



研究报告

Research Report

利用 VIGS 技术沉默 GhBES1 基因对棉花幼苗生理指标的影响

安汶铠[✉], 常丹[✉], 杨艺[✉], 张富春[✉]

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐, 830046

✉ 通讯作者, zfcxju@xju.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2016年, 第14卷, 第9篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0009

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

安汶铠等, 2016, 利用 VIGS 技术沉默 GhBES1 基因对棉花幼苗生理指标的影响, 分子植物育种(online), 14(9): 1055-1061 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0009)

引用格式(英文):

An et al., 2016, The Effects of Silenced GhBES1 Gene on Physiological Parameters of Cotton Seedlings by VIGS Technique, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 14(9): 1055-1061 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0009)

摘要 沉默基因有助于研究基因在逆境胁迫下的功能。通过对棉花 *GhBES1* 基因进行沉默位点的分析, 确定 *GhBES1* 基因沉默片段为 650 bp, 设计特异性引物, 利用 PCR 克隆从“新陆早 17 号”棉花中获得 650 bp 的基因片段。经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切后与 pTRV-RNA2 质粒连接构建成重组载体 pTRV-GhBES1, 转化农杆菌(GV3101)后, 侵染干旱胁迫处理的棉花幼苗。结果表明, 与 pTRV-00 相比, 携带沉默 *GhBES1* 基因的棉花幼苗的脯氨酸和可溶性糖明显降低, 分别降低了 50.47% 和 39.51%。丙二醛(MDA)含量增加了 1.84 倍。叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素、含水量和甜菜碱也都有一定的下降。研究说明利用 VIGS 技术沉默 *GhBES1* 后, 干旱胁迫处理的棉花幼苗的生理生化指标均表现为进一步下降, 表明 *GhBES1* 可能与棉花抗旱性有密切的相关性。

关键词 遗传变异棉花, 干旱胁迫, VIGS, 生理生化检测, 基因表达

The Effects of Silenced *GhBES1* Gene on Physiological Parameters of Cotton Seedlings by VIGS Technique

An Wenkai[✉], Chang Dan[✉], Yang Yi[✉], Zhang Fuchun[✉]

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, 830046

✉ Corresponding author, zfcxju@xju.edu.cn; ✉ Authors

Abstract In silencing gene is helpful to study the function of gene in the adversity stress. A length of 650 bp of silencing gene fragment was determined by analyzing the silent sites of *GhBES1* gene and designed the specific primer, specifically obtained the 650 bp gene fragment from cotton “XLZ17” (*Gossypium hirsutum*) by using PCR cloned technique. After *Kpn* I and *Xba* I digestion, the recombinant vector pTRV-GhBES1 was obtained by connection with pTRV-RNA2 plasmid and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). Then the *Agrobacterium* strain GV3101 infected the cotton seedlings with drought stress. The result showed that the proline and soluble sugar in cotton seedlings with silenced *GhBES1* gene dramatically decreased by 50.47% and 39.51%, respectively, compared with the pTRV-00. In contrast, the malondialdehyde (MDA) content increased by 1.84 times. Furthermore, the quantities of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, glycinebetaine and water content in silenced *GhBES1* seedlings also declined to some extent. To conclude, the physiology and biochemistry of cotton seedlings that was treated with drought stress expressed further decreased after *GhBES1* gene was silenced by using VIGS technique, the study indicated that *GhBES1* gene probably had a closed relationship with drought resistance of cotton seedlings

Keywords Cotton (*Gossypium hirsutum*), Drought stress, Virus-induced gene silencing (VIGS), Physiological and biochemical assay, Gene expression

研究背景

棉花已经成为新疆的主要经济作物之一, 而新疆干旱少雨的自然条件是影响棉花产量主要的非生物因素之一(周守华等, 2014)。干旱引起的水分缺失会导致棉花在生长发育、产量和品质等方面都受

