

庄倩倩,陈少鹏,刘洪章.紫萼玉簪 *HvGASA*、*HvFAD* 基因的克隆及表达分析[J].江苏农业科学,2019,47(4):55-60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.012

紫萼玉簪 *HvGASA*、*HvFAD* 基因的克隆及表达分析

庄倩倩^{1,2}, 陈少鹏^{1,2}, 刘洪章¹

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林长春 130118; 2. 吉林农业科技学院农学院, 吉林吉林 132101)

摘要:利用 RACE 技术、Genome Walking 技术及 PCR 技术,从紫萼玉簪中克隆得到长度分别为 336、1 320 bp 的 *GASA* 基因 *HvGASA* 和脂肪酶去饱和酶基因 *HvFAD* 的 cDNA 全长序列,分别编码 111、399 个氨基酸,其中 *HvFAD* 基因所编码的蛋白为跨膜蛋白。qRT-PCR 分析结果表明,2 条基因随自然地温的降低均上调表达,而且在地温降至 3 ℃ 时发生剧烈的表达量变化,说明 *HvGASA*、*HvFAD* 基因与紫萼玉簪的抗寒性具有密切关系。

关键词:紫萼玉簪;*HvGASA* 基因;*HvFAD* 基因;基因克隆;基因表达;抗寒性

中图分类号:S682.1⁺90.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)04-0055-06

紫萼玉簪(*Hosta ventricosa*)又称紫花玉簪、紫玉簪,为百合科玉簪属多年生宿根草本植物,在我国主要分布于东北、华东、西南、广西等地^[1],自然生长于林下、溪边。紫萼玉簪花紫色、无香味,叶卵圆形,有较高的观赏价值,作为重要的观赏植物被广泛应用于园林地被、花境及盆栽。玉簪属其他植物观赏性状丰富,如具有白色花朵、花朵具有香气等,但这些玉簪属植物多数不耐寒,无法在东北地区自然越冬,这严重阻碍了玉簪属植物在东北地区的应用推广,然而紫萼玉簪具有极耐寒的特性,是唯数不多的能够在东北地区自然越冬的玉簪属植物之一,故推测紫萼玉簪具有其他玉簪属植物所不具备的抗寒相关基因及抗寒机理。本研究通过探究紫萼玉簪中与抗寒功能相关的基因,为今后摸清紫萼玉簪的抗寒机理及利用分子育种方法进行抗寒玉簪新品种培育提供参考。

GASA(gibberellic acid-stimulated *Arabidopsis*) 基因家族最早在拟南芥中发现^[2],后来在很多其他植物中发现了与其相似的蛋白,如水稻(*Oryza sativa*) *OsGASR1* 基因和 *OsGASR2* 基因^[3]、草莓(*Fragaria ananassa*) *GAST1-like* 基因、矮牵牛(*Petunia hybrida*) *GIP* 基因^[4]等。*GASA* 编码基因数量众多,大多数成员受赤霉素(GA)调控^[5]。*GASA* 蛋白又称 Snakin 蛋白,是一类 CRP(cysteine-rich peptides)蛋白。CRP 蛋白是植物中富含半胱氨酸的小分子多肽,其在植物生长发育和逆境反应中具有重要的作用^[6]。*GASA* 蛋白中富含半胱氨酸,半胱氨酸是形成二硫键所必需的,而二硫键的形成对维持蛋白质空间构象的稳定具有非常重要的作用。*GASA* 蛋白在低温、高盐等非生物胁迫应答中具有重要作用,此外也参与多项生长发育活动,如种子萌发、根的形成、茎的生长、花和果实发

育及虫害、病菌等生物胁迫,在激素信号转导等过程中亦发挥重要的调控作用^[7]。

脂肪酶去饱和酶(fatty acid desaturase, *FAD*)是不饱和脂肪酸合成途径中重要的酶物质,*FAD* 基因是油酸合成的关键酶基因。当植物处于低温环境时,*FAD* 通过调节脂肪酸不饱和度来调节膜的流动性^[8],保护膜结构不受破坏,从而达到提高植物抗寒性的作用。目前 *FAD* 基因在许多植物中被发现及研究,其中有关抗寒性研究的植物种类也很多,包括马齿苋、棉花、橄榄、白芸豆、马铃薯等^[9]。此外,不饱和脂肪酸与植物的抗旱^[10]、耐盐^[11]、抗重金属、抗病、细胞识别以及组织免疫等方面也密切相关^[12-13]。

