

## cDNA-AFLP 法筛选红树植物盐应答基因

陈银华<sup>1,2</sup>, 韩淑梅<sup>2</sup>, 沙爱华<sup>3</sup>, 朱红林<sup>2</sup>, 范吉星<sup>2</sup>, 谢俊<sup>1,2</sup>, 符秀梅<sup>2</sup>, 李小靖<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>海南大学教育部热带生物资源重点实验室; <sup>2</sup>海南大学农学院, 海口 570228; <sup>3</sup>中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

**摘要:** 【目的】分析红树植物盐胁迫下基因表达谱, 分离识别耐盐相关基因。【方法】分别对红树植物-秋茄进行海水和淡水处理。分时提取总 RNA 进行等量混合, 获得两种不同处理的样品池。采用 cDNA-AFLP 技术进行表达差异分析。【结果】256 对引物组合共筛选了约 15 000 个 cDNA 片段, 获得差异片段 61 个。差异基因表达模式分为 2 类, 即海水处理诱导上升和下调表达, 其中上升表达的基因片段为 36 个, 下调表达的基因片段为 25 个; 其中 38 个可视为已知基因。按照其功能分类可分为 8 大类: 基础代谢、跨膜蛋白、信号转导、蛋白质代谢、转录因子、细胞骨架、抗病蛋白、假想蛋白, 而其中又以基础代谢相关基因所占比重最大。【结论】构建了红树植物-秋茄在盐胁迫下的基因表达谱, 从基因组水平上识别了一批受盐胁迫诱导或抑制表达、与耐盐相关的基因, 这些新基因可用于耐盐的分子机理研究。

**关键词:** 红树; 耐盐性; 基因分离; cDNA-AFLP

## Differential Analysis of Salt Response Genes by cDNA-AFLP in Mangrove

CHEN Yin-hua<sup>1,2</sup>, HAN Shu-mei<sup>2</sup>, SHA Ai-hua<sup>3</sup>, ZHU Hong-lin<sup>2</sup>, FAN Ji-xing<sup>2</sup>, XIE Jun<sup>1,2</sup>,  
FU Xiu-mei<sup>2</sup>, LI Xiao-jing<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Ministry of Education, Hainan University; <sup>2</sup>College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228; <sup>3</sup>Institute of Oil Crops Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

**Abstract:** 【Objective】This study was conducted to elucidate the gene expression response of mangrove to salt-stress. 【Method】Gene expression of *Kandelia candel* treated with fresh water and sea water was analyzed by the technology of cDNA-AFLP. 【Result】Two hundred and fifty-six primer combinations were used to investigate 15 000 cDNA fragments. Sixty-one differentially expressed cDNAs were found, 36 of which were up-regulated and 25 were down-regulated under the salt stress. The sequence analysis showed that 38 of them were with high homology to the genes in GenBank. The ESTs with significant protein homology were sorted into eight functional categories: basal metabolism, transmembrane protein, signal transduction, protein metabolism, transcription factor, cytoskeleton, disease resistance protein, hypothetical protein. The rate of the basal metabolism related genes was maximum. 【Conclusion】Gene expression profiling in response to salt and differentially expressed genes of mangrove *Kandelia candel* were revealed and identified via cDNA-AFLP analysis. This work begins to reveal potential molecular metabolism for salt tolerance of mangrove.

**Key words:** Mangrove; Salt-tolerance; Gene isolation; cDNA-AFLP

## 0 引言

【研究意义】土壤盐渍化是一个全球性的生态问题, 给农业生产造成了巨大损失, 如何利用大面积的盐碱地发展农业, 是人类迫切需要解决的重大课题。

【前人研究进展】红树林是分布在海岸潮间带, 受到海水周期性浸淹的木本植物群落, 由于其富含单宁酸, 被砍伐后易氧化成红色, 而称为“红树林”。该类植物长期生活在盐渍条件下, 在进化过程中, 已经逐渐演化成对高盐环境的适应性, 能逆浓度梯度吸收水分,

