

声波刺激对铁皮石斛过氧化物酶同工酶基因表达的影响

魏进民¹ 李 标^{1,2†} 王伯初^{1,2} 唐 坤¹ 梁亦龙¹ 舒坤贤¹

(1 重庆邮电大学生物信息学院 重庆 400065)

(2 重庆大学生物工程学院,教育部生物力学及组织工程重点实验室 重庆 400044)

摘要 从基因表达水平探索了植物适应物理应力刺激时可能作出的反应机制。以铁皮石斛组培苗为实验材料,以特定的声波(声强 100dB、频率 1000Hz)刺激为应力源,检测比较了声波刺激对铁皮石斛过氧化物酶(POD)同工酶酶谱及各酶带百分含量的影响;通过设计引物扩增出铁皮石斛 *POD* 基因片段,以此为探针,利用 Northern 点杂交技术检测分析了声波刺激对铁皮石斛 *POD* 基因表达的影响。结果显示,声波刺激没有引起铁皮石斛产生新的酶带,但促进了其 *POD* 同工酶酶量的提高;声波刺激对铁皮石斛 *POD* 基因表达的影响与其同工酶酶谱及其总 RNA 量的变化基本一致。表明声波刺激对植物 *POD* 同工酶基因表达有激活作用,可能引起植物某些基因转录和表达水平的变化。

关键词 声波, 铁皮石斛, 过氧化物酶, 同工酶, 基因表达

Effect of sound wave stimulation on peroxidase isozyme gene expression in *dendrobium candidum*

WEI Jin-Min¹ LI Biao^{1,2} WANG Bo-Chu^{1,2} TANG Kun¹
LIANG Yi-Long¹ SHU Kun-Xian¹

(1 College of Bio-informatics, Chongqing University of Posts & Telecommunications, Chongqing 400065)

(2 College of Bioengineering, Chongqing University, Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing 400044)

Abstract This paper aimed to investigate the influence of physical stress in plant on the gene expression level. In this paper, in vitro-cultured seedlings of *Dendrobium candidum* were used as experimental materials and a special sound wave (intensity 100dB, frequency 1000Hz) was used as a stress source. POD isozyme zymograms and the percentum of each enzyme band of *D. candidum* were detected after the sound wave stimulating. Moreover, the fragment of *POD* gene was amplified with two special primers, and the influence of the gene expression was analyzed by the Northern blot hybridization. The results showed that

2007-11-12 收稿; 2008-02-18 定稿

作者简介:魏进民(1960 -),四川乐山人,副教授,研究方向:生物物理学。

李标(1970 -),副教授,博士。王伯初(1962 -),教授,博士,博士生导师。唐坤(1974 -),讲师,硕士。

梁亦龙(1972 -),讲师,硕士。舒坤贤(1967 -),副教授,博士。

† 通信联系人 E-mail: cquptlibiao@yahoo.com.cn

there was no new enzyme band in the POD electrophoretogram for the treated groups compared with the control group and the peroxidase isozymes increased by varying degrees, as being consistent with the results of the molecular hybridization and of the change of total RNA content. These findings suggest that sound wave stimulation might activate on the POD isozymes gene expression in plant and might change some genes transcription and expression. The change was an adaptation to physical stress stimulation.

Key words Sound wave, *Dendrobium candidum*, Peroxidase, Isozyme, Gene expression