1 材料与方法

1.1 材料采集与处理

从 2015 年 9 月 15 日至 11 月 24 日,随着长春地区由秋季转入冬季,气温及地温逐渐降低,每隔 7 d 于当日 07:00 进行采样,每次采集的样品依次编号为 A~K。每次采样对校园内同地点种植的紫萼玉簪根系进行采集,并测定实时地温(距离地表 10 cm 处),记录当天最高及最低气温,将根系泥土用去离子水冲洗干净,吸干表面的水分,液氮速冻后置于 -80 ℃ 冰箱保存,具体采样的气候条件见表 1。

表 1 紫萼玉簪自然降温采样气候条件

| 采样编号 | 采集日期 (月-日) | 实时地温 (℃) | 最高气温 (℃) | 最低气温 (℃) |
|------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| A | 09-15 | 17.2 | 28 | 15 |
| B | 09-22 | 16.8 | 27 | 16 |
| C | 09-29 | 12.4 | 19 | 7 |
| D | 10-06 | 11.5 | 24 | 13 |
| E | 10-13 | 8.5 | 13 | 3 |
| F | 10-20 | 5.7 | 10 | -1 |
| G | 10-27 | 2.6 | 7 | -3 |
| H | 11-03 | 3.0 | 15 | 7 |
| I | 11-10 | 2.4 | 1 | -6 |
| G | 11-17 | 1.2 | -3 | -9 |
| K | 11-24 | -0.4 | -11 | -16 |

收稿日期:2018-02-25

基金项目:国家农业科技成果转化项目(编号:2014GB2B100007);吉林农业科技学院重点学科建设项目(编号:吉农院合字[2015]第 X089 号);吉林省大学生科技创新科研项目(编号:吉农院合字[2017]第 2017093 号)。

作者简介:庄倩倩(1984—),女,吉林临江市,博士,讲师,主要从事玉簪抗寒性研究。E-mail:zhuangqian_0156@sina.com。

通信作者:刘洪章,博士,教授,博士生导师,主要从事长白山特色植物资源研究。E-mail:lh999@126.com。

1.2 DNA 提取、总 RNA 提取、完整性检验及反转录 cDNA

紫萼玉簪根系总 DNA 提取采用改良 CTAB 法^[14],总 RNA 提取使用 RNeasy Pure 植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA、RNA 的完整性、降解程度及是否存在污染,采用超微量紫外分光光度计测定二者浓度。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司)将提取的紫萼玉簪根系 RNA 进行反转录 cDNA,制备好的 cDNA 置于 -20 ℃ 冰箱保存。

1.3 HvGASA、HvFAD 基因的克隆

笔者所在课题组前期进行了紫萼玉簪转录组测序工作,建立了以抗寒性为基础的转录组数据库,测序材料为紫萼玉簪的根系。在转录组测序数据库中筛选出 2 条功能注释与 GASA、FAD 相关的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)进行下一步分析,序列在测序数据库中的 ID 分别为

c18557.graph_c0、c60584.graph_c0。在美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information,NCBI)数据库中进行 BLASTp 比对,发现 c18557.graph_c0 蛋白序列与石刁柏(*Asparagus officinalis*)的 AoGASA 基因(XP_02027448.1)及大蒜(*Allium sativum*)AsGASA 基因(AEX55233.1)分别具有 66%、59% 的一致性,故命名为 HvGASA 基因;c60584.graph_c0 蛋白序列与石刁柏的脂肪酸去饱和酶 AoFAD(XP_0202441744.1)具有 85% 的一致性,故命名为 HvFAD 基因。

以紫萼玉簪根系 cDNA 为模板,采用 3' RACE 及 5' Genome Walking 的方法进行 HvGASA、HvFAD 基因 ORF 全长克隆,试验具体操作方法详见 3' - Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase(TaKaRa 公司)使用说明书及 Genome Walking Kit(TaKaRa 公司)使用说明书。使用 Primer 5.0 进行引物设计,并委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成及测序,引物信息见表 2。

表 2 PCR 引物序列

| 引物名称 | 序列 (5'→3') | 引物名称 | 序列 (5'→3') |
|----------------|---------------------------------|----------------|------------------------------|
| HvGASA - outer | ATGGCTTCGTCTCGCTTCTATCTTG | HvFAD - F | ATGGCTTCGTCTCGCTTCTATCTTG |
| HvGASA - inter | CATCAGAAGTTGACAAGGGAAAGCA | HvFAD - R | CTAAGGGCATTGTGCGCGCG |
| HvFAD - outer | CCGTGGATGGGCTATCACTTCTG | HvGASA - F | ATGGCGTGCAGGCTCGCA |
| HvFAD - inter | TCTCTCTGAAGACTCTCAACCAATC | HvGASA - R | TGTATACTCAGGCATGACCTTCTTGAGA |
| HvFAD - sp3 | GAAGGACCAAGTAGCAATGAGAGTTTGATCC | HvGASA - Q - F | GGCTTCGTCTCGCTTCTATCTTG |
| HvFAD - sp2 | GAAGCCATAACTTTTCGCACATCTCCTG | HvGASA - Q - R | ATGCTCCTCCGCAGTTCAAG |
| HvFAD - sp1 | CTGACTTCCAAGCTTTCTGATCATCAAT | HvFAD - Q - F | GGCATCATTTGCTTCAGACGA |
| | | HvFAD - Q - R | AAGGCAAGCACAGTATCGTCAG |

