

干旱胁迫下向日葵幼苗差异表达蛋白的鉴定与分析

梁春波^{1,2}, 马 军², 王文军², 王 静², 关洪江², 范丽娟², 乔广军², 黄绪堂^{2*}

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 黑龙江省农业科学院博士后工作站, 哈尔滨 150086)

摘要:为研究向日葵苗期对干旱胁迫在蛋白水平的应答机制, 挖掘耐旱相关基因, 本研究以向日葵恢复系 R5 为试验材料, PEG6000 溶液模拟干旱胁迫, 进行蛋白组测序, 鉴定差异表达蛋白。通过对胁迫组和对照组 6 个向日葵幼苗样品的蛋白组测序分析, 共鉴定出肽段 25 090 条和蛋白 5 573 个, 其中 654 个蛋白为显著差异蛋白。通过对蛋白进行功能预测和 GO 富集、KEGG 富集、pathway 富集、蛋白互作分析和亚细胞定位等, 初步了解了向日葵苗期干旱胁迫下的蛋白表达情况。本研究结果为向日葵苗期干旱胁迫的分子响应机制研究提供了理论依据, 并为通过基因工程改善向日葵耐旱性、选育向日葵耐旱新品种提供了基因资源。

关键词:向日葵; 苗期; 干旱胁迫; i-TRAQ; 差异表达蛋白

中图分类号: S565.5

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)03-0070-05

Identification and Analysis of Differentially Expressed Proteins of Sunflower Seedlings under Drought Stress

LIANG Chunbo^{1,2}, MA Jun², WANG Wenjun², WANG Jing², GUAN Hongjiang², FAN Lijuan², QIAO Guangjun², HUANG Xutang^{2*}

(1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. Postdoctoral Workstation of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to analyze the response mechanism of sunflower seedling to drought stress at protein level and promote the discovery of drought-tolerant related genes, PEG6000 was used to simulate drought stress to treat the drought-tolerant restorer line R5, and proteomic were sequenced to identify differentially expressed proteins. By the proteomic sequencing of 6 sunflower seedlings from stress group and control group, a total of 25,090 peptide fragments and 5,573 proteins were identified, of which 654 proteins were significantly different proteins. Through functional prediction, GO enrichment, KEGG enrichment, pathway enrichment, protein interaction analysis and sub-cellular localization, the expression of protein in sunflower seedlings under drought stress was preliminarily understood. The results of this study provided basis for the future study of molecular response mechanism to drought stress of sunflower seedling, and provide genetic resources for improving drought tolerance of sunflower through genetic engineering and the breeding of new sunflower varieties with drought tolerance.

Key words: Sunflower; Seedling stage; Drought stress; i-TRAQ; Differentially expressed protein

向日葵(*Helianthus annuus* L.)是全球重要的油料作物和生物能源作物, 因其对干旱、盐碱等非生物胁迫具有较高的耐性而在世界范围内广泛种植。2020 年全球的播种面积和总产量分别达

到 2 787.4 万公顷和 5 023.0 万吨^[1]。干旱是世界范围内影响最为广泛的非生物胁迫, 严重影响了包括向日葵在内的各种作物的生产。改善向日葵耐旱性对扩大其在干旱、半干旱地区的种植面积, 发展向日葵产业具有重要的意义。目前有关向日葵耐旱性的研究主要集中在耐旱性鉴定^[2]、生理性状分析^[3-5]、分子标记及 QTL 定位^[6-7]、表达谱测序^[8]等。关于干旱胁迫对向日葵蛋白质组学的影响鲜有报道。在向日葵响应逆境胁迫领域开展蛋白质组学相关研究, 为新的抗逆基因(或蛋白)的鉴定奠定了基础。同位素标记相对与绝对定量

收稿日期: 2020-12-13

基金项目: 黑龙江省青年基金项目(QC2015025); 黑龙江省农业科学院引进博士科研启动金项目(201507-38); 国家特色油料产业技术体系项目(CARS-14-1-06)

