

苗永美, 宁宇, 沈佳, 等. 黄瓜 LDC 基因克隆及逆境胁迫下的表达分析 [J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(3): 8-14

黄瓜 LDC 基因克隆及逆境胁迫下的表达分析

苗永美^{1,2}, 宁宇¹, 沈佳¹, 贾利¹, 李季¹, 姜群峰¹, 翁益群³, 陈劲枫^{1*}

(1. 南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 安徽科技学院生命科学院, 安徽 凤阳 233100; 3. 美国威斯康星大学园艺系, 威斯康星 麦迪逊 53706)

摘要: 利用 RT-PCR 技术从耐冷黄瓜品种 ‘Chipper’ 中克隆鉴定了 1 个赖氨酸脱羧酶(LDC) 基因的 ORF, 命名为 *CsLDC*, 在 GenBank 中的登录号为 KC202438. 该基因 ORF 全长为 645 bp, 编码 215 个氨基酸的肽链, 相对分子质量为 23 625. 2, 等电点为 5. 99. BLASTp 发现该蛋白具有赖氨酸脱羧酶保守序列, 与毛果杨的同源性最高, 进化树分析表明 *CsLDC* 与矮牵牛 LDC 亲缘关系最近; 该蛋白无信号肽但存在一个明显跨膜区, 并存在多个蛋白质位点; SWISS-MODEL 预测该蛋白的 3D 结构与拟南芥 *At2G37210* 基因编码赖氨酸脱羧酶蛋白 2a33 相似性为 88. 89%. 荧光实时定量 PCR 检测结果显示, *CsLDC* 是低温和盐快速响应基因, 在处理 4 h 时表达量达峰值, 分别是处理前的 4. 07 和 2. 03 倍, 之后下降到原来水平, 并长时间维持稳定; 而干旱胁迫对该基因表达起到下调作用, 24 h 时又恢复到原来水平, 推测 *CsLDC* 在黄瓜耐低温和耐盐中起重要作用。

关键词: 黄瓜; 赖氨酸脱羧酶(LDC); 基因克隆; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: S642. 2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2013)03-0008-07

Cloning of *LDC* gene and its expression analysis under several adversity stresses from *Cucumis sativus* L.

MIAO Yongmei^{1,2}, NING Yu¹, SHEN Jia¹, JIA Li¹, LI Ji¹, LOU Qunfeng¹, WENG Yiqun³, CHEN Jinfeng^{1*}

(1. College of Horticulture/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; 3. Department of Horticulture, University of Wisconsin, Madison 53706, USA)

Abstract: The open reading frame(ORF) of lysine decarboxylase(LDC) was isolated and identified from chilling tolerance cucumber ‘Chipper’ using RT-PCR technique, named as *CsLDC*. The accession number was KC202438 in GenBank. The gene had an ORF of 645 bp encoding a protein of 215 amino acids, had a relative molecular mass of 23 625. 2, and its isoelectric point was 5. 99. The putative amino acid sequence only contained LDC conserved sequence, and shared high identity with LDC in *Populus trichocarpa*. *CsLDC* had the nearest genetic relationship with *Petunia × hybrida* by phylogenetic tree analysis. The predicted protein had no signal peptide, but had an obvious transmembrane domain and multifunction site. The similarity of forecasting 3D structure of *CsLDC* with SWISS-MODEL and that of 2a33 encoded by *AtLDC*(*At2G37210*) was 88. 89%. The responses of *CsLDC* expression to low temperature and salt stress was quick by quantitative real-time PCR, and the expression of *CsLDC* under treatments for 4 h reached the peak, which were 4. 07 and 2. 03 times of that controls, then dropped to the previous levels and maintained stable. But *CsLDC* was inhibited by drought, and got back the original when treated for 24 h. It was speculated that the *CsLDC* gene might be involved in the defence against low temperature and salt resistance in cucumber seedling.

Key words: cucumber; lysine decarboxylase(LDC); gene cloning; bioinformatics; gene expression

黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 是世界性蔬菜, 也是我国设施温室栽培的主要蔬菜之一。黄瓜喜温不耐冷的特性限制了早春和晚秋的露地及保护地栽培。关于黄瓜在低温下形态生理的变化、缓解调控措施及黄瓜耐冷遗传方面的研究较多, 低温会对黄瓜的光合系统、抗氧化系统及细胞膜等造成伤害, 从而表现出冷害症状^[1]; 有些生理活性物质如 Ca^{2+} 、水杨酸、脱落酸及多胺均能一定程度上缓解低温对黄瓜的伤害^[2-3]; 黄瓜耐冷遗传性研究表明, 黄瓜的耐冷性受环境影响较小, 主要由基因型决定, 且是多基因控制的数量性状, 并且在发芽期、苗期、成株期可能由不同基因控制^[6-9]。随着分子生物技术的发展, 从分子水平揭示黄瓜的耐冷性并通过生物技术手段提高黄瓜的耐冷性是将来主要育种目标之一。目前已从黄瓜分离