1 引言

在植物体内,过氧化物酶(POD)主要在以下生理过程中起作用,如萌芽、细胞壁的形成、木质化、木栓化、多聚物的连接、激素代谢、细胞延长、应力防御、乙烯合成、生长调控、酚与 H_2O_2 的代谢等^[1,2],也有人利用 POD 同工酶的这一特性来检测植物对不良环境的反应^[3]。在响应诸如伤化、病菌侵染等不同的外界环境刺激下,过氧化物酶可以通过催化组成细胞壁化合物间的连接来形成一道物理屏障,或在植物细胞生长和凋亡过程中,有利于细胞壁的形成^[4]。环境因子的变化可以诱导或抑制某些同工酶的产生或使其表达量发生改变,通过这样来适应变化的环境而生存,一些学者把这些特性称做“适应性”反应^[5]。许多证据表明,环境物理因素会通过引起 POD 活性及其同工酶的变化来影响细胞内的生理代谢^[6]。POD 同工酶普遍存在于植物体各组织中,可能是连接环境与代谢的一个重要的酶类,在抵御环境胁迫中起重要作用^[7]。辐射、盐害、低温、淹水等均可引起 POD 同工酶的变化^[8,9],其编码基因是由一大类称之为超级基因家族的基因组成^[10,11]。

声波作为交变应力的一种特殊形式,对植物生长存在明显的影响^[12]。这方面研究认为较低强度和频率的声波作用于某些植物,不但不会破坏其细胞的完整结构,还有利于 DNA 的合成和细胞周期的同步化,从而促进植物的生长发育^[13-15]。有研究表明,特定的声波刺激对植物保护性酶活性有明显影响,能使过氧化物酶活性增加,也在一定程度上增加 POD

同工酶量^[16],且能使药用植物铁皮石斛多糖含量增加^[17],但仅对逆境条件下植物各种代谢酶活性及其酶谱研究还不足以说明其相关基因的表达变化。因此,克隆植物抗氧化酶系统关键酶基因并研究其逆境条件下的表达,从基因水平上认识和分析植物响应环境应力诱导的作用机制已成必然^[18]。

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)是一种传统的名贵中药材,以新鲜或干燥茎入药,加工后称为“铁皮枫斗”^[19],其生长代谢易受物理环境因子变化影响^[20]。本文对声波刺激下铁皮石斛 POD 同工酶酶谱、POD 基因的克隆及其表达变化进行分析,旨在研究物理应力对铁皮石斛 POD 同工酶基因表达水平变化的影响,以进一步探讨铁皮石斛 POD 同工酶基因表达与物理环境应力的关系。

2 材料与方法

2.1 实验材料及处理

2006年6月10日将铁皮石斛的组培苗同一无性系转接到 MS + IBA 的培养基中,分为两个平行组,一组将进行声波刺激,另一组作为对照。刺激仪为重庆大学生物工程学院自行研制的声波促进植物生长装置(专利号:ZL01256711.6)(见图1)。7月1日,以声强 100dB、频率 1000Hz 的声波对刺激组的材料连续进行刺激,每天一次,每次一小时,连续刺激 15 天,每隔 3 天取样。与刺激组相比,对照组的材料培养条件相同仅无声波干扰,比照取材, - 70℃ 冷冻备用,处理方法参见文献