作者简介: 梁春波(1981-), 女, 讲师, 博士, 主要从事作物遗传育种研究。

通讯作者: 黄绪堂, 男, 硕士, 研究员, E-mail: hxtlj@126.com

(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术是因其具有高定量精度的特点,目前已经越来越广泛地应用于定量蛋白质组学领域^[8]。本研究以PEG6000模拟干旱胁迫处理向日葵幼苗,采用iTRAQ技术进行蛋白组测序,对向日葵苗期干旱胁迫下的差异表达蛋白进行了鉴定,对差异蛋白进行分子功能预测,旨在挖掘向日葵响应干旱胁迫相关蛋白,了解参与耐旱过程的相关代谢通路,为向日葵耐旱育种提供更为有效的科学依据,也为通过基因工程改善向日葵耐旱性、选育耐旱新品种提供基因资源。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料及胁迫处理

本研究供试材料为具有较强耐旱性的油用向日葵自交系R5,种子由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供。在营养钵中播种,培养基质为营养土和蛭石等量混合,每个营养钵保证10株苗。4片叶前正常管理,在向日葵幼苗进入四叶期时移到蒸馏水中进行预培养,24 h后移到15%PEG溶液中模拟干旱胁迫处理,以蒸馏水为对照。每个处理3次重复。处理24 h后选取生长一致的向日葵幼苗迅速放入液氮中,用于后续试验。

1.2 试验方法

蛋白提取:称取1~2 g向日葵幼苗放入装有液氮的研钵中,快速研磨成粉。将粉末转入50 mL离心管内,加入适量体积10%TCA丙酮和终浓度10 mmol/L DTT,混匀后沉淀2 h。4 °C 15 000 g离心20 min,向沉淀中加入5倍体积含有0.1 mol/L乙酸钠的甲醇和DTT(终浓度为10 mmol/L),震荡混匀,-20 °C下静置2 h沉淀蛋白液。4 °C 12 000 g离心25 min后向沉淀中加入5倍体积的80%丙酮和终浓度为10 mmol/L的DTT,混匀后-20 °C沉淀蛋白液2 h。4 °C 12 000 g离心25 min,在沉淀中加入适当体积蔗糖提取液,随后加入等体积Tris饱和酚,冰上振荡5 min。4 °C 10 000 g离心10 min,收集酚相;液体加入等体积Tris饱和酚,冰上振荡5 min。4 °C 10 000 g离心10 min,收集酚相并与上次酚相合并。往上清液中加入5倍体积含0.1 mol/L乙酸钠的甲醇,加入终浓度10 mmol/L DTT,混匀后-20 °C沉淀蛋白液过夜。甲醇洗涤样品一次,80%丙酮洗涤样品一次,得到蛋白沉淀。风干去除沉淀中残余丙酮后,加入适量Lysis Buffer 3,加入终浓度1 mmol/L PMSF、2 mmol/L EDTA混匀,冰上放置5 min后加入终浓度10 mmol/L DTT,冰

浴超声5 min;25 000 g 4 °C离心15 min,向上清液中加入终浓度10 mmol/L的DTT,56 °C水浴1 h。恢复至室温后加入终浓度55 mmol/L的IAM,暗室放置45 min;加入5倍体积的冷丙酮,-20 °C沉淀蛋白液过夜;4 °C 5 000 g离心15 min,弃掉上清液。风干沉淀中残余丙酮,加入适量Lysis Buffer 3溶液,冰浴超声5 min。4 °C 25 000 g离心15 min,选取上清液,利用SDS-PAGE方法对提取的蛋白进行质量检测。

蛋白酶解:选取100 μg已烷基化处理的蛋白溶液加入10 KDa的超滤管中;20 °C 12 000 g离心20 min,直至蛋白液全部离心至收集管底部,去掉上清液,超滤管中再加入0.5 mol/L TEAB100 μL,同上离心操作。重复3次后更换新的收集管;在超滤管中加入50 μL 0.5 mol/L的TEAB,按照蛋白:酶=40:1的比例加入Trypsin酶,使用Parafilm封口膜将超滤管与管盖密封,放置于震荡仪上37 °C反应过夜;12 000 g离心15 min后再加入100 μL 10.5 mol/L的TEAB,12 000 g离心20 min,收集管中溶液即酶解后肽段溶液;转出收集管底部的酶解消化液于1.5 mL离心管中,冷冻抽干。