收稿日期: 2007-10-10; 接受日期: 2008-04-07

基金项目: 教育部科技重点项目 (207092); 海南省自然科学基金 (80540, 80612); 海南省重点学科建设项目-热带植物资源开发与利用

作者简介: 陈银华 (1976 - ), 男, 安徽安庆人, 副教授, 博士, 研究方向为植物抗逆分子生物学。Tel: 0898-66180255; E-mail: yhchenhu@126.com

具有类似旱生植物的结构和特殊根系, 是进行耐盐研究的重要资源<sup>[1]</sup>。厦门大学的周涵涛等利用 DDRT 技术从泌盐性红树植物白骨壤中分离到一个耐盐相关 cDNA, 日本 Toshiaki 利用 DDRT 方法从红树植物木榄中分离出高盐条件下差异表达的 mRNA 转录子, 方孝东等利用 RDA 技术从盐藻中分离了 2 个耐盐相关 cDNA 片段<sup>[2-4]</sup>。但目前关于红树植物的大量专著、论文主要集中在红树林的生态学和生理方面的研究, 对红树植物耐盐分子机理、耐盐基因的分离利用方面报道很少。为了充分发掘耐盐基因资源, 从分子水平上认识耐盐机制, 必须大力加强耐盐的分子生物学研究<sup>[4]</sup>。【本研究切入点】本研究采用 cDNA-AFLP 技术对不同处理条件下红树植物-秋茄的表达差异进行分析, 结合测序、生物信息学手段分离识别盐生植物的耐盐相关基因片段。【拟解决的关键问题】本研究为进一步克隆全长的盐胁迫相关基因, 从分子水平上认识盐生植物抵抗盐胁迫的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试红树植物秋茄 (*Kandelia candel*), 待种子成熟时, 取胎生苗种植于长形塑料盆中, 生长初期以淡水浇灌。当幼苗长到 3 叶 1 心时, 连根取出幼苗(注意保持幼苗根的完整性)。用海水分别处理 6、12、24 和 48 h, 淡水处理为对照。收集处理不同时期的根用于 RNA 提取。

cDNA-AFLP 相关试剂及试剂盒购自 Promega 公司; TA 克隆试剂盒 pMD18-T Kit 购自宝生物公司; 引物的合成及测序由上海生工生物工程技术服务公司完成。

### 1.2 总 RNA 的提取及双链 cDNA 合成

秋茄根部总 RNA 提取采用改进的 CTAB 法。取新鲜的红树根置预冷的研钵中, 加入液氮研磨成细粉末; 加 65℃ 预热的 CTAB 抽提液 (2% CTAB; 100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0; 1.4 mol·L<sup>-1</sup> NaCl; 2% β-巯基乙醇) 混匀; 于 65℃ 温育 30 min; 加等体积氯仿/辛醇混匀, 室温静置 2 min, 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min; 上层水相移至另一离心管中, 重复抽提直至中间界面看不到蛋白质沉淀, 离心取上清; 将上清移入一新离心管中, 加入 1/3 体积 8 mol·L<sup>-1</sup> LiCl, -20℃ 沉淀过夜; 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇漂洗 2 次, 倒置离心管, 在室温下自然干燥, 用 200 μl TE 溶解。取

少量样品进行电泳分析和紫外测定, 将各处理的 RNA 浓度调至相等。去 DNA 后保存备用<sup>[5-6]</sup>。

各处理取等量的 RNA 进行混合, 形成 2 个样品池 (海水处理、淡水处理)。采用 SMART 技术合成双链 cDNA<sup>[7]</sup>, 具体操作参照试剂盒说明书。经两轮 PCR 扩增, 取 5 μl PCR 产物, 1.2% 的琼脂糖凝胶检测。

### 1.3 cDNA-AFLP 筛选差异基因

取 250 ng cDNA, *EcoR* I / *Mse* I 双酶切 1 h, 终止酶切反应。直接在反应液中加入相应的限制性酶接头进行连接 1 h。取 5 μl 连接产物为模板, 以接头引物进行预扩增, 反应程序如下: 94℃ 1 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 25 循环; 第 1 轮 PCR 产物稀释 20 倍为模板, 选择性扩增引物进行第 2 轮 PCR, 反应程序如下: 94℃ 3 min、94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 0.7℃/循环, 72℃ 1 min, 13 循环; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 23 循环, 72℃ 5 min。

