

• 药材与资源 •

白桦 BpNOS 基因的生物信息及表达模式分析

周 珊, 孙丰坤, 姜 涛, 詹亚光, 曾凡锁*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 目的 克隆白桦 *Betula platyphylla* 一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS), 探讨其生物信息及表达模式, 并考察非生物胁迫对其 NOS 基因表达的影响。方法 通过 RACE 技术克隆了白桦 NOS 基因, 命名为 BpNOS。初步对该基因进行了生物信息学分析、分子进化分析、非生物胁迫处理以及信号诱导。结果 该基因全长 1 806 bp, 含有完整的开放读码框, 编码 601 个氨基酸 (Genebank 登录号: KJ197336)。BpNOS 基因为不稳定疏水性蛋白, 可能存在信号肽, 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, BpNOS 基因与葡萄等物种的遗传距离较近, 说明有着较近的亲缘关系; 与大豆、苜蓿的遗传距离较远, 说明其亲缘关系较远。BpNOS 基因的表达具有节律性, 在 15:00 时达到最大值, 为 0:00 时的 12 倍。盐、低温、重金属镉胁迫均能抑制 BpNOS 基因的表达, 但响应模式不同; 水杨酸 (SA) 和外源一氧化氮可以促进 BpNOS 基因的表达。结论 非生物胁迫能够在一定时间范围内抑制 NOS 活性, SA 和外源一氧化氮可以通过 NOS 途径调控内源一氧化氮的合成, 为进一步研究白桦一氧化氮的代谢调控奠定了基础。

关键词: 白桦; 一氧化氮合成酶; BpNOS; 节律调控; 生物信息学分析; 非生物胁迫

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1203-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.020

Bioinformatics and expression pattern analysis of BpNOS gene in *Betula platyphylla*

ZHOU Shan, SUN Feng-kun, JIANG Tao, ZHAN Ya-guang, ZENG Fan-suo

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective Nitric oxide synthase (NOS) is a kind of important NOS in organisms. The gene cloning and expression pattern analysis of NOS in plant laid the foundation for study on the biological functions of nitric oxide in plants. **Methods** NOS gene in *B. platyphylla* was cloned by RACE technology, named BpNOS. Bioinformatics and molecular evolution analysis, abiotic stress, and signal induced of the gene were preliminarily carried out. **Results** This full-length gene was 1 806 bp with the complete ORF, encoding 601 amino acids (Genebank ID: KJ197336). BpNOS was an unstable hydrophobic protein. This protein may exist signal peptide with transmembrane ability. The alpha helix, extension chain, random coil distributed throughout the protein. Molecular evolution analysis results showed that the genetic distance of BpNOS gene was closer to the gene genetic distance of grape species NOS, which indicates the relatively close relationship between them; While the genetic distance of BpNOS gene was farther from soybean and alfalfa, which explains that the relationship of them is far. The expression of BpNOS has rhythm, reached the maximum at 15:00, 12 times as at 0:00. The expression of BpNOS gene could be inhibited by salt, low temperature, and heavy metal cadmium stress, but in a different response pattern. The expression of BpNOS gene could be promoted by salicylic acid and exogenous NO. **Conclusion** Abiotic stress could inhibit the activity of NOS. The salicylic acid and exogenous NO could be synthesized by NOS pathway to regulate endogenous NO. This paper lays a solid foundation for the further research on the metabolic regulation of NO in *B. platyphylla*.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; nitric oxide synthase; BpNOS; rhythm control; bioinformatic analysis; abiotic stress

收稿日期: 2014-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31200463, J1210053); 黑龙江省博士后启动基金资助 (LBH-Q12166)

作者简介: 周 珊 (1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为植物基因工程。Tel: 15804634773 E-mail: zhoushanleo@163.com

*通信作者 曾凡锁 (1980—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事林木遗传育种和生物技术方面的研究。

