

# 与苜蓿褐斑病 (CLS) 抗性基因连锁的 SRAP 标记研究

王 瑜<sup>1</sup>, 袁庆华<sup>1</sup>, 李向林<sup>1</sup>, 高建明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; <sup>2</sup>天津农学院, 天津 300384)

**摘要:** 【目的】寻找与苜蓿抗褐斑病基因连锁的分子标记。【方法】以褐斑病中等抗性亲本杂交组合 (YL0602M × SH0602M) 的 F<sub>1</sub> 分离群体为研究材料, 采用 SRAP 分子标记技术, 结合 BSA 法筛选与抗褐斑病基因连锁的分子标记。【结果】SRAP 引物对 Me3/Em3 在抗、感病 DNA 池以及建池 20 单株中产生特异片段。测序结果显示, 目标片段大小为 169 bp, 将该标记命名为 M3E3-R169。【结论】标记 M3E3-R169 在 20 个建池抗、感单株中出现的符合率为 80%, 初步确定其与苜蓿抗褐斑病基因连锁。

**关键词:** 苜蓿; 褐斑病; SRAP 标记

## Analysis of SRAP Markers Associated with Common Leaf Spot Disease Resistance Gene in Alfalfa

WANG Yu<sup>1</sup>, YUAN Qing-hua<sup>1</sup>, LI Xiang-lin<sup>1</sup>, GAO Jian-ming<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193; <sup>2</sup>Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

**Abstract:** 【Objective】 The study identified the molecular markers linked to common leaf spot disease resistance gene in alfalfa. 【Method】 With a F<sub>1</sub> population produced by two middling resistant parents (YL0602M×SH0602M), the molecular marker associated with common leaf spot disease resistance gene was screened by BSA method and SRAP technology. 【Result】 One specific band was found between resistant and susceptible DNA pool and 20 plants that comprised the two pools. Sequencing of the fragment indicated that its length was 169 bp. This SRAP marker was named as M3E3-R169. 【Conclusion】 The coincidence rate of the existence of M3E3-R169 in 20 plants was 80%, so M3E3-R169 would be linked to common leaf spot disease resistance gene.

**Key words:** alfalfa; common leaf spot; SRAP markers

## 0 引言

【研究意义】由苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 假盘菌 (*Pseudopeziza medicaginis* (Lib.) Sacc.) 引起的褐斑病 (common leaf spot, CLS) 是苜蓿最常见和破坏性很大的病害之一, 几乎遍布世界所有苜蓿种植区, 常常造成牧草产量的较大损失<sup>[1]</sup>。选育和使用抗病品种是防治苜蓿褐斑病最经济、最有效的方法。由于紫花苜蓿是异花授粉四倍体植物, 群体杂合度高, 常规的田间病情调查筛选工作量大, 耗时长, 且人为鉴定标准存在差异, 难以高效率地筛选出大量抗性种质。另外, 病原菌生理小种分化速度快, 经过较长时间培育的抗病品种很可能在推广时已成为非抗病品种, 所以

要求育种工作者缩短育种周期。分子标记技术的发展为解决以上问题提供了可能。它通过对基因型的直接选择, 在苗期即可进行大量的抗病鉴定, 不受时间和环境的限制, 加速了育种进程。分子标记辅助育种对于提高苜蓿抗褐斑病新品种选育效率具有重要实际应用价值。【前人研究进展】目前, 国内已有研究者利用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术与苜蓿抗褐斑病基因连锁的分子标记进行了探索性研究<sup>[2-4]</sup>, 国外尚无相关报道。SRAP 分子标记技术由 Li 等<sup>[5]</sup>在芸苔属作物上开发出来, 以其简便、稳定、中等产率以及在基因组中分布均匀等特点被广泛应用于种质资源鉴定评价<sup>[6-8]</sup>、遗传图谱构建<sup>[5,9-10]</sup>、重要性状基因标记<sup>[11-13]</sup>乃至基因克隆<sup>[14]</sup>等方面。【本研究切入点】然而, 与

