

## 盐胁迫下西伯利亚蓼6个时期混合叶cDNA文库的构建和初步分析

刘关君\*, 刘明坤, 许志茹, 阎秀峰, 朱翔, 杨传平

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

**摘要:** 以3% NaHCO<sub>3</sub>胁迫处理西伯利亚蓼2 h、6 h、12 h、1 d、2 d和3 d共6个时期混合叶为材料, 提取总RNA。根据Stratagene公司cDNA建库试剂盒构建了西伯利亚蓼混合叶cDNA文库。原始文库滴度为2.0×10<sup>6</sup> pfu·mL<sup>-1</sup>, 扩增后文库滴度为4.5×10<sup>9</sup> pfu·mL<sup>-1</sup>, 重组率为95.9%, 插入片段大小在0.3~1.5 kb之间, 平均长度为0.45 kb左右。经测序获得2575个EST序列, 拼接出1977个假定独立转录本(TUTs), 其中文库中含有大量低丰度表达基因, 约占TUTs总数的89.58%。BlastX分析表明, 1977个TUTs中共有720个TUTs有明确功能注释, 其中参与胁迫过程中代谢、能量、光合作用和蛋白质合成基因表达量较高, 而涉及转录、信号转导、细胞防御和救援基因表达量较低。

**关键词:** 西伯利亚蓼; 混合叶; cDNA文库

## Construction and Preliminary Analysis of Six Period Mixed Leaves cDNA Library of *Polygonum sibiricum* Laxm. under Salt Stress

LIU Guan-Jun\*, LIU Ming-Kun, XU Zhi-Ru, YAN Xiu-Feng, ZHU Xiang, YANG Chuan-Ping

The Laboratory of Forest Genetics and Breeding and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** Total RNA was extracted from *Polygonum sibiricum* mixed leaves collected at time points ranging from 2 h to 3 d of 3% NaHCO<sub>3</sub> treatment. We used Stratagene cDNA Synthesis Kit to construct a cDNA library of *P. sibiricum* mixed leaves. The titer of primary cDNA library was 2.0×10<sup>6</sup> pfu·mL<sup>-1</sup>, the titer of amplified library was 4.5×10<sup>9</sup> pfu·mL<sup>-1</sup>, the recombination percentage was about 95.9%, inserted fragment size ranged from 0.3 to 1.5 kb, average inserted size was 0.45 kb. Sequencing analysis showed that 2575 ESTs were obtained from the cDNA library, in which we identified 1977 tentative unique transcripts (TUTs). About 89.58% genes identified from cDNA library were low abundant expression genes. The BlastX analysis showed 720 TUTs had function annotation in 1977 TUTs. In the 720 TUTs, genes involved in the metabolism, energy, photosynthesis and protein synthesis of stress processes were highly transcribed, genes involved in signal transduction, cytophyllaxis and deliverance were transcribed lowly.

**Key words:** *Polygonum sibiricum*; mixed leaves; cDNA library

西伯利亚蓼为多年生草本植物, 主要分布于我国东北、华北、西北等地区, 多生于盐碱荒地, 能在盐碱地碱斑上生长, 具有很强的抗盐碱能力, 是改良盐碱地及研究植物耐盐碱胁迫的优良材料。陆静梅和李建东(1994)以扫描电镜观察西伯利亚蓼解剖结构时发现, 其叶和茎部具有典型的耐盐碱结构特征。杜军华等(2003)对青海湖湖滨滩地西伯利亚蓼叶肉细胞超微结构研究发现, 其叶片叶绿体类囊体膨大, 这与其所处的盐渍地有着密切联系。吕艳芳等(2006)研究3% NaHCO<sub>3</sub>胁迫下西伯利亚蓼体内无机离子变化及刘关君等(2004)用SDS-PAGE研究3% NaHCO<sub>3</sub>处理后西伯利亚蓼不同部位蛋白表达差异分析, 均证明叶、茎和地下茎对于

盐碱胁迫反应存在多样性, 但有关西伯利亚蓼耐盐碱的分子机制研究较少。

表达序列标签(expressed sequence tag, EST)是指从不同组织来源的cDNA文库中随机挑选克隆进行5'或3'端测序后得到的部分cDNA序列, 长度一般在300~500 bp。EST已广泛用于构建遗传学图谱、分离与鉴定新基因、基因差异表达和比较基因组学等研究。EST应用研究植物基因对给定环境胁迫后的表达模式也较多(Qutob等2000; Faccioli等2001), 目前已经通过EST技术在盐胁迫下盐地

