

# 水稻籼爪重组自交系 PEG 胁迫 早期基因差异表达分析

樊庆鲁<sup>1,2</sup>, 肖国樱<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 长沙 410125; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 把从籼爪重组自交系中筛选出的最耐旱材料(47-274)和最敏感材料(47-299)在五叶一心时用 20% PEG 处理 6 h, 取叶片进行 mRNA 差异显示分析, 获得 10 个差异表达的 cDNA 片段。利用反式 Northern 斑点杂交法去除 6 个假阳性片段, 对 4 个阳性片段(DT-DF1、DT-DF2、DT-DF3、DT-DF4)测序后进行同源性分析, 发现 DT-DF3 的蛋白产物与核酸结合位点和富亮氨酸重复结构域类蛋白 B 高度同源, DT-DF2 与 L-乳酸氧化酶部分序列有同源性, DT-DF1 没有找到同源蛋白质序列, DT-DF4 与一个假设蛋白高度同源。

**关键词:** 水稻; 籼爪重组自交系; PEG; 干旱胁迫; 差异表达基因

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)04-0538-06

## Differentially expressed gene of *indica*/ *javanica* recombinant inbred line in rice at early stage of PEG stress

FAN Qing-Lu<sup>1,2</sup>, XIAO Guo-Ying<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The drought tolerant line and drought sensitive line screened from the population of *indica*/*javanica* recombinant inbred line were stressed with 20% PEG (Polyethyleneglycol) for 6 h at five-leaf stage of rice. Ten of cDNA fragments were isolated by mRNA differentially display reverse transcription PCR (DDRT-PCR), but only four fragments were approved truth by reverse Northern dot blotting. These fragments named as DT-DF1, DT-DF2, DT-DF3 and DT-DF4 were sequenced and then analyzed by Blast program. The putative protein of DT-DF3 was highly homologous with NBS-LRR-like protein B and that of DT-DF2 was homologous with L-lactate oxidase. The putative protein of DT-DF1 was not found homologous protein, and that of DT-DF4 was highly homologous with a hypothetical protein.

**Key words:** rice; *indica*/*javanica* recombinant inbred line; PEG; drought stress; differentially expressed gene

中国是一个水资源短缺的国家, 全球每年平均降水量 800 mm, 中国仅为 630 mm, 比全球的平均数约少 20%。中国人均水资源占有量仅为 2 400 m<sup>3</sup>, 是世界人均占有量的 1/4, 被联合国列为 13 个贫水国之一(邱福林等, 2000; 廖显辉, 2002)。干旱

在我国普遍发生, 每年由于缺水造成国民经济损失达 2 000 多亿元(邓楠, 1999)。据气象专家预测, 到 2050 年前, 我国将处于一个大范围干旱频数显著增多的时期。干旱缺水是 21 世纪我国面临的最严重的问题之一(章基嘉等, 1990)。

收稿日期: 2008-09-14 修回日期: 2009-06-09

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD77B03); 中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX1-YW-03)[Supported by National Key Technology Research and Development Program(2007BAD77B03); Key Project of Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences(KSCX1-YW-03)]

作者简介: 樊庆鲁(1980-), 男, 山东郓城人, 在读硕士研究生, 主要从事水稻耐旱性研究, (E-mail) fanqinglu2007@126.com.

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: xiaoguoying@isa.ac.cn)

干旱是影响植物生长发育最主要的逆境因子, 在过去十几年里植物逆境应答基因的功能及表达调控受到广泛重视并得到深入的研究。利用 mRNA 差别显示技术已成功分离出水稻抗铝、抗盐、抗病、耐淹涝、抗低温、抗紫外线等多种逆境响应基因(张立平等, 1997; 董海涛等, 1998; 周建明等, 1999; Li 等, 1999; 黄旭等, 2000; 丁秀英等, 2001; 曾建敏等, 2003; Watanabe 等, 2004; 陈永华等, 2006; 赵莉等, 2006; Liu 等, 2006; Tyagi & Chandra, 2006)。但利用 mRNA 差别显示技术分离水稻耐旱基因的报道很少, Tyagi & Chandra(2006)对基因型为 N22 的耐干旱水稻及其对照进行差异显示研究, 得到一个差异显示 cDNA 片段, Northern blotting 验证表明这一片段与干旱胁迫有关, 数据库对比发现该片段与编码 DI 蛋白的 psbA 基因同源。本研究对从籼爪重组自交系群体中筛选出的最耐旱材料(47-274)和最敏感材料(47-299)进行干旱早期差异表达基因分析, 以期揭示耐旱机理提供信息、为耐旱基因的进一步利用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料处理与取材

