



盐胁迫下陆地棉耐盐品种根系的抑制消减文库构建

叶武威, 赵云雷, 王俊娟, 樊保香

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南 安阳 455000)

摘要:采用抑制消减(SSH)杂交技术构建了陆地棉耐盐品种中棉所35在盐(0.4%NaCl)胁迫后1 d、3 d、5 d和7 d的混合SSH文库。文库质量检测表明,差减杂交效率较高,质量较好。随机挑选200个阳性克隆进行测序,获得160余条高质量的表达序列标签(EST)。对序列进行BLAST比对及功能注释,其中有62条unigene未获得源性匹配,42条与未知功能的序列源性较高;其余56条功能已知的unigene中,与抗逆直接相关的基因有14个,占8.8%,参与新陈代谢及信号转导的基因有11条和10条,分别占6.9%和6.3%,参与转录调控的基因8条,占5.0%。最后,对这些基因在盐胁迫中的作用进行了注释与讨论。

关键词:棉花;抗逆性;耐盐基因;SSH文库

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2009)05-0339-07

Construction of SSH Library on Root System of Salinity-Tolerance Variety (*G. hirsutum* L.) under the Stress of Salinity

YE Wu-wei, ZHAO Yun-lei, WANG Jun-juan, FAN Bao-xiang

(Cotton Research Institute of the Chinese Academy of Agriculture Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: A SSH library from the salt tolerant upland cotton cultivar, CCRI 35, was constructed using suppression subtractive hybridization (SSH) and pGEM-T Easy Vector under salt (0.4% of NaCl) stress at the first, third, fifth and seventh day after the beginning of salination. The library was evaluated to be of good quality with high efficiency of SSH. Total 200 positive clones were randomly selected and then sequenced, and 160 high quality sequences were obtained. According to BLAST screening and functional annotation, there were 62 unigenes (38.8%) without or only with weak similarities to the existent proteins in the NR database from NCBI and 42 unigenes (26.2%) significantly matched with hypothetical protein. While the unigenes assigned to stress-tolerance, metabolism, signaling conduction and transcription regulation accounted for 8.8%, 6.9%, 6.3% and 5.0%, respectively. The functions of these unigenes under salt stress were discussed.

Key words: cotton; stress tolerance; salt tolerance gene; SSH library

耐盐性是一个非常复杂的性状,长期以来人们对植物耐盐性的了解主要来自于生理学的研究成果,如有机溶质的积累和盐诱导蛋白的产生等^[1-2]。随着分子生物技术的发展,人们对耐盐性的了解逐渐深入到分子水平。由于植物的盐胁迫

反应是一个多基因参与的系统调控过程,尽管传统的研究方法已取得了一些成果,但是要想从根本上阐明盐胁迫机制尚有很大差距。这就需要在基因组水平上对其进行整合性研究。随着生物技术、基因组学和生物信息学的发展,目前已出现

收稿日期:2008-10-24

作者简介:叶武威(1967-),男,博士,研究员,yeww@cricaas.com.cn.

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务专项(SJA0822)

一系列大规模分离差异表达基因的方法。

SSH 即抑制消减杂交技术是由 Diatchenko 等^[3]于 1996 年以 mRNA 差异显示技术为基础建立起来的筛选未知差异表达基因的新技术。采用该技术在较短时间内即可获得差异表达基因的 cDNA 片段,可富集稀有序列 1000 倍以上,某些低丰度表达的 mRNA 有望被检出^[3]。近年来 SSH 技术在植物抗逆性研究上展现了良好的应用前景。夏卓盛等^[4]以铝离子胁迫的紫花苜蓿幼根为材料,构建了紫花苜蓿铝胁迫的抑制消减文库,研究了铝胁迫下的基因差异表达;蔡勤安等构建了 PEG 渗透胁迫下白花柃柳的抑制性消减杂交文库,研究渗透胁迫下白花柃柳基因的表达调控^[5];朱龙付等和王省芬等分别以海岛棉和陆地棉为材料,构建了黄萎病菌诱导的抑制消减文库,研究了棉花对黄萎病的抗性分子机制^[6-7]。而 SSH 文库在棉花抗逆性研究方面的报道很少。