收稿 2008-07-07 修定 2008-11-03

资助 黑龙江省科技攻关重点项目(GB06B303)。

\* E-mail: liuguanjun2003@126.com; Tel: 0451-82190607

碱蓬(Zhang等2001)、盐芥(Wang等2004)、白骨壤(Mehta等2005)和冰叶日中花(Kore-eda等2004)中成功发现胁迫相关基因及其表达模式。通过对不同时间盐胁迫下耐盐植物基因表达、甘油合成途径及多胺代谢等研究表明,不同盐胁迫时间下细胞存在不同的抗盐机制(Redkar等1995; Das等1995),因此植物在盐胁迫下不同时期参与抗盐的基因存在较大差异,为了更多地获得参与抗盐胁迫相关基因,我们构建了3% NaHCO<sub>3</sub>胁迫处理西伯利亚蓼2 h、6 h、12 h、1 d、2 d和3 d共6个时期混合叶cDNA文库,以研究盐胁迫下西伯利亚蓼叶中耐盐相关基因的整体表达模式,并为利用芯片技术研究西伯利亚蓼叶部在不同胁迫时间下抗盐基因表达模式建立资料基础。

### 材料与amp;方法

西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum* Laxm.)取自黑龙江省肇东市盐碱地。将西伯利亚蓼地下茎置于腐殖质和细砂混合物(体积比3:1)中于温室培养,苗高10~15 cm时用做实验。分别取3% NaHCO<sub>3</sub>浇灌胁迫处理西伯利亚蓼叶2 h、6 h、12 h、1 d、2 d和3 d的材料,立即放入液氮中,于-70℃下保存备用。ZAP-cDNA<sup>®</sup> Synthesis Kit、Gigapack<sup>®</sup> III Gold Cloning Kit购自Stratagene公司; PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System IV购自Promega公司; T3和T7引物及其他试剂由上海生物工程公司和大连宝生物公司提供。

分别取等量胁迫处理西伯利亚蓼2 h、6 h、12 h、1 d、2 d和3 d的叶片材料,混合均匀,提取混合叶总RNA,总RNA提取参考王玉成等(2003)文中的方法。利用Promega公司的PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System磁珠法分离纯化mRNA,用1%琼脂糖凝胶电泳检测mRNA质量。取5 μg西伯利亚蓼混合叶mRNA用于cDNA文库的构建,采用Stratagene公司ZAP-cDNA<sup>®</sup> Gigapack III Gold Cloning试剂盒,方法参照该公司的建库步骤进行。

原始文库滴度及重组率的检测参考吴海龙等(2007)方法。将扩增后的文库作1:10<sup>5</sup>稀释后铺平板,测定扩增后文库的滴度。从中随机挑取14个噬菌斑作为模板,以T3和T7为引物扩增插入片段。PCR反应体系为:2 μL的10×PCR缓冲液、1 μL的T3引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)、1 μL的T7引物(10

μmol·L<sup>-1</sup>)、2 μL的dNTP(2.5 μmol·L<sup>-1</sup>)、0.5 μL的Taq酶、2 μL模板DNA,加水至20 μL。PCR反应程序为:95℃预变性5 min;95℃30 s,56℃1 min,72℃1 min,30个循环;72℃延伸5 min。反应产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,确定插入片段的大小。

随机挑取阳性克隆使用MegaBACE 1000型自动测序仪测序。经Sequence Analyzer 3.0软件包(使用的Base Caller版本为Cimarron 3.12)分析读序,得到DNA序列。测序结果在GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行同源性比对,确定为新序列后,将序列通过Sequin软件提交给GenBank的EST数据库。

用NCBI的Blastcluster程序对EST序列(长度大于或等于100 bp)进行序列的初步聚类,两条序列至少有10%的重叠区并且重叠区有95%以上的相似性被鉴定为来自同一转录本。用CAP3软件对拼接结果进行组装,由至少含40 bp的匹配并且重叠区有95%以上相似性的两条或两条以上的EST序列组成的拼接序列被鉴定为一条重叠区(contig)序列,不能包含在任何contig中的独立EST序列被认为是一条单拷贝EST (singleton)序列,contig和singleton均被鉴定为一条假定独立转录本(tentative unique transcript, TUT)。将拼出的基因用BlastX软件对GenBank Nr Database作序列相似性比对,并根据MIPs分类标准,进行EST功能分类。