以 20% 的 PEG-6000 作渗透介质在芽期从水稻籼型光温敏核不育系准 S(43S)/爪哇稻改良品系 770 的重组自交系群体“准 7RIL”(270 个株系)中筛选出 8 个耐旱株系和 42 个敏感株系(樊庆鲁等, 2008), 把筛选出的材料经过苗期反复干旱后筛选出最耐旱的株系 47-274 和干旱最敏感的株系 47-299 供本实验使用。

取耐旱株系 47-274 和敏感株系 47-299 的种子进行水培, 待材料长到五叶一心时, 用 20% PEG-6000(渗透势为 -5.9 bar)水溶液处理 6 h, 取叶片放于 -70 °C 冰箱里保存备用。

### 1.2 总 RNA 提取与反转录

总 RNA 使用 TRIZOL 试剂盒(Invitrogen 公司)提取, 反转录锚定引物由上海 Sangon 公司合成。引物编号及序列为 M1: 5'-TTTTTTTTTTTCG-3'; M2: 5'-TTTTTTTTTTTAC-3'; M3: 5'-TTTTTTT TTTTGA-3'; M4: 5'-TTTTTTTTTTTGC-3'。使用反转录试剂盒(Fermentas 公司)进行反转录。

### 1.3 反转录产物的 PCR 扩增

反转录产物的 PCR 扩增使用与反转录相同的

锚定引物和 10 个随机引物组成的引物对进行。随机引物由上海 Sangon 公司合成, 引物编号及序列为 S1: 5'-TCGGGGCATC-3'; S2: 5'-CTGAGGTC-CT-3'; S3: 5'-CTACGGCTGC-3'; S4: 5'-AGCAG-GTGA-3'; S5: 5'-ACTGCCCGAC-3'; S6: 5'-CCCCTCAGAA-3'; S7: 5'-CTGGTGCTGA-3'; S8: 5'-TGGAGAGCAG-3'; S9: 5'-ACAACGCCTC-3'; S10: 5'-GAACACTGGG-3'。PCR 反应体积为 20  $\mu$ L, 包括反转录产物 2  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 2  $\mu$ L, 锚定引物 1  $\mu$ L(100 ng/ $\mu$ L), 随机引物 1  $\mu$ L(100 ng/ $\mu$ L), dNTP 1  $\mu$ L(各 2.5 mmol/L), Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L(2.5 U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 12.5  $\mu$ L。PCR 反应程序为 94 °C 5 min, (94 °C 1 min-40 °C 1 min-72 °C 1 min) $\times$ 40, 72 °C 延长 8 min。

### 1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染

PCR 扩增产物在 10% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳 3 h(电压为 800 V), 凝胶的制备与银染参照陈永华等(2006)所用的方法进行。

### 1.5 差异片段的回收、重扩增

利用煮沸法(李拥军等, 2005)从凝胶上回收差异表达片段, 用相同引物对回收产物进行 PCR 重扩增。重扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒(TaKaRa 公司)回收纯化, 用于反式 Northern 斑点杂交及克隆测序。

### 1.6 差异片段的反式 Northern 斑点杂交

在两张尼龙膜的相同位置上样 2  $\mu$ L 同一差异片段回收产物, 80 °C 真空烘烤 2 h 固定后作为杂交受体。将 PEG 处理 6 h 的耐旱材料和敏感材料的 RNA 分别反转录后用地高辛 DNA 随机标记试剂盒(深圳依诺金公司)对其进行标记。杂交信号检测使用地高辛化学显色杂交检测试剂盒(深圳依诺金公司)。