肽段标记:根据样品数量,取出一定量iTRAQ标签试剂;待试剂恢复至室温后,每管试剂加入50 μL异丙醇,涡旋震荡后低速离心;采用0.5 mol/L MTEAB溶液溶解肽段样品,并加入对应iTRAQ标签试剂中。不同样品肽段选用不同的iTRAQ标签;室温静置2 h。

肽段分离:采用岛津LC-20AB液相系统,5 μm 4.6×250 mmol/L Gemini C18分离柱对样品进行液相分离。

高效液相:将抽干的肽段样品用流动相A(2% ACN, 0.1%FA)复溶,20 000 g离心10 min后,取上清液通过LC-20AD(岛津公司)纳升液相色谱仪进行分离。

质谱检测:经过液相分离的肽段通过nanoESI源离子化后进入到串联质谱仪Q-Exactive(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)进行DDA(data-dependent acquisition)模式检测。

数据分析:使用Analyst QS 2.0软件(Applied Biosystems/MDS Sciex)进行数据采集。iTRAQ数据的定量采用华IQuant软件,对数据库搜索结果进行重新打分,从而提高结果的鉴定率。首先在谱图/肽段水平进行1% FDR的过滤(PSM-level FDR≤0.01),从而获得显著性鉴定的谱图和肽段列表。接着基于“简约原则”(The parsimony prin-

ciple),利用肽段进行蛋白组装,并产生一系列的蛋白组。为了控制蛋白的假阳性率,流程还会在蛋白水平上以FDR 1%再次进行过滤(Protein-level FDR<0.01),所使用策略为Picked protein FDR^[6]。最终差异蛋白以Fold change>1.2(所有比较组比值的平均值)和P-value<0.05(所有比较组的t-test)为筛选条件进行筛选。

蛋白功能预测:将鉴定到的蛋白质与NR数据库、KOG数据库和KEGG数据库进行比对,得到相应的GO富集、KOG注释和pathway注释分析结果。通过与STRING^[2]蛋白互作数据库比对,对差异表达蛋白进行互作分析。使用WoLF PSORT软件实现蛋白质的亚细胞定位预测。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下差异表达蛋白的鉴定

本研究对干旱组和胁迫组6个样品进行了蛋白组测序,共鉴定到25 090条肽段和5 573个蛋白。将干旱胁迫组3个样品与对照组3个样品进

行比较,共得到差异表达蛋白654个,其中360个蛋白上调表达,294个蛋白下调表达。

2.2 差异表达蛋白功能注释

本研究对654个差异表达蛋白进行功能预测,共预测到544个具有明确功能的蛋白,主要包括核糖体蛋白、细胞色素蛋白、脱水蛋白、转运蛋白、转录因子、热激蛋白、转移酶蛋白、光合作用相关蛋白、氧化还原酶蛋白、信号传导相关蛋白和锌指蛋白等。

2.3 蛋白质GO注释与GO富集

本研究GO注释和富集结果表明:3 773个检测蛋白和409个差异蛋白被富集到51个和44个GO条目中(表1)。在生物过程方面,细胞过程中检测的蛋白质数最多为1 691个,其中156个蛋白差异表达。其次是代谢过程,1 673个蛋白中有170个差异表达。343个蛋白与刺激应答相关,其中33个蛋白差异表达。细胞组分生物合成中有324个蛋白,其中35个差异表达。细胞组分方面,细胞及细胞组分中分别富集到1 766个和1 719个