### 实验结果

#### 1 总RNA的提取和mRNA的分离纯化

提取混合叶总RNA经紫外分光光度计检测,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值为1.93,说明RNA质量较高,没有DNA和蛋白的污染。经1.1%的琼脂糖凝胶电泳结果显示(图1),28S rRNA和18S rRNA两条谱带清晰,二者亮度比接近2:1,无拖尾现象,说明RNA完整性较好,并且分离的mRNA经电泳检测为均匀分散的弥散条带(图2),且绝大部分在0.5~1 kb之间,符合建立cDNA文库的要求。

#### 2 原始文库滴度及重组率测定

原始文库的噬菌体经1:10和1:100的梯度稀释后转染宿主菌(XL1-blue)涂平板,分别命名为1号和2号(每个设置3个重复),平板1号和2号的噬菌斑数平均值分别为209个和19个,噬菌体滴度2.0×10<sup>6</sup>

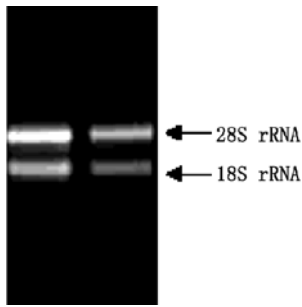


图1 西伯利亚蓼混合叶总RNA的琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA from *P. sibiricum* mixed leaves

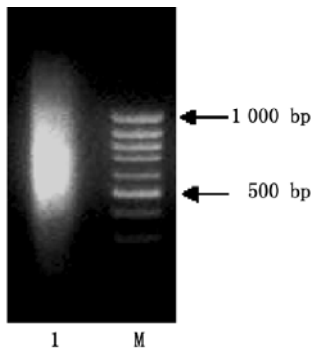


图2 西伯利亚蓼混合叶总mRNA的琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.2 Agarose gel electrophoretogram of total mRNA from *P. sibiricum* mixed leaves  
1: mRNA; M: DL1000分子量。

pfu·mL<sup>-1</sup>, 文库总容量约为2.0×10<sup>6</sup>个独立克隆数。蓝白斑筛选结果显示重组效率达95.9%。

### 3 扩增后文库滴度测定和插入片段PCR的检测

将扩增后的文库按1:10<sup>5</sup>稀释, 取1 μL铺板, 重复3次。3个平板分别形成39、43和52个噬菌

斑, 取平均值45个, 其滴度为45×10<sup>5</sup>×10<sup>3</sup>=4.5×10<sup>9</sup> pfu·mL<sup>-1</sup>(表1)。以随机选取的14个阳性克隆为模板, 扩增cDNA插入片段, 根据电泳图中各个克隆cDNA插入片段的大小, 除去T3、T7和质粒片段的长度, cDNA插入片段大多位于0.3~1.5 kb之间, 平均长度为0.45 kb左右(图3)。

表1 西伯利亚蓼混合叶cDNA文库滴度的检测

Table 1 The detection of titer-testing in the cDNA-library from *P. sibiricum* mixed leaves

平板编号	稀释倍数	噬菌体个数	文库滴度 /pfu·mL <sup>-1</sup>
1	10 <sup>5</sup>	39	3.9×10 <sup>9</sup>
2	10 <sup>5</sup>	43	4.3×10 <sup>9</sup>
3	10 <sup>5</sup>	52	5.2×10 <sup>9</sup>
平均值		45	4.5×10 <sup>9</sup>

### 4 EST的序列及功能分析

随机挑取2688个重组克隆测序, 经NCBI网站的VecScreen程序去除载体, 获得了2575个有效序列, 序列统计表明, EST序列最长为843 bp, 最短为103 bp, 平均长度为404 bp。对2575条EST进行分析, 共拼接出1977个TUTs, 其中包括206个contig, 1771个singleton, 非冗余序列占全部序列的76.78%。通过NCBI Nr数据库, 利用BlastX对1977个TUTs进行注释, 其中720个TUTs有明确的功能注释, 占总TUTs的36.42%, 109个为未知蛋白, 占总TUTs的5.51%, 其余1238个则没有明显同源性而被鉴定为新基因, 占总TUTs的62.62%。根据MIP分类标准对EST进行功能分类, 将720个

