

南荻 *MINAC13* 基因功能的初步探究

吉璐¹, 胡瑞波², 蒋建雄¹, 周功克², 易自力^{1*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院,湖南长沙 410128; 2.中国科学院青岛生物能源与过程研究所,山东青岛 266101)

摘要:对南荻 *MINAC13* 基因进行了克隆、亚细胞定位和转录激活试验,并用实时荧光定量 PCR 方法,检测了在盐胁迫、干旱胁迫、低温和脱落酸、茉莉酸甲酯、水杨酸处理下的 *MINAC13* 基因在南荻根部的表达模式。结果:1)获得了南荻 *MINAC13* 的全基因序列;2)用 N 端融合 YFP 进行亚细胞定位试验的结果证明,*MINAC13* 位于细胞核,*MINAC13* 可能在细胞核内行使功能;3) *MINAC13* 的 C 端及全长具有转录激活活性,N 端没有转录激活活性,说明它是转录因子,且转录激活域位于 C 端;4)除水杨酸外,脱落酸、茉莉酸甲酯均能诱导 *MINAC13* 基因的表达,说明 *MINAC13* 基因可能参与南荻的多种逆境胁迫响应。

关键词:南荻;NAC 转录因子;胁迫;表达模式;亚细胞定位;转录激活

中图分类号:S567.23⁺⁹

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2013)05-0478-06

Preliminary functional analysis of *MINAC13* gene in *Miscanthus lutarioriparius*

Ji Lu¹, HU Rui-bo², JIANG Jian-xiong¹, ZHOU Gong-ke², YI Zi-li^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)

Abstract: *MINAC13* gene was cloned from *Miscanthus lutarioriparius* (*M. lutarioriparius*), and subcellular localization and transactivation assay were conducted on this gene. Then real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the expression profile of *MINAC13* in root under salt, drought, cold, abscisic acid (ABA), Methyl jasmonate (MeJA) and Salicylic acid (SA) treatments. The results showed that 1) complete *MINAC13* gene sequence of *M. lutarioriparius* was obtained; 2) subcellular localization analysis using N-terminus fused with YFP showed that *MINAC13* was located in nucleus, suggesting that it might function in nucleus; 3) transactivation assay indicated that the full-length and C-terminus of *MINAC13* had transactivation activity, indicating that *MINAC13* is a transcription factor and the transactivation activity region located in C-terminus; 4) the transcript of *MINAC13* was up-regulated under all surveyed treatments except SA, indicating that it might participate in various stress responses of *M. lutarioriparius*.

Key words: *Miscanthus lutarioriparius*; NAC transcription factor; stress; expression profile; subcellular localization; transactivation

干旱、高盐、低温和病害等胁迫是限制植物产量和生长潜力的主要环境因素。为克服这些胁迫因素,植物在生理、生化、分子水平上为适应不同环境作出动态响应。而植物特有的 NAC(NAM, ATAF1/2, CUC2)转录因子被证实参与调控众多植

物的非生物胁迫和防御反应^[1-3]。NAC 转录因子能与靶基因启动子区域的胁迫响应元件特异性结合,诱导多个抗逆相关的功能基因表达,从而综合提高植物抗逆性。但长期以来人们关注的焦点都是植物地上部分对胁迫的应答,而对根部的研究甚少。研

收稿日期:2013-03-27

基金项目:国家“863”计划项目(2011AA10020903;2012AA10180104)

作者简介:吉璐(1989—),女,湖南蓝山人,硕士研究生,主要从事芒属植物分子生物学研究,kobejilu@163.com; *通信作者,yizili889@163.com

