

研究报告 Original Papers

耐盐杂草稻3个锌指蛋白基因家族的实时定量分析

张丽丽, 孙健, 马殿荣, 陈温福*

沈阳农业大学水稻研究所, 农业部北方作物生理生态重点开放实验室, 辽宁省北方粳稻遗传育种重点实验室, 沈阳 110866

摘要: 利用在300余份来源于辽宁、吉林、黑龙江、内蒙古、江苏等地的杂草稻材料中筛选出耐高盐杂草稻材料WR03-12。通过RT-PCR的方法得到盐胁迫下WR03-12与盐敏感栽培稻‘越光’幼苗的cDNA第一链, 对3个锌指蛋白基因家族的6个基因表达情况进行了荧光实时定量分析。结果表明, 2个C₂C₂型锌指蛋白基因SRZ1与SRZ2受到高盐胁迫的负向诱导, WR03-12受负向诱导程度要小于‘越光’; 2个TFIIIA型锌指蛋白基因ZFP18与ZFP245受到盐胁迫的正向诱导, WR03-12受诱导程度也小于‘越光’; 具有A20锌指结构的基因AACZ1基因在越光中不受盐诱导, 而在WR03-12中受短时间诱导后, 第7天已经恢复到胁迫前水平。具有AN1锌指结构的基因AACZ2在‘越光’与WR03-12中均不受盐胁迫诱导, 且表达水平没有显著差别。杂草稻WR03-12与‘越光’对于盐胁迫的应答机制可能在转录调控方面存在差别。

关键词: 杂草稻; 锌指蛋白; 转录调控; 实时定量PCR

Real-Time Quantitative Analysis on Three Zinc Finger Protein Gene Family of Salt-Tolerant Weedy Rice (*Oryza sativa f. spontanea*)

ZHANG Li-Li, SUN Jian, MA Dian-Rong, CHEN Wen-Fu*

Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology, Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Northern Japonica Rice Breeding of Liaoning, Rice Institute, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: Salt-tolerant weedy rice WR03-12 was screened from 300 accessions derived from Liaoning, Jilin, Heilongjiang, Inner Mongolia and Jiangsu Province. To investigate the salt-tolerant mechanism of WR03-12 in transcriptional regulation level, the first strand cDNA of salt-sensitive variety ‘Koshihikari’ and salt-tolerant weedy rice WR03-12 were obtained, and the expression of six genes in three zinc finger protein family of the two germplasm was studied by Real-time quantitative PCR. Results showed (i) the C₂C₂ pattern gene of SRZ1 and SRZ2 was induced negatively by high salt stress, and the expression level in WR03-12 was lower than ‘Koshihikari’; (ii) the TFIIIA pattern gene of ZFP18 and ZFP245 was induced positively by high salt stress, and the expression level in WR03-12 was lower than ‘Koshihikari’; (iii) the expression of A20 pattern gene AACZ1 was not induced in ‘Koshihikari’, while was induced in a short time (7 day) in WR03-12 under high salt stress; (iv) the expression of AN1 pattern gene AACZ2 was not induced by high salt stress in both ‘Koshihikari’ and WR03-12. Results suggested that the salt stress response mechanism between WR03-12 and ‘Koshihikari’ may be different in transcriptional regulation.

Key words: weedy rice; zinc finger protein; transcriptional regulation; real time PCR

植物盐胁迫应答的分子机制可划分成两大类, 第一类为效应分子直接参与盐胁迫的应答, 产生渗透调节剂合成酶等物质, 直接参与盐代谢; 另一类为调控分子通过介导信号传导来应答与调节盐代谢, 这些分子包括转录因子与位于信号级联系统中的各种激酶(Hasegawa等2000)。植物体在转录水平上调节自身盐代谢, 是其耐盐机制的重要组成部分, 转录因子在这一应答与调节过程中扮演着非常重要的角色。参照在拟南芥ABA缺陷或不敏感突变体中的研究结果, 将胁迫信号传递途径划分为依赖和不

依赖ABA的两条调控途径(Shinozaki和Yamaguchi-Shinozaki 1997; 沈义国和陈受宜2001)。在依赖于ABA的胁迫应答基因启动子区域中大都含有顺式作用元件“ABRE”, 能与bZIP、MYB或MYC等DNA

收稿 2010-03-16 修定 2010-04-16

资助 国家自然科学基金项目(30671262)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20060157003)和水稻生物学国家重点实验室开放课题。