表1 总蛋白及差异蛋白GO富集统计情况

类别	GO条目	蛋白数量	差异蛋白数量	类别	GO条目	蛋白数量	差异蛋白数量
生物过程	催化活性	2 164	235	细胞组分	胞外区域组分	6	0
	结合	1 715	186		核苷酸	4	1
	结构分子活性	172	20		细胞过程	1 691	156
	转运活性	155	20		代谢过程	1 673	170
	分子功能调节剂	86	12		刺激应答	343	26
	抗氧化活性	84	5		细胞成分组织或生物合成	324	33
	信号传感器活动	24	2		生物调节	322	25
	营养库活动	21	2		定位	320	35
	转录调节活性	17	3		生物过程调节	281	8
	分子传感器活性	12	1		发育过程	70	7
	分子载体活性	8	0		信号	68	3
	蛋白标签	1	0		多细胞组织过程	64	6
	细胞	1 766	184		生物过程负调节	46	4
	细胞组分	1 719	179		繁殖	43	3
细胞组分	细胞器	1 143	115	繁殖过程	42	4	
	膜	1 052	113	生物过程正调节	35	4	
	模组分	897	106	多生物过程	35	2	
	细胞器组分	618	53	解毒免疫系统过程	25	1	
	大分子复合物	616	65	生长	9	1	
	细胞外区	154	14	氮利用	5	1	
	膜腔封闭	100	9	免疫系统过程	5	0	
	交感神经	48	8	节律过程	3	0	
	细胞结	48	8	运动	2	0	
	病毒部分	26	5	细胞增殖	1	0	
	病毒	26	5	碳利用	1	1	
	超分子配合物	13	1				

蛋白,在所有条目中是最多的,差异蛋白富集的数量也最多,分别为184个和179个。分子功能方面的12个GO条目中,催化活性中富集蛋白2164个,其中235个蛋白差异表达。具有结合活性的1715个蛋白中,186个蛋白差异表达。其次为具有结构分子活性和转运活性,分别检测到了172个和155个蛋白,差异表达的蛋白数均为20个。另外,本研究还发现,24个与信号传导活性相关的蛋白中有2个差异表达,17个与转录调节活性相关的蛋白中有3个差异表达,表明具有以上功能的蛋白可能与向日葵苗期干旱胁迫应答相关。

2.4 蛋白质KEGG注释及pathway富集

本研究对检测到的所有蛋白和差异蛋白分别

进行了KEGG的注释和pathway富集,结果表明蛋白被富集到细胞过程、环境信息加工、遗传信息加工等6个方面的21个信号通路中(表2)。在细胞过程中参与运输和分解的235个蛋白中,有23个蛋白差异表达。在环境信息加工方面参与信号转导的140个蛋白中,有15个表达量存在差异。而参与膜转运的8个蛋白均未发现差异表达。遗传信息加工方面的4个信号通路中,差异蛋白均占检测蛋白的10%左右。代谢方面涉及的11个信号通路中,差异蛋白所占比例在10%~18%。另外127个与环境适应相关的蛋白中,有18个蛋白差异表达。

通过对各信号通路内富集差异蛋白的表达模

表2 总蛋白及差异蛋白信号通路富集情况

类别	KEGG 信号通路	蛋白数量	差异蛋白数量	类别	KEGG 信号通路	蛋白数量	差异蛋白数量
细胞过程	运输和分解代谢	235	23	代谢	氨基酸代谢	400	32
					能量代谢	374	89
脂代谢	272	44					
其他次生代谢产物的生物合成	252	38					
其他氨基酸代谢	212	29					
辅助因子和维生素的代谢	206	30					
核苷酸代谢	153	13					
萜类化合物和聚酮类化合物的代谢	114	23					
多聚糖生物合成与代谢	82	13					
组织	环境适应	127	18				
系统	消化系统	13	1				
环境信息加工	信号转导	140	15	人类疾病	内分泌代谢疾病	5	11
	膜转运	8	0				
遗传信息加工	翻译	455	61	代谢	概览图	1715	1
	折叠、分类和降解转录	357	45		碳水化合物代谢	744	177
	转录	150	0				
人类疾病	复制和修复	66	14				

式进行分析发现,在淀粉和蔗糖、氨基酸、半乳糖、甘油脂质、氮、脂肪酸和脂类代谢以及苯丙醇生物合成方面,上调蛋白的数量明显高于下调蛋白的数量。在合成、硫辛酸代谢、昼夜节律和玉米素生物合成方面的所有蛋白均为上调蛋白。而在核糖体、吡啶和叶绿素代谢和RNA降解方面则是下调蛋白占多数(表3)。

