

基于 CDDP 标记铁皮石斛抗性种质筛选与多样性研究

吴永辉, 张君毅*, 司 灿, 林清郁

华侨大学 生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

摘要: 目的 利用 CDDP 标记技术对 43 份铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 野生和栽培种质进行初步抗性筛选和遗传多样性分析, 为铁皮石斛产业以及优良品种筛选保护提供理论基础。方法 从 21 条 CDDP 引物中筛选出产物清晰、多态性好的引物对供试材料基因组 DNA 进行扩增。结果 16 条引物共扩增出了 151 条带, 其中多态性条带 144 条, 多态性比率 95.7%, 表明供试材料具有丰富的遗传多样性。种群遗传多样性结果表明, 3 个种群多态性位点比例 (PPL) 为 65.56%~82.12%, 种群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.110 2, 基因流 (N_m) 为 4.035 4, 说明人为选择亦可能促进铁皮石斛的遗传多样性。结论 铁皮石斛人工栽培种具有丰富的遗传多样性, 同时统计结果分析表明, 43 份材料中可以初步筛选出 8 份具有潜在优良抗性的植株。

关键词: 铁皮石斛; CDDP 标记; 遗传多样性分析; 抗性筛选; 多态性位点比例

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)22-4748-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.022.025

Screening and diversity of resistance germplasm of *Dendrobium officinale* by CDDP markers

WU Yong-hui, ZHANG Jun-yi, SI Can, LIN Qing-yu

Department of Bioengineering & Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

Abstract: Objective Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP) markers were used in the study of the genetic diversity of 43 *Dendrobium officinale* and preliminary resistance screening, in order to provide a theoretical basis for the screening of *D. officinale* and the selection of fine varieties. **Methods** A total of 21 CDDP primers were used to amplify the genomic DNA of the test material with clear and polymorphic primers. **Results** Sixteen primers generated 151 bands, of which 144 (95.7%) were polymorphic. The results of data analysis on three population showed that the percentage of polymorphic locus (PPL) were between 65.56% and 82.12%, coefficient of genetic differentiation among natural populations (G_{st}) was 0.110 2, and the total gene flow (N_m) was 4.035 4. Indicating that anthropogenic factors may also promote the genetic diversity of *D. officinale*. **Conclusion** The genetic diversity of *D. officinale* was rich, and the results showed that there were eight plants with potentially good resistance among 43 materials.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; CDDP marker; genetic diversity analysis; resistance screening; PPL

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科石斛属植物, 又名黑节草、云南铁皮, 以茎入药。生于海拔达 1 600 m 的山地半阴湿的岩石上^[1]。《中国药典》2015 年版收载其味甘, 微寒, 具有益胃生津、滋阴清热功效。用于热病津伤、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨痿软等^[2]。现代研究表明, 铁皮石斛中含有石斛多糖、生物碱、氨基酸以及多种微量元素^[3], 具有调节免疫、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、调血脂、改善记忆、抗疲劳等功效^[4-6]。

近年来, 因其巨大药用价值和经济价值, 过度采挖加上自然条件下铁皮石斛种子与真菌共生才能萌发, 导致野生资源濒临灭绝^[7]。而人工栽培量逐年增加, 截止 2015 年全国种植面积已突破 60 公顷。但是以保护地栽培为主, 仿野生栽培受到较大限制, 主要原因是铁皮石斛对生长环境要求苛刻, 因此选育抗逆性强的优良品种十分必要。利用分子标记技术辅助选育良种是育种工作中一种常用手段, 但现阶段铁皮石斛仍停留在随机分子标记上, 不能满足

收稿日期: 2017-06-28

基金项目: 福建省引导性项目: 铁皮石斛良种选育与关键栽培新技术研究 (2015N0028); 泉州台商投资区科技计划项目

作者简介: 吴永辉 (1991—), 男, 在读硕士, 研究方向为药用植物资源开发与利用。Tel: 13290781591 E-mail: qqanqq@126.com