* 通讯作者(E-mail: wfchen5512@yahoo.com.cn; Tel: 024-88487184)。

结合蛋白的特定结构域相互作用。也有一些胁迫应答基因如 rd22 能同 RD22BR (MYB)、AtMYB2 (MYC) 特异性结合, 而启动子中却并不含有“ABRE”顺式元件(Abe 等 1997; 沈义国和陈受宜 2001)。锌指蛋白通常由一系列锌指组成, 具有重复结构的氨基酸模式, 相隔特定距离的胱氨酸结合锌指, 能与某些 RNA/DNA 结合, 最早由诺贝尔奖获得者 Klug 和同事在爪蟾转录因子 IIIA (TFIIIA) 蛋白质中首先发现的(Searles 等 2000)。锌指蛋白基因家族是响应生物逆境胁迫过程中的一类重要的转录因子合成基因。研究表明高盐胁迫下拟南芥(Sakamoto 等 2004)、水稻(仇玉萍等 2004; Huang 等 2005)、棉花(王东和杨金水 2002) 等植物的多类锌指蛋白家族均受诱导, 并调节耐盐相关基因的表达。

杂草稻是指稻田或周边耕地里作为杂草类型而伴随栽培稻生长的水稻植株(汤凌华和森岛启子 1996), 其系统分类为禾本科稻属稻种变种杂草稻。杂草稻在许多国家与地区广泛分布, 与栽培稻伴生繁殖, 是一种难以防控的恶性杂草(马殿荣等 2005a; Paker 和 Dean 1976; Baki 等 2000; Oka 1988)。同时, 杂草稻遗传多样性丰富, 群体间遗传分化和变异较大(马殿荣等 2008a, 2005b; Suh 等 1997; Cho 等 1995; Kwon 等 1992; 孙健等 2009)。近年来, 一些科研人员对全国各稻区杂草稻进行了收集与鉴定, 成功从中筛选出了耐高盐、耐寒、耐深播的材料(马殿荣等 2008b)。目前, 对于杂草稻耐盐机理的研究已经有了相关报道(赵娜等 2007), 但多数研究集中于生理生化方面, 而在分子机理方面探讨杂草稻耐盐特性的相关研究相对较少。本研究以 3 类受 ABA 诱导调控的锌指蛋白基因家族中 6 个盐胁迫响应基因为研究对象, 从转录水平对盐胁迫下耐盐杂草稻与盐敏感栽培稻品种‘越光’锌指蛋白基因的表达进行了实时定量分析。

材料与amp;方法

1 耐盐杂草稻材料的筛选

对 300 余份杂草稻(*Oryza sativa* L. f. *spontanea*) 材料, 进行耐高盐筛选。具体筛选方法如下: 试验用种子经 3% H₂O₂ 消毒后, 用去离子水洗净, 于 25 °C 浸种 48 h, 在 28 °C 条件下催芽 24 h, 然后置于人工气候箱中砂培, 1 周后用 1/2 木村 B 溶液水培,

温度 25 °C, 光/暗时间为 14 h/10 h。培养至一叶一心期转移至装有 1/2 木村 B 营养液的塑料箱中, 塑料箱长 37 cm、宽 28 cm、深 12 cm, 1 周后换成全木村 B 营养液。幼苗用海绵固定在有孔的苯板上, 外部用遮光纸遮光, 培养室光/暗温度 28 °C/20 °C, 光/暗时间为 14 h/10 h。于三叶一心时在培养液里加入 NaCl 溶液进行处理初始胁迫浓度为 150 mmol·L⁻¹, 二次筛选浓度为 200 mmol·L⁻¹, 以死叶百分率作为耐盐性的筛选指标。

2 试验材料的培养、胁迫处理及取样

试验以筛选出的耐盐杂草稻与盐敏感栽培稻粳稻亚种(*Oryza sativa* L. subsp. *Japonica*) ‘越光’为试材, 采用水培法(培养方法同上), 二叶一心时用 150 mmol·L⁻¹ NaCl 进行盐胁迫处理。分别于 0、24 h、7 d 三个时间梯度进行取样。