经 2 轮扩增后, 取 20 μl 产物加入等量的甲醛上样缓冲液 (90% 甲醛, 10% 5×TBE, 0.25% 溴酚蓝及 0.25% 二甲苯青), 95℃ 变性 5 min, 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结果银染参照《分子克隆》的方法<sup>[8]</sup>。

### 1.4 差异片段的克隆及序列分析

回收试剂盒回收 PAGE 胶上的差异表达 cDNA 片段, 用与选择扩增相同的引物组合和 PCR 扩增程序重新扩增, 1.0% 琼脂糖凝胶检测。回收差异片段进行克隆、测序、序列分析。

### 1.5 差异片段的 RT-PCR 分析

根据测序结果, Primer 5.0 软件设计引物。从两个样品池取等量的去 DNA 的 RNA 反转录获得第一链 cDNA, 进行 RT-PCR 反应, 具体操作参照试剂盒说明书。1.0% 琼脂糖凝胶进行检测。

### 1.6 差异片段的 Northern 分析

为进一步检测所克隆片段在胁迫条件下的表达情况, 选择其中部分 EST 片段进行 Northern 杂交分析, 具体操作参照常规分子克隆方法进行<sup>[8]</sup>。

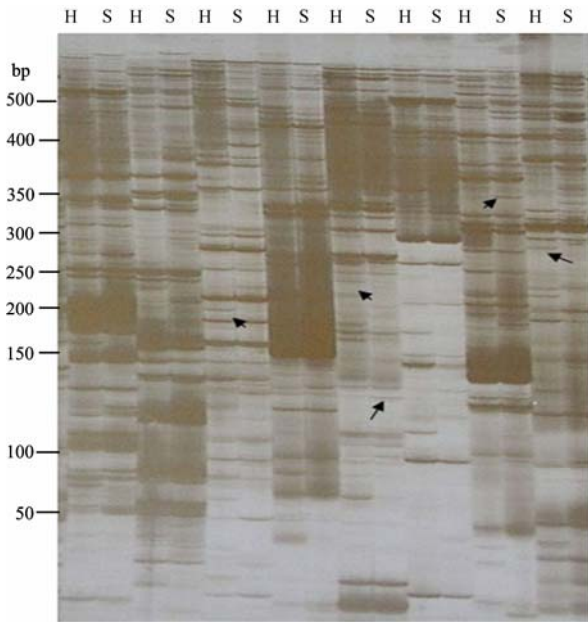
## 2 结果与分析

### 2.1 双链 cDNA 的合成

利用改进的 CTAB 法提取海水和淡水条件下的秋茄根部总 RNA。SMART 技术合成双链 cDNA, 经 21 个循环进行 PCR 扩增, 合成的双链 cDNA 片段的大小介于 300~3 000 bp, 可用于进一步进行 cDNA-AFLP 分析。

### 2.2 差异表达基因筛选

采用 256 对 *EcoR* I /*Mse* I 引物组合对淡水处理和盐水处理的红树幼苗根部表达基因进行了筛选, AFLP 扩增片段大小介于 50~500 bp, 每对引物组合平均可扩增出 60~80 条主带。图 1 所示为 PAGE 胶



图示为 8 对引物组合扩增的 cDNA-AFLP 产物在 PAGE 胶上的分离。H: 淡水处理; S: 盐水处理。箭头所示为差异表达片段  
The cDNA-AFLP products of eight pairs of primes separated on PAGE gel were indicated. H: Sample treated with H<sub>2</sub>O; S: Sample treated with salt. The bands differentially expressed were indicated with arrows

图 1 cDNA-AFLP 分析淡水和盐水处理红树幼苗根部基因表达  
Fig. 1 Gene expression of roots treated with H<sub>2</sub>O and salt by the analysis of cDNA-AFLP