本研究以耐盐棉花品种中棉所 35 为基础,采用抑制消减杂交技术构建了一个棉花经 NaCl 胁迫后根系的 SSH 文库,并对文库进行了分析,旨在为棉花耐盐机制研究和耐盐相关基因的克隆提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料及其处理

取中棉所 35 的种子 300 粒,自来水浸泡 24 h 后分别播种于装有 1.5 kg 细沙的 10 个发芽盒中,每盒 30 粒种子。将发芽盒置于光照培养箱中,采用白天 30℃、16 h 光照和夜晚 25℃ 的条件进行培养。当幼苗生长至三叶一心期后,随机选取 5 个发芽盒,称取干沙重 0.4% 的 NaCl,配成 100 mL 溶液后施入发芽盒中;另外 5 个发芽盒施加 100 mL 清水作为对照。选取在外观表型上最相似的植株进行取样,这些植株都具有生长良好的第一、二片真叶,顶端的第三片真叶正处于快速生长阶段。分别在盐处理后的第 1、3、5、7 d,用自来水小心冲洗发芽盒中的细沙,将处理和对照的根系冲洗干净,迅速置于液氮中速冻,然后保存于-70℃冰箱中备用。

1.2 棉花根系总 RNA 提取

总 RNA 提取采用改进的异硫氰酸胍法^[8],主要改进之处是在除去蛋白质的步骤中只使用氯仿:异戊醇(24:1)而不使用酚。提取的总 RNA 经 RQI RNase-free DNase I (Promega)处理后,

采用酚:氯仿(1:1)进行纯化。

1.3 SSH 文库的构建

依照 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech 公司,美国)和 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech 公司,美国)的说明书进行 SSH 操作。以中棉所 35 在盐胁迫后 1 d, 3 d, 5 d 和 7 d 的根系混合物为实验方,以中棉所 35 在清水处理后 1 d, 3 d, 5 d 和 7 d 的根系混合物为驱动方(Driver),构建盐胁迫条件下特异表达基因的 cDNA 文库。将 SSH 得到的 cDNA 与 pGEM-T Easy Vector (Promega)在 4℃ 条件下连接过夜,取 1.5 μL 连接产物用热激法转化到大肠杆菌感受态细胞 DH-5α 中,150 r·min⁻¹ 振荡培养 1 h。转化的菌液涂布于含有 Amp 100 mg·L⁻¹ 的 LB/X-gal/IPTG 培养基上,37℃ 暗培养 14~18 h。将培养皿放于 4℃ 冰箱中使蓝色菌落显色完全。挑选生长良好的白色克隆接种于含有防冻培养基的 96 孔细胞生长板中,37℃ 培养 12~16 h,保存在-80℃冰箱中。

1.4 插入片段大小检测

随机挑取阳性克隆于 3 mL LB 液体培养基中,150 r·min⁻¹ 振荡培养过夜,采用以菌液为 PCR 扩增模板的方法直接从菌液中扩增插入片段。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小。

1.5 EST 片段测序和序列同源性分析

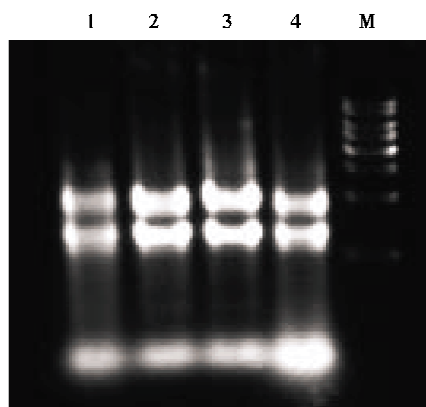
随机取文库中克隆的菌液在含 Amp 100 mg·L⁻¹ 的 LB 液体培养基中过夜培养,取 1 mL 过夜培养菌液送北京华大基因研究中心测序。测序按每批测 100 个序列的方法进行。利用 NCBI 中的 VecScreen 程序将测序结果中的载体序列去掉,再分别用 Blastn 和 Blastx 程序将克隆片段的碱基序列在 GenBank 中进行序列相似性搜索,以 Blastn 结果一致性大于 50%、分值大于 80, Blastx 结果一致性大于 40、分值大于 80 作为判断相似性的标准。