3 材料总 RNA 提取与纯度完整性检测

采用 TIANGEN 公司 RNAPrep pure Plant Kit 提取总 RNA。方法如下: 100 mg 幼苗地上部分叶片在液氮中迅速研磨成粉末, 加入 450 μL 裂解缓冲液 RL, 将所有溶液转移至过滤柱 CS 上, 13 400×g 离心 2~5 min, 小心吸取收集管中的上清至 RNase-free 的离心管中, 缓慢加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇, 混匀, 将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中, 13 400×g 离心, 向吸附柱 CR3 中加入 350 μL 去蛋白液 RW1, 13 400×g 离心 30~60 s, 向吸附柱 CR3 中央加入 80 μL 的 DNase I 工作液, 室温放置 15 min, 向吸附柱 CR3 中加入 350 μL 去蛋白液 RW1, 13 400×g 离心 30~60 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CR3 放回收集管中, 用 RW 漂洗液漂洗 2 次, 13 400×g 离心 30~60 s 后, 用 50 μL RNase-free ddH₂O 收集, 获得试材总 RNA 后利用分光光度法将所有样品浓度稀释至 50 ng·μL⁻¹。

用普通琼脂糖凝胶电泳对总 RNA 进行完整性与纯度检测。电泳条件: 胶浓度 1.2%; 0.5×TBE 电泳缓冲液; 150 V, 20 min 检测完整性。

4 反转录合成 cDNA 第一链

采用 TIANGEN 公司 Quantscript RT Kit 对试材 RNA 进行两步法反转录合成 cDNA 第一链 20 μL 模板, 方法如下: 将模板 RNA 在冰上解冻, 然后将逆转录体系各成分 10×RT 混合液 2 μL、dNTP 混合液 2 μL、Oligo-dT 2 μL、Quant Reverse Tran-

scriptase 1 μL 、RNase-free 水 7 μL 和模板 RNA 6 μL 彻底混匀, 涡旋振荡不超过 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。得到 cDNA 第一链后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 待进行荧光实时定量 PCR 反应。

5 六个锌指蛋白基因的实时定量分析

在 GenBank 上检索水稻 3 个锌指蛋白家族的 6 个基因序列, 利用 Primer Express 3.0 软件在 6 个基因的外显子保守区设计实时定量 PCR 引物。内参选择 Actin 基因 RAC1。以 WR03-12 与 ‘越光’ 0、24 h、7 d 的 cDNA 为实时定量 PCR 模板, 采用 TIANGEN 公司 Real Master Mix (SYBR Green) 试剂盒进行定量 PCR 反应体系的配置。首先, 将 20 \times SYBR 溶液加入至 1.0 m 2.5 \times Real Master Mix 中。反应体系与条件如下: 2.5 \times Real Master Mix 18 μL , Primer F 4 μL , Primer R 4 μL , cDNA 6 μL , ddH₂O 8 μL 。热循环设为 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 个循环; 60~92 $^{\circ}\text{C}$ 溶解反应分析产物特异性。实时定量 PCR 反应在 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 平台上进行, 每个反应设定 4 次重复, 具体操作过程严格参照 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 试验手册进行。

实验结果

1 试材确定与盐处理

300 份杂草稻材料经 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫初步筛选出 7 份较耐盐杂草稻材料, 再次对筛选出的杂草稻材料进行 2 次筛选(200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)。如表 1 所示, 以死叶百分率为筛选指标, 最终筛选出编号为 WR03-12 的耐高盐材料。

2 RNA 提取与纯度完整性检测

如图 1 所示, 提取的总 RNA 经凝胶电泳鉴定,

得到 28S 和 18S 的两条带, 且清晰完整无明显降解, 证明提取 RNA 完整。紫外分光光度计检测 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数均大于 1.9, 符合试验纯度和逆转录要求。

表 1 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下死叶百分率比较

Table 1 The comparison of dead leaf rate under 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ salt stress

材料名称	平均死叶百分率 / %	
	7 d	14 d
‘越光’	98.9	100
WR03-12	19.5	28.9
WR03-17	40.3	65.1
WR03-41	39.7	56.3
WR04-2	53.7	79.1
WR04-5	4.3	60.9
WR05-25	60.2	72.8
WR05-33	36.7	51.5

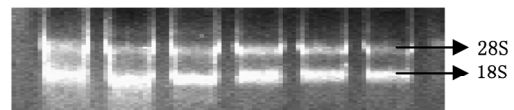


图 1 总 RNA 提取电泳图

Fig.1 Agrose gel electrophoresis analysis of total RNA

3 六个锌指蛋白基因的实时定量引物设计

本试验设计的实时定量 PCR 引物信息如表 2 所示, 其中 *Rac1* 为水稻肌动蛋白基因, 它稳定表达且表达水平与细胞周期以及细胞是否活化无关, 不受任何内源性或外源性因素的影响(Reece等1990), 因此作为本试验的内参基因。其余引物扩增产物为待研究的目的基因。