分离的部分 AFLP 扩增产物。

经 256 对引物组合对约 15 000 个基因片段进行筛选, 共筛选到差异表达片段 69 个, 约占总筛选片段的 0.4%。差异基因表达模式可分为两类, 即盐水处理诱导上调表达基因和下调表达基因, 其中上调表达的基因片段为 41 个, 下调表达基因片段为 28 个。

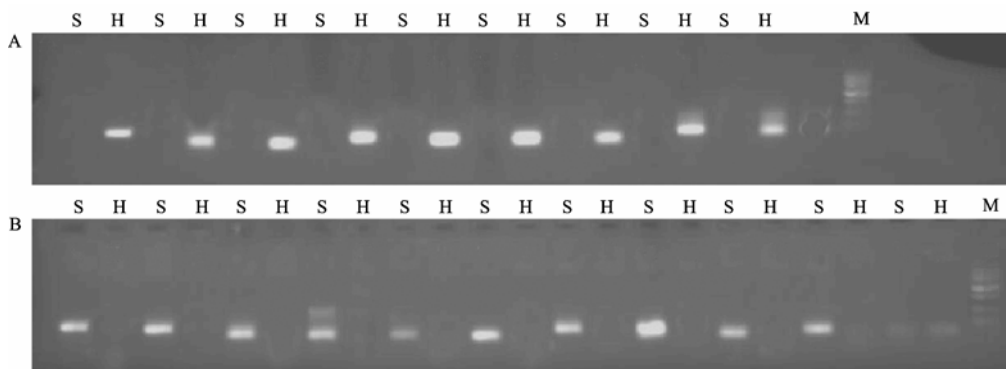
PAGE 胶上回收的差异表达 cDNA 片段用与选择扩增相同的引物组合和相同的 PCR 扩增程序进行重新扩增后, 进行克隆、测序。

### 2.3 差异表达基因的 RT-PCR 分析

根据测序结果设计引物, 以去 DNA 处理的 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应。结果表明, 筛选到的 69 个差异片段中, 61 个的表达特异性与 cDNA-AFLP 的结果是吻合的, 7 个片段在 2 种处理下表达差异不明显, 1 个未扩增出有效片段, 阳性率为 88%。图 2 所示为部分 ESTs 的 RT-PCR 结果。

### 2.4 差异表达基因片段的序列分析

将通过筛选获得的 61 个差异表达的 ESTs 序列在 GenBank 上进行 BLASTx 分析。与拟南芥、水稻、烟草等同源性较高且比对结果中 E 值低于 1e-05 的 ESTs 视为已知基因, 共 38 个; 其中盐胁迫诱导表达的 27 个, 淡水下诱导表达的 11 个。与其它物种同源性较低, 既无有意义的蛋白比对结果, 也无有意义的 DNA 比对结果的 EST, 所代表的可能是新基因, 共 23 个; 其中盐胁迫诱导表达的 14 个。在这 38 个已知基因中, 包括了一些已经报道的与盐胁迫相关的基因, 如多药和有毒化合物排出家族 (multidrug and toxic compound extrusion, MATE) 基因、水通道蛋白基因 (nodulin



S: 盐水处理, H: 淡水处理; A: 淡水处理下增强表达的部分 EST 的 RT-PCR 分析; B: 盐处理下增强表达的部分 EST 的 RT-PCR 分析, 横线部分表示 2 种处理下差异不明显的 EST  
S: Sample treated with salt; H: Sample treated with H<sub>2</sub>O; A: RT-PCR analysis of up-regulated ESTs under H<sub>2</sub>O; B: RT-PCR analysis of up-regulated ESTs under salt stress. The underlined sample indicate the EST expressed same under H<sub>2</sub>O and salt