*通信作者 张君毅, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为药用资源开发与利用。Tel: 18759287390 E-mail: junyi@hqu.edu.cn

抗性育种需求^[8-9]。

CDDP (conserved DNA-derived polymorphism) 分子标记是 Collard 和 Mackill 2009 年开发的一种目标分子标记技术^[10]。它操作简单, 基于单引物扩增, 针对植物功能基因或基因家族中保守氨基酸序列设计引物, 产生偏向候选功能标记, 并且可以在不同物种间通用, PCR 产物用琼脂糖凝胶即可实现分离, 多态性好, 成本低。与随机分子标记相比, CDDP 标记能有效产生和目标性状连锁的功能性分子标记, 在分子标记辅助育种和遗传多样性分析中有重要的应用价值^[11]。本实验利用 CDDP 标记, 采用 Collard 和 Mackil 针对转录因子 WRKY^[12]、生物与非生物因素胁迫应答相关基因 MYB^[13]和在逆境胁迫中起调控作用 ERF 转录因子^[14]等设计的 21 条引物, 建立铁皮石斛 CDDP 标记技术体系, 对来源于野生和栽培的种质资源进行抗性筛选, 并研究分析其遗传多样性和亲缘关系, 以期为铁皮石斛抗性育种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为采集于福建泰宁和邵武的 28 份铁皮石斛栽培种质(编号 1~28)及 15 份(编号 29~43)来自泰宁崖壁的野生种质, 经华侨大学张君毅副教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。

1.2 总 DNA 提取

参考 CTAB 法^[15]提取基因组 DNA, 做相应改进。取 0.3 g 叶片, 加少许聚乙烯吡咯烷酮, 液氮研磨至粉末后转移至 2 mL 离心管; 加 800 μ L 4 $^{\circ}$ C 预冷 CTAB 缓冲液及 30 μ L β -巯基乙醇, 震荡混匀后冰浴 20 min; 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加等体积 65 $^{\circ}$ C 预热 3 $\times$ CTAB 缓冲液和 30 μ L β -巯基乙醇, 颠倒混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 并不时轻微震荡; 加 500 μ L 氯仿-异戊醇 (24:1), 颠倒混匀 5 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 转移上清液至新离心管, 此步重复 3 次; 加 0.1 倍体积 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积预冷无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min; 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min; 70%乙醇清洗 DNA 沉淀 2 次, 室温干燥 30 min, 加 50 μ L TE 溶解 DNA; 1%琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性; -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 CDDP-PCR 反应体系建立

随机选取 3 份样品 DNA, 对反应体系设计 5 因素(模板、引物、聚合酶、dNTPs、Mg²⁺) 4 水

平(表 1), 并进行 L₁₆(4⁵)正交试验(表 2), 然后进行梯度退火及单因素优化实验, 最后进行体系验证, 引物为 5'-TGGCGSAAGTACGCCAG-3', 由 Invitrogen 公司合成。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55.7 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 CDDP-PCR 反应体系因素水平

Table 1 CDDP-PCR factors-levels

水平	因素				
	模板/ng	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTPs/(mmol·L ⁻¹)	聚合酶/U	引物/(μ mol·L ⁻¹)
1	20	1.0	0.10	0.5	0.3
2	30	1.5	0.15	1.0	0.4
3	40	2.0	0.20	1.5	0.5
4	50	2.5	0.25	2.0	0.6

