

核桃抗逆基因 *JrGSTU23* 的克隆及表达分析

高向倩^{1,2}, 李忆林¹, 贾彩霞¹, 李大培¹, 杨玉婷¹, 杨桂燕^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 林学院 山阳核桃板栗试验示范站, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 林学院 陕西省经济植物资源开发利用重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 谷胱甘肽转移酶 *GST* 基因在植物逆境响应中具有重要作用。核桃 *Juglans regia* 是重要的经济林木, 其生长和产量受环境因子的影响。为探索核桃抗逆生理机制, 筛选抗逆基因, 以品种‘香玲’‘Xiangling’为试材, 克隆获得核桃 *JrGSTU23* 基因, 并进行生物信息学和基因表达分析, 预测 *JrGSTU23* 的基本生物功能。结果显示: *JrGSTU23* 基因的开放阅读框(ORF)为 684 bp, 编码多肽为 25.89 kDa, 包含氨基酸 227, 理论等电点为 5.20。与碧桃 *Prunus persica*, 毛果杨 *Populus trichocarpa* 等同源蛋白进行多序列比对, 发现均有 GST-Tau 保守结构域, 且与香蕉 *Musa acuminata* 和毛果杨等的 Tau 家族 GST 蛋白具有较近的进化关系; 其上游 2 000 bp 启动子中含有多种与逆境响应相关的顺式作用元件。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)发现, *JrGSTU23* 在植物激素脱落酸(ABA), 茉莉酸(MeJA), 水杨酸(SA)和非生物胁迫氯化钠, 聚乙二醇(PEG 6000), 6 °C 等胁迫下能不同程度地被诱导表达, 且在根和叶中的表达趋势不同。表明 *JrGSTU23* 受不同植物激素和非生物胁迫诱导, 且具有组织表达特异性, 推测其在核桃逆境响应中起到一定作用。图 4 表 2 参 20

关键词: 林木育种学; 核桃; *GST* 基因; 基因表达; 胁迫; 启动子

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)04-0589-07

Identification and expression analysis of the stress resistance gene *JrGSTU23* from *Juglans regia*

GAO Xiangqian^{1,2}, LI Yilin¹, JIA Caixia¹, LI Dapei¹, YANG Yuting¹, YANG Guiyan^{1,2}

(1. Walnut and Chestnut Experiment Station of Shanyang, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Key Laboratory of Economic Plant Resources Development and Utilization in Shaanxi Province, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: The glutathione S-transferase (*GST*) gene, an important player in plant stress response, could benefit *Juglans regia*, a widely planted walnut tree with important economic value that has been affected by adverse environmental factors. To better explore the resistance of walnut trees and to screen the genes related to stress resistance, a Tau subfamily *GST* gene from *Juglans regia* ‘Xiangling’ (*JrGSTU23*) was cloned, and its biological function was analyzed through bioinformatics and gene expression analysis. A qRT-PCR was applied to analyze expression profiles of *JrGSTU23*. Results showed that the open reading frame (ORF) of the *JrGSTU23* gene was 684 bp, the coding polypeptide was 25.89 kDa, the amino acid was 227, and the theoretical isoelectric point was 5.20. The *JrGSTU23* protein contained GST-Tau conserved domain as other homologous, such as the *GSTs* from *Prunus persica*, *Populus trichocarpa*, *Ipomoea batatas*, and *Medicago truncatula*, and shared close evolution with the Tau subfamily *GST* proteins from *Musa acuminata* and *P. trichocarpa*. The up-stream 2 000 bp promoter of *JrGSTU23* was identified from the genome of *J. regia*; cis-elements included abiotic stress

收稿日期: 2017-08-25; 修回日期: 2017-10-16

基金项目: 西北农林科技大学博士科研启动基金资助项目(2014BSJJ038); 中央高校基本科研业务费项目(2452015171); 中国博士后科学基金特别资助项目(2017T100782)

作者简介: 高向倩, 从事林木遗传育种研究。E-mail: 1046655468@qq.com。通信作者: 杨桂燕, 讲师, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: yang861026@163.com

and hormone regulation relating motifs, such as the heat response element (HSE) and the drought response element (MBS). The qRT-PCR showed that the *JrGSTU23* gene could be induced by plant hormone abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA), and salicylic acid (SA), and abiotic stresses of NaCl, PEG 6000, and 6 °C. Also, expression profiles of the *JrGSTU23* gene were specific in roots and leaves. Thus, the walnut *JrGSTU23* gene which could be induced by different plant hormones and abiotic stresses and showed tissue specificity, could provide a potentially positive response to adverse environmental factors and hormone stresses in walnut. [Ch, 4 fig. 2 tab. 20 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Juglans regia*; *GST* gene; gene expression; stresses; promoter