收稿日期: 2016年03月09日

接受日期: 2016年04月07日

发表日期: 2016年04月10日

基金项目: 本研究由国家自然科学基金-新疆联合基金重点项目(U1303282)资助。

到不利影响(陈丽萍和何道一, 2010)。因此研究棉花的抗旱机制, 提高棉花的抗旱性, 对于新疆棉花产业的发展有重要的意义。

油菜素内酯(Brassinosteroid, BR)是最新发现一种与植物的发育和抗逆相关的植物激素。已有研究表明 BR 可以降低植物在非生物胁迫如干旱(阮英慧等, 2011)、高盐(刘金隆, 2013)和高温(曹云英和赵华, 2007)等条件的损伤。在 BR 信号通路中, *GhBES1* 编码的 BES1 蛋白是一种重要的转录因子, 去磷酸化的 BIN2 使得 BES1 蛋白去磷酸化后可以进入细胞核直接调控细胞内相关抗旱的基因的表达(He et al, 2005)。因此分析 *GhBES1* 基因的功能显得尤为重要, 本研究采用病毒有诱导的基因沉默技术对 *GhBES1* 基因的功能进行了初步的研究。

病毒诱导的基因沉默 (Virus-induced gene silencing, VIGS)是最近几年发现的转录后水平上的一种基因沉默技术, 它是指将带有一段靶基因的重组病毒载体转入根瘤农杆菌(GV3101)侵染植物, 引起植物体内同源基因的沉默或表型变异, 进而通过生理指标测定指标和表型变异来分析该基因的功能(Burch-Smith et al, 2004)。该技术与传统的转基因技术相比较有周期短和高效实用等优点(王丽等, 2014)。当前已有用于棉花赤霉素合成酶基因功能验证的报道(Gao et al., 2011)。本实验通过 VIGS 技术沉默棉花‘新陆早 17 号’幼苗的 *GhBES1* 基因, 研究 PEG6000 模拟干旱胁迫下的渗透物质、MDA、含水量以及叶绿素含量的变化, 为进一步验证 *GhBES1* 的功能提供理论依据。

1 结果与分析

1.1 重组载体 pTRV-GhBES1 的构建

根据沉默干涉位点分析得到棉花 *GhBES1* 基因的干涉片段为 650 bp, 以棉花‘新陆早 17 号’叶片所提取的 cDNA 为模板, 由设计特异性引物扩增后进行琼脂糖凝胶电泳(图 1A), 在 650 bp 左右出现, 扩增产物和 pTRV-RNA2 载体分别进行双酶切(*Kpn* I 和 *Xba* I)后, 进行回收、连接、转化(感受态为农杆菌 GV3101)(图 1B); 测序鉴定出阳性克隆。

1.2 GhCLA1 和 GhBES1 基因沉默效率的检测

相对于空载 pTRV-00, pTRV-GhBES1 植株的 *GhBES1* 的表达量只有 pTRV-00 植株的 21% (图 2), 由此表明棉花苗的 *GhBES1* 基因沉默成功。在 PEG6000 模拟干旱胁迫条件下, pTRV-00 和 pTRV-GhBES1 植株

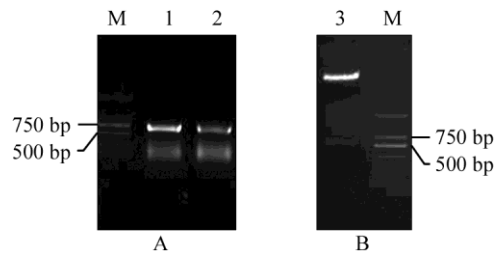


图 1 pTRV-GhBES1 的扩增和酶切鉴定

注: M: DL 2000 Marker; A: 1~2: pTRV-GhBES1 的扩增; B: 1: pTRV-GhBES1 重组质粒的 *Kpn* I 和 *EcoR* I 双酶切鉴定
Figure 1 The amplification and digestion identification of pTRV-GhBES1

Note: M: DL 2000 Marker; A: 1~2: The amplification of pTRV-GhBES1; B: 1: Identification of recombinant plasmid pTRV-GhBES1 digested by *Kpn* I and *EcoR* I