表 2 CDDP-PCR 正交试验设计

Table 2 CDDP-PCR orthogonal design

处理	因素				
	模板/ng	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTPs/(mmol·L ⁻¹)	聚合酶/U	引物/(μ mol·L ⁻¹)
1	20	1.0	0.10	0.5	0.3
2	20	1.5	0.15	1.0	0.4
3	20	2.0	0.20	1.5	0.5
4	20	2.5	0.25	2.0	0.6
5	30	1.0	0.15	1.5	0.6
6	30	1.5	0.10	2.0	0.5
7	30	2.0	0.25	0.5	0.4
8	30	2.5	0.20	1.0	0.3
9	40	1.0	0.20	2.0	0.4
10	40	1.5	0.25	1.5	0.3
11	40	2.0	0.10	1.0	0.6
12	40	2.5	0.15	0.5	0.5
13	50	1.0	0.25	1.0	0.5
14	50	1.5	0.20	0.5	0.6
15	50	2.0	0.15	2.0	0.3
16	50	2.5	0.10	1.5	0.4

1.4 产物检测

扩增产物用 TBE 配制 1%琼脂糖凝胶(含 0.05% Gold View)进行电泳分离, 电压 120 V, 凝胶成像系统拍照记录。

1.5 数据处理

同一引物扩增的所有模板, 同一位置有条带的认定为具有同源性, 在同一迁移位置, 有条带记“1”, 没有记“0”, 在 Excel 中建立数据矩阵。

用 Popgene 32 软件进行遗传参数分析, 分别计算多态位点百分率 (PPL)、观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 信息指数 (I)、群体总遗传多样性 (H_t)、群内基因多样性 (H_s)、居群间遗传分化系数 (G_{st}) 和居群间基因流 (N_m) 等, 用 NTSYS2.1 软件, 类平均法 (UPGMA) 进行聚类分析和主坐标分析^[16]。

1.6 抗性种质筛选

对引物类型中 WRKY 类、MYB 类和 ERF 类扩增条带进行统计, 并分别计算出各类型条带数平均

值, 大于平均值的个体则认为具有潜在优良抗性, 最后利用在线工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制韦恩图, 找出上述 3 类引物共同筛选出的潜在优良抗性种质。

2 结果与分析

2.1 CDDP 反应体系建立及引物筛选

不同因素水平组合的 CDDP-PCR 体系扩增结果各不相同, 从图 1 可以看出 3、4、7、9、10 号组合均有相对清晰条带, 其中 7、10 号较理想, 2 号组合没有条带, 5、6 号条带较弱, 8、11~16 号条带清晰度稍弱。

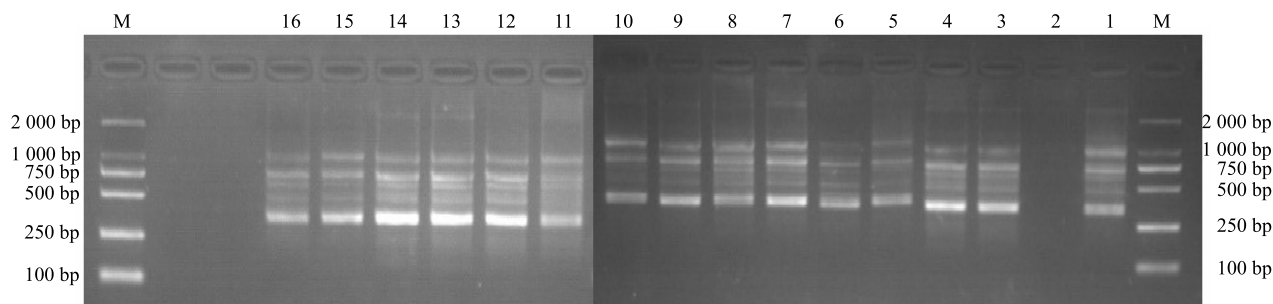


图 1 CDDP 正交设计体系的扩增结果

Fig. 1 CDDP system with orthogonal design

综合梯度退火实验及单因素优化实验 (部分实验见图 2、3), 最终确定 20 μ L 体系, 其中, DNA 模板 30 ng、引物 0.5 μ mol/L、聚合酶 1.5 U、dNTPs 0.2 mmol/L、 Mg^{2+} 2.75 mmol/L, 并进行体系验证 (图 4)。应用优化体系, 以样品 DNA 为模板, 对 Collard 和 Mackill^[12]发表的 21 条引物进行筛选, 选择多态性好, 条带清晰可辨的引物 16 条 (表 3), 利用 16 条引物对 43 份样本进行扩增。