1.4 生物信息学分析

利用 Ex PASy - Prot Param 和 Ex PASy - Prot Scale 在线分析氨基酸序列的疏水性和理化性质。通过 ExPASy 网站(<http://www.expasy.org/>)将该 cDNA 序列翻译为氨基酸序列。通过 NCBI 网站的在线 BLAST 分析工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中的 BLASTp 工具对核苷酸序列进行比对库检(比对数据库选择 NR,替换计分矩阵选择 BLOSUM62,其他采用默认参数),检索与该蛋白序列相似度较高的序列。然后选取比对结果中 E - value 较低且 Querycover 较高的序列,用 CLUSTX2 进行多序列比对。采用 Signal P4.1 预测其是否具有信号肽。将多序列比对结果输出为 NEXUS 格式,用 PUAP 4.0 和 Modeltest 3.7 检验最优的氨基酸替换模型,然后在 GTR + I + G(广义时间可逆)模型下用最大似然法构建进化树。在 NCBI 网站使用 BLASTp 程序进行库检,数据库采用 PDB,搜索结果与目的基因氨基酸序列相似性较高且已知蛋白晶体的序列,并选择与目的基因相似度较高且分辨率较高的 3 个晶体结构作为参考,然后用 Modeller 9.1 软件,构建三维结构。用 PSORT II 在线分析软件对蛋白质序列进行分析。

1.5 qRT - PCR 表达量分析

qRT - PCR 使用的引物序列见表 2,以报道的 Actin 基因为内参基因^[15],设置 3 次重复试验。试验试剂采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)(TaKaRa 公司),仪器使用 7300 Fast Real Time PCR System(ABI 公司)。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取、总 RNA 提取及检验

紫萼玉簪根系总 DNA 提取凝胶电泳结果见图 1, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.925,DNA 浓度为 486 μg/μL。根系总 RNA 的凝胶电泳结果见图 2, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 2.031,RNA 浓度为 209 μg/μL。

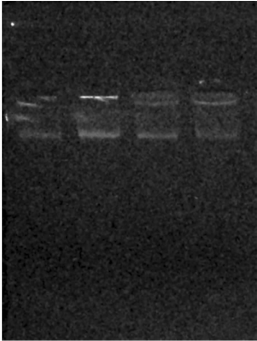


图1 紫萼玉簪根系总 DNA 提取凝胶电泳

2.2 HvGASA、HvFAD 基因的克隆

用 3' RACE 和 5' Genome Walking 的方法进行 HvGASA、HvFAD 基因 3' 末端和 5' 末端的克隆,PCR 凝胶电泳检测结果见图 3,切胶回收测序后,利用 DNAMAN 进行全长序列拼接后,再进行 Blast 序列比对,获得具有完整 ORF 框的 2 条基因序列:HvGASA(336 bp,图 3 - a)、HvFAD(1 320 bp,图 3 - b)。

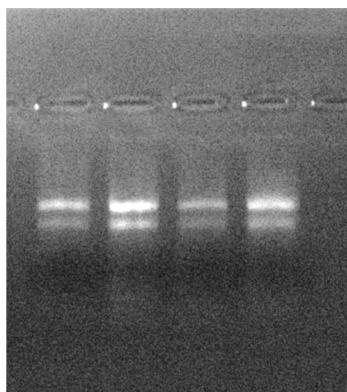
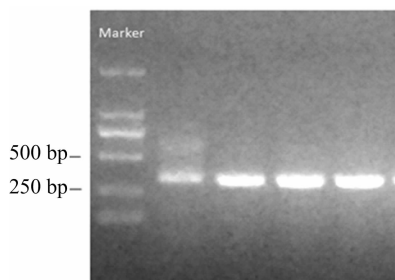