### 1.7 阳性片段的克隆测序

将反式 Northern 斑点杂交检测为阳性的片段与 pMD18-T 载体(大连宝生物)1  $\mu$ L 连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株。把通过氨苄青霉素筛选和质粒 PCR 鉴定为阳性的克隆接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基上培养, 取 1.5 mL 菌液送上海 Sangon 公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 PEG 处理后差异表达基因分析

40 对引物扩增产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,

回收后共得到4个差异表达片段。其中4个见图1。

### 2.2 反式 Northern 斑点杂交结果

对获得的10个差异显示片段纯化后进行反式 Northern 斑点杂交鉴定,得到4个阳性片段。图2表示在两张尼龙膜的相同位置上样2 μL 相同的电泳回收后的纯化产物,A膜与干旱敏感材料(47-

299)PEG处理6h标记探针进行杂交,B膜与耐旱材料(47-274)PEG处理6h的cDNA标记探针进行杂交。A膜无信号,B膜出现4个信号,表明这4个片段受干旱胁迫诱导表达且只存在于耐旱株系中,4个阳性片段分别命名为DT-DF1、DT-DF2、DT-DF3和DT-DF4。

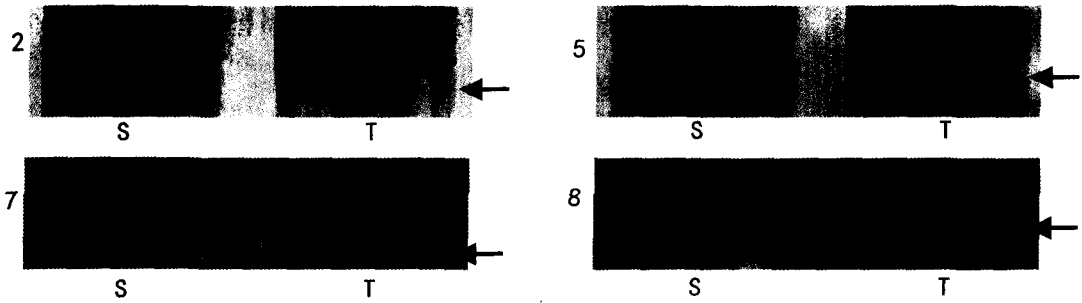


图1 差异显示结果

Fig. 1 The result of DDRT-PCR

S;敏感材料; T;耐旱材料,箭头所示为差异表达片段

S;Drought sensitive plant; T;Drought tolerant plant. The arrow marks the differential expressive band

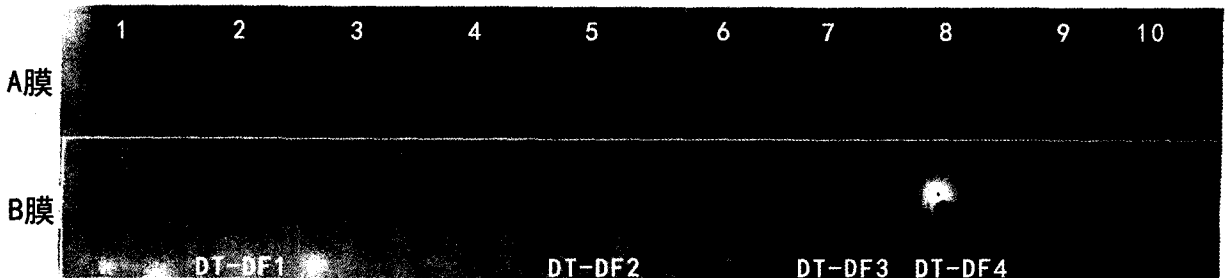


图2 反式 Northern 斑点杂交结果

Fig. 2 The result of reverse Northern dot blotting

A膜与干旱敏感材料用PEG处理6h叶片的cDNA标记探针杂交;B膜与耐旱材料用PEG处理6h的叶片cDNA标记探针杂交。DT-DF1、DT-DF2、DT-DF3、DT-DF4为4个阳性片段。