2.2 CDDP 标记多态性分析

利用筛选的 16 条引物对 43 份铁皮石斛进行扩增, 共扩增出 151 条带, 每条引物平均扩增 9.43 条, 其中多态性条带 144 条, 占总条带 95.3%, 说

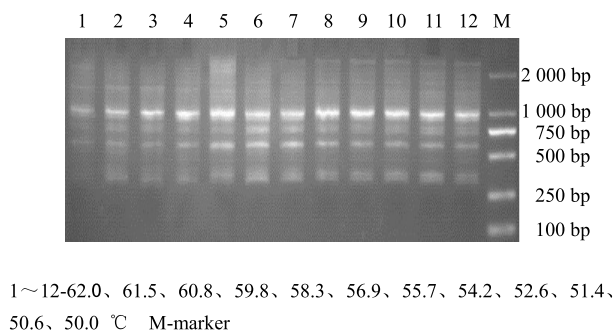


图 2 梯度退火实验

Fig. 2 Gradient annealing experiment

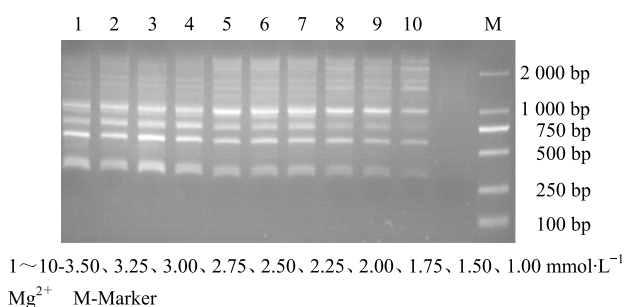


图 3 Mg^{2+} 单因素实验

Fig. 3 Mg^{2+} single factor experiment

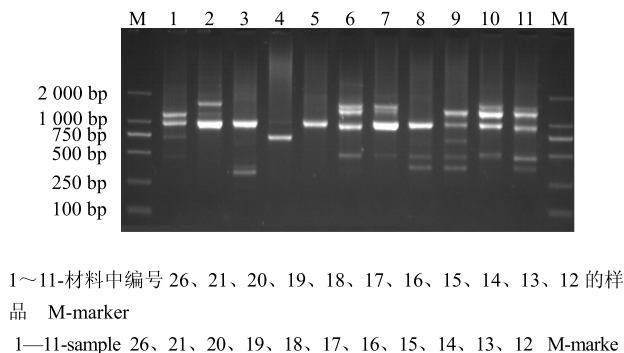


图 4 体系验证 CDDPWRKY-F1 引物扩增实验

Fig. 4 System validation in CDDPWRKY-F1 Primer amplification experiments

表 3 引物序列及扩增结果

Table 3 Primer sequence and amplification results

名称	序列 (5'-3')	条带数/条	多态性条带	PPL/%
WRKY-F1	TGGCGSAAGTACGGCCAG	8	8	100.00
WRKY-R1	GTGGTTGTGCTTGCC	9	8	88.89
WRKY-R3	GCASGTGTGCTCGCC	9	8	88.89
WRKY-R2B	TGSTGSATGCTCCCG	9	9	100.00
WRKY-R3B	CCGCTCGTGTGSACG	9	8	88.89
Myb1	GGCAAGGGCTGCCGC	12	12	100.00
ERF1	CACTACCGCGSCTSCG	7	7	100.00
ERF2	GCSGAGATCCGSGACCC	9	9	100.00
KNOX-1	AAGGSAAGCTSCCSAAG	11	10	90.91
KNOX-2	CACTGGTGGGAGCTSCAC	7	5	71.43
KNOX-3	AAGCGSCACTGGAAGCC	11	11	100.00
MADS-1	ATGGGCCGSGGCAAGGTGC	12	12	100.00
MADS-2	ATGGGCCGSGGCAAGGTGG	10	10	100.00
MADS-4	CTSTGCGACCGSGAGGTG	10	9	90.00
ABP1-1	ACSCCSATCCACCGC	11	11	100.00
ABP1-3	CACGAGGACCTSCAGG	7	7	100.00
总计		151	144	95.30
平均		9.43	—	—