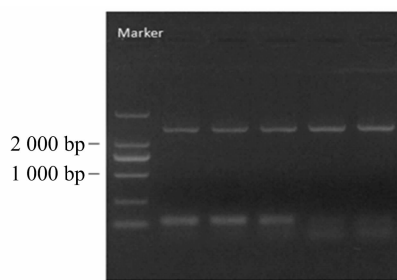
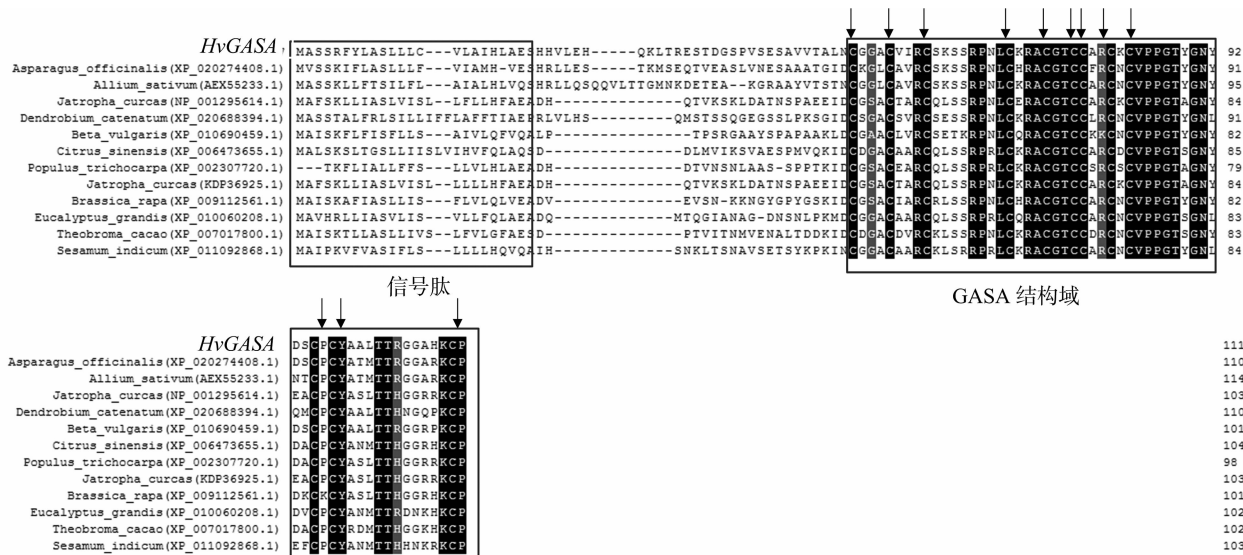
图2 紫萼玉簪根系总 RNA 提取凝胶电泳

a. *HvGASA* 基因的全长序列 PCR 验证电泳

2.3 生物信息学分析

2.3.1 *HvGASA* 基因

2.3.1.1 理化性质分析、多序列比对 *HvGASA* 基因的序列全长为 336 bp, 编码的蛋白质全长 111 个氨基酸, 分子量为 27.95 ku, 等电点(pI) 为 5.24。利用推测的 *HvGASA* 氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 BLASTp 搜索, 并从其序列比对结果中挑选相似性较高的 12 条 GASA 蛋白序列, 进一步与 *HvGASA* 进行多序列比对, 结果如图 4 所示。通过 SMART 网站及 ExPASy - ProtScale 网站对氨基酸序列进行分析, 发现 GASA 蛋白 N 端 1~23 个氨基酸为信号肽序列(图 4 中方框区域), C 末端具有由 12 个半胱氨酸残基组成的高度保守的 GASA 结构域(图 4 中箭头所指部位), 两者之间是极性氨基

b. *HvFAD* 基因的全长序列 PCR 验证电泳图3 *HvGASA*、*HvFAD* 基因的克隆电泳图4 *HvGASA* 基因多序列比对

酸残基组成的可变亲水区域, 黑色背景区域为保守性较高区域。

2.3.1.2 构建进化树 利用 PUAP 4.0 对 13 条 GASA 蛋白序列进行系统发育分析, 发现 GASA 蛋白可被分为 2 大类(图 5), 其中桐油树(*Jatropha curcas*, NP_001295614.1)、毛茛杨(*Populus trichocarpa*, XP_002307720.1)、芜菁(*Brassica rapa*, XP_009112561.1)、巨桉(*Eucalyptus grandis*, XP_010060208.1)、芝麻(*Sesamum indicum*, XP_011092868.1)等 8 条序列聚为一类;*HvGASA* 与石刁柏(*Asparagus officinalis*, XP_020274408.1)、大蒜(*Allium sativum*, AEX55233.1)关系较近, 与铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*, XP_010688394.1)、甜菜(*Beta vulgaris*, XP_010690459.1)聚为一类。

2.3.1.3 蛋白质三级结构预测 用 Modeller 9.1 软件构建三维结构, 构建出的 *HvGASA* 蛋白三维结构如图 6 所示。

2.3.1.4 亚细胞定位分析 用 PSORT II 在线分析软件对蛋白质序列进行分析, 得到 *HvGASA* 蛋白的亚细胞定位结果为 39.1% 的可能性在线粒体, 30.4% 的可能性在细胞外, 17.4% 的可能性在细胞核内, 8.7% 的可能性在细胞浆, 4.3% 的可能性在囊泡中。