### 2.3 阳性片段的测序结果

对4个阳性片段进行克隆测序,测序结果如图3。

### 2.4 序列分析及相似性比较

克隆的4个cDNA片段序列用Blast程序进行同源性分析,发现它们位于水稻不同染色体上,核苷酸相似性至少达到98%,说明它们确实是水稻基因组的序列(表1)。

DT-DF1的高度同源序列位于水稻第3号染色体上,Blast X查询无相应蛋白序列与其推导蛋白产物同源,推测其为新的基因片段。

DT-DF2位于水稻第6号染色体上且与水稻Os06g0133800 mRNA序列(登录号:NM\_

001063246.1)高度同源,其推导的蛋白质产物与L-乳酸氧化酶(登录号:MGAS6180)部分同源,但相似性不高(27%)。

DT-DF3的高度同源序列位于水稻第11号染色体上且与水稻NL-A,NL-B,NL-C和NL-D基因序列(登录号:AY518220.1)高度同源,其推导的蛋白质产物与NBS-LRR-like protein B(登录号:AAR99708.1)有99%的同源性。

DT-DF4的高度同源序列位于水稻第2号染色体上,且与水稻Os02g0557700 mRNA序列(登录号:NM\_001053676.1)高度同源,其推导的蛋白质产物与假设蛋白OsL\_007525(登录号:EAY86292.1)有99%

**DT-DF1:** CACGCTAGCTAGCTACTCGATCCACTTCATTATTACTTATCTTGTCTTCTCTCATATAATCTTGCTGCTAATTA  
TTTCTTCCATATAATTAATCCCTATATATATGTATATATACTCGATCGTACTATATTTGTATACATCATCAATTACTTG  
TAACCTCAATTAATCCTAGCTACATCGAAGAGGCAGGCGCCCTAGTTAGTTTTCCCTGTACTAGAAGCTAGTTAATTT  
CCTCTATGGAGTGTTATTATGAGTTGATTGAGTCGGGCAGTA (274 bp)。

**DT-DF2:** CGGGGCATCACCGCGGAGAACGTCATCGCAACAGCAAAGAGCCTGTAAGATTCAAACCGCGCTTTTGAGTTT  
TTGTCATCGTTGATGCCAAGGAACAGTATACATGAAGCCATGAAGTCTTGTGCCCAAAGCTTGGAAATAATGAAGGGA  
GAGGGATGCCTGCATTGGAGCGTGAGTGGATTTTTAGGCCTGTAATAAGCACTGCTTTTCCATTTACGTTTGT  
TGGATCACTCCTTAGATGATTCATCAAGTTGAGCCTGATTCAATTGGG (277 bp)。

**DT-DF3:** AGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTACAACGCCTCAACATGCCTCAAATTGGGGCAGACATTTACACGCAGC  
TCTCTCACTTGGGGAAGGTTGGAGATCCTCTCCAGGCCTTCGCATCCTTCAACTAAAAGGCAACCAGAGAGGAATGGGA  
GGTCTCCACCGTCTTCAAGCAACTTGTGTATCTTATCGAGAACTCCTTCAAGTTGGTGGCCTGCTGTCCAAGCTGTGG  
TGGGAGAGCCCTCAGCTTGGGGCAGTTCAAAGTTCCAACCTTGTCAAACAAGGCAGCAGCCACGACGACCTTGGAGTT  
GGAGACAGGGCTTCTTCCCCTTTGGCTTCGAAGCAGCAGTCCATCCTCTCCCCTTCTTGGCTGCTGCAGCTGCTTCC  
TCTCCTGCACCTTCTTCTTCTTCAACAAAGGACCCTTCCCAGTTGGGCATATCCTCGATGATCAACAATTCAAG  
CTTGGGGAAAGCAATTGTCTCTGTGGATCTGAGATTACCTCCCAGGAGCCAACGAATTCGGGTCCAATCTTGGTGATT  
GAACCTTGCTCCCTAATTTTCAAGTATTTCAAGTTTGGTATCTGTCCGATTGGTGGAAAGCTGCAAGCAGGATTTGCAA  
TCTGTGAGTTTCAAATATGTCAAGTAAAGATAATTGGGAAGTACTAAGCCAGGTGGGGAATCTACAACAAAGGAAAT  
CCCAACAAAAGATCTTCTAAGTTGTGTGGAGGCGTTGAACCTGCTTGGACGAGGCGTTGTAATCTCTAGAGGATCCCC  
GGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATCCACACAA  
CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG (934 bp)。