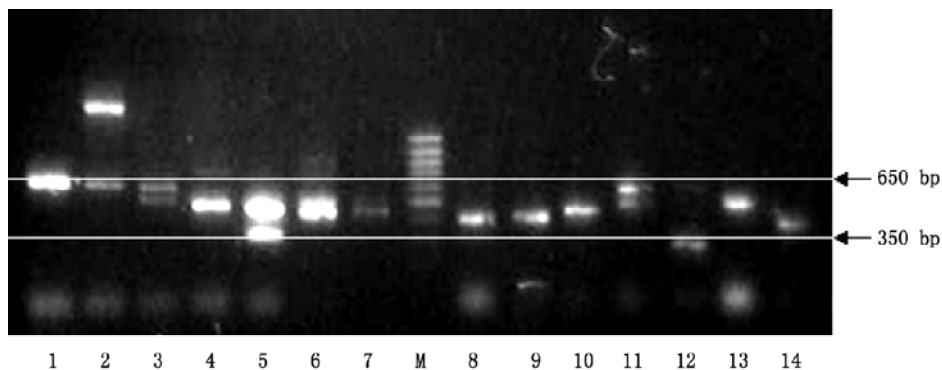


图3 西伯利亚蓼cDNA文库插入片段的PCR检测  
Fig.3 PCR of inserted size from *P. sibiricum* cDNA library  
1~14: cDNA插入片段; M: DL1000分子量。

TUTs 分成代谢(metabolism)、能量(energy)、光合作用(photosynthesis)、蛋白合成(protein synthesis)、转运组件(transport facilitation)、转录(transcription)、信号转导(signal transduction)、细胞救援与防御(cell rescue defence)及其他(others) 9类。对 720 个 TUTs 进行 EST 功能分类(图 4), 共涉及 404 类基因, 其中代谢为 198 种, 占 49.00%; 能量为 53 种, 占 13.12%; 光合作用为 37 种, 占 9.16%; 蛋白质合成为 61 种, 占 15.10%; 转运组件为 33 种, 占 8.17%; 转录为 21 种, 占 5.20%; 信号转导 19 种, 占 4.70%; 细胞救援与防御 17 种, 占 4.21%; 其他为 76 种, 占 18.81%。在已明确分类中, 代谢所涉及到的 EST 最多, 其次为蛋白合成、能量、光合作用、转运组件、转录、信号转导, 而细胞救援与防御为最少。

cDNA 文库中高丰度 EST 的统计结果表明(表 2), 文库中编码光合作用的相关 contig 共 6 个(contig 1、contig 8、contig 9、contig 10、contig 12 和

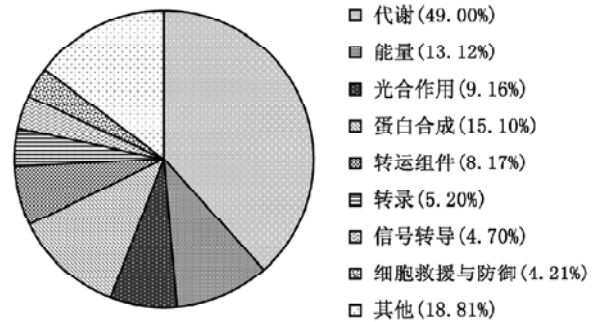


图 4 西伯利亚蓼 720 个 TUTs 按功能分类  
Fig.4 Distribution of functional categories of 720 TUTs in *P. sibiricum*

contig 16), 包含 209 个 EST, 占总高丰度 EST 数量的 73.08%。在参与细胞防御和救援相关 contig 7 共 11 个 EST 参与胁迫反应, 这与紫花苜蓿 cDNA 文库中克隆的 3 个脱落酸与环境胁迫诱导蛋白 cDNA 匹配较好, 3 个 cDNA 均受盐、低温、干旱和创伤的诱导(Luo 等 1992)。根据文献报道, 我们挑选

表 2 西伯利亚蓼混合叶中高丰度表达(拷贝数大于 7)的 EST

Table 2 Abundantly expressed (copy number >7) ESTs in *P. sibiricum* mixed leaves