谷胱甘肽转移酶(GSTs)是一个多功能的二聚体酶超家族,具有解毒、清除细胞内活性氧等功能^[1]。在植物中, GSTs 根据其功能和序列等特征被分为 8 个亚家族: alpha, mu, pi, sigma, theta, kappa, zeta 和线粒体(microsomal)GSTs^[1-3]。目前,很多植物中的 *GST* 基因被陆续克隆^[4-5],并进行功能研究,发现来自不同植物的 *GST* 同源基因或相同植株的不同 *GST* 基因,其功能具有一定差异。大多数 GSTs 基因具有响应逆境胁迫的功能。如前期研究发现,柽柳 *Tamarix hispida* 的 zeta 家族基因 *ThGSTZ1* 能被氯化钠,聚乙二醇(PEG 6000),脱落酸(ABA)和甲基紫精(MV)等胁迫调控,过量表达情况下能提高转基因株系抵抗盐、旱、MV 及 ABA 等胁迫的能力^[6-7]。核桃 *Juglans regia* 的 *JrGSTTau1* 基因也能响应不同逆境刺激,过量表达能改善植株应对低温胁迫的能力^[8]。在羽衣甘蓝 *Brassica oleracea* 中分离获得 65 个 *GST* 基因,其中 *BoGSTU19*, *BoGSTU24*, *BoGSTF10* 能被冷胁迫强诱导,推测它们与冷胁迫响应具有重要关系^[9]。水稻 *Oryza sativa* *OsGSTI2* 转基因拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 表现出较高的重金属耐受能力^[10]。这些研究表明: *GST* 基因在植物响应逆境应答及调节中具有多方面的作用,因此具有重要的研究价值。*GST* 家族成员众多,目前对 *GST* 基因的研究主要集中在草本植物,对木本植物 *GST* 基因的研究较少,特别是经济干果核桃鲜见报道。核桃属多年生落叶乔木,是中国主要经济树种之一。近年来全球环境的变化,环境因子特别是西北地区越冬入春出现的“倒春寒”及夏秋核桃成熟期严重的高温干旱等气候现象,严重制约了核桃产业的发展。因此,筛选核桃逆境响应重要基因,研究其逆境响应功能机制,将了解核桃的逆境适应机制具有指导作用。本研究从核桃中鉴定获得 1 条 *GST* 基因 *JrGSTU23*,通过生物信息及定量表达分析其生物学功能,以期核桃抗逆响应研究提供候选基因。

1 材料与方 法

1.1 材料及处理

选取培养于相同条件下的 2 年生‘香玲’‘Xiangling’核桃嫁接苗用作研究材料。处理包括非生物胁迫[100 g·kg⁻¹ 聚乙二醇(PEG 6000), 0.3 mol·L⁻¹ 氯化钠、低温 6 °C]和激素处理[0.1 mmol·L⁻¹ 脱落酸(ABA)], 100.0 mg·L⁻¹ 茉莉酸(MeJA)及 2.0 mg·L⁻¹ 水杨酸(SA)。分别在 0, 3, 6, 12, 24, 48 h 取样,以 0 h 正常浇水作为对照,重复 3 次·处理⁻¹。分别收集各处理后的根和叶,用液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 *JrGSTU23* 基因的克隆与分析

以“glutathione transferase”为关键词在‘香玲’核桃转录组数据中查找 *GST* 基因,经 BLAST 比对选取其中 1 条 *GST* 基因(命名为 *JrGSTU23*)进行分析。用 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定 *JrGSTU23* 基因开放读码框(ORF),再根据 ORF 两端序列设计引物 *JrGSTU23*-F 和 *JrGSTU23*-R (表 1),进行聚合酶链式反应(PCR)扩增。产物经回收纯化后与 pMD-18-T 载体连接并转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞。挑取阳性克隆扩大培养进行菌液 PCR 验证,对获得目的片段的克隆测序。利用 ExPasy ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对确认的 *JrGSTU23* 基因序列特征进行分析。利用 BLASTP(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行序列同源性搜索;利用 Clustal 3.0 软件对不同物种的 *GST* 蛋白进行多序列比对和进化分析。使用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析该基因启动子中含有的顺式作用元件。利用 ExPasy 中 Swiss Model 程序同源建模,推测该蛋白的三维结构模型。

