

密级：内部 5 年

论文编号：

中国农业科学院

学位论文

小麦耐盐相关新基因 *TaFbox* 的功能鉴定
及其进化分析

**Identification of a novel gene *TaFbox* related to salt tolerance
and its evolution analysis**

博士研究生：温小杰

指导教师：刘旭 研究员

张学勇 研究员

申请学位类别：农学博士

专 业：作物遗传育种

研 究 方 向：小麦抗逆分子生物学

培 养 单 位：中国农业科学院研究生院

作物科学研究所

提交日期 2007 年 6 月

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**Identification of a novel gene *TaFbox* related to salt tolerance
and its evolution analysis**

Ph.D Candidate: Wen Xiao-Jie

Supervisor: Prof. Liu Xu

Prof. Zhang Xue-Yong

Degree: Doctor of Agricultural Sciences

Major: Crop Genetic and Breeding

Specialty: Molecular Biology of Plant Stress Resistance

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 温小杰

时间： 2007年6月14日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名： 温小杰

时间： 2007年6月14日

导师签名： 刘旭

时间： 2007年6月14日

中国农业科学院

博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表

论文题目		小麦耐盐相关新基因 <i>TaFbox</i> 的功能鉴定及其进化分析			
论文作者	温小杰	专业	作物遗传育种	研究方向	小麦抗逆分子生物学
指导教师	刘旭	研究员	培养单位(研究所、中心)		作物科学研究所
姓名	职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人		硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			/
		硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			/
		硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			/
答 辩 主 席	董玉琛	院 士	中国农业科学院 作物科学研究所	作物种质资源	董玉琛
答 辩 委 员	张劲松	研究员	中国科学院生物 遗传与发育研究所	植物抗逆的分子机制 及功能研究	张劲松
	刘志勇	教 授	中国农业大学农学 与生物技术学院	小麦基因组学	刘志勇
	毛 龙	研究员	中国农业科学院作 物科学研究所	生物信息学	毛 龙
	黄荣峰	研究员	中国农业科学院生 物技术研究所	植物抗逆分子生物学	黄荣峰
	张增艳	研究员	中国农业科学院作 物科学研究所	小麦分子育种	张增艳
	孔秀英	研究员	中国农业科学院作 物科学研究所	小麦基因组学	孔秀英
			硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>		
会议记录(秘书)		刘朝			
论文答辩时间地点		2007年6月14日上午8:30, 重大科学工程楼220室			

摘 要

盐胁迫严重影响植物生长，因此，如何提高作物的耐盐性、有效地利用盐渍土就显得尤为重要。克隆与耐盐性相关的基因，研究其功能及抗逆分子机制，对于进一步培育耐盐作物品种具有十分重要的理论和实践意义。本课题组利用cDNA-AFLP方法获得了小麦盐胁迫差异表达片段，并进行RACE扩增，得到了*TaFbox*基因的全长序列，本论文在此基础上对其功能进行初步鉴定，并在小麦及其基因组供体间进行基因序列分析，取得了如下进展：

- (1) 转*TaFbox*基因拟南芥对NaCl和甘露醇表现出较强的耐受性，随着胁迫时间的延长和胁迫浓度的增强，转基因植株与非转基因植株的耐逆性差异越来越明显，表明*TaFbox*基因与耐盐及耐旱等非生物胁迫有关。生物信息学分析表明，该基因具有内向型和外向型跨膜区，利用GFP融合蛋白表达载体转化洋葱表皮细胞进行定位分析将该基因定位在细胞膜上，与其充当反应受体相吻合。
- (2) *TaFbox*基因组扩增表明该基因不含内含子，在小麦及其基因组供体材料内存在多态性，所有序列保守性很高，相似性达94%，差异除了有6个碱基（该序列命名为*TaFbox2*）的插入外，其余都为个别碱基的突变，有的拷贝由于碱基的突变只能编码200多个氨基酸，但仍具有*F-box*结构域。每种材料内都存在与*TaFbox*基因完全一致的序列，推测该基因是比较原始的序列。鉴于两种类型的基因在所有材料中存在，推测该基因在小麦二倍体祖先形成早期就已经存在。
- (3) *TaFbox*和*TaFbox2*基因原核表达蛋白与预测结果一致，分子量差异不明显，利用两个基因的特异引物进行RT-PCR分析，它们都受非生物胁迫的诱导，但诱导模式存在一定的差异。由于基因的保守性很高，其上游序列的差异对其表达差异可能存在更大影响。
- (4) 对 *TaFboxs* 基因的上游序列在小麦及亲缘材料间比较分析，上游序列间的差异明显高于编码区，相似性只有 76%，多为插入或缺失型突变，靠近基因的位置保守性高，差异主要集中在-500bp 以外的区域，可能影响到基因的表达模式。中国春的上游序列与栽培二粒及粗山羊草具有较高的相似性，这与六倍体小麦的形成相吻合。
- (5) 从中国春 BAC 文库中筛选到一个阳性克隆，鸟枪法 (shotgun) 测序拼接后得到 95kb 的序列，分析发现 *TaFbox* 基因有三个拷贝串联存在，与基因组测序结果一致，序列间存在高度的相似性 (91%)。由于碱基的突变序列提前出现终止密码子，第一、二个拷贝不能编码完整的氨基酸序列，第二个拷贝与 *TaFbox2* 具有极高的相似性，第三个拷贝与克隆的 *TaFbox* 基因完全一致。结合 Southern 杂交结果，推测该基因在每一个基因组中存在 3 个拷贝，该基因在基因组内的多态性是由于三个拷贝间的差异造成的。
- (6) 结合 BAC 克隆 *TaFbox* 基因的上游序列扩增结果和测序结果表明，第二和第三个拷贝的上游序列与 AB 组的相似性要高于 D 组，推测该 BAC 来自小麦的 A 组或 B 组。三个拷贝同

样在上游序列间存在较大差异，相似性只有 64%，所含转录元件结合位点的种类和数量存在差异，这将对其下游基因的表达和调控产生差异。第三个拷贝前有一个 Non-LTR 型反转录转座子插入，前两个拷贝上游序列中各有一个 MITE 元件插入，与基因组进化及下游基因的表达调控有关。

- (7) 小麦 BAC 克隆预测的结果与水稻、小麦和大麦的共线性区域进行比较，发现 BAC 上的基因在三个物种间存在明显的共线性，小麦和大麦更为接近。相关的水稻 BAC 位于第 7 染色体，大麦 BAC 位于第 2 染色体，利用中国春缺-四体和中国春-比萨偃麦草附加系，将该基因家族定位于第 2 部分同源群染色体上，基因组学分析与遗传学分析的结果相吻合。

关键词：小麦；耐盐性；*TaFbox*；BAC 测序；进化

Abstract

Salt stress can limit the crop growth severely, so it is very important to improve crop resistance to salt. To isolate the related genes and make research on their function and mechanism is one of the most efficient methods. In our previous studies a wheat mRNA fragment was obtained, which was differential expressing under salt stress and no-stress. Full sequence of *TaFbox* was obtained by RACE. Transformation of *Arabidopsis* was carried out to illustrate function of *TaFbox*, and full sequences of homology genes from wheat and its relatives were analyzed to explore the molecular origin and evolution relationships. The research progresses are as follows:

- (1) The transgenic *Arabidopsis* had stronger viability under NaCl and mannitol stress. With the increase of stress time and stress strength, the differences between transgenic plants and no-transgenic plants were more obvious, which showed *TaFbox* was related to improvement of tolerance to abiotic stress, such as salt and drought. Bioinformatics analysis predicted that there was an outside and an inside transmembrane domains in *TaFbox*. *TaFbox*-GFP fusion protein was localized on the cell membrane by expression in onion epidermal cell, which was consistent with its function as a response receptor.
- (2) No intron was detected in *TaFbox* and there was diversity among the sequences from the same diploid accession. The sequences were highly conservative with the similarity 94%. The most obvious difference was one 6 base pair insertion named as *TaFbox2*. Some sequences could not code full amino acids because of mutation (pseudogene) but they still had F-box domain. There was one sequence identical with *TaFbox* shared by all materials, which maybe the ancestor sequence. The sequence difference between *TaFbox* and *TaFbox2* might occur in the common ancestor of the **A**, **B** and **D** genome.
- (3) There was no obvious difference between *TaFbox* and *TaFbox2* in the amino acid content and molecular weight. The results of RT-PCR showed that the expression of *TaFboxs* was up-regulated by salt stress, and their expression patterns were different which maybe because of the differences in their up-stream sequences.
- (4) There were more differences in up-stream sequences than in the gene's with the similarity 76%. The variation often occurred outside of -500bp of the ATG with segment insertion or deletion. One of sequences isolated from CS had higher similarity to those from *T. dicoccum* (**AB**), and the other one to that from *Ae. tauschii* (**D**). This indicated that hexaploid wheat inherited the *TaFbox* genes of both tetraploid wheat and that of *Ae. tauschii*, which was consistent with evolution of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.).
- (5) A positive BAC single clone was screened out and the 95kb insertion was fully sequenced by

shotgun. There were three copies of *TaFbox* existing tandemly within the 95kb insertion. Similarly, the sequences were highly conserved with the similarity 91% and the first two copies could not code full amino acids. The nucleotide sequence of the second had higher similarity with *TaFbox2* and the third was identical with *TaFbox* completely. After consideration of the Southern blotting results, we suggested the *TaFbox* has three copies in each genome, and the diversity of the sequences within each genome was caused by the differentiation of the three copies.

- (6) Based on the results of PCR amplification of *TaFbox* in BAC and BAC clone sequence, we found that the up-stream sequences of the second and the third copies had high similarity with the CS-UP and CS-UP2' which had higher similarity with those from **AB** genome, so the BAC sequence was from either **A** or **B** genome of wheat. There were more differences among the up-stream sequences, with the similarity 64%. The major difference in the kinds and the number of transcript factor binding sites might affect the regulation and expression of down-stream gene. A Non-LTR Line retrotranspon inserted in front of the third copy, a MITE transposon inserted in up-stream of the first and the second copy respectively, which was also related to the evolution and expression of the gene.
- (7) Synteny analysis in wheat, barley (*Hordeum vulgare* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) showed there were some colinear relationships among them and the wheat is much closer to barley. The *O. sativa* BAC clone was mapped on chromosome 7, the *H. vulgare* BAC clone on chromosome 2, while the *T.aestivum* BAC clone was mapped on homoeologous group 2 by CS nullisomic-tetrasomic and CS-*Th.bessarabicum* addition lines, which was also indicated that genomic result was consistent with that of the genetics.

Key word: Wheat, salt-tolerance, *TaFbox* gene, BAC sequence, evolution

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 盐胁迫对植物的伤害	1
1.2 植物的耐盐机制	2
1.2.1 植物的拒盐机制	2
1.2.2 植物的耐盐机制	3
1.3 植物盐胁迫的信号传导途径	9
1.3.1 促分裂原激活蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径	10
1.3.2 钙依赖蛋白激酶 (Ca ²⁺ -dependent protein kinase, CDPK) 途径	11
1.3.3 SOS 信号途径	11
1.4 泛素途径研究进展	12
1.4.1 泛素及其蛋白酶系统	12
1.4.2 F-box 蛋白在植物生长发育中的作用	13
1.5 本论文研究目的、意义及技术路线	19
1.5.1 研究目的及意义	19
1.5.2 技术路线	19
第二章 <i>TaFbox</i> 基因功能的初步鉴定	20
2.1 材料与方法	20
2.1.1 实验材料	20
2.1.2 实验方法	21
2.2 结果与分析	31
2.2.1 <i>TaFbox</i> 基因保守结构分析	31
2.2.2 GFP 融合蛋白亚细胞定位分析	32
2.2.2 RD29A 启动子的克隆与分析鉴定	34
2.2.3 <i>TaFbox</i> 基因的功能鉴定	36
2.3 讨论	40
第三章 <i>TaFbox</i> 在小麦及亲缘供体种间的分析	42
3.1 材料与方法	42
3.1.1 实验材料	42
3.1.2 实验方法	43

3.2 结果与分析	49
3.2.1 <i>TaFbox</i> 基因在近缘种材料间的克隆分析.....	49
3.2.2 <i>TaFbox</i> 和 <i>TaFbox2</i> 表达分析.....	51
3.2.3 <i>TaFbox</i> 基因上游序列的克隆与分析.....	54
3.2.4 <i>TaFboxs</i> 基因的染色体定位	57
3.3 讨论	58
第四章 BAC 克隆的测序分析	60
4.1 材料与方法	60
4.1.1 试验材料	60
4.1.2 试验方法	60
4.2 结果与分析	68
4.2.1 BAC 文库的筛选.....	68
4.2.2 Shotgun 文库构建.....	69
4.2.3 BAC 克隆序列组装拼接	71
4.2.4 <i>TaFbox</i> 基因拷贝数分析	71
4.2.5 MITE 转座元件插入分析.....	76
4.2.6 水稻、大麦和小麦共线性分析	77
4.3 讨论	79
第五章 全文结论	81
参考文献	83
致谢.....	100
作者简历	101

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
BAC	Bacterial artificial chromosome	酵母人工染色体
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA-AFLP	cDNA amplified fragment length polymorphism	cDNA 扩增片段长度多态性
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide	溴代十六烷基三甲胺
DEPC	Diethylphyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
EDTA	Ethylene diaminetetracetic acid	乙二胺四乙酸
IPTG	Isoprophl- β -D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
KDa	Kilo Dalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani 培养基
MS	Murashige-Skoog	MS 培养基
OD	Optical density	光密度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis	脉冲场凝胶电泳
RACE	rapid amplification of cDNA ends	快速扩增 cDNA 末端
Rif	Rifampin	利福平
rpm	Rounds per minute	转/分
RT-PCR	Reverse transcription PCR	反转录 PCR
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
SSC	Standard saline citrate	标准柠檬酸盐溶液
TEMED	N,N,N',N'-TetraMethylEne Diamine	N,N,N',N'-四甲基二乙胺
Tris	Trishydroxymethylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
U	Unit	单位
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranodide	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D 半乳糖苷

第一章 文献综述

摘要: 盐胁迫严重影响植物生长, 因此, 如何有效地利用盐渍土、提高作物的耐盐性就显得尤为重要。而分离克隆与耐盐性相关的基因, 研究其功能及抗逆分子机制对于进一步利用分子育种方法培育耐盐作物品种具有重要意义。泛素介导的蛋白质降解是真核生物许多生理过程调控的关键环节, 近年来越来越受到大家的关注。SCF复合体是一种重要的泛素连接酶, 由四个亚基组成, F-box蛋白的N端有一个由40-50个氨基酸组成的F-box结构域, 决定泛素化蛋白底物的特异性识别, 在降解过程中发挥了关键作用。F-box蛋白质介导的泛素化蛋白质降解途径是植物基因表达调控非常重要的机制。本章综述了盐胁迫对植物的伤害、耐性机制及信号传导途径等方面研究进展, 并介绍了F-box蛋白在植物信号传导及生长发育过程中的作用, 在此基础上提出了本论文围绕*TaFbox*进行研究的意义及主要技术路线。

环境胁迫是影响植物生长的重要因素之一, 其中以盐渍化和干旱最为严重。盐渍土是各种盐土、碱土及其它不同程度盐化和碱化的土壤的总称, 盐渍土在世界各大洲都有分布, 约占地球陆地面积的10%, 在1.5亿ha耕地中, 0.77亿ha (约5%) 受到盐害的影响 (Munns et al. 1999), 土壤盐渍化已经成为一个倍受关注的全球性问题。我国也存在大面积的盐碱地, 约0.27亿ha, 其中0.06亿ha为耕地, 占耕地总面积的8.5%, 是世界盐碱地大国之一 (王宝山等, 1997)。近年来, 随着人口剧增、水资源缺乏、工业污染及人为灌溉不当, 耕地盐渍化倾向比较突出。土壤盐渍化对农业的威胁是一个全球性的问题, 盐碱对作物生长存在很大抑制作用, 通常土壤中含盐量为0.2-0.5%时就会影响植物的正常生长, 严重时将导致植物萎蔫甚至死亡。这不仅造成农作物严重减产, 也给生态环境造成巨大破坏。如何利用大面积的盐碱地和丰富的咸水资源发展农业, 是迫切需要解决的重大课题。主要有两条途径: 一是通过农业工程措施改良土壤, 降低土壤盐分; 另一种是走生物学路线, 利用生物工程技术提高作物的抗逆性以改良和利用盐渍化土壤。相比之下, 第二种是较经济有效的途径, 分离与耐盐性相关的基因, 并研究其功能及抗逆分子机制, 从而寻找提高植物耐盐性的途径和方法, 对于进一步利用分子育种方法培育耐盐作物品种具有重要意义。

1.1 盐胁迫对植物的伤害

盐胁迫使植物的生长受抑制、光合作用下降、能量消耗增加、生长量降低、衰老加速、最终导致植株因饥饿而死亡。从能量代谢的角度分析, 盐胁迫下植物生长量减少的原因主要有三个方面: 一是光合作用降低, 碳同化减少; 二是渗透调节物质的合成和积累是巨大的耗能过程; 三是维持渗透势是一个耗能的过程。

盐分对植物的伤害机制有两种: 一是离子伤害即原初盐害, 盐胁迫下, 植物被迫吸收盐离子, 由于盐离子的毒害作用, 造成活性氧等自由基产生和修复系统的动态平衡被破坏, 启动了膜脂过氧化或膜蛋白过氧化作用, 造成膜脂或膜蛋白损伤, 从而破坏膜结构, 使质膜的透性增加, 胞内

水溶性物质外渗,植物表现出盐害特征,进而干扰正常的生理代谢,使光合作用降低、呼吸作用加强、蛋白质合成降低、氮素代谢异常等。离子毒害主要是由于植物摄取了过量的 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等离子使植物细胞内离子浓度增高,而细胞内许多酶却只能在很狭窄的离子浓度范围才具有活性,对于 K^+ 离子而言是0.1-0.2M,对于 Na^+ 和 Cl^- 离子则要求低于50mM。Zhu等(1998)应用拟南芥盐敏感突变体研究认为,在NaCl胁迫下三种突变体细胞内的 K^+ 均低于野生型的拟南芥,人为造成突变体对盐敏感的主要原因是 K^+ 的吸收不足而不是 Na^+ 毒害;在盐胁迫下,高浓度的 Na^+ 造成根系对 K^+ 吸收的竞争性抑制。Ishitani等(2000)也得到类似结果。而Arbona等(2003)认为,高盐浓度下枳橙(*Carrizo citrange*)中有害影响主要来自细胞内的 Cl^- 毒害而非盐诱导的氧化胁迫。二是渗透胁迫即次生盐害。土壤中的盐分使土壤溶液的水势降低,通过渗透效应导致植物细胞脱水,植物吸水困难造成“生理干旱”,从而表现出旱害特征。而且由于离子间的竞争引起的某些营养元素的缺乏,在盐渍化条件下植株体难以吸收无机态氮,降低了氨基酸和蛋白质的合成,研究表明盐胁迫还可以显著降低棉苗对钙、镁、铜、锌、铁、钾的吸收(陈亚华等,2001)。因此,盐分胁迫导致伤害的大致过程是:盐胁迫→生理干旱、离子毒害和营养失调→影响生理生化代谢→影响植物的生长发育→影响植物的生物学产量和经济产量。

1.2 植物的耐盐机制

长期的适应性选择,使植物对盐和其它化学物质的胁迫产生一定的抵抗能力。盐生植物主要有吸盐型和拒盐型两种,吸盐型植物将进入体内的盐分通过细胞的离子区域化作用积累在液泡中,或通过组织的肉质化冲淡盐离子对植物的毒害,容易破坏细胞内的离子平衡,引起离子毒害和必需元素的缺乏;拒盐型植物则通过对离子的选择性吸收和适度控制盐分在不同组织、器官或细胞的不均一分配,来降低细胞内的离子浓度,减轻胁迫压力。另外,也存在泌盐型盐生植物,其依赖于叶片或茎上盐腺的分泌作用,将体内过剩的盐分分泌到体外或储存到盐囊泡中(Lipshitz and waisel, 1974)。

1.2.1 植物的拒盐机制

所谓拒盐是指在盐胁迫条件下不让外界盐分过多地进入植物体内,从而避免盐分胁迫。植物拒盐涉及以下过程(Drew et al. 1985):①植物根细胞不吸收 Na^+ ,即使有 Na^+ 进入细胞也可通过 Na^+/H^+ 质子泵将其排出胞外,内皮层细胞内的 Na^+ 也同样被排出,这可能与植物的细胞质膜有关;②植物把吸收的 Na^+ 贮存封闭于根、茎基部、节、叶鞘等处薄壁细胞的中央液泡中,阻止 Na^+ 向叶片运输;③吸收的 Na^+ 在木质部向上运输过程中被木质部或韧皮部传递细胞吸收,被分泌到韧皮部中运回根部,再排到环境中;④在NaCl胁迫下,由于植物对无机离子的选择吸收,尤其是 Na^+/K^+ 的选择吸收,植物吸收的 Na^+ 向地上部、特别是向叶片和果实的运输选择性降低,而 K^+ 运输选择性增加。Glenn等(1992)证明,在很多盐生植物中,选择吸收 K^+ 与植物的抗盐性密切相关。许多植物的延伸组织中含有较高浓度的 K^+ ,这可能与该植物的抗盐性有很大关系。植物细胞质中

必须维持适当的 K^+/Na^+ 比例以保证植物正常生长。保持胞质 K^+ 浓度,对于植物的生长及耐盐性都是非常必要的。植物细胞膜上至少存在两种 K^+ 吸收系统:一是低亲和 K^+ 吸收系统,随浓度梯度由高向低运输 K^+ ;二是高亲和 K^+ 吸收系统,能逆浓度梯度运输 K^+ ,在受到盐胁迫时, K^+ 的吸收由低亲和系统转为高亲和系统,从而减少 Na^+ 的吸收并增强 K^+ 的吸收(Dvorak and Gorham, 1992; Rubio et al. 1995)。小麦为典型的拒盐型植物(王宝山等, 1997),在一定的盐胁迫条件下,首先,小麦根毛区内皮层的U形casparian带阻碍 Na^+ 的运输, Na^+ 即使进入细胞也可通过 Na^+/H^+ 泵再排出;其次,吸收的 Na^+ 能够贮存于根和根茎结合部等部位,降低地上部的 Na^+ 含量,从而减轻 Na^+ 对地上部的伤害。另外,小麦根部吸收的 Na^+ 在向上运输的过程中被木质部或韧皮部传递细胞吸收并分泌到韧皮部中再运回根部,最后分泌到环境中。

1.2.2 植物的耐盐机制

耐盐,是指植物体可全部或部分承受盐胁迫而不引起伤害或伤害轻微的能力。在组织中盐分浓度相等的情况下,具有耐盐能力的植物比其它植物生长要好。目前研究的目的是为了增强植物的耐盐能力。

1.2.2.1 调节 Na^+ 在体内的分布

Na^+ 能破坏 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子的结合位点(Serrano, 1994),植物消除 Na^+ 毒害的策略包括:降低 Na^+ 的吸收、增加 Na^+ 的外排和 Na^+ 的区隔化。耐盐植物与盐敏感植物的差异在于耐盐植物中的 Na^+ 和 Cl^- 向叶子中的运输速率低,而且能够将这些离子运输到液泡中防止它们在细胞质或细胞壁中聚集从而避免盐害(Munns, 1993)。沈义国等(2001)认为,由 $NaCl$ 引起的盐胁迫不仅破坏了植物细胞中业已形成的 Na^+ 和 Cl^- 的平衡状态,而且也影响着 K^+ 和 Ca^{2+} 的胞内分布。大量的膜蛋白(H-ATPase类、焦磷酸酶、 Ca^{2+} -ATPase类、二级转运蛋白及各种通道蛋白)被激活并参与重建膜内外离子平衡。其简略的过程为: Na^+ 通过 Na^+-K^+ 共转运蛋白等通道大量涌入胞质, H^+ -ATPase、 Na^+/H^+ 反向转运蛋白等被激活,协调工作以驱动 Na^+ 外排和运入液泡,最终形成胞外、胞质、液泡三者间的离子平衡。

Na^+ 的内流

Na^+ 的内流是一个被动的过程。 Na^+ 摄入的一个重要途径是通过非选择性的阳离子通道,环核苷酸门控通道(CNGCs)和推测的谷氨酸激活的通道(GLRs)这两个非选择性阳离子通道已得到验证,但它们的调控机制至今还不清楚。小麦LCT1(low-affinity cation transporter)基因的表达可以使多种阳离子的摄入增加,并且该基因对 Na^+ 具有超敏感性(Amtmann et al. 2001)。 Na^+ 的摄入可能还有其它途径,如通过由HKT基因家族编码的转运体或通道蛋白。细胞膜上有两种不同的 K^+ 吸收系统,即低亲和 K^+ 吸收系统(LCT)和高亲和 K^+ 吸收系统(HKT), Na^+ 可与 K^+ 竞争并通过 K^+ 吸收系统进入细胞内,拟南芥和Eucalyptus同源基因ATHKT1、EcHKT1和EcHKT2在非洲爪蟾卵母细胞中的表达研究表明,在植物中该基因可能涉及低亲和的 Na^+ 摄入(Uozumi et al. 2000;

Liu et al. 2001)。Rubio等(1999)研究表明,小麦的*HKT1*是一个 Na^+ - H^+ 依赖性 K^+ 运输蛋白。对*HKT1*进行修饰可增加 K^+ 的运输,同时也使 Na^+ 内流减少,从而提高植物的耐盐性。拟南芥*AtHKT1*可能是一个 Na^+ 内流系统,控制 Na^+ 进入木质部并向其它部位运输(Rus et al. 2001)。Zhu(2002)也认为*HKT1*是在钙结合蛋白SOS3的调控下,并且在盐渍条件下表达被抑制。Rus等(2004)利用SOS突变体研究*AtHKT1*对 Na^+ 和 K^+ 吸收的影响发现该基因起到稳定细胞内 Na^+ 的水平,进而调节 K^+ 的营养。

Na^+ 的外排

Na^+ 从细胞内排出需要逆其电势转运,是一个主动运输的过程。胞质内过多的 Na^+ 排出胞外主要由质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白,利用质膜型 H^+ -ATPase和 H^+ -PPase产生的质子电化学梯度完成。质膜 H^+ -ATPase水解ATP提供能量,使 H^+ 顺势进入细胞,同时 Na^+ 逆势排出细胞(Rodriguez, 1997)。最近克隆的*SOS1*基因编码拟南芥质膜上的 Na^+/H^+ 反向运输蛋白,其过量表达可提高转基因植株的耐盐性(Shi et al. 2003)。Zorb等(2005)从玉米中克隆到5个*NHX*基因,在一个玉米的重组近交系中,*NHX*基因的表达水平与 NaCl 浓度呈线性关系。

盐离子的区隔化

植物在受到盐胁迫时,往往把盐从细胞质和细胞器中转移到液泡中,这种现象称为盐离子的区隔化。通过区隔化作用,一方面使渗透压保持一定梯度,让水分进入细胞;另一方面维持细胞质中正常的盐浓度,避免高浓度盐离子对膜系统的伤害,保持生物酶的活性,维持细胞内的离子平衡。离子区隔化是植物普遍具有的能力,在盐生植物和非盐生植物中都存在离子区隔化。盐生植物一般将吸收的盐离子积累在液泡中而与维持正常的胞内渗透势,使细胞质免受盐离子的毒害。而非盐生植物一般尽量减少对有害盐离子的吸收,同时将吸收的盐离子输送到老的组织储存起来,以牺牲老的组织为代价,保护幼嫩组织,或者是在细胞质中合成有机小分子物质以平衡内外渗透势(Cheeseman, 1988)。 Na^+ 的胞质隔离进入液泡主要依赖液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白以及液泡型 H^+ -ATPase和 H^+ -PPase基因表达的上调或活性提高(Golldack and Dietz, 2001; Gaxiola et al. 2001; Shi and Zhu, 2002)。水稻的*OsNHX1*编码液泡膜 Na^+ , K^+/H^+ 反向运输蛋白,用高浓度的 NaCl 和 KCl 处理水稻,该基因在根和芽中的转录水平提高;转基因植株的耐盐性增强(Fukuda et al. 2004)。拟南芥中的*SOS1*编码质膜 Na^+/H^+ 反向运输蛋白,研究表明液泡膜上的反向运输蛋白 Na^+/H^+ 也受SOS信号传导途径的调控(Qiu et al. 2003)。盐胁迫可以增强拟南芥*AtNHX1*基因的表达,并且具有组织特异性,在叶中的转录水平比对照高4倍,而根中的转录水平与对照几乎没有差异(Quintero et al. 2000)。

1.2.2.2 小分子渗透物质合成

渗透调节(osmotic adjustment)能力是植物耐盐的最基本特征之一。参与盐渍中植物渗透调节过程的渗透调节物质基本上分为两大类,一是外界环境进入植物细胞内的无机离子,如 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Cl^- 等,只是这些离子浓度升高会对植物造成毒害;二是在细胞内合成的有机溶质。二者在

植物对盐胁迫的适应中都起着一定的作用 (Hall et al. 1978; Zhao et al. 1999), 但调节渗透势的主要手段是合成有机物质, 这些物质被称为渗透剂 (osmolyte) 或渗透保护剂 (osmoprotectant), 包括脯氨酸、甜菜碱、多元醇、糖类等。它们在提高细胞内渗透压、降低 Na^+ 对酶活性抑制的同时, 能够清除活性氧, 从而有助于植物耐冷害、冻害、高温及干旱等胁迫 (Galinski, 1993; Shen et al. 1997; Kalir et al. 1981)。

脯氨酸 是植物中主要的小分子渗透调节物质之一, 而且是水溶性最大的氨基酸 (162.3g/100g H_2O , 25°C)。脯氨酸的积累可能是植物受到胁迫的一种信号, 许多植物在渗透条件下常通过积累脯氨酸来达到渗透调节的作用, 能积累十倍甚至百倍水平的脯氨酸 (Mansour, 1998)。脯氨酸不仅是生物大分子的保护剂或羟基的清除剂, 还是植物从胁迫条件回复正常过程中迅速、有效的氮源、碳源和还原剂。它还能稳定细胞蛋白质结构, 作为细胞的氮源和能量的代谢储存库。脯氨酸由谷氨酸通过P5C (δ^2 -吡啉-5羧酸) 合成酶 (P5CS) 和P5C还原酶 (P5CR) 催化合成, 同时脯氨酸可以经过脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 和P5C脱氢酶 (P5CDH) 转化成谷氨酸 (Yoshida et al. 1997)。而且, 研究表明脯氨酸在胁迫的条件下P5CS被诱导表达, ProDH的表达受到抑制, 即谷氨酸向脯氨酸的转变被激活; 相反, 胁迫消除后ProDH被诱导表达, P5CS受到抑制, 脯氨酸被迅速分解 (Yoshida et al. 1999)。Kavikishor等 (1989) 和Lilius等 (1996) 将吡咯啉-5-羧酸合成酶基因进行转基因研究, 发现脯氨酸含量明显提高, 且耐盐性也有所提高。Lin等 (1997) 在研究中发现拟南芥*sos1*突变体耐盐性高于野生型, 同时脯氨酸含量也高于野生型。干旱和高盐胁迫环境下, 植物的叶片和根部脯氨酸出现大量积累 (Sofa et al. 2004; Armengaud et al. 2004)。目前研究认为, 盐胁迫下脯氨酸的积累是由于脯氨酸合成的增加和其氧化代谢速率降低造成的 (Liu, 1997)。但孙金月等 (1997) 认为, 脯氨酸累积并不代表抗盐能力的大小, 不能作为抗盐生理指标。总之, 在盐胁迫条件下植物体内的脯氨酸合成及含量发生了明显的变化, 但关于脯氨酸含量与植物抗盐性的关系看法还不一致, 需作进一步的研究, 目前只能将其作为一种辅助指标慎重使用。

甜菜碱 是生物界广泛存在的细胞相溶性物质, 也是公认的在微生物和植物细胞中起着无毒渗透保护剂作用的主要次生代谢积累物之一, 一般高浓度盐对于酶的活性有抑制作用, 而甜菜碱的积累使许多代谢过程中的重要酶类在渗透胁迫下能继续保持活性 (Lilius, 1996)。甜菜碱广泛存在于高等植物中, 主要存储在叶绿体、微粒体和胞浆中, 在盐害下积累甜菜碱进行渗透调节, 对三羧酸循环的关键酶和光合作用具有保护作用 (Rhodes et al. 1993)。许多生物在盐碱、水分和低温胁迫下, 能诱导甜菜碱醛脱氢酶基因表达, 积累甜菜碱类物质来维持细胞的正常膨压。植物体内甜菜碱的合成分别在胆碱脱氢酶 (choline dehydrogenase, CDH) 和甜菜碱醛脱氢酶 (betaine aldehyde dehydrogenase, BADH) 的作用下通过两步氧化实现, 胆碱→甜菜碱醛→甜菜碱, 第一步是甜菜碱生物合成的限速反应 (Russell et al. 1998; Holmstrom et al. 2000)。植物碱合成后几乎不再被进一步代谢 (Lilius, 1996), 属于永久性或半永久性渗透调节剂, 是最有希望的渗透保护剂之一, 在植物抗盐研究中已越来越受到重视 (Hidenori H, 1997)。沈义国等 (2001) 用菠

菜CMO cDNA为探针克隆了山菠菜的CMO基因，并获得了耐盐性提高的转CMO基因烟草植株。甜菜碱的积累受各种生物和非生物胁迫的诱导（Nakamura et al. 1997；Gao et al. 2004a, 2004b），转甜菜碱醛脱氢酶基因烟草中甜菜碱的含量增加，对盐和干旱胁迫的抗性也随之增加。

多元醇 含多个羟基，亲水性强，能够有效地维持细胞内水活度，从而有效地抵抗盐胁迫下的渗透脱水。归纳起来有三方面作用：(1)作为代谢产物；(2)抗氧化剂，最近的研究表明，甘露醇和山梨醇具有清除羟自由基的能力，保护细胞免受羟自由基的损伤。(3)作为细胞渗透调节物质。包括甘露醇、山梨醇、环状多元醇、肌醇和它的衍生物等。大肠杆菌编码的甘露醇代谢的关键酶1-磷酸-甘露醇脱氢酶的基因（*mtlD*）是由Tarczynski（1993）从大肠杆菌中克隆到的，随后将该基因转入烟草中，高浓度盐分下，转*mtlD*基因的植株能检测到甘露醇，对高盐有较高的耐受性（如长新根和花），并且植物鲜重和株高都有所增加。导入的1-磷酸-甘露醇脱氢酶基因定位于叶绿体，可使烟草植株抵抗氧化性逆境（Tarczynski, 1993；刘俊君等, 1996）。转大肠杆菌6-磷酸山梨醇脱氢酶基因（*gut D*）的植株高度耐盐（刘岩等, 1998）。肌醇及其甲基衍生物的合成也是耐盐基因工程的目标。负责肌醇向甲基化肌醇转化的酶即肌醇-O-甲基转移酶（Inositol-O-methyltransferase）的基因（*Imt1*），编码该酶的基因已经得到克隆，在冰叶日中花发育的任何阶段都严格受环境控制，只在盐胁迫和低温下被诱导。其转基因植物对盐害和干旱有一定的抗性。研究发现，在盐胁迫下转基因植物的光合作用CO₂固定能力受抑制的程度比对照小，而且恢复较快（Vcmon et al. 1993；Sheveleva et al. 1997）。

糖类 也是受到盐胁迫时常常积累的小分子有机物，如海藻糖、果聚糖、蔗糖等。它们既是一种储藏性碳水化合物，又能作为渗透调节剂保护生物细胞和生物活性物质在不良环境条件下免遭破坏。ABA调控成果聚糖所需的关键酶FEH（fructan exohydrolase）的转录，在逆境胁迫中起着重要的作用。小麦、燕麦等作物的茎、叶中也能成果聚糖（Pollock et al. 1991）。海藻糖广泛存在于低等生物中，对于其度过水分胁迫起着至关重要的作用。在某些极端耐旱的植物中发现了海藻糖的存在（Bianchi, 1993），海藻糖-6-磷酸合成酶基因（*TPS*）受干旱、高盐和重金属等胁迫诱导。将大肠杆菌的*TPS*和海藻糖-6-磷酸酯酶（*TPP*）融合后转入水稻，转基因植株耐盐、耐旱和耐冷能力增强（Jang et al. 2003）。Garcia等（1997）发现水稻在盐胁迫下可积累一定量的海藻糖，外加海藻糖可以减少Na⁺积累，防止叶绿素的降解，保护根的完整性并促进生长。最近，将来源于Grifola Frondosa的海藻糖转到烟草中，明显地提高了抗旱性和耐盐性（Zhang et al. 2005）。区隔化作用是由基因控制的，但同时也受细胞质中有机渗透溶质和ABA的影响（Guo, 1999）。

1.2.2.3 晚期胚胎发生富集蛋白（LEA 蛋白）

晚期胚胎发生丰富蛋白（late embryogenesis abundant, LEA蛋白）具有较高的亲水性、可溶性，是一种脱水保护剂（Chandler et al. 1994），在减少种子发育后期的衰老和提高抗性中具有重要作用（Close, 1997）。LEA蛋白分子量较小，富含甘氨酸、赖氨酸等亲水性氨基酸，具有很高

的亲水性和热稳定性, 在营养生长过程中被干旱、寒冷、ABA、盐渍和渗透胁迫诱导表达, 使植物能够在水分亏缺时保持细胞膜系统及生物大分子免受破坏 (Ramanjulu and Bartels, 2002)。LEA蛋白主要分为三类, 第一类是*Em*基因的产物; 第二类为脱水素 (dehydrins); 第三类LEA蛋白含有一个由串联的11氨基酸重复基序构成的亲水 α 螺旋结构。这类基因首先在休眠的种子中分离得到, 以后发现它们在脱水的胚, 水分胁迫、ABA、盐和寒冷处理的幼苗中也有表达 (Cattivelli et al. 2002)。大麦*HVA1*基因属于第三类LEA蛋白, 在转基因水稻中的表达证明该基因能增加水稻对盐胁迫的抗性, 在逆境下受害症状出现较迟, 且容易恢复, 可维持较高的生长速率 (Xu et al. 1996)。组成LEA蛋白的氨基酸亲水性的含量高, 缺乏半胱氨酸和色氨酸残基, 在正常的生理条件下, 其氨基酸残基多以无规则卷曲的形式存在, 有利于与水分子结合, 维持生命所需的最低量的水, 这种结构还有利于在失水过程中调节自身形状, 夹在细胞组分之间, 减少冰晶对细胞膜的损坏 (Bary, 1997)。Chourey等 (2003) 利用双向电泳的方法从水稻中分离出4个LEA蛋白, 这些蛋白在盐胁迫下大量积累, 解除盐胁迫后, LEA蛋白又被降解掉。Raynal等 (1999) 从拟南芥中克隆到两个新的LEA蛋白基因*AtM10*和*AtM17*, 这两个基因受ABA、盐和干旱的抑制, 冷害只能诱导*AtM17*的表达。将烟草中克隆到的LEA蛋白基因*le25*转化酵母, 转化体的耐盐性和冷害均得到改善 (Imai, 1996)。目前, 大多数研究者认为LEA蛋白通过保护细胞结构的完整性, 从而提高植物的抗性。Goyal等 (2005) 认为LEA蛋白可能是一种新型的分子伴侣, 可以防止在水分亏缺条件下大量受损蛋白的积累。