[21]。取声波加载前的材料来克隆 *POD* 基因片段,取声波刺激第 0、3、6、9、12、15 天的材料

来提取过氧化物酶同工酶和 *POD* 基因表达比较实验,以第 0 天的材料作为对照。

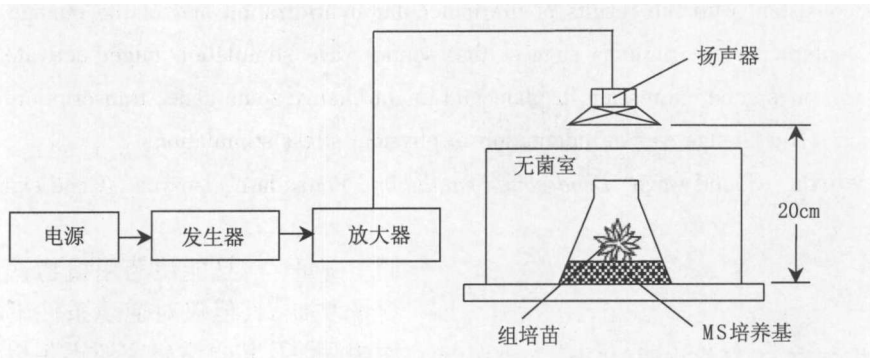


图1 声波发生装置示意图

2.2 *POD* 同工酶的提取与 PAGE 电泳

分别取 -70°C 下储存的铁皮石斛组培苗各 1g,加 3ml pH6.5 磷酸缓冲液,在冰浴中研磨成匀浆,以 4000 r/m 离心 15min (4°C),取上清液,此即为酶的粗提液,低温下保存备用。取 $40\mu\text{l}$ 酶液,加入 $10\mu\text{l}$ 蔗糖 (60%) 及 $10\mu\text{l}$ 溴酚蓝 (0.2%),混合后取 $20\mu\text{l}$ 加样。6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶采用醋酸-联苯胺染色法染色,直至过氧化物酶谱变为红褐色,然后用水冲洗清洁。所得结果用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行拍照分析,取得酶谱及各酶带的百分含量。

2.3 RNA 的提取

采用改良的柠檬酸缓冲液研磨法提取总 RNA,操作方法见文献[22]。

2.4 RT-PCR 扩增与电泳

从 GeneBank 里查出刺麻 (*Urtica dioica*) 内质网 *POD* 基因的全序列,以此设计特异引物,进行 RT-PCR 扩增。

引物序列: primer 1: $5' - \text{CACTTCCAC-GACTGCTTTG} - 3'$
primer 2: $5' - \text{GTGTGTGATC-CAAGGAGAAC} - 3'$

引物由北京天为时代公司合成。用 GIBCOBRL 的 SUPERScript™ ONE-STEP™ RT-PCR System 进行反转录和 PCR,模板 RNA 的量为 40ng ($40\text{ng}/\mu\text{l}$ 的总 RNA $0.5\mu\text{l}$),具体反应体系如下: $2 \times \text{PCR}$ 缓冲液 $12.5\mu\text{l}$, $2\mu\text{M}$

引物 1 $2.5\mu\text{l}$, $2\mu\text{M}$ 引物 2 $2.5\mu\text{l}$, Taq 酶 $0.5\mu\text{l}$,模板 $0.5\mu\text{l}$, 12.8M DMSO $2.0\mu\text{l}$,加 DEPC 水至 $25.0\mu\text{l}$ 。混匀上述反应物,离心后将管内液体收集至管底,在 PCR 仪中进行如下反应: 94°C 预变性 3min; 94°C 60sec, 53°C 60sec, 72°C 75min, 35 个循环; 72°C 5min, 4°C 保存。RT-PCR 扩增产物用 1.0% 变性琼脂糖凝胶电泳检测。

2.5 目的条带的回收纯化

用一次性无菌刀片切下琼脂糖凝胶电泳中目的条带,采用 QIAEX II 琼脂糖凝胶提取试剂盒回收目的条带,回收产物用作制备探针。

2.6 Northern 点杂交

2.6.1 杂交膜的制备

(1) 待转膜样品的处理

分别取 $2.5\mu\text{l}$ (100ng 左右) 的刺激组和对照组总 RNA 在 95°C 变性 5 分钟,立即置冰上冷却备用。

(2) 点样

将尼龙膜 (Hybond-N⁺, Amersham, UK) 用 DEPC 水浸湿,将变性好的样品低速离心后,每次取 $0.5\mu\text{l}$ 刺激组和对照组总 RNA 在膜上分别点样,待膜晾干,再重复点样 4~5 次,点样完毕,将膜置于 37°C 固定 2 小时。用保鲜膜封好,于 4°C 保存备用。