表 2 引物信息

Table 2 Primer information

基因名称	注册号	染色体	正向引物序列 5' → 3'	反向引物序列 5' → 3'
SRZ1	AY219846	2	GACCCGTCGACCCCTGAT	GCAAGCGTTTCGGGTTACAC
SRZ2	AF171223	6	GAAAAGACTGACGCGACCAAA	CTGGATCGCAGCCTGTGAAT
ZFP18	AY286473	3	TGCCACCGCAACCTATTTG	CACATAGTGCACCCGCATGT
ZFP245	AY395294	7	GTCGCCATCGGCAGTGA	TGCGAGCATCAAGAGAGAAGTC
OsAACZ1	AY282740	7	CGGAGGCCCAATATTGTG	ACGATGCTGGCGTAAATGC
OsAACZ2	AY377427	3	TGGCACAAGAGAGCTGGAAA	TGGCCTTAACGGTGTCCCTAT
Rac1	X16280	3	ATCCTGACGGAGCGTGGTTA	GGTCATAGTCCAGGGCGATGT

4 六个锌指蛋白基因的实时定量分析

6个锌指蛋白基因融解曲线均呈单峰(图2), 这表明引物设计与反应条件的优化使本试验中所有实时定量PCR反应限制了非特异性扩增。在实时定量PCR过程中, 随着热循环数增加, 荧光信号强度

