

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20140485

白桦 *BpHO* 基因非生物胁迫及信号诱导的表达模式分析

周 珊 李思达 董 恒 詹亚光 曾凡锁

(东北林业大学生命科学学院)

摘要: 血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是一种普遍存在的敏感的和高活性的血红素分解代谢过程中的限速酶。本文揭示了白桦 *BpHO* 在非生物胁迫及信号诱导调控的表达特征,为该基因在白桦中代谢调控功能的研究奠定基础。通过前期研究获得了白桦 HO 基因,命名为 *BpHO*,应用生物信息学软件分析了白桦 *BpHO* 基因的分子结构特征,利用重金属镉(Cd)、盐(NaCl)以及4℃低温进行非生物胁迫处理,利用硝普钠(SNP)和水杨酸(SA)进行信号诱导,分析 *BpHO* 的表达特征。生物信息学分析表明该基因全长855 bp,含有完整的开放读码框,编码284个氨基酸(Genebank 登录号:KJ197335)。*BpHO* 为不稳定类疏水性蛋白,不存在信号肽,也不具有跨膜能力, α -螺旋、延伸链、无规则卷曲分布于整个蛋白。分子进化分析结果表明,白桦 *BpHO* 基因与葡萄的遗传距离较近,说明二者亲缘关系较近;与大豆、菜豆、豌豆的遗传距离较远,说明其亲缘关系较远。非生物胁迫结果表明,*BpHO* 基因的表达水平随非生物胁迫处理时间的不同而上下波动,但在处理6 h后 *BpHO* 基因对4种非生物胁迫处理都上调表达,说明 *BpHO* 基因对非生物胁迫具有响应。信号诱导结果表明,外源 NO 调节了 *BpHO* 基因的转录表达,调控血红素加氧酶的合成。SA也参与了 *BpHO* 基因的信号调控。盐、低温、重金属镉胁迫均能促进 *BpHO* 的表达,但响应模式不同。

关键词: 白桦;*BpHO*;生物信息学分析;非生物胁迫

中图分类号: S718.46;S792.153;Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2015)11-0069-07

ZHOU Shan; LI Si-da; DONG Heng; ZHAN Ya-guang; ZENG Fan-suo. **Analysis of the expression patterns of *BpHO* gene induced by abiotic stress and signal in birch.** *Journal of Beijing Forestry University* (2015)37(11) 69-75 [Ch,24 ref.]

College of Life science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China;

Heme oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme in the process of heme catabolism which is ubiquitous, sensitive, and highly active. This paper reveals the *BpHO* expression pattern in signal induction and regulation of secondary metabolism, in an attempt to lay the foundation for the study of gene function in metabolic regulation of birch. In our previous research, the HO gene has been cloned from birch (*Betula platyphylla*), named *BpHO*. The molecular structure of *BpHO* was analyzed by bioinformatics software. Abiotic stress by cadmium (Cd), salt (NaCl) and low temperature (4℃), and signal induced by sodium nitroprusside (SNP) and salicylic acid (SA) were used in the study. The expression patterns of *BpHO* induced by abiotic and signal induction were analyzed. Bioinformatics analysis showed that *BpHO* is 855 bp, and contains the complete ORF, encoding 284 amino acids (Genebank ID:KJ197335). *BpHO* is an unstable hydrophobic protein, which does not possess signal peptide and the transmembrane ability either. The alpha helix, extension chain and random coil are distributed throughout the protein. Molecular evolution analysis results showed that the genetic distance of *BpHO* gene between birch and grape species is relatively close. The gene heredity distance is farther with soybean, Kidney bean and pea, explaining the far genetic relationship with them. Abiotic stress results indicated that *BpHO* gene expression levels varied with abiotic stress time with fluctuations, but after 6 h

收稿日期:2014-12-05 修回日期:2015-10-11

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572014DA04)、国家自然科学基金项目(J1210053、31200463)、黑龙江省博士后启动基金项目(LBH-Q12166)。

第一作者:周珊。主要研究方向:植物基因工程。Email:zhoushanleo@163.com 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路26号东北林业大学生命科学学院。

责任作者:曾凡锁,副教授。主要研究方向:林木遗传育种和生物技术。Email:zengfansuo@126.com 地址:同上。

treatment *BpHO* gene for four abiotic stress treatments were up-regulated, indicating *BpHO* genes are responsive to abiotic stresses. The results suggest that the signal induced by exogenous NO regulates transcription expression of *BpHO* and the synthesis of heme oxygenase. Salicylic acid is also involved in expression of *BpHO*. Salt, low temperature, heavy metal, and cadmium stress can promote the expression of *BpHO*, while the response patterns differ.