**DT-DF4:** ATCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGATTGAACACTGGGACCCCAAGGCAGCTACGATGATACTAAGCCTTGGC  
CTAGACGACAATGGCTCACGCTACCGTATGATGCTGTAGCAAATCTATATGCCGAATCAATCTCTGATGTATTGAG  
TTGTAGTCTTAACCTTGAAGTGTGTGCAACATTATGTTGTAGTTAGATCGAATCGACAGTGCCTAATGGCTGTA  
GCTGTGCGTACTGCTGGTTCGCTATCTCACAGTGATTCTGTACCGTATATTGATGATGATGAACTGTGAATGG  
GCAAAAAAAAAAAAAAAAAATCGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC (345 bp)。

图 3 DT-DF1、DT-DF2、DT-DF3 和 DT-DF4 阳性片段克隆测序结果

表 1 DDRT-PCR 法分离的 cDNA 特征

Table 1 Characteristics of the cDNAs isolated by DDRT-PCR

cDNA 克隆 cDNA clone	引物组合 Primer pair	染色体 Chro- mosome	同源核苷酸/序列号 Nucleic acid identity/ Accession No.	核苷酸相 似性 (%) Similarity of nucleic acid	同源蛋白质/序列号 Amino acid identity/ Accession No.	蛋白质 相似性 Similarity of amino acid (%)
DT-DF1	M1/S9	3	Os03g0857900/NM_001058493.1	98	No significant similarity found	--
DT-DF2	M2/S3	6	Os06g0133800/NM_001063246.1	100	L-lactate oxidase/AAX71442.1	27
DT-DF3	M2/S4	11	NL-A, NL-B, NL-C, and NL-D genes/AY518220.1	99	NBS-LRR-like protein B/ AAR99708.1	99
DT-DF4	M4/S7	2	mRNA Os02g0557700/NM_001053676.1	100	hypothetical protein OsI_007525 [ <i>Oryza sativa</i> (indica cultivar- group)/EAY86292.1	99

的同源性,其功能有待进一步的研究证明。

### 3 讨论

由于 mRNA 差异显示技术具有快速、灵敏、简单、可同时分析多个材料和所需起始材料量低等优点(陈永华等,2005),自 1992 年创立以来,很快成为研究基因表达以及克隆新基因的重要技术(谢晓东等,2003;孟凡荣等,2005;张海英等,2005)。目前,国内大多实验室都采用常规的银染法,该方法的缺点是银染时间太长。我们实验室采用的快速银染法只需 30 min,本实验和陈永华等(2006)的研究均证

明可以取得较好的实验效果。

对 DT-DF2 进行 Blast X 比较,发现与 L-乳酸氧化酶的部分序列同源。乳酸氧化酶能催化乳酸氧化成丙酮酸,主要是在微生物和动物体内发现,植物中的菠菜乙醇酸氧化酶属于乳酸氧化酶蛋白家族中的一个成员(谷劲松等,2003)。乙醇酸氧化酶是植物光呼吸过程中的关键酶之一,可以催化乙醇酸氧化成乙醛酸(晋剑锋等,2002)。推测 DT-DF2 可能与水分胁迫时光呼吸过程的某些生理生化过程有关,但由于只有 27% 的蛋白质相似性,这种推测还有待进一步证实。