Tel: 13694501997 E-mail: zengfansuo@126.com

一氧化氮是生物体内最广泛的信号分子之一^[1], 参与植物中许多重要的生理功能, 例如种子萌发、气孔运动、下胚轴的伸长、防御反应和细胞程序性死亡(PCD)、激素的反应、根和木质部发育、次生代谢和开花等^[2-5]。有越来越多的证据表明植物在响应逆境胁迫(包括盐度、干旱、寒冷、重金属、抗病等)的过程中, 一氧化氮起着至关重要的作用^[2]。研究表明, 一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)和硝酸还原酶(NR)是 2 个催化精氨酸和亚硝酸盐生成一氧化氮的关键酶。已有研究结果支持 NOS 途径在植物中的存在^[2,4]。研究表明, NOS 参与植物对非生物胁迫的响应, 如耐盐等。除了非生物胁迫, 病原物诱导^[4]和机械损伤^[6]均能诱导 NOS 产生一氧化氮。

镉是一种非必需的有毒的重金属, 能够诱导植物 PCD。暴露于镉胁迫下的植物生长不良, 呼吸受到抑制^[7-8]。水杨酸(SA)是一种酚类激素, 可调节植物的生长发育, 对植物的光合作用、蒸腾作用与离子的吸收与运输也有调节作用。SA 同时也可以诱导植物细胞的分化与叶绿体的生成。SA 还作为内生信号参与植物对病原体的抵御, 通过诱导组织产生病程相关蛋白, 当植物的一部分受到病原体感染时, 在其他部分产生抗性^[9-10]。

白桦 *Betula platyphylla* Suk. 属于桦木科(Betulaceae)桦木属 *Betula* L. 落叶乔木, 在我国分布广泛。白桦树叶和树皮中含有次生代谢产物白桦三萜, 其中白桦树皮中含有丰富的羽扇豆烷型的三萜白桦脂醇和白桦脂酸, 这 2 种天然产物具有抑制人免疫缺陷病毒复制和选择性杀死癌细胞等药理活性^[11]。本实验分析了白桦一氧化氮合酶(BpNOS)基因的分子结构特征及节律表达模式, 研究了非生物胁迫[重金属镉、低温(4℃)、盐]对该基因表达模式的影响。然后通过一氧化氮供体硝普钠(SNP)和 SA 进行信号诱导, 揭示 BpNOS 基因在白桦信号诱导和次生代谢调控中的表达特征, 为该基因在白桦一氧化氮代谢调控中的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白桦 *Betula platyphylla* Suk. 取自东北林业大学白桦强化种子园 5~7 年生嫁接优树(接穗 30 年生), 外植体取自其诱导的组培苗, 由东北林业大学生命科学学院詹亚光教授鉴定。

HY-6A 双层振荡器, Applied Biosystems 7500 荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

将白桦组培苗在 WPM 培养基中进行生根培养, 置于光照培养箱中, 控制适宜的温度 24℃和湿度 65%, 每隔 3 h 为一个时间点, 连续 24 h 取样。对白桦组培苗进行 50 μmol/L 镉、低温(4℃)、200 mmol/L 盐的处理, 每个处理均重复 3 次。分别于处理后 6、12、24、48、96 h 取样。使用 NT+0.01 mg/L TDZ+0.1 mg/L 6-BA 培养基对白桦茎段细胞进行悬浮培养, 将白桦悬浮细胞进行硝普钠(SNP)处理, 加入 SNP 后计时, 分别于 6、12、24、48、72 h 取样。对白桦悬浮细胞分别进行 SNP、KFeCN、cPTIO+SNP 12 h 的处理, 分析白桦悬浮细胞中 NOS 基因表达水平的变化。

应用 CTAB 法提取白桦 RNA, 将检测可用的 RNA 反转录成 cDNA 进行 RT-PCR, 产物长度在 150~250 bp。模板为稀释 10 倍的 cDNA。荧光定量使用 TOYOBO (SYBR Green) 试剂盒, PCR 体系(10 μL): 灭菌蒸馏水 3.2 μL, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 5 μL, 上下游引物各 0.3 μL, 50×ROX reference dye 0.2 μL, cDNA 模板 1 μL。利用 Applied Biosystems 7500 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 反应程序: 95℃、30 s→95℃、5 s→60℃、34 s(共 40 个循环)→95℃、15 s→60℃、1 min→95℃、15 s。每份样品重复 3 次。

2 结果与分析

本实验采用 RACE 技术克隆了 BpNOS 基因, 全长 1 806 bp, 含有完整的开放读码框, 编码 601 个氨基酸(Genebank 登录号: KJ197336)。