1.2.2.4 水通道蛋白 (Aquaporin)

在环境胁迫条件下, 水是最重要的因素之一, 水通道蛋白是一类具有选择性、高效运转水分子的跨膜通道蛋白, 它的分子量在25-30kD, 可以协助水分子从一个细胞进入另一个细胞, 不允许其它分子或离子通过, 介导细胞和介质之间快速的水分被动运输。胁迫信号能诱导水通道的数量增加或表达新的水通道, 达到响应水分胁迫的目的 (Yamaguchi-Shinozaki et al. 1992; Yamada et al. 1997)。Steudle等 (1995) 认为, 水通道蛋白可能起着阀门的作用, 它能可逆地提高水力导度, 并在不利的条件下促进植物吸水, 在植物生长发育过程中的细胞水分转运中起重要作用 (Maurel et al. 2001; Tournaire-Roux et al. 2003)。植物水通道蛋白根据来源可以分为3类: 质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)、液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic proteins, TIPs) 和NOD26类似的通道蛋白NLMS (Nodulin 26 like MIPs, NLMs)。水稻中分离的两个可能的的水通道蛋白基因*rMip1*和*rTip1*, 在水稻的苗期, 水分胁迫、盐胁迫及外源ABA作用下*rTip1*在叶片和根部的表达增强, 而*rMip1*只在叶片中表达 (Liu et al. 1994)。Yamada等 (1995) 从冰叶龙须海棠 (*Mesembrythemum Crystallinum*) 根的cDNA文库中分离了水通道蛋白基因, *MipA*、*MipC*在根和叶中表达, *MipB*仅在根中表达。在盐胁迫刚开始时, *MipA*、*MipB*、*MipC*表达水平降低, 随后又恢复到以前水平。*MipA*、*MipC*的mRNA水平的波动变化与盐胁迫下叶子的膨压变化相一致。向日葵*SunTIP7*基因的表达与其气孔运动高度相关, 以此来响应干旱胁迫 (Sarda et al. 1997)。

1.2.2.5 渗调蛋白

渗调蛋白是在盐胁迫、脱水或低水势条件下，植物对渗透压适应的过程中合成的一类蛋白。1983年Singh等人首次发现培养的盐烟草细胞在含NaCl的培养基上生长时，有一特异蛋白的表达。随后Singh等（1985，1987）报道，在筛选出的NaCl适应型的烟草细胞系中，存在58、37、35.5、34、26、21、19.5、18.5kD的盐适应蛋白，其中26kD蛋白积累最多，可达总蛋白量的12%。Ramagopal（1987）在生长于含NaCl培养基上的玉米愈伤组织中也发现合成了26.2、28.5和74kD的盐适应蛋白。1989年LaRosa把这种26kD蛋白称为调渗蛋白，随后获得了该蛋白的cDNA克隆。渗调蛋白是一种酸性蛋白，分为水溶型（渗调蛋白I）和去垢型（渗调蛋白II）两种，比例为2:3（Kononowicz et al. 1992）。目前在番茄、水稻、棉花、大豆等不同种属植物中均发现了分子量26kD左右的蛋白，虽然亲缘关系很远，但仍能进行免疫交叉反应，表明在进化过程中渗调蛋白具有高度的保守性（Singh et al. 1987）。目前已得到渗调蛋白启动子和葡萄糖苷醛酶报告基因嵌合在一起的转基因烟草，其在盐渍条件下渗调蛋白基因转录水平和转基因植物的抗性比对照都有明显的提高。渗调蛋白基因表达受转录后水平的调节，脱落酸诱导编码渗调蛋白mRNA的合成并使其稳定，但是只有渗调胁迫才能导致渗调蛋白的积累。

1.2.2.6 活性氧清除机制

当植物受到盐胁迫时，体内会产生大量的氧自由基，即活性氧（reactive oxygen species, ROS）（Hasegawa, 2000），从而引起膜脂的氧化伤害。植物体内存在抗氧化的过氧化酶系统，由超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）和抗坏血酸（ASA）等组成，它们协同起作用共同抵抗盐分胁迫诱导的氧化伤害。其中SOD是重要的抗氧化酶，在清除细胞内过多的活性氧方面起重要作用。在胁迫的条件下，细胞内会产生氧自由基（ $O^{\cdot-}$ ）、过氧化氢（ H_2O_2 ）和羟基自由基（ OH^{\cdot} ）等活性氧（ROS），导致氧化胁迫的产生，过氧化酶系统活动就会加强，以清除过多的活性氧。植物体内SOD等酶的活性与植物的抗氧化胁迫能力呈正相关，而且在盐分胁迫下，盐生植物与非盐生植物相比，其SOD、CAT、POD活性更高，因而更能有效地清除活性氧，阻抑膜脂过氧化（赵可夫等，1993）。Zn/Cu SOD 是定位于叶绿体中的超氧化物歧化酶，转Zn/Cu SOD基因烟草在氧化胁迫下较对照植株光合效率明显提高，植株对环境胁迫的抗性水平相应提高（Gupta et al. 1993; Mittler et al. 2002）。研究表明活性氧在ABA介导的一些胁迫信号传导中起着重要的作用（Pei et al. 2000; Zhang et al. 2001; Xiong et al. 2002）。

1.2.2.7 程序性死亡机制

程序性死亡（programmed cell death, PCD）是指在一定的发育时期和一定的外界条件下，细胞可以遵循自身的程序、主动结束其生命的过程，是细胞的生理性自杀行为，对保持周围组织的健康和正常生长具有十分重要的意义。它与细胞死亡不同，程序性死亡是自主的、对一定条件主动的反应，受基因控制。在植物发育过程中PCD普遍存在，与细胞分裂一样是植物体正常发育必

不可少的组成部分，也是植物体抵御病原体侵染、适应逆境胁迫的重要手段。近年来在植物上的研究迅速增加，迄今为止已经发现几种胁迫可以激活此反应（Houot et al. 2001；Leu et al. 2005；Boscolo et al. 2003；Yamamoto et al. 2002），在植物抵御不良环境的过程中发挥着重要作用。PCD是植物在长期的逆境中获得的一种适应性机制，具有重要的生物学意义。首先，受胁迫的根尖细胞通过局部细胞死亡而主动形成一道死亡细胞屏障，避免对其它组织的进一步侵害；其次，死细胞的DNA可主动降解为核苷酸，以让植物重新利用或者用来修复逆境胁迫所带来的伤害。因此推测，越是容易发生凋亡的植物，对外界的不良反应适应越快，其适应性也越强。

1.3 植物盐胁迫的信号传导途径

逆境胁迫与植物受体相互作用后，植物体内发生一系列生理生化变化的过程称之为信号传导。植物为适应各种外界环境刺激，以最大限度地减少逆境对自身的伤害，在长期的进化过程中，从对逆境信号的感知、胞间传导和传递到最终表达各种逆境基因，产生适应性，形成了一系列复杂的逆境信号传递的分子机制。逆境信号的传导由调控分子完成，位于效应分子的上游，包括转录因子和位于信号级联系统中的各种激酶（Paul et al. 2000）。在受到盐等胁迫下，植物体产生一系列盐应答效应分子，负责胁迫信号的传递，信号传导并非通过某一机制独立完成，而是形成一个调控网络，每一种信号感受器仅能调节某一方面胁迫信号传导途径的某一个分支，细胞中有更多的信号感受器来感知外界环境的胁迫，从而起始其它信号传导途径。然后经过第二信使的传递和胞内 Ca^{2+} 水平调节来起始一系列的蛋白磷酸化，最后通过转录因子的调控使直接参与细胞保护及修复的目的蛋白得以表达。这些基因的产物有些又参与了调控分子如植物激素ABA、乙烯和茉莉酸（SA）的生成，反过来这些调控分子反馈调控上述信号传导和更多的逆境信号分子（Xiong et al. 2002）。

虽然盐渍、水分和寒冷在自然属性上存在差异，而且使植物产生不同的反应，但它们也能激活一些共同的反应。细胞外部受到冻害后导致细胞内部脱水，而且在某些植物中，低温可以降低根部对水分的吸收与运输，普遍认为干旱和冷胁迫也导致渗透胁迫，这也是盐渍、干旱和寒冷能诱导一系列共同基因表达的原因所在。但盐分能对植物产生离子胁迫，导致的离子伤害与其它非生物胁迫如干旱和寒害的完全不同，植物体中存在专门针对离子胁迫的信号传导途径（Zhu, 2001）。Xiong等（2002）认为在冷胁迫、干旱胁迫和盐胁迫中信号传导网络分为3种主要类型：(I) 渗透胁迫和氧化胁迫使用MAPK模式；(II) 引起LEA-type基因活化的 Ca^{2+} 依赖信号途径；(III) 调节离子平衡的 Ca^{2+} 依赖SOS信号途径。Type I信号引起相容性渗透调节物质和抗氧化物质的合成，可能与细胞周期有关；Type II信号引起DRE/CRT和LEA-like基因活化；Type III信号盐胁迫下离子调节相关（图1-1）。

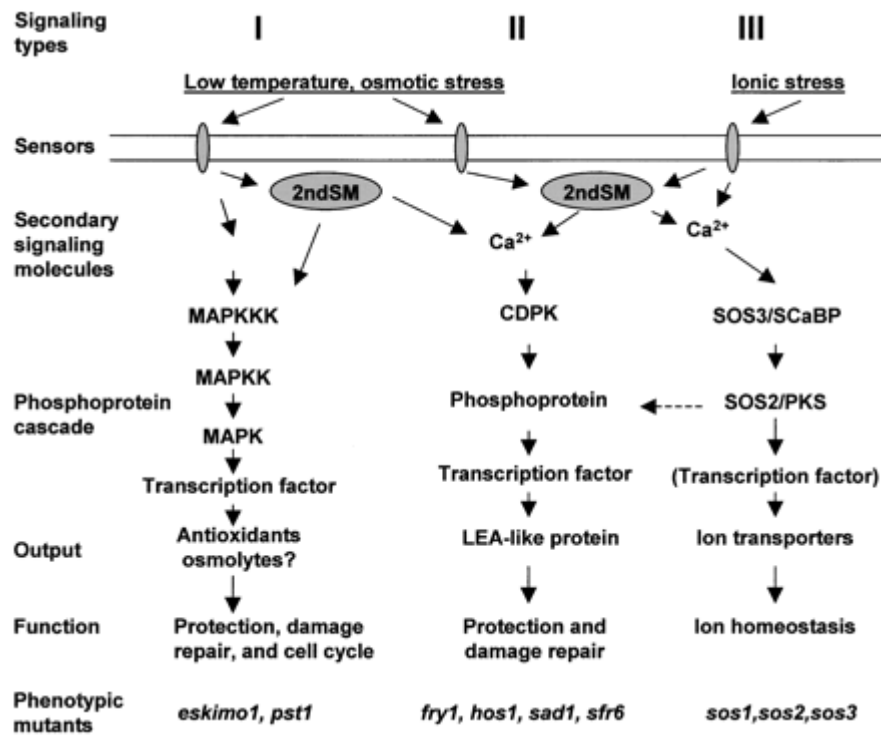


图1-1冷胁迫、干旱胁迫和盐胁迫中信号传导类型 (Xiong et al. 2002)

Fig.1-1 Major type of Signal for Plants during Cold, Drought and Salt Stress

1.3.1 促分裂原激活蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径

MAPKs是一类丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶, 广泛存在于真核生物中, 与一些其它的信号分子组成MAPK级联途径。MAPK级联途径有三类激酶组成并通过依次磷酸化将逆境信号传递下去, 即MAPKs→MAPKKs→MAPKKKs。近年来, 随着人们对植物体内MAPKs作用的深入研究, 越来越多实验证据表明它在植物细胞信号传导过程中起关键性作用。许多植物体内的MAPKs被诸如极端温度、干旱、盐分、植物激素、病原菌感染、紫外线辐射、以及活性氧类物质等环境刺激因子所激活 (Jonak et al. 1996; Kovtun et al. 1998; Borge et al. 1999; Mikolajczyk et al. 2000; Nakagami et al. 2004)。研究表明水稻中的*OsMAPK5a*可以在干旱、高盐、低温诱导及外源施加ABA时被激活, 并且在干旱和盐胁迫下*OsMAPK5a*在根中表达比在叶中早, 在低温诱导下也有少量表达, 这说明*OsMAPK5a*在时空表达上有一定差异 (Xiong et al. 2003)。作为MAPKs途径中的最上游基因, *MAPKKKs*也被证实参与了由环境胁迫引起的信号传递。Munnik等 (1999) 在苜蓿中发现了盐诱导表达的MAPK (SIMK)。以SIMK为诱饵, 采用酵母双杂交技术分离到了SIMK的上游蛋白激酶, 即SIMKK。实验证明, SIMKK无论在体内还是在体外都能特异激活SIMK, 且SIMKK能特异地对SIMK的丝氨酸/苏氨酸残基进行磷酸化 (Kiegerl et al. 2000)。将烟草中的*NPK1*基因转入玉米, 可以增强转基因玉米抵御干旱的能力, 并且在干旱条件下转基因玉米的光合效率比野生型高 (Shou et al. 2004a, 2004b)。

1.3.2 钙依赖蛋白激酶 (Ca²⁺-dependent protein kinase, CDPK) 途径

Ca²⁺作为植物细胞中最重要的第二信使,参与植物对许多逆境信号的传导(Gilroy et al. 2001)。在非生物逆境条件下,外界的这些环境刺激间接由膜上的受体发生感应,受体接到信号后,再通过膜上一系列磷酸化反应(主要是G蛋白、磷脂酶介导)激活膜上的钙离子通道,引起钙离子从钙库释放到细胞质,从而导致细胞质内钙离子浓度增加,即诱发产生钙信号(Sanders et al. 2002; Chinnusamy et al. 2004)。钙信号再通过其下游的钙结合蛋白进行感受和传导,进而在细胞内引起一系列的生物化学反应以适应或抵制各种逆境胁迫。CDPK家族有钙依赖蛋白激酶(CDPKs)家族、CDPK关联蛋白激酶(CPKs)家族、钙调素依赖蛋白激酶(CaMKs)家族、钙和钙调素依赖蛋白激酶家族(SnRKs)共4种类型(White et al. 2003)。该家族在结构上具有明显的特征,都具有典型的Ser/Thr蛋白激酶保守序列;不同的CDPK在调控区有差异,这种差异通过与不同特征“钙信号”特异反应来介导不同的钙信号。大量研究表明CDPK被生物和非生物胁迫所诱导激活,参与了胁迫信号传导。Urao等(1994)在拟南芥中克隆并测定了编码Ca依赖蛋白激酶(CDPK)的两个cDNA片段ATCDPK1和ATCDPK2。它们分别编码CDPK1和CDPK2两个蛋白质分子,并且在盐诱导条件下合成速度迅速增加。Saijo等(2000)研究发现水稻OsCDPK7基因的超量表达能够诱导与干旱、冷害及盐害有关基因的表达。Zhang等(2005a)在烟草中克隆得到的*NtCPK4*基因在赤霉素和盐处理条件下其表达显著增加,说明*NtCPK4*基因在调节植物对外界环境胁迫中起着重要作用。Rodriguez Milla等(2006)通过酵母双杂交方法得到了拟南芥AtCPK4和AtCPK11蛋白的作用底物AtDi19,它仅特异结合AtCPK4和AtCPK11蛋白,而与其它AtCPK蛋白成员结合很弱或者不结合,表明CDPK家族主要是通过调节底物并在下游形成多个支路将信号放大来调节信号传递。

1.3.3 SOS 信号途径

朱健康实验室的一系列关于SOS(salt overly sensitive)突变体的工作,揭示出一条盐胁迫反应中全新的信号通路。拟南芥SOS途径是目前研究最深入的植物耐盐机制,SOS途径中主要涉及3个关键基因:SOS3(Ca²⁺ binding protein)、SOS2(serine/threonine kinase)和SOS1(plasma membrane sited Na⁺/H⁺ antiporter)(Hasegawa et al. 2000; Zhu, 2000)。转录受盐正调控,而不受冷和ABA的影响,SOS1编码一个定位于质膜的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白(Na⁺/H⁺ antiporter),主要功能是将Na⁺从细胞质中排出(Shi et al. 2000; Zhu et al. 2001),同时SOS1的转录受SOS2和SOS3的控制,起到把Na⁺排出细胞外的作用(Shi et al. 2000);SOS2编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在N端具有催化结构域,C端具有调控结构域,这两个结构域相互作用,阻止底物进入催化中心(Liu et al. 2000; Guo et al. 2004),具有自我磷酸化的功能,调节体内Na⁺和K⁺的平衡,但依赖于SOS3和Ca²⁺的存在;SOS3编码Ca²⁺结合蛋白,感受盐胁迫引起的Ca²⁺浓度变化(Liu et al. 1998; Ishitani et al. 2000),其调控模式如图1-2所示(Chinnusamy et al. 2004)。除了调节SOS1的表达,SOS3-SOS2还可能调节其它盐胁迫效应器的表达(Uozumi et al. 2000)。有研究认为*HKT1*基因也受SOS3调控,在盐胁迫下,野生型植物中*HKT1*基因受到抑制(Zhu, 2002; Shi et al. 2002)。

此外, SOS3-SOS2 激酶复合体还能够激活 *AtNHX* 基因, 一个液泡膜 Na^+/H^+ 反向运输蛋白 (Qiu et al. 2004)。SOS3-SOS2 还特异调节其它基因的表达 (Gong et al. 2001)。

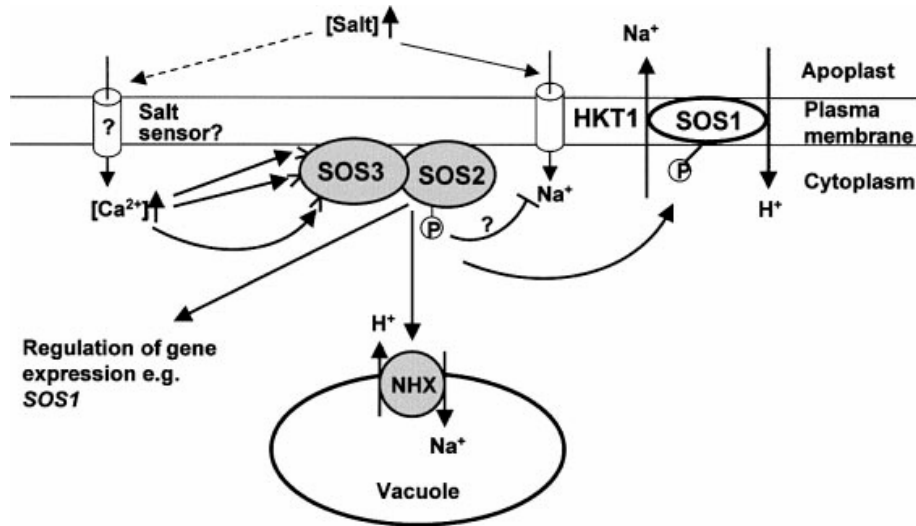


图 1-2 SOS 信号传导途径 (Chinnusamy et al. 2004)

Fig.1-2 SOS signal transduction pathway

1.4 泛素途径研究进展

高盐、低温、热激等外界不良条件以及植物体内自由基积累等因素都有可能导致细胞内蛋白变性或变构 (Belknap et al. 1996; Lee et al. 1998), 在特定条件下产生的调节蛋白, 完成相应的生物学功能后随即被迅速降解。此外, 蛋白质合成过程中也可能发生错误而产生一些异常蛋白, 这些异常蛋白的积累对细胞有毒害作用, 细胞内的蛋白降解是一个高度复杂、精密调控的系统, 该系统在细胞的生命和死亡过程中起着重要的作用。泛素-蛋白酶体途径 (Ubiquitin-Proteasome pathway) 是一个最近受到关注的调节蛋白质降解与功能的重要系统, 主要通过控制细胞中某些蛋白质, 如半衰期短的、变性的、异常的以及信号传导过程中的某些调节因子等参与多种生理生化过程 (Kampen et al. 1996), 同时, 泛素系统还参与一些膜受体蛋白的信号传递过程 (Ciechanover, 1994), 一些受体蛋白与相应的配体结合后随即被泛素系统识别并泛素化, 一般发生单泛素化或寡泛素化, 泛素化的受体蛋白并不随之被蛋白酶体降解而是作为一种活性物质激活细胞内相应的生理反应 (Glickman et al. 2002)。泛素蛋白酶体途径是目前已知的所有真核生物体内具有高度选择性的最为重要的蛋白质降解途径, 因此关于泛素化途径的研究于2004年获得诺贝尔化学奖。

1.4.1 泛素及其蛋白酶系统

泛素途径通过对相关蛋白水平的调控可以直接影响相应的生理生化过程, 在细胞周期的控制、免疫应答、胁迫反应和细胞程序性死亡等许多细胞内基本生理过程中起重要作用。泛素系统

通过对蛋白进行泛醮化,从而调节细胞内的多种蛋白的周转,由泛素(ubiquitin, Ub)、泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzymes, E2s)、泛素-蛋白连接酶(ubiquitin-protein ligases, E3s)、26S蛋白酶体和泛素解离酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)等组成,其对靶蛋白的降解是一种级联反应过程。泛素是由76个氨基酸组成的球形热稳定蛋白,其结构在真核细胞中高度保守。在不同生物体间组成泛素的氨基酸序列差别很小,如酵母和人的泛素仅有3个氨基酸序列的差别。泛素在一系列酶的催化下,通过ATP依赖的E1→E2→E3的级联反应连接到底物上,其C末端Gly与靶蛋白的Lys侧链相连,然后其它泛素分子以Gly连接到先前结合的泛素分子的Lys侧链上而形成多聚泛素链(Ciechanover et al. 2000)。E1是泛素降解途径的起始因子,约1100个氨基酸,含有位置固定的保守的半胱氨酸残基,同时还有一个保守的核苷结合位点,可以与ATP或AMP-Ub结合(Hartman-Petersen et al. 2003)。E1具有高度的催化效能,在低浓度的情况下就能够激活泛素,满足下游的级联反应过程(Pickart, 2001)。所有的E2s都含有一个保守的大约150个氨基酸的核心结构域,在结构域的中央是决定E2s活性的半胱氨酸残基,位于蛋白表面浅的裂隙内(Hamilton et al. 2001)。在植物中E2有多个家族成员(Dahan et al. 2001; Smalle et al. 2004)。E3s决定了泛素化途径底物的多样性和选择性。泛素-蛋白酶体降解途径包括两个主要阶段(图1-3):第一阶段:泛素与蛋白质底物的相互作用,首先,E1通过二硫键的方式与泛素小分子结合并激活泛素分子;其次,E2接受从E1传递而来的泛素分子并使之与一个半胱氨酸残基结合;然后,E2和泛素蛋白连接酶(E3)相互作用,泛素分子从E2上转移至早已捆绑在E3上的靶蛋白上;第二阶段:蛋白酶体对底物的降解,底物泛素链与蛋白酶体19S的泛素受体相互作用,蛋白质底物被逐步降解,在泛素C端水解酶、脱泛素酶和寡肽酶的作用下,释放出泛素分子(Ciechanover, 1998)。

1.4.2 F-box 蛋白在植物生长发育中的作用

在泛素途径中泛素连接酶E3对靶蛋白的特异性识别起关键作用(Jackson et al. 2000; Li et al. 2003)。E3在植物中含量非常丰富,拟南芥可能有1300多个基因编码E3的亚基(Vierstra, 2003)。正是由于这些复杂多变的E3s家族成员可以对不同的底物进行特异性识别,才呈现出蛋白降解的高度选择性。根据识别靶蛋白序列中结构域不同,E3又分为两类:(1)HECT型E3连接酶,HECT结构域包含保守的350个氨基酸。该结构域上的半胱氨酸残基与泛素的硫酯键连接形成复合物Ub-E3作为过渡,再将泛素转移到靶蛋白;(2)RING-finger E3连接酶,包括c-Cb1、APC和SCF,在泛素转运过程中都不直接与Ub形成过渡的蛋白复合物,而且都包含一个RING-finger结构域或一个结构相关的结构域,例如U-box结构域(Chung et al. 1999)。其中SCF复合体是一种重要的E3连接酶,降解目标通常是某种转录的激活因子或抑制因子,是高等真核生物调节通路的重要方式。由四个亚基组成:Skp1、Cdc53(cullin)、F-box蛋白及RBX1。除F-box蛋白以外的三个亚基组成一般性骨架,通过与不同的F-box蛋白结合识别不同的底物(Patton et al. 1999; Kong et al. 2004)(图1-4)。F-box蛋白的N端有一个由40-50个氨基酸组成的F-box结构域,通过参与SCF复

合体的形成介导了泛素化蛋白底物的特异性识别 (Bai et al. 1996)，在降解过程中发挥关键作用，被定位为细胞信号传导、转录调节和细胞周期等许多生理活动的关键调节蛋白。F-box蛋白质介导的泛素化蛋白质降解途径是植物基因表达调控的一个非常重要的机制。

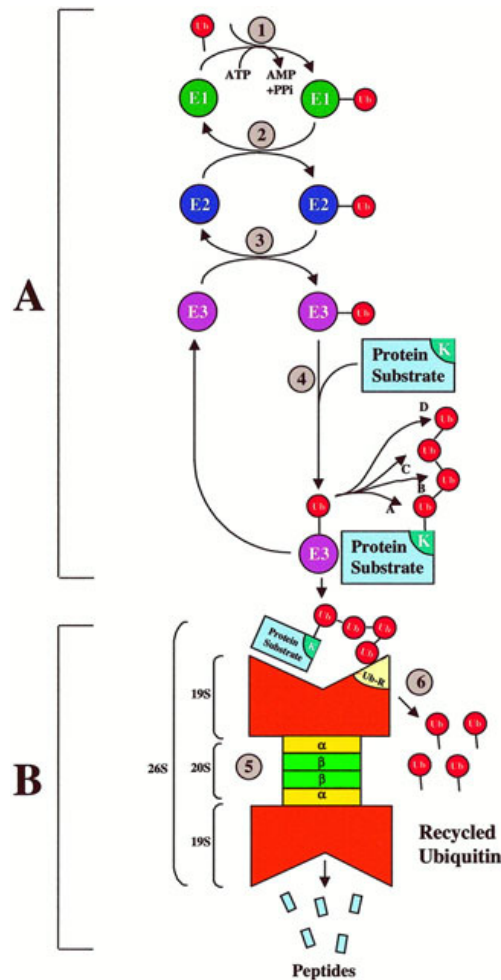


图1-3 泛素-蛋白酶体途径 (Ciechanover, 1998)

(A)泛素连接到底物分子上；(B)经泛素标记的底物被26S蛋白酶体降解。

注：(1)E1将泛素活化；(2)活化泛素从E1转移到E2 家族成员上；(3)活化泛素从E2 转移到特异识别底物的E3上；(4)形成底物-E3复合物并生成底物连接的泛素链；(5)多聚泛素化底物与26S蛋白酶体的泛素受体亚单位(19S复合物)结合并由20S复合物将其降解为片段；(6)同工肽酶使泛素再生。

Fig.1-3 The ubiquitin-proteasome pathway

(A) Conjugation of ubiquitin to the target molecule. (B) Degradation of the tagged substrate by the 26S proteasome.

(1)Activation of ubiquitin by E1. (2)Transfer of activated ubiquitin from E1 to a member of the E2 family.

(3)Transfer of activated ubiquitin from E2 to a substrate-specific E3. (4)Formation of a substrate–E3 complex and biosynthesis of a substrate-anchored polyubiquitin chain. (5)Binding of the polyubiquitinated substrate to the ubiquitin receptor subunit in the 19S complex of the 26S proteasome and degradation of the substrate to short peptides by the 20S complex. (6)Recycling of ubiquitin via the action of isopeptidases.

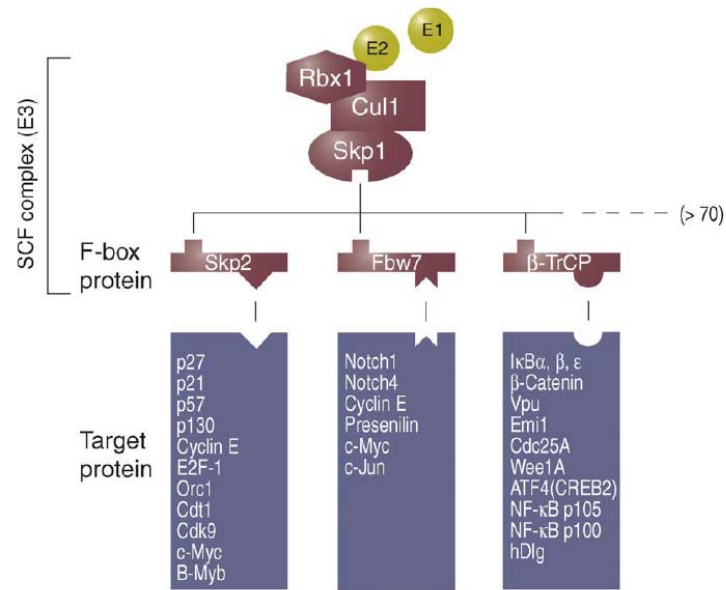


图1-4 SCF复合体结构示意图 (Nakayama et al. 2005)

Fig.1-4 The Structure of SCF complexes (Nakayama et al. 2005)

1.4.2.1 F-box 的结构与分布

F-box结构域大约由40-50个氨基酸组成，是介导与其他蛋白质发生相互作用的位点。由于这种基序首先在Cyclin F中发现，故将其命名为F-box (Bai et al. 1996)。通常位于蛋白质N端，与蛋白质C端的其它基序结合起来发挥作用。F-box蛋白缺少严格的一致序列，Kipreos等(2000)分析了234个F-box蛋白，显示仅有几个位置的氨基酸残基比较保守：位置8多为亮氨酸或甲硫氨酸，位置9多为脯氨酸，位置16为异亮氨酸，位置20为亮氨酸或甲硫氨酸，位置32为丝氨酸或半胱氨酸。由于缺少严格的保守性，我们很难鉴定F-box的结构，目前鉴定这一结构主要应用Prosite and Pfam数据库 (http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html)。F-box蛋白的C端包含用于蛋白-蛋白相互作用的区域，往往存在一些相关的二级结构，如亮氨酸拉链(LRR)、WD40、锌指结构、富含脂氨酸区等，有些F-box基因的C末端无明显的结构特征，主要是起受体的作用，与需要降解的靶蛋白结合(Winston et al. 1999)。F-box蛋白广泛地存在于多种真核生物中，目前已知酵母基因组中编码11个F-box蛋白，线虫中推测含有326个，果蝇中有22个，在植物中也有大量的F-box基因，拟南芥中约有700个F-box蛋白(Gagne et al. 2002; Risseuw et al. 2003)，有13类蛋白互作所需要的结构域，包括Leu-rich重复序列、Kelch、WD-40和Armadillo(Arm)等。F-box蛋白代表了拟南芥最大的超家族，占据了拟南芥整个基因组的2.7%(Gagne et al. 2002)。

1.4.2.2 F-box 与信号传导

1.4.2.2.1 F-box蛋白与赤霉素信号传导

在赤霉素信号反应的早期存在一类高度保守的赤霉素信号抑制子DELLA，当用26S蛋白小体

抑制剂MG132处理后, DELLA转录因子的丰度升高。最近, 通过筛选GA不敏感突变体在拟南芥和水稻中分离到与GA信号途径相关的F-box蛋白SLY1(拟南芥)和GID2(水稻)(McGinnis et al. 2003; Sasaki et al. 2003; Strader et al. 2004)。对这两个蛋白序列的比较分析表明, 两者具有36.8%的一致性和56%的相似性, 而且二者都含有一个F-box序列。运用酵母双杂交技术, 探明SLY1能够和RGA(Repressor of gal-3)和GAI(GA Insensitive)蛋白相互作用, 而这两个蛋白刚好都属于一类GRAS家族蛋白中的一个含有DELLA结构域的亚家族(Dill et al. 2004)。与它们相关的SCF E3s启动DELLA, RGA(repressor of GA1-3)和SLR1(slender rice1)的降解(McGinnis et al. 2003; Sasaki et al. 2003)。在水稻中, SLR1被GA激活的蛋白激酶磷酸化, 被磷酸化的SLR1被SCF^{GID2}识别后降解。拟南芥中, SLY1则通过DELLA蛋白C端的GRAS结构域, 直接与RGA和GAI(另一个DELLA蛋白)相互作用, 使其泛素化之后降解。GID2也能够与一个DELLA蛋白SLR1(Slender rice 1)相互作用。此外, GID2也能和来自水稻的Skp1家族成员OsSkp15相互结合。GA可以促进RGA和GAI的降解, 从而出现一系列的GA反应(Fu et al. 2004), SCF^{AtSLY1}和SCF^{OsGID2}分别以RGA和SLR1蛋白作为其降解的靶蛋白(图1-5), 对GA信号途径起正向调控作用(Itoh et al. 2003)。

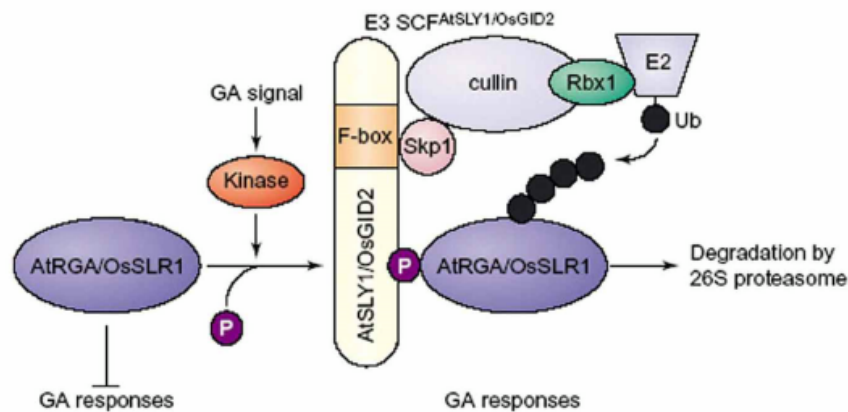


图1-5 SCF复合体参与GA信号途径的模式图 (Itoh et al. 2003)

Fig.1-5 A model of gibberellin (GA) signal pathway mediated by SCF complex

1.4.2.2.2 F-box蛋白与生长素信号传导

泛素/26S蛋白小体降解途径参与激素应答反应是在生长素应答反应途径中首次被发现的。人们苦苦追寻了数十年的生长素受体TIR1, 就是泛素化降解途径E3连接酶复合体中的F-box蛋白。2005年, 美国Indiana大学Estelle实验室(Dharmasiri et al. 2005)和英国York大学Leyser实验室(Kepinski et al. 2005)同时在Nature上发表文章, 提出TIR1与生长素直接相互作用, TIR1是生长素的受体, 在国际植物分子生物学界, 引起巨大反响。AUX/IAA蛋白是一类生长素诱导的蛋白, 编码小的核蛋白, 主要作为转录因子介导了生长素的特异反应。很多AUX/IAA蛋白的半衰期很短(6-8min), 其迅速降解对于生长素反应是十分重要的。研究发现, 生长素诱导Aux / IAA蛋白的降解需要SCF^{TIR1}的参与, 生长素还可以加强SCF^{TIR1}和Aux / IAAs的相互作用(图1-6)

(Dhannasiri et al. 2002)。生长素通过影响TIR1或与之紧密相关的其它蛋白来促进SCF^{TIR1}-Aux / IAA的相互作用 (Kepinski et al. 2004)。AUX/IAA蛋白是SCF^{TIR1}E3的底物, SCF^{TIR1}调控了其迅速降解的过程。在SCF^{TIR1}功能丧失突变体中, AUX/IAA家族蛋白半寿期延长, 抑制了生长素反应 (Gray et al. 2001)。在*tir1*中, 两个AUX / IAA蛋白 (IAA7和IAAI7) 含量稳定 (Dharmasiri et al. 2003; Tian et al. 2003)。

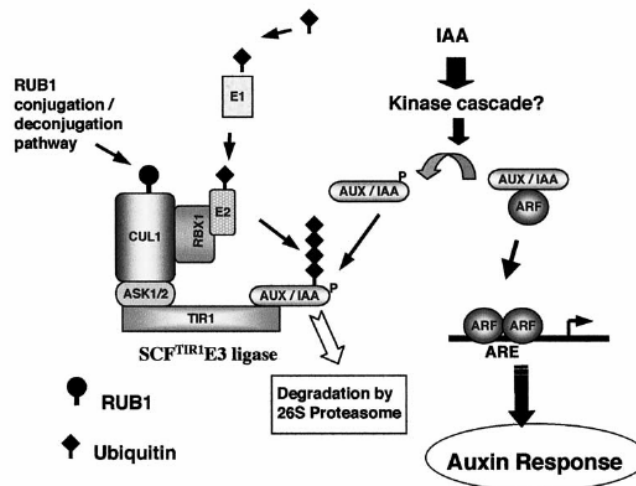


图1-6 SCF^{TIR1}参与生长素信号途径的模式图 (Dhannasiri et al. 2002)

Fig.1-6 Model for SCF^{TIR1} complex in regulating auxin response

1.4.2.2.3 F-box蛋白与乙烯信号传导

乙烯是植物体内一种激素, 与其它植物激素相比, 其生理学区别在于我们熟知的三重反应, 即对暗中生长的幼苗进行乙烯处理会使得根的生长受抑, 下胚轴变短且膨大和茎的横向生长。目前乙烯信号途径已经研究的比较清楚 (图1-7) (Alonso et al. 2004), 在没有乙烯时, 5个乙烯受体与下游的负调控因子CTR1相互作用并使之激活, 抑制EIN2和EIN3及下游基因的表达, 当乙烯存在时, 乙烯与受体结合, CTR1不能被激活, 下游基因表达, 产生乙烯反应。EIN3 (ethylene insensitive3) 和EIL1都是调控乙烯下游基因表达的转录因子, 其突变体在乙烯处理后丧失了三重反应 (Chao et al. 1997; Solano et al. 1998)。最近的研究发现, 转录因子EIN3对促进乙烯调节基因的转录起重要作用 (Yanagawa et al. 2002), 乙烯有利于EIN3, 当乙烯缺乏时, EIN3被降解。Potuschak等 (2003) 从拟南芥中克隆到两个F-box基因, EIN3/EIL结合蛋白, EBF1和EBF2, EBF1过量表达引起植物对乙烯不敏感, 在*ebf1/ebf2*双突变体中, EIN3是稳定的, 导致持续的乙烯反应, 并且积累较多的EIN3蛋白, 植株表现持续的三重反应 (Guo et al. 2003)。任何一个EBF1/EBF2突变都导致植物对乙烯反应增强, 而双突变体则表现出组成型乙烯反应。这些结果表明, 泛素降解途径通过降解EIN3来调节乙烯反应, 是乙烯途径的负调控因子。