的增加量存在着不同程度的差别(图3), 表明WR03-12与‘越光’在梯度时间盐胁迫下, 基因组内6个锌指蛋白基因mRNA的相对含量存在一定差异。

本试验中, WR03-12与‘越光’的锌指蛋白基

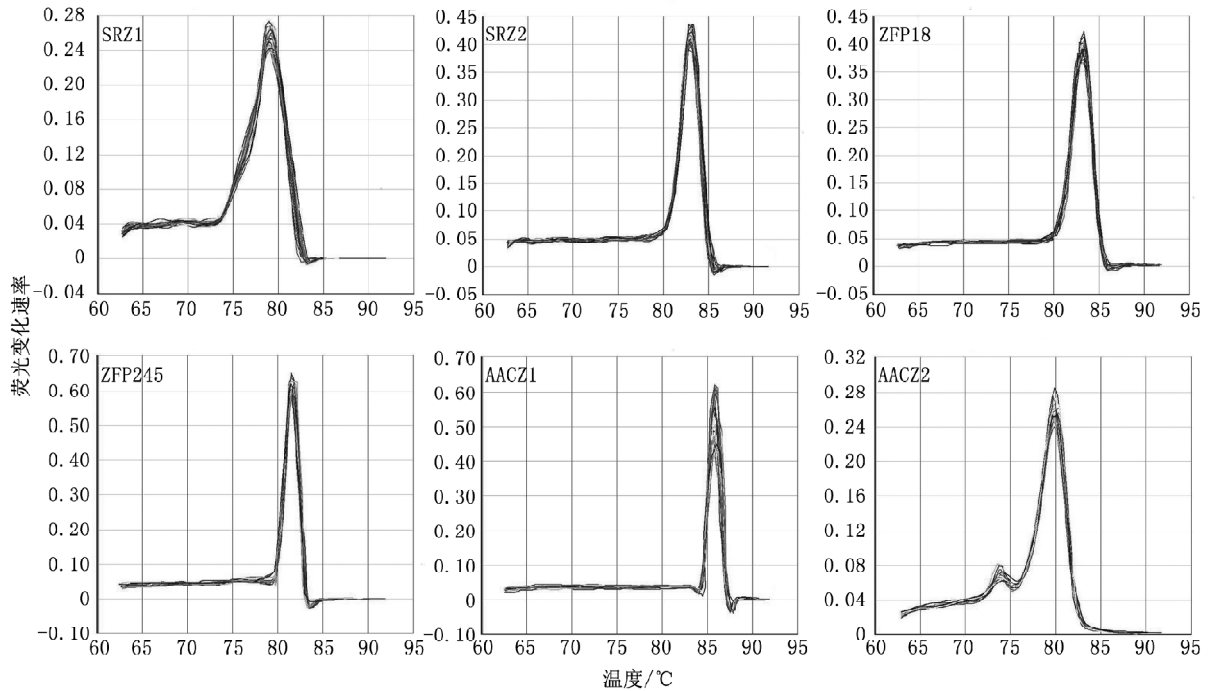


图2 六个锌指蛋白基因实时定量PCR溶解曲线
Fig.2 Melting curves in real time PCR for six ZFP gene

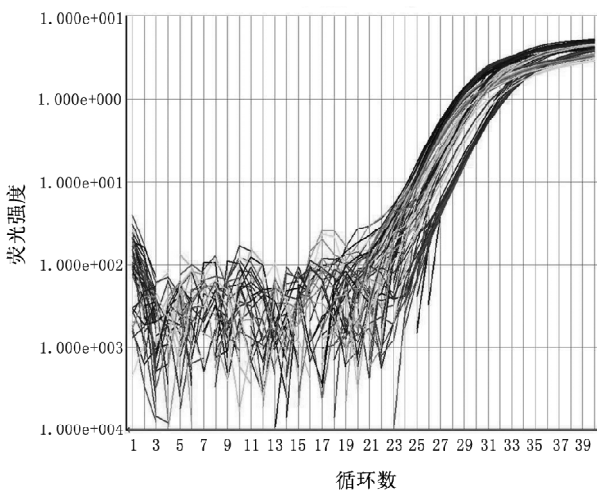


图3 六个锌指蛋白基因实时定量PCR扩增曲线
Fig.3 Real-time quantitative PCR amplification of the six ZFP gene

因均受到盐胁迫的诱导, 但两者受诱导程度有着明显的差异。其中2个C2C2型锌指蛋白SRZ1与SRZ2受到高盐胁迫的负向调控。从图4中可以看出, 2个C2C2型锌指蛋白基因SRZ1与SRZ2受到高盐胁迫的负向调控, 两类材料盐胁迫前表达量差别不大, 均在1上下。在胁迫24 h后‘越光’幼苗中SRZ1与SRZ2相对表达量差异不是很明显, 分别降低到 0.554 ± 0.114 和 0.550 ± 0.012 。WR03-12中SRZ1与SRZ2表达量呈降低趋势, SRZ1表达量降低程度要略小于‘越光’, 相对表达量为 0.601 ± 0.054 。胁迫7 d后, ‘越光’SRZ1与SRZ2相对表达量持续降低, 分别为 0.200 ± 0.060 与 0.400 ± 0.045 , 而WR03-12 SRZ1与SRZ2表达量略有回升, 分别为 0.654 ± 0.080 与 0.608 ± 0.040 。表明, WR03-12的这2个基因受盐胁迫负向诱导程度要小于‘越光’。

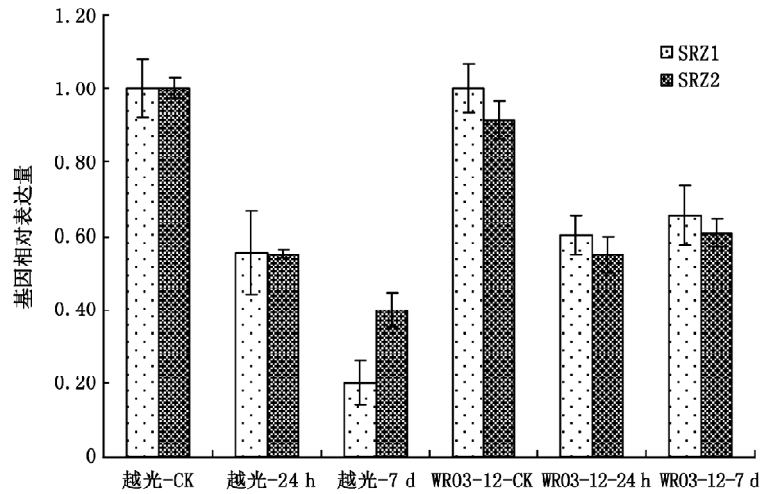


图4 盐胁迫下耐盐杂草稻(WR03-12)和盐敏感栽培稻(‘越光’) SRZ1 和 SRZ2 的相对表达量

Fig.4 The expression levels of SRZ1 and SRZ2 in salt stress of WR03-12 and ‘Koshihikari’

ZFP18与ZFP245是TFIIIA型锌指蛋白基因家族的2个重要成员,在本试验中这2个基因受到盐胁迫的正向诱导。如图5所示,WR03-12与‘越光’幼苗中ZFP18和ZFP245这2个基因在盐胁迫前的表达量存在差异,ZFP18基因在WR03-12幼苗中的表达量为‘越光’的1.33倍,ZFP245为‘越光’的1.40倍。在盐胁迫后24 h,WR03-12与‘越光’2个基因的转录水平比胁迫前均有所提高,并且‘越光’受诱导程度略高于WR03-12。胁迫7 d后,2个材料中2个基因的转录水平均有所下降,其中ZFP18基因在WR03-12中相对表达量的下降程度小于‘越光’,分别为 1.12 ± 0.152 与 0.721 ± 0.060 。