名称	功能注释	EST 数量	百分率/%	E- 值
contig 1	核酮糖 1,5- 二磷酸羧化酶小亚基前体(putative ribulose 1,5-biphosphate carboxylase small subunit precursor) (钝叶酸模, <i>Rumex obtusifolius</i> )	161	56.29	6.00E <sup>-85</sup>
contig 3	丝氨酸-乙醛酸转氨酶(putative serine-glyoxylate aminotransferase) (贝母, <i>Fritillaria agrestis</i> )	20	6.99	6.00E <sup>-25</sup>
contig 13	乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase) (番茄, <i>Lycopersicon esculentum</i> )	15	5.24	9.00E <sup>-29</sup>
contig 7	脱落酸和环境胁迫诱导蛋白(abscisic acid and environmental stress-inducible protein) (截形苜蓿, <i>Medicago truncatula</i> )	11	3.85	1.00E <sup>-12</sup>
contig 8	Mg- 原卟啉 IX 甲酯环化酶(magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase, chloroplast precursor) (水稻, <i>Oryza sativa</i> )	11	3.85	6.00E <sup>-49</sup>
contig 9	核酮糖二磷酸羧化酶 $\alpha$ 亚基前体(Rubisco activase alpha form precursor) (发草, <i>Deschampsia antarctica</i> )	10	3.50	2.00E <sup>-55</sup>
contig 10	类型 III 叶绿体 a/b 结合蛋白(type III chlorophyll a/b-binding protein) (番茄, <i>Lycopersicon esculentum</i> )	10	3.50	7.00E <sup>-77</sup>
contig 11	水解酶(catalytic/hydrolase) (拟南芥, <i>Arabidopsis thaliana</i> )	10	3.50	5.00E <sup>-26</sup>
contig 12	叶绿体磷酸核酮糖激酶前体(phosphoribulokinase, chloroplast precursor) (小麦, <i>Triticum aestivum</i> )	10	3.50	7.00E <sup>-60</sup>
contig 15	生长素抑制 12.5 kDa 蛋白(auxin-repressed 12.5 kDa protein) (水稻, <i>Oryza sativa</i> )	7	2.45	4.00E <sup>-13</sup>
contig 16	叶绿素 a/b 结合蛋白(chlorophyll a/b binding protein) (菠菜, <i>Spinacia oleracea</i> )	7	2.45	7.00E <sup>-81</sup>
contig 17	叶绿体氧气释出增进蛋白 3-2, 前体(oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplast precursor) (烟草, <i>Nicotiana tabacum</i> )	7	2.45	3.00E <sup>-57</sup>
contig 18	甘氨酸 RNA 结合蛋白(glycine rich protein, RNA binding protein) (大麦, <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> )	7	2.45	5.00E <sup>-57</sup>
总数		286	100	

出43条(表3)有可能与西伯利亚蓼耐盐相关EST序列(代表26个单一基因), 这为我们后续通过芯片技术研究不同胁迫时间西伯利亚蓼叶中参与耐盐相关基因差异表达提供基础。

表3 西伯利亚蓼 cDNA 文库中潜在与耐盐相关的基因序列

Table 3 Genes potentially involved in salt-tolerance in *P. sibiricum* cDNA library