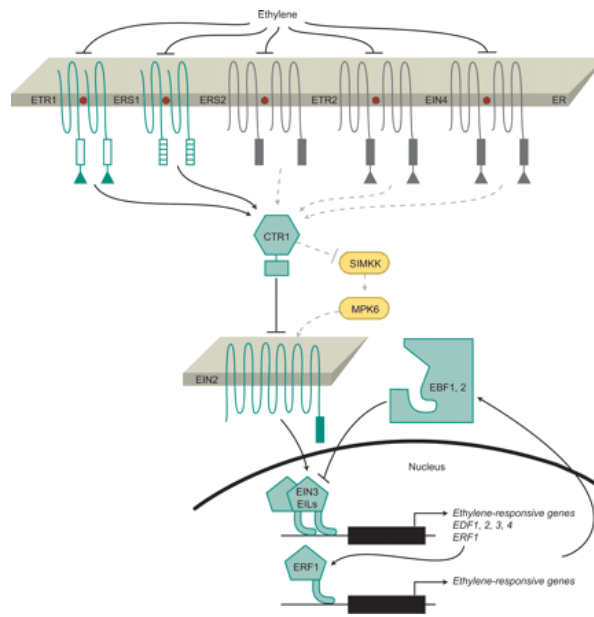


图1-7 乙烯信号途径 (Alonso et al. 2004)

Fig.1-7 Representation of the ethylene signal transduction pathway

1.4.2.3 F-box 蛋白与茉莉酸信号传导

拟南芥中, JA调节伤害和防御反应、花粉发育及胁迫相关的生长抑制, F-box蛋白COI1的发现, 将茉莉酸信号途径与泛素/26S蛋白小体降解途径联系起来 (Xu et al. 2002)。酵母双杂交实验表明, COI1与ASK2、CUL1、RBX1形成SCF^{COI1}复合体 (Feng et al. 2003; Xu et al. 2002)。

1.4.2.4 F-box 蛋白在植物生长发育过程中的作用

研究表明 F-box 蛋白参与了多个影响到植物生长发育的过程, 包括光形态建成、器官发育、自交不亲和及胁迫反应等。UFO(unusual floral organs)是植物中发现的第一个 F-box 基因, SCF^{UFO}参与了植物花器官发育的调控 (Levin et al. 1995)。植物自交不亲和的关键位点鉴定出了 S 位点相关 F-box (S-locus-linked F-box) 蛋白, 是花粉自交不亲和现象的决定因素, 通过酵母双杂交和免疫共沉淀表明, 能与 Skp 和 CULLIN1 蛋白相互作用形成 SCF 复合体(Qiao et al. 2004)。SCF^{EID1}是降解 phy 介导的光信号传导途径的正调节因子 (Dieterle et al. 2004)。F-box 蛋白 ZTL 通过降解一个重要的调节因子 TOC1 实现了植物对生物钟节律的调控 (Schultz et al. 2001)。最近研究还表明 F-box 蛋白还参与了 SA 和系统获得抗性不同的诱导反应。在植物的衰老过程中, 一种含 LRR 的 F-box 蛋白 ORE9 起了重要作用, 可以与 ASK1 相互作用, 可能也是通过形成 SCF^{ORE9} 发挥功能 (Woo et al. 2001)。当植物受到各种逆境胁迫时, 体内会形成很多的自由基, 从而对细胞的存活造成很大影响, 泛素途径可以使不正常的蛋白迅速降解, 推测 F-box 蛋白在其中也发挥了重要的作用。在柑橘中, 冷害可诱导 F-box 基因的表达 (Zhang et al. 2005)。在紫杆桉柳中, 一个 F-box 基因受 NaHCO₃ 胁迫诱导表达 (杨传平等, 2004)。

1.5 本论文研究目的、意义及技术路线

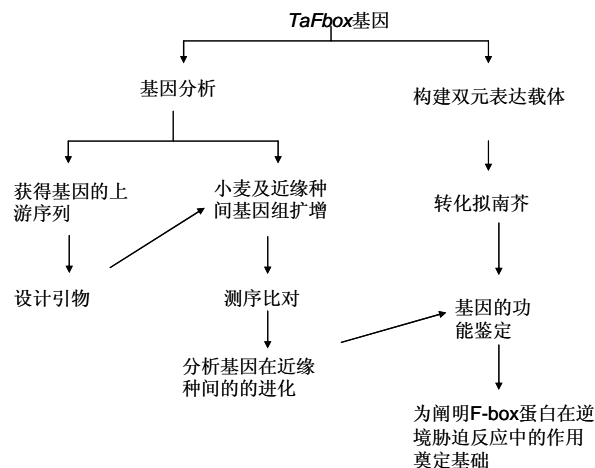
1.5.1 研究目的及意义

对植物生长影响最大的因素是环境胁迫，其中以盐渍化和干旱最为严重，盐渍土在世界各大洲都有分布，约占地球陆地面积的10%（Szabolcs, 1994）。近年来，随着人口剧增、水资源缺乏及人为灌溉不当，部分地区出现耕地逐步盐渍化的现象。如何利用大面积的盐碱地和丰富的咸水资源发展农业，是生物科学技术迫切需要解决的重大课题。研究植物耐盐胁迫机制，从而寻找提高植物耐盐性的途径和方法，对于进一步加强盐渍土的治理利用及利用分子育种方法培育耐盐作物品种具有重要意义。

本课题以cDNA-AFLP方法获得的盐胁迫差异表达片段为基础，进行RACE扩增获得基因的全长序列，保守结构域分析该基因的N-端具有F-box结构，命名为*TaFbox*，F-box蛋白通过参与SCF复合体的形成介导了泛素化蛋白底物的特异性识别，参与了激素调节、自交不亲和及胁迫反应及相应的信号传导途径，在植物的生长发育过程中发挥着重要的作用。越来越多的研究表明F-box蛋白也是非生物胁迫反应中的重要的调解因子，拟南芥F-box蛋白7（*AtFBP7*）的表达受温度胁迫的诱导（Calderón-Villalobos et al. 2007）。水稻基因组中许多F-box基因受非生物胁迫的上调表达，推测其在逆境信号传导过程中发挥了重要的作用（Jain et al. 2007）。根据拟南芥全基因组预测，编码F-box蛋白的基因有1000多个，由于F-box蛋白在基因组中广泛存在，推测植物信号传导过程中依赖SCF的蛋白降解途径可能起着极为广泛而重要的作用，但现在只对其中极少一部分的生物学功能有所了解（王红云等，2002）。对植物F-box蛋白质及其相互作用分子机理的研究将为全面了解蛋白质降解途径与生长发育、信号传导等机理奠定一定的基础。

本研究在课题组已有的研究基础上，深入鉴定该基因的功能，并在近缘物种间进行基因序列比较分析，探讨其分子起源和进化关系，进而为F-box基因在非生物胁迫反应中的功能及相应机理分析奠定基础。

1.5.2 技术路线



第二章 *TaFbox* 基因功能的初步鉴定

摘要: F-box 蛋白通过识别降解一些调节因子对某些信号传导途径起正调控或负调控作用, 参与了植物生长发育的诸多环节, 本课题组从小麦耐盐品系中克隆了受盐胁迫上调表达的基因 *TaFbox*, 构建了双元表达载体化拟南芥, 结果表明转 *TaFbox* 基因拟南芥对 NaCl 和甘露醇胁迫表现出较强的耐受性, 随着胁迫时间的延长和胁迫浓度的增加, 转基因植株与非转基因植株的耐逆性差异越来越明显, 表明 *TaFbox* 基因与耐盐性及抗旱性等非生物胁迫有关。生物信息学分析显示该基因具有内向型和外向型跨膜区, 利用 GFP 融合蛋白表达载体, 转化洋葱表皮细胞, 将该基因定位在细胞膜上, 与其充当反应受体相吻合。推测 F-box 蛋白在盐胁迫反应与适应过程中发挥了重要的作用, 本研究克隆的小麦 F-box 蛋白编码基因在耐盐胁迫反应中的作用及相关耐盐机理值得进一步深入研究。

外源基因导入植物细胞的方法有多种, 常用的有农杆菌法和基因枪法。农杆菌作为一种天然的植物基因转化系统, 具有转化的外源 DNA 结构完整、转化机理清楚、整合位点较稳定、拷贝数低、整合后外源基因结构变异较小等优点, 而且转化效率高。基因枪法可以将外源基因直接导入受体的组织或器官, 无需继代培养, 在基因的瞬时表达分析方面具有明显的优势。

GFP (green fluorescent protein, 绿色荧光蛋白) 来源于海洋生物水母, 是一种非酶性报告因子, 其基因可在异源组织中表达并产生荧光。近年来, GFP 作为新一代的基因转移报告物和定位标记物, 在生命科学中越来越受到关注 (Chalfie, 1994)。GFP 分子量较小, 它能与多种不同的蛋白质 N 端或 C 端融合而保持其天然蛋白的特性。因此, 它是一种直观性很强的遗传标记物, 在功能基因的亚细胞定位研究中被作为理想的报告基因。

cDNA-AFLP 是研究基因表达的有效分子技术, 可对生物体转录组进行全面、系统的分析, 在构建转录连锁图、基因表达特性研究及分离特异表达基因等方面得到了广泛的应用。*TaFbox* 基因是利用 cDNA-AFLP 技术筛选到的盐胁迫处理后差异表达片段, 再经 RACE 方法得到的全长 cDNA 序列, tblastx 结果没有比对上小麦中的氨基酸序列, 表明该基因在小麦中是一个新基因。本研究将利用农杆菌介导的方法转化拟南芥进行功能鉴定, 同时构建瞬时表达载体, 利用基因枪转化法对基因的表达进行亚细胞定位分析。

2.1 材料与方法

2.1.1 实验材料

耐盐性受主效基因控制的小麦品系98-160 (刘旭等, 2001)、农杆菌菌株GV3101由本实验室保存; 转化受体拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型0(Columbia-0), 载体质粒pJIT-163、pBINPLUS及163-GFP由中科院遗传与发育研究所李振声课题组提供; 各种限制性内切酶和T4 DNA连接酶均购自NEB公司; PGEM-Teasy载体购自Promega公司; 质粒提取及产物回收试剂盒购自百泰克生物

公司；高保真酶Mastermix购自天根生物公司。

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 DNA 的提取

总DNA采用改进的酚-氯仿法提取。

具体步骤如下：

- 1) 将适量新鲜叶片在液氮低温下磨碎，取适量置于1.5ml离心管中，加500 μ l缓冲液“S”（100mM Tris-HCl PH8.5, 100mM NaCl, 50mM EDTA PH8.0, 2% SDS），65 $^{\circ}$ C水浴1-2h；
- 2) 加入500 μ l酚-氯仿（1：1），轻柔混匀，8,000rpm离心15min；
- 3) 加入500 μ l氯仿（1：1），轻柔混匀，8,000rpm离心15min；
- 4) 取上清液加入0.6倍体积异丙醇，混匀静置5min，10,000rpm离心10min；
- 5) 倒掉液相，用70%乙醇将DNA洗1-2次后干燥；
- 6) 将DNA溶于500 μ l 1 \times TE（PH8.0），加2 μ l RNA酶（10mg/ml），37 $^{\circ}$ C恒温3h；
- 7) 加入500 μ l酚-氯仿（1：1），轻柔混匀，8,000rpm离心15min；
- 8) 加500 μ l氯仿，轻柔混匀，10,000rpm离心10min；
- 9) 取上清液加入1/10体积3M乙酸钠（PH5.2），2倍体积冷无水乙醇（或95%乙醇），轻轻混匀静置5min，10,000rpm离心10min；
- 10) 倒掉液相，用70%乙醇将DNA洗1-2次后干燥，溶于适量1 \times TE（PH8.0）保存待用；
- 11) 用紫外分光光度计测量DNA浓度和相对纯度；用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

2.1.2.2 *TaFbox* 基因的扩增

以含有该基因的质粒或基因组DNA为模板进行PCR扩增，PCR反应体系如表2-1。

表2-1 PCR反应体系

Table 2-1 PCR reaction system

普通 Taq 酶反应		高保真酶反应	
成分	体积	成分	体积
Ingredient	Amount(μ l)	Ingredient	Amount(μ l)
10 \times PCR Buffer	1.5	2 \times pfu PCR Mastermix	1.5
Mg ²⁺	1.5		
dNTP(25mM)	0.15		
Taq(5U/ μ l)	0.16		
Primer F(10 μ M)	1	Primer F(10 μ M)	1
Primer R(10 μ M)	1	Primer R(10 μ M)	1
模板	适量	模板	适量
Total	15	Total	15

反应程序：94 $^{\circ}$ C 5min, （94 $^{\circ}$ C 30sec; 55 $^{\circ}$ C 30sec; 72 $^{\circ}$ C 1min） \times 32, 72 $^{\circ}$ C 10min。平末端加 A

反应体系（表 2-2）。

表2-2 加A反应体系

成分	体积
Ingredient	Amount (μl)
10×Buffer	2
Mg ²⁺	1.8
Taq (5 U / μl)	0.16
dNTP(25mM)	0.15
PCR product	15 μl
Total	20 μl

反应程序：72℃ 30min

2.1.2.3 PCR 产物回收纯化

PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳后挖胶回收。用百泰克时代公司的凝胶回收试剂盒进行纯化。详细步骤如下：

- 1) 在盛有回收胶条的 1.5ml 离心管中加入 3 倍凝胶体积的溶胶液,于 50℃水浴锅中使胶溶解。可上下颠倒混匀；
- 2) 待胶溶解后,将溶解好的胶液加入纯化柱中,12000rpm 离心 1min；
- 3) 弃去回收管中的废液,加入 500 μl 漂洗液,12000rpm 离心 1min；
- 4) 弃去回收管中的废液,12000rpm 离心 2min；
- 5) 将纯化柱转移至一个新 1.5ml 离心管上,室温静置 10min。加入适量经 65℃预热的洗脱缓冲液,室温静置 2min。12000rpm 离心 2min；
- 6) 将洗脱下来的溶液再加入到纯化柱中,12000rpm 离心 2min。

2.1.2.4 T-easy vector 连接

用 Promega 公司的 pGEM-T easy vector 进行连接,室温下需连接 2 小时以上。连接体系为表 2-3。

表 2-3 pGEM-Teasy Vector 连接体系
Table 2-3 pGEM-Teasy ligation system

成分	体积
Ingredient	Amount (μl)
T4 DNA ligase	1 μl
2×T4 DNA ligase Buffer	2.5 μl
pGEM-T easy vector	1 μl
PCR products	x μl
Total volume	5 μl

2.1.2.5 DH5 α 热击感受态细胞的制备

- 1) 从 37°C 培养 16-20h 的新鲜平板上挑取一个单克隆，转到一个含有 100ml LB 或 SOB 培养基的 1L 三角瓶中，于 37°C 剧烈振荡培养约 3h (300rpm)，为获得有效转化，活细胞数不应超过 10^8 细胞/ml，可每隔 20-30min 测量 OD₆₀₀ 来监测培养物的生长状况；
- 2) 在无菌条件下将细菌转移到一个无菌、一次性使用的用冰预冷的 50ml 离心管中，冰上放置 10min，使其冷却至 0°C；
- 3) 4°C 4000rpm 离心 10min 收集细胞；
- 4) 倒出培养液，将管倒置 1min，使残液流尽；
- 5) 以 10ml 用冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬每份沉淀，放于冰上 (0.1mol/L CaCl₂ 需用 0.2 μ m 滤膜过滤灭菌)；
- 6) 4°C 4000rpm 离心 10min 收集细胞；
- 7) 同第 4 步；
- 8) 每 50ml 初始培养物用 2ml 冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬每份细胞沉淀；
- 9) 用冷却的无菌枪头将感受态细胞分装为 200 μ l/管，液氮速冻后 -70°C 保存备用。

2.1.2.6 连接产物大肠杆菌转化

热击法转化感受态细胞：

- 1) 取 100 μ l 感受态细胞和连接液一起置于冰上；
- 2) 待感受态细胞融化后，将 5 μ l 连接液加入感受态细胞中，轻弹管底混匀，冰浴 30min；
- 3) 42°C 热激 90sec，冰上放置 3-5min；
- 4) 加入 500 μ l SOC 或 LB 液体培养基，37°C 复苏 1h (250rpm)；
- 5) 7000rpm 离心 1min 收集细胞，去掉大部分 SOC，仅留下 150 μ l 重悬菌体；
- 6) 将培养物用涂棒涂在含有 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 固体培养基上，37°C 倒置培养过夜，进行蓝白斑筛选。

2.1.2.7 菌液 PCR 鉴定阳性克隆

在 90 μ l 无菌水中加入 10 μ l 菌液 (37°C 培养过夜)，按下列程序进行菌液 PCR：94°C 5min，(94°C 30sec；55°C 30sec；72°C 1min) \times 32，72°C 10min。

2.1.2.8 大肠杆菌质粒提取

按照百泰克生物公司质粒小量提取试剂盒说明进行。

- 1) 1.5ml 离心管收集菌液 2 次，8000rpm 室温离心 1min，去上清；
- 2) 加入预冷的溶液 I 250 μ l 振荡混匀；
- 3) 加入溶液 II 250 μ l，上下颠倒混匀；

- 4) 加入溶液III 350 μ l, 上下颠倒混匀, 冰上放置5min;
- 5) 12,000rpm室温离心10min;
- 6) 转移上清至一吸附柱中, 12,000rpm室温离心1min;
- 7) 加入去蛋白液600 μ l, 12,000rpm室温离心1min;
- 8) 向吸附柱中加入700 μ l漂洗液, 12,000rpm离心1min;
- 9) 倒出离心管中漂洗液, 再向吸附柱中加入500 μ l漂洗液, 12,000rpm离心1min;
- 10) 将离心管中的漂洗液倒掉, 12,000rpm离心2min;
- 11) 将吸附柱转移至一个新1.5ml离心管上, 加入适量洗脱液, 室温放置2min;
- 12) 12,000rpm离心1min, 弃吸附柱, 离心管内即为高纯度的重组质粒;
- 13) 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测质粒质量及浓度。

2.1.2.9 农杆菌 (GV3101) 电击感受态的制备

- 1) 从划线平板上挑取单克隆, 接种到 5ml YEB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 250rpm 培养过夜;
- 2) 按 1:20 的比例接种到 500ml YEP (含抗生素) 液体培养基中, 培养至 OD600 范围为 0.6-0.8 左右;
- 3) 将菌分装到预冷并灭菌的 50ml 离心管内, 4 $^{\circ}$ C 4000rpm 离心 10min, 收集菌体;
- 4) 弃上清, 加入 50ml 10%甘油悬浮菌体 (甘油用超纯水配制, 并灭菌), 4 $^{\circ}$ C 4000rpm 离心 10min;
- 5) 弃上清, 加入 25ml 10%甘油悬浮菌体, 4 $^{\circ}$ C 4000rpm 离心 10min;
- 6) 弃上清, 加入 5ml 10%甘油悬浮菌体, 4 $^{\circ}$ C 4000rpm 离心 10min;
- 7) 弃上清, 加入 1ml 10%甘油悬浮菌体, 分装为 20 μ l/管, 液氮速冻后存于-70 $^{\circ}$ C 备用。

2.1.2.10 农杆菌的电击转化

在 Gibico 公司的 cell Porter 电击仪上进行。

- 1) 将农杆菌感受态细胞、电击杯以及连接产物一起放到冰上直至感受态细胞融化;
- 2) 打开电击仪的开关, 并在电击槽内放入冰水混合物进行预冷;
- 3) 将 1 μ l 质粒加入已融化的盛有农杆菌感受态的离心管内, 轻弹管底混匀;
- 4) 将已混匀的质粒和感受态一起转移至电击杯中, 注意不要有气泡, 并将电击杯放到电击槽内;
- 5) 将电击槽与电击仪连接好, 将开关拧向 CHARGE, 按 MP 将电压升至 390 伏以上, 将开关转向 ARM, 待电压降到 390 伏时, 按 trigger 键 (电击参数: 电容为 330 μ F; 电击速度为 fast);
- 6) 取出转化液, 加入 500 μ l YEP 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C 220rpm 复苏培养 3h;
- 7) 取 3 μ l 培养液加入适量 YEP 液体培养基均匀涂布在含有壮观霉素和利福平的 YEP 固体平

板上，28℃倒置培养2天。

2.1.2.11 拟南芥转化

2.1.2.11.1 拟南芥培养

称取一定数量的拟南芥种子，加入适量水，避光4℃春化2-3天。蛭石与营养土按1:1体积比混合，分装到花盆中，土层表面撒上薄薄的一层蛭石以抑制真菌的生长。分装好的花盆放在大槽子中，将2倍体积的水浇到大槽子中，使土充分润湿。用100μl移液器播种，每盆大约12-18粒。保鲜膜密封花盆，温室中培养（22℃，16h光照；16℃，8h黑暗），托盘中的水量以始终保持湿润为准，不可太多。待幼苗出土两片子叶充分展开后，揭去保鲜膜，保证充分的水分及光照培养。大约3周后可以看到拟南芥抽出初生苔，剪去初生苔以使其抽出更多的次生苔，从而增加花的数量。待次生苔上长出一定数量的花蕾（尚未绽开）便可用于拟南芥的转化。转化前1天将需转化的苗浇透。

2.1.2.11.2 转化用农杆菌菌液的制备

取PCR检测正确的农杆菌菌液5μl接种于5ml YEB（Kan 1:100，Rif 1:50）液体培养基中，28℃250rpm培养30h。菌液按1:400转接到300ml YEB液体培养基中，28℃250rpm培养14h至OD600 1.5-3.0。7000rpm，4℃离心15min收集菌液，重悬菌体于2倍体积的转化渗透液（1/2MS+2%Sucrose，6-BA: 0.01mg/L，VB₁: 10mg/L，VB₆: 1mg/L，Silwet L-77: 0.02%）。

2.1.2.11.3 渗透转化

将拟南芥倒置，使花蕾朝下并浸入渗透液中，保持3-5min（长势强5min，长势弱3min）。转化后的植株平放，盖好保鲜膜。低光强度下生长24-48h后置于正常光照条件下生长，直到开花结实收集种子。

2.1.2.11.4 抗性鉴定

称取25-30mg拟南芥种子于1.5ml离心管中，10%次氯酸钠消毒10min，灭菌水冲洗去除次氯酸钠，加水混匀将种子均匀撒在1/2MS（潮霉素20mg/L）固体平板上（1/2MS+0.8%琼脂）。避光4℃春化2-3天。

2.1.2.11.5 转基因植株的PCR检测

具有赤霉素抗性的幼苗在抗性平板上正常生长呈绿色，根发育正常；非抗性幼苗虽也呈绿色，但植株较小且无根。平板上的绿苗长至4个叶片时移至土中，盖上保鲜膜保水3d后揭去。幼苗长至8-10个叶片且较健壮时，剪取叶片提取基因组DNA，进行PCR检测。

2.1.2.12 基因枪转化

- 1) 撕取直径 2cm 左右的洋葱表皮块置于 MS 培养基上（琼脂 1.5%）备用；
- 2) 准备 1ml、200 μ l、20 μ l、10 μ l 移液枪，100%无水乙醇一瓶，计时器一个，白纸板，记号笔，餐巾纸；
- 3) 称 2mg (0.02g) PVP 于一干燥洁净的 1.5ml 离心管内加入 1ml 无水乙醇，使其溶解，浓度为 20mg/ml 的母液；
- 4) 吸出 12.5 μ l 母液，稀释至 5ml，使其终浓度为 0.05mg/ml；
- 5) 称约 2mg 金粉（直径为 1 μ m），一干燥洁净的 1.5ml 离心管内用 1ml 无水乙醇进行 3 次清洗（涡旋，短暂离心，吸出。注意：此时有少量金粉被粘在管壁上）；
- 6) 加入 100 μ l 0.05M 亚精胺，涡旋混匀，超声波处理 5-10sec（去除电荷）；
- 7) 加入 25 μ l 质粒 DNA（2 μ g/ μ l）混匀。边涡旋边加入 100 μ l 1M CaCl₂，室温放置 10min；
- 8) 用 1ml 乙醇清洗 5 次，方法同上；
- 9) 用 3ml 0.05mg/ml PVP 将金粉稀释在一个 10ml 的大离心管中；
- 10) 打开 N₂ 总阀，调整减压阀，使 N₂ 压力在 0.4 左右，用纯度为 99.997% N₂ 干燥管 15min。停止 N₂ 气流，然后切割管，使其长于平台 10cm；
- 11) 将管的一端与注射器相连，涡旋金粒子溶液并迅速将该溶液转入管，使其每一末端均留有 6cm 的空隙；
- 12) 迅速将管置于支持物上并使溶液在管中停留 3min，并标记其充满的位置。用注射器缓慢移动溶液刚好经过右侧标记，使管旋转 180° 将溶液全部倒出；
- 13) 使管旋转 30sec，打开 N₂ 在 0.35-0.4rpm，使其旋转 5min；
- 14) 将管从支持架上取出，停止 N₂ 气流。切开封闭的管，将子弹放入盛有干硅胶的容器；
- 15) 准备好基因枪，将基因枪与氦气罐相连，压力为 150-300psi 进行轰击。

2.1.2.13 测序

用 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) 进行测序 PCR 反应，测序使用 ABI3730 XL DNA Analyzer。

- 1) 依据胶图估计质粒浓度，适当稀释；
- 2) 将约 100ng DNA 加入 96 孔测序板，变性 (96°C 3min)，变性后立即置于冰上，短暂离心 (4000rpm 1min)；
- 3) 配制测序 PCR master，按以下体系加入下列各试剂（表 2-4）；

表2-4 测序PCR反应体系

Table 2-4 Sequencing PCR system

成分	体积
Ingredient	Amount (μ l)
2.5×BigDye	0.5
5×Buffer	1.75
10 μ M Primer	0.32
Template	50-100ng
Total	10

- 4) 混匀, 按10 μ l体系分装master于各Well中;
- 5) 用测序垫封口, 轻柔涡旋混匀后4000rpm 1min短暂离心, 运行测序PCR程序。测序PCR程序: 96°C 10sec, rapid ramp-1.0°C/S to 50.0°C, 50°C 5sec, 60°C 3min, 35times;
- 6) PCR产物纯化(保证4°C离心)(本纯化程序针对10 μ lPCR体系):
 - (1) 每well加入40 μ l乙醇/NaAc(95%乙醇62.5ml, 3M乙酸钠(PH5.2) 3ml, ddH₂O 14.5ml混合), 铝箔封口膜封口, 颠倒混匀(可用涡旋仪);
 - (2) -20°C放置30min;
 - (3) 4°C 4000rpm离心30min;
 - (4) 弃上清, 倒后不可翻转, 将plate倒扣于餐巾纸上, 500rpm离心1min;
 - (5) 加入150 μ l 70%的乙醇, 封好, 4°C 4000rpm离心20min;
 - (6) 重复第4步;
 - (7) 阴凉避光处干燥30min, 如果不能当天测序, 沉淀封好后放到-20°C保存;
 - (8) 加入8 μ l甲酰胺, 4000rpm甩一下, 可4°C保存;
 - (9) 96°C变性3min, 立即置于冰上然后甩一下, 将样品放在ABI3730测序仪的样品台上, 准备测序。

2.1.2.14 试剂配制

(1) SOB 及 SOC 培养基的配制 (表 2-5, 表 2-6)

表 2-5 SOB 母液配制

Table 2-5 Confection of SOB stock

成分	体积
Ingredient	Amount
Bacto trytone	2g
Bacto yeast extract	0.5g
NaCl	1ml (1M stock)
KCl	0.25ml (1M stock)
ddH ₂ O	98ml
SOB	100ml

SOB 培养基配完成后，用 NaOH 调 PH 至 7.0，高压灭菌。SOC 培养基需现用现配：

表 2-6 SOC 培养基配制

Table 2-6 Confection of SOC culture medium

成分 ingredient	体积 amount
SOB	100ml
MgSO ₄ /MgCl ₂	1ml (2M stock)
Glucose	1ml (2M stock)

2M MgSO₄/MgCl₂ stock 及 2M Glucose stock 均需滤膜过滤。

(2) YEP 培养基 (表 2-7)

表 2-7 YEP 培养基配制 (1L)

Table 2-7 Confection of YEP culture medium

成分 Ingredient	体积 Amount
Bacto trytone	10g
Bacto yeast extract	10g
NaCl	5g
ddH ₂ O	1000ml

(3) LB 培养基 (表 2-8)

表 2-8 LB 培养基配制 (1L)

Table 2-8 Confection of LB culture medium (1L)

成分 Ingredient	体积 Amount
Bacto trytone	10g
Bacto yeast extract	5g
NaCl	10g
ddH ₂ O	1000ml

固体 LB 培养基加 1.5%琼脂

(4) MS 培养基母液配制 (表 2-9)

表 2-9 MS 培养基母液配制

Table 2-9 Confection of MS culture medium

母液种类	成分	规定用量 (mg/L)	扩大倍数	称取量(g)	母液定容体 积(ml)	配 1 升培养基称 取量(ml)
大量元素	KNO ₃	1900		38	1000	50
	NH ₄ NO ₃	1650		33		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	20×	7.4		
	KH ₂ PO ₄	170		3.4		
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440		8.8		
微量元素	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3		22.3	1000	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6		8.6		
	H ₃ BO ₃	6.2		6.2		
	KI	0.83	1000×	0.83		
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25		0.25		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		0.025		
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		0.025		
铁盐	Na ₂ -EDTA	37.3	100×	3.73	1000	10
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8		2.78		
维生素和氨基酸	甘氨酸	2		0.1	500	10
	维生素 B1	0.1	100×	0.005		
	维生素 B6	0.5		0.025		
	肌醇	100		5		

以上培养基配制完成后，需 120℃ 高压灭菌 15min。

(5) 各种抗生素的母液浓度及配制方法（表 2-10）

表 2-10 抗生素母液配制

Table 2-10 Confection of antibiotics stock

抗生素	浓度	溶剂
antibiotics	concentration	solvent
ampicillin	100mg/ml	water
kanamycin	100mg/ml	water
rifampicin	50 mg/ml	Methyl Alcohol

2.1.2.15 双元载体构建

2.1.2.15.1 酶切反应

选择合适的限制性内切酶进行酶切，反应体系如表2-11。

表2-11 酶切反应体系

Table 2-11 Digestion system

成分	体积
Ingredient	Amount (μl)
10×Buffer	1.5
BSA	0.15
E1	0.15
E2	0.15
模板	适量
Total	15

37°C, 2h 以上。

2.1.2.15.2 载体与目的片段连接反应 (表 2-12)

表 2-12 连接反应体系

Table 2-12 Ligation system

成分	体积
Ingredient	Amount (μl)
10×Buffer	2
Ligase	0.5
Vector	0.5
Target	适量
Total	5

4°C, 过夜。

2.1.2.15.3 构建策略

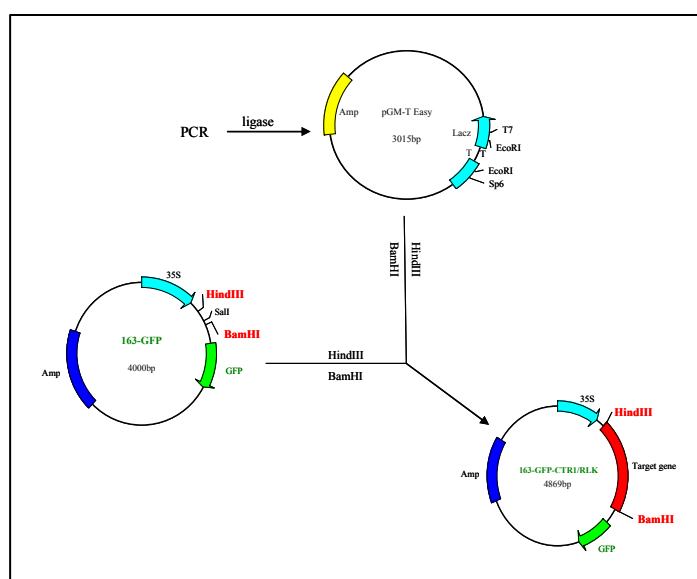


图 2-1 GFP 融合蛋白表达载体构建

Fig.2-1 Construction of the expression vector of fusion protein

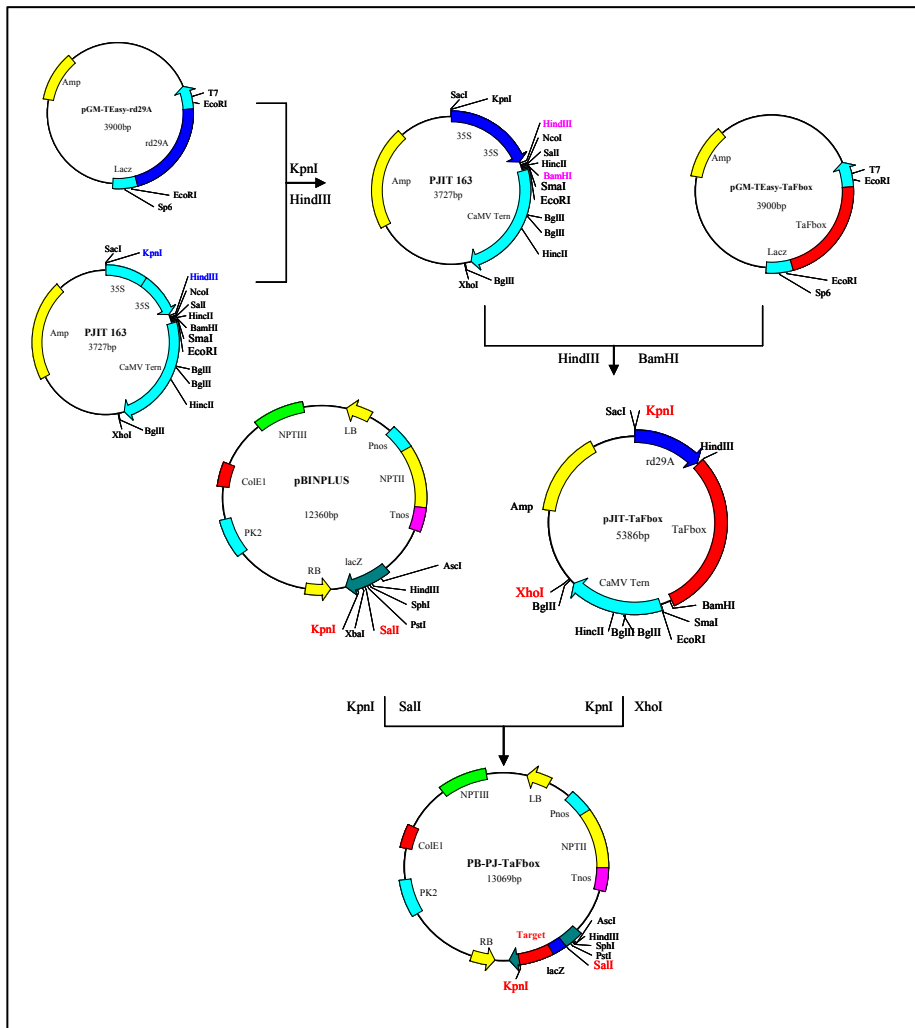


图 2-2 二元表达载体构建

Fig.2-2 Construction of Binary Vectors for transformation of Arabidopsis

2.2 结果与分析

2.2.1 *TaFbox* 基因保守结构分析

将 *TaFbox* 基因的氨基酸序列提交到 NCBI 的 rpsblast 网站进行保守结构域预测，基因的前 50 个氨基酸组成一个非常保守的 F-box 结构域（图 2-3），将 *TaFbox* 的氨基酸序列与 NCBI 上的其它物种的 F-box 基因的氨基酸序列进行多重对齐分析，几个基因的同源性较低，与水稻的相似性 50%左右，与水稻的一个 RLK 基因 (*OsRLK*) 具有一定的相似性，与拟南芥相似性只有 20%（秘彩莉，2005）。但是对该基因的 F-box 结构域比对分析发现，在此区域基因的相似性很高，能达到 80%左右，与拟南芥的一致性较低但也能达到 50%以上（图 2-4），上述 *OsRLK* 基因由于没有 F-box 结构域而未能比对上。

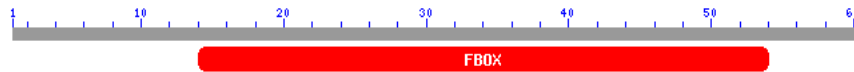


图 2-3 *TaFbox* 基因的 F-box 结构域

Fig.2-3 F-box domain of *TaFbox*

```

>gb|EAY96488.1| hypothetical protein OsI_017721 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
Length=389

Score = 82.0 bits (201), Expect = 9e-15, Method: Composition-based stats.
Identities = 37/55 (67%), Positives = 43/55 (78%), Gaps = 0/55 (0%)

Query 6  NGATSVADLTDDLLIEILSLLPVKSVCRFKCVSRWYSLISHPEHRKRLPQTISG 60
      +G  ADLTDDLI+EILS LP KSVCRFKCVS W LISH +HRK+LP T++G
Sbjct 17  DGDNPAADLTDDLIVEILSRLPAKSVCRFKCVSRWRRLISHRDHRKRLPHTLAG 71

>ref|NP_001054594.1| Os05g0139200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
gb|AAT77369.1| unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
gb|AAU10769.1| unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
db|IBAF16508.1| Os05g0139200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
gb|EA232815.1| hypothetical protein OsJ_016298 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Length=399

Score = 81.6 bits (200), Expect = 1e-14, Method: Composition-based stats.
Identities = 37/55 (67%), Positives = 43/55 (78%), Gaps = 0/55 (0%)

Query 6  NGATSVADLTDDLLIEILSLLPVKSVCRFKCVSRWYSLISHPEHRKRLPQTISG 60
      +G  ADLTDDLI+EILS LP KSVCRFKCVS W LISH +HRK+LP T++G
Sbjct 17  DGDNPAADLTDDLIVEILSRLPAKSVCRFKCVSRWRRLISHRDHRKRLPHTLAG 71

>gb|EAY96718.1| hypothetical protein OsI_017951 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
Length=108

Score = 79.0 bits (193), Expect = 8e-14, Method: Composition-based stats.
Identities = 36/49 (73%), Positives = 43/49 (87%), Gaps = 0/49 (0%)

Query 12  ADLTDDLLIEILSLLPVKSVCRFKCVSRWYSLISHPEHRKRLPQTISG 60
      A+LTDDLI++ILS LPVKSVCRC KCVSR W LIS P+HRK+LPQT++G
Sbjct 21  AELTDDLIVDILSRLPVKSVCRCKCVSRWRRLISDPDRKRLPQTLAG 69

>gb|AAR15451.1| F-box protein [Arabidopsis arenosa]
Length=421

Score = 55.1 bits (131), Expect = 1e-06, Method: Composition-based stats.
Identities = 31/62 (50%), Positives = 44/62 (70%), Gaps = 6/62 (9%)

Query 4  SKNGATSVADLTDDLLIEILSLLPVKSVCRFKCVSRWYSLISHPEHRKRL----PQTI 58
      S + AT VAD+ DD++I+ILSLLP+K++ RPK VS+ W SLI++P+ R+ P I
Sbjct 24  SSSSATIVADI-DDILIQLSLLPIKTLRPRKRVSKRWLSLITNPDFSNRVIKSNHPLPI 82

Query 59  SG 60
      SG
Sbjct 83  SG 84

>gb|ABE86418.1| Cyclin-like F-box; F-box protein interaction domain [Medicago
truncatula]
gb|ABE81276.2| Cyclin-like F-box; F-box protein interaction domain [Medicago
truncatula]
Length=391

Score = 54.7 bits (130), Expect = 2e-06, Method: Composition-based stats.
Identities = 25/40 (62%), Positives = 32/40 (80%), Gaps = 0/40 (0%)

Query 13  DLTDDLLIEILSLLPVKSVCRFKCVSRWYSLISHPEHRK 52
      DL DDLI+E+LSLLPVKS+ + KCV++ W SLIS P+ K
Sbjct 5  DLPDDLIVEVLSLLPVKSLLQLKCVNKSWNLSIDPKFVK 44
    
```