DT-DF3 位于水稻基因组的第 11 号染色体上,

对 DT-DF3 进行 Blast X 比较发现与核酸结合位点 (Nucleotide binding site, NBS) 和富亮氨酸重复结构域 (Leucine-rich repeat, LRR) 类蛋白 B 高度同源。NBS-LRR 类蛋白是植物中最多的一类抗病基因编码的蛋白, NBS-LRR 类基因编码的 NBS 结构域具有保守的基序, NBS 结构域可能参与了抗病信号的传递 (Ellis 等, 2000)。郭继虎等 (2003) 以小麦旱选 10 号为材料, 利用 DDRT-PCR 技术研究了种子芽期水分胁迫处理和对照材料在 mRNA 表达上的差异, 找到与编码 LEA 蛋白的 *Em* 基因同源的基因, 说明小麦芽期对水分胁迫的应答方式之一也是积累 LEA 蛋白, 还有一个与热胁迫有关的 EST 序列。从转录水平上证明了植物对水分胁迫与热胁迫应答的相似性。郭宾会等 (2003) 以小麦幼苗为材料, 对经过用 16% PEG 溶液处理不同时间而诱导表达的小麦基因进行分离, 在 GenBank 查询发现 11 个 cDNA 片段分别与小麦、大麦、高粱等在旱、盐、冷、病胁迫及 ABA 处理诱导表达的已知序列有较高的同源性, 说明植物在受到水分胁迫时产生的应答与在受到其它逆境胁迫的应答有内在的相关性, 即植物的交叉适应现象。

本研究通过 DDRT-PCR 的方法分离得到了 4 个差异条带, 是水稻受到干旱胁迫产生应激反应的基因表达情况或者是在植株受到干旱后启动特异或相应的基因进行表达来抵御外界胁迫。这些片段中有通过同源比较后可以推测其功能的基因序列, 也有功能未知的基因, 这些基因有的可能直接参与了水稻耐旱的信号传递过程, 有的则可能与信号传递后水稻相应的生理生化变化过程有关, 对这些基因的克隆和功能分析将有助于从分子水平了解水稻对干旱抗性的信号传导过程及其生理生化变化, 为探讨水稻耐旱机理并通过分子育种培育耐旱的水稻新品种做出贡献。

## 参考文献:

- 邓楠. 1999. 制定《农业科技发展纲要》推动农业科技革命[J]. 中国农业科技导报, 2: 3-8
- 廖显辉. 2002. 话说“节水农业”[J]. 农业考古, 1: 44-47
- 邱福林, 张伟平. 2000. 水分胁迫对水稻生长影响的研究进展[J]. 垦殖与稻作, 2: 7-13
- Chen YH(陈永华), Yan QQ(严钦泉), Yu JP(余建蒲), et al. 2005. Research progress on mRNA differentially display technology(mRNA 差异显示技术的研究进展)[J]. Acta Agric Boreal-Occident Sin(西北农业学报), 2: 9-12
- Chen YH(陈永华), Zhao S(赵森), Yan QQ(严钦泉), et al. 2006. Studies on genes related to submergence tolerant using differential display technique in rice(利用差异显示法研究水稻耐淹涝相关基因)[J]. J Agric Biotech(农业生物技术学报), 14(6): 894-898
- Ding XY(丁秀英), Zhang J(张军), Cui X(崔霞), et al. 2001. Studies on resistance gene expression by IPT inducing under low temperature stress in root of rice seedling(低温胁迫下 IPT 诱导水稻幼苗根中的 RNA 差别显示分析)[J]. Acta Agron Sin(作物学报), 27(6): 935-940
- Dong HT(董海涛), Wu YL(吴玉良), Cheng ZQ(程志强), et al. 1998. Molecular cloning of differentially expressed genes with kinase motif induced by *Xanthomonas oryzae* cv. *Oryzae*(差异显示法克隆水稻抗白叶枯病相关蛋白激酶基因)[J]. J Zhejiang Agric Univ(浙江农业大学学报), 24(5): 548-552
- Ellis J, Dodds P, Pryor T. 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes[J]. Curr Opin Plant Biol, 3(4): 278-284
- Fan QL(樊庆鲁), Guo JY(郭加沅), Xiao GY(肖国樱). 2009. Studies on drought tolerance of *indica/javanica* recombinant inbred line at germinating stage in rice(水稻籼爪重组自交系群体芽期耐旱性鉴定)[J]. Guihaia(广西植物), 29(1): 74-77
- Gu JS(谷劲松), Xu X(徐霞), Song X(宋欣). 2003. Research progress on lactate oxidase(乳酸氧化酶研究进展)[J]. Chin Biotech(中国生物工程杂志), 23(5): 36-41
- Guo BH(郭宾会), Gao SC(高双成), Jing RL(景蕊莲), et al. 2003. Studies on the differential expression cDNA induced by water-stressed in wheat seedling stage(小麦苗期水分胁迫诱导差异表达 cDNA 的研究)[J]. Biotech Bull(生物技术通报), 2: 40-44
- Guo JH(郭继虎), Jing RL(景蕊莲), Wang JS(王金胜). 2003. Differential display of mRNA induced by water stress in germinating wheat (*Triticum aestivum*)(小麦种子水分胁迫萌发的基因差异表达)[J]. J Shaanxi Agric Univ(山西农业大学学报), 23(1): 23-27
- Huang X(黄旭), Gong ZZ(龚葵葵), Xu ZY(徐竹筠), et al. 2000. Isolation of related cDNA clone resistant to blast of rice by mRNA differential display(mRNA 差异显示法分离水稻抗稻瘟病相关 cDNA 克隆)[J]. Jiangsu J Agric Sci(江苏农业学报), 16(2): 124-126
- Jin JF(晋剑锋), Tang TW(谭天伟), Su GF(苏国富). 2002. Cloning and expression of spinach glycolate oxidase in *Escherichia coli*(菠菜乙醇酸氧化酶基因的克隆及表达)[J]. Chin J Biotech(生物工程学报), 18(2): 212-215
- Li YJ(李拥军), Ao H(敖红), Sun GJ(孙桂金). 2005. Comparison of different methods in recovering special bands in mRNA differential display(mRNA 差异显示技术中特异条带回收方法的比较)[J]. Biotechnology(生物技术), 15(3): 43-44
- Li ZY, Chen SY. 1999. Inducible expression of translation elongation factor 1A gene in rice seedlings in response to environmental stresses[J]. Acta Bot Sin, 41(8): 800-806
- Liu D, Zhang X, Cheng Y, et al. 2006. rHsp90 gene expression in response to several environmental stresses in rice(*Oryza sativa*) [J]. Plant Physiol Biochem, 44(5-6): 380-386
- Meng FR(孟凡荣), Ni ZF(倪中福), Wu LM(吴利民), et al. 2005. Differential gene expression between reciprocal cross-fer-