收稿日期: 2013-02-05

基金项目: 国家 973 计划项目(2009CB119001); 国家自然科学基金重点项目(30830079)

作者简介: 苗永美, 博士研究生。* 通信作者: 陈劲枫, 教授, 博导, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn。

到少数与耐冷相关的基因或特异片段: 康国斌等^[10]通过差异显示技术克隆了一个低温锻炼中特异表达的基因 *CCR18*; 逯明辉等^[11]采用 cDNA-AFLP 技术从萌芽期低温处理的萌动种子中分离到了一条特异片段, 命名为 *cctr132*, 分析发现含有赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, *LDC*) 的保守序列。*LDC* 的生理功能是催化赖氨酸形成尸胺(cadaverine, *Cad*), 关于 *LDC* 与逆境的关系鲜有报道。在多胺研究中, *Cad* 研究较少, 而其他几种多胺如腐胺、精胺在抗逆中的作用研究较多^[12]。因此本研究从 *LDC* 基因克隆入手, 根据 *cctr132* 的序列信息和黄瓜基因组数据库信息, 从美国威斯康星大学引进的相对较为耐冷黄瓜品种 ‘Chipper’ 幼苗叶片 cDNA 中克隆了 *CsLDC*, 分析了该基因的生物信息学, 将序列信息在 GenBank 中进行注册, 并就该基因在 3 种逆境下的表达进行了分析, 为以后通过转基因手段详细研究该基因及催化产物 *Cad* 的生物学功能及调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料为美国生态型黄瓜品种 ‘Chipper’, 该材料经过 Chung 等^[13] 4 °C 处理 5.5 h 缓苗 5 d 后叶片受冷害情况观察统计发现, 其冷害指数为 2, 具有一定的耐冷性, 由南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室 2010 年从美国引进。

Trizol 试剂、PCR 相关试剂、M-MLV 反转录试剂盒、DNase I 试剂盒及克隆载体 pMD19-T 均购自 TaKa-Ra 公司; 凝胶回收试剂盒购自杭州爱思进生物技术公司; 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

1.2 基因 ORF 的克隆

黄瓜种子经过浸种和催芽后, 播种于钵钵中育苗, 昼夜培养温度 25 °C / 18 °C, 光周期 12 h / 12 h。待幼苗长至 2 ~ 3 片真叶时 4 °C 低温处理, 处理 24 h 后取嫩叶按 Trizol 法提取总 RNA, 参照 DNase I 试剂盒说明消除微量 DNA 污染, 用反转录试剂盒(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 合成 cDNA 第 1 链, 作为模板用于 PCR 扩增。根据黄瓜基因数据库设计引物, *CsLDC*-F(5'-GCGAGATCTATGGAGGGTTTGAT-TATGAATC-3') 和 *CsLDC*-R(5'-TATACTAGTCTAGAGATAGCCAAGCTGCTCT-3'), 下划线分别为 *Bgl* II 和 *Bcu* I 识别序列, 引物委托上海英骏生物技术有限公司合成。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min, 10 °C 终止。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 按凝胶回收试剂盒说明书回收目的片段, 并将其克隆在 pMD19-T 载体上。热激法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑阳性克隆并进行菌液 PCR 鉴定, 随机挑取阳性克隆送南京金斯瑞公司测序。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0 软件进行氨基酸序列推测和比对, 利用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 BLASTp 进行蛋白预测, 用 specialized BLAST(CDD search) 完成保守区域分析。系统进化树由 MEGA5.0 构建, 采用邻接法(Neighbor Joining Method) 作图, 重复计算次数设为 1 000。使用 ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白质理化性质分析; 用依靠跨膜蛋白数据库 Tmbase 的 TM-pred 工具(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析蛋白的跨膜区和跨膜方向; 在 <http://www.predictprotein.org> 预测蛋白的二级结构及蛋白位点; 利用在线工具 Smart(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质结构域; 用 Signal 4.1 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 亚细胞定位采用 PSORT-B Prediction(<http://www.psort.org/psortb>) 进行分析; 用 Swiss-Model Workspace(<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行 3D 结构预测。