ZFP245基因在WR03-12中相对表达量为 1.46 ± 0.040 ,而在‘越光’中并未检测到。表明WR03-12这2个基因受盐胁迫正向诱导程度也要小于‘越光’。

AACZ1和AACZ2是新发现的具有A20与AN1锌指结构的锌指蛋白基因。从图6可以看出,在盐胁迫下,‘越光’的AACZ1基因表达量变化不大,而杂草稻WR03-12的AACZ1基因受短时间诱导后恢复到胁迫前水平,其初始相对表达量为 1.20 ± 0.110 ,然后下降到 0.983 ± 0.130 水平,胁迫7 d后转录水平显著回升,其相对表达量达到 1.30 ± 0.072 。AACZ2基因的表达水平在WR03-12与‘越光’间无明显差别,在所有处理下变化趋势相同。

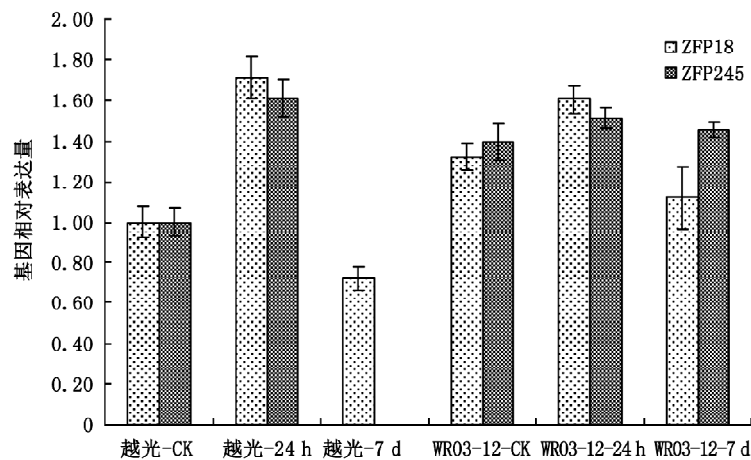


图5 盐胁迫下耐盐杂草稻(WR03-12)和盐敏感栽培稻(‘越光’) ZFP18 和 ZFP245 的相对表达量

Fig.5 The expression levels of ZFP18 and ZFP245 in salt stress of WR03-12 and ‘Koshihikari’

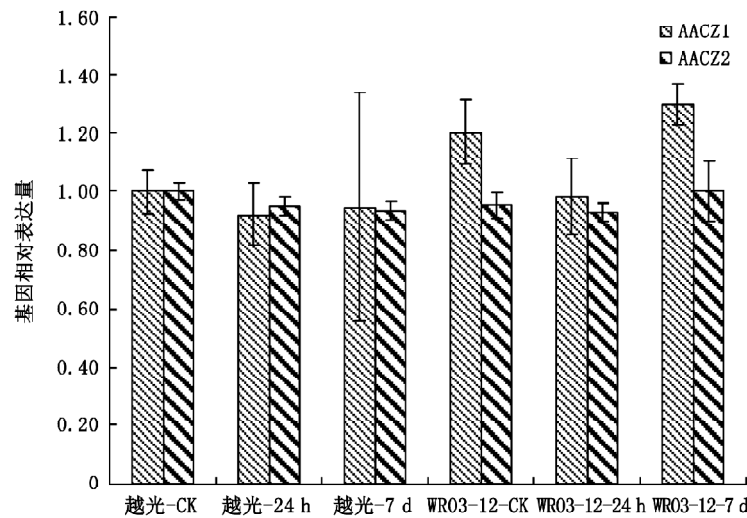


图6 盐胁迫下耐盐杂草稻(WR03-12)和盐敏感栽培稻(‘越光’) AACZ1 和 AACZ2 的相对表达量

Fig.6 The expression levels of AACZ1 and AACZ2 in salt stress of WR03-12 and ‘Koshihikari’

讨 论

目前,实时定量PCR广泛应用于医学与动物研究,在作物研究中的应用处于起步阶段。如检验关键基因在特定时间特定组织的表达、转基因作物外源基因表达与拷贝数检测、单碱基突变等(孙淑斌等 2006; 杨立桃等 2005)。在基因表达方面,由于实时定量PCR高通量与精度优点,与传统的半定量PCR方法相比有着明显的优势,实现了基因表达从定性向定量的进步,这种技术上的进步为杂草稻有利基因的开发提供了很好的平台。