图 2-4 同源基因的 F-box 结构域比对分析

Fig.2-4 Blast of F-box of homologous genes

2.2.2 GFP 融合蛋白亚细胞定位分析

2.2.2.1 融合蛋白表达载体构建

本研究将 *TaFbox* 基因连接在 GFP 的 N 端构建融合蛋白表达载体。对 *TaFbox* 基因的 ORF (Open reading frame, 开放阅读框) 用 DNASTar 软件进行 Mapdraw 分析, 该基因不含 *HindIII* 和 *BamHI* 酶切位点, 因此根据 ORF 设计引物, 并分别在引物两侧引入酶切位点 *HindIII* 和

*Bam*HI, 以含有 *TaFbox* 的质粒为模板进行扩增, 扩增片段 1.2Kb(图 2-5A), 连接到 pGEM-Teasy 载体进行测序分析, 与已知的片段大小及序列一致, 用上述酶进行双酶切与酶切的载体质粒 pJIT-163 连接, 转化大肠杆菌 TOP10, 挑取阳性菌落提取质粒进行酶切检测(图 2-5B)。

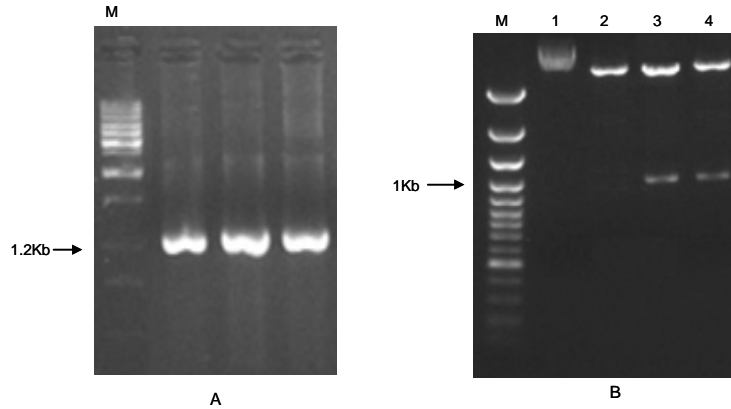


图 2-5 ORF 的 PCR 产物检测 (A) 和阳性克隆酶切检测 (B)

M: marker; 1: 质粒 (未酶切); 2: 空质粒 (酶切); 3、4: 阳性克隆 (酶切)

Fig.2-5 Amplification of *TaFbox* (A) and certification of positive clone (B)

M: marker; 1: plasmid(undigested); 2: plasmid without insertion(digested); 3&4: positive plasmid(digested)

2.2.1.2 *TaFbox* 基因的跨膜结构域预测

将 *TaFbox* 的氨基酸序列提交 http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser 进行跨膜结构域预测, 结果见图 2-6。根据氨基酸序列, 该软件预测 *TaFbox* 的 N 端在膜的外侧, 第 247 到 266 位氨基酸组成一个 20 个氨基酸的内向型跨膜区, 分值高达 1199; 248 到 266 位氨基酸组成一个 19 个氨基酸的外向型跨膜区, 分值为 1152 (秘彩莉, 2005)。

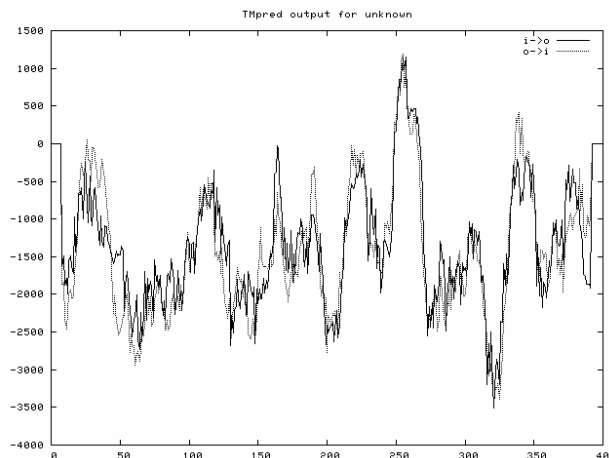


图 2-6 *TFbox* 跨膜结构域预测结果

只有 500 分以上的跨膜区被认为结果显著

Fig.2-6 Prediction of transmembrane structure in *TaFbox*

Only scores above 500 are considered significant

2.2.1.3 基因枪法转化洋葱表皮细胞

利用基因枪法转化洋葱表皮细胞，室温生长两天后在荧光共聚焦显微镜下观察，转对照质粒的整个细胞都能检测到信号（图 2-7A），而转 *TaFbox* 基因的只在洋葱细胞膜上检测到 GFP 信号（图 2-7B），表明该基因的表达部位在细胞膜，这也与前面预测的该基因具有跨膜结构域相吻合。

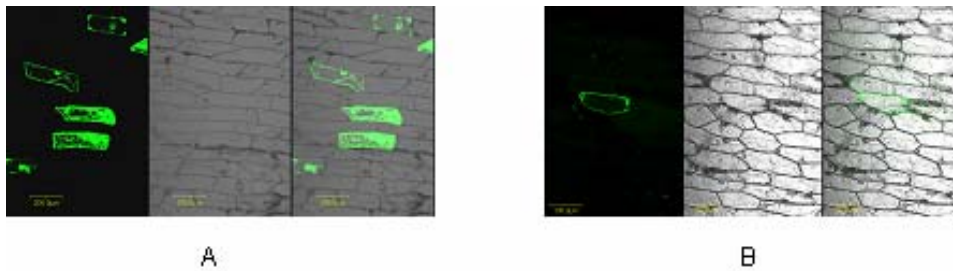


图 2-7 *TaFbox*-GFP 融合基因洋葱表皮定位

A: 转空载体; B: 转 *TaFbox*-GFP 融合蛋白

Fig.2-7 Physical localization of *TaFbox*-GFP fusion protein in epidermal cells of onion

A: transformed control vector with GFP; B: transformed vector with *TaFbox*-GFP

2.2.2 RD29A 启动子的克隆与分析鉴定

2.2.2.1 RD29A 启动子的克隆

RD29A启动子受干旱、寒冷和盐等逆境胁迫的诱导，没有组织特异性，本研究拟选用该启动子启动基因的表达。根据Genebank公布的RD29A启动子核苷酸序列（Yamaguchi-Shinozaki et al. 1993）设计引物（**RD29A-KpnI**: ggT,ACC,AAC,gCA,TgA,TTT, gAT,ggA,g; **RD29A-HindIII**: AAg,CTT,CTT,TCC,AAT,AgA,AgT, AAT,CAA），以拟南芥gDNA为模板进行扩增，得到约1Kb的片段（图2-8A），将所得片段回收连接到pGEM-Teasy载体上（命名为T-RD），挑选阳性克隆（图2-8B）测序。经测序确定该片段长960bp，在NCBI网站上比对结果表明所克隆的片段与拟南芥RD29A的启动子序列基本一致，相似性达99%。

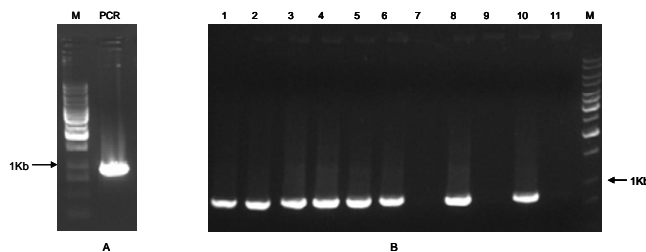


图 2-8 RD29A 启动子扩增结果 (A) 和阳性克隆菌落 PCR 检测 (B)

M: marker; 1-9: 菌落 PCR 扩增结果 (7 和 9 为假阳性菌落); 10: 阳性对照; 11: 阴性对照 (空载体)

Fig.2-8 Amplification of RD29A (A) and detection of positive clone by PCR (B)

M: Marker; 1-9: Result of colony PCR (7&9 was false positive clone);

10: Positive CK; 11: Negative CK (vector without insertion)

2.2.2.2 T-RD 序列分析

拟南芥rd29A启动子区域中含有与逆境胁迫应答有关的DRE顺式作用元件，对克隆的序列进一步分析发现在第666-674间和第723-731间各有一个干旱、高盐和低温响应（DRE）顺式作用元件，DRE序列含有9个碱基（TACCGACAT），它是目的基因在植物中被胁迫诱导表达或被反义抑制所必需的元件（Yamaguchi-Shinozaki et al. 1994）。此外在604-608bp间有一个CAAT box（CCAAT），856bp-861bp有一个TATA box（TATAAA）等启动子的基础元件，所有这些调控元件及其邻近的序列与报道基本一致，但该序列与报道序列相比所发生的个别碱基变化（图2-9），可能是由于材料来源的不同而产生的差异，并不影响主要调控区域。

2.2.2.3 T-RD 的活性分析

将克隆到的 T-RD 序列经 *KpnI* 和 *HindIII* 酶切替换 163-GFP 的启动子序列，基因枪法转化洋葱表皮细胞，分别于室温（20℃）和 4℃ 生长两天后在荧光共聚焦显微镜下观察，转化后的细胞能检测到绿色荧光蛋白的表达，在室温条件下表达较弱（图 2-10），表明该片段具有启动活性，而且受低温的诱导，可以用于下一步的实验研究。

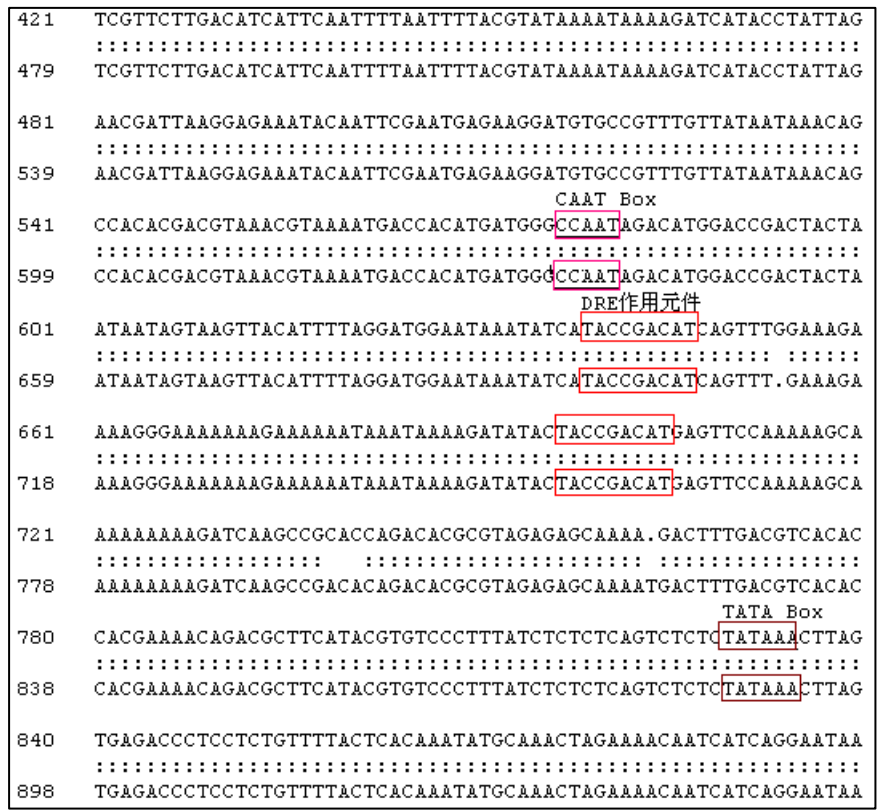


图2-9 克隆片段T-RD与RD29A的序列比较

Fig.2-9 Blast of T-RD and RD29A cloned

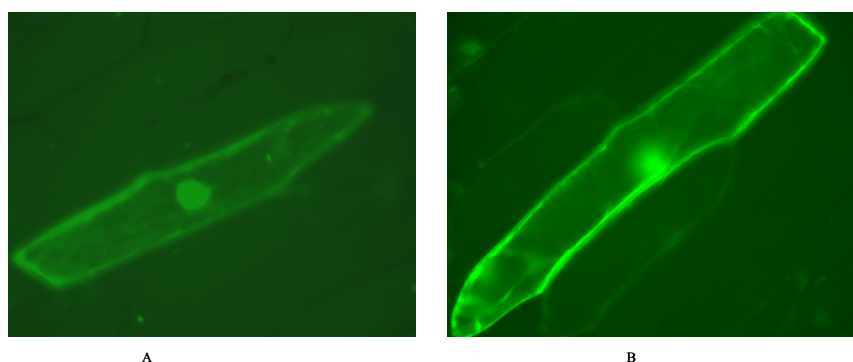


图2-10 T-RD活性鉴定 (A: 25°C; B: 4°C)

Fig.2-11 Identification of T-RD (A: 25°C; B: 4°C)

2.2.3 *TaFbox* 基因的功能鉴定

2.2.3.1 双元表达载体构建

以 pJIT 和 pBINPLUS 为基础载体, 构建 *TaFbox* 的拟南芥双元表达载体。首先根据 *TaFbox* 的开放阅读框设计引物, 并分别在引物两侧引入酶切位点 *HindIII* 和 *BamHI*, 按照构建策略 (图 2-11) 将 T-RD 启动子序列和 *TaFbox* 开放阅读框序列连接到 pBINPLUS 载体上获得 pB-pJ-*TaFbox* 质粒, 热击转化大肠杆菌 Top10, 挑选阳性克隆用 *HindIII* 和 *BamHI* 双酶切鉴定阳性克隆, 结果如图 2-11A 所示。将鉴定后的阳性克隆电击转化农杆菌 GV3101, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆 (图 2-11B)

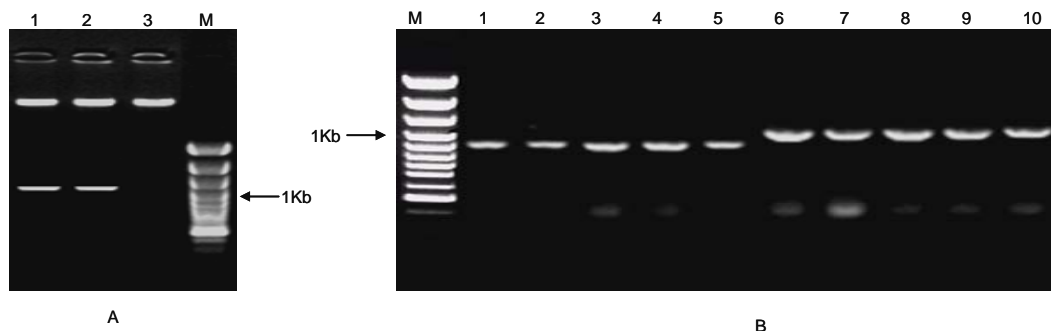


图 2-11 双元载体阳性克隆鉴定

A: pB-pJ-*TaFbox* 酶切鉴定 (1-2: 阳性克隆; 3: 空载体对照)B: GV3101 阳性克隆鉴定 (1-5: T-RD 扩增结果; 6-10: *TaFbox* 扩增结果)

Fig.2-11 Identification of positive binary clones

A: Identification of digestion (1-2: positive clone; 3: vector without insertion)

B: Identification of GV3101 (1-5: amplification of T-RD; 6-10: amplification of *TaFbox*)

2.2.3.2 转基因植株检测

以开花期的拟南芥为材料, 采用渗透法将 pB-pJ-*TaFbox* 和空载体转入花蕾。待种子成熟收获转基因当代植株种子 (T_0), 在含 Kan (50mg/L) 的 MS 固体培养基上筛选抗性植株。非抗性植株

为黄色，且植株矮小不能正常生长，而抗性植株在抗性平板上能正常生长（图2-12）。将抗性植株移至土中，待幼苗长至8-10个叶片且较健壮时，剪取叶片提取基因组DNA，进行PCR检测（图2-13）。

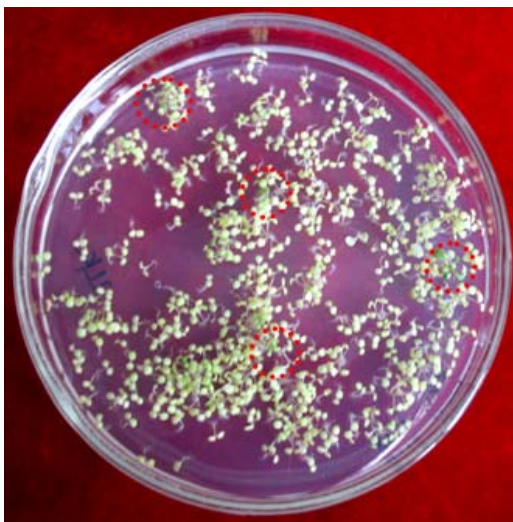


图 2-12 T₁ 代阳性植株筛选

Fig.2-12 Selection of transgenic plant of T₁

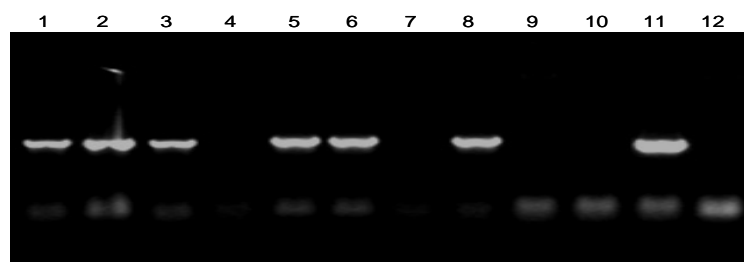


图 2-13 转基因植株 PCR 检测

1-8: 转基因植株; 9: 转空载体植株; 10: 野生型植株; 11: 阳性质粒; 12: H₂O

Fig.2-13 PCR detection of transgenic plant

1-8: transgenic plant; 9: only with vector; 10: wild type; 11: positive plasmid; 12: H₂O

2.2.3.3 转基因植株耐盐性鉴定

转基因植株在盐处理胁迫后表现出明显的差异,图 2-14 所示为 NaCl 胁迫的植株苗期表现,在胁迫条件下转基因植株的根部明显长于转空载体的对照植株及野生型植株,在 50mM 的胁迫条件下地上部分差异还不明显,随着胁迫浓度的增加野生型和空载体植株的地上部分较转基因植株长势弱。把生长一致的植株转移至土中生长进行胁迫处理,随着处理时间的延长和处理强度的增加,植株间表现出明显的差异,野生型和空载体植株长势缓慢,存活率越来越低,转基因植株在高盐浓度下仍能存活(图 2-15),在 200mM NaCl 的胁迫下依然正常开花成熟。

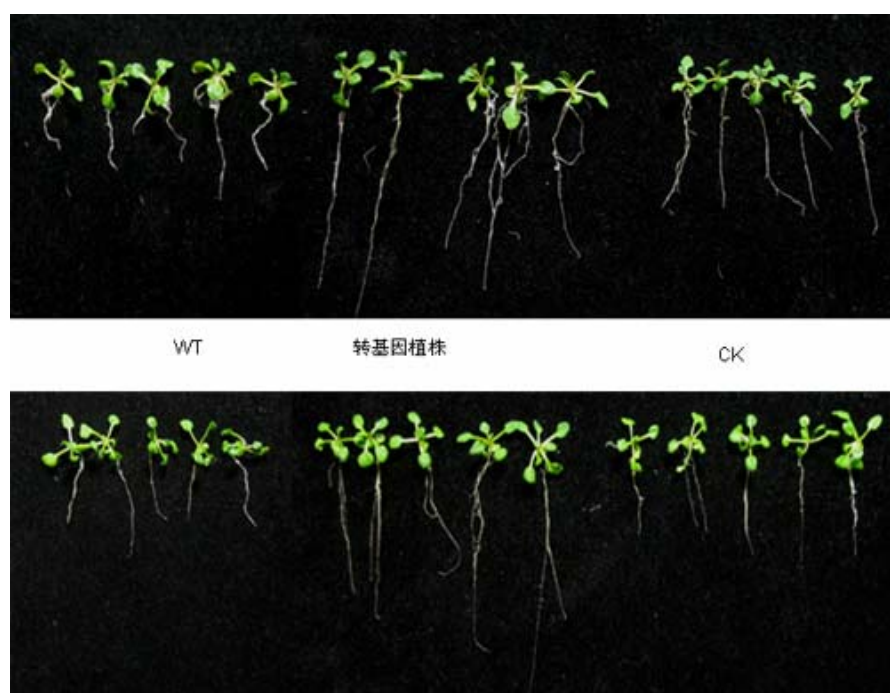


图 2-14 NaCl 胁迫条件下幼苗生长状况 (上图: 50mM NaCl; 下图: 100mM NaCl)

Fig.2-14 Seedlings stressed with NaCl (Up: 50mM; Down: 100mM)

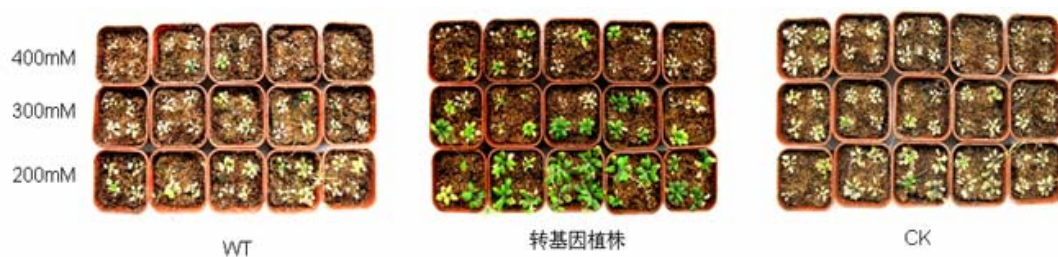


图 2-15 NaCl 胁迫条件下植株生长状况

Fig.2-15 Plants treated with NaCl

2.2.3.4 转基因植株耐旱性鉴定

幼苗表现出的耐胁迫差异从种子萌发以后就已经存在, 在 300mM 甘露醇胁迫的培养基上非转基因幼苗萌发后根部生长缓慢 (图 2-16A)。为了进一步验证胁迫对植株根部生长的影响, 将种子在不含胁迫的 MS 培养基上萌发, 生长一周后转入胁迫处理的培养基上, 两周后发现转基因植株的根部生长状态明显优于野生型和对照植株 (图 2-16B、C)。图 2-17 所示为在含有不同浓度甘露醇的培养基上幼苗萌发和生长情况的比较, 从图中可以看出, 种子的萌发力基本一致, 随着胁迫浓度的增强和胁迫时间的延长, 野生型和对照植株的幼苗成活率降低 (图 2-18)。

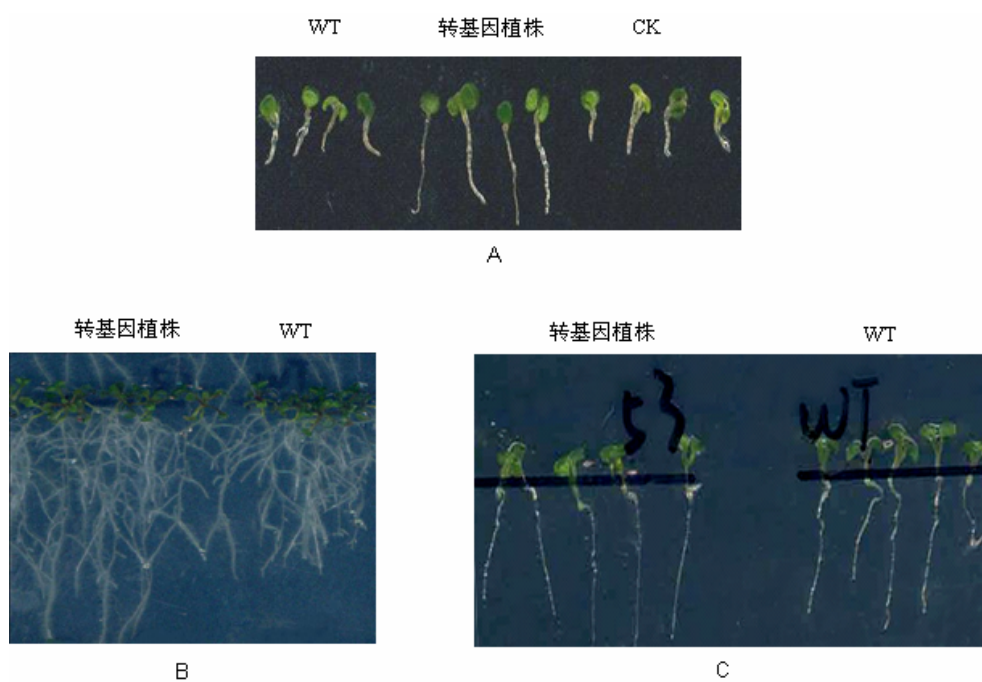


图 2-16 不同 MS 培养基条件下的幼苗

A: 400mM 甘露醇; B: 300mM 甘露醇处理 15 天; C: 处理前

Fig.2-16 Seedlings stressed with mannitol

A: 100mM NaCl; B: 400mM; C: 300mM for 15 days; D: treated before

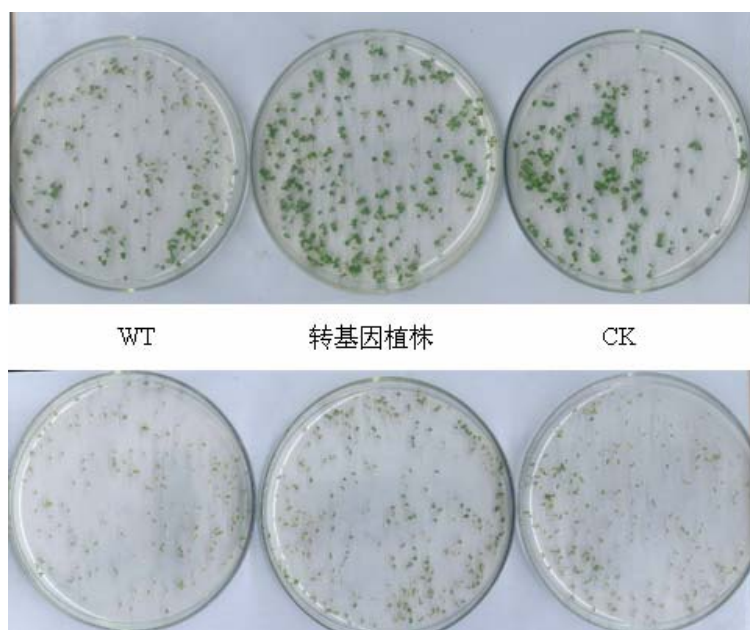


图 2-17 甘露醇胁迫下种子萌发能力 (上图: 300mM; 下图: 400mM)

Fig.2-17 Germination on medium containing mannitol (Up: 300Mm; Down: 400mM)

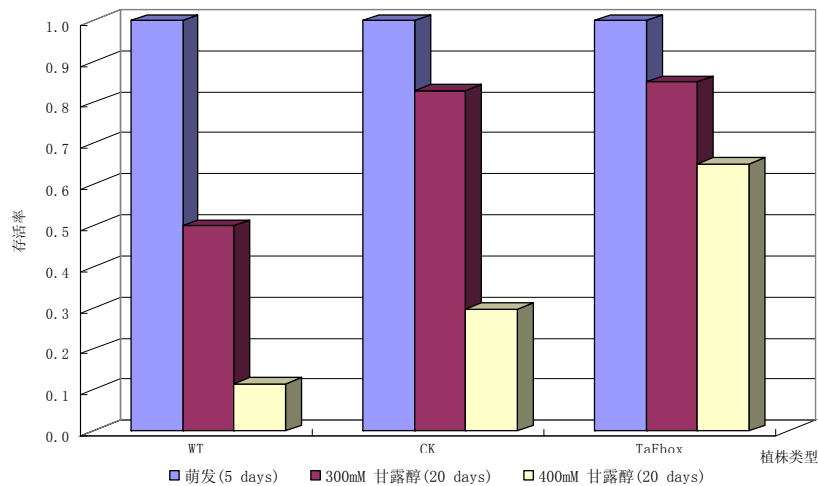


图 2-18 甘露醇胁迫下存活率比较

Fig.2-18 *Arabidopsis* survive rate after being stressed by mannitol

2.3 讨论

TaFbox 基因的氨基酸序列提交到 NCBI 的 rpsblast 网站进行保守结构域预测, 结果表明该基因前 50 个氨基酸组成一个非常保守的 F-box 结构域。F-box 蛋白是 SCF 复合体中的一个亚基, 此外 SCF 复合体还包含三个亚基: Skp1、Cdc53 (cullin) 和 RBX1, 这三个亚基组成一般性骨架, 主要通过不同的 F-box 蛋白结合识别不同的底物来发挥作用, 因此 F-box 蛋白决定了底物的特异性 (Kong et al. 2004)。通常, 在 F-box 蛋白的 N 端有一个由 40-50 个氨基酸组成的 F-box 结构域, 是介导与其它蛋白质发生相互作用的位点 (Bai et al. 1996)。此外, 在蛋白质的 C 端往往还存在一些与蛋白-蛋白相互作用相关的二级结构, 如亮氨酸拉链 (LRR)、WD40、锌指结构等, 有些 F-box 基因的 C 端无明显的结构特征, 它们可能介导了底物的特异性识别。我们克隆到的基因在 C 端没有明显的结构特征。相对于 F-box 蛋白而言, 同源基因间的相似性很低, 但其在 F-box 结构域区具有很高的保守性。

cDNA-AFLP 技术是研究初期分离基因差异表达片段的有效方法, 本实验室已经通过该方法克隆了小麦液泡膜 ATPase C 亚基 (*TaVHA-C*) 的全长 cDNA, Northern 结果表明, 该基因的表达受盐、干旱和低温的诱导 (秘彩莉等, 2006)。*TaFbox* 基因是通过盐胁迫处理后差异表达的片段经 RACE 方法得到的全长 cDNA 序列, tblastx 结果没有比对上小麦中的氨基酸序列, 表明该基因在小麦中是一个新基因。再与小麦的 EST 数据库比对, 分析发现与叶锈诱导的小麦 cDNA 文库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) 存在相似性很高的片段, 但没有相关基因全长序列的报道。推测该基因参与了盐胁迫下的应答反应, 在小麦的逆境胁迫反应中可能起到一定的作用。本研究借助生物信息学手段发现该基因具有跨膜结构, 洋葱表皮进行细胞定位分析, 该基因在细胞膜上表达; 转基因植株胁迫鉴定表明该基因能增强植株对盐和干旱胁迫的耐受性, 主要表现在降低了逆境胁迫对根部生长的抑制作用。越来越多的研究表明 F-box 蛋白与各种逆境抗性有

关,参与了非生物胁迫反应。利用DDRT-PCR (differential display-reverse transcription-PCR) 方法, Zhang等(2005)从柑橘中分离了8个上调表达的cDNA片段, RT-PCR分析表明这些基因片段在其它植物中同样受渗透胁迫和光氧化信号的调节。*CIDM7*编码的F-box蛋白受冷胁迫上调表达, Jain等(2007)分析了水稻的F-box蛋白,多数受光及非生物胁迫的诱导。杨传平等(2004)利用抑制性消减杂交(SSH)技术获得了36个盐胁迫应答基因,经Blastx分析这些应答基因包括抗氧化酶CAT、海藻糖磷酸酶(trehalose phosphatase)、bZIP转录因子F-box蛋白等多种蛋白或调控蛋白。F-box蛋白在植物体中广泛存在,数量繁多,参与了多种信号途径及调节过程。

F-box蛋白通过识别降解一些调节因子对某些信号传导途径起正调控或负调控作用,参与了植物生长发育的诸多环节(Quint et al. 2006; Zhao et al. 2002; Wang et al. 2004)。EIN3是乙烯信号传导途径中的一个转录激活因子,控制一系列乙烯诱导基因的表达。Potuschak等(2003)从拟南芥中克隆到两个编码EIN3/EIL结合蛋白的F-box基因,分别命名为*EBF1*和*EBF2*,*EBF1*过量表达时突变体对乙烯不敏感,*ebf1*和*ebf2*突变体植株则表现出组成型乙烯反应,并且积累较多的EIN3蛋白。在没有乙烯存在的情况下,EIN3被泛素降解途径迅速降解。任何一个EBF1/EBF2突变都导致植物对乙烯反应增强,而双突变体则表现出组成型乙烯反应。这些结果表明,泛素降解途径通过F-box蛋白识别并降解EIN3来调节乙烯反应,是乙烯信号传导途径的负调控因子(Guo et al. 2003)。Calderón-Villalobos等(2007)克隆了拟南芥F-box蛋白7(*AtFBP7*),研究发现*AtFBP7*在拟南芥体内广泛表达,而且其表达受低温或热激的诱导,认为F-box蛋白是温度胁迫条件下某些蛋白合成所必需的。S-位点F-box类蛋白基因(S-locus F-box like genes, *AtSFLs*)是控制自交不亲和性状的关键所在,Dong等(2006)对来自拟南芥的92个*AtSFLs*分析发现,它们具有多重功能,在拟南芥的生长发育过程中发挥了不同的作用。如CEG(*AtSFL61*)受生长素诱导表达,对生长素介导的侧根形成起负调控作用。生长素是一种植物激素,受体为泛素途径中E3连接酶SCF复合体中的F-box蛋白TIR1。在生长素存在的条件下,SCF^{TIR1}与生长素直接结合,促进与AUX/IAA的识别与互作,启动泛素化过程使其降解(Kepinski et al. 2004, 2005; Dharmasiri et al. 2005a)。生长素在植物生长发育的诸多方面发挥重要的作用,研究表明生长素通过结合F-box蛋白/受体调节生长发育过程中的各种生长素反应(Dharmasiri, 2005b; Parry et al. 2006)。Bao等(2002)认为生长素与胁迫反应的相互作用可能发生在泛素途径。在所有真核生物中,F-box蛋白调节蛋白的合成,是生化过程中的主要调节因子(Lechner et al. 2006)。推测F-box蛋白在盐胁迫反应与适应过程中发挥了重要的作用,本研究克隆的小麦F-box蛋白在耐盐胁迫反应中的作用及相关耐盐机理值得进一步深入研究。

第三章 *TaFbox* 在小麦及亲缘供体种间的分析

摘要: *TaFbox*基因内没有内含子,为在基因组水平研究提供了方便。本章分别以二倍体、四倍体和六倍体小麦材料,对该基因在亲缘种间的进化关系进行了分析。该基因在同一基因组内部及不同基因组材料间都存在多态性,同源序列间的保守性很高,相似性达到94%,多为个别碱基的突变,差异明显的只有6个碱基的插入(命名为*TaFbox2*)。利用反向PCR方法得到了基因的上游序列,并根据*TaFbox*和*TaFbox2*设计了下游特异引物,分析发现亲缘材料上游序列间的差异明显高于基因间的差异,相似性只有76%,多为插入或缺失型突变,差异主要集中在远离基因约-500bp以外的位置,可能影响到基因的表达模式。RT-PCR结果表明*TaFbox*和*TaFbox2*都受盐、旱胁迫的诱导,但诱导模式存在一定的差异,由于基因的保守性很高,其上游序列的差异对其表达差异可能有更大的影响。利用中国春-比萨偃麦草附加系和中国春缺-四体分析,将该基因家族定位在第2部分同源群染色体上。

小麦是重要的粮食作物之一,普通小麦是通过属间天然杂交形成的异源六倍体,整个基因组分为**A**、**B**、**D**三个基因组;目前,通过形态学、染色体配对、细胞学鉴定和分子标记已证明**A**基因组的祖先供体为乌拉尔图小麦(*Turartu Thum*, **A**),**D**基因组的供体是粗山羊草(*Ae.squarrosa*, **D**) (Kihara, 1944; McFadden and Sears, 1944),**B**基因组的来源虽然还没有定论,但许多研究表明拟斯卑尔脱山羊草(*Aegilops speltoides*, **S**)及其近亲单独或共同提供了基因组的供体,只是在进化过程中发生了部分改变(Sarkar, 1956; Daud et al. 1996),**A**、**B**基因组直接供体来自栽培二粒小麦。不同基因型的小麦携带不同的遗传信息,许兴等(2002)对不同基因型小麦幼苗的抗旱、抗盐性比较研究发现,含有DD染色体组的二倍体粗山羊草较含有**BB**和**AA**的四倍体小麦具有较强的抗旱与抗盐性,且由它与四倍体小麦(**AABB**)杂交后形成六倍体小麦(**AABBDD**)较二倍体和四倍体小麦有较强的抗旱、抗盐性。余波澜等(2001)以STS标记MWG913研究同源DNA的进化发现,**A**、**S**、**D**基因组在进化中DNA序列的演化速度存在明显的差异,**S**基因组要快于**A**和**D**基因组。Feuillet等(2001)研究也表明在多倍体化后同源基因(*Lrk*)的进化是相对独立的。

3.1 材料与方法

3.1.1 实验材料

六倍体普通小麦(*Triticum aestivum* L. **ABD**)品种中国春和耐盐品系98-160、栽培二粒小麦(*T.dicoccum* S. **AB**) DM102、二倍体祖先种乌拉尔图小麦 UR203 (*T. urartu* Thum, **A**)、拟斯卑尔脱山羊草 Y162 (*Aegilops speltoides*, **S**)、粗山羊草 Y2280 (*Ae.squarrosa*, **D**)和中国春缺四体、中国春-比萨偃麦草(*Thinopyrum bessiarabicum*, **E^b**)附加系等材料的DNA由本实验室保存提供。所用原核表达载体 pet30a 由本实验室保存。

3.1.2 实验方法

3.1.2.1 总 RNA 的提取

将 98-160 品系的种子浸泡过夜，然后在培养皿中生长，待幼苗长至 5cm 时，转入盛有 Hoagland 营养液的塑料盒中培养。当幼苗长至两叶一心时，加入 250mM NaCl 和 16% PEG 进行胁迫处理，整个培养过程在 25℃ 进行。胁迫时间分别为 0、15min、2h、6h、12h、24h，同时取叶片备用。具体步骤如下：