1.4 基因的表达分析

按 1.2 节的方法培养 ‘Chipper’ 黄瓜幼苗至二叶一心时期时, 分别进行 4 °C 低温、0.1 mol·L⁻¹ NaCl 盐胁迫和 300 g·L⁻¹ PEG6000 干旱处理, 在处理 2、4、8、12 和 24 h 时分别取叶片提取 RNA, 并进行反转录用于 qRT-PCR。根据已获得的 *CsLDC* 的 ORF 序列设计 qRT-PCR 引物(*qLDC*-F: 5'-TCATAACCTGGGCT-CAAC-3'; *qLDC*-R: 5'-AAGGCACATACTCCTCTAAC-3'), 扩增片段长度为 195 bp。选取黄瓜看家基因 *EF1a* 作为内参, 引物序列为 *EF1a*-F: 5'-ACTGTGCTGCTCCTCATTATTG-3'; *EF1a*-R: 5'-AGGGTGAAAGCAAGAA-GAGC-3'。试验在 Bio-Rad iCycler iQ 实时定量 PCR 仪上进行, 每个样品设 3 次重复。反应采用 20 μ L 体系, 包括 1 μ L cDNA, 上、下游引物各 1 μ L, 10 μ L iQ™ SYBR® Green Supermix(Bio-Rad), 7 μ L ddH₂O。两步法扩增, 具体程序为: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 然后进行熔解曲线分析。

将正常条件下 *CsLDC* 的表达量设为 1,按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算出基因的相对表达量。采用 SPSS 18.0 进行方差分析,采用 Excel 2003 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 *CsLDC* 的克隆及序列分析

以 cDNA 第 1 链为模板,用引物 *LDC-F/LDC-R* 扩增出了 1 条长度约 650 bp 的条带(图 1)。将目的片段回收、克隆及测序,得到了长度为 645 bp 的编码阅读框,编码 215 个氨基酸。用 DNAMAN 6.0 对测序结果进行拼接并推测氨基酸序列(图 2),BLASTp 结果发现该蛋白具有赖氨酸脱羧酶保守序列(61 ~ 191 位),将该基因命名为 *CsLDC*,该序列在 GenBank 中的登录号为 KC202438。黄瓜与其他 18 种植物的 LDC 的氨基酸序列相似性在 70% ~ 95% 之间,其中与毛果杨 LDC 同源性最高(图 3)。用 MEGA 5.0 软件对黄瓜 LDC 的氨基酸序列与其他 18 种植物的 LDC 蛋白的氨基酸序列进行进化树分析(图 4),结果显示 19 种植物的 LDC 蛋白具有相同的进化起源,黄瓜与矮牵牛的进化亲缘关系最近。

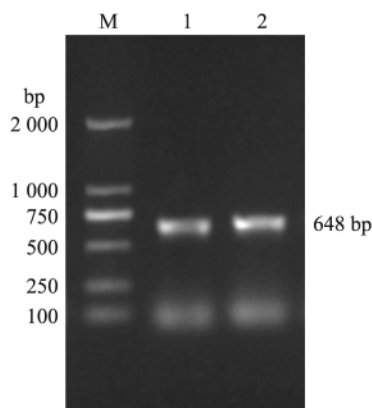


图 1 *CsLDC* 开放阅读框的扩增

Fig. 1 Amplification of *CsLDC* open reading frame

M. DNA 标准品 DNA marker(DL2000); 1, 2. PCR 扩增产物
The amplification of PCR

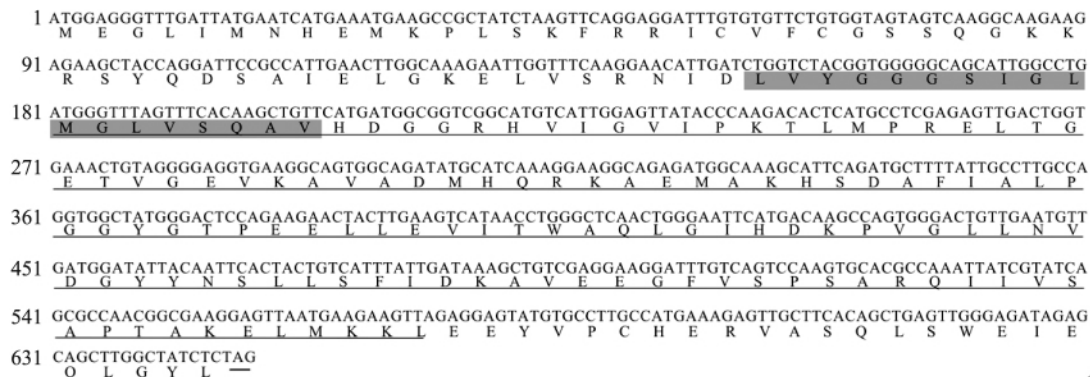


图 2 *CsLDC* 编码区的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *CsLDC* coding region and deduced amino acid sequence

下划线部分为基因的保守区段,灰色部分为跨膜区域。

Underlined region stands for the conserved domain, and gray stands for transmembrane domain.