究根系对胁迫的响应,有助于人们更全面地了解植物胁迫应答模式。

芒属植物是一种 C_4 光合途径的禾本科多年生高大草本,起源于热带和亚热带地区,但在东南亚和太平洋群岛等区域有不同的物种分布^[4]。芒属植物具有对多种逆境的良好适应能力以及较高的物质产量等特点,作为一种有重要利用价值的能源植物受到高度关注。芒属植物主要包括4个种:五节芒 (*Miscanthus floridulus*)、芒 (*Miscanthus sinensis*)、荻 (*Miscanthus sacchariflorus*) 和南荻 (*Miscanthus lutarioriparius*)^[5]。目前,对芒属植物的研究多围绕分子标记遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建、资源收集与评价、优良种质资源发掘与新品种选育等方面展开^[6-14]。关于芒属植物 *NAC* 基因与抗逆的相关性尚少见报道。本研究拟克隆南荻 *MINAC13* 基因,分析其亚细胞定位和转录活性,并对其在各种环境下的表达模式进行分析,旨在为下一步提高南荻的抗逆性研究提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 供试植物及主要试剂

南荻($2n=2x=38$)由中国科学院上海生命科学研究院植物生态研究所韩斌教授惠赠;烟草 (*Nicotiana benthamiana*)品种 Wisconsin38,由湖南农业大学芒属植物研究所保存。所有材料经根状茎无性繁殖。2种材料的培养条件均为温度 25~28 °C,光照强度 80~200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1})$,光照周期 16 h(光照)/8 h(黑暗),空气相对湿度 65%。

反转录试剂盒 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR Premix Ex Taq、DNA 分子量标准 DL 2 000 DNA Marker、RNase-free 琼脂糖购自 BioWest 公司;限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Bam*HI 和 *Nde* I、高保真 DNA 聚合酶 *Pfu*、DNase I 和 T 载体以及反转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司;DNA 片段回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;酵母培养基购自 Clontech 公司;实验中使用的其他化学试剂购自国药集团化学试剂北京有限公司;离心管及枪头购自 Axygen 公司。大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、酵母菌 AH109、pGWC-T 载体、pEarlyGate104 载体及 pGBKT7 由湖南农业

大学芒属植物研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 *MINAC13* 基因的克隆

南荻根部 RNA 的提取参见文献[15]。提取的 RNA 用 DNase I 进行消化,去除 DNA 污染,反应体系如下:RNA 30 μL 10 μg , DNase I 20 μL , 10 \times Buffer 10 μL , RNase Inhibitor 0.5 μL , H₂O (RNase-free) 39.5 μL , 总体积 100 μL 。37 °C 下消化 30 min,再 65 °C 灭活 10 min。消化后的样品重新抽提沉淀。每个样品均做 3 个生物学重复。cDNA 第一链的合成参照反转录试剂盒说明书进行。

根据已得到的 *MINAC13* 基因(GenBank 登录号 KC840942)序列设计特异性引物,扩增得到目的片段,经回收,连接到入门载体 pGWC-T,并转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,在含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 平板上进行转化子筛选,用 PCR 鉴定的阳性克隆,送北京华大基因公司测序。测序正确的重组入门载体命名为 pGWC-MLNAC13。

1.2.2 亚细胞定位

将重组入门载体 pGWC-MLNAC 与表达载体 pEarlyGate104 通过 LR 反应构建 N 端 YFP 融合表达载体。LR 反应体系如下:1 μL (30~50 ng) pEarlyGate104, 1 μL (30~50 ng)pGWC-MINAC13, LR clonase Enzyme Mix 1 μL , 2 μL ddH₂O。混合反应液在 25 °C 下反应 4~6 h。转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的 LB 平板上进行转化子筛选,PCR 鉴定的阳性克隆,送至北京华大基因公司测序,将测序正确的重组表达载体命名为 p35S:YFP-MINAC13。

将重组表达载体 p35S:YFP-MINAC13 转化农杆菌,在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的 LB 平板上进行转化子筛选,PCR 鉴定阳性克隆,并将阳性克隆农杆菌振荡培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.6,室温下 6 000 \times g 离心 20 min 收集菌体,用侵染缓冲液(150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乙酰丁香酮,10 mmol/L MES,10 mmol/L MS, pH 5.6)重悬菌体至 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.5~0.6。用 1 mL 的一次性注射器(去掉针头)将重悬菌液注射在烟草叶片背面,避光放置 2~5 d 后,取约 1 cm^2 的叶片材料,在激光共聚焦显微镜(OLYMPUS FV300)下观察。