表 1 研究所用引物

Table 1 The used primers

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
18S <i>rRNA</i>	GGTCAATCTTCTCGTTCCCTT	TCGCATTTTCGCTACGTTCTT
<i>JrGSTU23</i> -DL-F/ <i>JrGSTU23</i> -DL-R	GTGAAGCTGATGCCACT	GTCCTTCCATGTCTCCTC
<i>JrGSTU23</i> -F/ <i>JrGSTU23</i> -R	ATGGGGGATAAGGTGAAG	TCATGGTGTATTGGCTGC

1.3 *JrGSTU23* 的表达分析

各样品总核糖核酸(RNA)采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法提取^[8], RNA经DNA消化酶处理后采用PrimeScript™ RT Reagent Kit(CWBIO, 康为世纪, 中国)反转录为cDNA, 稀释10倍后用作实时荧光定量PCR(qRT-PCR)的模板。qRT-PCR参照SYBR Green Real time PCR Master mix(CWBIO)进行, 内参基因为核桃18S *rRNA* (*HE574850*)基因^[10]。*JrGSTU23*定量引物为DL-F和DL-R(表1)。定量反应仪器为Applied Biosystems生产的Step One™ Real-Time PCR System。反应程序为: 94℃预变性30s; 94℃变性12s, 60℃退火45s, 72℃延伸45s, 45个循环; 81℃读板1s, 重复3次·样品⁻¹。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对定量结果进行相对分析^[11], 所有表达值均做了以2为底的对数转化。

2 结果与分析

2.1 *JrGSTU23* 全长 cDNA 序列分析

通过查找核桃转录组数据获得1条*GST*基因, 根据获得的cDNA序列设计引物*JrGSTU23*-F/R进行PCR验证, 经分析发现该基因ORF长684bp, 拟推导的蛋白分子量为25.89kDa, 含有氨基酸数为227, 理论等电点为5.20。BLAST分析发现: 该基因与核桃转录组中的*GST23*基因相同。保守结构域分析发现: 该蛋白具有GST-Tau保守域(图1), 表明该蛋白属于GST氧硫还蛋白亚家族(thioredoxin-line superfamily, Thi), 因此命名为*JrGSTU23*(GeneBank登录号: MG356784)。经美国生物技术信息中心(NCBI)同源搜索获得相似蛋白, 并进行进化分析, 发现*JrGSTU23*蛋白与香蕉*Musa accuminata*, 毛果杨*Populus trichocarpa*等的进化关系较近(图2)。通过Swiss Model程序同源建模, 推测该蛋白的三维结构如图3所示。