2.2 黄瓜 *LDC* 基因编码蛋白的生物信息学分析

用 ProtParam 工具预测 *CsLDC* 编码蛋白的基本理化性质,发现该蛋白含有 215 个氨基酸,包括 20 种基本氨基酸,分子式为 $C_{1051}H_{1682}N_{284}O_{311}S_{11}$,相对分子质量为 23 625.2,等电点(pI)为 5.99,其水溶液在 280 nm 处的消光系数约为 21 555,该蛋白的不稳定系数为 42.97,不稳定。脂肪系数是 96.09,平均亲水系数为 -0.098,具有亲水性。利用 TMpred 工具预测蛋白的跨膜区和方向表明,该蛋白只存在一个明显跨膜区,51 ~ 68 区域是负责由外向内和由内向外的跨膜区,呈牢固的螺旋结构。通过在线预测,该蛋白二级结构中螺旋占 40.7%、扩展链占 16.7%、转角占 42.8%,同时还发现可能存在蛋白位点或基序:1 处环化腺/鸟苷酸依赖的蛋白激酶磷酸化位点(29KKRS),2 处蛋白激酶 C 磷酸化位点(173SAR 和 183TAK),6 处酪氨酸蛋白激酶 II 磷酸化位点(32SYQD、36SAIE、92TVGE、125TPEE、159SFID 和 183TAKE),1 处酪氨酸激酶磷酸化位点(47RNIDLVI),3 处 N-豆蔻酰化位点(3GLIMNH、24GSSQK 和 55GGSIGL)和 1 处酰胺化位点(27QGKK)。利用在线工具 Smart 分析结构域,发现该蛋白中只存在赖氨酸脱羧酶家族中的 1 个保守结构域(第 61 ~ 191 位)。该蛋白没有信号肽,定位于细胞质内,属于不分泌型蛋白。利用基于同源建模的分析工具 SWISS-MODEL 进行 3D 结构预测,在提交序列进行模板识别后,从蛋白质数据库(PDB)中选择

2a33B 为模板,运用自动同源建模方式,通过 X-射线晶体衍射比较发现,目标蛋白与拟南芥 *At2G37210* 基因编码赖氨酸脱羧酶蛋白 2a33 相似性为 88.89%,E 值为 $2.03e-87$,说明该蛋白是赖氨酸脱羧酶。