- (1) 灭菌后的一次性塑料制品如枪头、1.5ml离心管基本上无RNA酶，可以不经预处理直接用于制备和贮存RNA；反复使用的塑料制品如40ml离心管、研钵和玻璃器皿等使用前需用0.1%DEPC水浸泡过夜，然后高压蒸汽灭菌45min。新开封的试剂基本上无RNA污染，可直接使用。提取过程中所有需配制试剂的溶剂一律用灭菌的0.1%DEPC水；
- (2) 将研钵充分预冷，称取0.1g叶片材料，在液氮低温下充分研磨；将粉末转入1.5ml离心管，加入1ml Trizol，充分混匀；
- (3) 将样品在室温（15-30℃）放置5min，使核酸蛋白复合物完全分离，4℃10000×g离心10min；
- (4) 将上清液转入一新离心管，加入200μl氯仿，剧烈振荡15s，室温静置3min，4℃10000×g离心15min；
- (5) 将液相转移到一新离心管中，加入0.5ml异丙醇，混匀，室温静置10min，4℃10000×g离心10min；
- (6) 倒掉液相，加入1ml 75%乙醇，4℃低于7500×g离心5min，弃上清。短暂干燥，加入适量DEPC水溶解，-70℃保存；
- (7) 经1.2%甲醛变性后琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性，Bio-Rad公司的紫外分光光度计测定RNA的浓度；
- (8) 变性凝胶电泳：胶板、胶槽、梳子和电泳池用洗涤灵浸泡洗涤后，0.5%SDS浸泡过夜，洗净后，用蒸馏水冲洗、备用。配制1.2%甲醛变性琼脂糖凝胶（100ml）：1.2g琼脂糖；10ml 10×FA Buffer；加灭菌DEPC水至100ml。溶胶后将胶冷却至50℃，加入1.8ml甲醛及1μl EB，混匀后倒胶（厚度0.5-0.6cm）。待胶凝固后，将胶放入盛有1×FA running buffer的电泳槽中平衡（至少0.5h），将RNA样品中加入1/4体积的1×RNA loading buffer。混匀后，65℃恒温3-5min，然后冰浴至少5min，点样。电压100V，0.5h。

3.1.2.2 cDNA 第一链合成

将完整性很好的RNA经反转录合成第一链cDNA。参照Invitrogen公司反转录试剂盒（M-MLV RT）提供的方法进行。

- 1) 将如下试剂（表3-1）加入无RNA酶离心管；

表3-1 cDNA合成反应液1

Table 3-1 Mix1 of cDNA reaction

成分	体积
Ingredient	Amount
Oligo(dT)18(500ng/μl)	1μl
Total RNA	1-5μg
10mM dNTP Mix	1μl
Total	12μl

65℃恒温5min后，迅速置于冰上。

2) 将上述混合液离心后，每管加入如下溶液（表3-2）；

表3-2 cDNA合成反应液2

Table 3-2 Mix2 of cDNA reaction

成分	体积
Ingredient	Amount (μl)
5×first strand Buffer	4
0.1M DTT	2
RNaseOUT™	1
Total	7

轻轻混匀，37℃恒温2min。

3) 加入1μl M-MLV RT (200units/μl)，用枪头反复吹吸混匀，37℃恒温50min；

4) 70℃15min终止反应。

3.1.2.3 RT-PCR 反应

以单链cDNA为模板进行RT-PCR。PCR反应总体积为20μl，反应体系如下（表3-3）：

表3-3 RT-PCR反应体系

Table 3-3 RT-PCR reaction system

成分	体积
Ingredient	Amount(μl)
10× PCR Buffer	1.5
Mg ²⁺	1.5
dNTP(25mM)	0.15
Taq(5U/μl)	0.16
Primer F(10μM)	1
Primer R(10μM)	1
模板	适量
Total	15

3.1.2.4 质粒提取（96孔板）

将阳性克隆接菌到含有 1.2ml/孔 TB 的 96 深孔板中，37℃250rpm 摇菌 20 小时，按下列程

序提取质粒。

- 1) 离心, 收集菌体, 4℃4000rpm 离心 10min;
- 2) 倒掉上清液, 将板倒置餐巾纸上, 擦干残留液体后每孔加入 110 μ l 的 solution I, 每 100ml solution I +300 μ l 的 RnaseA (需根据酶的质量而定, 不同公司的酶需加不同的量);
- 3) 加入提前配好的 solution II, 每孔 110 μ l, 轻轻混匀, 室温放置一会儿, 从开始加入 solution II 时开始计时 5min;
- 4) 加入 solution III, 每孔 110 μ l, 上下颠倒混匀, 冰上放置 30min, 然后离心沉淀 (4℃、4000rpm、30min);
- 5) 转移上清液 (每孔 280 μ l) 到提前准备好的过滤膜上, 4℃4000rpm 离心 10min;
- 6) 加入 174 μ l (0.6 倍体积) 异丙醇, 盖上胶盖, 颠倒混匀, 20℃4000rpm 离心 20min;
- 7) 弃上清, 将板倒扣餐巾纸上, 然后置超净工作台内吹干, 无异味为止, 再用 50 μ l 的 1mM 的 Tris-HCl 溶解质粒;
- 8) 加入 25 μ l 7.5M 的乙酸钾和 150 μ l 预冷的无水乙醇, 然后盖好胶盖, 上下颠倒混匀, -20℃冰箱内沉淀 30min 左右, 离心沉淀 (4000rpm、4℃、30min);
- 9) 弃上清, 将板倒置餐巾纸上, 加入 200 μ l 70%乙醇清洗, 封膜离心 (4000rpm、4℃、20min);
- 10) 弃上清, 将板倒置餐巾纸上, 置超净工作台内吹干, 无乙醇味为止;
- 11) 依据 DNA 量适当加入 1mM 的 Tris-HCl 溶解 (50 μ l 左右)。

3.1.2.5 培养基及提取液配制

(1) TB 培养基 (表 3-4、表 3-5)

表 3-4 TB 培养基配制

Table 3-4 Confection of TB culture medium

成分 ingredient	体积 amount
Bacto trytone	12g
Bacto yeast extract	24g
甘油	4ml
ddH ₂ O	To 1000ml

表 3-5 磷酸盐缓冲液配制

Table 4-5 Confection of phosphate buffer

成分 Ingredient	体积 Amount
KH ₂ PO ₄ (0.17Mol/L)	2.31g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O(0.72Mol/L)	16.43184g
H ₂ O	100ml

混匀后高压蒸汽灭菌 20 分钟，然后使溶液降温至 60℃或 60℃以下，再加入 100ml 经灭菌的磷酸盐缓冲液和抗生素。

(2) Solution I (表 3-6):

表 3-6 Solution I 配制
Table 3-6 Confection of Solution

成分	体积
Ingredient	Amount
葡萄糖(50mMol/L)	9.9g
1M Tris-HCl (PH8.0) (25mMol/L)	25ml
0.5M EDTA (PH8.0) (10mMol/L)	20ml

定容至 1L，高压灭菌。

(3) Solution II (表 3-7):

表 3-7 Solution II 的配制
Table 3-7 Confection of Solution II

成分	体积
Ingredient	Amount
ddH ₂ O	9.3ml 23.25ml 46.5 ml
10N NaOH	200ml 500ml 1ml
20% SDS	500ml 1.25ml 2.5ml
Total	10ml 25ml 50ml

(4) SolutionIII (3M)

乙酸钾：294.45g；冰醋酸：300ml 左右（调 PH4.8-5.2）

用 1L 的蒸馏水定容，高压灭菌，冷却后 4℃保存。

(5) 7.5M 的乙酸钾

乙酸钾 736.05g，用 1L 的蒸馏水溶解，摇匀后高压灭菌，冷却后于 4℃保存。

3.1.2.6 原核表达蛋白诱导

根据基因的开阅读框设计引物，加上酶切位点 *KpnI* 和 *SacI*，与原核表达载体 *pet30a* 连接构建表达载体、转化大肠杆菌、挑选阳性克隆、提取单克隆质粒热激转化表达菌株 BL21、挑取单菌落菌斑接种于 2ml 的 LB 液体培养基（含适宜的抗生素）中，于 37℃振荡培养过夜，次日将菌液按 1: 100 转接到 50ml 液体培养基中，37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.3-0.5，加入 IPTG 至终浓度 0.5mM，诱导目标蛋白表达，继续于 37℃摇床培养，2h 后分别取 1ml 菌液，7000rpm 离心 1min 收集菌体。细菌沉淀可以在-70℃保存，短期内不会降低目的蛋白的产量。

3.1.2.7 蛋白表达检测

- 1) 样品准备：将上面收集的菌体加入适量蛋白提取液，搅拌均匀，置于 60℃ 水浴锅中水浴 2 小时，期间振荡 2-3 次；
- 2) 玻璃板组装和灌胶
 1. 擦板：分别用酒精和 Repel 试剂将玻璃板内面擦拭干净；
 2. 组装：将玻璃板夹条放在长短玻璃板内面左右两侧，用板夹将玻璃板的左右两边夹紧，形成封闭系统，底边缘用橡皮膏粘紧，固定在玻璃板支架上，等待灌胶（如果漏液，将板夹底端与玻璃板接触部位空隙处先用凡士林添满，擦拭干净后，再粘橡皮膏）；
 3. 先配制分离胶，选择适合目标蛋白大小的分离胶浓度，按照表 3-8 从上到下顺序依次将溶液加入 100ml 烧杯中，往玻璃板间灌分离胶到距离上边缘 4.5cm 处为止，每板再轻轻加入正丁醇 200 μ l，至上层可明显见到三层溶液（约 40-50min）则聚合完成；
 4. 用滤纸轻轻吸出上层正丁醇溶液，按表 3-8 浓缩胶溶液从上到下顺序加入 100ml 烧杯中混匀，倒入分离胶上面至溢出，迅速插入样品梳，约 10min 后浓缩胶聚合完成，拔掉样品梳，用 1 倍的电极缓冲液用力冲洗梳孔，等待上样。
- 3) 加样和电泳
 - a) 样品孔内加满 1 倍的电极缓冲液，用 10 μ l 移液枪加样，每孔加 8 μ l 样品提取液，所有样品加完后把板上到电泳槽上，在上下电泳槽内加入电极缓冲液（上槽 350ml，下槽 2100ml）（注意：上槽每次必须用新配制的电极缓冲液，下槽可用 5-6 次）；
 - b) 16 \times 18cm 的玻璃板，恒流 21mA 条件下电泳 14-16h 即可。
- 4) 染色和脱色

电泳结束后小心剥离胶，放入 200-400ml 10%三氯乙酸染色液的盘内染色。倒出染液加入自来水脱色过夜，期间换水 2-3 次，胶脱色后可照相或风干保存。

表 3-8 SDS-PAGE 凝胶的配制
Table3-8 Confection of SDS-PAGE gel

试剂名称 reagent	分离胶贮液 separation gel C=2.67	浓缩胶贮液 Concentration gel C=2.67
40% Acr(ml)	8.72	1.824
2% Bis(ml)	4.75	1
Tris 3M PH8.8(ml)	5.64	
Tris 0.5M PH6.8(ml)		5
ddH ₂ O(ml)	25.2	12
10% SDS(μ l)	500	200
10% APS(μ l)	200	150
TEMED(μ l)	20	20
Total(ml)	45	

5) 提取液配制

a) 提取缓冲液母液 (Sample Buffer)

4g SDS+11.5ml 蒸馏水+20ml 甘油+25ml 0.5M Tris (PH6.8) +25mg 溴酚蓝, 60°C 水浴溶解, 4°C 保存。

b) 样品提取液

缓冲液母液 10ml+10ml 蒸馏水+200mg DTT, 完全溶解, 4°C 保存。

6) 胶溶液配制

1. 40% 丙烯酰胺 (Acr)

称 200g Acr 置于 500ml 烧杯中, 加入蒸馏水, 60°C 水浴溶解, 待温度降至室温, 将溶解的 Acr 液倒入 500ml 容量瓶中, 用蒸馏水补至刻度线, 过滤, 4°C 保存备用。

2. 2% 甲叉双丙烯酰胺 (Bis)

称 4g Bis 于 200ml 烧杯中, 加入蒸馏水, 60°C 水浴溶解, 待温度降至室温, 倒入 200ml 容量瓶, 用蒸馏水补至刻度线, 过滤, 4°C 保存备用。

3. 3M Tris-HCl (PH8.8)

称 72.6g Tris 置于 200ml 烧杯中, 加蒸馏水至 150ml, 60°C 水浴溶解, 待温度降至室温, 加入 8ml 盐酸, 再缓慢加入微量盐酸, 调 PH 值至 8.8, 将调好后的 Tris 溶液倒入 200ml 容量瓶中, 用蒸馏水调至刻度线, 过滤, 4°C 保存备用。

4. 5M Tris-HCl (PH6.8)

称 15.1g Tris 置于 500ml 烧杯中, 加蒸馏水溶解, 用盐酸和酸度计调 PH 值至 6.8。将调好的溶液倒入 250ml 容量瓶, 蒸馏水调至刻度线, 过滤, 4°C 保存备用。

5. 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS)

10g SDS 加 90ml 蒸馏水于 100ml 烧杯中, 60°C 水浴溶解, 室温保存。

6. 10% 过硫酸铵 (APS)

3g APS 加 30ml 蒸馏水于 100ml 烧杯中, 分装到 1.5ml 离心管中, -20°C 储存备用。

7) 电极缓冲液和染色液的配制

1. 10× 电极缓冲液母液 (Running Buffer)

称 144g 甘氨酸+30.3g Tris+10g SDS 置于 1000ml 烧杯中, 加蒸馏水稀释, 60°C 水浴溶解, 溶后待温度降至室温倒入容量瓶, 用蒸馏水调至刻度线, 室温储存备用。

2. 1% 考马斯亮蓝 (R-250)

1g Coomassie+100ml 95% 或 100% 的乙醇, 混匀过夜备用。

3. 10% 三氯乙酸 (TCA) 染色液

10g 三氯乙酸+100ml 蒸馏水+2.5ml 1% 考马斯亮蓝。

3.1.2.8 反向 PCR (Inverse PCR, IPCR)

表 3-9 IPCR 反应体系
Table 3-9 IPCR reaction system

成分 Ingredient	体积 Amount
10×Buffer	5ml
E	15U
BSA	0.5ml
gDNA	5μg
Total	50ml

- 1) 按表 3-9 反应体系配制混合液，37℃ 反应过夜；
- 2) 65℃ 10min 使酶失活；
- 3) 取 5μl 电泳检测，剩余溶液加入等体积的酚：氯仿（1：1），混匀后 12000rpm 离心 15min；
- 4) 取上清加 2 倍体积的乙醇沉淀，12000rpm 离心 15min；
- 5) 70%的乙醇洗一次，12000rpm 离心 15min；
- 6) 取适量 TE 溶解沉淀；
- 7) 酶切产物连接：取 5μl 酶切产物，加 0.3U 连接酶 4℃ 反应过夜；
- 8) PCR 反应参照 Ochman 等（1988）。

3.2 结果与分析

3.2.1 *TaFbox* 基因在近缘种材料间的克隆分析

3.2.1.1 *TaFbox* 基因在近缘种材料间的克隆

根据开放阅读框设计引物在小麦 gDNA 中扩增，发现其扩增片段与 cDNA 扩增片段大小一致（图 3-1），表明该基因没有内含子，为该基因在近缘材料间的研究提供了方便。以 UR203（**A** 基因组）、Y162（**S** 基因组）、Y2280（**D** 基因组）、栽培二粒小麦（**AB** 基因组）及中国春和 98-160（**ABD** 基因组）为材料进行扩增，同样扩增出 1.2Kb 的片段，将扩增的片段回收，连接在 PGEM-Teasy 载体上，分别挑取一定数量的阳性质粒进行测序分析。

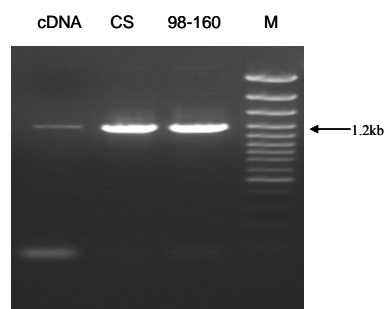


图 3-1 gDNA 扩增

Fig.3-1 Amplification of gDNA

3.2.1.2 亲缘材料间 *TaFbox* 基因核苷酸序列分析

对来自不同材料的序列进行测序分析，发现该基因在材料间和材料内都存在多态性，但在每个材料中都包含两种以上的序列，但所有序列的保守性很高，差异主要是单个氨基酸的突变，不同材料间的相似序列突变趋势是相似的，即碱基的突变类型和突变位置基本一致。差异明显的可以分为两种类型（图 3-2），较第一种类型明显的差异在于 6 个碱基的插入（ABD2 命名为 *TaFbox2*）。对所有序列进行聚类分析，序列保守性都很高，相似性达到 95%以上（图 3-3），除 Y162（S 基因组）以外其它基因组材料间存在基本一致的序列，如图 3-4 所示，只有 Y2280（D 组）存在两个氨基酸的差异，A、AB 和 ABD 组的材料与我们最初克隆的基因（*TaFbox* 基因）完全一致。总体上，各种类型序列在不同材料中都有分布，而且所有序列在核苷酸 (>95%) 及氨基酸 (>90%) 水平上的相似性都很高。一些序列由于突变的存在提前终止，不能编码完整的 400 个氨基酸，但对其氨基酸保守结构域分析，所有序列都具有 F-box 结构（图 3-5）。

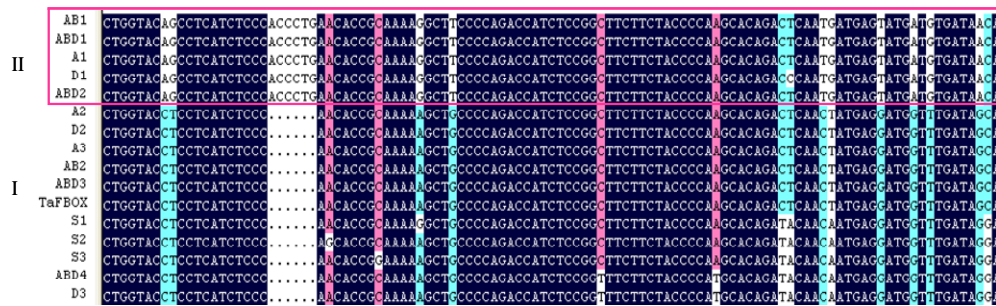


图 3-2 基因组材料间 *TaFbox*s 的核苷酸序列比对
Fig.3-2 Alignment of *TaFbox* from genomic DNAs

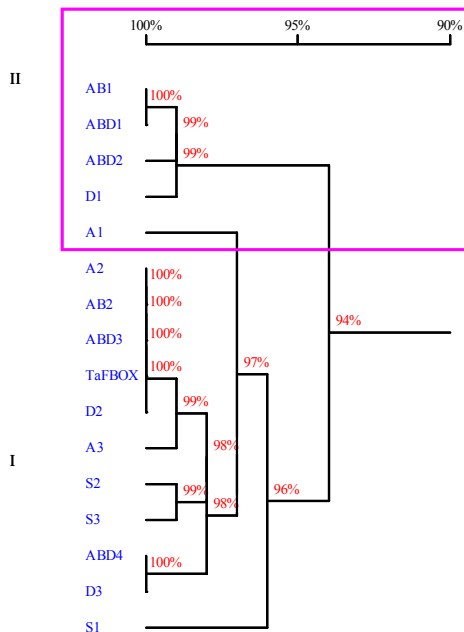


图 3-3 基因组材料间 *TaFbox*s 的核苷酸序列聚类分析
Fig.3-3 Cluster of *TaFbox*s from genomic materials

D2	MACTQMNCSKNGTTSAADLTDDLIEILSELVKSVCRFKCVSRWLWYLLISQHRKLPQTISGFFYPKHRLNYEDGLIAFPPTFDGISRDQEQLFPPDSSLS	100
A2	MACTQMNCSKNGTTSAADLTDDLIEILSELVKSVCRFKCVSRWLWYLLISQHRKLPQTISGFFYPKHRLNYEDGLIAFPPTFDGISRDQEQLFPPDSSLS	100
ABD3	MACTQMNCSKNGTTSAADLTDDLIEILSELVKSVCRFKCVSRWLWYLLISQHRKLPQTISGFFYPKHRLNYEDGLIAFPPTFDGISRDQEQLFPPDSSLS	100
AB2	MACTQMNCSKNGTTSAADLTDDLIEILSELVKSVCRFKCVSRWLWYLLISQHRKLPQTISGFFYPKHRLNYEDGLIAFPPTFDGISRDQEQLFPPDSSLS	100
TaFbox	MACTQMNCSKNGTTSAADLTDDLIEILSELVKSVCRFKCVSRWLWYLLISQHRKLPQTISGFFYPKHRLNYEDGLIAFPPTFDGISRDQEQLFPPDSSLS	100
D2	FLTGYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWVILPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSPHFHFVQILEGDEDEYGISGVNIYSSETGAWSY	200
A2	FLTGYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWVILPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSPHFHFVQILEGDEDEYGISGVNIYSSETGAWSY	200
ABD3	FLTGYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWVILPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSPHFHFVQILEGDEDEYGISGVNIYSSETGAWSY	200
AB2	FLTGYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWVILPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSPHFHFVQILEGDEDEYGISGVNIYSSETGAWSY	200
TaFbox	FLTGYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWVILPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSPHFHFVQILEGDEDEYGISGVNIYSSETGAWSY	200
D2	KENGWGDNEIQIVDMRGVFFNGMMHLLTCEFKILAVDTGKTTWRTISLLETMCVGNICLGLAFIGQSQRLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIF	300
A2	KENGWGDNEIQIVDMRGVFFNGMMHLLTCEFKILAVDTGKTTWRTISLLETMCVGNICLGLAFIGQSQRLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIF	300
ABD3	KENGWGDNEIQIVDMRGVFFNGMMHLLTCEFKILAVDTGKTTWRTISLLETMCVGNICLGLAFIGQSQRLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIF	300
AB2	KENGWGDNEIQIVDMRGVFFNGMMHLLTCEFKILAVDTGKTTWRTISLLETMCVGNICLGLAFIGQSQRLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIF	300
TaFbox	KENGWGDNEIQIVDMRGVFFNGMMHLLTCEFKILAVDTGKTTWRTISLLETMCVGNICLGLAFIGQSQRLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIF	300
D2	KYNIISTSQLFGELEGEKNHMLQRDYADLLFQRDYALIAIHPECNLIFVWRCKDVLVSYDMDRGKVCVICSLKYHLYDTFPPYLPVPPFFSRIGKPRVEA	400
A2	KYNIISTSQLFGELEGEKNHMLQRDYADLLFQRDYALIAIHPECNLIFVWRCKDVLVSYDMDRGKVCVICSLKYHLYDTFPPYLPVPPFFSRIGKPRVEA	400
ABD3	KYNIISTSQLFGELEGEKNHMLQRDYADLLFQRDYALIAIHPECNLIFVWRCKDVLVSYDMDRGKVCVICSLKYHLYDTFPPYLPVPPFFSRIGKPRVEA	400
AB2	KYNIISTSQLFGELEGEKNHMLQRDYADLLFQRDYALIAIHPECNLIFVWRCKDVLVSYDMDRGKVCVICSLKYHLYDTFPPYLPVPPFFSRIGKPRVEA	400
TaFbox	KYNIISTSQLFGELEGEKNHMLQRDYADLLFQRDYALIAIHPECNLIFVWRCKDVLVSYDMDRGKVCVICSLKYHLYDTFPPYLPVPPFFSRIGKPRVEA	400

图 3-4 高相似性序列的氨基酸序列比对
Fig.3-4 Alignment of some sequences with high similarity

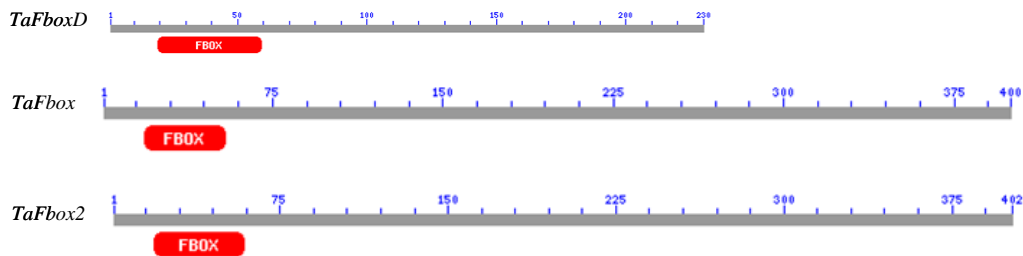


图 3-5 不同类型序列保守结构域
Fig.3-5 Conserve domain of different type sequences

3.2.2 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 表达分析

3.2.2.1 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 氨基酸水平比较分析

TaFbox 和 *TaFbox2* 是所克隆的序列中差异较大的两个类型，原核表达分析表明它们蛋白分子量差异较小。氨基酸序列分析（图 3-6）发现两个基因在氨基酸水平相似性也很高，达 90%，明显的差异在于 6bp 碱基的插入，但并没有破坏原有基因的编码框，只是导致在该位点处有两个氨基酸的插入，其它位置氨基酸的差异主要是由于个别碱基的突变产生的。对两个氨基酸组成进行统计分析（表 3-11），分子量分别为 45.9KD 和 46.5KD，差异较小，预测的与原核表达结果基本一致。从氨基酸组成成分分析，*TaFbox2* 含有较多的强酸性氨基酸，其它成分相差不大，因此 *TaFbox2* 基因的等电点较低。总的来看，两个基因在蛋白水平存在着一定的差异，加之两种类型的基因在上游序列存在较大差异，推测基因在表达调控方面应该存在差异。

TaFbox	MACTQMNCSKNCITTSADLTDDLIIIEILSLLPVKSVCRFKCVSRLWYLLISQ...HRKRLPQTISGFFYPKHLRLNEDGLIAPPTF	83
TaFbox2	MACTQMNRSKNCATSADLTDDLIIIEILSLLPVKSVCRFKCVSRLWYSLISHPHHRKRLPQTISGFFYPKHLRLNEDYDVIAPPTF	85
TaFbox	DGISRDQEQLFDPSSLSFLTQYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWVLLPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSP	168
TaFbox2	DGISRDQEQLFDPSSLSFLTAYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWVLLPDAGHKSDALAYRLGFDGAMST	170
TaFbox	HFHFVQILEGDEDDYGYISGVNIYSSETGAWSYKENGWGDNEIQIVDMRGVFFNGMMHLLTCEFKLLAVDTEGKTWRTISLLETMC	253
TaFbox2	HFHFVQILEGDEDDYGYISGVNIYSSETGAWSYKENGWGDNEIQIVDMRGVFFNGMMHLLTREFKLLAVDTEGKTWRTISLLETMC	255
TaFbox	VCNICTLGLAFIQSQGRLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIFKYNISTSQLFGELFGEKNHMLQRDYADLLFQRDYALIA	338
TaFbox2	DENIYLCHLAFIQSQGRLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIFKYNISTSQLFGELFGEKDVTLQRDYADLLFQRDYALIA	340
TaFbox	IHPBCNLIFVWRCKDVLVLSYDMDRGKVCVICSLKYLIDTFPPYLPYVVEFSRIGKPRVEA	400
TaFbox2	IHPBCNLIFVWRCKDVLVLSYDMDRGKARVICSLKESYETTFPPYLPYVVEFSRIGKPRVEA	402

图 3-6 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 氨基酸序列比对
Fig.3-6 Amino acids alignment of *TaFbox* and *TaFbox2*

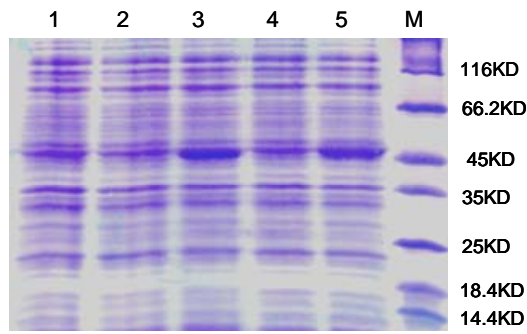
表 3-11 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 氨基酸组成分析

Fig.3-11 Amino acids composition of *TaFbox* and *TaFbox2*

	<i>TaFbox</i>	<i>TaFbox2</i>
氨基酸数目	400	402
Amino Acids		
分子量	45.9KD	46.5KD
Molecular Weight		
强碱性氨基酸	36	38
Strongly Basic(+) Amino Acids		
强酸性氨基酸	49	56
Strongly Acidic(-) Amino Acids		
亲水性氨基酸	142	140
Hydrophobic Amino Acids		
极性氨基酸	110	108
Polar Amino Acids		
等电点	5.117	4.995
Isoelectric Point		

3.2.2.2 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 蛋白原核表达分析

根据基因的开放阅读框设计引物，加入酶切位点 *KpnI* 和 *SacI*，以 *pet30a* 为基础载体构建了两个基因的原核表达载体。以大肠杆菌 BL21 寄主，通过 IPTG 诱导基因的表达，提取蛋白进行电泳检测，两个蛋白具有完整的编码活性，但分子量大小差异不很明显（图 3-7），与上述分析结果一致。

图 3-7 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 蛋白原核表达分析

1: pet30a; 2: *TaFbox* (诱导前); 3: *TaFbox* (诱导 2h); 4: *TaFbox2* (诱导前); 5: *TaFbox2* (诱导 2h); M: 蛋白 Marker

Fig.3-7 Induced expression of *TaFbox* and *TaFbox2* in *E.coli*

1: pet30a; 2: *TaFbox* (induced before); 3:*TaFbox* (induced for 2h); 4:*TaFbox2* (induced before); 5:*TaFbox2* (induced for 2h); M:Protein Marker

3.2.2.3 RT-PCR 分析

以 98-160 为材料, 用 250mM NaCl、16%PEG、4℃低温进行胁迫处理, 提取不同处理时间的总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性 (图 3-8), 合成 cDNA 的第一条链。以微管蛋白 (tubulin) 做内参, 据 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 设计特异引物, 研究 *TaFboxs* 基因在盐和干旱胁迫下的诱导表达。从图 3-9A 中可以看出, 两个基因都受盐的胁迫诱导, 在盐胁迫的早期 (15min), *TaFboxs* 基因的表达即达到最高水平, 到 24h 呈现出下降的趋势; 在干旱胁迫的条件下, 两个基因均上调表达, *TaFbox* 基因的表达在 6h 后达到最高水平, 而 *TaFbox2* 基因的反应较快, 表达在 2h 达到最高水平; 对低温的反应中, *TaFbox* 基因在处理 2h 时达最高水平, 6h 后有下降的趋势, 到 12h 降到最低水平, *TaFbox2* 同样在 2h 达到最高水平, 6h 后虽有所下降, 但一直保持一定的表达水平。通过 RT-PCR 分析, *TaFboxs* 基因的表达受胁迫的诱导, 对盐的反应较为敏感, 在短时间内迅速诱导表达, 受盐诱导表达模式基本一致, 但对干旱的反应有所不同, *TaFbox2* 基因反应较为迅速, 对低温的反应差异较大, 该结果也表明两个基因对不同胁迫的表达模式存在差异。

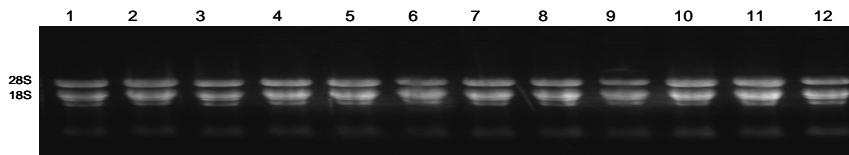


图 3-8 总 RNA 检测

1-6: 250mM NaCl 处理; 7-12: 16%PEG 处理; 处理时间分别为 0h、15min、2h、6h、12h、24h

Fig.3-8 Detection of total RNA

1-6: treated with 250mM NaCl; 7-12: treated with 16%PEG for 0h, 15min, 2h, 6h, 12h, 24h respectively

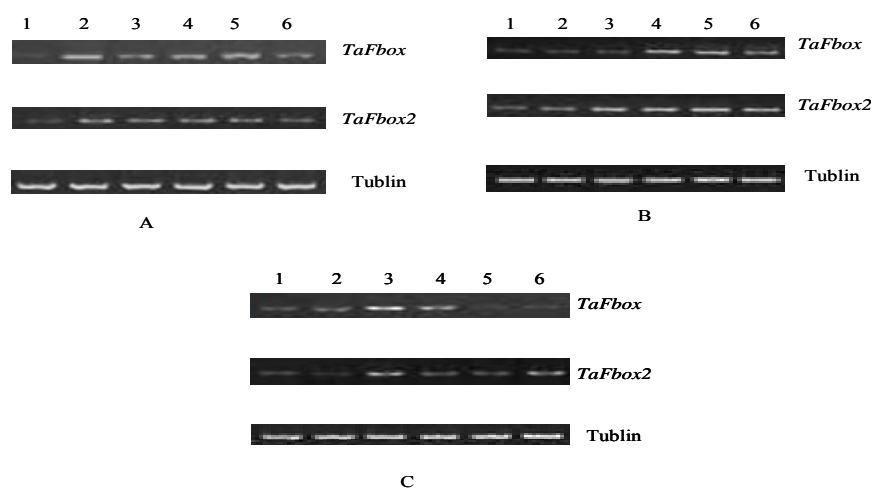


图 3-9 *TaFboxs* 在不同胁迫条件下的表达分析

A: 250mM NaCl; B: 16% PEG; C: 低温 (4°C)

1: CK; 2: 15min; 3: 2h; 4: 6h; 5: 12h; 6: 24h

Fig.3-9 Expression of *TaRLKs* under different stresses

A: 250mM NaCl; B: 16% PEG; C: low temperature (4°C)

1: CK; 2: 15M; 3: 2H; 4: 6H; 5: 12H; 6: 24H

3.2.3 *TaFbox* 基因上游序列的克隆与分析

3.2.3.1 *TaFbox* 基因上游序列的克隆

利用 MAPDRAW 软件对 *TaFbox* 基因分析, 该基因不含 *Hind*III 酶切位点, 因此利用该酶对二倍体材料 *Turartu* (UR203)、*Ae. speltoides* (Y162)、*Ae. tauschii* (Y2280)的 gDNA 进行酶切, *T₄*DNA 连接酶使酶切的片段自连, 根据 *TaFbox* 基因的 3'-端和 5'-端分别设计两对反向巢式引物, 利用二次扩增的方法扩增该基因的上游片段, 获得最长约 1.5Kb 的片段 (图 3-10)。将所得片段回收连接到 PGEM-Teasy 载体上进行测序, 比对发现该片段为 *TaFbox* 基因的上游序列, 而且三个材料的片段间同样具有一定的相似性。

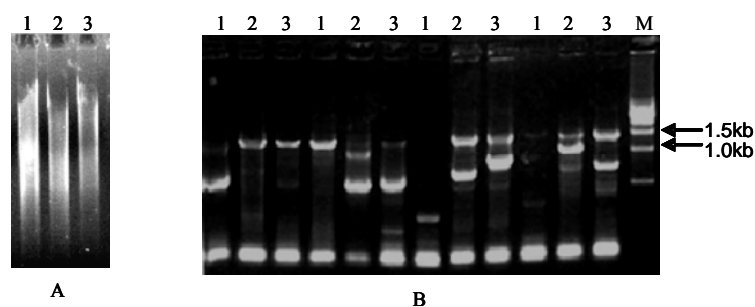


图 3-10 反向 PCR 结果 (1: UR203; 2: Y162; 3: Y2280)

A: *Hind*III 酶切结果; B: 二次 PCR 结果 (不同的退火温度)

Fig.3-10 Result of Inverse-PCR (1: UR203; 2: Y162; 3: Y2280; M: Marker)

A: Digest with *Hind*III; B: Result of reamplification (different anneal temperatures)

3.2.3.2 *TaFbox* 基因上游序列在近缘基因组材料间的分析

根据上述上游序列设计上游引物 (UP), 在 *TaFboxs* 基因的差异位置设计特异的下游引物 (DOWN1 (*TaFbox*)、DOWN2 (*TaFbox2*))。利用 UP-DOWN1 引物组和扩增结果显示 Y2280 (D 组) 的片段明显与其它片段 (A、S 和 AB 组) 不同(图 3-11A), 而在六倍体材料中国春中扩增出两条片段, 从位置上分析这两条片段分别与上述两条扩增片段相对应。测序结果聚类分析 (图 3-12) 表明, Y162 和 UR203 的上游序列比较近, 中国春的两条带中一条与 Y2280 的相似性高 (仅几个碱基的差异), 另一条与 DM102 的完全相同, 而且该片段与二倍体材料获得的片段差异较大, 相似性为 89%, 推测该片段可能是四倍体材料形成过程中发生了变异, 六倍体材料形成过程中继承了 AB 和 D 组的序列。利用 UP-DOWN2 引物组合扩增 (图 3-11B), UR203 和 Y162 没有扩增带, 所扩增的序列在核苷酸水平与第一种类型的序列差异较大。中国春材料获得两条序列, 分别与 Y2280 和 DM102 具有较高的相似性, 但这两种序列差异较大, 相似性只有 84%, 结果与上述引物基本一致, 进一步表明在四倍体形成过程中基因的上游序列发生了较大的变异, 六倍体材料的序列直接来源于四倍体 AB 组和二倍体材料 D 组。总的来看, 所获得的上游序列同样具有明显的两种类型, 差异明显高于基因间的差异 (相似性 76%>95%), 多为大片的插入/缺失, 获得的全部序列在靠近基因区域保守性很高, 差异主要集中在远离基因约 500 以上的位置 (图 3-13)。

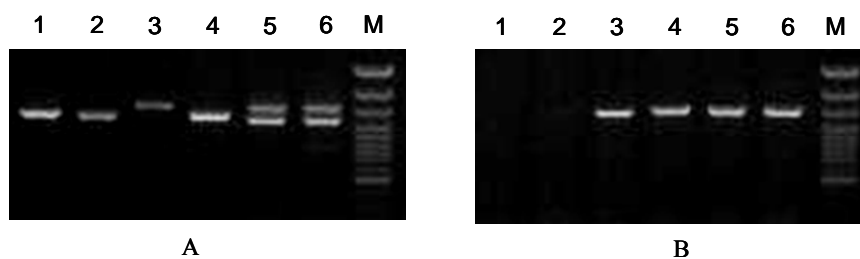


图 3-11 上游片段扩增结果

1 A: UP-DOWN1 引物扩增结果; B: UP-DOWN2 引物扩增结果
: UR203(A); 2: Y162(S); 3: Y2280(D); 4: DM102(AB); 5: CS(ABD); 6: 98-160(ABD); M: Marker

Fig.3-11 Amplification of up-sequences

A: Amplification with UP-DOWN1; B: Amplification with UP-DOWN2
1: UR203(A); 2: Y162(S); 3: Y2280(D); 4: DM102(AB); 5: CS(ABD); 6: 98-160(ABD); M: Marker

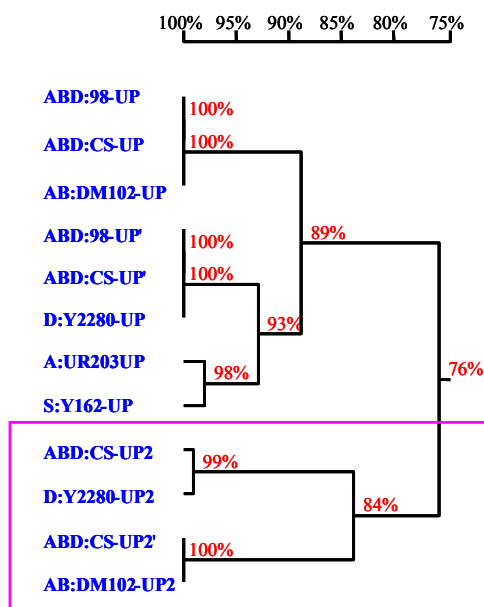


图 3-12 *TaFboxs* 上游序列聚类结果

注: 名字带 UP 的为 UP-DOWN1 扩增序列, 带 UP2 的为 UP-DOWN2 扩增序列。

Fig.3-12 Clustering based on of up-stream sequences of *TaFbox* genes

Note: sequences named with UP were amplified with primer UP-DOWN1 and UP2 with primer UP-DOWN2

