

# 干旱胁迫下黄花苜蓿与蒺藜苜蓿两个抑制性差减杂交文库的构建及分析

王天佐, 赵敏桂\*, 张文浩

(中国科学院植物研究所植被与环境变化国家重点实验室, 北京 100093)

**摘要:**水分胁迫是植物面临的最主要的非生物胁迫之一, 研究植物的抗旱机理以提高植物的抗旱能力具有重大的意义。抑制性差减杂交是一种筛选特异表达基因的良好手段, 使用该方法成功构建了豆科植物黄花苜蓿和蒺藜苜蓿 2 个差减文库并进行测序。通过 GO 分类和 KEGG 分析等手段对文库中序列进行分类, 并分析表达序列的差异, 发现黄花苜蓿文库中对抵抗水分胁迫起积极作用的基因表达序列明显多于蒺藜苜蓿。此外, 还对筛选到的 2 个基因在 2 种苜蓿中的干旱响应表达模式进行了分析, 结果表明, 在黄花苜蓿中这 2 个基因的表达更加有利于响应和抵抗干旱。这些结果在分子层面上一定程度的解释了黄花苜蓿较蒺藜苜蓿更加抗旱的原因。

**关键词:**黄花苜蓿; 蒺藜苜蓿; 干旱; 抑制性差减杂交 (SSH)

**中图分类号:** S816; S551<sup>+</sup>.703.4; Q945.78   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1004-5759(2012)06-0175-07

水资源缺乏是一个全球性的问题, 地球上 1/3 以上的陆地是干旱和半干旱地区, 而中国是主要的干旱国家之一, 干旱半干旱土地面积占国土面积的 50% 以上。水分是植物生存所必需的, 干旱胁迫会严重地影响植物的生长发育, 造成作物大面积减产<sup>[1]</sup>。干旱对农业和社会造成的损失相当于其他各类自然灾害造成的损失之和<sup>[2]</sup>。日益加剧的水资源短缺与植物的正常生长之间形成了激烈的矛盾, 因此, 通过揭示抗旱植物抵抗胁迫的机理, 以寻找提高植物抗旱能力的途径势在必行。

黄花苜蓿 (*Medicago falcata*) 是一种具有突出经济价值和生态功能的多年生优质豆科牧草, 在我国分布广泛, 内蒙古、新疆分布较多<sup>[3]</sup>。黄花苜蓿属于耐寒的旱中生植物, 抗旱、耐寒、耐盐碱、耐风沙、耐贫瘠、抗病虫害。由于黄花苜蓿具有优异的抗逆性, 所以在苜蓿的育种实践中, 黄花苜蓿常常作为父本与高产的紫花苜蓿杂交, 来培育苜蓿新品种<sup>[4-6]</sup>。Pennycooke 等<sup>[7]</sup>对黄花苜蓿和蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 冷响应基因的结构进行了分析, 发现黄花苜蓿基因组中编码诸如胚胎发育晚期丰富蛋白的同源基因较多, 并且其上游具有多个识别低温信号的 CRT/DRE 元件 (C-repeated/dehydration responsive element motifs), 这是黄花苜蓿较蒺藜苜蓿抗冷的分子机理之一。另外, 在低温胁迫下, 黄花苜蓿体内积累的脯氨酸和可溶性糖比蒺藜苜蓿占优势<sup>[8]</sup>。黄花苜蓿在低磷胁迫下能通过大量合成植物激素乙烯, 调控其根系的水分运输和酸性磷酸酶的活性<sup>[9,10]</sup>, 黄花苜蓿还能通过根系大量分泌柠檬酸, 活化根际难溶态磷来提高在磷胁迫条件下对磷的吸收<sup>[11]</sup>。在水分胁迫下, 黄花苜蓿具有形态学上的优势: 根系发达, 入土深度达 2 m, 侧根沿水平方向扩展; 上表皮气孔小, 下表皮气孔多<sup>[3]</sup>。干旱胁迫下, 黄花苜蓿较其他品种能够积累更多的可溶性糖, 保持较高的光合速率, 拥有较强的抗氧化系统<sup>[12]</sup>。虽然国内外对黄花苜蓿抗旱的生理机理研究已取得一定的成果, 但对其抗旱的分子机理研究尚未见报道。因此, 对黄花苜蓿抗旱分子调控机制的研究是极其有意义和亟待进行的。但由于黄花苜蓿遗传背景比较复杂, 分子生物学研究稀少, 直接对其进行抗旱分子机理研究存在一定的困难。由于黄花苜蓿与豆科模式植物蒺藜苜蓿有着紧密的亲缘关系, 蒺藜苜蓿基因组小、自花授粉、丰富的基因组信息、完善的转化体系<sup>[13]</sup>以及现有的对蒺藜苜蓿抗旱的研究<sup>[14-16]</sup>为研究黄花苜蓿抵抗水分胁迫的机理提供了便利。

抑制性扣除杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是一种比较和分离不同细胞系、不同组织间

收稿日期: 2011-12-06; 改回日期: 2011-12-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2007CB106800) 资助。