2 结果与分析

2.1 棉花根系总 RNA 质量检测

采用改进的异硫氰酸胍法,提取了高质量的棉花根系总 RNA,经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后置紫外灯下观察 RNA 的完整性(图 1),可清楚地看到 28S RNA 和 18S RNA 两条主带,且 28S RNA 的亮度是 18S RNA 的 2 倍。经紫外分光光度计测定,总 RNA 的吸光值 A₂₆₀/

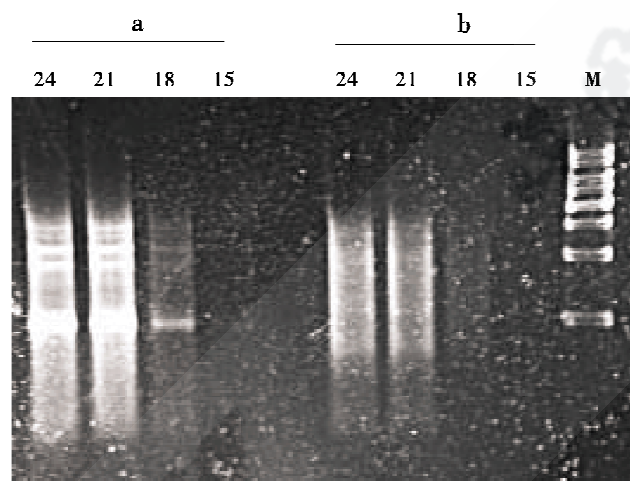
A280 在 1.9~2.1 之间, A260/A230 值大于 2.0。说明所制备的总 RNA 质量较好, 达到建库要求。



注:泳道 1 和 2 为盐胁迫后 1 d, 3 d, 5 d 和 7 d 的根系混合物的 RNA;泳道 3 和 4 为清水处理后 1 d, 3 d, 5 d 和 7 d 的根系混合物的 RNA;M 为 1 kb DNA Ladder.

图 1 棉花根系 RNA 的电泳检测

Fig. 1 The integrity of total cotton root RNA



注:M 为 1 kb Marker;a 表示以人类胎盘总 RNA 作为阳性对照的 LD-PCR;b 表示以 tester 的总 RNA 为模板进行 LD-PCR;泳道上方的数字表示 PCR 循环数。

图 2 LD-PCR 循环数梯度实验

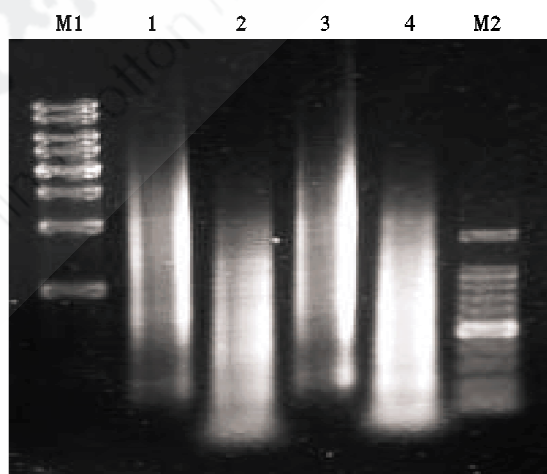
Fig. 2 Cycle gradient amplification of LD-PCR

2.3 SSH 文库的评价

差减效率是 SSH 技术的关键。以盐胁迫后的棉花根系混合物为实验方,以清水处理后的棉花根系混合物为驱动方进行差减杂交,杂交后的 cDNA 以通用引物 Primer 1 进行第一次 PCR 扩增,结果显示杂交后的 cDNA 的第一次 PCR 扩增产物的电泳条带比未杂交的 cDNA 的第一次 PCR 扩增产物电泳条带明显减弱(图 4),表明 2 次消减杂交效率很高。将第一次 PCR 产物稀释 10 倍后,取 1 μ L 作为模板,利用巢式引物进行第