2.2 *JrGSTU23* 启动子分析

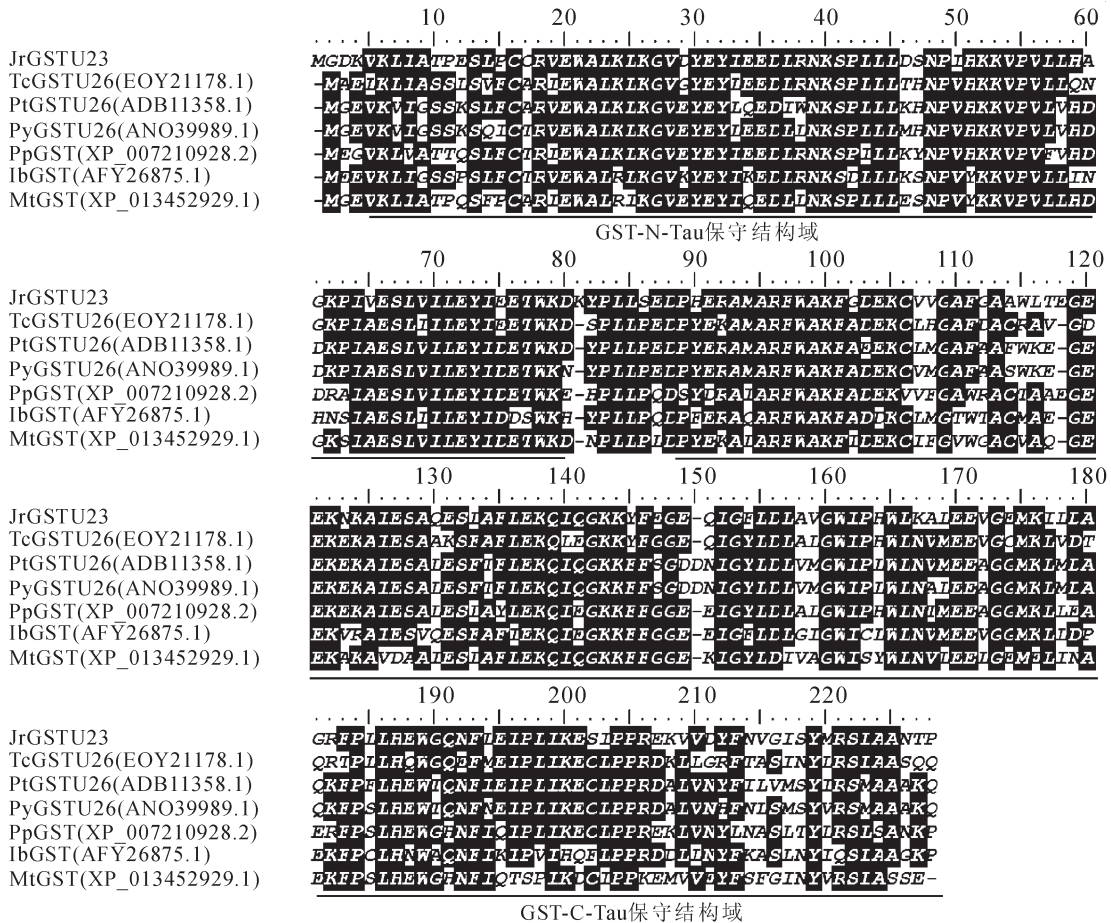
以*JrGSTU23*在NCBI数据库中进行同源搜索, 发现其与‘强特勒’核桃的*GST*序列(XM_018974105.1)一致。因此, 分析XM_018974105.1序列起始密码子上游2000bp的DNA序列作为基因启动子, 并对其顺式作用元件进行分析, 为预测*JrGSTU23*基因的功能及可能调控机制提供参考依据。PlantCARE预测结果显示, *JrGSTU23*启动子包含多个与逆境响应及激素调控相关的顺式作用元件, 如热胁迫响应元件(HSE), 干旱响应元件(MBS), 茉莉酸响应元件(CGTCA-motif), 水杨酸响应元件(TCA-element)等(表2)。

2.3 外源激素胁迫对 *JrGSTU23* 表达的影响

对试材分别进行ABA, MeJA, SA等激素处理。qRT-PCR实验发现: *JrGSTU23*能被这些激素明显诱导, 但在根和叶的表达趋势不同(图4)。在叶中, ABA处理3~6h被抑制, 24h达最大表达水平(2.85); MeJA胁迫下与ABA相反, 随着胁迫时间延长, *JrGSTU23*的表达水平逐渐下降, 在24h被抑制(-0.98); SA胁迫3~6h也被抑制, 在24h达最大值4.13, 但其最低值出现在3h, 为-0.01。在根中, *JrGSTU23*在ABA胁迫下的最大和最小转录水平分别出现在12和24h, 分别为4.35和2.74; MeJA处理下, 该基因的最大和最小表达量分别为7.24(12h)和2.73(3h); 而在SA胁迫下, *JrGSTU23*的表达随胁迫时间延长而增强, 最大值为4.57倍(24h)。表明*JrGSTU23*基因能不同程度响应ABA, MeJA, SA的胁迫, 并表现出组织特异性, 但其具体的响应机制可能不同。