明 CDDP 标记应用于铁皮石斛遗传多样性分析表现出较好的多态性。不同引物扩增结果不同, 引物 ERF1、KNOX-2 和 ABP1-3 扩增条带最少为 7 条, 引物 Myb1 和 MADS-1 最多为 12 条, 引物 KNOX-2 扩增结果 PPL 最低为 71.43%, 10 条引物 WRKY-F1、WRKY-R2B、Myb1、ERF1、ERF2、KNOX-3、MADS-1、MADS-2、ABP1-1、ABP1-3 的 PPL 均达 100% (表 3)。

2.3 铁皮石斛遗传多样性分析

按来源不同将 43 份样本分为 3 个居群, 其中样本编号 1~17 为邵武栽培品种 1 号居群, 编号 18~28 为泰宁栽培品种 2 号居群, 编号 29~43 的为泰宁崖壁野生品种 3 号居群。居群遗传多样性分析结果表明, 居群 PPL 为 65.56%~82.12%, 平均为 74.61%, 最高的为邵武品种 (82.12%), 最低的是野生品种 (65.56%)。居群 H 在 0.169 6~0.228 3, 平均 0.199, 最高的是邵武品种 (0.228 3)、最低的是野生品种 (0.169 6)。I 为 0.268 2~0.354 3, 平均 0.312 8, 居群 H 与居群 PPL 大小趋势一致 (表 4)。群体 H_t 为 0.224, 群内 H_s 为 0.199 3, 居群间 G_{st} 为 0.110 2, 表明居群间遗传分化水平较低, 居群间 N_m

表 4 遗传多样性

Table 4 Analysis of genetic diversity

居群	N_a	N_e	H	I	PPL/%
1	1.821 2	1.372 9	0.228 3	0.354 3	82.12
2	1.761 6	1.317 5	0.199 8	0.315 9	76.16
3	1.655 6	1.269 0	0.169 6	0.268 2	65.56

为 4.035 4, 表明居群间有较高的基因交流, 遗传变异主要存在于居群内。

2.4 聚类分析

基于遗传一致度, 用 NTSYS-pc2.10 采用 UPGMA 法, 构建 43 份铁皮石斛图谱 (图 5)。由图 5 可以看出, 43 份样本遗传相似性系数在 0.64~0.95, 遗传距离跨度较大, 说明供试样本遗传背景具有丰富的多样性。在相似系数 0.656 位置可以将 43 份样本分为 2 大类, 第 1 类主要为泰宁栽培种和野生种, 第 2 类主要是邵武栽培种。其中第 2 类邵武的栽培品种相似性系数跨度较大, 为 0.64~0.95, 说明邵武栽培品种种质资源出现了较大的遗传分化, 可能与其品种来源广泛, 不同品种混植以及仿野生栽培有关。第 1 类在相似性系数为 0.672 位置, 可以分为 2 个亚类, 第 1 个亚类主要为泰宁栽培种, 部分