2.1 氨基酸理化性质分析

利用在线分析软件 Protparam^[12]对 BpNOS 的氨基酸序列的理化性质进行分析。其蛋白等电点(pI)为 4.92; 不稳定系数为 44.73(不稳定系数小于 40 时, 预测蛋白质稳定, 反之则不稳定), 为不稳定蛋白; 总平均疏水性为 0.799, 说明该蛋白为疏水性蛋白。

2.2 BpNOS 蛋白质一级结构分析

2.2.1 亲水区域/疏水区域预测 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。利用在线分析软件 ProtScale^[12]的 Kyte and Doolittle 算法对 BpNOS 蛋白进行亲水/疏水性分析(>0.5 为疏水区, <-0.5 为亲水区, 介于 0.5~-0.5 主要为两性区域)。结果表明, BpNOS 蛋白共有 1 482 个疏水区, 无亲水区域(图 1)。

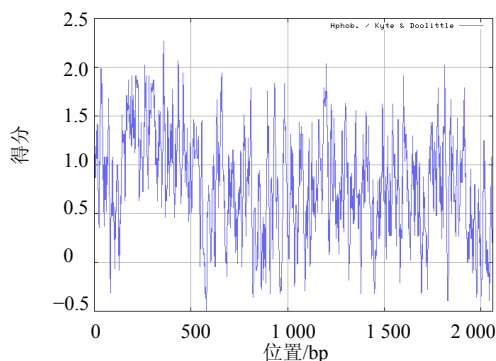


图1 BpNOS 基因的亲水/疏水性分析

Fig. 1 Analysis of hydrophilic/hydrophobic BpNOS gene in *B. platyphylla*

2.2.2 信号肽的预测和分析 信号肽是N端的一段氨基酸序列,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,信号肽位于蛋白质的N端,一般由16~26个氨基酸残基组成,其中包括疏水核心区、信号肽的C端和N端。利用在线分析工具 Signal IP^[13]的神经网络算法对 BpNOS 蛋白进行预测。结果表明,BpNOS 蛋白在46或47的位置可能存在信号肽,说明 BpNOS 可被分泌出来,作用到受体上,属于分泌蛋白(图2)。

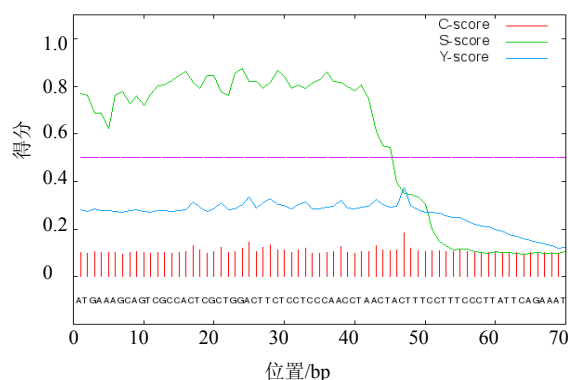


图2 BpNOS 基因蛋白信号肽的预测和分析

Fig. 2 Prediction and analysis of BpNOS gene protein signal peptide in *B. platyphylla*

2.2.3 跨膜结构域的预测与分析 跨膜结构是蛋白质与膜内在蛋白的静电相互作用和氢键键合相互作用下与膜结合的一段氨基酸片段,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。利用在线工具 TMPred^[14]对 BpNOS 蛋白进行跨膜结构分析。结果表明,BpNOS 蛋白有2个跨膜结构域,其中一个总分为-2 413,既有从外到内的跨膜能力,又有从内到外的跨膜能力;另一个总

分为-3 768,既有从外到内的跨膜能力,又有从内到外的跨膜能力(图3)。

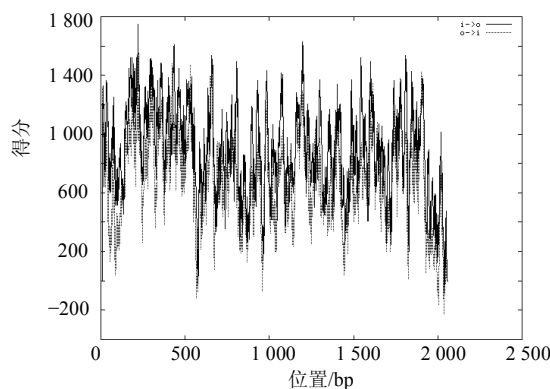


图3 BpNOS 基因蛋白跨膜结构域预测和分析

Fig. 3 Prediction and analysis of BpNOS gene protein transmembrane domain in *B. platyphylla*