的基因表达量分别是相对于非干旱胁迫下基因表达量的 2.41 和 3.4 倍。表明干旱胁迫下促进 *GhBES1* 的表达。

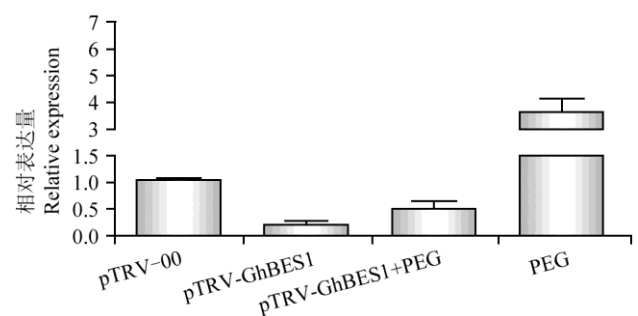


图 2 沉默 GhBES1 对棉花叶中 GhBES1 的表达影响

Figure 2 Effect of silenced GhBES1 on expression of GhBES1 in the cotton

1.3 GhBES1 基因沉默后植株含水量的检测

干旱胁迫 24 h 后, 测量植株含水量(图 3A), 相对于空载 pTRV-00, pTRV-GhBES1 植株的含水降低了 5.4%, 但无明显差异。

测量可溶性糖含量可知(图 3B), pTRV-00 植株和 pTRV-GhBES1 植株可溶性糖含量有显著性差异 ($P=0.0221$)。相对于 pTRV-00 植株, pTRV-GhBES1 植株可溶性糖含量下降了 39.51%。

1.4 GhBES1 基因沉默后光和色素含量的测定

干旱胁迫 24 h 后, 分别对空载 pTRV-00 和 pTRV-GhBES1 植株的叶绿素 a、b、叶绿素 a/b 和类胡萝卜素进行了测量, 与空载 pTRV-00 组相比, 实验组的叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量分别降低了 7.1%、15.6% 和 14.4%。而叶绿素 a/b 相反增加了 12.01% (图 4)。但与空载相比都没有显著性差异。

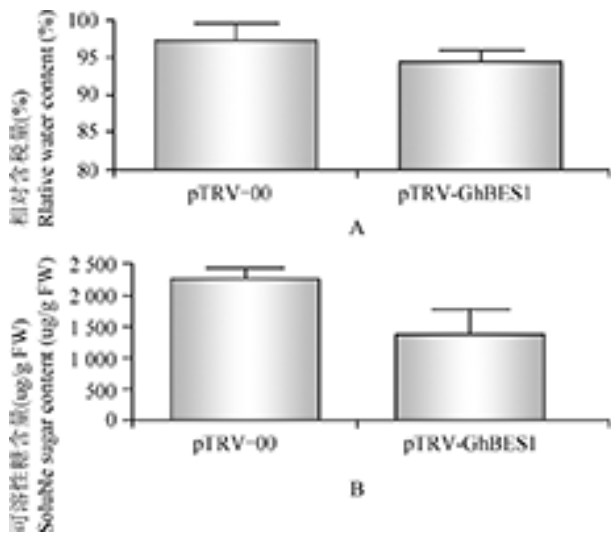


图3 沉默 *GhBES1* 对棉花叶片的含水量和可溶性糖含量的变化的影响
Figure 3 Effect of silenced *GhBES1* on the change of water content and soluble sugar content in leaves of cotton