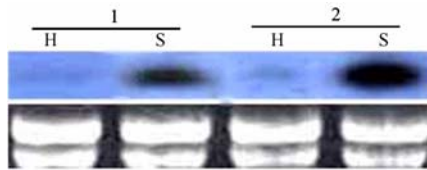
图 2 部分差异 EST 的 RT-PCR 分析  
Fig. 2 RT-PCR analysis of differential ESTs

family protein)、茉莉酸甲酯酯酶基因 (methyl jasmonate esterase) 等,这在一定程度上也说明了差异筛选的可靠性。

将视为已知基因的 38 个 EST,按功能分为 8 大类:基础代谢、跨膜蛋白、信号转导、蛋白质合成、转录因子、细胞骨架、抗病蛋白、假想蛋白,如表所示。这一结果表明,EST 所代表的基因参与到植物细胞生命活动的各个方面。在这 8 大类 EST 中,参与基础代谢的基因最多,达到 31.6%。

### 2.5 差异片段的 Northern 杂交

为进一步对获得的差异片段进行表达分析,选择盐胁迫下增强表达的水通道蛋白基因和茉莉酸甲酯酯酶类似基因进行 Northern 杂交分析。结果表明,海水处理下,它们均能在秋茄根部特异表达,其中茉莉酸甲酯酯酶类似基因的表达量比淡水高 10 倍以上(图 3)。这一结果与 RT-PCR 结果基本一致,只是 Northern 杂交对这两个基因在秋茄根部的本底表达也能反映出来。



H: 淡水处理, S: 海水处理; 1, 2 依次代表水通道蛋白基因和茉莉酸甲酯酯酶类似基因  
H: Sample treated with H<sub>2</sub>O; S: Sample treated with salt; 1, 2 indicate nodulin family protein and methyl jasmonate cleaving esterase genes respectively.

图 3 差异片段 Northern 杂交

Fig. 3 Northern blotting of differential fragments

## 3 讨论

红树是一种生长在热带、亚热带海岸潮间带的木本植物,它们长期生活在盐渍条件下。长期的进化过程中,已经逐渐演化成对高盐环境的适应性,能逆浓度梯度吸收水分,具有类似旱生植物的结构和特殊根系,是进行耐盐研究的重要资源。但目前对红树植物主动适应盐胁迫的分子机制尚缺乏认识,盐胁迫下会诱导多少基因的差异表达,这些基因的作用机制如何还完全不清楚<sup>[9-10]</sup>。所以构建海水和淡水条件下差异表达的 cDNA 库,对大量筛选、克隆耐盐基因具有重要意义。

表 差异表达的 EST 及可能编码的蛋白

Table Differentially expressed ESTs and putative protein

功能类型	数量	占比	推测的蛋白名称
Function type	Number	(%)	Name of Putative proteins
基础代谢 Primary metabolism	12	31.6	光系统 II G 蛋白 Photosystem II G protein
			细胞色素 P450 单氧酶 Cytochrome P450 monooxygenase
			尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 UDP-glucosyl transferase
			查尔酮合成酶 Chalcone synthase
			NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase
			β-木糖苷酶 beta-D-xylosidase
			肌醇氧化酶 Myo-inositol oxygenase
			丝氨酸蛋白酶类似蛋白 Serine protease-like
			细胞色素 P450 Cytochrome P450
			锰离子转运蛋白 Manganese transport protein
			结瘤蛋白家族 Nodulin family protein
			淋巴限制性膜蛋白 Lymphoid-restricted membrane protein
跨膜蛋白 Membrane protein	6	15.8	多药和有毒化合物排出家族基因 Multidrug and toxic compound extrusion
			TonB 依赖受体 TonB-dependent receptor
			富含亮氨酸跨膜蛋白激酶 Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
			卷曲类似蛋白 Frizzled-like protein 6 gene
			蛋白激酶家族 Protein kinase family
			茉莉酸甲酯酯酶 Methyl jasmonate esterase
信号转导 Signal transduction	4	10.5	泛素结合酶 Ubiquitin-conjugating enzyme
			泛素系统组成因子 Ubiquitin system component Cue
			16S 核糖核酸 16S RNA
			翻译延伸因子 G Translation elongation factor G
蛋白质代谢 Protein metabolism	5	13.2	核糖体蛋白 S12 Ribosomal protein S12 gene
			锌指蛋白 Zinc finger protein
			β-微管蛋白 beta-tubulin
			核苷酸结合区和富含亮氨酸重复类抗病蛋白 NBS-LRR type disease resistance protein
			假想蛋白 Hypothetical protein
转录因子 Transcription factor	1	2.6	假想蛋白 Hypothetical protein
细胞骨架 Cytoskeleton	1	2.6	假想蛋白 Hypothetical protein
抗病蛋白 Disease resistance protein	1	2.6	假想蛋白 Hypothetical protein
假想蛋白 Hypothetical protein	8	21	假想蛋白 Hypothetical protein