1.2.3 转录激活试验

用引物对 *MINAC13*-NF、*MINAC13*-CR 扩增 *MINAC13* 的全长(1~1 065 bp);用引物 *MINAC13*-NF、*MINAC13*-NR(表 1)扩增 N 端片段(1~513 bp)、*MINAC13*-CF、*MINAC13*-CR(表 1)扩增 C 端(514~1 065 bp)片段,PCR 产物均经酶切分别连至酵母表达载体 pGBKT7 中,PCR 筛选阳性克隆。

表1 转录激活引物序列

Table 1 Primer sequences for the transactivation assay

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>MINAC13</i> -NF	CATATGATGGTGGAGCGTAGTGTGAAATCAG
<i>MINAC13</i> -NR	GGAATTCCTTGTGGTGCACCTTGCAC
<i>MINAC13</i> -CF	CATATGGGCGAAGAGGACAGCAGTACGAAG
<i>MINAC13</i> -CR	GGAATTCCTTGTGGTGCACCTTGCAC

根据 Clontech 公司的操作手册,将构建好的转录激活表达载体 pGBKT7-MINAC13、pGBKT7-MINAC13ΔC(N 端)和 pGBKT7-MINAC13ΔN(C 端)转入酵母 AH109 中,转入 pGBKT7 载体的 AH109 作为阴性对照。菌株将在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His/30 mmol/L 3-AT 培养基上进行双重筛选。2 次筛选均为阳性的克隆,用移液枪取适量滴在显色培养基上(X-α-gal (20 mg/mL)按 1 : 1 000 比例加入)倒置避光培养,直至显色,显蓝色的为阳性克隆,其转入的片段具有转录激活活性。

1.2.4 在不同胁迫及激素处理下 *MINAC13* 基因在根部的表达模式分析

在南荻生长到 6 叶期时进行胁迫处理。

1) 盐胁迫处理:将植株根部泥沙轻轻洗净,浸入 150 mmol/L NaCl 溶液中。

2) 干旱胁迫处理:将植株根部泥沙轻轻洗净,吸干表面水分,并用吸水纸包裹,放置于培养箱中。

3) 低温胁迫处理:将植株放入 4 °C 光照培养箱中。

4) 激素处理:将脱落酸(ABA, 100 μmol/L)、茉莉酸甲酯(MeJA, 100 μmol/L) 和水杨酸(SA, 1 mol/L)溶液分别均匀喷洒于叶面。

5) 机械伤害胁迫处理:用干净的剪刀剪去每个叶片的顶端约 5 cm。

所有处理光照强度、光照周期和空气相对湿度都与 1.1 的条件保持一致。以上处理在 0、1、3、6、12 和 24 h 时间点取相同部位的根部液氮速冻,并于 -80 °C 冰箱保存。RNA 提取及 cDNA 第一链的