2.3 蛋白质的二级结构域的预测与分析

应用 GOR4^[15]对 BpNOS 蛋白的二级结构进行分析。BpNOS 蛋白是由 α -螺旋、延伸链、无规则卷曲所组成的,并且分布于整个蛋白。BpNOS 蛋白由28.79%的 α -螺旋、48.09%的无规则卷曲和23.13%的延伸链组成。

2.4 氨基酸序列比对及系统进化树构建

利用 NCBI 数据库对 BpNOS 基因序列以及推测的编码蛋白进行同源序列比对,Blast X 比对结果见表1。

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。利用 MEGA 5.0 软件,应用 Neighbor-Joining 算法构建系统进化树^[16]。结果表明,11条蛋白序列大致分为4个大类,其中毛果杨、蓖麻、可可、甜橙、葡萄聚成一类,黄瓜自成一类,碧桃和草莓聚成一类,大豆和苜蓿聚成一类。BpNOS 蛋白与葡萄等遗传距离较近说明有着较近的亲缘关系,与大豆、苜蓿的遗传距离较远,说明其亲缘关系较远(图4)。

2.5 BpNOS 基因在白桦中的表达模式

2.5.1 BpNOS 基因的节律表达 选取生长一致的白桦组培苗,分析 BpNOS 基因的节律表达模式,如图5所示。横坐标代表取材时间,纵坐标代表 BpNOS 在白桦中的相对表达量。在0:00~12:00时,NOS 在白桦中的表达量9:00时最高,是0:00时的4倍;在12:00~21:00时,15:00时达到最大值,是0:00时的12倍。BpNOS 在白桦中的表达量随着时间的推移波动,在15:00时达到高峰,说明 BpNOS 基因的

表 1 BpNOS 基因序列与其他物种同源比对

Table 1 Homological comparison on NOS gene sequence with other species

物种	登录号	比对得分	与 BpNOS 蛋白的一致性/%
碧桃 <i>Prunus persica</i>	XM_007218 893.1	1 516	80
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	XM_006490 065.1	1 497	82
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	XM_006368 163.1	1 380	80
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	FQ383 930.1	1 370	80
可可 <i>Theobroma cacao</i>	XM_007038 310.1	1 362	80
草莓 <i>Fragaria vesca</i>	XM_004307 754.1	1 403	80
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	XM_002510 916.1	1 352	79
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	XM_004158 061.1	1 263	78
大豆 <i>Glycine max</i>	XM_003534 323.2	1 166	77
蒺藜状苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	XM_003595 703.1	1 086	76

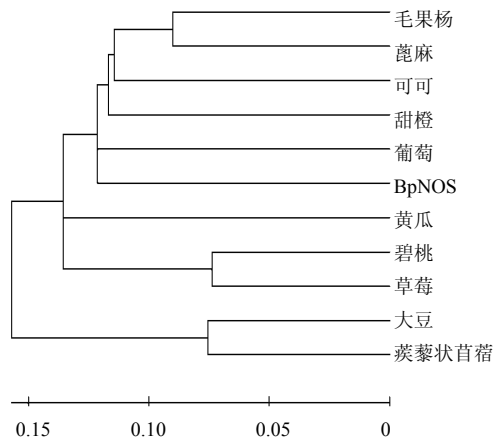


图 4 BpNOS 基因系统发育进化树

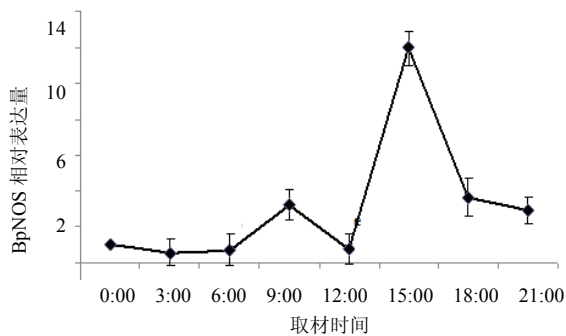
Fig. 4 Phylogenetic tree of BpNOS gene in *B. platyphylla*