2.6.2 探针标记、杂交、洗膜和胶片冲洗

本实验从探针标记,到杂交、洗膜都采用

North2South Direct HRP (horseradish peroxidase) (Pierce 公司, USA) 标记检测试剂盒。该试剂盒是一个完整的系统, 应用于 Northern 和 Southern 点杂交中的核酸标记和化学发光检测。这个一步标记杂交系统和一个新的增强发光底物 HRP 结合, 确保了结果的快速和一致。其灵敏性等同于甚至超过了³²P。标记核酸必须去掉蛋白质污染, 并且要溶解在超纯水中。探针标记、杂交、洗膜和胶片冲洗参见该试剂盒说明书。根据 Northern 点杂交的信号强弱, 分析铁皮石斛 *POD* 基因在声波刺激诱导下的表达情况。

3 结果

3.1 声波刺激下铁皮石斛 *POD* 同工酶酶谱

图 2 为聚丙烯酰胺凝胶电泳得到的铁皮石斛 *POD* 同工酶酶谱。从图 2 可以看出, 铁皮石斛对照组和刺激组在电泳凝胶上均出现了 6 条酶带, 从各酶带的迁移率来看, 刺激组各组和对照组的相应酶带的迁移率均相近, 可以认为刺激组没有出现新的 *POD* 同工酶酶带。但可以看出, 声波处理组的 *POD* 同工酶的各酶带染色比对照组明显加深, 这表明声波刺激增强了铁皮石斛 *POD* 同工酶的活性。其中, 刺激第 9 天 (T9) 的一组染色最深。

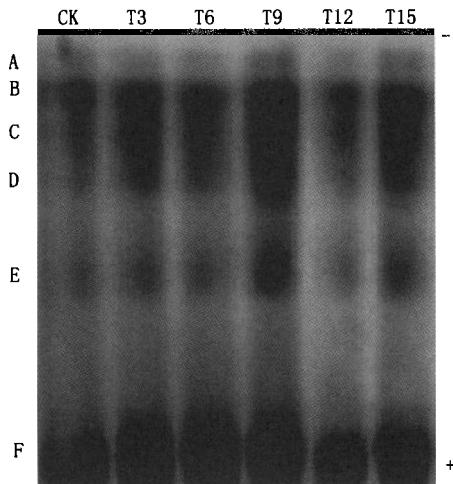


图 2 铁皮石斛 *POD* 同工酶电泳图

表 1 显示过氧化物酶同工酶各酶带蛋白的百分含量, 从表 1 可以看出, 各组样品中 F 带的百分含量都相对较高, 各酶带的百分含量都不尽相同。

表 1 铁皮石斛 *POD* 同工酶谱带百分比含量比较

	A	B	C	D	E	F
CK	0.94%	18.32%	13.84%	7.62%	8.67%	50.61%
T3	1.43%	15.38%	12.05%	3.92%	10.60%	56.54%
T6	0.94%	20.12%	17.61%	6.27%	3.45%	51.61%
T9	1.73%	17.25%	13.36%	4.22%	4.71%	58.75%
T12	1.12%	15.12%	14.16%	14.41%	13.93%	41.26%
T15	0.95%	13.27%	8.42%	7.13%	5.12%	65.26%

3.2 RT-PCR 扩增铁皮石斛 *POD* 基因片段

从图 3 可以看出, 从铁皮石斛材料中都扩增出了一条 *POD* 基因 (大小约 500bp) 的片段。使用 QIAEX II 胶回收试剂盒回收纯化目的条带。

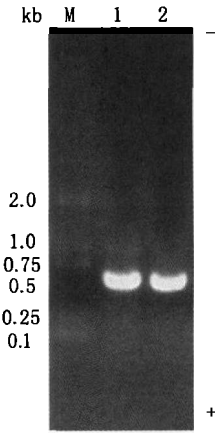


图 3 铁皮石斛 *POD* 基因 RT-PCR 产物 1.0% 变性琼脂糖凝胶电泳

3.3 Northern 点杂交研究 *POD* 基因在声波刺激下的表达

使用 1.3 的方法分别提取了铁皮石斛经过声波处理的第 0、3、6、9、12、15 天材料的总 RNA, 以第 0 天的材料作为对照, 总 RNA 的含量见表 2、电泳见图 4。可以看出, 刺激第 9 天 RNA 的量最为显著, 声波应力对铁皮石斛总 RNA 的影响有一定的时间关系。