2.3.2 *HvFAD* 基因

2.3.2.1 理化性质分析、多序列比对 *HvFAD* 基因的序列全长为 1 320 bp, 编码 399 个氨基酸, 具有 3 个跨膜结构, 说明 FAD 是跨膜蛋白, 分子量 50.98 ku, 等电点(pI) 为 8.85。利用推测的 *HvFAD* 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 数据库中

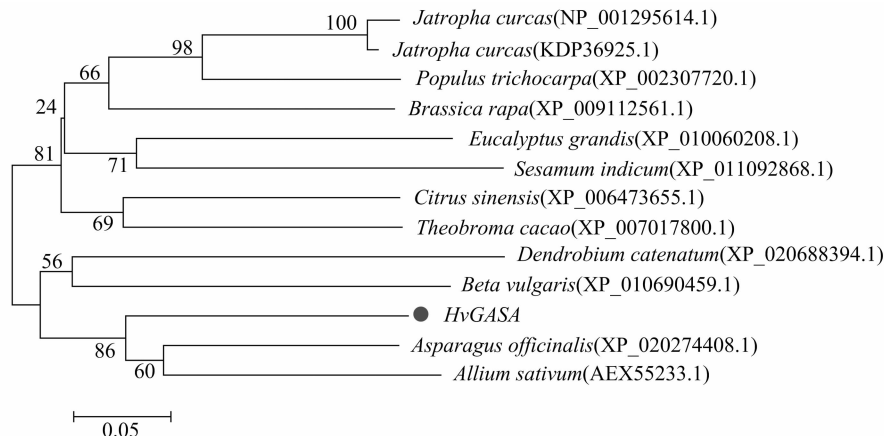


图5 *HvGAS4* 基因系统进化树

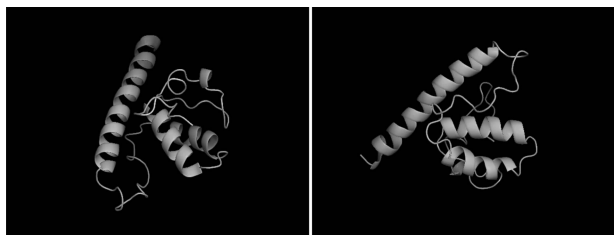


图6 *HvGAS4* 蛋白三级结构预测

的 12 条 FAD 蛋白序列,进一步与 *HvFAD* 的编码氨基酸进行多序列比对。多序列比对结果如图 7 所示,图中方框标识区域为该基因的 3 个跨膜结构,黑色背景区域为保守性较高区域。

2.3.2.2 构建进化树 *HvFAD* 基因与石刁柏 (*Asparagus officinalis*, XP_020241744.1) 100% 同源,与菠萝 (*Ananas comosus*, XP_020082614.1)、小果野蕉 (*Musa acuminata*, XP_00938546.1)、油棕 (*Elaeis guineensis*, XP_010942103.1)、海枣 (*Phoenix dactylifera*, XP_008799646.1) 聚为一类,详见图 8。