序列号	功能注释	对应物种	阈值	EST 数量
FE901488	金属硫蛋白	落花生( <i>Arachis hypogaea</i> )	2.00E <sup>-07</sup>	1
FE902955	金属硫蛋白	落花生( <i>Arachis hypogaea</i> )	8.00E <sup>-28</sup>	1
FE902143	过氧化物歧化酶	冰叶日中花( <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> )	2.00E <sup>-75</sup>	1
FE902426	过氧化物酶	落花生( <i>Arachis hypogaea</i> )	7.00E <sup>-34</sup>	3
FE903041	谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶	拟南芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	3.00E <sup>-44</sup>	1
FE903790	钙调蛋白	甘蓝( <i>Brassica oleracea</i> )	6.00E <sup>-21</sup>	1
FE902659	环核苷酸 - 钙调离子通道	拟南芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	6.00E <sup>-30</sup>	1
FE903386	真核翻译起始因子 5A	烟草( <i>Nicotiana glauca</i> )	7.00E <sup>-31</sup>	1
FE903175	真核翻译起始因子 1A	悬铃木( <i>Platanus×acerifolia</i> )	0.006	2
FE903488	蛋白翻译起始因子 IF1	加拿大细辛( <i>Asarum canadense</i> )	1.00E <sup>-32</sup>	3
FE903878	半胱氨酸合成酶	烟草( <i>Nicotiana tabacum</i> )	6.00E <sup>-28</sup>	1
FE902973	苹果酸脱氢酶	红甜菜( <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> )	2.00E <sup>-38</sup>	1
FE902478	β-1,3- 葡聚糖酶	葡萄( <i>Vitis riparia</i> )	9.00E <sup>-31</sup>	2
FE903912	3- 磷酸甘油醛脱氢酶	拟南芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	8.00E <sup>-08</sup>	1
FE902368	叶绿体内蛋白 OEE 1	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )	4.00E <sup>-27</sup>	2
FE903501	叶绿体内蛋白 OEE 3-2	烟草( <i>Nicotiana tabacum</i> )	3.00E <sup>-57</sup>	7
FE902692	丝氨酸 / 苏氨酸蛋白磷酸酯酶	苜蓿( <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>varia</i> )	4.00E <sup>-32</sup>	2
FE901958	GTP 结合蛋白	大豆( <i>Glycine max</i> )	8.00E <sup>-37</sup>	1
FE902164	H <sup>+</sup> 转运 ATP 酶	苜蓿( <i>Medicago truncatula</i> )	3.00E <sup>-07</sup>	2
FE903147	几丁质酶	鹰嘴豆( <i>Cicer arietinum</i> )	0.004	1
FE902360	逆境蛋白	苜蓿( <i>Medicago truncatula</i> )	2.00E <sup>-28</sup>	1
FE902356	液泡 ATP 酶	冰叶日中花( <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> )	2.00E <sup>-26</sup>	2
FE901919	水通道蛋白	葡萄( <i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis rupestris</i> )	6.00E <sup>-52</sup>	1
FE902147	硫氧还蛋白	拟南芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	1.00E <sup>-26</sup>	1
FE901901	谷氧还蛋白	油桐( <i>Vernicia fordii</i> )	3.00E <sup>-11</sup>	2
FE902778	锌脂蛋白	斑马鱼( <i>Danio rerio</i> )	8.00E <sup>-18</sup>	1

表4 西伯利亚蓼与其他耐盐植物盐胁迫下 cDNA 文库功能分类比较

Table 4 Functional classification comparison of *P. sibiricum* cDNA library with other salt-tolerant plants

植物及钠盐胁迫处理	代谢	能量	蛋白合成	光合作用	信号转导	细胞救援与防御	转录	转运组件	%
冰叶日中花(0.5 mol·L <sup>-1</sup> NaCl 胁迫处理)	0 h	5.50	30.7	3.88	27.60	2.37	6.61	2.59	3.41
	30 h	4.67	17.7	4.85	12.72	3.38	8.48	1.94	3.63
	48 h	9.63	11.5	3.24	7.41	2.73	15.1	2.88	4.35
紫杆柃柳(0.4 mol·L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub> 胁迫处理 48 h)		19.72	5.12	7.33	9.94	4.89	20.19	6.62	6.78
盐芥(0.5 mol·L <sup>-1</sup> NaCl 胁迫处理 48 h)		25.38		13.67	7.30	8.23	13.83	10.87	7.22
碱茅(0.4 mol·L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub> 胁迫处理 48 h)		18.84	4.79	8.48	9.34	5.65	9.66	12.48	6.20
二色补血草(0.4 mol·L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub> 胁迫处理 48 h)		18.74	3.23	7.61	14.86	4.74	12.20	3.59	10.19
西伯利亚蓼(3% NaHCO <sub>3</sub> 胁迫处理 2 h、6 h、12 h、1 d、2 d 和 3 d 的混合叶)		49.00	13.12	15.10	9.16	4.70	4.21	5.20	8.17