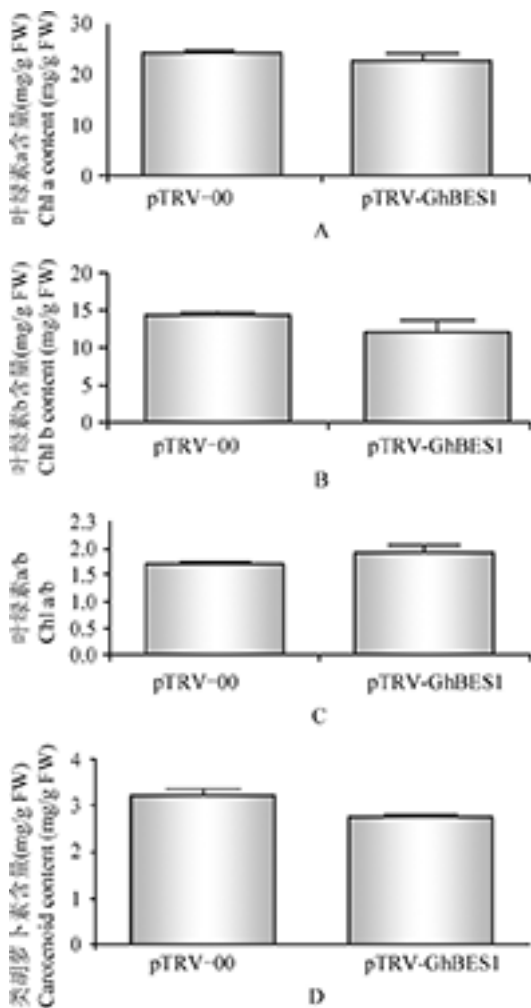


图4 沉默 *GhBES1* 对棉花的叶绿素含量的影响
Figure 4 Effect of silenced *GhBES1* on chlorophyll content in cotton

1.5 *GhBES1* 基因沉默后丙二醛(MDA)的测定

胁迫 24 h 后, 采样分别测定 pTRV-00 和 pTRV-GhBES1 植株叶片的 MDA 含量, 对照组 pTRV-00 组的 MDA 含量仅为沉默组 pTRV-GhBES1 的 1.84 倍, 且有显著性差异($P=0.0249$) (图 5)。

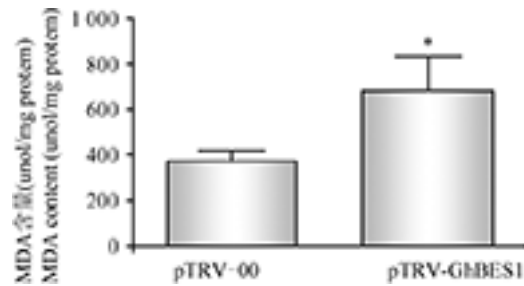


图5 沉默 *GhBES1* 对棉花的 MDA 含量的影响
Figure 5 Effect of silenced *GhBES1* on MDA content in cotton

1.6 *GhBES1* 基因沉默后渗透调节物质的测定

干旱胁迫 24 h 后, 分别测量 pTRV-00 和 pTRV-GhBES1 植株叶片的脯氨酸和甜菜碱含量, 相对于空载 pTRV-00, pTRV-GhBES1 植株叶片的脯氨酸含量只有其空载的 50.47%, 且在极显著水平有差异($P=0.0053$) (图 6A)。相对于 pTRV-00 植株, pTRV-GhBES1 植株甜菜碱含量下降了 6.2%。二者之间含量无显著性差异(图 6B)

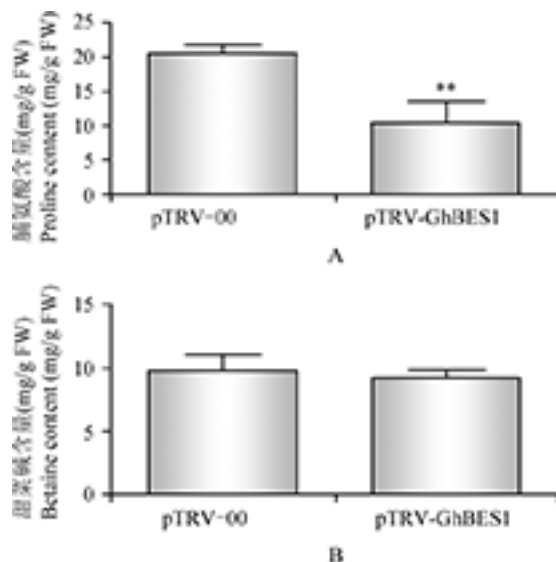


图6 沉默 *GhBES1* 对棉花的脯氨酸和甜菜碱含量的影响
Figure 6 Effect of silenced *GhBES1* on proline and betaine content in cotton

2 讨论

病毒诱导的基因沉默目前已经成功的应用于烟草(Ratcliff et al., 2001)、番茄(Liu et al., 2002)、辣



椒(Chung et al., 2004)、矮牵牛(Chen et al., 2004)等, 王丽等人最新也报道了利用 VIGS 技术对棉花幼苗 GhCPS 基因的沉默(Gao et al., 2011)。本实验参照的方法王丽等人的实验操作, 用 VIGS 技术沉默 *GhBES1* 基因, 对其基因的功能进行了初步摸索。实验流程为将棉花幼苗注射含有 pTRV-GhBES1 的重组载体 35 d 后, 提取其总 RNA 后反转成 cDNA, 做 Real time-PCR 检测 *GhBES1* 基因的表达量, 仅为空载 pTRV-00 的 21%, 表明 *GhBES1* 基因的沉默体系(VIGS)建立成功, 后续在 PEG6000 模拟干旱胁迫下测定其生化指标来推测其基因的功能。