2.4 不同非生物胁迫对 *JrGSTU23* 基因表达的影响

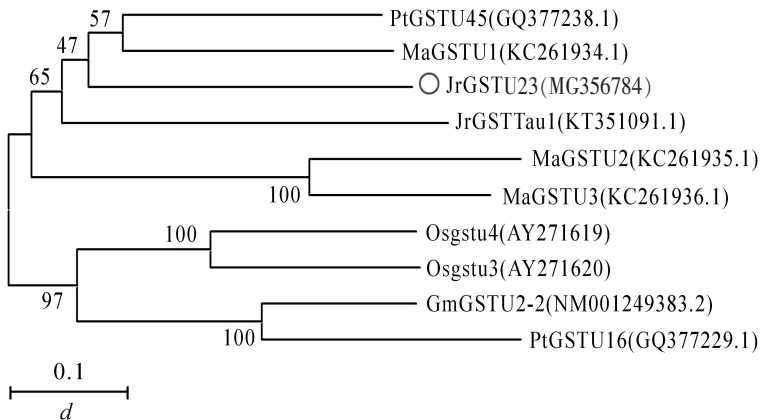
qRT-PCR结果显示: *JrGSTU23*能被氯化钠, 聚乙二醇(PEG 6000), 6℃等不同胁迫明显诱导, 且在大多数时间点下的表达差异显著(图4)。氯化钠胁迫下, *JrGSTU23*在根和叶中的表达趋势相似, 均随着胁迫时间的延长表达增高, 在胁迫24h达最大表达水平, 分别为2.49和4.11。但除3h外, 其他处



Jr. 核桃 *Juglans regia*; Tc. 可可 *Theobroma cacao*; Pt. 毛果杨 *Populus trichocarpa*; Py. 亚东杨 *Populus yatungensis*; Pp. 碧桃 *Prunus persica*; Ib. 甘薯 *Ipomoea batatas*; Mt. 苜蓿 *Medicago truncatula*

图1 JrGSTU23 蛋白与其同源蛋白序列的氨基酸聚类分析

Figure 1 Amino acid sequence alignment between JrGSTU23 and its homologous proteins from other species



Jr. 核桃 *Juglans regia*; Pt. 毛果杨 *Populus trichocarpa*; Ma. 香蕉 *Musa acuminata*; Os. 水稻 *Oryza sativa*; Gm. 大豆 *Glycine max*

图2 JrGSTU23 蛋白与其他物种相似蛋白氨基酸序列的系统进化树分析

Figure 2 Phylogenetic tree of JrGSTU23 protein and its homologs from other species

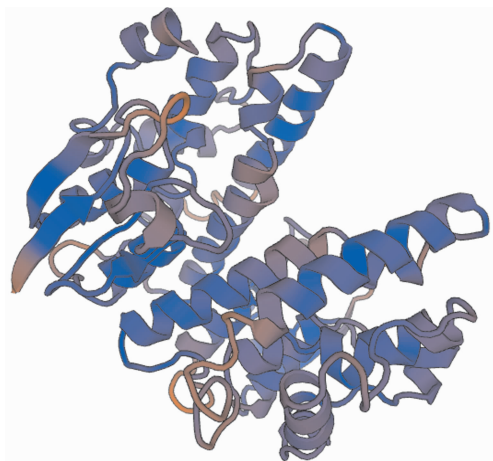


图3 JrGSTU23 蛋白三维结构预测模型

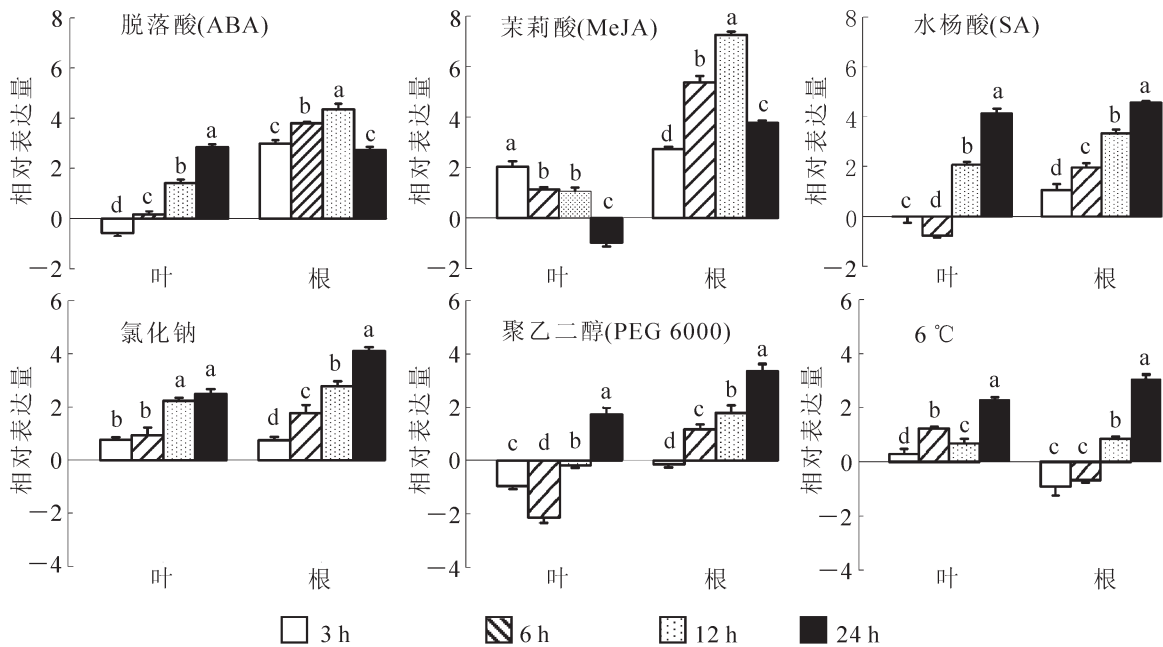
Figure 3 Predicted 3D structure model of protein JrGSTU23