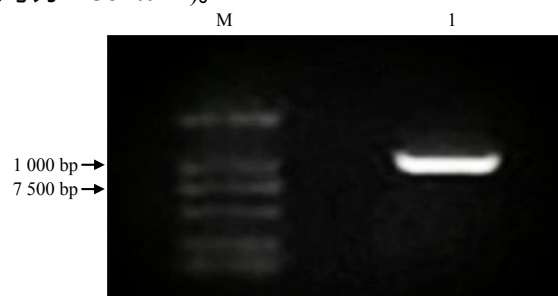
合成同 1.2.1。

引物设计使用 Beacon Designer V7.0 (Premier Biosoft International, California, USA)软件。设置退火温度 58~60 °C、引物序列长度 20~25 bp、扩增序列长度 50~200 bp。获得 *MINAC13* 基因正向引物序列为 5'-TCCAGCTTGCCTTTGCCCC-3';反向引物序列为 5'-GGCAGGCCGACGAAGCAAGT-3'。芒草基因 *ACTIN11* 用作内参基因,正向引物序列为 5'-CTCGTCTTCCTCACCGTTATCAC-3';反向引物序列为 5'-GCGTCATCTCCAGCGAACC-3'。荧光定量 PCR (RT-qPCR)在冰上配制如下反应体系:2 × SYBR 预混液 10 μL, cDNA 模板 1 μL,正向及反向引物各 0.4 μL,补加超纯水至终体积 20 μL。实时荧光定量 PCR 反应利用 LightCycler® 480 (Roche)实时荧光定量 PCR 系统进行。反应程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,58 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 10 s,共 45 个循环。溶解曲线测定:65~95 °C。基线与循环阈值(Ct 值)使用 LightCycler® 480 软件自动生成。按照相对定量法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目标基因的相对表达量,其中 $\Delta\Delta Ct = [\Delta C_{t(待测样品目的基因)} - \Delta C_{t(待测样品管家基因)}] - [\Delta C_{t(对照组目的基因)} - \Delta C_{t(对照组管家基因)}]$ [16]。在本研究中至少在一种胁迫处理的一个时间点表达比对照上调了 3 倍以上才被认为是被胁迫诱导表达。

2 结果与分析

2.1 *MINAC13* 基因的克隆结果

扩增出的 *MINAC13* 基因片段的大小约为 1 000 bp (图 1)。将 PCR 产物连接到 pGWC-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5α,阳性菌落经 PCR 检测,筛选出 3 个阳性克隆进行测序。测出的克隆片段的大小均为 1 065 bp,与本实验室所得数据一致(GenBank 登录号为 KC840942)。



M DL 2 000 DNA Marker; 1 PCR 产物。

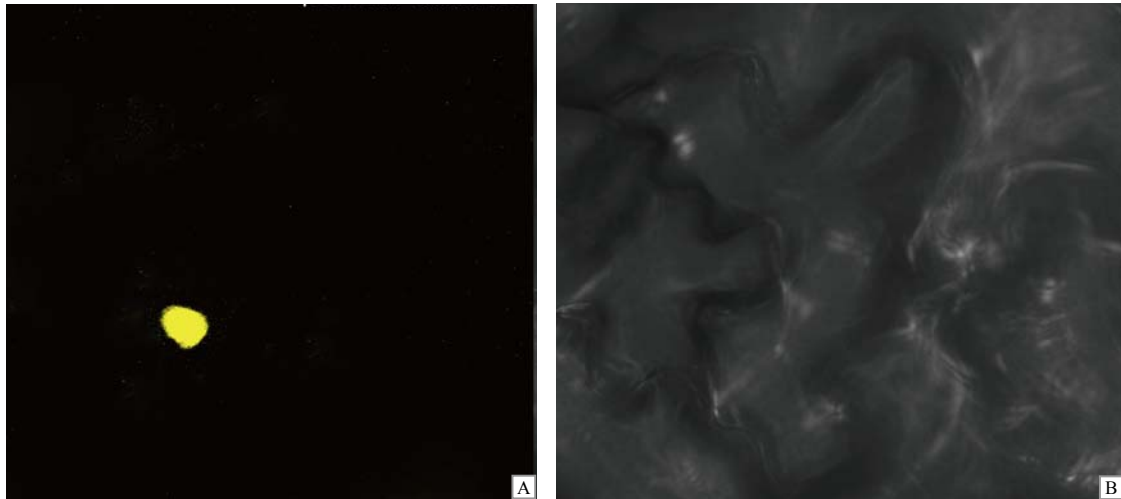
图1 *MINAC13*基因PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *MINAC13*

2.2 MINAC13 的亚细胞定位结果

为了明确 MINAC13 的亚细胞定位, 构建了 MINAC13 的 N 端融合的 YFP 表达载体, 由 *CaMV* 35S 启动子驱动, 采用农杆菌侵染法使其在烟草细

胞中瞬时表达。从图 2(彩版见封三)可看出, *p35S:YFP-MINAC13* 在细胞核中信号最为明显, 说明 MINAC13 是一个核定位的蛋白, 可能在细胞核内行使功能。