进行 BLASTp 搜索,并从其序列比对结果中挑选相似性较高

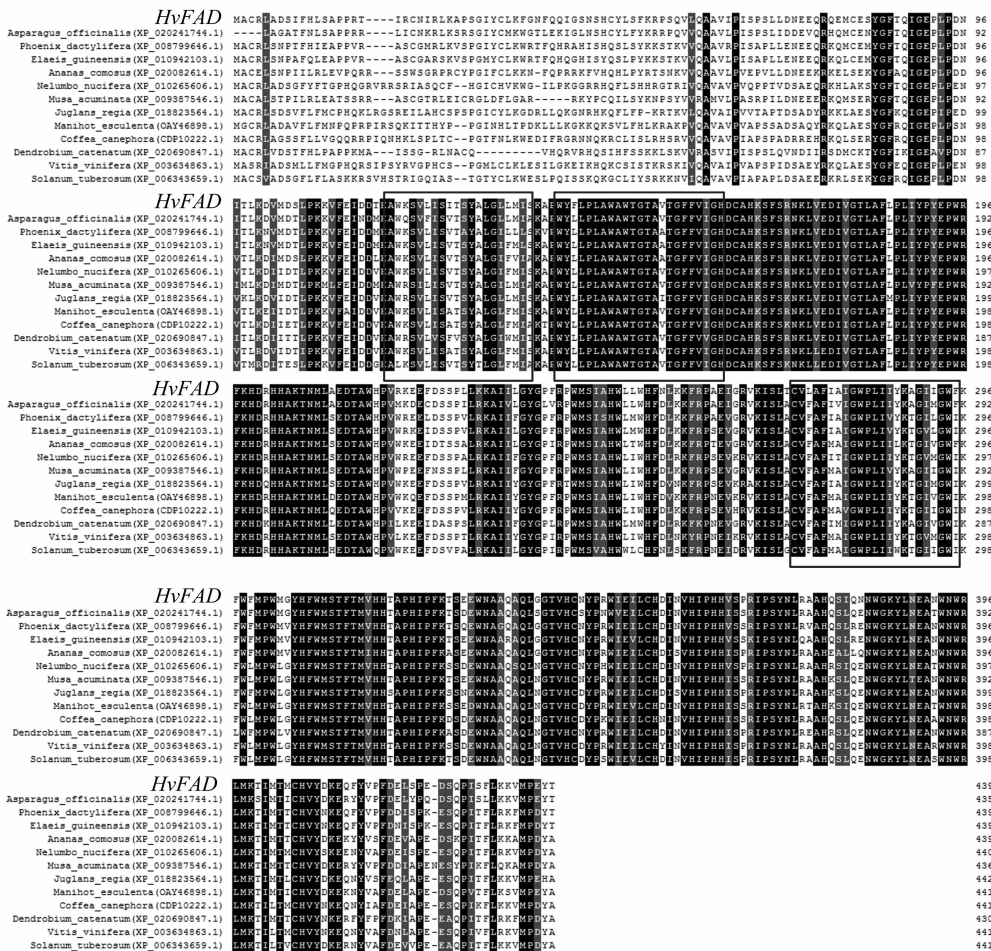
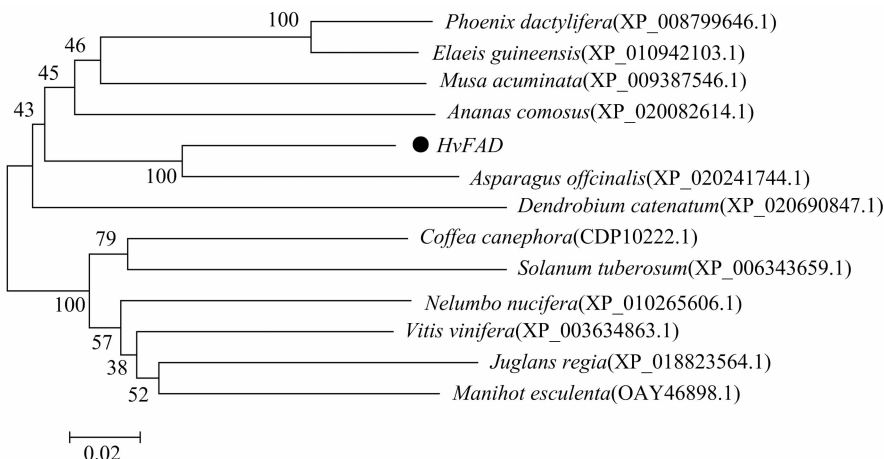
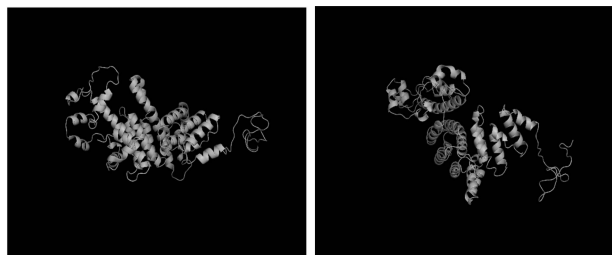


图7 *HvFAD* 基因多序列比对

图8 *HvFAD* 基因系统进化树

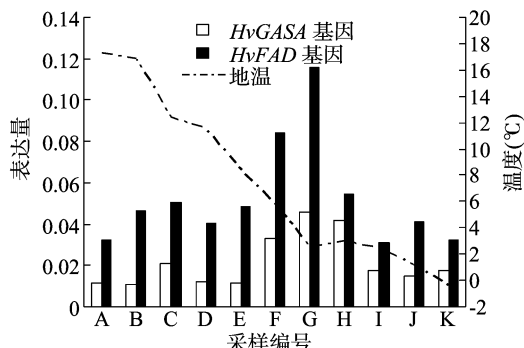
2.3.2.3 蛋白质三级结构预测 用 Modeller 9.1 软件构建三维结构,构建出的 *HvFAD* 蛋白三维结构如图 9 所示。

图9 *HvFAD* 蛋白三维结构预测

2.3.2.4 亚细胞定位分析 用 PSORT II 在线分析软件对蛋白质序列进行分析,得到该蛋白的亚细胞定位结果为 55.6% 可能性定位于内质网,44.4% 可能性定位于线粒体。这与报道中 *EuFAD3-1* (杜仲, *Eucommia ulmoides*) 基因通过亚细胞定位发现其编码的蛋白质定位于内质网的结果^[16]相似。