克隆植物新基因的方法众多,包括图位克隆法、转座子或 T-DNA 标签法、序列克隆法和差异表达分析法等<sup>[11-13]</sup>。在分离差异表达基因时,cDNA-AFLP 由于其简单、易行、灵敏度高、快速等特点而受到格外的重视<sup>[14]</sup>,如陈学峰等<sup>[15]</sup>采用 cDNA-AFLP 技术分离克隆了水稻杂种与亲本间差异表达基因片段 S600,郭丽琼等<sup>[16]</sup>采用单酶切 cDNA-AFLP 改良法克隆分离了 10 条草菇冷诱导基因片段,逯明辉等<sup>[17]</sup>采用 cDNA-AFLP 技术从耐冷性强的黄瓜品种长春密刺中分离到一条特异片段-ctr132。笔者的研究利用该方法从耐盐植物秋茄中获得了差异表达片段 61 个。经生物信息学分析及 RT-PCR 检测证实所获得差异片段均来自红树。这些结果表明,该方法用来分离差异表达基因还是十分有效的。

对获得的 38 个已知基因按功能分为 8 大类,说明红树在盐胁迫条件下要涉及大量的基因参与到各种代谢途径中,不仅需要大量的物质和能量代谢、跨膜蛋白的运输,还需要信号转导、转录因子等的参与,这与其它研究结果一致<sup>[18-19]</sup>。从各类 EST 所占的比例来看,似乎红树植物对盐胁迫的适应性更多的来自自身代谢能力的增强及离子转运。这一现象是否在所有盐生植物上均有表现有待进一步研究。

在筛选到的 38 个 EST 中,参与基础代谢的最多,达到 31.6%,主要与光合作用有关。光合作用包括光反应和碳反应。参与到光反应中的如,光系统 II G 蛋白、NADH、细胞色素等;而丝氨酸蛋白酶等则参与到碳反应中。光合作用途径的改变最终引起糖代谢和有机酸代谢的改变,使得红树产生对盐胁迫的适应性<sup>[20]</sup>。

植物在盐胁迫条件下,会有一些新的蛋白合成,这将会引起蛋白合成相关基因表达增强。核糖体蛋白及 16sRNA 是参与组成核蛋白体的成分,不同的核糖体蛋白组装成核糖体后在蛋白质的翻译过程中具有不同的作用<sup>[21]</sup>。延伸因子是在蛋白质合成过程中将氨酰 tRNA 结合于核糖体受体位点所需的分子,当其表达增强时候蛋白质的合成速率也相应的增加。而泛素系统是蛋白质降解所必需的,盐胁迫下泛素系统的是否增强表达意味着,在产生新的蛋白质的同时还需要降解部分蛋白以加快蛋白质代谢过程<sup>[22-23]</sup>。

为了应对盐胁迫产生的高渗透压及离子不平衡,植物会想办法去逃避或者忍耐盐胁迫。通常情况下,植物可通过休眠去逃避盐胁迫,通过抑制细胞分裂、放慢甚至停止生长去减少对盐离子的吸收及应对渗透