Key words *Betula platyphylla*; *BpHO*; bioinformatics analysis; abiotic stress

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是一种普遍存在的敏感的和高活性的血红素分解代谢过程中的限速酶,主要代谢产生哺乳动物体内的一氧化碳(CO)、铁(Fe^{2+})、胆绿素(BV)。HO有3种类型:HO-1、HO-2、HO-3,其中HO-1为氧应激诱导型,HO-2和HO-3为组成型^[1-6]。相关HO基因已经在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、苜蓿(*Medicago sativa*)和小麦(*Triticum aestivum*)等中被证明。例如,拟南芥中有4个基因编码HO,在光敏色素的生物合成中起到重要的作用^[1-2]。研究表明,HO-1或其催化产物CO参与植物对盐胁迫、重金属、紫外线辐射、程序性细胞死亡的响应,以及气孔运动和不定根发育^[1-4];同时也可以被细胞接触剂,如生长因子、促炎细胞因子、细菌内毒素、一氧化氮(NO)和肿瘤启动子等诱导^[6]。

镉(Cd)是一种植物非必须的有毒的重金属,能够诱导植物细胞程序性死亡(PCD)^[7]。镉容易被植物吸收,产生各种毒性症状,如萎黄、萎蔫、生长减少和细胞死亡^[8]。镉的毒性可以归因于许多生理过程,例如减少在细胞间隙和叶绿体的数目,抑制叶绿素合成和光合作用,生成游离的恶化自由基和活性氧^[9]。水杨酸(SA),植物生长调节器,是一个重要的信号分子,影响植物许多生理过程,如种子发芽、产热、果实成熟、衰老等,SA还介导植物响应许多生物和非生物胁迫,如寒冷、高盐、以及重金属过量;SA还可以通过激活的致病相关基因的表达,诱导植物防御细菌或病毒病原体^[7,10-11]。

白桦(*Betula platyphylla*),桦木科(Betuleae)桦木属,落叶乔木,雌雄同株,生命力强,产于中国东北、华北等地。白桦具有极高的药用价值,其树叶和树皮中含有次生代谢产物白桦三萜,具有清热利湿,祛痰止咳,解毒消肿,抗癌等药理活性^[7,12]。本文分析白桦*BpHO*的基因序列,研究在重金属镉、低温(4℃)、盐的非生物胁迫下该基因的表达模式,利用NO供体硝普钠(SNP)和水杨酸对*BpHO*进行处理,观察信号诱导下*BpHO*的表达模式,以揭示*BpHO*在非生物胁迫和信号诱导下的表达特征。

1 材料与方法

1.1 材料

本文所用材料为白桦组培苗及悬浮细胞。

1.2 方法

白桦无菌苗由本试验室保存并采用组织培养法在WPM固体培养基中継代及扩繁。分别用50 μmol/L的镉(Cd)、200 mmol/L的盐(NaCl)以及4℃的低温对白桦组培苗进行非生物胁迫,每个处理均重复3次。分别于处理后6、12、24、48、96 h取样。分别测量对照组和处理组的表达量,用处理组的测量结果减去对照组的测量结果,若为正数说明表达水平上调,反之说明表达水平下调。

硝普钠(SNP)为一种NO供体,分解后产生NO;亚铁氰化钾(potassium ferrocyanide, KFeCN)为SNP的类似物,其分解产物与SNP相同,但分解后不提供NO;cPTIO为NO专一性猝灭剂,可消除SNP分解后产生的NO^[7-8,13-15]。使用NT液体培养基对白桦茎段细胞进行悬浮培养,培养基中加入激素0.01 mg/L TDZ和0.1 mg/L 6-BA,将上述培养的白桦茎段细胞分别进行SNP(1 mol/L)和水杨酸(50 mmol/L)处理,加入后开始计时,分别于6、12、24、48、72 h取样^[7]。对白桦悬浮细胞分别用SNP(1 mol/L)、KFeCN(1 mol/L)、cPTIO + SNP(150 mmol/L)处理12 h,分析白桦悬浮细胞中HO基因表达水平在信号诱导下的变化^[7]。RNA的提取以及荧光定量试验方法参照文献^[7]进行操作。