收稿日期: 2009-03-27; 接受日期: 2009-08-21

基金项目: 国家自然科学基金 (30972140)、国家“十一五”科技支撑项目 (2008BADB3B01)、草业创新团队项目 (2009td-2)

作者简介: 王 瑜, 博士研究生。E-mail: yuzi-1981@163.com。通信作者袁庆华, 研究员, 硕士。Tel: 010-62185750; E-mail: yuanqinghua@hotmail.com

苜蓿抗褐斑病相关的 SRAP 标记研究尚未见报道。

【拟解决的关键问题】本研究拟利用苜蓿褐斑病中等抗性的 2 个亲本组合构成的 F<sub>1</sub> 分离群体，筛选出与抗褐斑病基因连锁的 SRAP 标记，提供苜蓿褐斑病抗性鉴定的分子手段，用于分子标记辅助育种，并为抗病基因克隆奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

根据袁庆华等<sup>[15]</sup>对伊鲁瑰斯 (*Medicago sativa* L. cv. Iroquois)、萨兰斯 (*Medicago sativa* L. cv. Saranac)、沙湾 (*Medicago sativa* L. cv. Shawan)、沙河 (*Medicago sativa* L. cv. Shahe) 和涇阳 (*Medicago sativa* L. cv. Jingyang) 5 个苜蓿品种的离体叶筛选研究，每品种筛选出最抗和最感各 5 株，并通过无性扦插扩繁单独收种。本试验在此基础上将这 5 个品种最抗和最感单株的后代培育成株系，每品种抗、感各 5 个株系，每株系育苗 100 株。通过接种鉴定结合方差分析，挑选出中抗材料 4 株，分别为伊鲁瑰斯 2 株 (YL0601M, YL0602M)、沙河 2 株 (SH0601M, SH0602M)，依次编号为 A、B、C、D。

配置中抗材料杂交组合：A×B、B×D、C×A 和 D×C，人工授粉、单独收种。将 F<sub>1</sub> 育苗，每组合育苗 200 株。

苜蓿假盘菌 [*Pseudopeziza medicaginis* (Lib.) Sacc.] 菌种采自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所生长 6 年的苜蓿试验地，经室内分离纯化扩繁后，接种于保定苜蓿上，隔离小区内活体保存备用。

SRAP 引物为上海生物工程公司合成，dNTP、Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 产品，DMSO 购自上海生物工程公司，琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒、感受态细胞 JM109 和克隆载体 pMD19-T 均为 TaKaRa 产品。

### 1.2 方法

1.2.1 育苗 参考马鸿文等<sup>[16]</sup>的苜蓿幼苗培养方法，每组合育苗 200 株。

1.2.2 接种鉴定及筛选 参照孟芳等<sup>[4]</sup>的活体菌株覆盖接种法及其病情分级标准，从 4 个中抗杂交组合中，选择长势良好，单株间发病程度差异最大，综合性状差异大的 1 个组合——B×D，再从中挑选高抗、高感各 10 个单株，用来构建抗、感病 DNA 池。

1.2.3 DNA 提取及定量 苜蓿基因组 DNA 提取采用改进的 CTAB 法<sup>[17]</sup>。用 0.8% 琼脂糖凝胶对 DNA 质量进行电泳检测，并以一定浓度 λDNA 作为定量参照标

准，将各单株 DNA 浓度定为 10 ng·μL<sup>-1</sup>，-20℃ 保存备用。

1.2.4 抗、感病 DNA 池的建立 对挑选出的 10 个高抗单株和 10 个高感单株，利用 Michelmores 等<sup>[18]</sup>提出的 BSA 法建立抗病池和感病池。

1.2.5 SRAP 扩增与产物检测 20 μL 反应体系中各反应物的含量为：10 ng 模板 DNA、0.2 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP、0.25 μmol·L<sup>-1</sup> SRAP 引物、0.8 U Taq DNA 聚合酶、2 μL 10×PCR buffer、2.0 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、2.5% DMSO。PCR 扩增参照 Li 等<sup>[5]</sup>的程序。扩增结束后，6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，银染显色<sup>[19]</sup>。