干旱胁迫下植物的生长发育变缓, 其原因就是植物体内水分缺失, 造成了渗透物质增加、膜脂过氧化损伤和离子毒害。Anjum 等人的研究表明文冠果苗在干旱胁迫下, 油酸素内酯(BR)处理增加了文冠果叶片的相对含水量、脯氨酸和可溶性糖含量(Anju et al., 2011)。其 BR 信号通路中的 *GhBES1* 编码的 BES1 蛋白是植物防御的一种内源信号分子, 植物在受到干旱或盐胁迫情况下可以诱导该基因的表达去抵御外界的胁迫(Krishna, 2003)。也有人报道 *GhBES1* 编码的 BES1 蛋白 BR 信号通路是一种重要的转录因子, 去磷酸化的 BIN2 使得 BES1 蛋白去磷酸化后可以进入细胞核直接调控细胞内相关抗旱的基因的表达(He et al., 2005)。这与我们实验分析降低了棉花的抗旱性相一致, 即沉默 *GhBES1* 使得棉花叶片的渗透物质游离脯氨酸和可溶性糖的含量分别降低了 50.74% 和 39.51%。进而表明 *GhBES1* 基因很可能参与调控棉花抵御干旱相关基因的表达。

干旱胁迫下可以导致活性氧破坏膜脂的过氧化, 其中丙二醛(MDA)是反映植物细胞膜损伤程度的重要指标之一。聂石辉等人(2011)的研究表明干旱胁迫不同程度的增加了大麦丙二醛的含量。我们测得沉默 *GhBES1* 的棉花苗的 MDA 含量相对于空载也显著增加, 这一分析也进一步说明 *GhBES1* 基因在植物抵御抗旱胁迫中的重要作用。本实验也研究了沉默 *GhBES1* 基因对棉花的光合作用的影响, 结果显示, 实验组与空载组相比较, 叶绿素含量及叶绿素光效率和效率(叶绿素 a/b)变化不显著, 这个分析很可能表明 *GhBES1* 基因的表达与棉花的光合作用系统无关。

随着 BR 可以提高植物抗旱性研究大量的报道, 进一步研究 BR 提高植物抗旱的调控机制显的

尤为重要。本研究利用 VIGS 技术沉默 *GhBES1* 基因, 分析显示沉默 *GhBES1* 基因的棉花苗相对于空载的含水量、甜菜碱、脯氨酸、可溶性糖以及叶绿素含量都有一定的降低, 膜脂过氧化程度(MDA 含量)有一定的增加。表明 *GhBES1* 基因的表达很可能与棉花的抗旱机制调控有关。也表明了 *GhBES1* 可能是棉花的抗旱调节中发挥作用的一个基因。该结果也为进一步的阐明 BR 信号通路提供了理论依据。

3 材料与方法

3.1 实验材料

3.1.1 沉默所用实验苗的处理

实验所用的棉花‘新陆早 17 号’种子由新疆农业科学院经济作物研究玛纳斯试验站提供。挑选籽粒饱满大小一致的棉花种子, 用 70% 乙醇消毒 1 min, 蒸馏水冲洗 3~4 次, 用 15% 过氧化氢浸种 5 h, 蒸馏水冲洗 3~4 次, 播种到固体 MS 培养基中, 进行无菌培养, 10 d 后打开封口膜炼苗两天, 然后将棉花幼苗转至 Hoagland 营养液(木合热皮亚, 艾尔肯和张富春, 2011)中继续培养两到三天, 以此时的棉花幼苗为实验材料。