- tilized kernels and their parents during the early stages of seed development in wheat(不同优势小麦正反杂交种子与亲本自交种子发育前期基因表达差异)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **31**(1):119-123
- Tyagi A, Chandra A. 2006. Isolation of stress responsive *Psb A* gene from rice(*Oryza sativa* L.) using differential display [J]. *Indian J Biochem Biophys*, **43**(4):244-246
- Watanabe H, Saigusa M, Hase S, et al. 2004. Cloning of cDNA encoding an ETR2-like protein(Os-ERL1) from deep water rice (*Oryza sativa* L.) and increase in its mRNA level by submergence, ethylene, and gibberellin treatments[J]. *J Exp Bot*, **55**(399):1 145-1 148
- Xie XD(谢晓东), Ni ZF(倪中福), Meng FR(孟凡荣), et al. 2003. Relationship between differences of gene expression in early developing seeds of hybrid versus parents and heterosis in wheat(小麦杂交种与亲本发育早期种子的基因表达差异及其与杂种优势关系的初步研究)[J]. *J Genet Genom*(遗传学报), **30**(3):260-266
- Zeng JM(曾建敏), Lin WX(林文雄), Liang KJ(梁康迺), et al. 2003. Molecular responses of rice(*Oryza sativa*) to the stress of lowly enhanced UV-B radiation(水稻对低剂量 UV-B 辐射胁迫的分子应答研究)[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **14**(6):941-944
- Zhang JJ(章基嘉), Zhou SG(周曙光). 1990. Major climatic disasters in China and their impact on agricultural production(我国的主要气候灾害及其对农业生产的影响)[J]. *J Nanjing Inst of Meteor*(南京气象学院学报), **13**(3):259-264
- Zhang HY(张海英), Liu Y(刘勇), Liu DC(刘冬成), et al. 2005. Identification of the genes related to resistant to *Magnaporthe grisea* using differential display technique in rice(差异显示法分离水稻抗稻瘟病相关基因)[J]. *J Genet Genom*(遗传学报), **32**(7):719-725
- Zhang LP(张立平), Wu P(吴平), Zhu JM(祝金明), et al. 1997. The expressive difference of inductive gene by aluminium in rice by differential display(利用 DD-PCR 技术分析水稻铝诱导基因的表达差异)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **30**(5):71-74
- Zhao L(赵莉), Deng XL(邓晓玲), Jia XL(贾显禄). 2006. mRNA differential expression of rice induced by elicitor from *Magnaporthe grisea*(稻瘟病激发子诱导的水稻叶片 mRNA 差别表达研究)[J]. *Mol Plant Breeding*(分子植物育种), **4**(4):535-539
- Zhou JM(周建明), Zhu Q(朱群), Bai YY(白永延). 1999. Cloning and sequencing of cDNA fragment of early responsive gene of rice induced by blast fungus *Magnaporthe grisea*(稻瘟病菌侵染诱导的水稻早期反应基因的 cDNA 片段克隆与序列分析)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **25**(2):115-120