## 讨 论

本文 EST 重复次数最多的是参与光合作用的关键酶——核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶小亚基, 共 161 次, 占总测序量的 6.0%, 这与西瓜叶(Ok 等 2000)和结球白菜前期心叶(高瑞娟等 2004)结果一致, 其中核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶小亚基在西瓜叶片中占 4.8%, 在结球白菜前期心叶中占 1.5%。盐胁迫会损伤植物的光合系统, 导致植物光合效率降低, 保护修复光合系统可能是植物能在盐碱逆境条件下生存的关键条件之一, 且西伯利亚蓼叶为旱生叶结构特征, 栅栏组织细胞中叶绿体含量高, 增加了光合作用面积(陆静梅和李建东 1994; 李正理 1981), 这可能与西伯利亚蓼混合叶中参与光合作用基因比率高有关。

不同植物的耐盐方式不同, 与其他盐胁迫下耐盐植物 cDNA 文库分析比较(表 4)表明, 盐胁迫下西伯利亚蓼和其他耐盐植物的基因表达有很大区别, 对西伯利亚蓼混合叶 cDNA 文库的分析结果表明, 参与代谢、能量和光合作用组分占主要部分(77.22%), 其中西伯利亚蓼参与代谢的基因达到了 49%, 远远超过了冰叶日中花(0 h, 5.50%; 30 h, 4.67%; 48 h, 9.63%) (Kore-eda 等 2004)、紫杆柽柳(19.72%) (Wang 等 2006)、碱茅(18.84%) (Wang 等 2007)和二色补血草(18.74%) (Wang 等 2008), 而西伯利亚蓼参与细胞防御和救援的基因仅占 4.12%, 均低于冰叶日中花(0 h, 6.61%; 30 h, 8.48%; 48 h, 15.1%)、紫杆柽柳(20.19%)、盐芥(13.83%) (Wang 等 2004)、碱茅(9.66%)和二色补血草(12.20%)。吕艳芳等(2006)对西伯利亚蓼 3%  $\text{NaHCO}_3$  胁迫处理后, 叶部  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  离子含量及  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比值变化平缓, 而茎部  $\text{Na}^+$  含量迅速增加,  $\text{K}^+$  离子含量下降,  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比值变化明显, 这说明 3%  $\text{NaHCO}_3$  胁迫处理对西伯利亚蓼叶部影响较小, 而茎部在抵御盐胁迫中发挥着重要作用, 因此盐胁迫下叶部参与细胞防御和救援的基因较少, 同时也说明西伯利亚蓼与冰叶日中花、紫杆柽柳、碱茅和二色补血草等植物抵御盐碱胁迫机制有一定的差异。

根据盐生植物抗盐机制及其形态结构和生态学特征, 可将盐生植物分为真盐生植物、泌盐盐生植物和假盐生植物 3 种类型, 二色补血草、紫杆柽柳属于泌盐盐生植物, 从表 4 中可以看出,  $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  胁迫处理 48 h 的二色补血草和紫杆柽柳在

参与代谢、蛋白合成和信号转导的基因所占比例大致相同, 说明在盐胁迫下二色补血草和紫杆柽柳的耐盐机制有相似之处。碱茅属于假盐生植物, 而盐芥属于真盐生植物, 由于真盐生植物主要分布在高盐环境中, 一定土壤盐分能够促进其生长, 是盐生植物中最耐盐的一类, 根据我们的野外观察与室内的耐盐实验结果, 以 3%  $\text{NaHCO}_3$  连续浇灌的西伯利亚蓼 1 个月以上仍可正常生长, 且用 1%  $\text{NaHCO}_3$  连续浇灌西伯利亚蓼 1 个月比不经  $\text{NaHCO}_3$  浇灌处理的植株长势更好, 说明西伯利亚蓼的耐盐能力更接近真盐生植物, 并且西伯利亚蓼叶肉细胞具有发达的中央液泡, 有助于降低盐分对植物的伤害, 而且根和茎部导管分布频率高, 有利于在短暂的雨季进行较高的代谢活动和蒸腾作用(李正理 1981; 陆静梅和李建东 1994)。冰叶日中花耐盐的主要途径是在盐胁迫下增加水分利用效率, 在盐胁迫下把光合作用模式从  $\text{C}_3$  转换到  $\text{CAM}$  模式(Cushma 等 1989), 从表 4 也发现胁迫处理的冰叶日中花中参与光合作用的基因也随着胁迫时间的延长显著减少(0 h, 27.60%; 30 h, 12.72%; 48 h, 7.41%)。由此可见, 不同耐盐植物的耐盐机制不同, 这也是可能导致不同物种间在盐胁迫时基因表达规律不同的一个原因。