A 为 *p35S:YFP-MINAC13*; B 为 DIC 明场像。

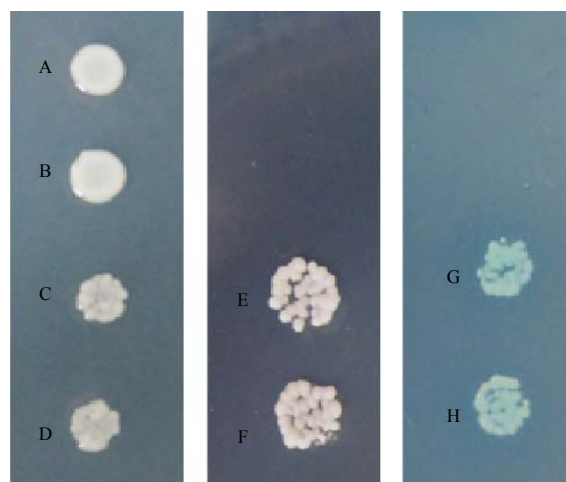
图2 MINAC13的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of MINAC13

2.3 转录激活

将 PCR 筛选鉴定为阳性的重组酵母菌株以及只含有 *pGBKT7* 的对照酵母菌株分别涂在 *SD/-Trp*、*SD/-Trp/-His/30 mmol/L 3-AT* 和 *SD/-Trp/-His/X-α-gal* 平板上, 30 °C 条件下培养 3~6 d。观察结果发现, 含有 MINAC13 的 C 端及全长的酵母表达菌株能够在 *SD/-Trp* 和 *SD/-Trp/-His/30 mmol/L 3-AT* 平

板上正常生长, 并在 *X-α-gal* 存在的情况下(*SD/-Trp/-His/X-α-gal*)显示蓝色。而只含有 *pGBKT7* 的对照酵母菌株以及 MINAC13 的 N 端的酵母表达菌株能在 *SD/-Trp* 正常生长, 但是不能在 *SD/-Trp/-His/30 mmol/L 3-AT* 和平板上正常生长, 说明 MINAC13 具有转录激活活性, 并且转录激活区域在 C 端(图 3, 彩版见封三)。



A、B、C、D 为含 *pGBKT7*、MINAC13 的 C 端、MINAC13 全长、MINAC13 的 N 端的酵母菌在 *SD/-Trp* 平板上的生长情况; E、F 为含 MINAC13 全长、MINAC13 的 N 端的酵母菌在 *SD/-Trp/-His/30 mmol/L 3-AT* 平板上的生长情况; G、H 为含 MINAC13 全长、MINAC13 的 N 端的酵母菌在 *SD/-Trp/-His/X-α-gal* 平板上的生长情况。

图3 *MINAC13*基因在酵母体内的转录活性结果

Fig. 3 Transactivation analysis for *MINAC13* gene in yeast

2.4 MINAC13基因在南荻根部的表达模式

在盐胁迫下, *MINAC13* 基因的表达水平随着处理时间的延长而逐渐升高, 并在 12 h 时达到峰值, 为对照的 10 倍左右, 随后降低, 在处理 24 h 后为对照的 4 倍左右。在干旱胁迫下, *MINAC13* 基因的转录水平都随着干旱处理时间延长而升高, 并且在处理 3 h 时急剧上升, 在处理 12 h 时达到峰值, 为对照的 22 倍左右, 处理 24 h 之后, 根部由于失水过多, 导致无法提取 RNA, 所以只研究了 0~12 h 的表达模式。在低温(4 °C)处理下, *MINAC13* 基因的表达量在处理 3 h 内无明显变化, 而处理 6 h 后急剧升高, 为对照的 9 倍左右, 在处理 12 h 和 24 h 时的表达水平略有下降, 至处理 24 h 时约为对

照的 6 倍。在 ABA 处理下, *MINAC13* 基因在处理 0~3 h 间, 表达量先上升后下降, 在处理 6 h 后表达量急剧增加, 为对照的 6 倍左右, 而后在 12 h 和 24 h 时表达量又呈降低的趋势。在 MeJA 处理下, *MINAC13* 基因在 0~6 h 内的表达呈先下降后上升的趋势, 在 12 h 时表达量升高, 为对照的 3 倍左右, 在处理 24 h 后转录水平略有下降。在 SA 处理下, *MINAC13* 基因的表达量在 0~12 h 内呈先下降后上升的趋势, 而在 24 h 略有下降。机械伤害处理下, *MINAC13* 基因的表达在处理 6 h 内呈先下降后上升的趋势, 在处理 12 h 后表达量达到峰值, 为对照的 4 倍左右, 在处理 24 h 后, 转录水平下降。