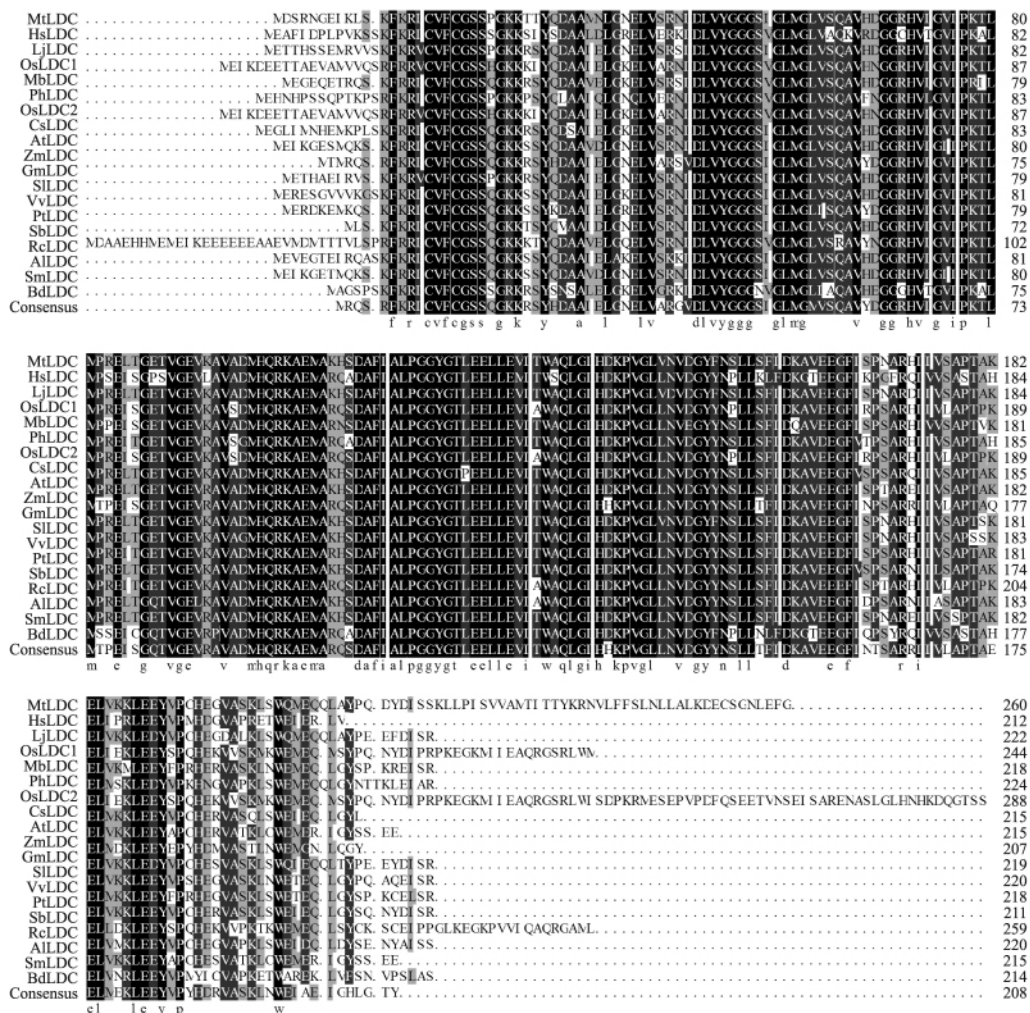


图3 黄瓜 LDC 氨基酸序列与其他植物 LDC 同源比对

Fig.3 An alignment comparison of CsLDC amino acid sequence homologous with other plants LDC

1) MtLDC. 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* XP_003625636.1; HsLDC. 蛇足石杉 *Huperzia serrata* AFG28179.1; LjLDC. 百脉根 *Lotus japonicus* AFK40158.1; OsLDC1. 粳稻 *Oryza sativa* Japonica Group B9F166.1; MbLDC. 野芭蕉 *Musa balbisiana* BAG70979.1; PhLDC. 矮牵牛 *Petunia × hybrida* BAK52670.1; OsLDC2. 籼稻 *Oryza sativa* Indica Group EAY8677.1; CsLDC. 黄瓜 *Cucumis sativus* KC202438; AtLDC. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* NP_181258.2; ZmLDC. 玉米 *Zea mays* NP_001169307.1; GmLDC. 大豆 *Glycine max* NP_001240198.1; SILDC. 番茄 *Solanum lycopersicum* NP_001244911.1; VvLDC. 葡萄 *Vitis vinifera* XP_002285246.1; PtLDC. 毛果杨 *Populus trichocarpa* XP_002326355.1; SbLDC. 高粱 *Sorghum bicolor* XP_002446792.1; RcLDC. 蓖麻 *Ricinus communis* XP_002519528.1; AILDC. 琴叶拟南芥 *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* XP_002881496.1; SmLDC. 江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* XP_002972215.1; BdLDC. 二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* XP_003574067.1

2) 黑色背景表示氨基酸序列一致性为 100%,灰色背景表示一致性高于 75%,浅灰色背景表示一致性高于 50%。

Black background indicates 100% sequence homology, gray background indicates amino acid with $\geq 75\%$, and light gray background indicates amino acid with $\geq 50\%$.

2.3 CsLDC 在不同逆境胁迫下的表达分析

由图 6 可见, *CsLDC* 基因对低温、盐和干旱 3 种逆境胁迫的响应不同,低温下的响应变化最强,其次是盐胁迫,响应变化最小的是干旱胁迫。当进行 4°C 低温处理时, *CsLDC* 表达变化随时间先上调后下调,其中在处理 4 h 时表达量达峰值,是对照的 4.07 倍,随后又降低,8 ~ 24 h 内维持一个相对较稳定的水平,且与对照差异不显著。在盐胁迫下 *CsLDC* 表达趋势类似于低温处理,处理 4 h 其表达变化量达最高水平,是对照的 2.03 倍,随后又降低并维持相对稳定水平。而干旱胁迫处理的 *CsLDC* 表达明显下调,但在处理 24 h 后又达到对照时的水平。说明 *CsLDC* 是低温和盐快速响应基因,干旱会抑制该基因的表达。