( 上接第 520 页 Continue from page 520 )

1999. Effect of different fertilizing methods on the absorption and translocation of iron in apple trees(施肥方式对苹果吸收、运输铁的影响)[J]. *J Fruit Sci*(果树科学), **16**(1):1-3
- Yang QQ(杨青芹), Xue JJ(薛进军), Wang XR(王秀茹), et al. 2001. Mechanism of iron fertilizer by root-inserted to correcting chlorosis of fruit(铁肥根系输液矫正苹果缺铁失绿症机理)[J]. *Plant Nutr Fert Sci*(植物营养与肥料学报), **7**(4):435-440
- Zhou W(周卫), Lin B(林葆). 2002. Study on pathways of Ca<sup>2+</sup> movement in young fruit tissue of apple and its regulation by hormones(苹果幼果组织钙运输途径与激素调控)[J]. *Plant Nutr Fert Sci*(植物营养与肥料学报), **6**(2):214-219
- Bramlage WJ, Weis SA, Drake M. 1990. Observation on the relationships among seed number, fruit calcium, and senescent breakdown in apples[J]. *Hort Sci*, **25**:351-353
- Cline JA, Haiuon EJ. 1992. Relative humidity around apple fruit influences its accumulation of calcium[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, **117**(4):542-546
- Fallahi E, Righetti TL, Richardson DG. 1985. Predictions of quality by preharvest fruit and leaf mineral analyses in 'Starkspur Golden Delicious' apple[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, **110**:524-527
- Huang XM, Wang HC, Zhong WL, et al. 2008. Spraying calcium is not an effective way to increase structural calcium in litchi pericarp[J]. *Sci Hort*, **117**(1):39-44
- Johnson DS, Ridout MS. 1998. Prediction of storage quality of 'Cox's Orange Pippin' apples from nutritional and meteorological data using multiple regression models selected by cross validation[J]. *J Hort Sci Biotech*, **73**:622-630
- Moon BW, Lu WJ, Zheng HL, et al. 2002a. Effects of tree-spry of liquid calcium compounds on calcium contents, quality, and cell wall structure change of "Jingfen" pear fruits[J]. *J Kores Soc Hort Sci*, **43**(4):51-53
- Moon BW, Kang IK, Lee YC, et al. 2002b. Effects of tree-spry of liquid calcium compounds on the changes in cell wall components, cell wall hydrolases, and cell wall structure during cold storage of non-astringent persimmon fruits[J]. *J Kores Soc Hort Sci*, **43**(4):443-446
- Perring MA. 1984. Redistribution of minerals in apple fruit during storage; preliminary investigations with the variety Spartan[J]. *J Sci Food Agric*, **35**:182-190
- Perring MA, Person K. 1987. Redistribution of minerals in apple fruit during storage, the effect of storage atmosphere on calcium concentration[J]. *J Sci Food Agric*, **40**:37-42
- Wojcik P. 2001. Dabrowicka prune fruit quality as influenced by calcium spraying[J]. *J Plant Nutri*, **24**(8):1 229-1 241