利用在线分析软件Protparam^[16]分析*BpHO*氨基酸序列的理化性质。利用在线分析软件ProtScale^[16]的Kyte and Doolittle算法分析*BpHO*蛋白亲水/疏水性。利用在线分析工具SignalP^[17]的神经网络算法对*BpHO*蛋白进行预测并分析*BpHO*蛋白的信号肽。利用在线工具TMPred^[18]预测和分析*BpHO*蛋白的跨膜结构。应用GOR4^[19]分析*BpHO*蛋白的二级结构。利用NCBI数据库对*BpHO*基因序列以及推测的编码蛋白进行同源序列比对^[7]。应用PRALINE在线多序列比对软件分析对*BpHO*推测的编码蛋白以及上述物种中的同源蛋白,进行同源序列比对分析。利用MEGA 5.0软件,应用Neighbor-Joining算法构建系统进化树^[20]。

2 结果与分析

2.1 氨基酸理化性质分析

前期研究克隆了白桦 *BpHO* 全长基因 855 bp, 编码 284 个氨基酸, 含有完整的开放读码框, 并已上传至 NCBI, 登录号: KJ197335。分析 *BpHO* 理化性质, 其蛋白等电点 (pI) 为 5.04; 不稳定系数为 42.31, 为不稳定类蛋白 (不稳定系数大于 40 时, 预测蛋白质为不稳定蛋白, 反之则为稳定蛋白); 总平均疏水性为 0.773, 说明该蛋白为疏水性蛋白。蛋白质亲疏水性氨基酸的组成是蛋白质折叠的主要驱动力, 通过亲水性预测可以反映蛋白质的折叠情况^[21] (> 0.5 区域为疏水区, < -0.5 区域为亲水区, 介于 +0.5 ~ -0.5 之间主要为两性区域)。结果表明 (图 1), *BpHO* 蛋白共有 855 个疏水区, 4 个亲水区域。

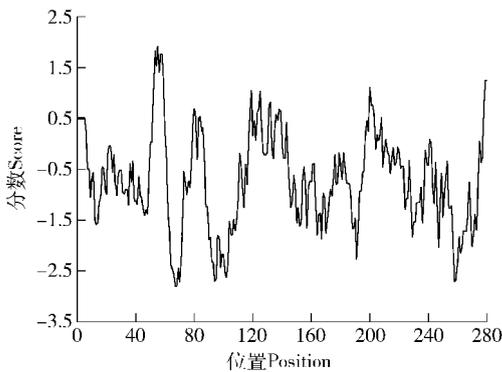


图 1 白桦 *BpHO* 基因的亲水/疏水性分析

Fig. 1 Analysis of hydrophilic /hydrophobic *BpHO* gene in birch

2.2 信号肽及跨膜结构域的预测和分析

信号肽是 N 端的一段氨基酸序列, 一般由 16 ~ 26 个氨基酸残基组成, 指导分泌性蛋白到内质网膜上合成, 在蛋白质合成结束之前被切除, 其中包括疏水核心区、信号肽的 C 端和 N 端^[7,21]。结果表明,

BpHO 蛋白不存在信号肽。

跨膜结构是一段氨基酸片段, 一般由 20 个左右的疏水性氨基酸残基组成, 主要形成 α -螺旋^[21]。图 2 表明, *BpHO* 蛋白既没有从外到内的跨膜能力, 也没有从内到外的跨膜能力。

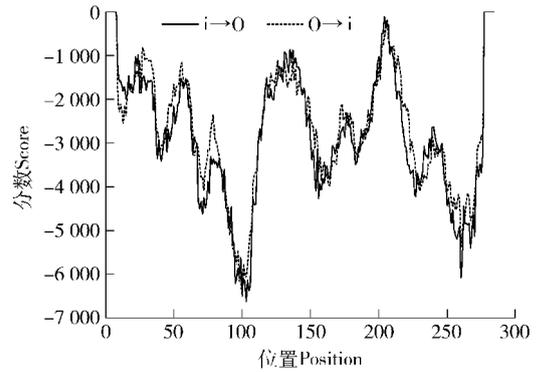


图 2 白桦 *BpHO* 蛋白跨膜结构域预测和分析

Fig. 2 Prediction and analysis of *BpHO* protein transmembrane domain in birch

2.3 蛋白质二级结构域的预测与分析

BpHO 蛋白是由 45.07% 的 α -螺旋 (Alpha helix)、9.86% 的延伸链 (Extended strand) 和 45.07% 的无规则卷曲 (Random coil) 所组成的, 并且分布于整个蛋白 (图 3)。由此可知, *BpHO* 蛋白较不稳定, 为不稳定蛋白。