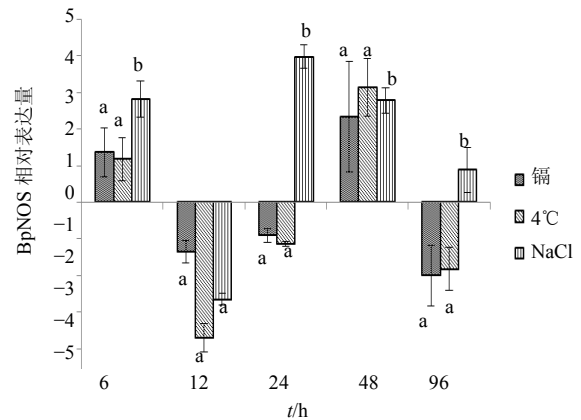
图 5 BpNOS 的节律表达

Fig. 5 Rhythm expression of BpNOS gene

表达具有节律性。

2.5.2 非生物胁迫下 BpNOS 基因在白桦中的表达 对白桦分别进行重金属镉、低温 (4 °C)、盐胁迫的处理并在处理后不同时间取样。以未处理的作为对照, 用处理后测得的表达量减掉对照的表达量, 表达水平上调结果为正, 表达水平下调结果为负。结果表明, 所有处理都随处理时间的

不同而上下波动。镉处理与低温处理表达情况相似, 在处理 6、48 h 上调表达, 其余时间下调表达。盐处理只有在 12 h 下调表达, 其他时间都为上调表达, 在 24 h 时, 表达量最高。说明 BpNOS 基因对非生物胁迫有响应, 而对不同胁迫方式的响应模式不同 (图 6)。



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same as below

图 6 非生物胁迫下 BpNOS 基因在白桦中的表达

Fig. 6 Expression of BpNOS gene under abiotic stress in *B. platyphylla*

2.5.3 信号诱导下 BpNOS 基因在白桦中的表达 将白桦悬浮细胞进行 SNP 处理, 分析 BpNOS 基因表达量的变化。结果表明, SNP 处理 12 h, BpNOS 的表达量达到最大值, 约为 6 h 的 2 倍, 48 h 的表达量次于 12 h 处理的悬浮细胞, 72 h 材料中的 BpNOS 表达量最低, 但是均高于未处理的对照。因此, SNP 对白桦中 BpNOS 的表达具有一定的影响, 初步说明外源一氧化氮通过 NOS 的途径影响了内源一氧化氮的合成 (图 7)。

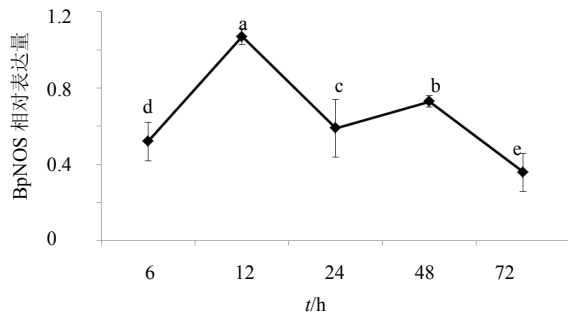


图 7 SNP 处理后 BpNOS 基因的表达

Fig. 7 Expression of BpNOS gene after SNP treatment

为确定是 SNP 中何种物质对白桦悬浮细胞产生影响, 本研究又对白桦悬浮细胞分别进行 SNP、KFeCN、cPTIO+SNP 处理 12 h 后, 分析白桦悬浮细胞中 BpNOS 表达水平的变化。其中 KFeCN 为 SNP 的类似物, 分解后不产生一氧化氮, 但其他分解产物与 SNP 相同; cPTIO 为一氧化氮清除剂, 将 SNP 分解后产生的一氧化氮除去^[5,7,12-14]。结果表明, KFeCN 及 cPTIO+SNP 处理组, BpNOS 的表达量均显著低于 SNP 处理组。此结果进一步证实了外源一氧化氮调节了 BpNOS 基因的转录表达, 通过 NOS 途径调控内源一氧化氮的合成 (图 8)。

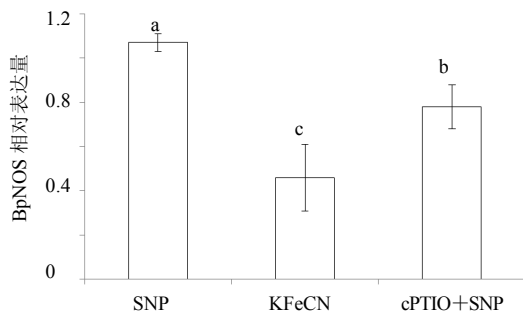


图 8 SNP、KFeCN、cPTIO+SNP 处理后 BpNOS 基因的表达
Fig. 8 Expression of BpNOS gene after SNP, KFeCN, and cPTIO + SNP