3.1.2 生理生化测定的棉花苗处理

注射完后计时, 等到 10~15 d 时, 注射 pTRV-CAL1 棉花幼苗的 1~2 片真叶陆续出现漂白现象, 最终统计注射 pTRV-CAL1 的棉花幼苗白化率为 25/30=83.34%, 表明沉默成功。等到 35 d 时, 用 2.5% 的 PEG6000 模拟干旱胁迫处理 24 h 后, 分别采样, 放置于 -80℃ 冰箱, 以备后续试验。

3.2 VIGS 重组载体的构建与注射棉花

用于建立 VIGS 体系的 pTRV (pTRV-RNA1 和 pTRV-RNA2)载体与携带 CAL1 基因的病毒载体由中国农业大学馈赠。植物的 CLA1 (*Cloroplastos alterados 1*, CLA1)编码 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase), 参与叶绿体的发育过程, 且此酶在进化中高度保守, 棉花中此基因沉默后植株叶片表现出光漂白症状(Gao et al., 2011), 本实验以此基因作为 VIGS 体系操作成功与否的评价。

VIGS 重组载体的构建: 根据 GHBS1 干扰位点分析结果设计特异性引物, 以 CDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物和 PTRV-RNA2 载体分别进行双酶切(*Kpn I* 和 *Xba I*)后, 进行回



收、连接、转化(感受态为农杆菌 GV3101); 测序鉴定出阳性克隆。

VIGS 重组载体转化农杆菌 GV3101: pTRV-RNA1、pTRV-RNA2、pTRV-CLA1、pTRV-GhBES1 分别转化农杆菌 GV3101。

VIGS 重组载体注射棉花叶片的步骤如下: 倒置培养 36~48 h 后, 挑选单克隆与 7 mL LB 培养基(LB+50 μg/mL 卡那霉素+50 μg/mL 庆大霉素), 28°C、200 r/min 过夜培养; 将菌液接种于 50 mL YEB 培养基(YEB+20 μmol/L 乙酰丁香酮+50 μg/mL 卡那霉素+50 μg/mL 庆大霉素+100 μmol/L MES), 28°C、200 r/min 过夜培养, OD₆₀₀=1.5; 酶标仪测量菌液 OD₆₀₀=0.6 左右时, 将菌液置于无菌离心管, 4 000 r/min, 离心 8 min, 弃上清液, 合并几次沉淀的菌体于无菌烧杯中; 用转化液(YEB+200 μmol/L 乙酰丁香酮+10 μmol/L MES+10 μmol/L MgCl₂)悬浮菌体至 OD₆₀₀=1.5; 将 pTRV-RNA1 分别与 pTRV-RNA2、pTRV-CLA1、pTRV-GhBES1 的悬浮液等体积混合, 置于室温 3 h; 棉花幼苗子叶平展, 每株幼苗分别注射 2 片子叶, 每片子叶注射 10 mL 左右, 每组 30 株, 3 次重复。

3.3 生化指标的测定

3.3.1 GhCLA1 和 GhBES1 基因沉默效率的检测

棉花幼苗注射完 10 d 左右, 观察到 pTRV-CLA1 的处理苗出现白化现象, 注射 35 d 后对空载对照(pTRV-00)和实验组(pTRV-GhBES1)棉花苗的第 2 片真叶, 提取其总 RNA, 逆转录为 cDNA, 选用棉花的 18s 为内参基因, GhBES1 和 Gh18s 分别设计荧光定量 PCR 的特异性引物已列出(表 1)。

表 1 GhBES1 和内参基因 Gh18s 的引物序列
Table 1 Primer sequences of GhBES1 and reference genes Gh18s

引物名称	引物序列(5'-3')
The name of primer	Sequences of primer (5'-3')
Gh18s-F	CAACTTGCGTTCAAAGACTCG ATGGTT
Gh18s-R	CAAGGAATCGAA ACGAAAGAAGG
GhBES1-F	GGGGTACCATGACGTCAGGGA CGAGAATGCC
GhBES1-R	GGAATTCCAGGAAAGGCGGG TGAGCATG

实时荧光定量 PCR 参照带有 ROX 的 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (美国 Invitrogen

公司)试剂盒说明书进行。RT-PCR 反应参数为: 94°C 15 s; 94°C 30 s; 59°C 30 s; 72°C 45 s; 40 cycles; 72°C 2 min。采用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪进行 RT-PCR 及检测, 数据采用 2-ΔΔCt 法进行分析。