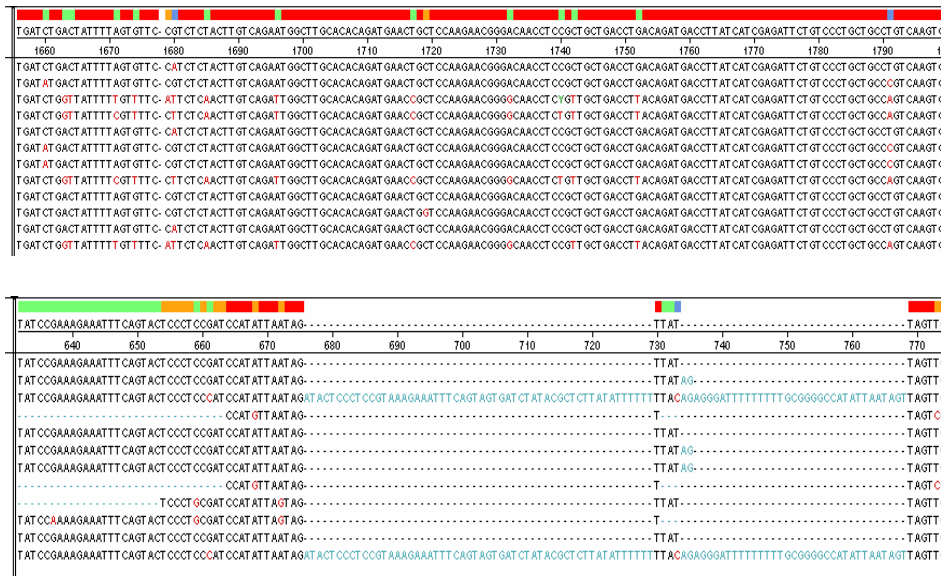


图 3-13 上游序列核苷酸序列分析
(上图：3'端即靠近基因部分；下图：5'端即远离基因部分)

Fig.3-13 Blast of up-stream sequences

(UP: 3' near the gene; Down: 5' far away from the gene)

3.2.4 *TaFboxs* 基因的染色体定位

鉴于 *TaFbox* 基因的上游序列存在较大差异，而且多态性低，UP-DOWN1 引物组合能区分来自 **D** 基因组的片段，利用该引物组合以中国春-比萨偃麦草 (E^b) 附加系 gDNA 为模板进行扩增，结果如图 3-14 所示，来自比萨偃麦草的片段明显的与 CS 的不同，在 7 个附加系材料中， $2E^b$ 扩增出自偃麦草和 CS 的片段，推测该基因位于第 2 部分同源群。进一步用中国春第二同源群和 **D** 组缺-四体材料进行分析 (图 3-15)，在所有缺失 2**D** 染色体的材料中均不能扩增出 **D** 组的特异带，单独缺失 **A** 和 **B** 的都能扩增出较小的那条片段，但缺失 2**A** 染色体的片段扩增强度明显减弱，推测可能是 **B** 组的序列本身与其它差异较大，引物匹配程度不高，因此确定该基因位于第二同源群，而且在 **A**、**B** 和 **D** 染色体上同时存在。

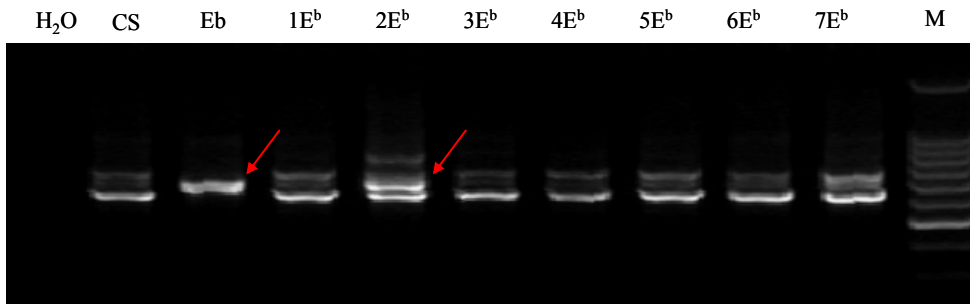


图 3-14 中国春-比萨偃麦草附加系扩增结果 (UP-DOWN1 引物组合)

Fig.3-14 PCR Amplification of up-stream of *TaFboxs* in CS-*Th.bessarabicum* addition lines (Primer UP-DOWN1)

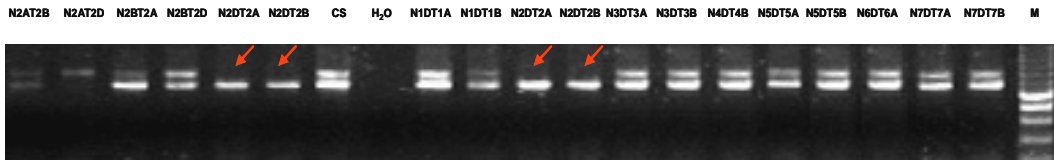


图 3-15 中国春缺四体定位 (D 组和第二同源群缺-四体, UP-DOWN1 引物组合)

Fig.3-15 Localization of *TaFbox*s on chromosomes by nullisomic-tetrasomic Chinese Spring (D genome and 2nd homologous groups nullisomic-tetrasomic, primer UP-DOWN1)

3.3 讨论

Jain 等 (2007) 分析了水稻中的 687 个 *F-box* 基因, 46.7% (280) 不含内含子, 幸运的是本研究克隆的 *F-box* 基因不含内含子, 为其在基因组水平研究提供了方便。 *TaFbox* 基因在小麦基因组中存在多拷贝现象, 通过中国春缺四体和中国春-比萨偃麦草附加系定位在第二同源群。 *TaFbox* 基因在基因组中扩增发现该基因存在多态性, 在小麦基因组供体材料中同样存在, 而且所有的序列在材料内部和材料间保守性都很高。该基因核苷酸序列在不同的材料间既有保守性, 又存在变异, 粗山羊草 (Y2280)、乌拉尔图小麦 (UR203)、栽培二粒小麦 (DM102) 和中国春小麦一些序列完全相同, 推测该序列可能是 *TaFbox* 基因的祖先序列。而拟斯卑尔脱山羊草 (Y162) 则没有与其它材料一致的序列, 而且所获得的所有序列相似性也相对较低, 表明该基因在 Y162 材料中发生了较大的变异。不同材料中都存在 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 两种类型, 由此推测这两种类型在 A、S、D 基因组物种分化的早期就已经存在, 材料间的差异可能是在以后的进化过程中形成的。对上游序列的分析发现, 来源不同的序列差异较大, 相似性只有 76%。A 组和 S 组的序列比较相似, 与其他材料的序列相差较大, 以 UP-DOWN2 为引物时, A 组和 S 组材料没有扩增带, 进一步推测是由于差异较大的原因。利用两组引物组合在六倍体中国春中总能有两条序列分别与 DM102 (AB 组) 和 Y2280 (D 组) 相似性极高, 因此推测该序列在形成 AB 型四倍体材料后发生了变异, 而六倍体小麦则继承了 AB 组和 D 组的片段, 这也与六倍体小麦的进化途径相吻合 (董玉琛等, 2000)。在 *Lrk* 的研究上也有类似的结果, Feuillet 等 (2001) 从二倍体和六倍体小麦、节节麦以及大麦中分离了 *Lrk* 基因家族, 表明 *Lrk* 同源基因在多倍体化后进化是相对独立的。 *Lrk10* 是从小麦中分离的与小麦族的抗条锈基因 *Lrk10* 紧密连锁的受体激酶基因 (Feuillet et al, 1997; Stein et al., 2000), 在一个位点上存在多拷贝现象, 而且研究表明该基因分布在第一和第三同源群上, 在燕麦属二倍体、四倍体、六倍体不同物种间分析, *Lrk10* 的序列明显地分为两组, 一组为 AA 和 AABB 基因组所有, 另一组为 CC、AACC 和 CCCC 基因组所有 (Cheng et al. 2002, 2003)。

本研究表明近缘基因组材料间研究表明 *TaFbox* 基因在进化上是保守的, 与前人研究结果相一致 (Calderón-Villalobos et al. 2007)。Das 等 (2002) 从斑马鱼中分离了两个高度保守的同源 *ppa*, 并且都能在胚胎形成过程中表达。本研究的分析结果表明该基因内部没有大片的缺失和突变, 只在 *TaFbox-2* 型有六个碱基的插入, 其它差异主要是某些位点处一两个碱基的突变,

相对而言，基因区的序列较其上游序列的变异程度低。

TaFbox 基因上游序列区的 500bp 以上的位置变异较大，多为插入或缺失型的变异，这些变异有可能导致基因表达的差异，甚至影响到基因是否表达。启动子是基因转录中重要的调控元件，受不同的调节因子控制，这种控制不仅决定基因表达的水平也决定基因表达的时空顺序，因此可以认为启动子在某种程度上决定基因表达的时空特异性。通过 RT-PCR 分析表明 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 两个基因都受胁迫的诱导，对不同胁迫条件反应是有区别的，而且在表达模式上也存在差异，深入对基因上游启动子序列的研究将有助于对基因表达功能的理解。

第四章 BAC 克隆的测序分析

摘要: 利用 *TaFbox* 基因从矮败-中国春 BAC 文库中筛选到一个阳性克隆, 通过鸟枪法测序得到 95kb 的完整序列, 分析发现 *TaFbox* 基因有三个拷贝串联存在, 序列间存在高度的相似性(91%)。结合 BAC 克隆上 *TaFbox* 基因的上游序列扩增结果和测序结果表明第二和第三个拷贝的上游序列与从栽培二粒小麦 (AB) 中扩增的序列相似性更高, 推测该 BAC 克隆来自小麦的 A 或 B 基因组。三个拷贝的上游序列差异较大, 相似性只有 64%, 所含的转录元件结合位点在种类和数量上存在明显差异。第三个拷贝前有一个 Non-LTR 型反转录转座子插入, 前两个拷贝上游序列中各有一个 MITE 元件插入。将小麦 BAC 克隆预测的结果与水稻、小麦和大麦的共线性区域进行比较, 发现 BAC 克隆上的基因在三个物种间存在明显的共线性, 小麦和大麦更为接近。相关的水稻 BAC 克隆位于第 7 染色体, 大麦 BAC 克隆位于第 2 染色体, 利用中国春缺-四体和中國春-比萨偃麦草附加系, 将该 *TaFbox* 基因家族定位于第 2 部分同源群染色体上, 基因组学分析与遗传学分析的结果相吻合。

BAC 克隆携带大片段目标 DNA, 含有基因完整的信息即基因编码区及其内含子和调控区, 对于研究基因的结构、功能、时空调控、表达特性及基因间的相互关系十分重要。同时, 在基因的定位与比较基因组研究方面也非常有效。本章对矮败-中国春 BAC 文库进行筛选并对阳性克隆通过 shotgun 测序进行分析。

4.1 材料与方法

4.1.1 试验材料

实验所用矮败-中国春小麦 BAC 文库由本实验室孔秀英课题组提供, 该库约含 1×10^6 个克隆, 覆盖小麦基因组 6.5 倍, BAC 克隆保存在 399 个混合池中; 平均插入片段 118Kb; 重组率 94%, 空载率 2.6%。

4.1.2 试验方法

4.1.2.1 BAC 混合池的筛选

BAC 混合池保存的菌种混匀后取 5ul 接种到 LB 培养基中, 摇床转速 220rpm、37℃ 培养过夜, 碱裂解法提取质粒 DNA, 根据 *TaFbox* 基因开放阅读框设计引物进行扩增, 对阳性混合池进行下一步的筛选。

- 1) 将阳性 BAC 混合池的保存菌液稀释之后, 涂布在 LB 固体培养基表面, 37℃ 过夜培养, 然后挑取 5 倍于混合池中克隆数的单克隆接种于 384 孔板中, 37℃ 培养过夜, 培养基冷冻保存;
- 2) 用每块 384 孔板中的所有单克隆制备成混合池, 接种于 LB 培养基中培养过夜, 碱裂解法

提取质粒 DNA, PCR 检测;

- 3) 对上步中呈阳性克隆的混合池进行阳性单克隆筛选。将 384 孔板中 16 个横行 (A-P) 和 24 个纵列 (1-24) 中的克隆分别混合, 共得到 40 个更小的克隆混合池。分别以其菌液为模板, 用等位特异性 PCR 引物扩增, 检测是否含有阳性克隆。含有阳性克隆的横行和纵列的交叉点就是可能的阳性单克隆;
- 4) 对 384 孔板中相应位置的单克隆用 PCR 引物加以验证。

4.1.2.2 Shotgun 文库构建

采用鸟枪法构建亚克隆文库 (Shotgun Library), 进行 BAC 克隆测序。将 BAC DNA 随机机械剪切成 3-5kb 的小片段, 连接到质粒载体上, 转化大肠杆菌感受态细胞构建文库。对该文库中的克隆进行两端测序, 利用不同克隆间的重叠关系即可拼接成 BAC 克隆的一致序列。

4.1.2.2.1 BAC DNA 大小的确定

1) 提取质粒

采用碱裂解法, 详细步骤略。

- 2) *Not I* 酶切反应体系见表 4-1, 37°C 温育 3~5 小时。

表 4-1 酶切反应体系

Table 4-1 *Not I* digestion system

成份	体积
Ingredient	Amount
10×buffer 3	2μl
<i>Not I</i>	0.2μl
40mM Spermidine	1 ul
ddH ₂ O	11.8μl
BAC DNA	5μl
总体积	20μl

3) 脉冲电泳

PFGE MarkerI 作对照, 用 0.5×TBE 配制的 1%琼脂糖凝胶封住点样孔。经 *Not I* 酶切后进行脉冲电泳检测, 脉冲条件为: 0.5×TBE 配制的 1%琼脂糖凝胶, 温度 11°C, 起始脉冲 5s, 终止脉冲 15s, 脉冲时间 16h, 电压 6V/cm, 角度 120°, 泵 70。电泳结束后, 用终浓度 0.5μg/ml 的溴化乙锭水溶液染色 30min, 水洗 30min。紫外灯下检测并统计插入片段大小。

4.1.2.2.2 BAC DNA 的提取

Qiagen Large-Construct Kit 提取 BAC DNA。

- (1) 从划线培养的平板中挑取新鲜的单克隆, 接种到 5ml LB 液体培养基中, 200-230rpm、37°C 培养 8 小时;

- (2) 取上一步菌液 750 μ l, 接种到 500ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200-230rpm 过夜培养 12-16 小时 (所用三角瓶的体积至少为培养液的 4 倍, 菌液浓度应达到约 $3-4 \times 10^9$ /ml);
- (3) 4 $^{\circ}$ C、6000 \times g 离心 15min 收集菌体, 倒置离心瓶使液体流尽 (若此时想终止操作, 将菌液沉淀置于-20 $^{\circ}$ C);
- (4) 20ml 溶液 P1 (含有 RNase A, 终浓度 100 μ g/ml) 悬浮菌体, 并尽量使沉淀散开;
- (5) 加入 20ml 溶液 P2, 轻柔颠倒 4-6 次彻底混匀, 室温放置不超过 5min;
- (6) 加入 20ml 预冷溶液 P3, 立即轻柔颠倒 4-6 次, 彻底混匀后冰上放置 10min;
- (7) 再次混匀样品, 4 $^{\circ}$ C、25,000 \times g 离心 30min, 将 1 层 microcloth 用 ddH₂O 润湿后, 过滤上清液至离心管 (离心管体积约 40ml) 中;
- (8) 4 $^{\circ}$ C、25,000 \times g 离心 30min, 将上清液用 ddH₂O 润湿的折叠滤纸 (Large-congstruct kit 自带) 过滤到新的离心管中;
- (9) 加入 0.6 倍体积的异丙醇 (室温), 混匀, 4 $^{\circ}$ C、 $\geq 15,000 \times$ g 离心 30min, 小心倒掉上清液;
- (10) 加入 5ml 70%的乙醇 (室温), 4 $^{\circ}$ C、 $\geq 15,000 \times$ g 离心 30min, 小心倒掉上清液;
- (11) 将离心管倒扣在纸巾上, 使 DNA 沉淀空气干燥 2-3min, 小心除去离心管口的液体。9.5ml 溶液 EX 溶解 DNA 沉淀 (500ml 菌液), 注意勿吸打, 以免断裂;
- (12) 加入 200 μ l ATP 依赖的核酸外切酶、300 μ l ATP (100mM) 溶液, 轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h (若溶液浑浊, $\geq 15,000 \times$ g 离心 5min, 然后迅速转移 DNA 上清液; 实验发现离心后存在许多沉淀, 应为必要的一步);
- (13) 10ml QBT 溶液平衡 QIAGEN-tip 500 DNA 吸附柱, 让溶液靠重力作用自然流尽;
- (14) 第 12 步中得到的溶液中加入 10ml 溶液 QS, 混匀后加到 QIAGEN-tip 500 DNA 吸附柱中, 让溶液靠重力作用自然流出;
- (15) 30ml 溶液 QC 清洗 DNA 吸附柱, 清洗两次;
- (16) 15~17ml 预热到 65 $^{\circ}$ C 的溶液 QF 洗脱柱子中吸附的 DNA;
- (17) 0.7 倍体积 (10.5-11.9ml) 的异丙醇 (室温) 沉淀 DNA, 混匀后 4 $^{\circ}$ C、 $\geq 15,000 \times$ g 离心 30min, 小心倒掉上清液;
- (18) 加入 5ml 70%的乙醇 (室温), 4 $^{\circ}$ C、 $\geq 15,000 \times$ g 离心 15min, 小心倒掉上清液;
- (19) 空气干燥 DNA 沉淀 5-10min, 用 250 μ l 1 \times TE (pH8.0) 溶解 (200-300 μ l, 应使溶液覆盖沉淀, 可在室温下溶解过夜。水太酸时 (pH \leq 8.0), DNA 不易溶解。用 250 μ l 溶液溶解可使 DNA 浓度达到约 125ng/ μ l)。

4.1.2.2.3 *Hind* III 酶切

酶切验证所提质粒是否正确, 并估计大致浓度, 而不用 λ DNA 标准浓度来电泳检测。尤其是质粒很大时, 浓度又高, 不易跑出点样孔。

表 4-2 *Hind* III 酶切反应体系
Table 4-2 *Hind* III digestion system

成份	体积
Ingredient	Amount
10×Buffer	2μl
<i>Hind</i> III	1.5μl
ddH ₂ O	11.5μl
BAC DNA	5μl
Total	20μl

Hind III 酶切反应体系见表 4-2, 37℃温育 3-5h, 7v/cm、1%琼脂糖电泳约 3h。

4.1.2.2.4 BAC DNA 的切割

用 Hydroshear (GeneMachines) 把 BAC DNA 机械剪切成 3-5kb 的小片段。理想反应体积为 200μl, DNA 浓度为 100ng/μl。剪切前, 12,000rpm 离心 10min 以使蛋白沉淀, 防止阻塞 Hydroshear。

4.1.2.2.5 Mung Bean 核酸外切酶处理, 将 DNA 变成平末端

先用 30℃水浴 20 分钟, 然后 37℃水浴 10 分钟。Mung Bean 核酸外切酶反应体系见表 4-3。

表 4-3 Mung Bean 核酸外切酶反应
Table 4-3 Mung Bean exonuclease digestion system

成份	体积
Ingredient	Amount
BAC DNA	100μl
Mung Bean Exonuclease	1μl
10×Buffer	12μl
ddH ₂ O	7μl
Total	120μl

4.1.2.2.6 外切酶酶切产物纯化

- 1) 表 4-3 反应液中加入 380μlH₂O;
- 2) 加入 500μl 酚/氯仿, 混匀, 13,000rpm 离心 5min, 转移上清液于新离心管中;
- 3) 加入等体积氯仿, 混匀, 13,000rpm 离心 5min, 转移上清液;
- 4) 加入 0.1 倍体积 3M 醋酸钠 (PH5.2)、2.5 倍体积无水乙醇, 充分混匀, -80℃放置 30min, 然后 13,000rpm 离心 30min;
- 5) 弃上清液, 用 500μl70%乙醇清洗沉淀, 13,000rpm 离心 30min;
- 6) 空气干燥 DNA 沉淀, 用 20μlH₂O 溶解。

4.1.2.2.7 虾碱性磷酸酶脱磷处理

37℃水浴一小时，然后 65℃水浴 15 分钟终止反应。脱磷反应体系见表 4-4。

表 4-4 脱磷反应体系

Table 4-4 Dephosphorization system

成份	体积
Ingredient	Amount
DNA	20μl
SAP	5μl
10×Buffer	5μl
ddH ₂ O	20μl
Total	50μl

4.1.2.2.8 PCR 方法加尾

72℃水浴 30 分钟。加尾反应体系见表 4-5。

表 4-5 加尾反应体系

Table 4-5 Plusing tail system

成份	体积
Ingredient	Amount
DNA	50μl
10×Buffer	6.3μl
MgCl ₂	5.04μl
dNTP	0.504μl
Taq 酶	1μl
ddH ₂ O	0.16μl
Total	63μl

4.1.2.2.9 片段大小选择

- 1) 加尾后的产物 0.8%琼脂糖凝胶电泳，样品两侧点上 1kb Marker，7V/cm 电压，在灭菌的 1×TAE 缓冲液中电泳 45min；
- 2) 电泳结束后，分别将带有 Marker 和 DNA 样品的点样孔边缘 2-5 毫米切下，用终浓度 0.5μg/ml 的溴化乙锭水溶液染色 30min，水洗 30min。紫外灯下观察 Marker 电泳情况，通过参照 Marker，确定 3-5kb 的 DNA 范围并在胶上做出标记。将未染色部分中的 3-5kb 区域切割下来；
- 3) 剩余凝胶重新拼在一起，EB 染色，水洗，成像。

4.1.2.2.10 DNA 的纯化

用 QIAEX II 凝胶纯化试剂盒进行纯化。

- 1) 每 100mg 凝胶的体积按 100μl 估计，每管中加入 3 倍体积的溶液 QX I 和 2 倍体积的 ddH₂O；
- 2) 将 QX II 旋涡混匀 30s，向样品中加入 30μl 溶液 QX II，50℃水浴 10min，每 2 分钟上下颠

倒混匀一次，观察混合物的颜色是否为黄色。若混合物颜色为橙黄色或紫色，加 10 μ l 3MnaoAc (PH5.0)，混匀，颜色应变为黄色 (PH \leq 7.5)，继续温浴 5min；

- 3) 13,000rpm 离心 30s，用移液器小心弃掉上清液；
- 4) 500 μ l 溶液 QX I 清洗沉淀两次。加入 QX I 之后，将沉淀重新悬浮起来并混匀，然后 13,000rpm 离心 30s，小心弃掉上清液，可除去残留的琼脂糖凝胶；
- 5) 500 μ l PE 溶液清洗沉淀两次。加入 PE 溶液后，将沉淀重新悬浮起来，混匀，13,000rpm 离心 30s，小心弃掉上清液；
- 6) 空气干燥沉淀 20-30min，直到沉淀变成白色；
- 7) 洗脱 DNA：加入 300 μ l TE，50 $^{\circ}$ C 水浴 5min。13000rpm 离心 30s，转移上清到一新离心管中；
- 8) 加入 750 μ l 100%乙醇、30 μ l 3M 醋酸钠，混匀后于-80 $^{\circ}$ C 放置 30min，然后 4 $^{\circ}$ C、13,500rpm 离心 30min，弃上清；
- 9) 500 μ l 75%乙醇清洗 DNA 沉淀，4 $^{\circ}$ C、13,500rpm 离心 20min，弃上清。空气干燥 DNA 沉淀，用 8 μ l H₂O 溶解 DNA。

4.1.2.2.11 连接反应

用 Invitrogen TOPO TA 将 DNA 片段与载体进行连接（表 4-6）。

表 4-6 连接反应体系
Table 4-6 Ligation system

成份	体积
Ingredient	Amount
上一步 DNA	4 μ l
salt solution	1 μ l
TOPO vector	1 μ l
Total	6 μ l

轻弹管壁混匀，23 $^{\circ}$ C 水浴 20min，脱盐处理 20min。

4.1.2.2.12 连接产物的转化

采用 Gibco BRL 公司的 Cell-Porator Electroporation System 进行转化。参数设置为：Voltage (390)；Capacitance (330uF)；Impedance (Low ohms)；Charge rate (Fast)；Resistance (4K ohms)。

- 1) 将 2 μ l 连接液与 18 μ l DH5 α 感受态细胞混合，混匀后加到电激转化杯中，电击转化；
- 2) 将连接液和感受态细胞的混合物加入到 500 μ l SOC 培养基中，37 $^{\circ}$ C、225rpm 至少复苏 1h，使抗生素基因表达；
- 3) 取适量复苏液涂布于含 50 μ g/ml 卡那霉素 (Km^R)、140 μ g/ml IPTG、60 μ g/ml X-gal 的 LB 固体培养基表面，37 $^{\circ}$ C 培养 16-20h。

4.1.2.2.13 插入片段的检测

随机挑取若干质粒，对其进行 *EcoRI* 酶切 2-3h，1%琼脂糖凝胶电泳检测其插入片段大小。

表 4-7 *EcoRI* 酶切反应体系
Table 4-7 *EcoRI* digestion system

成份	体积
Ingredient	Amount
cosmid DNA	5 μ l
<i>EcoR</i> I	0.25 μ l
10 \times React Buffer	1 μ l
ddH ₂ O	3.75 μ l
Total	10 μ l

4.1.2.3 菌的培养

- (1) 将 TB 培养基加入 96 深孔板中，每孔 1.2ml（抗生素依载体而定）；
- (2) 提前将超净工作台进行紫外消毒，挑菌之前用医用酒精彻底把超净工作台擦一遍，然后开风机和白灯，点燃酒精灯；
- (3) 用已灭菌的牙签将形状大小较一致的单克隆从 Q-tray 上挑至 96 深孔板中，以保证培养的菌生长均匀。挑菌时最好按照深孔板上的序号依次放入，以免漏挑；挑完一板后，放一会儿，将牙签按照挑菌的先后顺序拔出，盖好胶盖；
- (4) 挑菌过程结束后，写上板号，放入摇床培养，37 $^{\circ}$ C、230rpm，通常培养时间以 19-21h 为宜。

4.1.2.4 菌的保存

- (1) 将摇好的菌以及上述物品全部放入提前消毒过的超净工作台内；
- (2) 首先将两个洗刷盒倒入一定量的医用酒精，然后在另一旁点燃酒精灯（注意一定要远离两个酒精盒子）；
- (3) 将写好的标签纸贴在 384 孔板上，保证 384 和 96 孔板号一致，准备工作做好后开始复制；
- (4) 将 96 针复制头放到酒精盒子里，浸泡 3min（起消毒、杀菌作用），待 96 针复制头上的酒精凉干后，再用酒精灯的外焰过一下（起双重杀菌作用），然后静置 3min 左右，使每根针都冷却为止；
- (5) 取下 96 孔板摇菌的胶盖，打开 384 孔板的盖子，将复制针与 96 孔板对应好，然后顺时针和逆时针各转三圈，使每根复制针上都沾上菌液；
- (6) 将沾好菌液的针对好 384 孔板相对应的孔（96A1-384A1，96A2-384A2，96B1-384B1，96B2-384B2），从左上角的位置一一落下，也同样逆时针、顺时针各转三圈；
- (7) 复制好一板后用清水洗刷复制头上的菌液和杂质，清洗干净后继续放到酒精盒子内消毒，

重复以上过程。4 个 96 板对应 1 个 384 板，复制完成后，将 384 孔板包上保鲜膜，放在摇床中，230rpm，37℃，培养 16-18h，最后放在超低温冰箱中保存；

(8) 保菌后，收集 96 孔板中的菌体，4000rpm，8min，4℃。

离心后将96孔板倒扣餐巾纸上，除去残留的液体，然后盖好胶盖。96孔板质粒提取及测序参见第三章实验方法部分。

4.1.2.5 BAC 全序列的拼接

用 Lasergene SeqManII Module (DNASar) (<http://www.DNASar.com>)对亚克隆序列进行组装、拼接，并适当加以人工调整。

参数 Match Size 设置为 40、Minimum Match Percentage 设置为 95，并根据序列的文件名设置参数定义同一个克隆的两个末端序列。然后组装拼接这些序列，即根据不同序列之间的重叠部分以及来自同一克隆的两个末端序列的前后位置关系。

4.1.2.6 BAC 全序列分析

- 1) BLASTN、BLASTX 将序列与 NCBI 网站的数据库进行同源序列分析；
- 2) BLAST against TREP 分析 BAC 中的重复序列 (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/ITMI/Repeats/index.html>)。

4.1.2.7 Southern 杂交分析

T.uratu 203 (A 基因组)，*Ae.speltoides* 4024 (S^S 基因组) 和 *Ae.squarrosa* Y215 (D 基因组) 的 DNA 均为 10μg，普通小麦中国春为 15μg，分别用 *EcoRI*、*EcoRV* 和 *Hind III* 进行酶切。

4.1.2.7.1 预杂交

- (1) 预杂交液的配制 (表 4-8)：50ml 离心管中分别加入水、5×HSB、Denhardt's III，混匀后置于 65℃ 水浴中。各种溶液用量视杂交膜 (film) 的多少而定；

表 4-8 预杂交液的配制及用量
Table 4-8 Confection of prehybirding liquid

成分	1~2 块膜	3~6 块膜	7~10 块膜
Ingredient	1~2 film	3~6film	7~10film
ddH ₂ O	6 ml	12ml	18ml
5×HSB	2ml	4ml	6ml
Denhardt's III	1ml	2ml	3ml

- (2) 鲑精 DNA 变性：将鲑精 DNA (10mg/ml) 放入沸水中煮 7min 进行变性，迅速放入冰浴中；

- (3) 待 50ml 离心管中的预杂交液澄清后, 加入 300 μ l (9ml 预杂交液)、600 μ l (18ml 预杂交液)、900 μ l (27ml 预杂交液) 变性后的鲑精 DNA, 混匀后倒入杂交盒中;
- (4) 将第一张杂交膜放入杂交盒中, 待预杂交液完全浸湿后再放入第二张杂交膜, 依此类推。最后将封好的杂交盒置于 65 $^{\circ}$ C 恒温振荡器中振荡至少 3h (旧膜) 或 5-6h (新膜)。

4.1.2.7.2 探针标记

- (1) 以 *TaFbox* 全长 cDNA 为探针。在 1.5ml 离心管中加入 1 μ l cDNA (25ng/ μ l) 和 15 μ l ddH₂O, 短暂离心, 沸水中煮 7min 变性, 然后迅速放入冰浴中, 短暂离心;
- (2) 在离心管中分别加入 1 μ l Klenow enzyme (5U/ μ l)、5 μ l olb、2 μ l BSA, 混匀, 短暂离心后, 加入 2 μ l ³²P-dCTP (总体积 20 μ l), 再次混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 3h。

4.1.2.7.3 探针变性

杂交前, 需对探针进行变性。加入 24 μ l 1 \times TE 和 5 μ l 3N NaOH 溶液, 混匀后室温变性 5min。

4.1.2.7.4 杂交

将变性后的探针直接加入预杂交液中混匀, 封好杂交盒, 置 65 $^{\circ}$ C 温箱中杂交过夜 (16h 以上)。

4.1.2.7.5 洗膜

- (1) 洗脱液的配制
洗脱液 I: 2 \times SSC, 0.5%SDS; 洗脱液 II: 0.2 \times SSC, 0.5%SDS
- (2) 洗脱: 先倒掉杂交液, 再加入少量洗脱液漂洗, 然后加入适量 65 $^{\circ}$ C 的洗脱液 I 振荡洗脱 15min;
- (3) 用洗脱液 I 洗脱两次后, 如信号仍较强, 用洗脱液 II 继续洗脱, 方法同上。直至洗至信号在 0.5-10count 为止;
- (4) 压磷屏: 用滤纸将膜上的水滴吸干, 然后用保鲜膜包好 (除去气泡)。

4.1.2.7.6 扫屏

将洗脱好的杂交膜压在磷屏上, 确定适宜的时间用 Personal Molecular Imager FX (Bio-RAD) 磷屏仪扫屏。

4.2 结果与分析

4.2.1 BAC 文库的筛选

根据 *TaFbox* 基因的开放阅读框设计引物, 对矮败中国春小麦 BAC 文库进行筛选得到了 10 个阳性混合池 (图 4-1), 对扩增的片段回收测序, 发现两种类型的序列在每个混合池中都存在,

选取混合池 pool-38 (池的密度 1500) 经 3 轮筛选得到一个阳性单克隆 BAC, 利用 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 特异引物进行扩增, 两个基因存在于一个 BAC 单克隆 (图 4-2), 测序结果进一步得到证实 (图 4-3)。推测 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 基因串联存在。

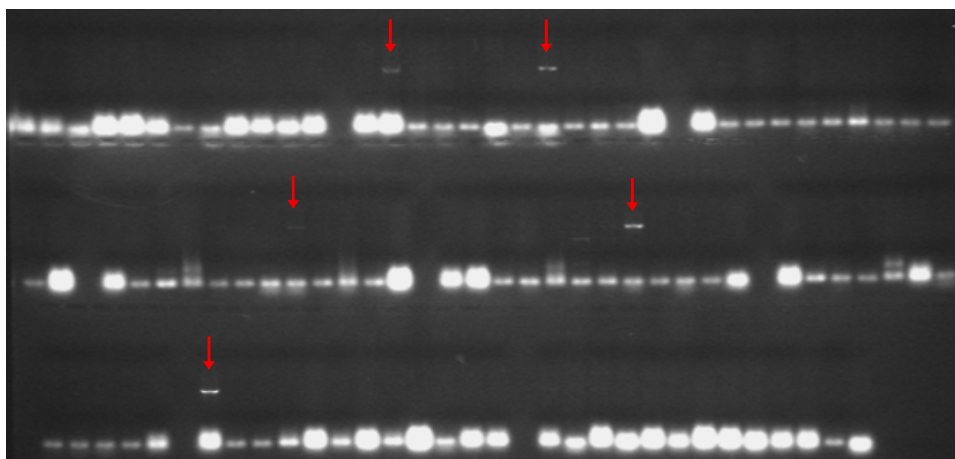


图 4-1 BAC 文库筛选
Fig.4-1 Screen of BAC library

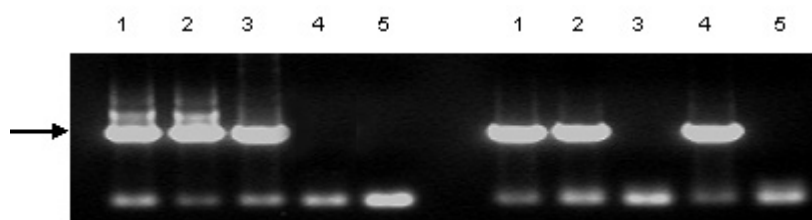


图 4-2 BAC 单克隆扩增 (左边: *TaFbox* 基因; 右边: *TaFbox2* 基因)
Fig.4-2 Amplification of BAC clone (Left: *TaFbox*; Right: *TaFbox2*)
1、2: BAC; 3: *TaFbox* 质粒; 4: *TaFbox2* 质粒; 5: H₂O

```

GTCTCCYSGCTCTGGTACMGCCTCATCTCCCA-----AaCACCgCAARARGCTKCCCMAGACCMTCTCCGGCTTC
GTCTCCCGGCTCTGGTACAGCCTCATCTCCCAcCCTGAACACCGCAAAGGGCTTCCCCAGACCAATCTCCGGCTTC
GTCTCCCGGCTCTGGTACAGCCTCATCTCCCAcCCTGAACACCGCAAAGGGCTTCCCCAGACCAATCTCCGGCTTC
GTCTCCTCGCTCTGGTACC GCCTCATCTCCCA-----A-CACCgCAAAGAGCTGCCCAAGACCCCTCTCCGGCTTC
GTCTCCTCGCTCTGGTACC GCCTCATCTCCCA-----A-CACCgCAAAGAGCTGCCCAAGACCCCTCTCCGGCTTC
GTCTCCCGGCTCTGGTACTCCTCATCTCCC-----AACACCgCAAAGAGCTGCCCAAGACCAATCTCCGGCTTC
GTCTCCCGGCTCTGGTACAGCCTCATCTCCCAcCCTGAACACCGCAAAGGGCTTCCCCAGACCAATCTCCGGCTTC
GTCTCCTCGCTCTGGTACC GCCTCATCTCCCA-----A-CACCgCAAAGAGCTGCCCAAGACCCCTCTCCGGCTTC
    
```

图 4-3BAC 单克隆测序结果
Fig.4-3 Sequence analysis of BAC monoclone

4.2.2 Shotgun 文库构建

筛选到的 BAC 单克隆提取质粒后经 *NotI* 酶切脉冲电泳检测分析, 在插入片段内存在该酶切位点, 被切成三条片段, 通过片段的累加确定该克隆插入片段约 100Kb (图 4-4A)。将保存

的单克隆菌液划线培养，从中挑取新鲜的单克隆，接种到 500ml LB 培养基中，用 Qiagen Large-Construct Kit 提取 BAC DNA，*Hind*III 酶切进行验证所提质粒是否正确（图 4-4B）。然后用 Hydroshear（GeneMachines）把 BAC DNA 机械剪切成 3-5kb 的小片段，进行脱磷加尾等处理后经琼脂糖凝胶电泳挖取 3-5Kb 的片段回收，用于亚克隆文库的构建（图 4-5）。

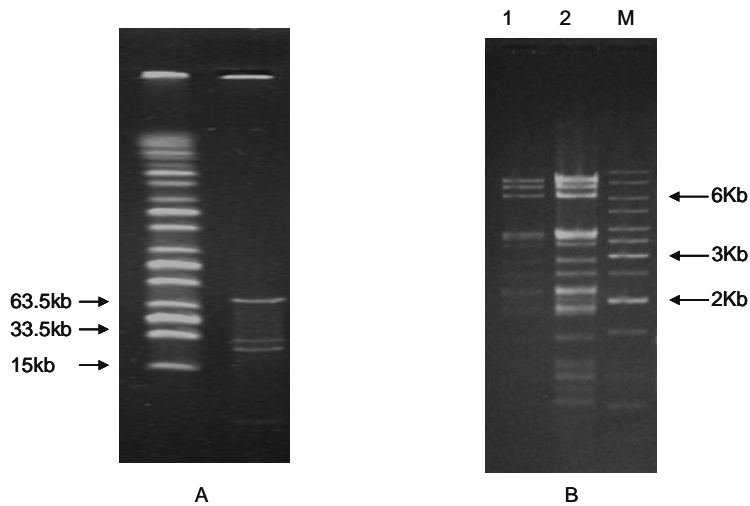


图 4-4 BAC 质粒检测

A: 脉冲电泳检测插入片段大小 (*Nco*I 酶切); B: 质粒验证 (1: 原始质粒; 2: 建库质粒, *Hind*III 酶切)