理点该基因在根中的表达水平高于在叶中的表达。PEG 6000 模拟干旱胁迫 3~12 h, *JrGSTU23* 在叶中的表达被抑制, 24 h 被诱导为 1.76; 在根中的表达趋势与氯化钠胁迫相似, 随着胁迫时间延长而增大, 且

表 2 PlantCARE 预测 *JrGSTU23* 启动子区顺式作用元件

Table 2 Cis-acting regulatory elements in *JrGSTU23* promoter predicted by PlantCARE

顺式作用元件	起始位点	方向	序列	特性
AT-rich element	1 436	+	ATAGAAATCAA	ATBP-1 结合位点
ATC-motif	1 125	+	AGTAATCT	光响应
Box 4	298/353/302/368	+ / + / + / +	ATTAAT	
Box I	344/453	- / +	TTTCAA	
GAG-motif	121/157	- / -	AGAGATG	
GATA-motif	1 235	+	GATAGGG	
I-box	1 235/1 249	+ / -	GATAGGG/GATATGG	
Sp1	1 147/1 354	+ / +	CC (G/A) CCC	
chs-CMA2a	580	-	GCAATTCC	
CCGTCC-box	1 157	+	CCGTCC	分生组织激活
CGTCA-motif	197	+	CGTCA	茉莉酸响应
TGACG-motif	197	-	TGACG	
HSE	126	-	AGAAAATTCG	热胁迫响应
MBS	669	-	TAACTG	干旱胁迫响应
O2-site	1 249	-	GATGATATGG	玉米素代谢调控
RY-element	645	+	CATGCATG	种子调控
Skn-1_motif	379	-	GTCAT	胚乳表达
TC-rich repeats	393	+	ATTTTCTTCA	防卫和胁迫响应
TCA-element	316	+	CCATCTTTTT	水杨酸响应
TCA-element	192	+	AACGAC	激素响应元件
WUN-motif	736	-	TCATTACGAA	创伤响应元件



不同字母表示在相同组织相同处理下不同处理时间相对表达量差异显著($P < 0.05$)

图 4 *JrGSTU23* 基因在不同胁迫处理下的表达水平

Figure 4 Expression level of *JrGSTU23* gene under different stresses

在 24 h 达最高水平，但表达量低于氯化钠胁迫。表明 *JrGSTU23* 应对氯化钠和干旱胁迫的响应机制可能相似，但 *JrGSTU23* 对盐胁迫可能更为敏感。低温胁迫下，*JrGSTU23* 在叶中的表达在 6 h(1.22)和 24 h (2.30)出现 2 个高峰；在根中，其表达趋势与氯化钠和干旱胁迫相似，随着胁迫时间延长而升高，在 24 h 达最大值(3.06)。