2.5 差异表达蛋白互作分析

本研究通过与STRING蛋白互作数据库比对,对差异蛋白进行了互作分析。共发现654个差异蛋白之间存在1420个互作关系,其中425个蛋白与单个蛋白存在互作关系,另外210个差异蛋白可能与多个蛋白存在互作关系。本研究选取可信度前100的互作关系绘制了互作图。从图中可以看出,拆选出的100个互作关系中既存在仅包含2~3个差异蛋白的简单互作关系也包括存在53个差异蛋白的复杂互作关系。在简单的互作关系中

所涉及的2个或3个差异蛋白的表达模式是比较一致的。而在复杂的互作关系群中同时包括上调和下调的差异蛋白。

2.6 差异表达蛋白亚细胞定位

本研究利用WoLF FSORT软件对差异蛋白质进行了亚细胞定位预测(图1),结果表明654个差异蛋白质定位于细胞中的12个部位,其中叶绿体

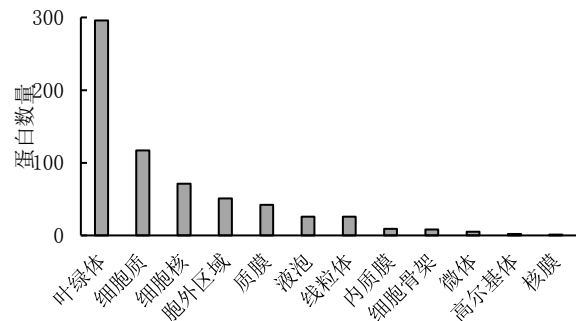


图1 差异蛋白亚细胞定位

表3 各信号通路差异蛋白表达情况

信号通路名称	上调表达蛋白数	下调表达蛋白数
核糖体	12	26
淀粉和蔗糖代谢	31	2
苯丙醇生物合成	21	5
内质网蛋白质加工	10	11
氨基酸代谢	15	1
卟啉和叶绿素代谢	1	15
丙酮酸盐代谢	7	6
RNA降解	4	7
半乳糖代谢甘油脂质代谢	11	1
mRNA 监视通路	9	3
戊糖和葡萄糖相互转化	5	7
氮代谢	11	1
脂肪酸代谢	6	3
脂代谢	3	5
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	6	2
丙酸盐代谢	1	6
蛋白质出口	2	5
类黄酮生物合成	1	6
鞘脂代谢	2	4
硫代谢	5	1
吡啶生物碱生物合成	4	2
二苯乙烯、二芳基庚烷和姜辣素的生物合成	3	2
玉米素生物合成	1	4
N-聚糖生物合成	5	0
昼夜节律	2	2
植物角质、亚表皮和蜡的生物合成	3	0
单巴坦生物合成糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚生物合成	2	1
硫辛酸代谢	2	0

中定位的差异蛋白数最多,为296个。其他依次为:细胞质、细胞核、胞外区域、质膜、液泡、线粒体、内质网、细胞骨架、微体、高尔基体和核膜。

3 讨论

蛋白质组学在研究植物非生物胁迫方面具有重要的作用。本研究通过对PEG模拟干旱胁迫处理向日葵幼苗蛋白组进行测序鉴定差异蛋白,初步研究发现差异蛋白涉及信号转导、光合、碳水化合物和能量代谢、抗氧化、次生代谢物生物合成、氨基酸和蛋白质生物合成等。

在干旱胁迫下的向日葵幼苗中,发现有15个差异表达蛋白与信号传导相关。其中9个蛋白为上调蛋白,涉及富含亮氨酸重复受体蛋白激酶、

过氧化酶、铜转运ATP酶、磷酸肌醇磷脂酶和木葡糖内酯酶/水解酶蛋白等。另有6个下调蛋白,其中3个为类囊体相关蛋白,另3个为酸性磷酸酶蛋白。说明干旱胁迫下,向日葵可能是通过以上基因进行胁迫感应和传导的。

大量研究表明,干旱胁迫会影响作物的光合作用,保持光合速率的稳定对维持其在干旱胁迫中的生长发育具有十分重要的意义^[9-11]。本研究中共发现10个差异蛋白可能与向日葵干旱胁迫下的光合作用相关,其中叶绿体B3亚体、B5亚体、光系统I装配蛋白和光系统II相关多肽下调表达,一个光系统II修复蛋白上调表达,说明干旱胁迫对向日葵幼苗的光合作用产生了一定的影响,向日葵随即启动了光合修复程序。此外,本研究还发现5个1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶大亚基(Rubisco)相关蛋白下调表达,表明干旱可能导致向日葵幼苗叶片氧化还原稳定状态遭到破坏,从而使其光合作用受得了抑制。