SA 作为一种内生信号, 参与植物体内多种代谢产物的调控。为了确定 BpNOS 能否被 SA 这种信号物质诱导, 对白桦进行 SA 处理, 分别于不同时间取样, 观察 BpNOS 表达量的变化。以未处理的作为对照, 表达水平上调结果为正, 表达结果下调结果为负。由结果可以看出, 处理 6 h 的材料, 表达结果明显上调, 为对照的 3 倍, 但在 12 h 和 48 h 结果较对照减少较为明显, 24 h 和 96 h 处理的材料与对照相比基本不变。说明 SA 通过 NOS 途径参与了一氧化氮信号的调控 (图 9)。

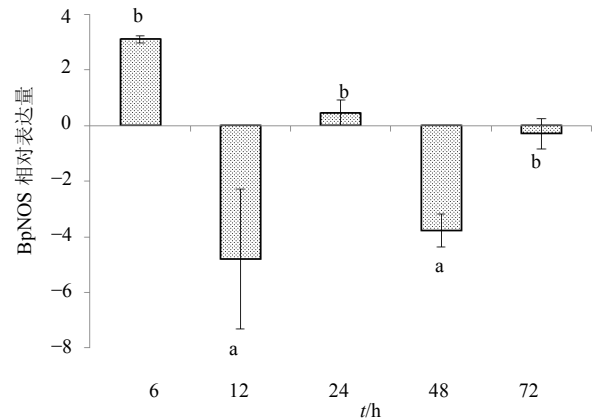


图 9 SA 作用下 BpNOS 基因在白桦中的表达模式

Fig. 9 Expression pattern of BpNOS gene in *B. platyphylla* after salicylic acid treatment

3 讨论

动物细胞合成一氧化氮主要通过 NOS 途径。然而目前的研究中, 在植物细胞中的一氧化氮机制仍是一个有争议的问题。一些研究支持植物中的 NOS 活性的存在。NR 和 NOS 仍然应该是一氧化氮在植物中的 2 个潜在的酶源^[17]。探讨内源性一氧化氮的产生机制的贡献和解开镉诱导过程中内源性一氧化氮量的变化, 通过药理学方法使用 NR 和 NOS 抑制剂来进行测定。Xiong 等^[7]的研究结果表明, 内源性一氧化氮是根冠萌生的重要物质, 并有 NOS 和内源性一氧化氮量之间的反馈抑制机制。在 Xiong 等^[7]的实验中, 外源性一氧化氮对镉诱导的抑制根冠延伸无改善作用。因此, 推测根冠伸长率是独立的内源性一氧化氮的量所影响的。总之, 镉抑制 NOS 活性, 减少内源性一氧化氮的量^[7]。这与本实验的结果类似, 在镉处理 12~24 h 的材料中, BpNOS 的表达量低于对照组, 但在 48~96 h 的处理中, BpNOS 的表达量要高于对照组, 这个差异可能是由于反馈抑制机制造成的。

研究表明一氧化氮通过改变 NOS 活性和内源性一氧化氮水平参与植物耐盐性^[4]。盐是一种主要的非生物胁迫因子, 通过破坏离子平衡和施加渗透压和应力对植物产生毒性。离子平衡的维护, 特别是 K^+ 与 Na^+ 比是植物抵御盐胁迫的重要因素。在细胞质中足够 K^+ 的存在是调节酶的活化, 控制膜电位, 和渗透调节必不可少的。当植物暴露于高浓度的 Na^+ 时, 由于 Na^+ 和 K^+ 之间物理化学的相似性, 过量 Na^+ 趋于替代 K^+ , 导致植物功能障碍^[4,13-14]。Zhao 等^[4]的研究发现, 拟南芥 NOS 突变体植物比野生型植物对盐不敏感,