本试验利用 SYBR Green 为核酸荧光燃料,对目的基因表达进行实时定量PCR检测。由于 SYBR Green 可以与双链 DNA 小沟结合,其荧光强度是游离状态下的 10~100 倍,可以被仪器检测到,但与探针法相比容易受到引物二级结构的影响使特异性降低,影响试验精度。为避免这种非特异性扩增对实验结果的影响,本试验选用 Hotmaster Tag DNA 聚合酶通过温度调节方式封闭聚合酶的底物结合位点,最大限度的减少 PCR 扩增过程中的非特异性扩增。在引物设计上尽量减少二级结构产生,同时优化了退火、延伸的温度与时间。本试验中溶解曲线基本上为单峰,说明引物设计与热循环优化成功避免了非特异性扩增。

为了更好的利用与适应盐碱性土壤,科研工作

者在进行盐碱地改良的同时不断发掘水稻耐盐遗传资源。多年来,对杂草稻的认识多为稻田恶性伴生杂草,对于其遗传优势的利用报道较少。本试验通过两次高盐筛选最终筛选出耐高盐材料 WR03-12。有研究表明,植物在逆境应答过程中,由于相关基因表达的变化,导致机体内产生生物化学与生物物理过程的适应性调整,其中包括膜组分的改变,可溶性蛋白的增加,糖分与脯氨酸的积累等(Browse 和 Xin 2001; Zhang 等 2000; Van Buskirk 和 Thomashow 2006)。转录因子可以与启动子区域顺式元件互作,正向或者负向调控基因的转录从而调控基因表达。本试验通过与盐敏感品种‘越光’在转录水平上的对比发现,杂草稻 WR03-12 SRZ 类与 ZFP 类锌指蛋白基因对盐胁迫的响应为惰性,WR03-12 在盐胁迫基因的转录机制上与‘越光’可能存在差别,这可能是其耐高盐的重要因素。

锌指蛋白种类繁多且信号传导途径复杂。目前,对于锌指蛋白基因受哪些转录因子调控,其产物调控哪些耐盐基因的表达,以及在信号转导中扮演着怎样的角色尚未研究透彻,但有研究表明本试验中的三类锌指蛋白基因启动子区均含有脱水应答元等顺式作用元件或逆境转录因子识别位点(Sakamoto 等 2004; Huang 等 2009),这也证实本研究中 WR03-12 与‘越光’的耐盐程度与 3 个锌指蛋白类基因表达量的差别是存在相关性的。本研究

中SRZ1与SRZ2受高盐的负向调控,这与Li和Chen(2001)对C₂C₂型双锌指结构蛋白的研究结果是吻合的。黄骥等人的研究(Huang等2005)表明2个TFIIIA型锌指蛋白基因ZFP18与ZFP245启动子区具有脱水应答等顺式作用元件CRT/DRE与ABRE,而具有A20与AN1锌指结构的AACZ1与AACZ2基因是具有GCC-box转录因子识别位点的一类可能的细胞死亡抑制因子。在本研究中,这两种顺式与反式的调控方式均在WR03-12与‘越光’中通过实时定量分析得以表达体现,但只有ZFP18与ZFP245的顺式调控在WR03-12与‘越光’中表现出差别,而SRZ1与SRZ2的反式调控则在材料间差别较小。进而说明锌指蛋白基因是一类非常复杂且重要的盐胁迫响应与调控基因,并且在水稻的品种间或品种与变种间存在着表达水平的差异。

Huang等(2009)通过图位克隆方法分离克隆了控制抗逆性状的基因DST,该基因编码一个只含有一个C₂H₂类型锌指蛋白核转录因子。DST作为抗逆性的负调控因子,当其功能缺失时可直接下调过氧化氢代谢相关基因(如过氧化物酶基因)的表达,使清除过氧化氢的能力下降从而增加过氧化氢在保卫细胞中的累积,促使叶片气孔关闭,减少水分蒸发,最终提高水稻的抗旱耐盐能力。我们通过对耐盐杂草稻与栽培稻的生理研究(另文发表)发现耐盐材料WR03-12与盐敏感材料‘越光’的过氧化物酶与气孔行为也具有以上类似生理特征,并且某些锌指蛋白基因与DST有着类似的结构,也可能具有类似的功能。植物基因应答非生物胁迫途径分为依赖ABA信号途径与不依赖ABA信号途径,我们也会在后续试验中将ABA作为干涉条件加入到锌指蛋白基因实时定量研究中。对于杂草稻WR03-12与‘越光’盐胁迫应答分子机制的差别有待于进一步深入研究。