2.4 氨基酸序列比对及系统进化树构建

对 *BpHO* 氨基酸序列进行同源序列比对并构建系统进化树 (图 4)。Blast X 比对结果如表 1 所示。获得的 *BpHO* 蛋白序列, 与毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、大豆、葡萄 (*Vitis vinifera*)、可可 (*Theobroma cacao*)、甜橙 (*Citrus sinensis*) 和蓖麻 (*Ricinus communis*) 等物种中的同源蛋白序列相比具有很高的保守性。

表 1 *HO* 基因序列与其他物种同源比对

Tab. 1 *HO* gene sequence homology with other species

种名 Species	登录号 Accession No.	比对得分 Alignment score	与 <i>BpHO</i> 蛋白的一致性 Consistency with <i>BpHO</i> protein/%
碧桃 <i>Prunus persica</i>	XM_007202348.1	806	84
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	XM_002285156.1	729	83
可可 <i>Theobroma cacao</i>	XM_007013383.1	770	83
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	XM_006475777.1	736	82
草莓 <i>Fragaria vesca</i>	XM_004287271.1	681	82
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	XM_002324619.2	659	81
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	XM_002524448.1	650	81
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	XM_004150814.1	673	80
大豆 <i>Glycine max</i>	XM_003522859.2	618	80
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	XM_007138250.1	596	79
豌豆 <i>Pisum sativum</i>	AF276228.1	560	78