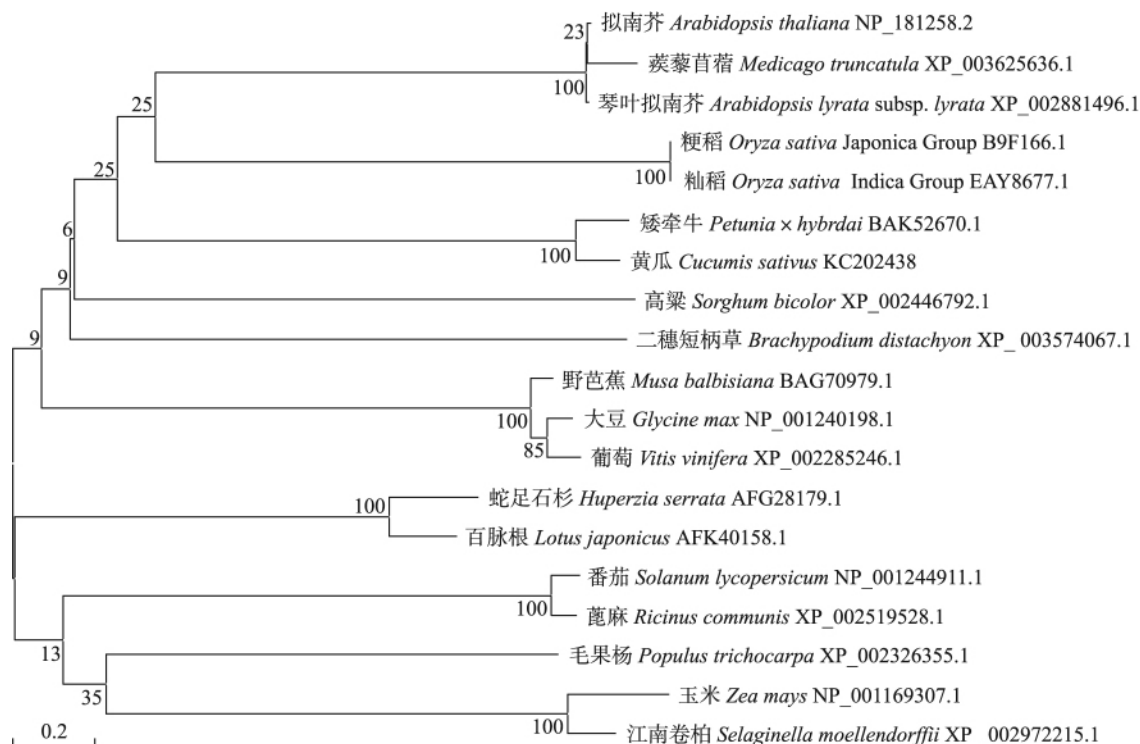


图4 CsLDC 与其他物种同源蛋白系统发育树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of CsLDC and their homologs in other plants

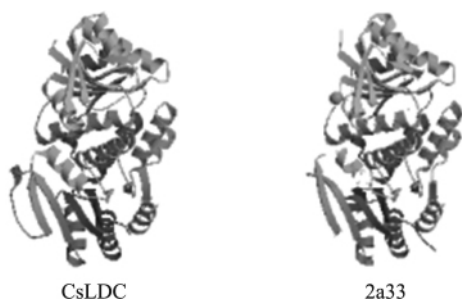


图5 利用 SWISS-MODEL 进行黄瓜赖氨酸脱羧酶 (CsLDC) 三级结构预测结果

Fig. 5 Predicted results of forecasting 3D structure of cucumber lysine decarboxylase with SWISS-MODEL

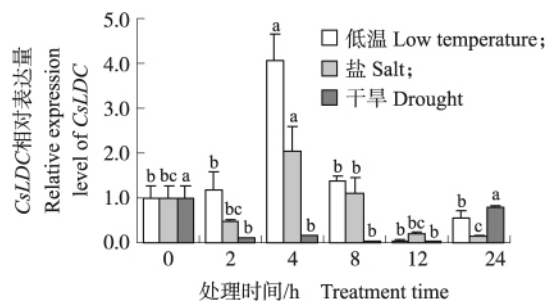


图6 3种逆境处理后CsLDC在叶片中的表达比较

Fig. 6 The comparison of CsLDC expression in leaves under three stress treatments

不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level.