2.2 cDNA 合成及酶切效果检测

根据 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 的说明书进行双链 cDNA 的合成。为了获得双链 cDNA 的最好扩增效果,在双链合成的 LD-PCR 过程中必须进行 PCR 循环数的优化,保证双链的扩增处于指数扩增时期。图 2 是 LD-PCR 循环数梯度的实验结果。可以看出,当循环数为 21 时,反应已经达到平台期,根据试剂盒要求,减去一个循环即为双链 cDNA 合成的最佳时期。20 个循环的扩增产物见图 3(泳道 1,3)。扩增的片段集中分布在 300~4000 bp,因此可以满足下一步的实验需要。另外,图 3 也展示了利用限制性内切酶 *Rsa* I 酶切的效果图(泳道 2,4)。可以看出,经过酶切以后双链 cDNA 的片段明显变小,主要集中在 100~2000 bp,说明酶切比较充分,达到了试剂盒的要求,可以用于下一步的接头连接反应。



注:M1 为 1 kb Marker;M2 为 100 bp Marker,泳道 1 和 2 分别为 tester 的 ds cDNA 及 *Rsa*I 酶切产物;泳道 3 和 4 分别为 driver 的 ds cDNA 及 *Rsa*I 酶切产物。

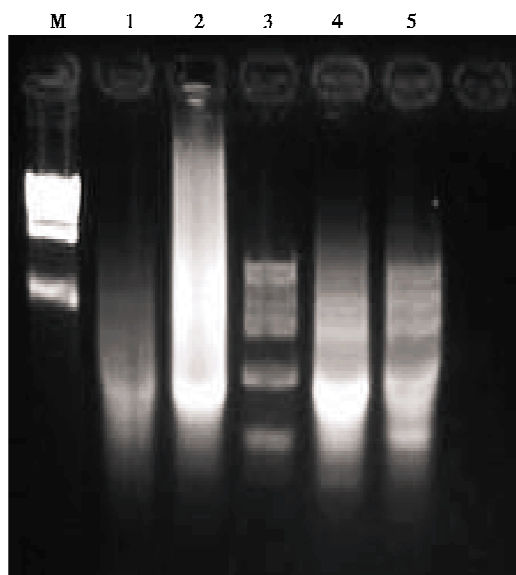
图 3 cDNA 合成与酶切质量检测

Fig. 3 Results of cDNA syntheses and *Rsa* I digested efficiency

二次 PCR 扩增,经检测可以看到电泳条带较第一次 PCR 产物明显变亮,而且特异性增强,条带分布范围较未差减样品明显下移,主要集中在 200~1200 bp,说明酶切、连接效率较好,抑制差减杂交效率较高(图 5)。

2.4 差异表达 cDNA 的 PCR 产物检测

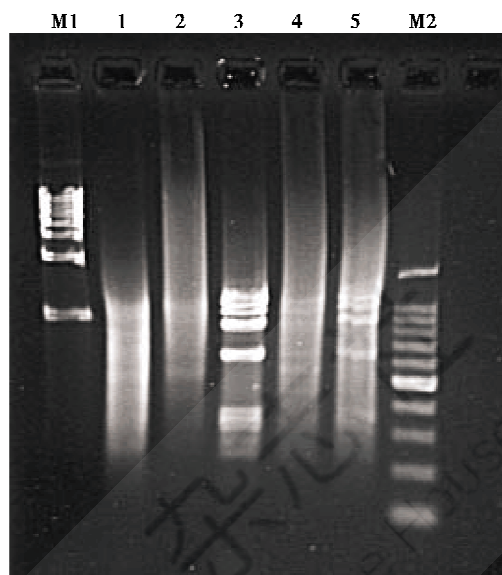
随机挑取阳性克隆进行菌落 PCR,检测插入片段大小,结果显示挑取的阳性克隆均能扩增出有效产物,其大小为 200~1200 bp,多数在 700 bp 左右,除去引物与所加接头的长度,实际插入的



注: M 为 1 kb Marker; 泳道 1, 差减产物第一次 PCR 扩增结果; 泳道 2, 未差减产物第一次 PCR 扩增结果; 泳道 3, 对照骨骼肌 cDNA(含有 λ X174/Hae III 片段) 差减产物第一次 PCR 扩增结果; 泳道 4, 对照骨骼肌 cDNA 未差减产物第一次 PCR 扩增结果; 泳道 5, 阳性 PCR 对照差减 cDNA 的第一次 PCR 扩增结果。