1.2.6 SRAP 标记的筛选 采用 BSA 法，用抗、感病 DNA 池对 100 对 SRAP 引物进行筛选，挑选在抗、感病池间能够产生特异性条带的引物，然后用建抗、感病 DNA 池单株对其进行验证。

1.2.7 特异片段的回收、克隆和测序 从 PAGE 胶上挖下特异片段放入 200 μL PCR 薄壁管中，加入 20 μL 10×TE，95℃ 保温 10 min；取出，用灭菌枪头捣烂，然后再于 95℃ 保温 10 min，取 1 μL 用作 PCR 模板，反应体系和程序同 1.2.5。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后，于紫外灯下挖下特异片段，用琼脂糖凝胶纯化试剂盒对片段进行回收纯化。之后，将其与 pMD19-T 载体连接，连接产物转化入 *E. coli* JM109 菌株进行克隆。克隆产物送宝生物工程有限公司进行测序。

1.2.8 DNA 序列分析 用分子生物学软件 BioEdit 分析序列中碱基组成，并通过 NCBI 核苷酸数据库进行序列比对。

## 2 结果

### 2.1 SRAP 标记筛选

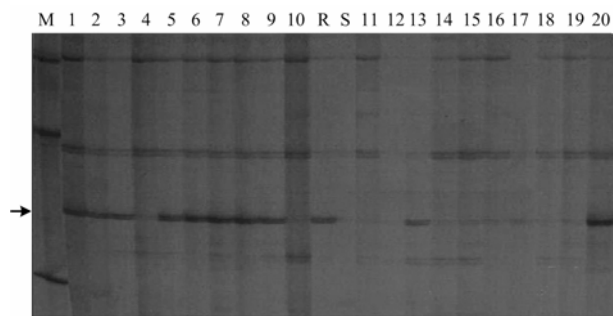
本试验采用 10 条正向引物和 10 条反向引物(表)组合成 100 对 SRAP 引物，以抗、感病 DNA 池为模板，对 100 对引物进行扩增。扩增产物先用琼脂糖凝胶进行检测，挑选扩增条带清晰稳定，且具有特异性条带的引物对其产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。结果显示，琼脂糖凝胶电泳检测中，98 对引物有扩增产物(占 98%)，共产生条带 529 条，条带数量在 1—10 条之间，大小主要分布在 100—1 000 bp 之间。其中，Me3/Em3 和 Me8/Em6 两对引物均在抗病 DNA 池中各产生 1 条特异性条带。用建抗、感病 DNA 池的 20 个单株对 2 个标记进行验证，结果 Me8/Em6 引物对在抗、感单株间不存在特异性，而 Me3/Em3 引物

对特异性明显, 在 10 个高抗单株中, 8 株扩增出该特异性条带, 在 10 个高感单株中, 8 株无该条带, 2 株有 (图), 特异性条带出现的符合率为 80%。

表 正向和反向 SRAP 引物序列

Table The forward and reverse SRAP primer sequences for this study

正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')
Me1 TGAGTCCAAACCGGATA	Em1 GACTGCGTACGAATTAAT
Me2 TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2 GACTGCGTACGAATTTGC
Me3 TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3 GACTGCGTACGAATTGAC
Me4 TGAGTCCAAACCGGACC	Em4 GACTGCGTACGAATTAAC
Me5 TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5 GACTGCGTACGAATTGCA
Me6 TGAGTCCAAACCGGACA	Em6 GACTGCGTACGAATTCAA
Me7 TGAGTCCAAACCGGACG	Em7 GACTGCGTACGAATTCAC
Me8 TGAGTCCAAACCGGACT	Em8 GACTGCGTACGAATTCAT
Me9 TGAGTCCAAACCGGAGG	Em9 GACTGCGTACGAATTCTA
Me10 TGAGTCCAAACCGGAAA	Em10 GACTGCGTACGAATTGTC