3 讨论

GSTs 是植物响应逆境的重要基因, 在植物解毒等方面具有重要作用。其中, 含有 Tau 保守结构域的 GST 亚家族基因, 参与植物众多的逆境响应。核桃作为中国西北地区扶贫攻坚项目的重要经济树种, 在推动区域经济发展上具有重要作用。核桃产业的健康快速发展与核桃产量和质量息息相关。但气候等环境因子严重制约了中国核桃产业的发展, 因此, 选育抗逆优良核桃品种, 掌握核桃抗逆适应机制, 对深入了解核桃的适应性具有重要指导作用。本研究从‘香玲’核桃中克隆获得 1 条 Tau 家族的 GST 基因(*JrGSTU23*), 经进化分析发现该基因与来自水稻、香蕉、毛果杨、大豆 *Glycine max* 等物种的 Tau 家族基因具有较近的亲缘关系, 推测其可能与这些蛋白具有相似或相近的功能。如, 水稻 *Osgstu4* 和 *Osgstu3* 能迅速被抗氧化剂和过氧化氢诱导, 表明 *Osgstu4* 和 *Osgstu3* 的应答反应涉及氧化还原反应^[12]。大豆 *GmGSTU2-2* 是严格的渗透胁迫型响应基因, 参与植物胁迫反应中的催化和调节功能网络^[13]。毛果杨的 *GSTU16* 和 *GSTU45* 能被三硝基甲苯(2,4,6-trinitrotoluene)诱导^[14]。因此, 推测 *JrGSTU23* 与逆境应答具有重要关系。

顺式作用元件一般由 5~20 个碱基对组成, 是同一 DNA 分子中具有转录调节功能的特异 DNA 序列^[15]。海蓬子 *Salicornia brachiata* 的一个 Tau 类 GST 基因的上游 1 023 bp 启动子包含有非生物胁迫响应相关的 ABA 响应元件(ABRE), 干旱响应基因 *rd22* 识别位点(MYB), 结节特意表达元件(NOD), 光响应表达元件(GATA), 光调控表达元件(GT1)及激素、病害和损伤等相关的顺式作用元件, 参与了该基因响应氯化钠和渗透胁迫的表达调控^[16]。玉米 *Zea mays* 的 *ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 基因启动子序列中含有 ABA, SA, 赤霉素(GA), 低温等相关的顺式作用元件, 在氯化钠、干旱、低温胁迫下, *ZmCIPK10* 和 *ZmZIP71* 的表达量上升, 表明其参与了玉米的逆境响应^[17-18]。本研究发现: *JrGSTU23* 基因启动子含有丰富的顺式作用元件, 如玉米素代谢、种子调控、分生组织激活、胚乳表达以及干旱胁迫、热胁迫、防卫、MeJA 和 SA 等响应相关的元件(表 2)。由此可推测, *JrGSTU23* 可能参与植物生长发育及逆境响应过程, 具有深入研究的价值。

GSTs 基因响应逆境具有组织表达特异性。本研究发现的 *JrGSTU23* 基因在不同激素(SA, MeJA, ABA)及不同逆境(氯化钠、干旱、低温)下在根和叶中能被不同程度地诱导表达, 体现了一定的组织表达特异性和逆境响应特异性。这与其他物种的 Tau 家族 GST 基因的逆境响应表达具有一定的相似性。如从香蕉克隆获得的 5 个 GST 基因(*MaGSTU1*, *MaGSTU2*, *MaGSTU3*, *MaGSTF1*, *MaGSTL1*)的表达具有组织特异性, 在盐、干旱、冷等胁迫下 Tau 亚家族的 *MaGSTU1*, *MaGSTU2*, *MaGSTU3* 的表达受盐、干旱、冷诱导更为明显, 而 *MaGSTF1* 和 *MaGSTL1* 更受信号分子影响^[19], 预测这些 GST 基因对不同逆境的响应功能具有差异。盐胁迫下, 番茄 *Solanum lycopersicum* 的 *SIGSTU23* 和 *SIGSTU26* 基因在叶中被上调表达^[20], 推测这些 GST 基因在不同逆境下的具体功能可能不同。*JrGSTU23* 在低温胁迫下也表现出根、叶表达差异, 过表达提高了植株的抗寒能力^[8]。可见, 通过分析基因响应不同逆境的转录水平, 可以推测其在逆境响应中可能的生物学功能。*JrGSTU23* 能不同程度地响应激素及非生物胁迫, 表明其参与了核桃的逆境响应调控。后续研究将通过在植株中过量表达全面分析 *JrGSTU23* 基因的抗逆响应功能。

4 参考文献

- [1] DIXON D P, LAPHORN A, EDWARDS R. Plant glutathione transferases [J]. *Methods Enzymol*, 2005, **401**(3): 169 - 186.
- [2] DIXON D, HARTMANN D H, KOLACZYK E D, et al. Evidence for a galactic r-ray halo [J]. *New Astron*, 1998, **3**(7): 539 - 561.
- [3] DIXON D P, EDWARDS R. Glutathione transferases [J]. *Arabidop Book*, 2010, **8**(45): e0131. doi: 10.1199/tab.0131.
- [4] CHEN J H, JIANG Hanwei, HSIEH E J, et al. Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid [J]. *Plant Physiol*, 2012, **158**(1): 340 - 351.
- [5] JAIN M, GHANASHYAM C, BHATTACHARJEE A. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses [J]. *BMC Genom*, 2010, **11**