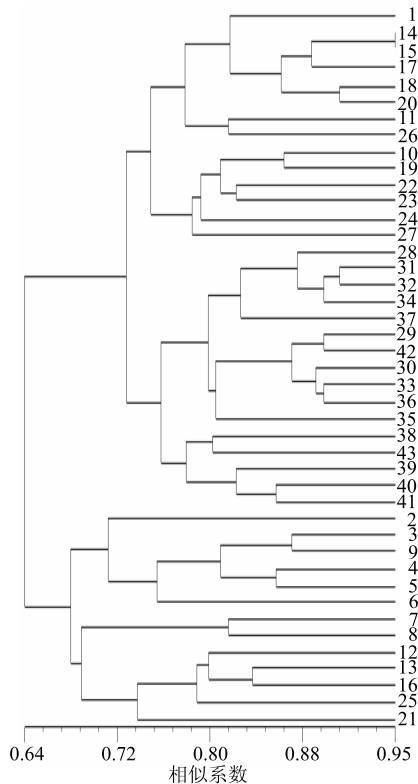


图 5 基于 CDDP 标记的铁皮石斛聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of *Dendrobium candidum* based on CDDP Marker

邵武栽培品种与其有重叠,第 2 个亚类除 28 号外均为野生品种。

2.5 主坐标分析

主坐标可将 43 份样本分 2 个主体域和一个附属域 (图 6), A 域中除 28 号外均为野生种质,与聚类图中第二亚类一致, B 域主要为邵武栽培品种,与聚类图不同的是,主坐标中邵武和泰宁栽培品种重叠度更大,同时部分变异较大的样本远离主体域形成附属域 B1。在聚类图和主坐标分布中,野生品种均较好地聚在一起,说明其遗传信息传递的保守性,而邵武和泰宁的栽培品种则差异较大并重叠分布,可能人为选择加快了铁皮石斛品种的遗传变异。

2.6 抗性种质初步筛选

对与抗性相关的 WRKY 类、MYB 类、ERF 类引物扩增结果进行条带统计,其中 WRKY 类引物共扩增出清晰条带 521 条,平均每个植株 12.1 条,筛选出大于平均值的植株有 17 个,再分别对其他二类引物扩增结果进行计算,绘制韦恩图 (图 7 和表 5),最终与抗性相关的 3 类引物共同筛选出的优良种质为 8 个,分别为 26、10、22、23、13、3、9、

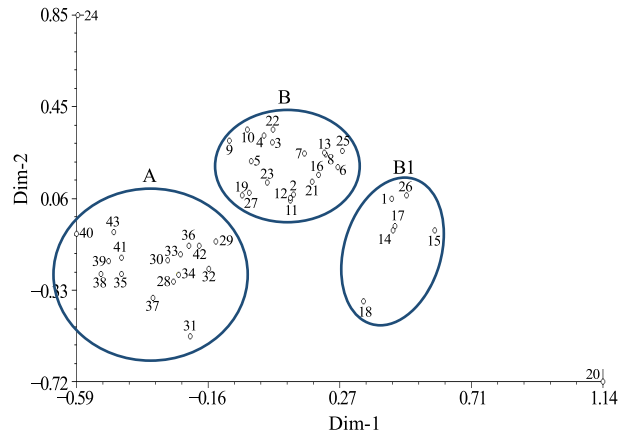


图 6 主坐标分析

Fig. 6 Principal coordinate analysis

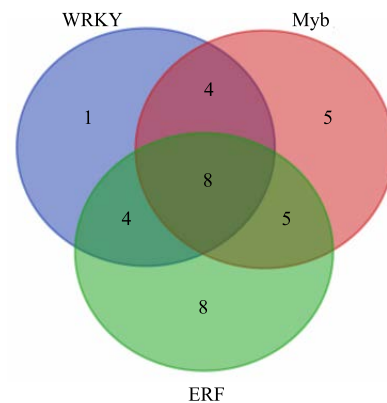


图 7 筛选潜在抗性材料

Fig. 7 Screening of potential resistant materials

表 5 筛选集合

Table 5 Filter collection

集合名称	共有带数	元素
ERF Myb WRKY	8	26、10、22、23、13、3、9、41
Myb WRKY	4	30、28、31、43
ERF WRKY	4	2、40、4、5
ERF Myb	5	7、20、6、39、38
WRKY	1	42
Myb	5	33、21、29、12、34
ERF	8	17、18、14、24、11、36、15、8