M: DNA 标准; R: 抗病 DNA 池; S: 感病 DNA 池; 1—10: 高抗单株; 11—20: 高感单株  
M: DNA marker; R: Resistant pool; S: Susceptible pool; 1-10: Resistant plants; 11-20: Susceptible plants

图 Me3/Em3 在抗、感病 DNA 池以及建池抗、感单株间的扩增结果

Fig. The PCR results with primer Me3/Em3 in resistant and susceptible DNA pools, 10 highly resistant plants and 10 highly susceptible plants

## 2.2 特异片段的克隆和序列分析

Me3/Em3 引物所扩增的特异片段, 经回收、克隆和测序, 发现其大小为 169 bp, 将该标记命名为 M3E3-R169, 片段序列如下 (下划线处为引物序列):

TGAGTCCAAACCGGAATAACCCCATATGTA  
GTAGACTTGAAATCGGAACAAAATTAATGTCAG

ATGAAACTTTTTTATCTTCGAGAGAGAACAATAT  
TATTATTTGCTTACCCATAAGAAGGTGTTAATGT  
CAGCTGTCTCGTGTCCCCCTGTCAATTCGTACGC  
AGTC

从序列测定结果可知, 目的片段 M3E3-R169 测定序列长 169 bp, 其两端分别含有特异引物 Me3 序列和 Em3 反向互补序列 (划线部分所示)。该片段中 A、T、C、G 4 种碱基的数目分别为 53、51、34、31, 其中, A+T=61.54%, C+G=38.46%。通过 NCBI 将该片段与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行比对, 发现片段 M3E3-R169 中的 6—157 号碱基序列与紫花苜蓿谷氨酰胺合成酶基因<sup>[20]</sup>的 3 855—4 006 号碱基具高度一致性, 同一性高达 97%, 横跨其 11 号表达子与间隔子序列。

## 3 讨论

重要农艺性状基因紧密连锁标记的获得, 可进行性状分子标记辅助选择, 提高育种的选择效率与预见性, 加快新品种的选育进程。Li 等<sup>[5]</sup>曾采用 SRAP 标记技术, 在中国白菜 (*Brassica pekinensis* (Lour) Rupr) 中发现了一个与雄性 2 基因有关的 SRAP 标记, 在油菜 (*Brassica campestris* L.) 中筛选到一个与恢复基因连锁的 SRAP 标记, 在芹菜 (*Apiron graveliens* L.) 中获得一个与病毒抗性基因紧密连锁的 SRAP 标记。但是, 有关苜蓿重要农艺性状的 SRAP 分子标记研究目前尚未见报道。

苜蓿为异花授粉四倍体植物, 中抗×中抗杂交产生的 F<sub>1</sub> 群体在抗病基因位点处存在 5 种基因型: AAAA、AAAa、AAaa、Aaaa 与 aaaa。在该群体中挑选高抗、高感单株难以保证其目标基因均为纯合四倍体, 难免有基因型杂合的单株, 从而使得在几株高感单株中也扩增出了微弱的目的条带 (图)。另外, 4 号与 10 号 2 个抗病单株未扩增出目的条带, 而 13 号与 20 号 2 个感病单株则扩增出清晰稳定的目的条带, 是因为与抗病基因连锁的标记发生重组造成的。20 株抗、感植株中目的条带出现的符合率为 80%, 可初步判断标记 M3E3-R169 与苜蓿褐斑病抗性基因连锁。

谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 在植物氮素同化过程中起重要作用, 广泛分布于高等植物的种子、根、叶、根瘤和果实等器官中。在植物体内, 铵态氮经谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶循环途径形成谷氨酸, 谷氨酸再经谷氨酸途径合成脯氨酸, 脯氨酸作为一种渗透调节剂, 在提高植物耐逆性方面发