3.3.2 光和色素含量的测定

注射病毒后 35 d 后, 用 2.5% 的 PEG6 000 干旱胁迫 24 h, 分别取 pTRV-00 和 pTRV-GhBES1 棉花幼苗的第二片真叶, 测定其叶绿素 a/b、总叶绿素和类胡萝卜素含量, 具体方法参照(木合热皮亚, 艾尔肯和张富春, 2013)。

3.3.3 含水量的测定

处理方法同上, 采样后分别用相对含水量采用烘干法(姚世响, 2010)对其相对含水量进行测定。

3.3.4 丙二醛(MDA)含量的测定

处理方法同上, 采用硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量(王瑜, 2008); 电导仪检测叶片的电导率(姚世响, 2010)。

3.3.5 渗透物质含量的测定

处理方法同上, 采样后分别用酸性茚三酮显色法测定 Pro 含量(姚世响, 2010); 蒽酮比色法测定可溶性糖含量(姚世响, 2010); 雷氏盐法测定甜菜碱含量(姚世响, 2010)。

3.4 统计分析

各个实验均为独立重复 3 次, 实验数据的处理与作图均为 GraphPad Prism 5 软件处理分析。

作者贡献

安汶钡负责实验的实施与论文的撰写。常丹和杨艺参与了实验的设计与实施, 张富春负责实验的设计、指导与论文的修改。

致谢

本研究由国家自然科学基金-新疆联合基金重点项目(U1303282)资助。

参考文献

Anjum S.A., Wang L.C., Farooq M., Hussain M., Xue L.L., and Zou C.M., 2011, Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange, Journal Agronomy and Crop Science, 197(3): 177-185
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00459.x>