2.4 qRT-PCR 分析表达量

通过 qRT-PCR 试验,获得 *HvGASA*、*HvFAD* 基因在紫萼玉簪入冬自然降温过程中的表达量变化,结果见图 10。

图10 *HvGASA*、*HvFAD* 基因在不同时期的表达水平

2.4.1 *HvGASA* 基因 qRT-PCR 分析 通过 qRT-PCR 试验发现,紫萼玉簪中 *GASA* 基因的表达量在入秋降温过程中有 3 个明显的降温阶段 (17.2 ~ 11.5、11.5 ~ 3.3 ~ -1.0 °C), *HvGASA* 基因表达量均呈现上升趋势,而最后一次降温中 *HvGASA* 基因上调表达的幅度明显大于前 2 个阶段降温,说明 3 °C 低温对紫萼玉簪产生了较明显的胁迫作用,致使 *HvGASA*

基因大量表达以抵御逆境胁迫,而当降温程度减弱甚至稍有回升时, *HvGASA* 基因表达量又表现出下调趋势。

2.4.2 *HvFAD* 基因 qRT-PCR 分析 紫萼玉簪 *FAD* 基因在入秋降温过程中有 3 个明显的降温阶段 (17.2 ~ 11.5、11.5 ~ 3.3 ~ -1.0 °C), *HvFAD* 基因表达量均呈现上升趋势,且 11.5 ~ 3 °C 的降温幅度中, *HvFAD* 基因上调表达幅度最明显。

3 讨论

GASA 编码基因数量众多,不同的 *GASA* 基因家族成员可以具有相同或相反的功能,甚至同一 *GASA* 基因家族成员具有多种生物学功能。本研究通过低温差异背景下进行的转录组测序,经 Unigene 组装及差异表达基因分析、基因功能注释等工作,从测序数据库中筛选得到 *HvGASA* 基因。曾有文献报道 *GASA* 基因与环境温度相关, Ko 等研究表明,拟南芥 *GASA4* 基因的表达与温度有关,研究发现该基因与玉米 (*Zea mays*) 的耐热基因 *TTO6* (Thermo-tolerance 6) 存在 69% 的相似性; *GASA4* 基因过表达下,转基因拟南芥植株的抗热性显著增强,认为可能是 *GASA4* 蛋白作为胞外热击信号分子或者作为分子伴侣通过稳定内质网上的与热击因子 HSE (heat shock element) 有关的 BiP 蛋白 (binding protein),从而提高了转基因植株的耐热性^[17]。张强等研究发现,大马士革玫瑰 (*Rosa damascena*) 的 *GASA4-like* 基因与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *GASA4* 氨基酸及玉米耐热基因 *TTO6* 氨基酸均有较高的相似性。通过对 GenBank 的 Blast 分析及基因序列分析发现,大马士革玫瑰 *GASA4-like* 基因与高温和盐胁迫下诱导表达的基因高度同源,其序列中发现了多个 MYB、MYC 转录因子识别位点和诱导抗性响应基因转录的 W-box,表明 *GASA4-like* 的蛋白可能也参与了植物的抗性调节过程^[18]。本试验中发现,自然降温过程中 *HvGASA* 基因会随着降温而发生上调表达,且降温幅度大,表达量上调幅度也增加,而当温度略有回升时, *HvGASA* 基因发生下调表达,说明紫萼玉簪 *GASA* 基因与植物抗寒性具有密切的关系,并成正向相关,而玉簪的 *GASA* 基因是否还参与系统发育等方面的建成,还有待于进一步研究。

植物受低温胁迫时引起的受害反应主要是由于低温破坏了细胞膜系统的结构和流动性,而脂肪酸是细胞膜脂的主要

成分,适当的增加植物体内不饱和脂肪酸的比例,可明显提高植物的抗寒性。根据双键的位置和功能等可将不饱和脂肪酸分为 $\omega-3$ 和 $\omega-6$ 2 种类型^[19],目前对 $\omega-3$ 脂肪酸去饱和酶基因研究多集中在 *FAD3* 基因,据文献报道该基因已从紫苏(*Perilla frutescens*)等植物中成功分离克隆出来,经试验验证该基因的过量表达可显著提高植物体内不饱和脂肪酸的比例,而提高植物的抗寒性^[20]。 $\omega-3$ 脂肪去饱和酶属于膜结合脱氢酶,有研究表明,拟南芥的脂肪酸脱氢酶基因 *FAD3* 和 *FAD7* 基因在常温下可正常表达,而 *FAD8* 基因只有在在温度 $\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时才表达^[19]。本试验中 *HvFAD* 基因随自然降温而发生上调表达,原因是 *FAD* 基因上调表达的结果是增加了不饱和脂肪酸的含量,从而提高膜脂的流动性,最终使得植物的耐冻性得到提高。有研究证明,脂肪酸的代谢和修饰在细胞的内质网或胞质中进行^[21],本研究中对紫萼玉簪的 *FAD* 基因的亚细胞定位预测结果与之相符合。