挥着重要作用。Hoshida 等<sup>[21]</sup>通过研究证明 GS2 在转基因水稻中可以提高植物的耐盐性。另外, 脯氨酸可进一步合成羟脯氨酸。富含羟脯氨酸的糖蛋白为细胞抗击病原体的一道屏障<sup>[22]</sup>, 可以保护细胞免受病原菌侵染, 其抗逆功能在发育<sup>[23]</sup>、机械损伤、真菌感染<sup>[24]</sup>、植物抗毒素诱导剂处理以及热处理等方面均有表现。本研究所得到的 SRAP 标记 M3E3-R169 与苜蓿褐斑病抗性基因连锁, 经序列分析发现该标记为苜蓿 GS 基因的一部分, 由此推测该位点所在染色体上存在 GS 基因, 苜蓿抗病植株的抗病能力可能与该基因的表达有关。Pageau 等<sup>[25]</sup>在烟草的研究中发现, 在受到细菌、病毒、真菌等病原物侵染后, 烟草体内 GS 表达活性将受影响, 对不同病原物, GS 的表达活性将表现为不同的变化趋势, 或上升或下降或保持不变。笔者认为需要通过进一步的生理生化以及分子生物学试验, 对苜蓿褐斑病抗性机理以及病原菌侵染前后抗、感苜蓿植株体内谷氨酰胺合成酶的表达情况进行研究, 以判断与褐斑病抗性基因连锁的是否为 GS 基因, 并且确定该基因对苜蓿褐斑病抗性的贡献。

另外, 在得到 M3E3-R169 这个标记后, 一方面, 应该建立 BC<sub>1</sub> 群体, 在分离群体中验证该标记的可靠程度并确定其与抗病基因间的遗传距离; 另一方面, 根据 M3E3-R169 的序列, 设计用于做 SCAR 标记的引物, 提高试验的重复性和稳定性。

## 4 结论

本研究利用 SRAP 标记结合 BSA 法, 对苜蓿褐斑病抗性进行研究, 得到一个与抗褐斑病基因相关的标记——M3E3-R169。该标记在建池抗、感单株中出现的符合率高达 80%, 初步推断其与抗褐斑病基因连锁。经克隆测序和序列比对, 发现其 6—157 号碱基序列与紫花苜蓿谷氨酰胺合成酶基因的 3 855—4 006 号碱基序列同一性高达 97%, 横跨该基因 11 号表达子与间隔子。

## References

- [1] Morgan W C, Parbery D G. Effects of *Pseudopeziza* leaf spot disease on growth and yield in Lucerne. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1977, 28: 1029-1040.
- [2] 袁庆华, 桂 枝, 张文淑. 苜蓿基因组 DNA 提取和 PAPD 反应条件优选. *草地学报*, 2001, 9(2): 99-105.  
Yuan Q H, Gui Z, Zhang W S. Optimization of alfalfa genomic DNA extraction and RAPD conditions. *Acta Agrestia Sinica*, 2001, 9(2): 99-105. (in Chinese)
- [3] 王 瑜, 袁庆华, 高建明. 苜蓿褐斑病抗性基因 ISSR 标记研究. *中国草地学报*, 2008, 30(3): 55-58.  
Wang Y, Yuan Q H, Gao J M. Analysis of ISSR markers associated with brown blot resistance gene in alfalfa. *Chinese Journal of Grassland*, 2008, 30(3): 55-58. (in Chinese)
- [4] 孟 芳, 袁庆华, 苏德荣, 高建明. 苜蓿抗褐斑病基因 ISSR 标记的筛选及验证. *植物保护*, 2008, 34(4): 46-50.  
Meng F, Yuan Q H, Su D R, Gao J M. Selection and validation of ISSR markers of common leaf spot disease resistance-related gene in tetraploid alfalfa. *Plant Protection*, 2008, 34(4): 46-50. (in Chinese)
- [5] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.
- [6] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(2): 271-282.
- [7] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, Gaussoin R E, Riordan T P, Dweikat I. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 328-334.
- [8] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F<sub>2</sub> 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析. *遗传学报*, 2004, 31(6): 622-626.  
Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of F<sub>2</sub> segregation population and genetic diversity in cotton. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(6): 622-626. (in Chinese)
- [9] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 贺道华, 吴茂清. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建. *科学通报*, 2003, 48(15): 1676-1679.  
Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, He D H, Wu M Q. The construction of a linkage map using SRAP in cotton. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(15): 1676-1679. (in Chinese)
- [10] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 傅廷栋, 马朝芝. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱. *中国农业科学*, 2007, 40(6): 1118-1126.  
Li Y Y, Shen J X, Wang T H, Fu T D, Ma C Z. Construction of a linkage map using SRAP, SSR and AFLP markers in *Brassica napus* L. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(6): 1118-1126. (in Chinese)
- [11] Chen W, Zhang Y, Liu X P, Chen B Y, Tu J X, Fu T D. Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (*Brassica napus*) using DH and immortalized F<sub>2</sub> populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115: 849-858.