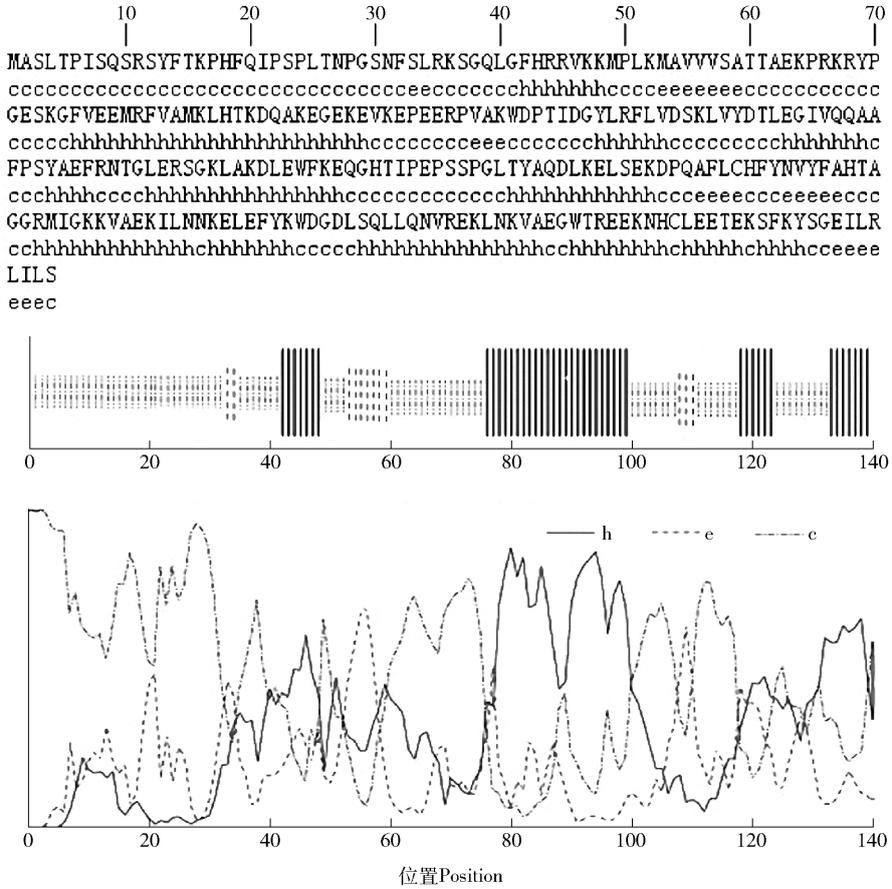


图 3 白桦 BpHO 蛋白二级结构预测

Fig. 3 Prediction of secondary structure of BpHO protein in birch

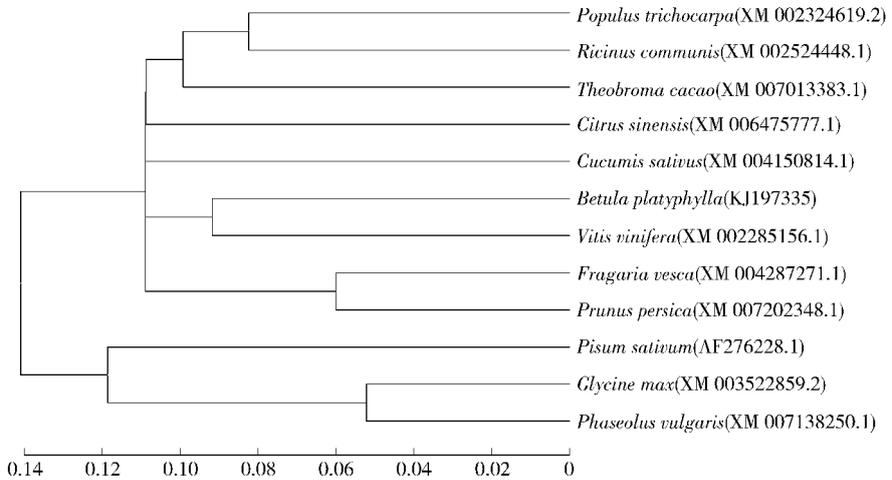


图 4 白桦 BpHO 基因系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of BpHO gene

系统进化树是物种的进化史,通过构建系统进化树可以根据这些物种的祖先描述它们的进化关系^[7]。结果表明(图 4), 12 条蛋白序列大致分为 2 个大类: 其中毛果杨、蓖麻、可可、甜橙、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、碧桃 (*Prunus persica*)、草莓 (*Fragaria vesca*)、葡萄和白桦聚成一个大类, 豌豆 (*Pisum sativum*)、大豆和菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 聚

成一类。白桦 BpHO 蛋白与葡萄的遗传距离较近说明有着较近的亲缘关系; 与大豆、菜豆、豌豆等的遗传距离较远, 说明其亲缘关系较远。

2.5 BpHO 在白桦中的表达模式

2.5.1 非生物胁迫下 BpHO 在白桦中的表达

非生物胁迫下 BpHO 基因的表达水平随处理时间的不同而上下波动(图 5), 但在处理 6 h 后 BpHO

基因对 3 种非生物胁迫处理都上调表达,说明 *BpHO* 基因对非生物胁迫具有响应。镉处理结果表明在处理 6 和 48 h 上调表达,而在处理 24 和 96 h 时下调表达,在处理 12 h 后表达量与对照几乎一致。低温处理表达结果表明,处理 6 和 48 h 上调表达,其余时间下调表达。而 NaCl 处理只有在 12 h 下调表达,其他时间都为上调表达。所有的处理都是在 48 h 时,表达量最高。说明 *BpHO* 对非生物胁迫有响应,而对不同的胁迫方式的响应模式不同。

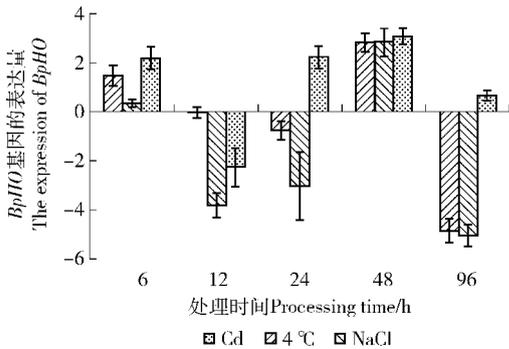


图 5 白桦 *BpHO* 基因在非生物胁迫下的表达

Fig. 5 Expression of *BpHO* under abiotic stress in birch

2.5.2 信号诱导下 *BpHO* 在白桦中的表达

SNP 处理 6 h 后,HO 的表达量达到最大值,约为最低值 24 h 的 4 倍;12 h 的表达量较 6 h 有所降低,但仍高于 24 h,约为 24 h 的 1.5 倍;48 h 的表达量仅次于 6 h 处理的悬浮细胞,约为最低值 24 h 的 2 倍;72 h 处理材料中的 HO 表达量与 48 h 基本相同,与对照相比所有处理的 *BpHO* 表达量均有所提高(图 6)。因此,SNP 能够影响白桦中 *BpHO* 基因的表达,初步说明外源 NO 影响了血红素加氧酶的合成。