在碳水化合物代谢、能量代谢、氮代谢方面,上调表达的基因数要明显高于下调表达的基因数,特别是ATP合成酶明显上调表达,说明向日葵幼苗在干旱胁迫下可能通过加强碳水化合物、能量等代谢产生ATP等能量物质以维持其在干旱胁迫下的生长发育所需。

参考文献:

- [1] 国际粮农组织官方网站数据库.世界向日葵种植及生产情况统计[EB/OL].(2022-02-17)[2022-06-16]. <https://www.fao.org/faostat/zh/#data/QCL/visualize>
- [2] 温蕊,侯建华,张艳芳,等.干旱胁迫对向日葵种子萌发的影响及其抗旱性鉴定[J].干旱地区农业研究,2018,32(2):186-191.
- [3] 刘金刚,王妍,宋殿秀,等.开花期干旱胁迫对向日葵干物质积累与产量的影响[J].辽宁农业科学,2017(3):1-8.
- [4] 宋殿秀,依兵,崔良基,等.开花期干旱胁迫对向日葵叶片光合特性的影响[J].辽宁农业科学,2017(4):1-6.
- [5] 曹倩,杨恒山,依兵,等.开花期干旱胁迫对向日葵叶片活性氧代谢的影响[J].辽宁农业科学,2017(2):1-8.
- [6] 张永虎,陈雪,于海峰,等.向日葵芽期抗旱性状丙二醛含量的SSR分子标记分析[J].内蒙古农业大学学报,2012,33(3):25-29.
- [7] 吕品,于海峰,于志贤,等.向日葵高密度遗传连锁图谱构建及两种水分条件下芽期性状的QTL分析[J].作物学报,2017,43(1):19-30.
- [8] Chunbo Liang, Wenjun Wang, Jing Wang, et al. Identification of differentially expressed genes in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves and roots under drought stress by RNA sequencing [J]. Botanical Studies, 2017, 58:42.

(下转第112页)

产孢和孢子萌发的最适温度为 25 °C;孢子萌发相对湿度要求高于 75%,湿度越高,萌发率越高;菌丝生长、产孢最适 pH 为 7;菌丝生长最适碳氮源分别是果糖和硝酸钠;光照条件对菌丝生长和孢子萌发无明显影响;病原菌分生孢子致死温度为 55 °C、10 min。因此在高温、高湿和中性环境下该病易于侵染和发生,这与铁皮石斛根腐病易发生于高温高湿的 6~8 月田间塑料大棚的环境相一致,且发病较为严重^[19]。