41 号种质,初步认定该 8 株植株潜在具有比其他植株优良的抗性。

3 讨论

3.1 CDDP 标记与抗性育种

CDDP 是基于单引物扩增的一种目标分子标记技术,相对于 ISSR、SSR、SRAP 等随机分子标记技术,其标记的是目的基因的一部分或与目的基因

紧密连锁,在良种选育上更具有优势。植物抗逆性状受诸多基因控制,如耐高温、耐低温、抗病虫害等性状的强弱往往不取决于单一因子,其中转录因子可以通过调控一系列与逆境相关的功能基因的表达,从而提高植物对逆境的抵抗力。CDDP 标记的引物正是基于转录因子开发而来。

其中 WRKY、MYB、ERF 类是目前研究较多的与植物抗逆相关的转录因子。Qiu 等^[17]研究发现 WRKY45 过表达可增强拟南芥抗病性和耐旱性,在烟草中 WRKY 基因参与烟草花叶病毒的防御反应^[18],Zheng 等^[19]研究发现 WRKY25 转录因子过表达增强抵抗病原菌的能力,Zhou 等^[20]通过转基因过表达 WRKY21 发现可增强植株抗冷害能力。此外,众多研究表明 MYB 转录因子^[21-24]和 ERF 转录因子^[25-28]也参与植物抗病虫害、耐旱、耐寒等非生物胁迫过程的响应。利用基于 WRKY、MYB、ERF 等转录因子开发的 CDDP 锚定引物,通过扩增条带间接筛选潜在抗性植株,可作为一种有效的辅助选育抗逆品种的快捷方法。本研究利用 CDDP 标记筛选得到 8 份具有潜在抗性的铁皮石斛优良种质,为后续品种的选育奠定了基础,能够大大提高分子辅助选育新品种的效率,同时也节省了人力和时间成本。

3.2 铁皮石斛的遗传多样性

遗传多样性反映的是物种进化和适应环境的能力,也是资源保护和利用的重要参考依据。研究铁皮石斛遗传多样性对铁皮石斛引种改良、种质鉴定、资源保护等具有重要意义。近年来,包英华等^[29]用 SRAP 技术对 8 个居群铁皮石斛进行多样性分析,其多态性百分率为 96.46%,而在铁皮石斛 ISSR 标记分析中,其多态性比率分别达 91.7%^[8]、94.4%^[9]、100%^[30],表明铁皮石斛具有丰富的遗传多样性。本研究通过对铁皮石斛种质资源进行 CDDP 标记研究,共扩增出 151 个位点,其中多态性位点 144 个,多态性比率达 95.3%,该结果与前人研究结果比较一致,说明 CDDP 分子标记可以应用于铁皮石斛种质资源分析,同时表明供试材料具有较高的遗传多样性,遗传资源较为丰富,应该加强对供试材料研究和利用。

本研究中,人工栽培品种遗传多样性要高于野生品种,分析原因可能是野生铁皮石斛采集相对集中,样本量少,而取样数量会影响植物遗传多样性的评价;同时栽培品种 N_m 达到 4.035 4,说明其具有较强的基因流,形成了较高的遗传多样性。究其原因,近