通过上述 2 条与抗寒相关基因在不同地温环境中表达量分析发现,2 条基因均在 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 附近表现出明显的表达量变化,由此可推测紫萼玉簪根系对于 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上低温环境不敏感, $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上低温对紫萼玉簪根系组织的影响相对较小,而 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的低温会明显影响其正常生理活动,致使大量抗寒相关基因迅速发生表达量变化,以达到抵御低温所带来的危害。

4 结论

从紫萼玉簪中克隆得到 *HvGASA*、*HvFAD* 基因的 cDNA 全长序列,长度分别为 336、1 320 bp,分别编码 111、399 个氨基酸,其中 *HvFAD* 基因所编码的蛋白为跨膜蛋白。qRT-PCR 分析结果表明,2 条基因随自然地温的降低均发生上调表达,而且在地温降至 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时发生剧烈的表达量变化,说明 *HvGASA* 和 *HvFAD* 与紫萼玉簪的抗寒性具有密切的关系。

参考文献:

- [1] 盘波,丁涛,宁世江. 广西元宝山自然保护区珍稀野生花卉资源[J]. 中国野生植物资源,2009,28(6):21-25.
- [2] Herzog M, Dorne A M, Grellet F. *GASA*, a gibberellin-regulated gene family from *Arabidopsis thaliana*, related to the tomato *GASTI* gene[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(4):743-752.
- [3] Furukawa T, Sakaguchi N, Shimada H. Two *OsGASR* genes, rice *GAST* homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different expression patterns in developing panicles[J]. Genes & Genetic Systems, 2006, 81(3):171-180.
- [4] Ben-Nissan G, Lee J Y, Borohov A, et al. GIP, a petunia hybrida GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering[J]. Plant Journal, 2004, 37(2):229-238.
- [5] Sun S L, Wang H X, Yu H M, et al. *GASA14* regulates leaf expansion and abiotic stress resistance by modulating reactive oxygen species accumulation[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(6):1637-1647.
- [6] Wolf S, van der Does D, Ladwig F, et al. A receptor-like protein mediates the response to pectin modification by activating brassinosteroid signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(42):15261-15266.
- [7] 钟春梅,王小菁. 富含半胱氨酸的 *GASA* 小分子蛋白研究进展[J]. 植物学报, 2016, 51(1):1-8.
- [8] Lyons J M. Chilling injury in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1973, 24(1):445-466.
- [9] 李飞,徐建飞,刘杰,等. 三个耐冻性不同的马铃薯野生种中 *FAD2* 基因的克隆及表达分析[J]. 作物学报, 2014, 40(1):45-53.
- [10] Gigon A, Matos A R, Laffray D, et al. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia)[J]. Annals of Botany, 2004, 94(3):345-351.
- [11] Zhang M, Barg R, Yin M G, et al. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants[J]. Plant Journal, 2005, 44(3):361-371.
- [12] Chaffai R, Elhammadi M A, Seybou T N, et al. Altered fatty acid profile of polar lipids in maize seedlings in response to excess copper[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2007, 193(3):207-217.
- [13] 卢善发. 植物脂肪酸的生物合成与基因工程[J]. 植物学通报, 2000, 17(6):481-491.
- [14] 苏华楠,王雪峰,黄爱军,等. 高质量提取柑橘样品中病原总核酸方法的建立[J]. 园艺学报, 2014, 41(11):2342-2352.
- [15] 朱晓仙. 玉簪花中 3 个乙烯生物合成相关基因的克隆及其表达分析[D]. 金华:浙江师范大学, 2012.
- [16] 冯延芝. 杜仲种仁转录组测序及 *FAD3* 基因的鉴定与功能研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2016.
- [17] Ko C B, Woo Y M, Lee D J, et al. Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the *GASA4* gene[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(9):722-728.
- [18] 张强,孟月娥,李艳敏,等. 玫瑰 *GASA4-like* 基因的克隆及其序列分析[J]. 河南农业科学, 2009, 38(9):161-166.
- [19] McConn M, Hugly S, Browse J, et al. A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast $\omega-3$ desaturase[J]. Plant Physiology, 1994, 106(4):1609-1614.
- [20] 袁中厚. 紫苏 $\omega-3$ 脂肪酸脱氢酶基因的克隆与表达分析[D]. 重庆:重庆师范大学, 2014.
- [21] Somerville C. Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(14):6215-6218.