内源性一氧化氮水平明显低于野生型植株。减少内源性一氧化氮水平,可能是考虑到对盐胁迫的响应突变体和野生型植物之间的差异。总之盐抑制 NOS 的活性^[4],这与本实验的结果类似,在盐处理 12 h 后,BpNOS 表达量低于对照组,但盐处理 24~96 h 的植物材料,BpNOS 的表达量高于对照组。另外,一氧化氮处理芦苇、玉米等被证明能提高植物对盐胁迫的耐受性。因此可以推测,24~96 h 盐胁迫处理的植物材料,NOS 的表达量上升是一种植物的自我修复机制,通过增加内源性一氧化氮的量来提高植物对盐胁迫的耐受性。

SA 和一氧化氮都是能够诱导植物对非生物逆境反应的抗逆信号分子。它们均可通过诱导或增强抗氧化酶系统活性来清除体内过多的活性氧(ROS),降低细胞的脂质过氧化,从而增强植物对低温、高温、干旱、重金属及盐胁迫等非生物逆境的适应能力。研究证实,SA 的信号途径并不是孤立存在的,它与一氧化氮之间相互交叉,在很多生理和抗逆反应中都表现出协同作用^[18-20]。SNP 作为外源一氧化氮供体,能够为植物提供一氧化氮,抑制 BpNOS 的合成。结果显示,随着处理时间的增加,植物 BpNOS 的表达量缓慢下降,但是在 12 h 时,BpNOS 表达量高于所有的处理时间,这种表达机制还不清楚,有待于进一步研究。本研究表明 SA 能够抑制 BpNOS 活性,只有在 SA 处理 6 h 的材料中 BpNOS 表达量上升,但在 12 h 和 48 h 的处理材料中,BpNOS 的表达量明显下降,在 24 h 和 96 h 的处理材料中表达量基本不变。

综上所述,本研究揭示了 BpNOS 基因表达具有节律性,重金属镉、低温、盐胁迫等非生物胁迫能够在一定时间范围内抑制 BpNOS 活性,胁迫时间延长后,由于植物的自我修复机制,BpNOS 的表达量增加。外源性施加 SA 和一氧化氮均能够抑制 BpNOS 的合成,说明 BpNOS 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 BpNOS 在本植物中的生物学功能和机制提供了有力的依据。

参考文献

- [1] Liu W Z, Kong D D, Gu X X, *et al.* Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in Arabidopsis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(4): 1548-1553.
- [2] Wang B L, Tang X Y, Cheng L Y, *et al.* Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin [J]. *New Phytol*, 2010, 187(4): 1112-1123.
- [3] Zhang A, Jiang M, Zhang J, *et al.* Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves [J]. *New Phytol*, 2007, 175(1): 36-50.
- [4] 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 Physiol*, 2007, 144(1): 206-217.
- [5] Zhang A, Zhang J, Zhang J, *et al.* Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(1): 181-192.
- [6] 李 翠, 柯 学, 龚 明. 一氧化氮合酶(NOS)在植物逆境胁迫中的作用 [J]. 安徽农学通报, 2009, 15(9): 49-51.
- [7] Xiong J, Lu H, Lu K, *et al.* Cadmium decreases crown root number by decreasing endogenous nitric oxide, which is indispensable for crown root primordia initiation in rice seedlings [J]. *Planta*, 2009, 230(4): 599-610.
- [8] Ma W, Xu W, Xu H, *et al.* Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells [J]. *Planta*, 2010, 232(2): 325-335.
- [9] Chaturvedi R, Shah J. *Salicylic Acid in Plant Disease Resistance* [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2007.
- [10] Vilela H H, Sousa B M L, Santos M E R, *et al.* Characterization of tillers of piata palisade grass deferred in the fall with varying heights and deferment periods [J]. *Acta Sci Anim Sci*, 2013, 35(1): 21-27.
- [11] 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(5): 520-526.
- [12] John M W. *The Proteomics Protocols Handbook* [M]. New Jersey: Humana Press, 2005.
- [13] Thomas N P, Soren B, Gunnar H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nat Methods*, 2011(8): 785-786.
- [14] Hofmann K, Stoffel W. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments [J]. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1993, 374: 166-170.
- [15] Sen T Z, Jernigan R L, Garnier J, *et al.* GOR V server for protein secondary structure prediction [J]. *Bioinformatics*, 2005, 23(21): 2787-2788.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [17] Xu Y, Sun X, Jin J, *et al.* Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue [J]. *J Plant Physiol*, 2010, 167(7): 512-518.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.