表2 铁皮石斛总 RNA 含量比较

Time(d)	0(CK)	3	6	9	12	15
Total RNA contents($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{FW}$)	222.0 \pm 8.9	240.8 \pm 8.3	243.4 \pm 9.6	264.1 \pm 10.2	258.6 \pm 8.7	231.8 \pm 8.1

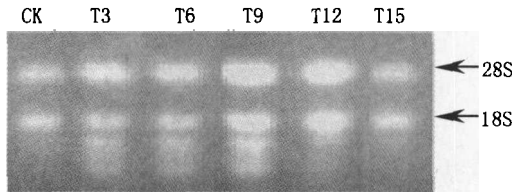
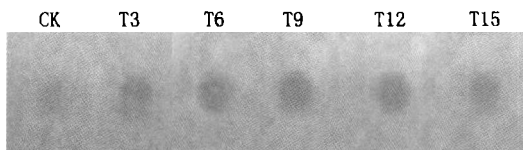


图4 铁皮石斛总 RNA 1.0% 琼脂糖凝胶电泳

POD 基因片段的 Northern 点杂交(图5)也显示,不同处理时间下的特定声波应力对铁皮石斛 *POD* 基因表达的影响与其总 RNA 量的变化比较一致,也是从刺激第3天开始, *POD* 基因的表达信号明显增强,刺激第9天的表达信号最强,后又有逐渐减弱的趋势。这表明,铁皮石斛的 *POD* 基因在声波刺激作用下其表达有一个先逐渐增强、后逐渐减弱的过程。

图5 铁皮石斛 *POD* 基因 Northern 点杂交

4 讨论

4.1 声波刺激对铁皮石斛 *POD* 同工酶的影响

POD 是细胞内的一个重要酶类,其作用是多方面的。它一方面作为保护酶系统中的组成部分与 SOD、CAT 协调一致,维持细胞内自由基的低水平,防止自由基毒害;另一方面调节细胞内的生理代谢。许多证据表明, *POD* 对环境十分敏感,许多环境物理因素(微重力、激光、微波、磁场等)都是通过 *POD* 活性的升高来调节生理代谢的^[6]。本实验的同工酶分析也显示,随着刺激时间的延长, *POD* 同工酶量

也有一个逐渐增多后又逐渐减弱的趋势。尽管酶带的数量没有发生变化,但刺激组的酶带染色与对照相比都明显加深,刺激第9天的酶带染色最深,表明一定强度的声波应力对 *POD* 同工酶有激活作用。

同工酶是由基因决定的,但由于组成酶蛋白的肽链数目和性质有所不同,因此基因与同工酶之间的对应数量亦复杂。同工酶作为基因的直接产物可以从分子水平上直接反映基因的微小差异,这也可从 *POD* 同工酶各酶带的相对含量看出。表1显示,铁皮石斛 *POD* 同工酶6条主要酶带含量随着刺激时间的不同出现较大差异,表明声波应力作用可能使铁皮石斛过氧化物酶同工酶的基因表达发生了改变。一部分基因可能受到影响而增强表达,也可能有些基因受到应力刺激表达减弱;但总的来看,在声波刺激下 *POD* 同工酶基因家族的基因表达普遍增强,表达量普遍有所提高,且以刺激第9天的尤为突出。同时,由于各基因对外界刺激的敏感程度又有所不同,因而各酶带蛋白的活性程度就表现出差异,导致酶带含量各不相同。看来,特定的声波应力有可能通过诱发 *POD* 等酶基因的表达改变来影响植物细胞代谢及其生长行为。