图 4 差减与未差减产物第一次 PCR 扩增结果

Fig. 4 First PCR products of subtracted and unsubtracted samples



注: M1 为 1 kb Marker; M2 为 100 bp Marker; 泳道 1, 差减产物第二次 PCR 扩增结果; 泳道 2, 未差减产物第二次 PCR 扩增结果; 泳道 3, 对照骨骼肌 cDNA(含有 λ X174/Hae III 片段) 差减产物第二次 PCR 扩增结果; 泳道 4, 对照骨骼肌 cDNA 未差减产物第二次 PCR 扩增结果; 泳道 5, 阳性 PCR 对照差减 cDNA 的第二次 PCR 扩增结果。

图 5 差减与未差减产物第二次 PCR 扩增结果

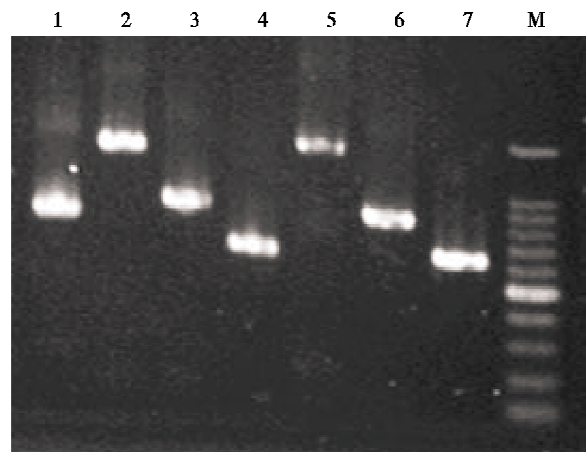
Fig. 5 Second PCR products of subtracted and unsubtracted samples

耐盐相关表达 cDNA 片段大小在 600 bp 左右(图 6)。

2.5 差异表达 cDNA 片段的序列分析

随机挑选 200 个重组子进行测序, 去除低质量序列后获得 197 条 EST, 最短的为 174 bp, 最长的为 897 bp, 片段平均长度为 568 bp。经序列聚类后得到 160 条非冗余 EST。经 Blast 比对后, 发现有 56 条(35%) unigene 获得功能注释, 42 条(26.2%) 与未知功能的序列同源性较高, 另有 62 条(38.8%) 未获得同源性匹配, 可能为新基因或者是序列较短的原因。在功能已知的序列中, 与抗逆直接相关的基因有 14 条, 占 8.8%, 为含量最多的一类基因, 包括逆境直接诱导蛋白如脱水蛋白、NBS-LRR 抗性蛋白和类 dirigent 植物蛋白, 以及影响植物抗逆性的蛋白酶类如半胱氨酸蛋白酶、过氧化物酶、环氧类胡萝卜素双加氧酶和 1-吡咯啉-5-羧酸合成酶等; 其次为参与新陈代谢和信号转导的基因, 分别有 11 条和 10 条, 占 6.9% 和 6.3%, 包括参与脂类代谢的脂肪酶、酮脂酰-CoA 还原酶和脂酰载体蛋白脱饱和酶等, 以及参与信号转导的 GTP 结合蛋白、丝氨酸-苏氨酸激酶和促分裂原活化蛋白激酶等; bZIP 转录因

子、富含 AT 结合因子、poly(A) 结合蛋白等参与转录调控的基因 8 条, 占 5.0%; 另外还包括转座酶 2 个, 泛素蛋白 2 个, 核糖体蛋白 1 个, 脱镁叶绿酸氧化酶 1 个; 有 7 个有明确比对结果的 unigene, 其参与的具体代谢反应未知; 部分同源性比对结果见表 1。



注: M 为 100 bp Marker; 泳道 1~7 为随机挑取的克隆。

图 6 差减 cDNA 文库插入片段的检测

Fig. 6 Identification of inserted fragments of the subtracted cDNA library

表 1 部分功能已知非冗余 EST 的分类结果

Table 1 Function classification of a part of the annotated unigenes according to BlastX