- Burch-Smith T.M., Anderson J.C., Martin G.B., Gregory B.M., and Dinesh-Kuma S.P., 2004, Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene functions studies in plants, *The Plant Journal*, 39(5): 734-746
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x>
- Cao Y.Y., and Zhao H., 2007, Protective roles of brassinolide in rice seedlings under heat stress, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 21(5): 525-529 (曹云英, 赵华, 2007, 高温胁迫下油菜素内酯对水稻幼苗的保护作用, *中国水稻科学*, 21(5): 525-529)
- Chen J.C., Jiang C.Z., Gookin T., Hunter D., Clark D. G., and Rdd M., 2004, Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence, *Plant Molecular Biology*, 55(4):521-530
<http://dx.doi.org/10.1007/s11103-004-0590-7>
- Chen L.P., and He D.Y., 2010, Reasearch advance on drought and salt resistant genes in transgenic plants, *Jiyin Zuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 29(3): 542-549 (陈丽萍, 何道一, 2010, 植物抗旱耐盐基因的研究进展, *基因组学与应用生物学*, 29(3): 542-549)
- Chung E., Scong E., KimY.C., Chung E.J., Oh S.K., and Lee S., 2004, A method of high frequency virus indued gene silencing in chili pepper(*Capsicum annum L. cv. Bukang*). *Molecules and Cells*, 17(2): 377-380
- Gao X.Q., Wheeler T., Li Z.H., Charles M.K., He P., and Shan L.B., 2011, Silencing *GhNDR1* and *GhMCK2* compromises cotton resistance to Verticillium wilt, *The Plant Journal*, 66(2): 293-305
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04491.x>
- He J.X., Gendron J.M., Sun Y., Srinivas S.L., Gampala N.G., Sun Q., and Wang Z.Y., 2005, BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses, *Science*, 307(5715): 1634-1638
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1107580>
- Krishna P., 2003, Brassinosteroid-mediated stress responses, *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(4): 289-297
<http://dx.doi.org/10.1007/s00344-003-0058-z>
- Liu J.L., 2013, The effects and mechanisms of brassinolide regulating salt resistance of three dicotyledons, Thesis for M.S., Nanjing agricultural university, Supervisor: Zheng Q.S., pp.7-13 (刘金隆, 2013, 油菜素内酯调控三种双子叶植物耐盐性的效应及其机制, 硕士学位论文, 南京农业大学, 导师: 郑青松, pp.7-13)
- Liu Y., Schiff M., and Dinesh-Kumar S.P., 2002, Virus-induced gene silencing in tomato, *The Plant Journal*, 31(6): 777-786
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x>
- Muherepiya Aierken., and Zhang F.C., 2013, Physiological and biochemical analysis for the salt tolerance of transgenic cotton transformed by the vacuolar H-Pyrophosphatase gene(*VPI*) from *Halostachys caspicas*, *Xinjiang Nongye Kexue (Xinjiang Agricultural Sciences)*, 50(6): 1016-1023 (木合热皮亚.艾尔肯, 张富春, 2013, 盐穗木 HcVP1 转基因棉花耐盐性的生理生化分析, *新疆农业科学*, 50(6): 1016-1023)
- Nie S.H., Qi J.C., Zhang H.L., Li J., Ma G., Gao C., Wei P.F., Zhang H.L., and Li L., 2011, Effect of drought stress simulated by PEG600 on malondialdehyde content and activities of protective emzymes in barley seedlings, *Xinjiang Nongye Kexue (Xinjiang Agricultural sciences)*, 48(1): 11-17 (聂石辉, 齐军仓, 张海禄, 李静, 马贵, 高琛, 韦鹏飞, 张合理, 李璐, 2011, PEG6000 模拟干旱胁迫对大麦幼苗丙二醛含量及保护酶活性的影响, *新疆农业学报*, 48(1): 11-17)
- Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., and Banleonbe D.C., 2001, Tobaceo rattle virus as a vector for analysis of gene functions by silencing, *The Plant Journal*, 25(2): 237-245
<http://dx.doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x>
- Ruan Y.H., Dong S.K., Liu L.J., Sun C. M., Guo X.X., and Wang L.B., 2011, Effects of brassinosteroid on physiological characteristics at flowering stage of soybean under drought stress, *Zuowu Zazhi (Crops)*, 8(6): 33-37 (阮英慧, 董守坤, 刘丽君, 孙聪妹, 郭茜茜, 王利彬, 2011, 干旱胁迫下油菜素内酯对大豆花期生理特性的影响, *作物杂志*, 8(6): 33-37)
- Wang L., Mu C., Zhang M.C., Du M.W., Tian X.L., and Li Z.H., 2014, Effect of silencing *GhCPS* on the growth and endogenous hormone content of cotton seedlings(*Gossypium hirsutum L.*), *Mianhua Xuebao (Cotton Science)*, 26(3): 189-196 (王丽, 穆春, 张明才, 杜明伟, 田晓



- 莉, 李召虎, 2014, *GhCPS* 基因沉默对棉花幼苗生长和内源激素含量的影响, 棉花学报. 26(3): 189-196)
- Wang Y., 2008, Studies on salt-tolerance of transgenic *Nicotiana tabaccum* and *Arabidopsis thaliana* with the vacuolar H-pyrophosphatase gene from halophyte *chenopodium glaucum*, Thesis for M.S., Xinjiang University, Supervisor: Zhang F. C., pp.24-37 (王瑜, 2008, 灰绿藜液泡膜焦磷酸酶 H-pyrophosphatase 基因增强烟草和拟南芥耐盐性的研究, 硕士学位论文, 新疆大学, 导师: 张富春, pp. 24-37)
- Yao S.X., 2010, Studies on Seed Heteromorphism of *Chenopodium album* and the Biochemical and Descendants, Thesis for M.S., Xinjiang University, Supervisor: Lan H.Y., pp.55-79 (姚世响, 2010, 藜科植物藜(*Chenopodium album*)种子异型性及后代耐盐生理生化机理的研究, 硕士学位论文, 新疆大学, 导师: 兰海燕, pp:55-79)
- Zhou S. H., Liu Z.L., Han H.Q., Wang X., and Fang W., 2014, Influence analysis of meteorological condition on cotton yield in bortala mongol autonomous prefecture of Xinjiang, *Shamo Yu Lvzhou Qixiang (Desert and Oasis Meteorology)*, 8(2): 70-74 (周守华, 刘忠礼, 韩欢庆, 王翔, 方雯, 2014, 新疆博州气象条件对棉花产量的影响分析, 沙漠与绿洲气象, 2014, 8(2): 70-74)