4.2 声波刺激对铁皮石斛 *POD* 同工酶基因表达的影响

编码 *POD* 同工酶的基因的表达受多种因素影响^[9]。从表2可以看出,在声波应力的作用下,铁皮石斛总 RNA 的含量得到提高,说明其基因表达受到应力刺激的影响。由于受到影响的基因较多且非常复杂,因此,有必要克隆其中的某一两个基因来检测其受应力刺激的影响程度,以此来证明是否与其表达酶谱相一致。从其酶谱(图2)和各酶带相对含量(表

1)的分析来看,即使是 POD 同工酶家族基因,也有一些是受声波刺激增强表达的,一些则不受多大影响,还有一些基因表达是受抑制的。不过,从提取的总 RNA(表 2)分析来看,受到声波刺激而诱导相关基因表达或提高相关基因表达量是客观存在的。再从本实验设计的特异引物扩增出一条 POD 基因片段的杂交结果显示(图 5),所扩增出的这条 POD 基因表达是受声波应力刺激诱导或增强表达的,与对照相比,各刺激组的杂交信号明显要强,且依然是刺激第 9 天的杂交信号最强,与前面的 POD 活性检测和酶谱分析相一致。这说明,所扩增的 POD 基因具有代表性,特定的声波刺激铁皮石斛基因表达受处理时间的影响,呈现先升后降的趋势。以上研究表明,影响 POD 基因表达信号的差异可能主要是 mRNA 转录本数量的差异,不同 mRNA 转录本决定基因表达过程的转录水平。不同的处理时间下,POD 基因表达过程中转录水平的高低主要表现为 mRNA 转录本之间质量的差异,没有新的 POD 基因产生。

4.3 POD 同工酶基因表达与环境应力的关系

植物体内各细胞、组织、器官的基因组成完全一致,但基因的表达存在时间、空间上的差异^[23]。同工酶是基因表达的产物,它是生物体为适应细胞代谢的多方面要求而形成的。在细胞生长发育过程中,受到环境应力刺激时,植物会从代谢的不同层次和水平上作出相应的应答,在遗传上则表现为基因表达的改变^[24,25]。环境应力刺激时通过细胞内代谢产物的诱导或阻遏作用,诱导有关基因的表达而相应地关闭某些基因,以适应应力作用下细胞内的特殊代谢反应^[26]。本研究所使用的声波应力引起铁皮石斛某些基因转录和表达水平的改变,与其幼苗在应力作用下的生理代谢可能有某种程度对应关系,是植物对环境应力的一种适应性反应。

过氧化物酶是植物体内的重要防御酶之一,它的主要生理功能是清除逆境环境下细胞

内活性氧自由基的含量,抑制膜内不饱和脂肪酸的过氧化作用,提高植物抗逆性^[8]。本实验表明,环境应力作用下 POD 同工酶基因表达发生了明显的变化,虽然诱导没有产生了新的同工酶,但可推测 POD 同工酶对环境应力的刺激具有不完全相同的酶学特性和生理功能;应力刺激下植物 POD 同工酶基因表达的变化,可能是通过控制其基因的转录、翻译影响表达,最终达到抵御不良环境进而适应变化的环境。

致谢 感谢国家自然科学基金项目(30470431)和重庆市自然科学基金项目(CSTC 2008BB5410)资助。

参 考 文 献

- [1] Scialabba A, Bellani LM, Dell'Aquila A. Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Eur J Histochem*, 2002, 46: 351 - 358.
- [2] Allison SD, Schultz JC. Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *J Chem Ecol*, 2004, 30:1363 - 1379.
- [3] Radic S, Radic-Stojkovic M, Pevalek-Kozlina B. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. *J Plant Physiol*, 2006,163(12): 1284 - 1292.
- [4] Passardi F, Cosio C, Penel C, et al. Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Rep*, 2005, 24:255 - 265.
- [5] Peng YK, Wang W, Qi ZZ. Effects of 1 - 4°C low temperature treatment on seedling growth and POD isoenzymes in higher plants. *Acta Agri Boreali-Sinica*, 1994, 9 (suppl): 28 - 31.
- [6] 习岗,宋清,杨初平,等.低强度微波对烟草叶片细胞膜系统和 POD 同工酶的非热效应. *微波学报*, 2006, 22 (2): 65 - 70.
- [7] Hossain Z, Mandal AK, Datta SK, et al. Development of NaCl-tolerant strain in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through *in vitro* mutagenesis. *Plant Biol (Stuttg)*, 2006, 8 (4): 450 - 461.
- [8] Roy S, Begum Y, Chakraborty A, et al. Radiation-induced