3 讨论

植物受到逆境胁迫时会产生特异表达的基因^[4-15]。本试验从低温处理的黄瓜幼苗叶片中分离到了赖氨酸脱羧酶基因,该蛋白是一个保守的蛋白家族,关于植物中LDC蛋白研究报道较少。本研究比较了黄瓜与毛果杨等18种植物中LDC的氨基酸序列相似性,为70%~95%,其中与毛果杨PtLDC、拟南芥AtLDC、番茄SlLDC和大豆GmLDC的氨基酸具有较高的序列同源性。该蛋白只包含一个赖氨酸脱羧酶保守结构域,含有数个磷酸化位点及酰胺化位点,提示此蛋白可能在植物遭受胁迫时被某些蛋白激酶或因子激活。生物信息学分析表明黄瓜LDC蛋白不存在信号肽,定位于细胞质,Thomas等^[14]和Michael等^[17]通过提取分离分析证明羽扇豆中70%~80%赖氨酸脱羧酶存在于叶绿体中,同时Somnuk等^[18]利用瞬时表达技术,发现羽扇豆的LDC蛋白在拟南芥表达部位是叶绿体。分析表明本研究克隆到的CsLDC编码的蛋白存在一个明显跨膜区,推测该蛋白可能通过跨越类囊体膜,在叶绿体中执行自己的功能。本研究表明,CsLDC与拟南芥中赖氨酸脱羧酶2a33的3D结构相似性最高。

LDC催化赖氨酸脱羧形成尸胺。有研究指出LDC在豌豆根伸长区活性是其他部位的2倍,从而使根

中 Cad 含量比其他部位高 90 多倍^[9];也有研究指出 Cad 在烟草中主要在根中合成,然后运输到茎和叶部位,因此根中含量明显高于其他部位^[20]。Cad 能促进植物不定根的生长及发育^[21-23],还有研究指出尸胺还能作为信号分子关闭蚕豆保卫细胞来适应非生物胁迫^[24]。关于 *LDC* 的报道不多,逯明辉等^[1]利用 AFLP 技术从萌芽期耐冷存在差异的黄瓜中获得了 132 bp 长的赖氨酸脱羧酶部分片段,推测该基因可能在提高种子低温发芽力方面起作用。本研究从低温处理的黄瓜幼苗 cDNA 中同样分离到赖氨酸脱羧酶基因(*CsLDC*),qRT-PCR 表达分析证明了低温会上调基因的表达,说明该基因可能与黄瓜幼苗期的耐低温性也存在一定关系,同时也说明黄瓜叶片中有该基因的表达。关于盐胁迫下尸胺的变化,Kuznetsov 等^[25]研究发现冰叶日中花在受到 500 mmol·L⁻¹ NaCl 处理时,体内 Cad 含量增加;本研究中,‘Chipper’幼苗在盐胁迫处理时,*CsLDC* 的表达发生变化,呈先增加后降低的趋势。说明该基因在受到一定盐胁迫时,表达量会增加,从而可能导致其催化产物尸胺量的改变。Galiba 等^[26]通过培养基中添加甘露醇以形成渗透胁迫,研究抗旱性存在差异的小麦愈伤组织中 Cad 的变化,发现 Cad 含量只在不抗旱和其中一个抗旱材料中有了提高,中度抗旱和另一个抗旱材料中没有变化。另一研究表明,2 个抗旱差异明显的小麦品种在 PEG 渗透胁迫时,体内的尸胺含量出现先升后降趋势^[27];同时当对油菜进行渗透胁迫处理时,叶片中 Cad 含量也发生急剧增加^[28]。而在本研究中 *CsLDC* 表达对于 PEG 的响应变化先降低后升高,说明 *CsLDC* 变化可能与 Cad 变化不完全一致,或许是因为 *CsLDC* 受其他复杂转录因子调控。综上所述,低温、盐和干旱 3 种胁迫会诱导并改变 *CsLDC* 表达,说明 *CsLDC* 与黄瓜的抗逆性有一定的相关性。体内的 Cad 变化是否与 *LDC* 变化一致及该基因在生理及分子上的作用机制等有待下一步研究。

参考文献:

- [1] 闫世江,司龙亭,张建军,等. 黄瓜苗期耐低温性及相关生理指标遗传分析 [J]. 西北植物学报,2011,31(3):531-535
- [2] 李晓明,陈劲枫,逯明辉,等. 低温下钙对黄瓜幼苗抗氧化酶活性及 POD 同工酶谱的影响 [J]. 西北植物学报,2006,26(2):241-246
- [3] 刘伟,艾希珍,梁文娟,等. 低温弱光下水杨酸对黄瓜幼苗光合作用及抗氧化酶活性的影响 [J]. 应用生态学报,2009,20(2):441-445
- [4] Zhang Y, Jiang W J, Yu H J, et al. Exogenous abscisic acid alleviates low temperature-induced oxidative damage in seedlings of *Cucumis sativus* L. [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(Suppl 2): 221-228
- [5] 王学. 低温胁迫下精胺对黄瓜幼苗抗氧化酶系统及膜脂过氧化的影响 [J]. 种子,2008,27(11):33-36
- [6] 顾兴芳,封林林,张春霞,等. 黄瓜低温发芽能力遗传分析 [J]. 中国蔬菜,2002(3):5-7
- [7] 闫世江,司龙亭,马志国,等. 黄瓜苗期耐低温性及相关形态学性状的遗传分析 [J]. 沈阳农业大学学报,2008,39(1):11-14
- [8] 闫世江,司龙亭,张建军,等. 黄瓜苗期低温弱光下耐低温性主基因-多基因联合遗传分析 [J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):281-285
- [9] 卢淑雯. 黄瓜耐冷性育种研究进展 [J]. 黑龙江农业科学,2007(6):105-107
- [10] 康国斌,许勇,雍伟东,等. 低温诱导的黄瓜 *cer18* 基因的 cDNA 克隆及其表达特性分析 [J]. 植物学报,2001,43(9):955-959
- [11] 逯明辉,李晓明,陈劲枫,等. 黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达 [J]. 中国农业科学,2005,38(12):2492-2495
- [12] 陈丽芳,陆巍,孙锦,等. 外源亚精胺对盐胁迫下黄瓜幼苗光合作用和根叶碳水化合物积累的影响 [J]. 南京农业大学学报,2011,34(3):31-36. doi: 10.7685/j. issn. 1000-2030. 2011. 03. 006
- [13] Chung S M, Staub J E, Fazio G. Inheritance of chilling injury: a maternally inherited trait in cucumber [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2003, 128(4): 526-530
- [14] 李为观,杨寅桂,魏跃,等. 热胁迫下黄瓜幼苗生理生化指标变化及 *CSHSP70* 基因表达 [J]. 南京农业大学学报,2010,33(3):47-50. doi: 10.7685/j. issn. 1000-2030. 2010. 03. 009
- [15] 陈海旺,侯喜林,李英,等. 冷胁迫下不结球白菜 *BcSLAC1* 基因克隆和表达分析及 ABA 和 H₂O₂ 在调控气孔运动中的作用 [J]. 南京农业大学学报,2011,34(4):8-12. doi: 10.7685/j. issn. 1000-2030. 2011. 04. 002
- [16] Thomas H, Schoofs G, Michael W. A chloroplast-localized lysine decarboxylase of *Lupinus polyphyllus*: the first enzyme in the biosynthetic pathway of quinolizidine alkaloids [J]. Febs letters, 1980, 115(1):35-38
- [17] Michael W, Thomas H. Activation of chloroplast-localized enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis by reduced thioredoxin [J]. Plant Cell Reports, 1981, 1:6-9
- [18] Somnuk B, Kae K, Emi I, et al. Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae [J]. The Plant Cell, 2012, 24: 1202-1216
- [19] Bakhanashvili M, Ickson I, Apelbaum A. Cadaverine formation by specific lysine decarboxylation in *Pisum sativum* seedlings [J]. Plant Cell Reports, 1985, 4: 297-299
- [20] Bagni N, Creus J, Pistocchi R. Distribution of cadaverine and lysine decarboxylase activity in *Nicotiana glauca* plants [J]. Journal of Plant Physiology, 1986, 125(1):9-15
- [21] Niemi K, Haggman H, Sarjala T. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation

- in Scots pine *in vitro* [1]. Tree Physiol, 2002, 22: 373 – 381
- [2] Gamarnik A, Frydman R. Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds [J]. Plant Physiol, 1991, 97: 778 – 785
- [3] Cassan F, Maiale S, Masciarelli O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation [J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45: 12 – 19
- [4] Liu K, Fu H, Bei Q, et al. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements [J]. Plant Physiol, 2000, 124: 1315 – 1325
- [5] Kuznetsov V, Shorina M, Aronova E, et al. NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress [J]. Plant Science, 2007, 172: 363 – 370
- [6] Galiba G, Srmon-Sarkadi L, Salgo A, et al. Genotype dependent adaptation of wheat varieties to water stress *in vitro* [J]. Journal of Plant Physiology, 1989, 134(6): 730 – 735
- [7] 黄久常, 王辉, 夏景光. 渗透胁迫和水淹对不同抗旱性小麦品种幼苗叶片多胺含量的影响 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 1999, 33(2): 259 – 262
- [8] Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F. Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment [J]. Plant Growth Regulation, 1997, 21: 153 – 163

责任编辑: 范雪梅