Fig.4-4 Detection of BAC plasmid

A: detection of fragment inserted by PFGE (digested by *Nco*I); B: identification of plasmid (1 original plasmid and 2 plasmid used, digested by *Hind*III)

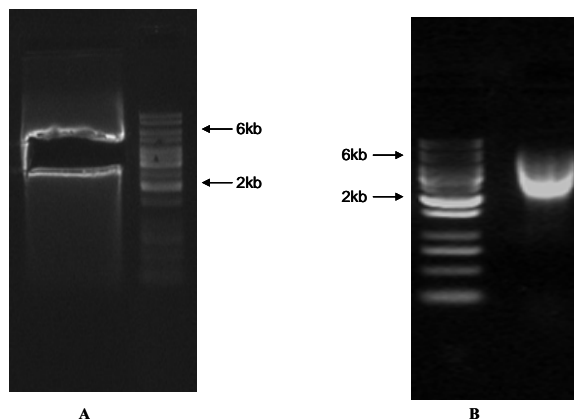


图 4-5 回收片段检测

Fig.4-5 Fragment recycled

回收的片段用 Invitrogen 公司的 TOPO TA Cloning Kit 进行连接转化，共挑取 12×96 个克隆，提取质粒，随机选取 60 个质粒，对其进行 *Eco*RI 酶切，检测其插入片段大小，1%琼脂糖凝胶电泳检测，酶切产物片段与插入片段大小基本相同（图 4-6）。对亚克隆文库中随机选取的

克隆用引物 T3、T7 进行两端测序，共获得亚克隆序列 1576 条，总碱基数 1.13×10^6 bp，约覆盖插入片段长度的 10 倍。

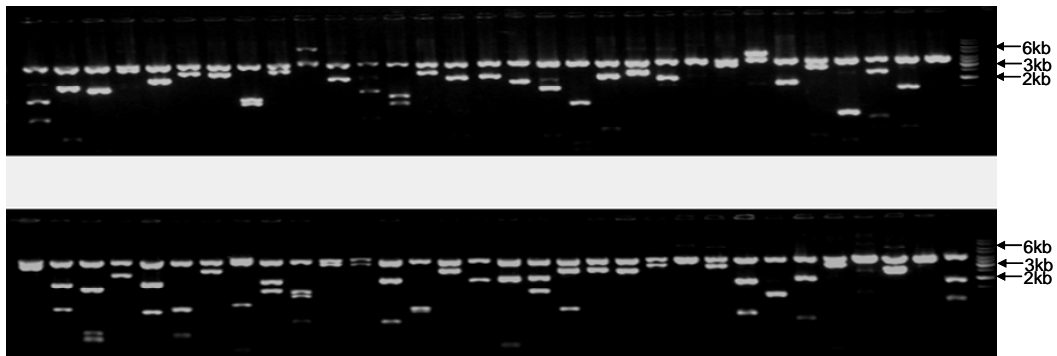


图 4-6 亚克隆库插入片段长度检测 (*Eco*RI)

Fig.4-6 Detection of insertion in the shotgun library

4.2.3 BAC 克隆序列组装拼接

测序完成后，从测序仪中调取*.abi 格式的序列文件，添加到 SeqManII 软件中。去除载体后，设置参数，运行程序进行自动组装。然后在此基础上根据插入片段的长度，及同一个克隆的两端序列的方向，进行人工调整，对共 1576 条亚克隆序列进行拼接，最后得到 20 个重叠克隆群 (Contig)，最大 20.496kb，6 个缺口 (gap)。根据所得的序列设计引物继续测序填补，最终得到 1598 条序列，序列长度共计 1,135,531bp，平均序列长度 710bp，组装的序列中还有 3 个 gap，都是位于序列的两端重复序列区，重叠克隆群的长度为 113,251bp，将得到的 contig 通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) 进行序列自身的比对，去掉重叠部分后，最终长度为 95.167kb，基本上与酶切检测结果相吻合。

4.2.4 *TaFbox* 基因拷贝数分析

4.2.4.1 BAC 克隆 Dot-Matrix 分析

组装的 BAC 序列用 DNASTar 软件进行 Dot-Matrix 分析，所采用的参数为：Method: 1; Range: 20; Mismatch: 3; 相似性 85%。发现该基因序列呈三个重复串联分布，图 4-7 所示为含有三个基因拷贝的 30kb 区段（位于整条序列的 20kb-50kb 之间）dotplot 结果，可以看出对角线的两侧序列方向分别存在两条平行短线，即在该片段上共有三个重复存在，三个重复正好是 *TaFboxs* 基因的三个拷贝，它们串联存在，在整个 BAC 上的分布如图 4-8 所示，在第三个拷贝前有一个 Non-LTR 反转录转座子插入，而且在前两个拷贝的上游序列分别有 MITE 转座子插入。

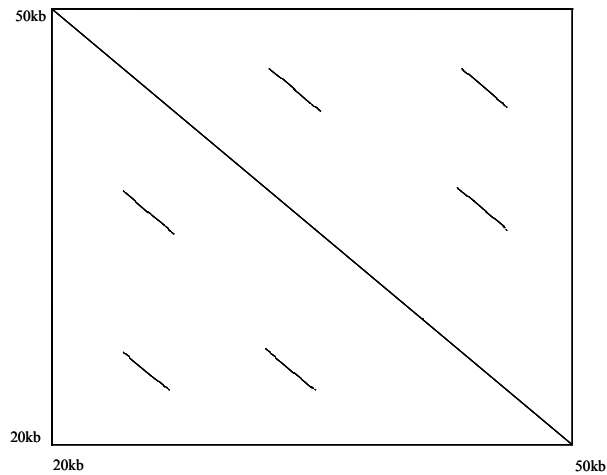


图 4-7 基因重复区 Dot-Matrix 分析

Fig.4-7 Dot-Matrix analysis of gene repeat domain

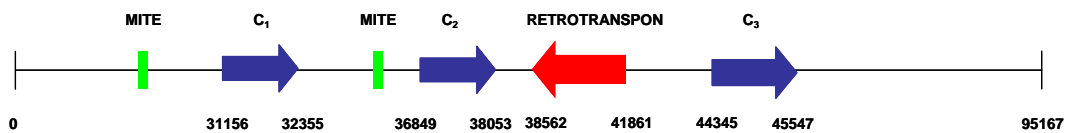


图 4-8 三个基因拷贝在 BAC 上的分布

Fig.4-8 Distribution of three copies in BAC

4.2.4.2 BAC 克隆上三个拷贝比较分析

三个串联序列在核苷酸序列上相似性很高，并且分别与在基因组 DNA 中克隆的两种差异较大类型的序列 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 具有较高的相似性(图 4-9A)，第三个拷贝(C3)与 *TaFbox* 基因序列完全一致。拷贝 1 (C1) 属于没有 6 个碱基插入类型，但由于序列内部有较多突变，与其它拷贝差异较大。前两个拷贝均只能编码 200 多个氨基酸，氨基酸水平分析它们的相似性也很高(图 4-10)，与不同基因组材料间的分析结果一致，推测该基因在同一基因组内的多态性是由于不同的拷贝间的差异造成的。另外，对三个基因的上游序列进行分析，扩增结果显示该 BAC 来自 A 或 B 组染色体(图 4-11)，同样后两个拷贝的上游序列分别与 CS-UP (DM102) 和 CS-UP2' (DM102) 相似性很高，C1 的上游序列却存在较大差异，相似性只有 64%(表 4-9B)。

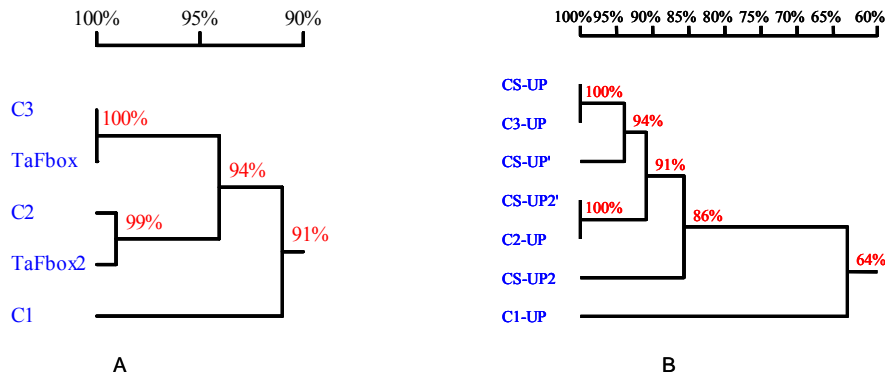


图 4-9 三个拷贝核苷酸序列比对

A: 基因间比较; B: 上游序列比较

Fig.4-9 Blast analysis of nucleotide of three copies

A: Among genes; B: Among up-stream sequences

C2.pro	...MNRSKNGATSVADLTDLLIIEILSLLPVKSVCRFKCVSRLWYSLISHPEHRKRLPOTISGFFYPKHRLNDEYDVIITFPTF	80
TaFbox2	MACTQMNRSKNGATSVADLTDLLIIEILSLLPVKSVCRFKCVSRLWYSLISHPEHRKRLPOTISGFFYPKHRLNDEYDVIITFPTF	85
TaFbox	MACTQMNRCSKNGITSAADLTDLLIIEILSLLPVKSVCRFKCVSRLWYLLISQ..HRKKLPOTISGFFYPKHRLNDEYDGLIATFPTF	83
C3.pro	MACTQMNRCSKNGITSAADLTDLLIIEILSLLPVKSVCRFKCVSRLWYLLISQ..HRKKLPOTISGFFYPKHRLNDEYDGLIATFPTF	83
C1.pro	MACTQMNRCSKNGATSSADLTFDDLIIEILSLLPVKSVCRFKCVSRLWYRLISQ..HRKKLPOTISGFFYPKHRLNDEYDGLVITFPTF	83
C2.pro	DGISRDAQEQLFPDSSLPFLTCYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWWVLPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSL	165
TaFbox2	DGISRDAQEQLFPDSSLPFLTCYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWWVLPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSL	170
TaFbox	DGISRDAQEQLFPDSSLPFLTCYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWWVLPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSP	168
C3.pro	DGISRDAQEQLFPDSSLPFLTCYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWWVLPDAGHKSDALAYRLGFDGAMSP	168
C1.pro	DGILGNQEQPFSDDSSLAFLTCYRQILPKDCCNGLIFCLCWKDSPIDEADYVVCNPATEEWWVLPDAGHBSNALAYRLGSDAAMSP	168
C2.pro	HFHVFQILEDEDEYGYISGVNIYSSETGAWSYKENGWGDNEIQIVDMRGVVFNGMMHLLTYEFKILAVDTEGKTWRTISLLETMC	225
TaFbox2	HFHVFQILEDEDEYGYISGVNIYSSETGAWSYKENGWGDNEIQIVDMRGVVFNGMMHLLTYEFKILAVDTEGKTWRTISLLETMC	255
TaFbox	HFHVFQILEDEDEYGYISGVNIYSSETGAWSYKENGWGDNEIQIVDMRGVVFNGMMHLLTYEFKILAVDTEGKTWRTISLLETMC	253
C3.pro	HFHVFQILEDEDEYGYISGVNIYSSETGAWSYKENGWGDNEIQIVDMRGVVFNGMMHLLTYEFKILAVDTEGKTWRTISLLETMC	253
C1.pro	HFHVFQILEDEDEYGYISGVNIYSSETGAWSYKENGWGDNEIQIVDMRGVVFNGMMHLLTYEFKILAVDTEGKTWRTISLLETMI	253
C2.pro	225
TaFbox2	DENIYLGHLAFIGQSQRGLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIFKYNISTSQLFGELFGEKDVTLQRDYADLLQRDYALIA	340
TaFbox	VGNICLGPLAFIGQSQRGLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIFKYNISTSQLFGELFGEKNHMLQRDYADLLQRDYALIA	338
C3.pro	VGNICLGPLAFIGQSQRGLYFINMRDNDSSKLSVWILEDYNGNEWIFKYNISTSQLFGELFGEKNHMLQRDYADLLQRDYALIA	338
C1.pro	LGNFL.....	258
C2.pro	225
TaFbox2	IHPECNLIFVWRKEDVLLSYDMDRGKARVICSLKEHSYHTFPPYLPYVPSFSTRIGKPRVEA	402
TaFbox	IHPECNLIFVWRCKDVLLSYDMDRGKVCVICSLKYHLYDTFPPYLPYVPSFSTRIGKPRVEA	400
C3.pro	IHPECNLIFVWRKDVLLSYDMDRGKVCVICSLKYHLYDTFPPYLPYVPSFSTRIGKPRVEA	400
C1.pro	258

图 4-10 三个拷贝氨基酸序列比较分析

Fig.4-10 Alignment of amino acids of the genes

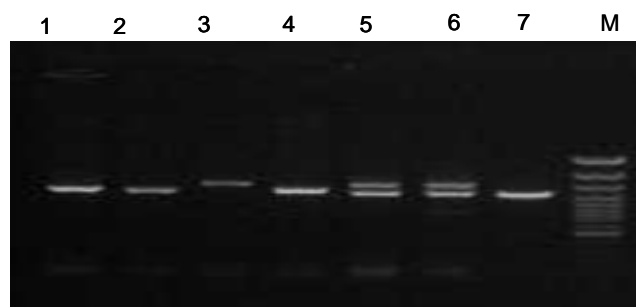


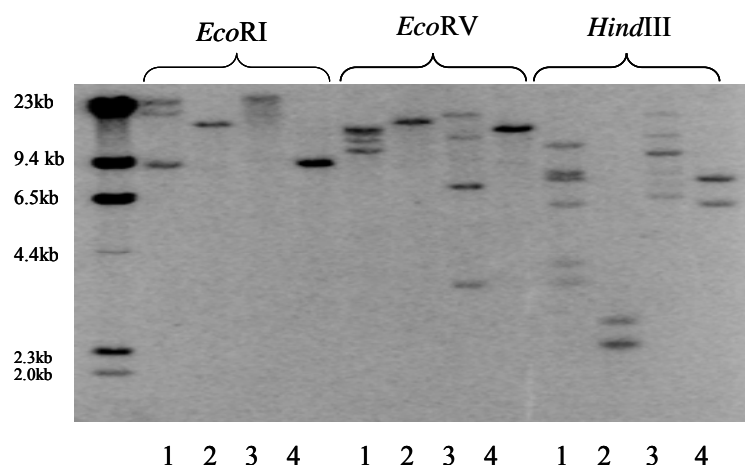
图 4-11 不同材料上游片段扩增结果

Fig.4-11 Amplification of up-sequences

- 1: 乌拉尔图 203 UR203 (A); 2: 粗山羊草 Y162 (S); 3: 拟斯卑尔脱山羊草 Y2280 (D);
4: 栽培二粒小麦 DM102 (AB); 5: 中国春 CS (ABD); 6: 耐盐小麦品系 98-160 (ABD); 7: BAC

4.2.4.3 *TaFboxs* 基因拷贝数分析

TaFbox 开放阅读框序列无 *EcoRI*、*EcoRV* 和 *HindIII* 酶切位点。以 *TaFbox* 基因的全长 cDNA 为探针进行 Southern 杂交（图 4-12）。从 *EcoRI* 酶切的杂交图谱可以看出，A、S、D 基因组各有一条杂交带，在六倍体中国春中有三条杂交带，但这并不是三个基因组的简单组合，A 基因组的杂交带消失，代之以一条新的杂交带。在 *EcoRV* 酶切图谱中，A 和 D 基因组各有一条杂交带，S 基因组有多条，而在中国春中则只有三条，只有 D 基因组的杂交带得以保留，其它两条均为新产生。在 *HindIII* 酶切图谱中，几个基因组的杂交带均都比较多，不能得出肯定的结论（秘彩莉等，2005）。

图 4-12 *TaFbox* 的 Southern 杂交结果

- 1: CS (ABD 基因组); 2: *T.uratu* 203 (A 基因组); 3: *Ae.speltoides* 4024 (S 基因组);
4: *Ae.squarrosa* Y215 (D 基因组)

Fig.4-12 Southern results of *TaFbox*

- 1: Chinese Spring; 2: *T.uratu* 203 (A); 3: *Ae.speltoides* 4024 (S); 4: *Ae.squarrosa* Y215 (D)

对 BAC 序列用 DNASTar 软件进行 MAPDRAW 分析, 在含有三个基因拷贝的区域内有多个 *HindIII* 酶切位点, 而没有 *EcoRV* 和 *EcoRI* 酶切位点。综合 Southern 杂交和 BAC 测序结果表明, 该基因存在三个拷贝, 但由于 *EcoRI* 和 *EcoRV* 的酶切位点很少, 不能将各个拷贝区分开, 而 *HindIII* 的酶切位点较多, 至少能将三个拷贝中的一个分开, 因此在 **A** 和 **D** 基因组材料中显示两条杂交带, 其中一条带的信号较强, 可能是两个拷贝的累加 (图 4-12)。

4.2.4.4 三个拷贝上游序列分析

对 BAC 克隆含有三个基因拷贝的 20-50kb 区域进行启动子活性分析 (图 4-13), 发现在三个基因的上游序列具有明显的启动子结构域, 推测三个拷贝应该具有转录活性。通过对上游序列的分析, 它们之间存在较大的差异, 从对启动子活性预测结果也可以看出启动活性的确存在着差异。

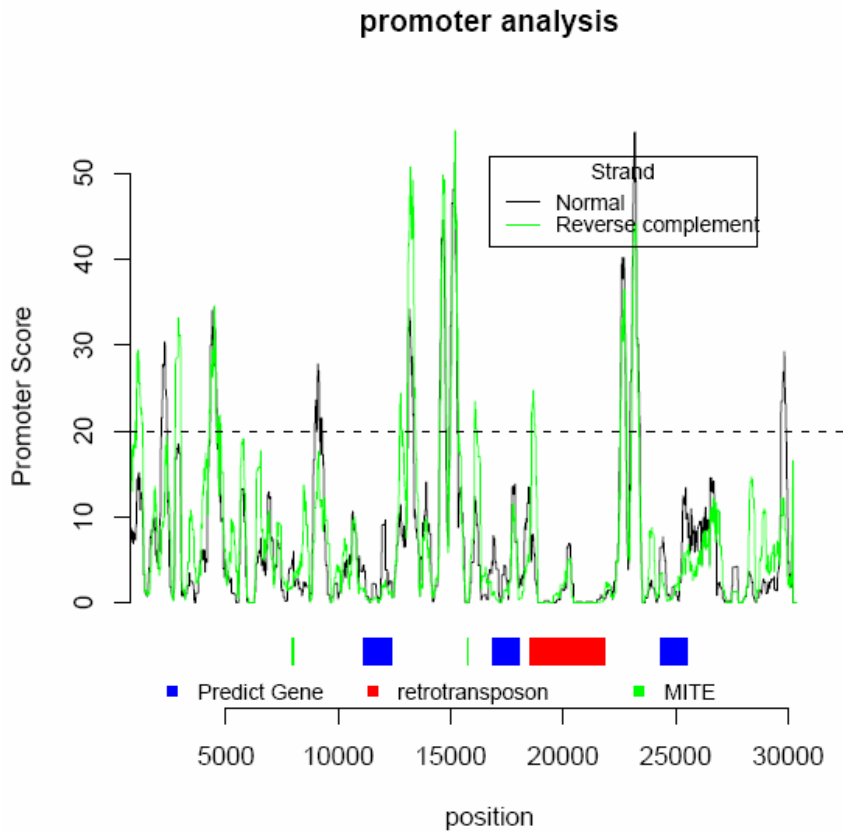


图 4-13 启动子预测分析

Fig.4-13 Promoter predict

PlantCARE (plant cis-acting regulatory elements) 是一个收录植物顺式作用元件、增强子和抑制子的数据库。分别将三个拷贝的上游序列进行网上数据分析 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), 统计结果如表 4-8 所示。可以看出, 三个拷贝的上游序列都含有与生物胁迫和非生物胁迫诱导相关的转录元件结合位点, 所含的转录元件在数量和种

类上存在明显的差异，以 C1 的差别最大，C2 和 C3 在个别位点上存在差异，表明其所控制的下游基因应该受胁迫诱导的表达，而且在诱导表达模式上存在一定的差异，与 *TaFbox* 和 *TaFbox2* 的 RT-PCR 分析结果一致。

表 4-8 诱导相关转录调控元件结合位点统计

Table 4-8 Statistic of transcript factor related to induce expression

位点名称 Site Name	数目 NO.			功能 Function
	C1-UP	C2-UP	C3-UP	
AAGAA-motif	3		1	enhancer-like
ARE	2	3	3	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
AuxRR-core	1	1		cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness
box E		1		Cis-element for induction upon fungal elicitation
box S			1	wounding and pathogen respons
Box-W1		3	1	fungal elicitor responsive element
CCAAT-box		2	1	MYBHv1 binding site
CGTCA-motif	4	4	4	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
C-repeat/DRE	1			regulatory element involved in cold- and dehydration-responsiveness
EIRE		1	1	elicitor-responsive element
ERE	1		2	ethylene-responsive element
GC-motif	1		1	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
HSE	1	2	2	cis-acting element involved in heat stress responsiveness
JERE		2	1	elicitation; wounding and pathogen responsivness
LTR	1		3	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness
MBS		3	2	MYB binding site involved in drought-inducibility
TATCCAT/C-motif		2		involved in sugar repression responsiveness
TCA-element		1	1	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TC-rich repeats			3	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
TGACG-motif	4	5	4	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGA-element	1			auxin-responsive element
W box		3	1	wounding and pathogen respons
WUN-motif		1		wound-responsive element
Total	20(11)*	34(14)*	30(14)*	

*: 数目 (种类)

4.2.5 MITE 转座元件插入分析

MITE (Miniature inverted repeat transposable element) 是一类新近发现的 DNA 转座元件，广泛分布于真核生物基因附近或内部。本研究对 BAC 序列分析结果显示，在 C1 和 C2 拷贝的上游分别有一个 MITE 插入，C2 和 C3 的上游序列相似性很高，明显的差异就是 C2 上游 MITE 元件的插入 (图 4-14)。对该 MITE 元件进行转录元件分析，发现在短短的 100 多个碱基内，含有 TATA-box、CAAT-box 以及与生长素、逆境胁迫表达有关的转录因子结合位点 (图 4-15)。

因此，MITE 的插入也有可能对其下游基因的表达模式产生一定的影响。

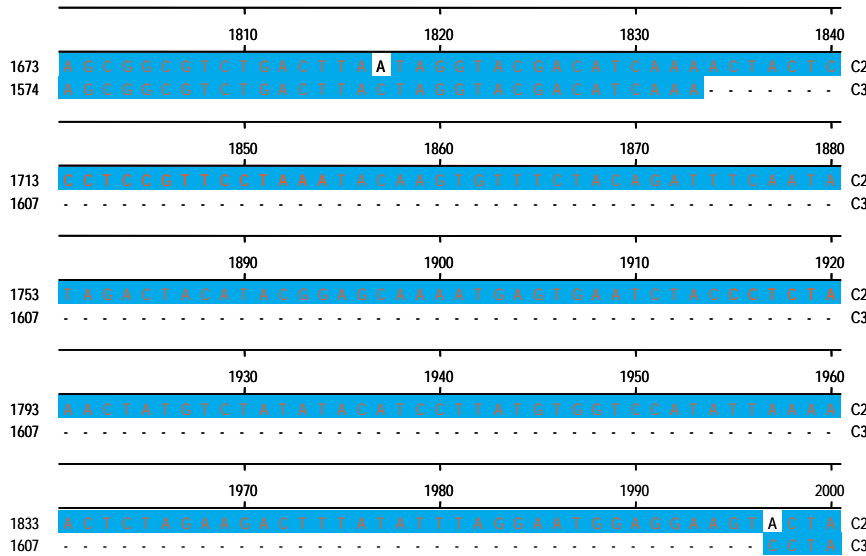


图 4-14 C2 和 C3 上游序列比较 (C2 插入部分为 MITE 序列)

Fig.4-14 Blast of up-stream sequences of C2 and C3 (The insertion of C2 was MITE sequence)

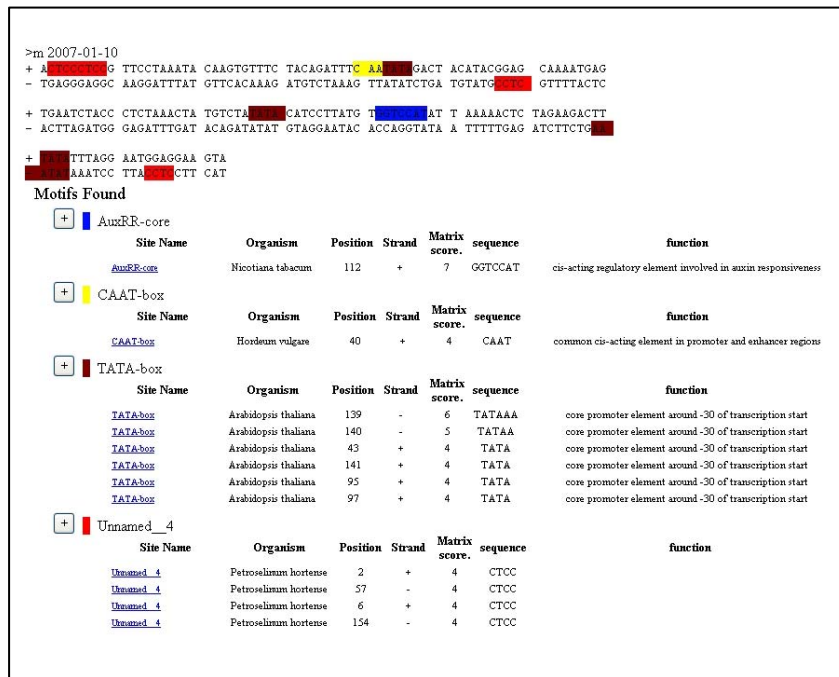


图 4-15 C2 MITE 转录元件预测

Fig.4-15 Transcript factor protection of MITE of C2

4.2.6 水稻、大麦和小麦共线性分析

将筛选到的中国春 BAC (*Ta* BAC) 进行 NCBI 和 Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>), 网上数据分析, 在 *Ta* BAC 序列上有 5 个基因, 分别为: *TaFbox* 三个拷贝、*USP* (universal stress protein, 胁迫反应通用蛋白) 和 *SF2* (alternative splicing factor2, 可变剪

接因子)。通过同源比对从 NCBI 数据库中下载了水稻 (*Os* BAC) 和大麦 (*Hv* BAC) 的 BAC 序列, 分别来自水稻的第七染色体和大麦的第二染色体。我们获得的 BAC 位于小麦的第 2 部分同源群, 同源基因存在一定的共线性关系 (图 4-16)。同源基因比对结果显示 (图 4-17), 小麦的 *TaFbox* 基因与大麦的 *HvF-box* 基因相似性很高, 但是大麦的基因由于碱基突变只能编码几十个氨基酸, 预测结果表明该基因为假基因。总的来看, 大麦 BAC 上三个基因都与小麦相关基因有较高的同源性, 在位置分布、排列方向和顺序上都一致, 只是在大麦的 BAC 上 *F-box* 基因只有一个拷贝, 具体原因有待于进一步分析。水稻的 BAC 中 *F-box* 基因同样有三个拷贝存在, 且与小麦的三个拷贝情况类似, 它们之间同样具有很高的相似性 (83%), 前两个串联的拷贝相似性能达到 99%, 水稻的 *USP* 和 *SF2* 基因相邻, 在位置上与 *F-box* 基因相距较远, 没有分布在一个 BAC 上, 但存在于一条染色体上。三个物种间 *USP* 和 *SF2* 相似性明显高于 *F-box* 基因间的相似性 (>70%)。此外, 在此区段水稻的 BAC 含有多个受体激酶基因, 而且 *F-box*、*USP* 及 *SF2* (曾纪晴等, 2006) 都与胁迫反应有关, 推测该基因组区域可能与谷类作物的抗逆反应密切相关。总的来说, 不同物种间具有一定的共线性关系, 水稻上的基因比小麦和大麦的密度大, 反转录转座子插入较少, 小麦与大麦的序列共线性更高一些。

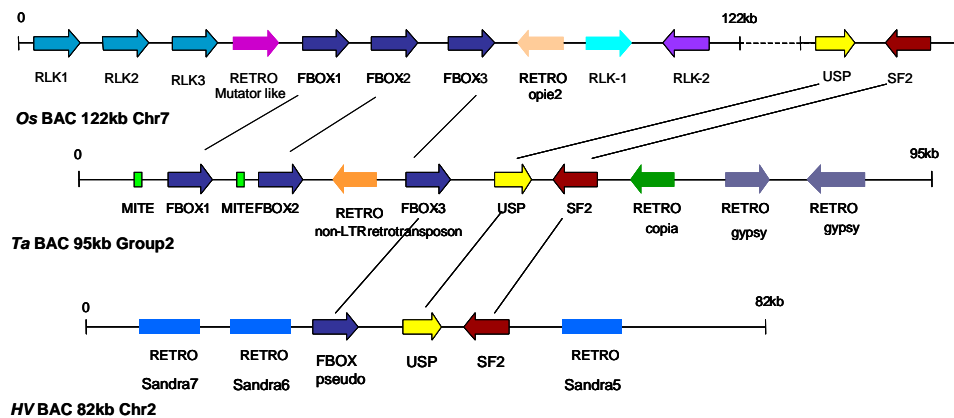


图 4-16 小麦、水稻和大麦同源基因共线性分析

Fig.4-16 Colinear analyses among of wheat, rice and barley

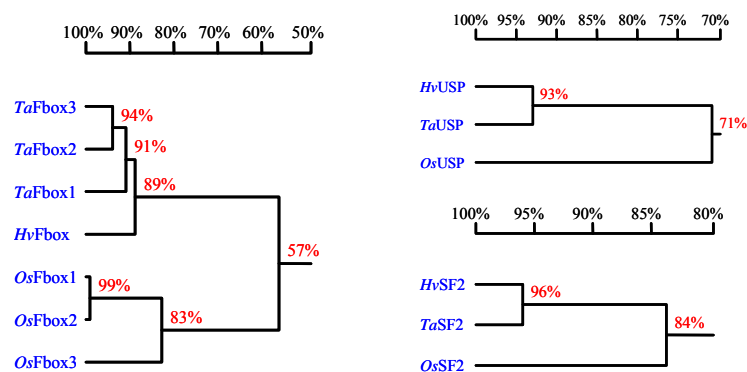


图 4-17 水稻、小麦、大麦的同源基因比对分析

Fig.4-17 Blast of homologous genes among rice, wheat and barley

4.3 讨论

筛选到的小麦BAC克隆，测序拼接后得到95kb的序列，经分析发现*TaFbox*基因的三个拷贝串联存在，推测是基因重复的结果。从Southern blotting结果分析，在二倍体基因组供体种中也非常类似，因此复制应该发生在二倍体分化之前。基因重复是植物基因组进化的主要机制之一（Zhang et al. 2002），Richly等（2000）认为基因簇或家族内的基因可能起源于一个共同的祖先，第三个拷贝的核苷酸序列与预测的祖先序列（*TaFbox*）完全一致，因此重复可能是以该序列为基础进行的。三个拷贝间的相似性达91%，同样上游序列的差异较大，只有64%，造成相似性低的原因应该是我们在此节分析中所用的序列是通过BAC序列获得的，每条在3kb以上，而上节分析中用反向PCR的方法只得到了1.5kb左右的片段，而且分析表明差异主要发生在编码基因-500bp以外。

转座元件是重复性的DNA片段，能在基因组中跳动，转座元件的插入导致基因的进化而产生新的生物功能（Sakai et al. 2007）。通常认为植物的抗性基因是进化最快的基因，新的抗性基因的产生除了必要的非对等交换外，由转座元件插入产生的高度变异也发挥了很重要的作用。*Xa21*基因家族中间插入了大量的转座元件（包括LTR反转录转座元件和MITE）（Richter et al. 2000）。*TaFbox*的第三个拷贝前有一个Non-LTR型反转录转座子插入，前两个拷贝前均有一个MITE元件插入（约150bp）。而在A、S和D组的上游序列没有发现MITE插入，因此MITE元件可能是在四倍体形成后插入的。

MITE是Bureau等（1994）发现的一种新型的转座元件，其结构与非自主元件相似，最近被鉴定出来的一大类真核转座因子，在基因的调控及进化中发挥了作用（Wessler et al. 1995），有的甚至已经进化成基因的调节结构（Brosius, 1991）。它们多位于基因的5'上游，序列本身的倒转重复结构及富含T/A的特征，使其有可能充当核基质附着区（MARs）的作用，对下游的基因进行调控（Bureau et al. 1996; Tu, 1997; Casacuberta, 1998; Avramova, 1998）。张显亮等（2000）通过对82kb的水稻BAC克隆全序列分析，精确鉴定了10个蛋白质编码基因的位置和转录方向以及7个MITEs的位置，发现MITEs只要存在，总是位于最近的基因的上游。本研究与前人的研究结果一致，通过对MITE序列分析发现在短短的100bp内，含有TATA-box、CAAT-box以及与生物素、胁迫和组织特异性表达有关的转录因子结合位点，因此MITE的插入有可能对其下游基因的表达模式产生一定的影响。McClintock（1984）认为转座元件是应对胁迫反应的“基因组改造机”（genome remodeling machines）。当植物处于逆境时，转座元件的移动能促进基因组进化，导致一些对适应性和生物存活有利变异的产生。所以，具有高度重复性的MITE元件在植物基因或基因组的进化上可能发挥了重要的作用（Casacuberta et al. 2003）。

绝大部分功能基因在禾本科植物种属间存在很高的的同源性或相似性，而且基因在染色体上的排列次序也是相似的，具有高度的共线性（Synteny）（Gale et al. 1998; Moore et al. 1995,1997）。在*TaFbox*基因所在区域，小麦和大麦的相似性高、共线性强，与水稻的较低，产生这种结果与三个物种的分化时间有关，小麦与大麦的分化时间在10-14Mya左右（Wolfe et al. 1989），与水稻的

在50Mya (Paterson et al. 2004)。我们筛选的BAC定位在第2同源群,相关的水稻BAC位于第7染色体,大麦的位于第2染色体,与小麦的第2同源群与水稻的第7染色体相对应是一致的 (Moore et al. 1995)。*F-box*基因在水稻中也有三个相似性很高的拷贝串联存在,推测也是由于基因重复形成的,研究认为禾本科植物起源于共同的祖先 (Ahn et al. 1993; Moore et al. 1995),或者有可能该同源基因的复制发生在禾本科物种形成的更早期,在以后的进化过程中又各自发生了变异。其它两个基因USP和SF2在三个物种间高度保守,但在水稻中,这两个基因与F-box基因距离较远,但都位于同一条染色体上,而且在染色体上的方向一致,而且USP和SF2总是串联在一起,推测是由于禾本科作物进化的过程中发生了重排、插入或缺失造成的。

水稻是基因组最小的禾本科作物之一,在基因组中的重复序列和反转录转座子插入较少、基因密度大,短柄草也是一种基因组比水稻还小的禾本科植物,有人也拿它作为模式植物。Bossolini等 (2007) 比较了水稻和短柄草的同源位点,发现在相同的区域内水稻包含的基因数是短柄草的两倍,我们分析的区域水稻包含了更多的基因,很少有转座元件插入。进一步说明水稻是开展谷类作物基因组学研究的理想模式植物,在小麦、大麦等作物重要基因的分离和功能验证中将发挥重要作用。

第五章 全文结论

- 1) 通过农杆菌介导法转化拟南芥对 *TaFbox* 功能进行初步鉴定, 其对 NaCl 和甘露醇表现出较强的耐受性, 在表型上主要表现在减轻了胁迫对地下根部生长的抑制作用, 随着胁迫时间的延长和胁迫浓度的增加, 转基因植株与非转基因植株的耐逆性差异越来越明显, 总体看来 *TaFbox* 基因与耐盐性及抗旱性等非生物胁迫有关。利用 GFP 融合蛋白表达载体转化洋葱表皮细胞, 将该基因定位在细胞膜上。
- 2) 基因组扩增结果表明该基因不含内含子, 在小麦及亲缘种材料间和材料内均存在多态性, 每种材料都含有差异明显的两种类型序列 *TaFbox* 和 *TaFbox2* (有 6 个碱基的插入), 所有序列保守性很高, 相似性达 94%, 除 *TaFbox2* 基因存在 6 个碱基的插入外, 多为个别碱基的突变。一些序列由于碱基的突变只能编码 200 多个氨基酸, 但仍具有 F-box 结构域。每种材料内都存在与 *TaFbox* 基因完全一致的序列, 推测该基因是原始基因序列。鉴于两种类型的基因在所有材料中都存在, 推测该基因在进化的早期就已经存在。
- 3) *TaFbox* 和 *TaFbox2* 基因原核表达蛋白与预测结果一致, 分子量差异不明显, 利用两个基因的特异引物进行 RT-PCR 分析, 结果表明它们都受盐、PEG 和低温的胁迫诱导, 但诱导表达模式存在一定的差异。
- 4) 利用反向 PCR 方法获得该基因上游约 1.5kb 的序列, 在小麦及亲缘材料间进行分析, 上游序列间的差异明显高于编码区的差异, 相似性只有 76%, 多为插入或缺失型的差异 (Indel); 在靠近基因的位置保守性高, 差异主要集中在远离基因约 500bp 以上的位置。
- 5) 上游序列比对分析, UR203 和 Y162 的序列与其它材料差异较大, 六倍体中国春两组引物 (UP-DOWN1 和 UP-DOWN2) 扩增结果表明, 中国春的上游序列分别与 **AB** 和 **D** 基因组的序列具有较高的相似性, 推测在形成四倍体 **AB** 基因组材料过程中及在以后的进化过程中发生了变异, **ABD** 材料继承了 **AB** 和 **D** 基因组, 与小麦六倍体物种的形成途径一致。
- 6) 利用中国春缺-四体和中国春-比萨偃麦草附加系将该基因家族定位于小麦族的第 2 部分同源群染色体上。
- 7) 从矮败-中国春 BAC 中筛选到一个阳性克隆, 通过 shotgun 测序、拼接得到 95kb 的序列, 分析发现 *TaFbox* 基因存在三个拷贝的串联, 同样在序列间存在高度的相似性 (91%); 前两个拷贝不能编码完整的氨基酸序列 (400 个), 第二和第三个拷贝分别与 *TaFbox2* 和 *TaFbox* 具有极高的相似性, 第三个拷贝与克隆的 *TaFbox* 基因完全一致。
- 8) BAC 克隆上 *TaFbox* 基因上游序列的扩增结果表明该 BAC 来自 **A** 组或 **B** 组, 第二和第三个拷贝的上游序列分别与中国春中与 **AB** 组相似的上游序列具有较高的相似性, 与预期结果一致。另外, 三个拷贝在上游序列间也存在较大差异, 相似性只有 64%, 所含的转录调控元件结合位点在种类和数量上都存在差异。第三个拷贝前有一个 Non-LTR 型反转录转座子插入, 前两个拷贝上游序列中各有一个 MITE 元件插入, 可能与基因组进化及对下

游基因的调控有关。

- 9) 将小麦 BAC 预测的基因与水稻、小麦和大麦的同源序列加以比较, 该区域在三个物种间存在明显的共线性; 水稻 BAC 位于第 7 染色体, 大麦 BAC 位于第 2 染色体, 与预期结果吻合。

参考文献

1. 陈亚华, 沈振国, 刘友良, 陈梅. NaCl 胁迫对棉花幼苗的离子平衡. 棉花学报, 2001, 13 (4): 225-229.
2. 董玉琛, 郑殿生. 中国小麦遗传资源. 中国农业出版社. 2000.
3. 刘俊君, 彭学贤, 黄绍兴, 柳维波. 转基因烟草的甘露醇合成和耐盐性. 生物工程学报, 1996, 12 (2): 206-210.
4. 刘旭, 史娟, 张学勇, 马缘生, 贾继增. 小麦耐盐种质的筛选鉴定和耐盐基因的标记研究. 植物学报, 2001, 43 (9): 948-954.
5. 刘岩, 王国英, 刘俊君, 彭学贤, 谢友菊, 戴景瑞, 郭世伟, 张福锁. 大肠杆菌 *gutD* 基因转入玉米及耐盐转基因植株的获得. 中国科学 (C 辑), 1998, 6: 542-547.
6. 秘彩莉, 张学勇, 温小杰, 刘旭. 利用 cDNA-AFLP 技术获得小麦耐盐性相关基因 *TaVHA-C*. 中国农业科学, 2006, 39 (9): 1736-1742.
7. 秘彩莉. 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 耐盐相关基因的克隆及特性分析. [博士学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
8. 沈义国, 杜保兴, 张劲松, 陈受宜. 山菠菜胆碱但氧化酶基因 (*CMO*) 的克隆与分析. 生物工程学报, 2001, 17 (1): 1-6.
9. 沈义国, 陈受宜. 植物盐胁迫应答的分子机制. 遗传, 2001, 23 (4): 365-369.
10. 孙金月, 赵玉田. 小麦细胞壁糖蛋白的耐盐性保护作用与机制研究. 中国农业科学, 1997, 30 (4): 9-12.
11. 王宝山, 赵可夫, 邹琦. 作物耐盐机理研究进展及提高作物抗盐性对策. 植物学通报, 1997, 14 (增刊): 25-30.
12. 王红云, 黄剑, 赖钊, 薛勇彪. 植物 F-box 蛋白质及其研究进展. 科学通报, 2002, 47 (12): 891-895.
13. 许兴, 郑国琦, 邓西平, 徐兆桢, 刘振荣. 不同基因型小麦幼苗抗旱抗盐性比较研究. 西北植物学报, 2002, 22 (5): 1122-1135.
14. 杨传平, 王玉成, 刘桂丰, 姜静. NaHCO₃ 胁迫下紫杆怪柳一些基因的表达. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30 (2): 229-233.
15. 余波澜, 黄朝峰, 周文娟, 张文俊. 小麦 **A**, **B** 和 **D** 基因组同源 DNA 序列在进化过程中的演变研究. 遗传学报, 2001, 28 (7): 635-639.
16. 曾纪晴, 张明永. 选择性剪接在植物逆境相关基因表达调控中的作用. 植物生理学通讯, 2006, 42 (6): 1005-1014.
17. 张显亮, 洪国藩. 水稻基因组中 MITEs 的偏爱位置. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32 (3): 223-228.