压失衡引起的脱水压力等<sup>[24-26]</sup>。而作为一种长期生活在海水中的植物—红树可能通过表达大量的跨膜蛋白,将其细胞内的有害离子运出,以达到调节自身的离子平衡,因此在笔者所获得的 38 个 EST 中,跨膜蛋白占 15.8%。水通道蛋白(MIP)是其中一种广泛分布于植物细胞质膜上。水通道蛋白可以形成选择性的水运输通道,允许水自由出入,而将离子或其它有机物拒之门外。一般认为干旱、盐等胁迫能调控水通道蛋白在生物膜(质膜、质体和液泡膜)上的数量和相对丰度<sup>[27]</sup>。笔者的研究发现,红树水通道蛋白类似基因在盐胁迫下转录水平大大提高,与前人的研究结果一致<sup>[28]</sup>。但该基因在耐盐中的调控机制尤其是盐生植物主动适应盐胁迫中的作用机制目前尚缺乏认识。

茉莉酸类物质(JAs)是广泛存在于高等植物体内的一种新型植物生长调节物质,在调节植物生长发育、光合特性、抗逆反应等起着重要的作用<sup>[29]</sup>。JA 及其甲酯类(MeJA)并存在于细胞中,JA 信号的转运主要是通过 MeJA 实现的。当植物受到环境胁迫时,首先在胁迫响应部位合成 MeJA。作为一种气体信号分子,MeJA 能在不同细胞和植株之间进行长距离运输,将这种逆境预警在不同细胞和组织间进行传递。植物细胞识别这种外源信号分子以后通过茉莉酸甲酯酶水解为茉莉酸,进入细胞,进而引发防卫反应,提高整个植株对逆境的适应能力<sup>[30]</sup>。因此,MeJA 向 JA 的转化成为调控 JA 相关反应的要点之一。笔者的研究发现该基因在盐胁迫下表达大大增强,与番茄上的研究结果一致<sup>[31]</sup>。对该基因的功能研究将有利于进一步了解茉莉酸信号途径,及盐生植物对抗盐胁迫的信号转导机制。

目前而言,植物对盐胁迫的抗性是多基因控制的数量性状,其生理生化过程是基因间相互协调作用的结果,在这些基因中,哪些起主导作用,期待进一步的研究。这些盐生植物 EST 数据的获得,为进一步认识植物耐盐机制、克隆耐盐高效基因打下了基础。