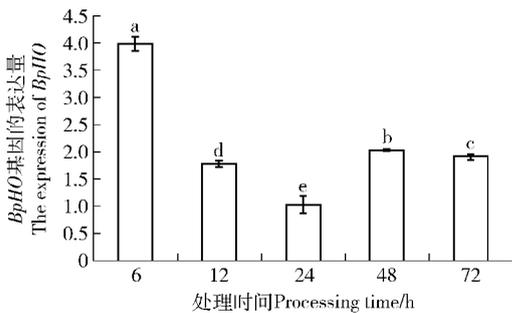


图 6 *BpHO* 在 SNP 处理后的表达

Fig. 6 Expression of *BpHO* after SNP treatment

为了确定是否为外源 NO 导致 *BpHO* 基因表达水平的变化。本研究又用 SNP、KFeCN、cPTIO + SNP 处理白桦茎段细胞 12 h,分析白桦茎段细胞中 *BpHO* 基因表达水平的变化^[7]。结果表明(图 7),白桦 *BpHO* 基因的表达量在 SNP 处理组中要高于

KFeCN 及 cPTIO + SNP 处理组。这组实验证实了 *BpHO* 基因的转录表达可以被外源 NO 调节,外源 NO 可以调控血红素加氧酶的合成。

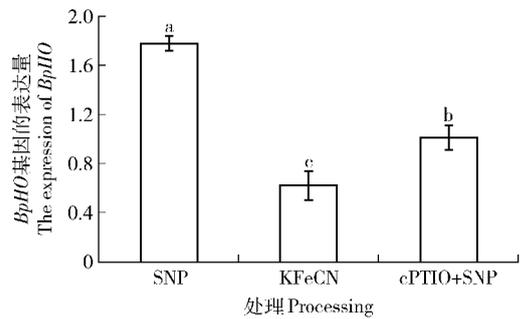


图 7 白桦 *BpHO* 基因在 SNP、KFeCN、cPTIO + SNP 处理后的表达

Fig. 7 Expression of *BpHO* after SNP, KFeCN and cPTIO + SNP

水杨酸(SA)作为一种植物生长调节剂,参与植物体内多种代谢产物的调控^[7,10]。我们对白桦进行水杨酸处理,用来确定水杨酸对白桦 *BpHO* 表达的影响。由结果可以看出(图 8),处理 6 h 的材料,表达量明显升高,约为对照的 2 倍,但在处理 12 h 后表达量急剧减少,处理 24 h 后表达量又开始上调约为对照组的 3 倍,但在处理 48 h 后表达量明显降低,96 h 处理的材料与对照相比基本不变。综上所述可知,SA 参与了 *BpHO* 基因的信号调控。

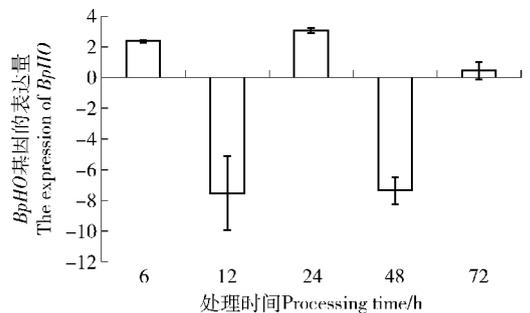


图 8 白桦 *BpHO* 基因在水杨酸作用下的表达模式

Fig. 8 Expression pattern of *BpHO* after salicylic acid treatment in birch

3 讨论与结论

一氧化碳(CO)是对流层中最重要的反应性的微量气体;自 17 世纪以来,CO 一直被称为一种有毒气体;然而,在过去的几年中,已经有大量证据表明 CO 的炎症反应是一个显著调制器,影响细胞增殖以及细胞因子和生长因子产生的过程^[6]。在动物中,一氧化碳(CO),主要是由血红素加氧酶(HO)合成,HO 已被证实参与许多信号和细胞毒剂生理和免疫过程^[2]。许多在动物身上发现的 HO 基因或相应的蛋白质,已经确定来自不同植物物种,包括拟南芥属、大豆、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、苜蓿、水稻 (*Oryza sativa*)、玉

米(*Zea mays*)、高粱(*Sorghum moench*)等^[3]。已有多种证据表明,在动物和植物,HO的表达是由多种应激诱导的刺激,包括缺氧,盐胁迫,重金属,紫外线辐射和NO等。因此无论是在动物还是植物中,HO蛋白或相应基因的生物功能被认为与抵抗氧化应激和细胞应激有关,使其具有基本适应性和防御反应^[3]。