表4 RT-qPCR分析MINAC13基因在胁迫处理下根部的表达模式

Table 4 Expression profiles of *MINAC13* in root under stress treatments by RT-qPCR analyses

处理	相对表达量					
	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
150 mmol/L NaCl	1.00 ± 0.01	2.60 ± 0.07	5.81 ± 0.05	8.40 ± 0.34	10.70 ± 0.36	4.25 ± 0.23
干旱	1.00 ± 0.03	2.27 ± 0.14	13.09 ± 0.71	15.93 ± 0.99	22.06 ± 1.02	
低温(4 °C)	1.00 ± 0.07	0.87 ± 0.05	1.28 ± 0.08	9.33 ± 0.25	5.28 ± 0.12	6.14 ± 0.23
100 μmol/L ABA	1.00 ± 0.04	2.95 ± 0.09	1.65 ± 0.10	6.16 ± 0.17	0.79 ± 0.02	0.46 ± 0.04
100 μmol/L MeJA	1.00 ± 0.05	0.72 ± 0.13	0.40 ± 0.04	0.61 ± 0.01	2.80 ± 0.14	1.54 ± 0.12
1 mol/L SA	1.00 ± 0.14	0.97 ± 0.06	0.56 ± 0.02	1.12 ± 0.09	2.29 ± 0.10	1.83 ± 0.05
机械伤害	1.00 ± 0.04	1.05 ± 0.08	0.65 ± 0.04	1.76 ± 0.06	4.23 ± 0.12	0.50 ± 0.01

将 0 h 表达量设置为标准化相对量 1。

3 讨论

转录因子可以通过调节胁迫相关信号途径或者调控胁迫相关的表达来调节植物的胁迫反应。通过序列比对(数标未列出)本研究克隆的 *MINAC13* 基因与水稻的 *ONAC045*^[16] 是同源基因。本研究的结果显示, 在盐胁迫下 *MINAC13* 基因在根部的转录水平随着处理时间延长而逐渐升高, 并在 12 h 时达到峰值, 这与 Zheng 等^[16] 在盐胁迫下, 对 *ONAC045* 基因转录水平的研究结果相似。在干旱胁迫下, *MINAC13* 基因在根部的转录水平随着处理时间延长而升高, 这与 Zheng 等^[16] 在干旱胁迫下对 *ONAC045* 基因转录水平的研究的结果相反。在低温处理下, *MINAC13* 基因在 1 h 内迅速被诱导, 转录峰值分别位于 1 h 和 6 h, 与在低温处理下 *ONAC045* 基因的转录情况^[16] 相比, 转录峰值出现得更早。在

ABA 处理下, *MINAC13* 基因在 6 h 时转录水平急剧升高, 而 *ONAC045* 基因在 ABA 处理下, 其转录水平随着处理时间的延长而逐渐升高。这些结果的差异, 可能是研究材料与实验条件、方法等不同而造成的。在 MeJA、SA 胁迫和机械伤害下, *MINAC13* 基因在根部不受 SA 诱导, 而受 MeJA 和机械伤害诱导, 说明 *MINAC13* 基因可能通过 MeJA 信号途径介导南荻的防御反应, 其结果还有待进一步验证。

生命活动中直接起作用的是基因表达后产生的蛋白质, 因此亚细胞定位技术多用于分析蛋白质的功能。目前, 研究亚细胞定位的方法主要包括免疫组织化学定位法、共分离标记酶辅助定位法和融合报告基因法等。融合报告基因法有操作简便、灵敏度高、实验周期短等优点, 目前被广泛应用。本研究所用的报告基因为 YFP, *MINAC13* 与 YFP 的