## 4 结论

4.1 用 cDNA-AFLP 的方法构建了盐胁迫条件下,红树植物在细胞水平上的基因表达谱。

4.2 从基因组水平上识别了 38 个受盐胁迫诱导或抑制表达、与红树耐盐相关的基因。

## References

- [1] Tomlinson P B. *The Botany of Mangroves*. London: Cambridge

- University Press, 1986: 38.
- [2] 周涵韬, 林 鹏. 利用 mRNA 差别显示技术分离盐胁迫下红树植物白骨壤耐盐相关 cDNA. 生物工程学报, 2002, 18(1): 51-54.  
Zhou H T, Lin P. Extraction of the salt-tolerant cDNA in mangrove *Avicennia marina* by mRNA differential display. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, 18(1): 51-54. (in Chinese)
- [3] 方孝东, 黄 薇, 林栖凤, 李冠一, 屈良鹤. 通过 cDNA RDA 法分离和识别盐藻(*Dunaliella salina*)盐胁迫相关基因. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(1): 67-72.  
Fang X D, Huang W, Lin Q F, Li G Y, Qu L H. Isolation and identification of genes involved in salt-adaptation of *Dunaliella salina* by cDNA RDA. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 20(1): 67-72. (in Chinese)
- [4] 林栖凤. 耐盐植物研究. 北京: 科学出版社, 2004.  
Lin Q F. *Halophyte Research*. Beijing: Science Press, 2004. (in Chinese)
- [5] 裴 东, 谷瑞升. 几种提取木本植物中 RNA 方法的比较和改进. 植物生理学通讯, 2002, 38: 362-365.  
Pei D, Gu R S. Comparison and improvement of the methods of RNA isolation for woody plants. *Plant Physiology Communication*, 2002, 38(4): 362-365. (in Chinese)
- [6] 方孝东, 吴多桂, 林栖凤, 李冠一. 一种适用于盐生植物的 RNA 提取方法. 海南大学学报(自然科学版), 1998, 18: 311-313.  
Fang X D, Wu D G, Lin Q F, Li G Y. A suitable method for the RNA extraction of halophyte. *Natural Science Journal of Hainan University*, 1998, 18: 311-313. (in Chinese)
- [7] Chenchik A, Zhu Y Y, Diatchenko L, Li R, Hill J, Siebert P D. Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR (BioTechniques Books, M A)*, 1998: 305-319.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Parida A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60: 324-349.
- [10] Zhu J K. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 2001, 2: 66-71.
- [11] Garfinkel D J, Mastrangelo M F, Sanders N J, Shafer B K, Strathern J N. Transposon tagging using Ty elements in yeast. *Genetics*, 1988, 120: 95-108.
- [12] Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Research*, 1993, 21: 4272-4280.
- [13] Huang L, Brooks S A, Li W L, Fellers J P, Trick H N, Gill B S. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics*, 2003, 164: 655-664.
- [14] Bachem C W B, Van der Hoeven R S, de Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 1996, 9: 745-753.
- [15] 陈学峰, 熊建华, 张义平, 华 扬, 李阳生, 朱英国. 水稻杂种与亲本间差异表达 cDNA 片段 S600 的分离克隆. 武汉植物学研究, 2005, 23: 91-95.  
Chen X F, Xiong J H, Zhang Y P, Hua Y, Li Y S, Zhu Y G. Identification and cloning of S600 cDNA fragment that is differentially expressed in a rice hybrid and its parents. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2005, 23: 91-95. (in Chinese)
- [16] 郭丽琼, 林俊芳, 杨丽卿, 刘瑞瑞. 单酶切 cDNA-AFLP 改良法分离草菇冷诱导基因. 菌物学报, 2004, 23: 241-247.  
Guo L Q, Lin J F, Yang L Q, Liu R R. Isolation of cold induced genes by modified cDNA-AFLP with single enzyme digestion from *Volvariella Volvacea Mycosystema*, 2004, 23: 241-247. (in Chinese)
- [17] 逯明辉, 李晓明, 陈劲枫, 陈龙正, 钱春桃. 黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达. 中国农业科学, 2005, 38: 2492-2495.  
Lu M H, Li X M, Chen J F, Chen L Z, Qian C T. Study on chilling tolerance of cucumber during germination and expression of lysine decarboxylase gene. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 2492-2495. (in Chinese)
- [18] Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16: 123-132.
- [19] Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J K. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 2005, 45: 437-448.
- [20] Cushman J C, Meyer G, Michalowski C B, Schmitt J M, Bohnert H J. Salt stress leads to differential expression of two isogenes of PEP Case during CAM induction in the common ice plant. *Plant Cell*, 1989, 1: 715-725.
- [21] Yokoi S, Bressan R A, Hasegawa P M. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*, 2002, 1: 25-33.
- [22] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6: 441-445.
- [23] Banzai T, Hershkovits G, Katcoff D J. Identification and characterization of mRNA transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differential display in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Science*, 2002, 162:

- 499-505.
- [24] Parida A K, Das A B, Mitra B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees Structure Function*, 2004, 18(2): 167-174.
- [25] Parida A K, Das A B, Mohanty P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Physiology*, 2004, 161(5): 531-542.
- [26] Parida A K, Das A B, Sanada Y. Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, *Aegiceras corniculatum*. *Aquatic Botany*, 2004, 80: 77-87.
- [27] Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjoval S, Fraysse F, Weig A R, Kjellbom P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1358-1369.
- [28] Maurel C, Reizer J, Schroeder J I, Chrispeels M J. The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *Europe Molecular Biology Journal*, 1993, 12: 2241-2247.
- [29] Dreher K, Callis J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals of Botany*, 2007: 1-35.
- [30] Cheong J J, Yang D C. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, 2003, 19: 409- 413.
- [31] Christiane S, Martin J M, Heribert W. Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271: 2976-2983.

(责任编辑 于 竞)