作者简介: 王天佐 (1985-), 男, 山东潍坊人, 助理研究员, 博士。E-mail: tzwang@ibcas.ac.cn

\* 通讯作者。E-mail: zhaomingui@ibcas.ac.cn

或同一细胞系、同一组织在不同条件下有差别表达基因的方法。抑制性消减杂交法是寻找重要功能基因的新方法,它通过单链 Tester cDNA 的消减均等化,以及两轮抑制性 PCR 使高低丰度的差异表达基因均能有效地进行分离,并可同时得到多条片段<sup>[17]</sup>。SSH 技术已经成功的用于苜蓿差减文库的构建<sup>[18,19]</sup>,并广泛的运用于筛选干旱相关基因的研究<sup>[20,21]</sup>。本研究利用 SSH 技术构建了黄花苜蓿和蒺藜苜蓿的 2 个差减文库并进行测序,通过比较 2 个文库序列的差异来分析黄花苜蓿抗旱的原因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蒺藜苜蓿使用测序种 Jemalong A17,黄花苜蓿使用呼伦贝尔野生黄花苜蓿。试验于 2008 年 11 月—2009 年 5 月在中国科学院植物研究所植被与环境变化国家重点实验室进行。

### 1.2 方法

**1.2.1 材料栽培** 选取均匀一致的黄花苜蓿和蒺藜苜蓿种子,用浓硫酸处理,春化后生根。待根长到 1 cm 左右时种到直径 10 cm 的小盆中。每盆 4 株,为求条件一致,2 个品种的苜蓿种于同一盆中,相同品种对角种植。培养土为蛭石:泥炭土=2:1,各盆中培养土量一致。控制条件(光照 14 h/26℃,黑暗 10 h/18℃,相对湿度均为 50%),使之正常生长。

**1.2.2 干旱处理** 当苜蓿在适宜条件下长至 4 周时开始处理。先将数盆苜蓿浇透水开始干旱处理,以后每隔数天依次进行干旱处理,最后同时取样,干旱处理天数为 4,6,8 和 10 d。收样时,正常生长的为对照,将不同干旱时间地上部样品等量混合为干旱处理,液氮速冻后存放于-70℃超低温冰箱。

**1.2.3 差减文库构建** 使用 RNAiso Plus (TaKaRa) 进行总 RNA 的提取,总 RNA 经检验没有降解后,再使用 PolyTract mRNA Isolation systems(Pormega)对其中的 mRNA 进行磁珠法分离。

然后使用 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech),参照其说明书进行操作获得干旱诱导基因的表达序列标签(expressed sequence tag, EST)。cDNA 的合成:提取干旱处理和正常材料的 mRNA 分别作为检测样本(tester)和参照样本(driver),在反转录酶的作用下将它们的 mRNA 转录为 cDNA;cDNA 的酶切:将 tester、driver 的双链 cDNA 分别用 Rca I 酶切,产生较短的平头末端;接头连接:将 tester 样本经酶切后的 cDNA 片段分为 2 份,分别接上接头-1(Adapter-1)和接头-2R(Adapter-2R),形成 Adapter-1-tester-cDNA, Adapter-2R-tester-cDNA;扣除杂交:用过量的 driver 加入到 Adapter-1-tester-cDNA 和 Adapter-2R-tester-cDNA 中加热变性后分别退火杂交,再将第 1 次杂交后的产物混合,加入新制备的变性 drive,再次退火杂交,得到干旱胁迫下特异表达基因的片段;PCR 扩增:扣除杂交后的产物需 2 次 PCR 才能有效地扩增有差别表达的片段。在 PCR 反应中,只有干旱诱导表达基因的 cDNA 片段能以指数级扩增。

最后将这些片段纯化后连接 pGEM-T Easy 载体(Pormega),转化大肠杆菌感受态,菌液 PCR 鉴定后进行测序。

**1.2.4 生物信息学分析** 将 2 个文库测序出的 EST 片段使用生物序列分析软件 DNA Star 进行去低质量片段、去接头、去重复、并进行拼接。然后将这些序列使用碱基局部比对检索工具 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)、基因语义分类 GO (Gene Ontology category, <http://www.geneontology.org/>) 和京都基因与基因组百科全书 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) 进行分析。

**1.2.5 基因表达模式分析** 从筛选出的干旱响应基因中,选取了 1 个乙烯响应因子(ethylene response factor, ERF)家族的转录因子基因 ERN1(EU038802)以及 1 对同源的胚胎发育晚期丰富蛋白基因 *MfCAS30*(EU139865)和 *MtCAS31*(EU139871),进行干旱处理下基因表达的半定量分析,ERN1 半定量引物为 5'-GT-TAGGCAAAGGCCATCAGG-3'和 5'-GCAGAAGCAACAGCACCATC-3',黄花苜蓿 *MfCAS30* 的半定量引物为 5'-CTTGAGCCAAGGCCAAGTT-3'和 5'-CTGTCCTGTACCATACCC-3',蒺藜苜蓿 *MtCAS31* 的半定量引物为 5'-ATCAAACACGTAGGGTTG-3'和 5'-GGTTCCACCAATGTCAGT-3'。使用 *Actin*(引物为 5'-AC-GAGCGTTTCAGATG-3'和 5'-ACCTCCGATCCAGACA-3')作为内标。