年来铁皮石斛资源人工驯化栽培成功后,由于较高的经济价值和药用价值,栽种者交流频繁,相互引种,造成资源融合,促进了栽培品种的遗传多样性。另外,邵武和泰宁的材料聚类相互重叠,这与相似的生长环境、种养模式和种源混杂不无关系。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志科学编辑委员会. 中国植物志 (第十九卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 中国药典. [S]. 一部. 2015.
- [3] 相萍萍, 王旭, 刘超. 铁皮石斛的最新应用研究 [J]. 西部中医药, 2016, 29(1): 129-132.
- [4] 梁楚燕, 梁颖敏, 赵雪洁, 等. 铁皮石斛改善记忆能力及延缓衰老的初步研究 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2016, 37(2): 99-104.
- [5] 覃辉艳, 梁慧莉, 姚思宇, 等. 铁皮石斛颗粒增强免疫力作用的实验研究 [J]. 应用预防医学, 2016, 22(1): 81-83.
- [6] 郭婕, 颜燕, 姚文环, 等. 铁皮石斛茶缓解小鼠体力疲劳作用的研究 [J]. 海峡药学, 2015, 27(2): 19-21.
- [7] 斯金平, 俞巧仙, 宋仙水, 等. 铁皮石斛人工栽培模式 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 481-484.
- [8] 江金兰, 叶炜, 李永清, 等. 福建泰宁野生铁皮石斛 ISSR 亲缘关系分析 [J]. 浙江农业科学, 2016, 57(2): 208-210.
- [9] 李永清, 叶炜, 江金兰, 等. 铁皮石斛种质亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 西南农业学报, 2015, 28(4): 1530-1534.
- [10] Collard B C Y, Mackill D J. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2009, 27(4): 558-562.
- [11] 熊发前, 蒋菁, 钟瑞春, 等. 两种新型目标分子标记技术——CDDP 与 PAAP [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(9): 871-875.
- [12] Agarwal P, Reddy M P, Chikara J. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants [J]. *Mol Biol Reports*, 2011, 38(6): 3883-3896.
- [13] 左然, 徐美玲, 柴国华, 等. 植物 MYB 转录因子功能及调控机制研究进展 [J]. 生命科学, 2012, 24(10): 1133-1140.
- [14] 莫纪波, 李大勇, 张慧娟, 等. ERF 转录因子在植物对生物和非生物胁迫反应中的作用 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(12): 1145-1154.
- [15] 尹明华, 徐志坚, 黄玮, 等. 江西山药种质资源遗传多样性及其组培苗遗传稳定性的 RAPD 检测 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3486-3493.

- [16] 张君毅. 半夏遗传结构和多样性 RAPD 标记分析 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(18): 43-47.
- [17] Qiu Y, Yu D. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Enviro Exper Bot*, 2009, 65(1): 35-47.
- [18] Naoumkina M A, He X, Dixon R A. Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula* [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 132-137.
- [19] Zheng Z, Mosher S L, Fan B, *et al.* Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae* [J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 7(1): 2-10.
- [20] Zhou Q, Tian A, Zou H, *et al.* Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(5): 486-503.
- [21] Ramirez V, Agorio A, Coego A, *et al.* MYB46 modulates disease susceptibility to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(4): 1920-1935.
- [22] Cominelli E, Sala T, Calvi D, *et al.* Over-expression of the *Arabidopsis* AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability [J]. *Plant J*, 2008, 53(1): 53-64.
- [23] De Vos M, Denekamp M, Dicke M, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* transcription factor AtMYB102 functions in defense against the insect herbivore *Pieris rapae* [J]. *Plant Signal Behav*, 2006, 1(6): 305-311.
- [24] Liao Y, Zou H F, Wang H W, *et al.* Soybean GmMYB76, GmMYB92, and GmMYB177 genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 1047-1060.
- [25] Zhang Z, Huang R. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor TERF2/LeERF2 is modulated by ethylene biosynthesis [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 73(3): 241-249.
- [26] Zhang H, Huang Z, Xie B, *et al.* The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco [J]. *Planta*, 2004, 220(2): 262-270.
- [27] Wu L, Zhang Z, Zhang H, *et al.* Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(4): 1953-1963.
- [28] Zhang G, Chen M, Li L, *et al.* Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco [J]. *J Experim Bot*, 2009, 60(13): 3781-3796.
- [29] 包英华, 潘超美, 白 音, 等. 铁皮石斛种质资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(5): 349-353.
- [30] 江金兰, 叶 炜, 李永清, 等. 福建泰宁野生铁皮石斛种群的 ISSR 亲缘关系分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(3): 259-266.