- phenotypic alterations in relation to isozymes and RAPD markers in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82(11): 823-832.
- [9] Sahoo MR, Dasgupta M, Kole PC, et al. Antioxidative enzymes and isozymes analysis of taro genotypes and their implications in *Phytophthora* blight disease resistance. *Mycopathologia*, 2007, 163(4): 241-248.
- [10] Boach A, Vega C, Benito C. The peroxidase isozymes of the wheat kernal; tissue and substrate specificity and their chromosomal location. *Theor Appl Genet*, 1987, 73: 701-706.
- [11] Liu CJ, Chao S, Cale MD. The genetical control of tissue-specific peroxidases, per-1, per-2, per-3, per-4, and per-5 in wheat. *Theor Appl Genet*, 1990, 79: 305-313.
- [12] Liu YY, Wang BC, Long XF, et al. Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 24(3-4): 321-326.
- [13] 孙克利, 席葆树. 交变应力作用下烟草愈伤组织细胞热力学相行为的研究. *生物物理学报*, 1999, 15: 579-583.
- [14] 沈子威, 孙克利, 杨钧, 等. 应用傅里叶红外光谱研究强声波作用下植物细胞壁蛋白质二级结构的变化. *光子学报*, 1999, 18: 600-602.
- [15] 蔡国友, 侯玉霞. 应用圆二色光谱研究交变应力对烟草细胞膜蛋白构象的影响. *光子学报*, 2000, 29: 289-297.
- [16] Wang XJ, Wang BC, Jia Y, et al. Effects of sound stimulation on protective enzyme activities and peroxidase isoenzymes of *Chrysanthemum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 27: 59-63.
- [17] 李标, 王伯初, 梁亦龙, 等. 声波刺激对铁皮石斛组培苗多糖含量的影响. *中药材*, 2006, 29(7): 645-647.
- [18] Triantafyllia GD, Issidora SP, Dimitrios JS, et al. Molecular cloning and tissue-specific transcriptional regulation of the first peroxidase family member, Udp1, in stinging nettle (*Urtica dioica*). *Gene*, 2005, 362: 57-69.
- [19] 邵华, 张玲琪, 李俊梅. 铁皮石斛研究进展. *中草药*, 2004, 35(1): 109-202.
- [20] 苏文华, 张光飞. 铁皮石斛叶片光合作用的碳代谢途径. *植物生态学报*, 2003, 27(5): 631-637.
- [21] Liu YY, Wang BC, Long XF, et al. Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 24: 321-326.
- [22] Li B, Wang BC, Tang K, et al. A simple and convenient approach for isolating RNA from highly viscous plant tissue rich in polysaccharides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, 49(2): 101-105.
- [23] Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvao VC, et al. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 2006, 224(2): 300-314.
- [24] Xu XY, Kadnkura H, Okuho A, et al. Cloning and sequencing of a gene encoding a novel salt stress-induced membrane protein from *Rhodobacter haerohiesf.* sp. *Enitri-ficans*. *Appl Microbiol Biotech*, 2001, 56: 442-447.
- [25] Galver AF, Gulick PJ, Dvorak J. Characterization of the early stages of genetic salt-stress responses in salt-tolerant lophopyrum elongatum, salt-sensitive wheat and their amphiploid. *Plant Physiol*, 1993, 103: 257-265.
- [26] Li K, Xu C, Zhang K, et al. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. *Proteomics*, 2007, 7(9): 1501-1512.