- [12] Rahman M, McVetty P B E, Li G. Development of SRAP, SNP and multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L.. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115: 1101-1107.
- [13] Mutlu N, Boyacr F H, Göcmen M, Abak K. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a Fusarium wilt resistance gene in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117: 1303-1312.
- [14] Li G, Quiros C F. Genetic analysis, expression and molecular characterization of *BoGSL - ELONG*, a major gene involved in the aliphatic glucosinolate pathway of *Brassica* species. *Genetics*, 2002, 162: 1937-1943.
- [15] 袁庆华, 张文淑. 苜蓿抗褐斑病遗传资源离体叶筛选及田间评价. 草地学报, 2003, 11(1): 205-209.
- Yuan Q H, Zhang W S. Screening for genetic resistance of alfalfa to *Pseudopeziza medicaginis* by inoculation of leaf tissue and field evaluation of the plants. *Acta Agrestia Sinica*, 2003, 11(1): 205-209. (in Chinese)
- [16] 马鸿文, 袁庆华, 徐秉良. 苜蓿假盘菌对一些豆科牧草寄主侵染能力的初步研究. 植物保护, 2007, 33(6): 54-56.
- Ma H W, Yuan Q H, Xu B L. A preliminary study on the virulence and infectivity of *Pseudopeziza medicaginis* to some leguminosae. *Plant Protection*, 2007, 33(6): 54-56. (in Chinese)
- [17] 袁庆华, 桂 枝. 苜蓿褐斑病研究. 北京: 化学工业出版社, 2006: 33-35.
- Yuan Q H, Gui Z. *Study on the Common Leaf Spot Disease in Alfalfa*. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 33-35. (in Chinese)
- [18] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1991, 88: 9828-9832.
- [19] 朱正歌, 贾继增, 孙宗修. 水稻 AFLP 指纹银染法显带研究. 中国水稻科学, 2002, 16(1): 71-73.
- Zhu Z G, Jia J Z, Sun Z X. Improvement of AFLP protocol for silver-staining in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2002, 16(1): 71-73. (in Chinese)
- [20] Tischer E, DasSarma S, Goodman H M. Nucleotide sequence of an alfalfa glutamine synthetase gene. *Molecular and General Genetics*, 1986, 203: 221-229.
- [21] Hoshida H, Tanaka Y, Hibino Y, Hayashi Y, Tanaka A, Takabe T, Takabe T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology*, 2000, 43: 103-111.
- [22] Cosgrove D J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 2000, 407: 321-326.
- [23] Hood E E, Shen Q X, Varner J E. A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein in maize pericarp cell walls. *Plant Physiology*, 1988, 87: 138-142.
- [24] Wei G, Kloepper J W, Tuzun S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Biological Control*, 1996, 86(2): 221-224.
- [25] Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry J F, Masclaux-Daubresse C. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(3): 547-557.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)