随着医药市场对铁皮石斛需求的增大,人工设施栽培面积也不断扩大,而设施栽培具有温度高、湿度大、空气不流通,连年种植等特点,非常有利于病原菌的生长繁殖。研究发现三唑类杀菌剂具有广谱性,如苯醚甲环唑水分散粒剂和戊唑醇可湿性粉剂对孩儿参根腐病 *Fusarium oxysporum* 的抑菌效果明显高于其他药剂^[7],10% 灭菌唑悬浮种衣剂对玉米丝黑穗病 *Sporisorium reilianu* 也有较高防效^[20],40% 氟硅唑乳油和 10% 苯醚甲环唑水分散粒剂也能有效抑制油梨溃疡病 (*Dothiorella* spp.) 菌丝的生长^[21]。本研究发现三唑类杀菌剂腈菌唑乳油和丙环唑乳油、苯基酰胺类和苯吡咯类复配剂精甲·咯菌腈悬浮剂对铁皮石斛根腐病病原尖孢镰刀菌的室内毒力较高,其 EC₅₀ 低于 10 μg/mL;三唑类杀菌剂的戊唑醇悬浮剂、三唑酮可湿性粉剂和氟硅唑乳油的毒力较差,有机硫类代森锰锌可湿性粉剂的抑制效果最差,因此可将三唑类杀菌剂腈菌唑乳油和丙环唑乳油、苯基酰胺类和苯吡咯类复配剂精甲·咯菌腈悬浮剂 3 种农药作为铁皮石斛根腐病田间化学防治的药剂,3 种药剂的田间防治效果还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 高秀娟,王春生. 鲜品铁皮石斛的应用介绍[J]. 北京中医药, 2013, 32(7):543-544.
- [2] 李 戈,李荣英,高微微,等. 药用石斛规模化种植中的病害问题及防治策略[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 56-57.
- [3] 赵玲琳,王国荣,沈伟东,等. 铁皮石斛炭疽病病原菌的分离鉴定及其有效杀菌剂的筛选[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 185-190.
- [4] 陈秋燕,陈东红,石 艳,等. 铁皮石斛白绢病发生规律研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2):1-5.
- [5] 旷 玲,周如军,傅俊范. 短梗五加根腐病菌生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(1):28-32.
- [6] Guo R, Liu X, Li S, et al. In vitro inhibition of fungal root-rot pathogens of *Panax notoginseng* by rhizobacteria[J]. Plant Pathology Journal, 2009, 25(1): 70-76.
- [7] 任建国,欧阳桂炉,汪文云,等. 太子参根腐病菌的分离和鉴定及 10 种杀菌剂对其毒力测定试验[J]. 农药, 2016, 55(4): 297-299.
- [8] 张礼维. 贵州白术根腐病病原鉴定及防治研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [9] 李佳穗,严铸云,兰 英,等. 四川主产区川芎根腐病病原菌鉴定[J]. 中药材, 2015, 38(3):443-446.
- [10] 廖长宏,陈军文,吕婉婉,等. 根和根茎类药用植物根腐病研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(2): 492-497.
- [11] 宁荣彬,孙海峰. 贝母类中药材病害防治研究进展[J]. 东北农业科学, 2018, 43(5):34-37.
- [12] 刘昌云,张永至,申 杰,等. 黄连根腐病发病因素分析及防治药剂筛选[J]. 植物医生, 2019, 32(4):24-27.
- [13] 蒋 平,唐 华. 大棚栽培铁皮石斛常见病害及防治方法[J]. 植物医生, 2014, 27(6):24-25.
- [14] 谢响焯,方 丽,王连平,等. 浙江省铁皮石斛病害的发生及调查[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(10): 1757-1759, 1762.
- [15] 杨凤丽,姚林泉. 温室栽培铁皮石斛主要病虫害及其绿色防控技术模式探讨[J]. 中国农技推广, 2016, 32(4):59-62.
- [16] 方中达. 植病研究方法(第 3 版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1998: 146-155.
- [17] 徐汉虹. 植物化学保护学实验指导(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2012: 45-49.
- [18] 孙乐乐,杨永红,刘军凯,等. 白芨根腐病病原鉴定和生物学特性研究[J]. 中药材, 2013, 36(3):341-345.
- [19] 李 朋,李国祥,王长愉. 滇西南铁皮石斛常见病虫害防治措施[J]. 云南农业科技, 2016(6):45-47.
- [20] 孟玲敏,贾 娇,张 伟,等. 防治玉米丝黑穗病药剂的筛选[J]. 东北农业科学, 2018, 43(6):25-27.
- [21] 韦文添. 不同杀菌剂对油梨溃疡病菌的抑菌效果[J]. 东北农业科学, 2015, 40(2): 68-70, 91.

(责任编辑:王 昱)

(上接第 74 页)

- [9] 赵 欣,白 伟. 杜仲叶片干旱胁迫响应相关差异蛋白的筛选与鉴定[J]. 植物研究, 2008, 38(3): 422-432.
- [10] 卢福顺,石 璞,王凤义. 持续干旱对马铃薯叶绿素荧光参数的影响[J]. 吉林农业科学, 2013, 38(6): 71-75.

- [11] 裴冬丽,张红岩,张 贺,等. 干旱胁迫对番茄幼苗叶片 SOD、POD 和 PAL 活性的影响[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(4): 83-86.

(责任编辑:刘洪霞)