参考文献

仇玉萍, 荆邵娟, 付坚, 李璐, 余迪求(2004). 13个水稻WRKY基因的克隆及其表达谱分析. 科学通报, 15(5): 479~480
 马殿荣, 陈温福, 徐正进, 张文忠(2005a). 辽宁省杂草稻的初步考察. 辽宁农业科学, (6): 22~24
 马殿荣, 陈温福, 徐正进, 张文忠(2005b). 辽宁杂草稻的发生及其控制措施. 中国农学通报, 21(8): 358~360
 马殿荣, 李茂柏, 王楠, 徐正进, 陈温福(2008a). 中国辽宁省杂草稻遗传多样性及群体分化研究. 作物学报, 34(3): 403~411

马殿荣, 王楠, 王莹, 贾德涛, 陈温福(2008b). 中国北方杂草稻深覆土条件下出苗动力源分析. 中国水稻科学, 22(2): 215~218
 沈义国, 陈受宜(2001). 植物盐胁迫应答的分子机制. 遗传, 23(4): 365~369
 孙健, 马殿荣, 陈温福(2009). 辽宁杂草稻雌蕊性状的初步研究. 中国稻米, (1): 46~48
 孙淑斌, 李宝珍, 胡江, 徐国华(2006). 水稻低丰度表达基因OsAMT1实时荧光定量PCR方法的建立及其应用. 中国水稻科学, 20(1): 8~12
 汤凌华, 森岛启子(1996). 杂草稻的起源和遗传多样性. 中国栽培稻的起源和分化论文集. 北京: 中国农业大学出版社, 211~218
 王东, 杨金水(2002). 棉花类耐盐锌指蛋白基因的克隆与结构分析. 复旦学报(自然科学版), 41(1): 42~46
 杨立桃, 赵志辉, 丁嘉羽, 张承妹, 贾军伟, 张大兵(2005). 利用实时荧光定量PCR方法分析转基因水稻外源基因拷贝数. 中国食品卫生杂志, 17(2): 140~144
 赵娜, 马殿荣, 陈温福(2007). 北方杂草稻发芽期耐盐性的初步评价. 中国稻米, (2): 20~24
 Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. Plant Cell, 9: 1859~1868
 Baki BB, Chin DV, Mortimer M (2000). Wild and Weedy Rice in Rice Ecosystems in Asia—A review. Los Banos: International Rice Research Institute, 118
 Browse J, Xin Z (2001). Temperature sensing and cold acclimation. Curr Opin Plant Biol, 4: 241~246
 Cho YC, Chung TY, Park YH, Suh HS (1995). Genetic polymorphisms and phylogenetic relationships of Korean red rice (weedy rice in *Oryza sativa* L.) based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) makers. Korean J Breed, 27: 86~93
 Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 51: 463~499
 Huang J, Wang JF, Wang QH, Zhang HS (2005). Identification of a rice zinc finger protein whose expression is transiently induced by drought, cold but not by salinity and abscisic acid. Mitochondrial DNA, 16: 130~136
 Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX (2009). A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. Genes Dev, 23: 1805~1817
 Kwon SL, Smith Jr RJ, Talbert RE (1992). Comparative growth and development of red rice (*Oryza sativa*) and rice (*O. sativa*). Weed Sci, 40: 57~62
 Li ZY, Chen SY (2001). Isolation, characterization and chromosomal location of a novel zinc-finger protein gene that is down-regulated by salt stress. Theor Appl Genet, 102: 363~368
 Oka HI (1988). Origin of Cultivated Rice. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 107~114
 Paker C, Dean ML (1976). Control of wild rice in rice. Pestic Sci,

- 7: 403~416
- Reece KS, McElroy D, Wu R (1990). Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa* L.) actin genes. *Plant Mol Biol*, 14 (4): 621~624
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol*, 136: 2734~2746
- Searles MA, Lu D, Klug A (2000). The role of the central zinc fingers of transcription factor IIIA in binding to 5 S RNA. *J Mol Biol*, 301 (1): 47~60
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 115: 327~334
- Suh HS, Sato YI, Morishima H (1997). Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD makers. *Theor Appl Genet*, 94: 316~321
- Van Buskirk HA, Thomashow MF (2006). *Arabidopsis* transcription factors regulating cold acclimation. *Physiol Plant*, 126: 72~80
- Zhang JX, Klueva NY, Wang Z, Wu R, Ho THD, Nguyen HT (2000). Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 36: 108~114