融合蛋白定位于细胞核,说明 *MINAC13* 可能在细胞核内行使功能。酵母单杂交结果显示,含有 *MINAC13* 基因全长及 C 端的菌株能在 SD/-Trp/-His/30 mM 3-AT 培养基上生长,并且能在 SD/-Trp/-His/X- α -gal 显蓝色。而对照组及含有 *MINAC13* 的 N 端的菌株不能在这 2 种培养基上生长。说明 *MINAC13* 具有转录激活活性,并且转录激活区域位于 C 端。亚细胞定位和转录激活试验的结果都支持了 *MINAC13* 是转录因子的假设。

芒属植物作为第 2 代能源草类,受到越来越多的关注。提高芒属植物在逆境下的耐受力是目前研究的重点。本研究结果说明, *MINAC13* 基因可能参与了南荻的多种逆境胁迫响应,这还需进一步利用转基因技术进行功能验证。

参考文献:

- [1] Wang N ,Zheng Y ,Xin H ,et al .Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*[J] . Plant Cell Reports , 2013 , 32(1) : 61-75 .
- [2] Puranik S ,Sahu P P ,Srivastava P S ,et al .NAC proteins : Regulation and role in stress tolerance[J] . Trends in Plant Science , 2012 , 17(6) : 369-381 .
- [3] Mao X G , Zhang H Y , Qian X Y , et al . TaNAC2 , a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*[J] . J Exp Bot , 2012 , 63(8) : 2933-2946 .
- [4] Greef J M , Deuter M . Syntaxonomy of *Miscanthus × giganteus* Greef-et-Deu[J] . Angew Bot , 1993 , 67(3/4) : 87-90 .
- [5] 易自力 . 芒属能源植物资源的开发与利用[J] . 湖南农业大学学报:自然科学版, 2012 , 38(5) : 455-463 .
- [6] 王禹, 易自力, 易镇邪, 等 . 芒属能源植物繁殖与栽培技术研究进展[J] . 可再生能源, 2012 , 30(5) : 84-88 , 99 .
- [7] 杜凤, 蒋建雄, 卢玉飞, 等 . 芒属植物核型分析技术体系的建立[J] . 现代生物医学进展, 2009 , 9(10) : 1878-1880 .
- [8] 马洪峰, 李珊珊, 葛颂, 等 . 能源作物芒属双药芒组 SSR 引物的筛选及其评价[J] . 生物多样性, 2011 , 19(5) : 535-542 .
- [9] 宗俊勤, 陈静波, 聂东阳, 等 . 我国不同地区芒和荻种质资源抗盐性的初步评价[J] . 草地学报, 2011 , 19(5) : 803-807 .
- [10] 王禹, 易镇邪, 王学华, 等 . 湘杂芒 2 号种子发芽条件的研究[J] . 草业科学, 2013 , 30(1) : 69-73 .
- [11] 卢玉飞, 蒋建雄, 易自力 . 玉米 SSR 引物和甘蔗 EST-SSR 引物在芒属中的通用性研究[J] . 草业学报, 2012 , 21(5) : 86-95 .
- [12] Hastings A ,Clifton-Brown J ,Wattenbach M ,et al .Future energy potential of *Miscanthus* in Europe[J] . Gcb Bioenergy , 2009 , 1(2) : 180-196 .
- [13] Walsh M .Miscanthus for Energy and Fibre[M] .London : James and James , 2001 .
- [14] Jiang J X , Wang Z H , Tang B R , et al . Development of novel chloroplast microsatellite markers for *Miscanthus* species(Poaceae)[J] . American Journal of Botany , 2012 , 99(6) : e230-233 .
- [15] Chang S J , Puryear J , Cairney J . A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J] . Plant Molecular Biology Reporter , 1993 , 11(2) : 113-116 .
- [16] Livak K J , Schmittgen T D . Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J] . Methods , 2001 , 25(4) : 402-408 .
- [17] Zheng X N , Chen B , Lu G J , et al . Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance[J] . Biochem Bioph Res Co , 2009 , 379(4) : 985-989 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维