非生物胁迫是限制植物生长及产量的全球性问题。经过长期的自然选择,植物逐渐进化出一套完整的适应非生物胁迫的能力^[2]。例如盐是一种主要的非生物胁迫因子,在盐条件下,钠离子通过非选择性阳离子通道和高亲和力 K^+ 转运进入根部表皮细胞。这样的带电 Na^+ 离子能够使质膜去极化,导致 K^+ 立即通过去极化活化的外向整流 K^+ (KOR)通道泄漏。这耗尽细胞内 K^+ ,损害细胞的新陈代谢并可能导致盐水条件下细胞程序性死亡。因此,离子平衡的维护是植物抵御盐胁迫的重要因素。^[7,14-15,22-23]。已有研究表明,低剂量的NaCl诱导血红素加氧酶的形成,但加入CO后,上述反应发生抑制^[2]。这与我们的结果类似(图5),除12h的处理外,所有NaCl处理的白桦细胞,*BpHO*基因都上调表达;推测12h处理后*BpHO*基因下调表达的原因可能是,6h盐胁迫处理后,*BpHO*基因上调表达,代谢产生CO抑制了*BpHO*基因的表达。Cao等^[2]的结果表明,在低渗胁迫和盐胁迫的拟南芥幼苗,HO基因在根组织中显著表达。因此,可以进一步推断血红素加氧酶可能参与植物耐受非生物胁迫。Bose等^[23]的研究表明,血红素加氧酶通过增加膜电位复极化的速率防止 K^+ 的损失;同时血红素加氧酶上调 H^+ -ATP酶的活性,从而导致更高的速率的膜电位复极化和盐胁迫期间实现更好的保留 K^+ 。但在转录水平的盐诱导增加的 H^+ -ATP酶的表达,还需要进一步的研究来揭示这一过程的具体细节,这项工作强调的血红素加氧酶在盐胁迫期间具有保留 K^+ 和排斥 Na^+ 的有益作用,因此血红素加氧酶能在今后的育种中有针对性地施加于耐盐作物。

能够诱导植物对逆境反应的抗逆信号分子:水杨酸(SA)和一氧化氮(NO),是公认的植物防御细胞凋亡的信号分子。研究表明,NO与SA共同参与植物的生理反应^[10,15,24];同时,NO可以诱导血红素加氧酶的合成^[7]。我们的结果显示(图6),随着处理时间的延长,植物*BpHO*基因的表达量上下波动,在12h时*BpHO*基因表达量达到最低值,但是在处理24h后*BpHO*基因的表达量有所升高,这种表达机制还不清楚。研究表明,当加入CO或BR时,可

以抑制SA诱导*BpHO*的产生^[1];这与我们的结果类似(图8)。SA能够诱导*BpHO*基因活性,但在SA处理12和48h的材料中,*BpHO*基因表达量下降,推测*BpHO*基因代谢分解产生CO和BR,抑制了*BpHO*基因的表达。Cui等^[1]的结果表明,血红素加氧酶对SA的诱导缓解氧化应激和镉的毒性引起的镉应力具有益效果;事实上,血红素加氧酶的这种细胞保护活动可能是它的酶促反应的催化的产物。同时药理学证据表明,SA可能是上一个线性信号传导途径中的氧化应激的过程,以此来减轻镉的毒性^[1]。我们的结果也证实了镉胁迫,可以提高*BpHO*基因的表达(图5)。

综上所述,本研究证实了重金属镉、低温、盐胁迫等非生物胁迫可以诱导*BpHO*基因表达,初步说明血红素加氧酶参与植物耐受非生物胁迫。外源信号水杨酸和一氧化氮均能够促进HO的合成,说明HO基因对信号诱导和次生代谢调控响应明显。本研究为进一步研究HO在木本植物中的表达和生物学功能提供了依据,同时为深入研究*BpHO*基因响应非生物胁迫和信号诱导奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] CUI W, LI L, GAO Z, et al. Haem oxygenase-1 is involved in salicylic acid-induced alleviation of oxidative stress due to cadmium stress in *Medicago sativa* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5521-5534.
- [2] CAO Z, GENG B, XU S, et al. BnHO1, a haem oxygenase-1 gene from *Brassica napus*, is required for salinity and osmotic stress-induced lateral root formation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(13): 4675-4689.
- [3] WU M, HUANG J, XU S, et al. Haem oxygenase delays programmed cell death in wheat aleurone layers by modulation of hydrogen peroxide metabolism [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(1): 235-248.
- [4] BAUDOIN E, FREND O P, LE GLEUHER M, et al. A *Medicago sativa* haem oxygenase gene is preferentially expressed in root nodules [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(394): 43-47.
- [5] SHEKHAWAT G S, VERMA K. Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(9): 2255-2270.
- [6] XUAN W, ZHU F Y, XU S, et al. The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(2): 881-893.
- [7] 周姗,孙丰坤,姜涛,等. 白桦*BpNOS*基因的生物信息及表达模式分析[J]. *中草药*, 2015, 46(8): 1203-1208.
ZHOU S, SUN F K, JIANG T, et al. Bioinformatics and expression pattern analysis of *BpNOS* gene in *Betula platyphylla* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, 46(8): 1203-1208.