18. 赵可夫, 邹琦. 盐分和水分胁迫对盐生和非盐生植物膜脂过氧化作用的效应. 植物学报, 1993, 35 (7): 519-522.
19. Ahn S., Tanksley S.D.. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. Proc Natl Acad Sci, 1993, 90: 7980-7984.
20. Alonso J.M., Stepanova A.N.. The ethylene signaling pathway. Science, 2004, 306 (5701): 1513-1515.
21. Amtmann A., Fischer M., Marsh E.L., Stefanovic A., Sanders D., Schachtman D.P.. The wheat cDNA *LCT1* generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. Plant Physiol, 2001, 126: 1061-1071.
22. Arbona V., Flors V., Jaeas J., García-Agustín P., Gómez-Cadenas A.. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange. a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. Plant and cell physiology, 2003, 44 (4): 388-394.
23. Armengaud P., Thiery L., Buhot N., Grenier-De M.G., Savoure A.. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. Physiol Plant, 2004, 120: 442-450.
24. Avramova Z., Tikhonov A., Chen M., Bennetzen J.L.. Matrix attachment regions and structure colinearity in the genomes of two grass species. Nucleic Acids Res, 1998, 26: 761-767.
25. Bai C., Sen P., Hofmann K., Ma L., Goebel M., Harper J.W., Elledge S.J.. *SKP1* connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. Cell, 1996, 86 (2): 263-74
26. Bao F., Li J.Y.. Evidence that the auxin signaling pathway interacts with plant stress response. Acta Botanica Sinica, 2002, 44 (5): 532-536.
27. Belknap W.R., Garbarino J.E.. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. Trends Plant Sci, 1996, 1: 331-335.
28. Bogre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Hirt H., Heberle-Bors E.. A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. Plant Cell, 1999, 11 (1): 101-113.
29. Boscolo P.R.S., Menossi M., Jorqe R.A.. A luminum-induced oxidative stress in maize. Phytochemistry, 2003, (62): 181-189.
30. Bossolini E., Wicker T., Knobel P. A., Keller B.. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. The Plant Journal, 2007, 49: 704-717.
31. Bray E.A.. Plant responses to water deficit. Trends in plant Science, 1997, 25: 48-54.
32. Brosius J.. Retroposons-seeds of evolution. Science, 1991, 251 (4995): 753.

33. Bureau T.E., Ronald P.C., Wessler S.R.. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted repeat elements in wild-type rice genes. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93: 8524-8529.
34. Bureau T. E., Wessler S.R.. *Stowaway*: A new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *The Plant Cell*, 1994, 6 (6): 907-916.
35. Bureau T. E., Wessler S. R.. *Tourist*: A large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *The Plant Cell*, 1992, 4 (10): 1283-1294.
36. Calderón-Villalobos L.I.A., Nill.C., Marrocco K., Kretsch T., Schwechheimer C.. The evolutionarily conserved *Arabidopsis thaliana* F-box protein *AtFBP7* is required for efficient translation during temperature stress. *Gene*, 2007, 392 (1-2): 106-116.
37. Casacuberta E., Casacuberta J.M., Puigdomenech P., Monfort A.. Presence of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in the genome of *Arabidopsis thaliana*: Characterization of the Emigrant family of elements. *Plant J*, 1998, 16: 79-85.
38. Casacuberta J.M., Santiago N.. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes. *Gene*, 2003, 311: 1-11.
39. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W., Prasher D.. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802-805.
40. Chandler P.M., Robertson M.. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to salt stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45: 113-141.
41. Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W., Ecker J.R.. Activation of the ethylene gas response pathway by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 1997, 89: 1133-1144.
42. Cheeseman J.M.. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 1988, 87: 547-550.
43. Cheng D.W., Armstrong K.C., Drouin G., McElroy A., Fedak G., Molnar S.D.. Isolation and identification of *Triticeae* Chromosome 1 receptor-like kinase genes (*Lrk10*) from diploid, tetraploid, and hexaploid species of the genus *Avena*. *Genome*, 2003, 46: 119-127.
44. Cheng D.W., Armstrong K.C., Tinker N., Charlene P.W., He S., Lybaert A., Fedak G., Molnar S.J.. Genetic and physical mapping of *Lrk10*-like receptor kinase sequences in hexaploid oat (*Avena Sativa* L.). *Genome*, 2002, 45: 100-109.
45. Chinnusamy V., Schumaker K., Zhu J.K.. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*, 2004, 55 (395): 225-236.
46. Chourey K., Ramani S., Apte S.K.. Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young

- seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. *J Plant Physiol*, 2003, 160 (10): 1165-1174.
47. Chung C.H., Baek S.H.. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 266 (3): 633-640.
48. Ciechanover A.. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EBMO J*, 1998, 17 (24): 7151-7160.
49. Ciechanover A.. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 1994, 79: 13-21.
50. Ciechanover A., Orián A., Schwartz A.L.. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, 2000, 22: 442-451.
51. Close T.. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiology Plantarum*, 1997, 100: 291-296.
52. Dahan J., Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P., Suty L.. Cryptogein affects expression of $\alpha 3$, $\alpha 6$ and $\beta 1$ 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *J Exp Bot*, 2001, 52: 1947-1948.
53. Das T., D'Angelo C.P.J., Weir M.. A conserved F-box gene with unusual transcript localization. *Dev Genes Evol*, 2002, 212: 134-140.
54. Daud H.M., Stafson J.P. Molecular evidence for *Triticum speltoides* as a **B**-genome progenitor of wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 1996, 39(3): 543-548.
55. Dharmasiri N., Dharmasiri S., Lechner E.. The F-box protein *TIR1* is an auxin receptor. *Nature*, 2005a, 435: 441-445.
56. Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J.S., Jurgens G., Estelle M.. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev Cell*, 2005b, 9: 109-119.
57. Dharmasiri N., Dharmasiri S., Jones A.M., Estelle M.. Auxin action in a cell-free system. *Curr Biol*, 2003, 13 (16): 1418-1422.
58. Dharmasiri S., Estelle M.. The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol Biol*, 2002, 49: 401-409.
59. Dieterle M., Zhou Y.C., Schafer E., Funk M., Kretsch T.. EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-specific light signaling. *Genes Dev*, 2001, 15 (8): 939-944.
60. Dill A., Thomas S.G., Hu J., Steber C.M., Sun T.P.. The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*, 2004, 16: 1392-1405.
61. Dong L., Wang L., Zhang Y.E., Zhang Y.S., Deng X.W., Xue Y.B.. An auxin- inducible F-box protein CEGENDUO negatively regulates auxin-mediated lateral root formation in *Arabidopsis*.

- Plant Molecular Biology, 2006, 60: 599–615.
62. Drew M.C., Lauchli A.. The distribution of Na ion in plant. *Plant Physiol*, 1985, 79: 171-176.
 63. Feng S., Ma L., Wang X., Xie D., Dinesh-Kumar S.P., Wei N., Deng X.W.. The COP9 signalosome interacts physically with SCF^{COI1} and modulates jasmonate responses. *Plant Cell*, 2003, 15 (5): 1083-94.
 64. Feuillet C., Schachermayr F., Keller B.. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at *Lr10* disease resistance locus of wheat . *Plant J*, 1997, 11: 45-52.
 65. Feuillet C., Penger A., Gellner K., Mast A., Keller B.. Molecular evolution of Receptor-like Kinase Genes in Hexaploid Wheat. Independent Evolution of Orthologs after Polyploidization and Mechanisms of Local Rearrangements at Paralogous Loci. *Plant Physiology*, 2001, 125: 1304-1313
 66. Fu X., Richards D.E., Fleck B., Xie D., Burton N., Harberd N.P.. The *Arabidopsis* mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*, 2004, 16 (6): 1406-1418.
 67. Gagne J.M., Downes B.P., shiu S.H., Durski A.M. Wierstra R.D.. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 11519-11524.
 68. Gale M.D., Devos K.M.. Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 1971-1974.
 69. Galinski E.A.. Compatible solutes of halophilic eubacteria molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia*, 1993, 49: 487-496.
 70. Gao X.P., Wang X.F., Lu Y.F., Zhang L.Y., Shen X.Y., Liang Z., Zhang D.P.. Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. *Plant Cell environ*, 2004a, 27: 497-507.
 71. Gao X.P., Yan J.Y., Liu E.K., Shen Y.Y., Lu Y.F., Zhang D.P.. Water stress induces in pear leaves the rise of betaine level that is associated with drought tolerance in pear. *J. Horticult Sci Biotechnol*, 2004b, 79: 114-118.
 72. Garcia A.B., Engler J.A., Iyer S., Gerats T., Van Montagu M., Caplan A.B.. Effects of osmoprotectants on NaCl Stress in rice. *Plant Physiol*, 1997, 115: 159-169.
 73. Gaxiola R.A., Li J., Undurraga S., Dang L.M., Allen G.J., Apler S.L., Fink G.R.. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump, *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98 (20): 11444-11449.
 74. Gilroy S., Trewavas A.. Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 307-314.

75. Glenn E.P., Watson M.C., O'Leary J.W., Axelson R.D.. Comparison of salt tolerance and osmotic adjustment of low-sodium and high-sodium subspecies of the C₄ halophyte, *Atriplex canescens*. *Plant, cell and environment*, 1992, 15 (6): 711-718.
76. Glickman M.H., Ciechamover A.. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 2002, 82: 373-428.
77. Golldack D., Dietz K.J.. Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1643-1654.
78. Gong Z., Koiwa H., Cushman M.A., Ray A., Bufford D., Koreda S., Matsumoto T.K., Zhu J., Cushman J.C., Bressan R.A., Hasegawa P.M.. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiol*, 2001, 126: 363-375.
79. Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A.. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J*, 2005, 388: 151-157.
80. Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M.. Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 2001, 414: 271-276.
81. Guo F.Q., Bang Z.C.. Enhanced H⁺ transport activity of tonoplast vesicles isolated from roots of salt-tolerant multiant. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 4 (13): 1198.
82. Guo H., Ecker J.R.. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 2003, 115 (6): 667-677.
83. Guo Y., Qiu Q., Quintero F.J., Pardo J.M., Ohta M., Zhang c., Schumaker K.S., Zhu J.K.. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2004, 16: 435-449.
84. Gupta A.S., Heinen J.L., Holaday A.S., Burke J.J., and Allen R.D.. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90 (4): 1629-1633.
85. Hall J.L., Harvey D.M.R., Flowers T.J.. Evidence for the cytoplasmic locating of betaine in leaf cells of *Suaeda maritima*. *Planta*, 1978, 140: 59-62.
86. Hamilton K.S., Ellison M.J., Barker K.R., Williams R.S., Huzil J.T., McKenna S., Ptak C., Glover M., Shaw G.S.. Structure of a conjugating enzyme-ubiquitin thiolester intermediate reveals a novel role for the ubiquitin tail. *Structure*, 2001, 9 (10): 897-904.
87. Hartmann-Petersen R., Seeger M., Gordon C.. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 26-31.
88. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J.. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 463-499.

89. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Pardo J.M.. The dawn of plant salt to tolerance genetics. Trends in plant sci, 2000, 5: 317-319.
90. Hidenori H.. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and stress. Plant, 1997, 12 (1): 133-142.
91. Holmstrom K.O., Somersalo S., Mandal A., Palva T. E., Welin B.. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. J Exp Bot, 2000, 51: 177-185.
92. Houot V., Etienne P., Petitot A.S., Barbier S., Blein J.P., Suty L.. Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. J Exp Bot, 2001, 52: 1721-1730.
93. Imai R., Chang L., Ohta A., Bray E.A., Takagi M.. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1996, 170 (2): 243-248.
94. Ishitani M., Xiong L., Stevenson B., Zhu J.K.. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interaction and convergence of abscisic acid dependent and abscisic acid independent pathways. Plant Cell, 1997, 9: 1935-1949.
95. Isllitani M., Liu J.P., Kim C.S., Wei M., Zhu J.K.. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. Plant Cell, 2000, 12: 1667-1677.
96. Itoh H., Matsuoka M., Steber C.M.. A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. Trends Plant Sci, 2003, 8 (10): 492-497.
97. Jackson P.K., Eldridge A.G., Freed E., Furstenthal L., Hsu J.Y., Kaiser B.K., Reimann J.D.. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. Trends Cell Biol, 2000, 10 (10): 429-439.
98. Jain M., Nijhawan A., Arora R., Agarwal P., Ray S., Sharma P., Kapoor S., Tyagi A.K., Khurana J.P.. F-box Proteins in Rice: Genome-wide Analysis, Classification, Temporal and Spatial Gene Expression during Panicle and Seed Development, and Regulation by Light and Abiotic Stress. Plant Physiology, 2007, in press.
99. Jang I.C., Oh S.J., Seo J.S., Choi W.B., Song S.I., Kim C.H., Kim Y.S., Seo H.S., Choi Y.D., Nahm B.H., Kim J.K.. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. Plant Physiol, 2003, 131 (2): 516-524.
100. Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Baker P.J., Huskisson N.S., Hirt H.. Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. Proc Natl Acad Sci,

- 1996, 93, 11274–11279.
101. Kalir A., Poljakof-Mayber A.. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* L. Allen exposed to high sodium chloride concentration. *Ann Bot*, 1981, 47: 75-85.
102. Kampen J.V., Wettern M., Schulz M.. The ubiquitin system in plants. *Physiologia Plantarum*, 1996, 97 (3): 618-624.
103. Kellogg E. A.. Relationships of cereal crops and other grasses. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 93: 9121-9126.
104. Kepinski S., Leyser O.. Auxin-induced SCF^{TIR1}-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCF^{TIR1} complex. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101 (33): 12381-12386.
105. Kepinski S., Leyser O.. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 2005, 435: 446-451
106. Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklof S., Till S., Bogre L., Hirt H., Meskiene I.. SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant cell*, 2000, 12: 2247-2258.
107. Kihara H.. Discovery of the DD-analyzer, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agr Hort Jpn*, 1944, 19: 889-890.
108. Kipreos E.T., Pagano M.. The F-box protein family. *Genome Biol*, 2000, 10: 3002.1-3002.7
109. Kong H., Leebens-Mack J., Ni W., dePamphilis C.W., Ma H.. Highly heterogeneous rates of evolution in the *SKPI* gene family in plants and animals: functional and evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(1): 117-128.
110. Kononowicz A.K., Nelson D.E., Singh N.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.. Regulation of the osmotin gene promoter. *Plant cell*, 1992, 4: 513-524.
111. Kovtun Y., Chiu W.L., Zeng W., Sheen J.. Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature*, 1998, 395 (6703): 716-720.
112. Lechner E., Achard P., Vansiri A., Potuschak T., Genschik P.. F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9: 631-638.
113. Lee D.H., Goldberg A.L.. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 1998, 8: 397-403.
114. Leu K., Hsu B.. A programmed cell disintegration of *Chlorella* after heat stress. *Plant Science*, 2005, 168: 145-152.
115. Levin J.Z., Meyerowitz E.M.. UFO: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell*, 1995, 7 (5): 529-548
116. Levy A.A., Feldman M.. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon

- allopolyploidization. *Biol J Linnean Society*, 2004, 82 (7): 607-613.
117. Li M., Brooks C.L., Wu-baer F., Chen D., Baer R.. Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, 2003, 302: 1972-1975.
118. Lilius G., Holmberg N., Bülow L.. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnology*, 1996, 14: 177-180.
119. Lin J.P., Zhu J.K.. Proline accumulation and salt stress induced gene expression in a salt hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1997, 114: 591-596.
120. Liphshitz N., Waisel Y.. Existence of salt glands in various genera of the Gramineae. *New Phytol*, 1974, 73: 507-513.
121. Liu H.Y., Toyn J.H., Chiang Y.C., Draper M.P., Johnston L.H., Denis C.L.. DBF2, A cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *EMBOJ*, 1997, 17: 5289-5298.
122. Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C.S., Shi W., Zhu J.K.. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 3730-3734.
123. Liu J., Zhu J.K.. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 1998, 80: 1943-1945.
124. Liu Q., Umeda M., Uchimiya H.. Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol. Biol.* 1994, 26 (6): 2003-2007.
125. Liu W.H., Fairbairn D.J., Reid R.J., and Schachtman D.P.. Characterization of two *HKT1* homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiol*, 2001, 127: 283-294.
126. Losecher W.H., Tyson R.H., Everare J.D., Redgwell R.J., Bielecki R.L.. Mannitol synthesis in higher plants: evidence for the role and characterization of NADH-dependent mannose 6-phosphate reductase. *Plant physiol*, 1992, 98: 1396-1402.
127. Mansour M.. Physiological attributes associated with early-season against NaCl stress. *Plant Physiol biochem*, 1998, 39 (10): 1039-1044.
128. Maurel C., Chrispeels M.J.. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, 2001, 25: 135-138.
129. McClintock B.. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 1984, 226 (4676): 792-801.
130. McFadden E. S., Sears E. R.. The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Rec Genet Soc Am*, 1944, 13: 26-27.
131. McGinnis K.V., Thomas S.G., Soule J.D., Strader L.C., Zale J.M., Sun T.P., Steber C.M.. The

- Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*, 2003, 15: 1120-1130.
132. Mikolajczyk M., Awotunde O.S., Muszynska G., Klessig D.F., Dobrowolska G. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase *ASK1* in tobacco cells. *Plant Cell*, 2000, 12: 165-178.
133. Mittler R.. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 405-410.
134. Moore G., Aragón-Alcaide L., Roberts M., Reader S., Miller T., Foote T.. Are rice chromosomes components of a holocentric chromosome ancestor? *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 17-23.
135. Moore G., Devos K. M., Wang Z., Gale M.D.. Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol*, 1995, 5: 737-739.
136. Munnik T., Ligterink W., Meskiene I. I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt H.. Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J*. 1999, 20 (4): 381-388.
137. Munns R.. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Env*, 1993, 16: 15.
138. Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H.. *OMTK1*, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem*, 2004, 279 (26): 26959-25966.
139. Nakamura T., Yokota S., Muramoto Y., Tsutsui K., Ogrui Y., Fukui K., Takabe T.. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J*, 1997, 11: 1115-1120.
140. Nakayama K.I., Nakayama K.. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005, 16 (3): 323-333.
141. Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L.. Genetic applications of an inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics*, 1988, 120: 321-623.
142. Parry G., Estelle M.. Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18: 152-156.
143. Paterson A.H., Bowers J.E., Chapman B.A.. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 9903-9908.
144. Patton E.E., Willems A.R., Sa D., Kuras L., Thomas D., Craig K.L., Tyers M.. *Cdc53* is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev*, 1998, 12 (5): 692-705.
145. Paul M.H., Ray A.B., Zhu J.K., Hans J.B.. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol*, 2000, 51: 463-499.

146. Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I.. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 2000, 406: 731-734.
147. Pickart C.M.. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503-533.
148. Pollock C.J., Cairns A.J.. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42: 77-101.
149. Potuschak T., Lechner E., Parmentier Y., Yanagisawa S., Grava S., Koncz C., Genschik P.. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F-box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*. 2003, 115(6): 679-89.
150. Qiao H., Wang F., Zhao L., Zhou J., Lai Z., Zhang Y., Robbins T.P., Xue Y.. The F-box protein *AhSLF-S2* controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, 2004, 16 (9): 2307-2322.
151. Qiu Q.S., Guo Y., Quintero F.J., Pardo J.M., Schumaker K.S., Zhu J.K.. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279 (1): 207-215.
152. Quint M., Gray W.M.. Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9: 448-453.
153. Quintero F.J., Blatt M.R., Pardo J.M.. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na^+/H^+ antiporter. *FFBS lett*, 2000, 47 (1): 224-228.
154. Ramagopal S.. Salinity Stress induced tissue-specific in barley seedling. *Plant physiol*, 1987, 84 (2): 324-331.
155. Ramanjulu S., Bartels D.. Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plant. *Plant, cell and environment*, 2002, 25: 141-151.
156. Raynal M., Guilleminot J., Gueguen C., Cooke R., Delseny M., Gruber V.. Structure, organization and expression of two closely related novel Lea (late-embryogenesis-abundant) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 1999, 40 (1): 153-165.
157. Richly E., Kurth J., Leister D.. Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol Biol Evol*, 2002, 19: 76-84.
158. Richter T. E., Ronald P. C.. The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42: 195-204.
159. Rissewv E.P., Daskalchuk T.E., Banks T.W., Liu E., Cotelesage J., Hellmann H., Estelle M., Somers D.E., Crosbv W.L.. Protein W ttraction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *Plant J*, 2003, 34: 753-767.
160. Rodes D., Hanson AD.. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 357-384.

161. Rodriguez H.G., Roberts J.K.M., Jordan W.R. Drew M.C.. Growth, water relation, and accumulation of organic solutes in roots of Maize seedling during salt stress. *Plant Physiol*, 1997, 113: 881-893.
162. Rodriguez M.M.A., Uno Y., Chang I.F., Townsend J., Maher E.A., Quilici D., Cushman J.C.. A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: characterization of the interaction between AtCPK11 and AtDi19, a nuclear zinc finger protein. *FEBS Lett*, 2006, 580: 904-911.
163. Rubio F., Gassmann W., Schroeder J.I.. Genetic selection of mutants in the high affinity K⁺ transporter *HKT1* that define functions of a loop site for reduced Na⁺ permeability and increased Na⁺ tolerance. *J Biol Chem*, 1999, 274: 6839-6847.
164. Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee B.H., Matsumoto T.K., Koiwa H., Zhu J.K., Bressan R.A., Hasegawa P.M.. *AtHKT1* is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 14150-14155.
165. Rus A., Lee B.H., Munoz-Mayor A., Sharkhuu A., Miura K., Zhu J.K., Bressan R.A., Hasegawa P.M.. *AtHKT1* facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiol*, 2004, 136 (1): 2500-2511.
166. Russel B.L., Rathinasabapathi B., hanson A.D.. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiol*, 1998, 116: 859-865.
167. Saijo Y., Hata S., Kyojuka J., Shimamoto K., Izui K.. Overexpression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plant. *Plant J*, 2000, 23:319-327.
168. Sakai H., Tanaka T., Itoh T.. Birth and death of genes promoted by transposable elements in *Oryza sativa*. *Gene*, 2007, 392: 59-63.
169. Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper J.F.. Calcium at the cross-roads of signaling. *Plant Cell*, 2002, 14: S401-S417.
170. Sandhu D., Gill K. S.. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiology*, 2002, 128: 803-811.
171. Sarda X., Tusch D., Ferrare K., Legrand E., Dupuis J.M., Casse-Delbart F., Lamaze T.. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *The Plant Journal*, 1997, 12: 1103-1111.
172. Sarkar P., Stebbins G.L.. Morphological evidence concerning the origin of the **B** genome in wheat. *Amer J bot*, 1956, 43: 297-306.
173. Sasaki A., Itoh H., Gomi K., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Jeong D.H., An G., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M.. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science*, 2003, 299: 1896-1898.

174. Schultz T.F., Kiyosue T., Yanovsky M., Wada M., Kay S.A.. A role for *LKP2* in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2001, 13 (12): 2659-2570.
175. Serrano R., Gaxiola R.. Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Gret Rev Plant Sci*, 1994, 13 (2): 121-138.
176. Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J.. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1177-1183.
177. Sheveleva E., Chmara W., Bohmer H.J., Jensen R.G.. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol*, 1997, 115: 1211-1219.
178. Shi H., Lee B.H., Wu S.J., Zhu J.K.. Overexpression of a plasma membrane Na^+/K^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 2003, 21 (1): 81-85.
179. Shi H., Ishitani M., Kim C., Zhu J.K.. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6896 -6901.
180. Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M., Zhu J.K.. The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter *SOS1* controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell*, 2002, 14 (2): 465-477.
181. Shi H., Zhu J.K.. Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 2002, 50 (3): 543-550.
182. Shinozaki K., Dennis E.. Cell signaling and gene regulation global analyses of signal transduction and gene expression profiles. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 405-409.
183. Shou H., Bordall P., Fan J.B., Yeakley J.M., Bibikova M., Sheen J., Wang K.. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *Proc Natl Acad Sci*, 2004b, 101: 3298-3303
184. Shou H.X., Bordallo P., Wang K.. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (*NPK1*) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *Journal of Experimental Botany*, 2004a, 55: 1013-1019.
185. Singh N.K., Bracker C.A., Hasegawa P.M., Handa A.K., Buckel S., Hermodson M.A., Pfankoch E., Regnier F.E., Bressan R.A.. Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cell. *Plant Physiol*, 1987, 85: 529-536.
186. Singh N.K., LaRosa P.C., Handa A.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1987, 84: 739-743.
187. Singh N.K., Handa A. K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cell to NaCl. *Plant physiol*, 1985, 79: 126-137.
188. Singh N.K., Handa A.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.. Electrophoretic protein patterns in cultured cells of tobacco adapted to NaCl. *Plant Physiol*, 1983, 72 (5): 535.
189. Smalle J., Wierstra R.D.. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant*

- Biol, 2004, 55: 555-590.
190. Sofu A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A.. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiol plant*, 2004, 121: 58-65.
191. Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J.R.. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev*, 1998, 12: 3703-3714.
192. Stein N., Feuillet C., Wicker T., Schlagenhauf E., Keller B.. Subgenome chromosome walking in wheat: a 450 kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*T. aestivum* L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13436-13441.
193. Steudle E., Henzler T.. Water channels in plants: do basic concepts of water transport change? *J Exp Bot*, 1995, 46: 1067-1076.
194. Strader L.C., Ritchie S., Soule J.D., McGinnis K.M., Steber C.M.. Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene *SLEEPY1* are rescued by overexpression of its homologue, *SNEEZY*. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 12771-12776.
195. Szabolcs I.. Soils and salinization. In: Pessaraki M, ed. *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker, 1994, 1-3
196. Tarczynski M.C., Jense R.G., Bohnert H.J.. Stress protection of transgenic tobacco by production of osmolyte mannitol. *Science*, 1993, 259: 508-510.
197. Tian Q., Nagpal P., Reed J.W.. Regulation of *Arabidopsis* *SHY2/IAA3* protein turnover. *Plant J*, 2003, 36 (5): 643-651.
198. Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., Luu D.T., Bligny R., Maurel C.. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 2003, 425: 393-397.
199. Uozumi N., Kim E.J., Uubio F., Yamaguchi T., Muto S., Tsuboi A., Bakker E.P., Nakamura T., Schroeder J.I.. The *Arabidopsis* *HKT1* gene homolog mediates inward Na^+ currents in *Xenopus* oocytes and Na^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1249-1260.
200. Urao T., Katagiri T., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida N., Shinozaki K.. Two genes that encode Ca^{2+} -dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1994, 244 (4): 331-340.
201. Vcmon D.M., Tarczynski M.C., Jensen R.G., Bohnert H.. Cyclitol production in transgenic tobacco. *Plant J*, 1993, 4: 199-205.
202. Vierstra R.D.. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 135-142.

203. Wang L., Dong L., Zhang Y.E., Zhang Y.S., Wu W.H., Deng X.W., Xue Y.B.. Genome-wide analysis of S-Locus F-box-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56: 929-945.
204. Wendel J.F.. Genome evolution polyploids. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 255-249.
205. Wessler S.R., Bureau T.E., White S.E.. LTR-retrotransposons and MITEs-important players in the evolution of plant genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5: 814-821.
206. White P.J., Broadley P.J.. Calcium in plant. *Ann Bot*, 2003, 92: 487-511.
207. Winston J.T., Koepp D.M., Zhu C., Elledge S.J., Harper J.W.. A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol*, 1999, 9: 1180-1182.
208. Wolfe K.H., Gouy M.L., Yang Y.W., Sharp P.M., Li W.H.. Date of the monocot–dicot divergence estimated from chloroplast DNA-sequence data. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86: 6201-6205.
209. Woo H.R., Chung K.M., Park J.H., Oh S.A., Ahn T., Hong S.H., Jang S.K., Nam H.G. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2001, 13: 1779.
210. Xiong L.M., Schumaker K.S., Zhu J.K.. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell*, 2002, S165-S183.
211. Xiong L.M., Zhu J.K.. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 131-139.
212. Xiong L.Z., Yang Y.N.. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, 2003, 15: 745-759.
213. Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.H.D., Wu R.. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley conferred tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 1996, 110: 249-257.
214. Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W.L., Ma H., Penb W., Huanb D., Xie D.. The SCF (CO11) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2002, 14: 1919-1935.
215. Yamada S., Katsuhara M., Kelly W.B., Michalowski C.B., Bohnert H.J.. A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell*, 1995, 7 (8): 1129-1142.
216. Yamada S., Komori T., Myers P.N., Kuwata S., Kubo T., Imaseki H.. Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant and Cell Physiology*, 1997, 38: 1226-1231.
217. Yamaguchi-Shinozaki K., Koizumi M., Urao S., Shinozaki K.. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*:

- sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and Cell Physiology*, 1992, 33: 217-224.
218. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, (6): 251-264.
219. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation- responsive rd29 genes. *Plant Physiol*, 1993, 101 (3): 1119-1120.
220. Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S.R., Rikiishi S., Matsumoto H.. A luminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol*, 2002, 128: 63-72.
221. Yanagawa Y., Hasezawa S., Kumagai F., Oka M., Fujimuro M., Naito T., Makino T., Yokosawa H., Tanaka K., Komamine A., Hashimoto J., Sato T., Nakagawa H.. Cell-cycle dependent dynamic change of 26S proteasome distribution in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43 (6): 604-613.
222. Yoshida Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-shinozaki K., Shinozaki K.. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant cell Physiol*, 1997, 38: 1095-1102.
223. Yoshida Y., Nanjo T., Miura S., Yamaguchi-shinozaki K., Shinozaki K.. Stress-responsive and developmental regulation of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase1 (*P5CS1*) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261: 766-772.
224. Zhang C.K., Lang P., Dane F., Ebel R.C., Singh N.K., Locy R.D., Dozier W.A.. Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 764-769.
225. Zhang J.Y., Broeckling C.D., Blancaflor E.B., Sledge M.K., Sumner L.W., Wang Z.Y.. Overexpression of *WXP1*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J*, 2005, 1-19.
226. Zhang L., Vision T.J., Gaut B.S.. Patterns of nucleotide substitution among simultaneously duplicated gene pairs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol*, 2002, 19: 1464-1473.
227. Zhang M., Liang S., Lu Y.T.. Cloning and functional characterization of *NtCOK4*, a new tobacco calcium-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1729: 174-185.
228. Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D.W., Song C.P.. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1438-1448.
229. Zhao K.F., Lin J.. Effects of salinity on the contents of osmotica of monocotyledonous halophytes and their contribution to osmotic adjustment. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41 (12):

- 1287-1292.
230. Zhao L., Ma W.S., Han B., Liang L.Z., Zhang Y.S., Hong G.F., Xue Y.B.. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50: 29-42.
231. Zhu J. K., Liu J. P., Xiong L. M.. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 1998, 10: 1181-1191.
232. Zhu J.K.. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 124: 941-948.
233. Zhu J.K.. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci*, 2001, 6: 66-71.
234. Zhu J.K.. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 247-273.
235. Zorb C., Noll A., Karl S., Leib K., Yan F., Schubert S.. Molecular characterization of Na⁺/H⁺ antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. *J Plant Physiol*, 2005, 162 (1): 55-66.

致 谢

在本论文完成之际，首先衷心感谢我的导师刘旭研究员和张学勇研究员。从论文选题、实验设计到具体研究过程，到论文完成无不倾注了二位导师大量的心血和汗水。两位导师渊博的知识、严谨求实的科研作风、活跃的创新思维和忘我工作的敬业精神值得我终生学习。在这三年中，我学到的不仅仅是知识和技术，更有许多做人的道理，在此谨向两位导师表示崇高的敬意！

董玉琛院士是一位德高望众而又慈祥的长者，一丝不苟的治学态度和对科学事业的追求是我们永远学习的榜样。贾继增研究员严谨、认真、忘我的工作精神，也同样激励着我努力工作。实验过程中，周荣华研究员、景蕊莲研究员、孔秀英研究员、昌小平副研究员、毛新国博士、王兰芬副研究员和金翠云老师提出许多宝贵的意见和建议，并给予无私帮助。在此向几位老师道声辛苦和谢谢，祝大家事业兴旺，家庭和美。

特别感谢我的师姐秘彩莉，为实验的深入开展奠定了良好的基础。感谢在学习和研究工作中给予帮助的刘朝博士后、徐涛博士、游光霞博士、盖红梅博士、李葆春博士、杜小燕、岳伟、陆坤同学以及张洪娜、田艳华、林景等可爱的小姑娘们。感谢徐重益博士和李绪彦博士后在拟南芥培养与转化工作上的指导，感谢吴佳洁博士和张俊成硕士在 BAC 文库筛选测序过程中给予的无私帮助。还有我的同学庞斌双博士，非常珍惜三年来互相帮助、共同走过的日子。感谢中国农业科学院李爱丽副研究员在基因枪使用上给予的帮助。

感谢中科院遗传发育研究所的李振声院士惠赠了 pBINPLUS、pJIT-163 和 163-GFP 质粒，使实验得以顺利进行。感谢中科院遗传发育研究所文玉香老师在荧光共聚焦显微镜的使用过程中提供的帮助和支持。感谢中国农业科学院生物技术研究所的黄荣峰研究员对实验的指导。感谢中国科学院遗传发育研究所的李大勇博士在序列拼接和分析方面给予的帮助。感谢中国科学院遗传发育研究所的缪军博士、赵学强博士以及中国农业大学的赵晋峰博士在实验过程中给予的热情帮助。

感谢实验室的所有老师和同学。大家相处融洽，亲如一家，营造了良好的工作氛围。

同时感谢同宿舍的刘丽、王荣焕和张晓艳博士，我们朝夕相处、互相鼓励，结下了真诚的友谊，终生难忘。

在求学过程中，我的双方父母及亲人给予了无限的关怀和厚爱，是我人生中奋斗的源泉与动力。特别感谢我的爱人郝晨阳博士，在生活和学业上都是我坚强的后盾，失落时安慰我，挫折时鼓励我，生活中无微不至的关怀我，使我克服困难，全身心的进行研究工作。

最后，真挚的感谢所有关心和帮助我的人，祝大家永远幸福、安康！

本课题承蒙国家自然科学基金（30370881）资助，在此表示感谢。

温小杰

2007年6月

作者简历

温小杰，女，汉族。1977年6月生于河北省唐山市，1997年9月考入河北农业大学农学院，2001年7月获农学学士学位。2001年9月考入河北农业大学农学院，从事我国陆地棉抗枯黄萎病品种遗传多样性研究，2004年7月获农学硕士学位。同年考取中国农科院研究生院，攻读作物遗传育种专业博士学位，主要从事小麦耐盐相关基因分析及功能鉴定的研究。

博士期间发表的论文：

1. 温小杰，张学勇，郝晨阳，刘旭. MITE 转座元件在植物中的研究进展. (已投).
2. 温小杰，马峙英，王省芬，张桂寅，李喜焕. 中国抗枯、黄萎病陆地棉材料分子水平的遗传差异评价. 中国农业科学，2005，38(5): 936-943.
3. 温小杰，张桂寅，王省芬，李喜焕，马峙英. 棉花组织总 RNA 的快速提取方法. 分子植物育种，2004，2(1): 147-150.
4. 秘彩莉，张学勇，温小杰，刘旭. 利用 cDNA-AFLP 技术获得小麦耐盐性相关基因 *TaVHA-C*. 中国农业科学，2006，39(9): 1736-1742.
5. 郭小敏，段会军，温小杰，吴立强. 西瓜枯萎病菌最优 RAPD 体系的建立. 河北农业大学学报，2004，27(3): 64-67.
6. 王省芬，马峙英，张桂寅，温小杰，李喜焕. SSR 和 AFLP 技术鉴定棉花遗传资源的比较分析. 棉花学报，2006，18(6): 391-393.
7. 段会军，马峙英，张彩英，郭小敏，李喜焕，温小杰. 河北省西瓜枯萎病菌生理小种分化及其分布. 中国农学通报，2005，21(6): 317-321.