抗逆相关蛋白 克隆编号	长度	可能基因	种属	一致性	E 值
B5	504	脱水蛋白	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	89	3.00E-15
D6	377	类 dirigent 植物蛋白	<i>Gossypium barbadense</i>	99	0
A4	598	半胱氨酸蛋白酶	<i>Actinidia deliciosa</i>	84	3.00E-77
4c9	741	质膜内在蛋白	<i>Populus tremula</i>	89	2.00E-29
4c4	184	NBS-LRR 抗性蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	86	2.00E-38
4c3	628	IAA-Ala 水解酶	<i>Gossypium barbadense</i>	100	1.00E-159
G10	597	半胱氨酸蛋白酶	<i>Actinidia deliciosa</i>	84	7.00E-75
I5	495	液泡膜内在蛋白	<i>Arabidopsis thaliana</i>	84	2.00E-41
A5	622	过氧化物酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	98	0.00E+00
4b5	611	微管特异性分子伴侣	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86	2.00E-35
4b7	532	半胱氨酸蛋白酶	<i>Actinidia deliciosa</i>	84	2.00E-68
G4	726	环氧类胡萝卜素双加氧酶	<i>Citrus sinensis</i>	83	2.00E-20
4a10	337	1-吡咯啉-5-羧酸合成酶	<i>Vitis vinifera</i>	86	1.00E-16
4b8	631	类金属硫蛋白	<i>G. hirsutum</i>	92	1.00E-150
转录					
C1	797	bZIP 转录因子	<i>Capsicum annuum</i>	100	
D7	621	转座酶	<i>Listonella anguillarum</i>	100	2.00E-13
D9	527	转录因子(ANAC019)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	85	2.00E-28
E10	601	转座酶	<i>Listonella anguillarum</i>	100	2.00E-13
2A6	619	bZIP 转录因子	<i>Phaseolus vulgaris</i>	88	4.00E-64
3B4	434	富含 AT 结合因子	<i>Pisum sativum</i>	86	1.00E-17
3c2	364	poly(A)结合蛋白	<i>Cucumis sativus</i>	83	1.00E-16
3c4	274	核糖体 RNA 大亚基	<i>Cinnamomum camphora</i>	98	1.00E-126
信号转导					
B11	864	GTP 结合蛋白	<i>Capsicum annuum</i>	82	1.00E-134
B12	563	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酯酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	88	2.00E-22
E12	682	酪氨酸蛋白磷酸酯酶	<i>Lycopersicon esculentum</i>	86	4.00E-27
F11	628	磷脂酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	98	0.00E+00
G8	333	丝氨酸-苏氨酸激酶	<i>Nicotiana tabacum</i>	100	1.00E-13
H9	387	海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82	2.00E-18
I1	502	丝氨酸-苏氨酸激酶	<i>Nicotiana tabacum</i>	97	1.00E-11
2B6	705	蛋白激酶家族蛋白	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81	3.00E-93
2-E8	569	酪氨酸-丝氨酸-苏氨酸激酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	86	8.00E-13
4c5	688	促分裂原活化蛋白激酶 MAPK	<i>Prunus armeniaca</i>	81	1.00E-58
新陈代谢					
A3	630	脂肪酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80	1.00E-20
D5	568	酮脂酰-CoA 还原酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	96	0.00E+00
F2	443	琥珀酸脱氢酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83	2.00E-40
G2	697	半乳糖苷合成酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83	3.00E-37
G3	569	硬脂酰-酰基载体蛋白脱饱和酶	<i>G. hirsutum</i>	91	1.00E-101
2B10	488	脂酰载体蛋白	<i>C. glauca</i>	89	1.00E-35
2C7	785	类聚半乳糖醛酸酶	<i>Fragaria x ananassa</i>	82	2.00E-48
2G5	632	乙醇脱氢酶	<i>Solanum tuberosum</i>	83	1.00E-106
3b10	181	尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶	<i>Glycine max</i>	93	2.00E-13
3c8	377	辅酶 2 依赖性的苹果酸蛋白	<i>Ricinus communis</i>	84	9.00E-61
4c1	400	糖蛋白	<i>Solanum tuberosum</i>	86	9.00E-18

3 讨论

研究构建了 SSH-cDNA 文库,与普通 cDNA 文库相比,SSH 文库在富集差异表达基因等方面具有明显的优越性^[9]。对随机挑选的 200 个阳性克隆进行测序,得到的 EST 的同源序列涉及到大量已经报道过的参与植物逆境胁迫反应的基因,