- (1): 11 – 17.
- [6] GAO Caiqiu, YANG Guiyan, GUO Yucong, *et al.* Overexpression of *ThGSTZ1* from *Tamarix hispida* improves tolerance to exogenous ABA and methyl viologen [J]. *Trees*, 2016, **30**(6): 1935 – 1944.
- [7] YANG Guiyan, WANG Yucheng, XIA Dean, *et al.* Overexpression of a *GST* gene (*ThGSTZ1*) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance by enhancing the ability to scavenge reactive oxygen species [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2014, **117**(1): 99 – 112.
- [8] YANG Guiyan, XU Zhenggang, PENG Shaobing, *et al.* In planta characterization of a tau class glutathione S-transferase gene from *Juglans regia* (*JrGSTTau1*) involved in chilling tolerance [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, **35**(3): 681 – 92.
- [9] VIJAYAKUMAR H, THAMILARASAN S K, SHANMUGAM A, *et al.* Glutathione transferases superfamily: cold-inducible expression of distinct *GST* genes in *Brassica oleracea* [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(8): 1211. doi: 10.3390/ijms.17081211.
- [10] KUMAR S, ASIF M H, CHAKRABARTY D, *et al.* Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses [J]. *J Hazardous Mater*, 2013, **248/249**: 228 – 237.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [12] MOONS A. *Osgstu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione-S-transferases, are heavy metal-and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots [J]. *FEBS Lett*, 2003, **553**(3): 427 – 432.
- [13] SKOPELITOU K, MULETA A W, PAPAGEORGIU A C, *et al.* Characterization and functional analysis of a recombinant tau class glutathione transferase *GmGSTU2-2* from *Glycine max* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, **94**(B): 802 – 812.
- [14] MUSDAL Y, MANNERVIK B. Substrate specificities of two tau class glutathione transferases inducible by 2,4,6-trinitrotoluene in poplar [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2015, **1850**(9): 1877 – 1883.
- [15] 郭晋艳, 郑晓瑜, 邹翠霞, 等. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式元件及转录因子研究进展[J]. 生物技术通报, 2011, **23**(4): 16 – 20.
- GUO Jinyan, ZHENG Xiaoyu, ZOU Cuixia, *et al.* Research progress of *cis*-elements of abiotic stress inducible promoters and associated transcription factors [J]. *Biotechnol Bull*, 2011, **23**(4): 16 – 20.
- [16] TIWARI V, PATEL M K, CHATURVEDI A K, *et al.* Functional characterization of the tau class glutathione-S-transferases gene (*SbGSTU*) promoter of *Salicornia brachiata* under salinity and osmotic stress [J]. *PLoS One*, 2016. **11**(2): e0148494. doi: 10.1371/journal.pone.0148494.
- [17] 赵晋锋, 余爱丽, 王寒玉, 等. 非生物逆境胁迫下 *ZmCIPK10* 基因表达分析[J]. 生物技术进展, 2011, **1**(2): 130 – 134.
- ZHAO Jinfeng, YU Aili, WANG Hanyu, *et al.* Expressional analysis of *ZmCIPK10* under abiotic stresses [J]. *Curr Biotechnol*, 2011, **1**(2): 130 – 134.
- [18] 刘彦丹, 英生, 张登峰, 等. 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP71* 的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, **12**(5): 775 – 781.
- LIU Yandan, YING Sheng, ZHANG Dengfeng, *et al.* Isolation and expression analysis of a stress-responsive gene *ZmbZIP71* in maize (*Zea mays* L.) [J]. *J Plant Genet Resour*, 2011, **12**(5): 775 – 781.
- [19] WANG Zhou, HUANG Suzhen, JIA Caihong, *et al.* Molecular cloning and expression of five glutathione S-transferase (*GST*) genes from banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish) [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, **32**(9): 1373 – 1380.
- [20] CSISZÁR J, HORVÁTH E, VÁRY Z, *et al.* Glutathione transferase supergene family in tomato: salt stress-regulated expression of representative genes from distinct *GST* classes in plants primed with salicylic acid [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, **78**(3): 15 – 26.