- [8] CUI Y, XU G, WANG M, et al. Expression of OsMSR3 in *Arabidopsis* enhances tolerance to cadmium stress[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2013, 113(2):331-340.
- [9] MA L J, LI X M, BU N, et al. An alginate-derived oligosaccharide enhanced wheat tolerance to cadmium stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, 62(1):71-76.
- [10] KHURANA A, KUMR R, BABBAR S B. Nitric oxide is involved in salicylic acid-induced flowering of *Lemna aquinoctialis* Welw [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(10):2827-2833.
- [11] FENG H Q, GUAN D D, BAI J Y, et al. Extracellular ATP alleviates the salicylic acid-induced inhibition of cell viability and respiration through a Ca^{2+} -dependent mechanism [J]. *Biologia Plantarum*, 2015, 59(1):193-197.
- [12] 尹静, 詹亚光, 肖佳雷. 白桦三萜的合成和调控[J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(5):520-526.
YIN J, ZHAN Y G, XIAO J L. Synthesis and regulation of triterpene from *Betula platyphylla* Suk [J]. *Plant Physiology Communications*, 2009, 45(5):520-526.
- [13] XU Y, SUN X, JIN J, et al. Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(7):512-518.
- [14] 郑春芳, 姜东, 戴廷波, 等. 外源一氧化氮供体硝普钠浸种对盐胁迫下小麦幼苗碳氮代谢及抗氧化系统的影响[J]. *生态学报*, 2010, 30(5):1174-1183.
ZHENG C F, JIANG D, DAI Y B, et al. Effects nitroprusside, a nitric oxide donor, on carbon and nitrogen metabolism and the activity of the antioxidation system in wheat seedlings under salt stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(5):1174-1183.
- [15] 孙德智, 何淑平, 彭靖, 等. 水杨酸和硝普钠对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生长及生理特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(3):541-546.
SUN D Z, HE S P, PENG J, et al. Effects of salicylic acid and sodium nitroprusside on tomato seedling growth and physiological characteristics under NaCl stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33(3):541-546.
- [16] JOHN M W. The proteomics protocols handbook [M]. Totowa: Humana Press, 2005: 571-607.
- [17] THOMAS N P, SOREN B, GUNNAR H. SignalP 4. 0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10):785-786.
- [18] HOFMANN K, STOFFEL W. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments[M]. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1993, 374:166.
- [19] SEN T Z, JERNIGAN R L, GARNIER J, et al. GOR V server for protein secondary structure prediction [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21:2787-2788.
- [20] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [21] 梁楠松, 周姗, 李蕾蕾, 等. 小黑杨 bHLH 转录因子基因和启动子的克隆与分析[J]. *经济林研究*, 2013, 31(4):58-66.
LIANG N S, ZHOU S, LI L L, et al. Cloning and analysis of bHLH transcription factor genes and promoters in *Populus × xiaohei* T. S. Hwang et Liang [J]. *Nonwood Forest Research*, 2013, 31(4):58-66.
- [22] ZHAO M G, TIAN Q Y, ZHANG W H. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(1):206-217.
- [23] BOSE J, XIE Y, SHEN W, et al. Haem oxygenase modifies salinity tolerance in *Arabidopsis* by controlling K^+ retention via regulation of the plasma membrane H^+ -ATPase and by altering SOS1 transcript levels in roots [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(2):471-481.
- [24] 张庆雨, 刘芳春, 段可, 等. 水杨酸对草莓炭疽病响应基因 FaNBS20 表达的影响[J]. *园艺学报*, 2014, 41(1):53-62.
ZHANG Q Y, LIU F C, DUAN K, et al. Effects of salicylic acid on the expression of FaNBS20 gene responsive to *Colletotrichum gloeosporioides* infection in *Fragaria × ananassa* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(1):53-62

(责任编辑 赵 勃
责任编辑委 卢孟柱)