说明所构建的文库对于富集差异表达相关基因的优势是比较明显的。

本研究所获得的 EST 中,经与其同源序列比对,既有在逆境胁迫反应中直接起作用的蛋白质,又有参与信号转导或基因表达调控的物质,说明棉花的盐胁迫反应是一个多基因参与的系统调控过程。盐分胁迫和水分胁迫之间存在不可分割的

关系,盐分胁迫导致外界渗透势变化,即渗透胁迫^[10]。在本研究中发现了大量直接参与渗透胁迫的基因,如参与渗透调节物质脯氨酸合成中的关键酶——1-吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)。在紫花苜蓿、豌豆、拟南芥、水稻中的研究表明:盐处理或干旱条件下 P5CS 基因转录水平有很大程度的提高,并最终导致了脯氨酸含量的增加^[11]。已知脯氨酸是最有效的渗透调节物质之一,植物通过脯氨酸的累积来维持细胞渗透势,从而提高耐盐性。另外,本研究还富集到了大量的半胱氨酸蛋白酶基因。沈法富等报道,棉花半胱氨酸蛋白酶基因与棉花的衰老和细胞程序性死亡有关^[12]。因此,作者推测盐胁迫在一定程度上诱导了细胞的程序性死亡。本研究还富集到了一些氧化酶类如过氧化物酶(POD),氧化酶类通过去除活性氧,保护细胞膜、叶绿体膜、线粒体膜,在一定程度上减缓渗透胁迫对植物造成的伤害,从而提高植物的抗逆性。在比对的序列中还发现了质膜内在蛋白和液泡膜内在蛋白,由于各种逆境对植物的最大伤害就是损坏膜结构,因此逆境条件下植物通过诱导合成膜蛋白,以维持细胞膜结构、功能稳定性;同时还获得一个与微管特异性分子伴侣高度同源的序列,由于胁迫能导致蛋白质的变性,推测微管特异性分子伴侣的主要作用是防止微管蛋白的进一步变性。

目前已发现的与植物耐盐性相关的信号传导途径有:SOS 信号途径^[13-17], Ca^{2+} 及钙调素信号途径^[16],蛋白激酶、蛋白磷酸酶途径^[18]等。研究富集到 10 个参与信号转导的基因,其中大部分为丝氨酸-苏氨酸激酶家族成员,如促分裂原活化蛋白激酶(MAPK),说明棉花在盐胁迫诱导下其细胞信号传导的主要途径是 MAPK 级联途径。还获得了一些与基因表达调控相关的 EST 序列,如 bZIP 类转录因子,已知 bZip 蛋白可以特异性地结合 ABA 诱导基因的启动子区域的 ABRE 序列(ABA responsive element, ABA 反应元件),从而开始脱水胁迫下 ABA 诱导基因的转录^[19-20]。

另外,本研究还富集到大量与新陈代谢相关的 EST 序列,如参与脂类代谢的脂肪酶、酮脂酰-CoA 还原酶和脂酰载体蛋白脱饱和酶等,以及参与呼吸作用的乙醇脱氢酶、琥珀酸脱氢酶和苹果酸蛋白等。这说明在盐胁迫条件下,植物中有许多基因被诱导表达,产生多种功能各异的产物,涉及植物的光合作用、碳和能量代谢、细胞壁和细

胞膜的结构组成、水通道、离子运输、信号传导、分子伴侣、转录调控因子等^[21]。这些产物不仅是植物对胁迫条件的反应,而且其中很多物质与植物的抗胁迫密切相关,说明植物的耐盐性是由多种基因控制的综合反应,是一种数量性状。这也是目前通过基因工程使单功能基因在转化植株中过量表达并不足以显著提高植株的抗逆性的原因之一。目前,本实验室正在对其它克隆进行测序,以发掘更多的与耐盐相关的 EST,进一步对一些重要的功能基因克隆其全长并进行功能验证。

参考文献:

- [1] WOOD A J, Saneoka H, Rhodes D, et al. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum [J]. *Plant Physiology*, 1996, 110(4): 1301-1308.
- [2] DEROCHER E J, Bohnert H J. Development and environmental stress employ different mechanisms in the expression of plant gene family [J]. *Plant Cell*, 1993, 11(5): 1611-1625.
- [3] DIATACHENKO L, Lau Y F C, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030.
- [4] 夏卓盛, 吴跃明, 李新伟, 等. 紫花苜蓿铝胁迫抑制消减文库的构建和初步分析[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15 (5): 805-809.
XIA Zhuo-sheng, WU Yue-ming, Li Xin-wei, et al. Construction and primary analysis of alfalfa suppression subtractive library influenced by aluminum stress [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15 (5): 805-809.
- [5] 蔡勤安, 王玉成, 董玉芝, 等. 干旱胁迫下白花柽柳抑制性消减文库的构建与分析[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15 (2): 354-355.
CAI Qin-an, Wang Yu-cheng, Dong Yu-zhi, et al. Construction and analysis of *Tamarix albiflorum* suppression subtractive hybridization library under drought stress [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15 (2): 354-355.
- [6] 朱龙付, 涂礼莉, 张献龙, 等. 黄萎病菌诱导的海岛棉抗病反应的 SSH 文库构建及分析[J]. *遗传学报*, 2005, 32 (5): 528-532.
ZHU Long-fu, Tu Li-li, Zhang Xian-long, et al. Construction and analysis of SSH library of *Gossypium barbadense* upon infection with *Verticillium dahl-*

- iae* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32 (5): 528-532.
- [7] 王省芬, 田海燕, 马峙英, 等. 黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种 SSH 文库的构建[J]. *棉花学报*, 2008, 20 (1): 3-8.
WANG Xing-fen, Tian Hai-yan, Ma Zhi-ying, et al. SSH library construction of upland cotton resistant cultivar under the stress of *Verticillium dahliae* [J]. *Cotton Science*, 2008, 20(1): 3-8.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 518-521.
SAMBROOK J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 518-521.
- [9] 骆 蒙, 孔秀英, 刘 越, 等. 小麦抗病基因表达谱中的文库构建与筛选方法研究[J]. *遗传学报*, 2002, 9 (9): 814-819.
LUO Meng, Kong Xiu-ying, Liu Yue, et al. cDNA libraries construction and screening in gene expression profiling of disease resistance in Wheat [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 9(9): 814-819.
- [10] HASEGAWA P M, Bressan R A, Zhu Jian-kang, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 51: 463-499.
- [11] 崔润丽, 刁现民. 植物耐盐相关基因克隆与转化研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(8): 25-30.
CUI Run-li, Diao Xian-min. Advances on cloning and translation of the salt tolerance genes in plant [J]. *Progress in Biotechnology*, 2005, 25(8): 25-30.
- [12] 沈法富, 喻树迅, 韩秀兰, 等. 棉花半胱氨酸蛋白酶基因的克隆和表达特性分析 [J]. *科学通报*, 2004, 49 (22): 2318-2323.
SHEN Fa-fu, Yu Shu-xun, Han Xiu-lan, et al. Cloning and expression of cysteine proteinase in cotton [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49 (22): 2318-2323.
- [13] ZHU Jian-kang. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 941-948.
- [14] SHI Hua-zhong, Xiong Li-ming, Stevenson B, et al. The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for Vitamin B6 in plant salt tolerance [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 575-588.
- [15] SHI Hua-zhong, Zhu Jian-kang. *SOS4*, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 585-593.
- [16] SHI Hua-zhong, Kim Y S, Guo Yan, et al. The *Arabidopsis* *SOS5* locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 19-32.
- [17] KLEE C B, Draetta G F, Hubbard M J. Calcineurin [J]. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1988, 61: 149-200.
- [18] ZHANG Shu-qun, Lessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling [J]. *TRENDS in Plant Sci*, 2001, 6(11): 520-527.
- [19] GIRAUDAT J, Parcy F, Bertauche N, et al. Current advance in abscisic acid action and signaling [J]. *Plant Mol Boil*, 1994, 26(5): 1557-1577.
- [20] SHEN B, Jensen R G, Bohnert H J. Increase resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1177-1153.
- [21] WINICOV I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants [J]. *AnnBot*, 1998, 82: 703-710. ●