## 参考文献

- 杜军华, 范平, 马永贵, 刁治民(2003). 青海湖湖滨滩地西伯利亚蓼和水麦冬叶肉细胞超微结构的研究. 草业科学, 20 (1): 12~15
- 高瑞娟, 戴大鹏, 马荣才, 曹鸣庆, 晏月明, 王亚东, 任世军, 郭新宇(2004). 结球白菜结球前期基因表达序列标签(EST)分析. 农业生物技术学报, 12 (1): 24~29
- 李正理(1981). 旱生植物的形态和结构. 生物学通报, 4: 9~12
- 刘关君, 王大海, 郭晓瑞, 杨传平, 冯昕, 张波(2004). 用 SDS-PAGE 研究  $\text{NaHCO}_3$  处理后西伯利亚蓼不同部位蛋白表达的变化. 植物研究, 24 (3): 361~365
- 陆静梅, 李建东(1994). 西伯利亚蓼解剖结构的扫描电镜观察. 东北师大学报(自然科学版), (3): 83~87
- 吕艳芳, 王大海, 刘关君, 杨传平, 周颖(2006). 盐碱胁迫下西伯利亚蓼体内无机离子的变化. 广西植物, 26 (3): 304~307
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2003). 胡杨、柽柳总 RNA 提取方法的建立. 东北林业大学学报, 31 (5): 99~100
- 吴海龙, 万秋红, 方盛国, 张林源, 夏经世, 钟震宇(2007). 麋鹿血液 cDNA 文库的构建. 兽类学报, 27 (4): 380~384
- Cushma JC, Meyer G, Michalowski CB, Schmitt JM, Bohnert HJ (1989). Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. Plant Cell, 1: 715~725

- Das S, Bose A, Ghosh B (1995). Effect of salt stress on polyamine metabolism in *Brassica campestris*. *Phytochemistry*, 39 (2): 283~285
- Faccioli P, Pecchioni N, Cattivelli L, Stanca AM, Terzi V (2001). Expressed sequence tags from cold-acclimatized barley can identify novel plant genes. *Plant Breed*, 120: 497~502
- Kore-eda S, Cushman MA, Akselrod I, Bufford D, Fredrickson M, Clark E, Cushman JC (2004). Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Gene*, 341 (27): 83~92
- Luo M, Liu JH, Mohapatra S, Hill RD, Mohapatra SS (1992). Characterization of a gene family encoding abscisic acid and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *J Biol Chem*, 267 (22): 15367~15374
- Mehta PA, Sivaprakash K, Parani M, Venkataraman G, Parida AK (2005). Generation and analysis of expressed sequence tags from the salt-tolerant mangrove species *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. *Theor Appl Genet*, 110: 416~424
- Ok S, Chung YS, Um BY, Park MS, Bae JM, Lee SJ, Shin JS (2000). Identification of expressed sequence tags of watermelon (*Citrullus lanatus*) leaf at the vegetative stage. *Plant Cell Rep*, 19 (9): 932~937
- Qutob D, Hraber PT, Sobral BWS, Gijzen M (2000). Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol*, 123: 243~253
- Redkar RJ, Locy RD, Singh NK (1995). Biosynthetic pathways of glycerol accumulation under salt stress in *Aspergillus nidulans*. *Exp Mycol*, 19 (4): 241~246
- Wang YC, Chu YG, Liu GF, Wang MH, Jiang J, Hou YJ, Qu GZ, Yang CP (2007). Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library. *J Plant Physiol*, 164: 78~89
- Wang YC, Ma H, Liu GF, Xu CX, Zhang DW, Ban QY (2008). Analysis of gene expression profile of *Limonium bicolor* under NaHCO<sub>3</sub> stress using cDNA microarray. *Plant Mol Biol Rep*, 26 (3): 241~254
- Wang YC, Yang CP, Liu GF, Jiang J, Wu JH (2006). Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of *Tamarix androssowii*. *Plant Sci*, 170: 28~36
- Wang ZL, Li PH, Fredricksen M, Gong ZZ, Kim CS, Zhang C, Bohnert HJ, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM et al (2004). Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. *Plant Sci*, 166 (3): 609~616
- Zhang L, Ma XL, Zhang Q, Ma CL, Wang PP, Sun YF, Zhao YX, Zhang H (2001). Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. *Gene*, 267 (2): 193~200