2 结果与分析

2.1 2 个文库的测序

分别从黄花苜蓿和蒺藜苜蓿差减文库中挑取了 667 和 565 个单克隆进行测序,得到了 515 和 547 条 EST 序列。经过 DNA Star 的处理,黄花苜蓿得到 391 条非冗余序列,包括 78 条拼接序列和 313 条单序列;蒺藜苜蓿得到 353 条非冗余序列,包括 57 条拼接序列和 296 条单序列(表 1)。

2.2 序列的生物信息学分析

Gene Ontology 分类包含了基因参与的生物过程,所处的细胞位置,发挥的分子功能三方面信息。在基因表达谱分析中,GO 分类常用于提供基因功能分类标签和基因功能研究的背景知识。利用 GO 数据库的知识体系和结构特点,旨在发掘与基因差异表达现象关联的单个特征基因功能类或多个特征功能基因的组合<sup>[22]</sup>。GO 分类将 2 个文库的 EST 序列分成细胞定位、分子功能和生物功能三大部分,每部分又有细化(图 1)。

表 1 对照和干旱文库的 EST 统计结果

Table 1 Statistics of ESTs for *M. falcata* and *M. truncatula* libraries

材料 Material	表达序列 标签 ESTs	非冗余序列 Unigenes		
		拼接序列 Contigs	单序列 Singletons	总计 Total
黄花苜蓿 <i>M. falcata</i>	515	78	313	391
蒺藜苜蓿 <i>M. truncatula</i>	547	57	296	353

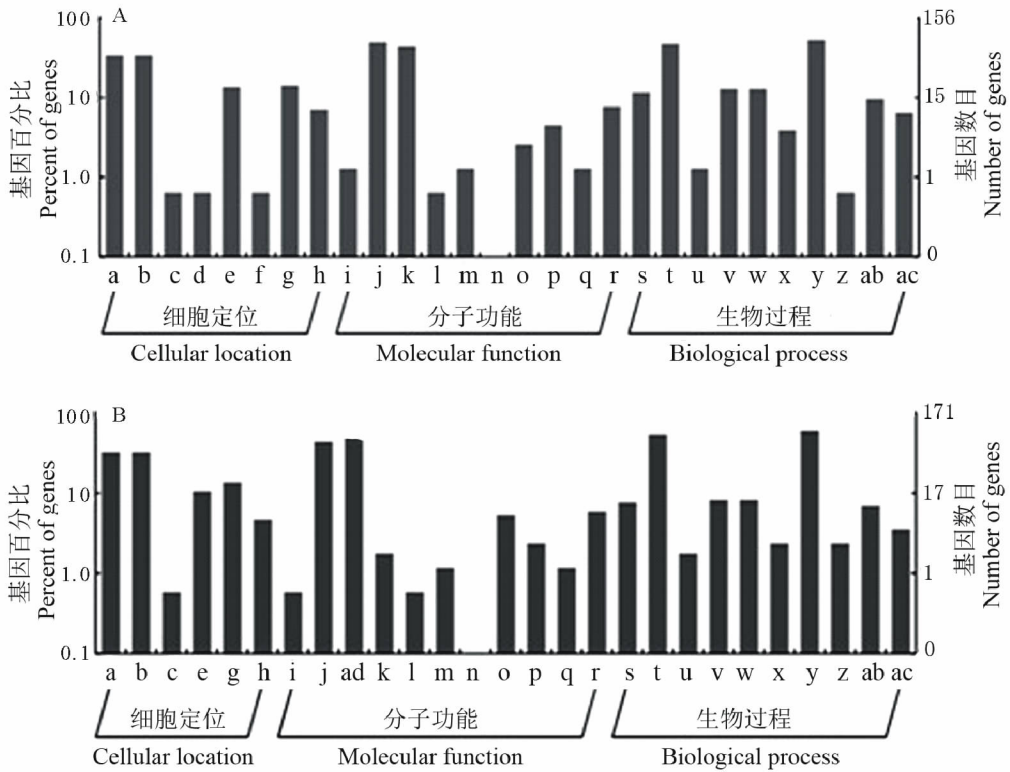


图 1 黄花苜蓿和蒺藜苜蓿 EST 序列的 GO 分类

Fig. 1 GO category of ESTs from *M. falcata* and *M. truncatula* libraries

A: 黄花苜蓿 *M. falcata*; B: 蒺藜苜蓿 *M. truncatula*; a: 细胞 Cell; b: 细胞组成 Cell part; c: 包膜 Envelope; d: 胞外区 Extracellular region; e: 大分子复合体 Macromolecular complex; f: 膜/内膜 Membrane/-enclosed lumen; g: 细胞器 Organelle; h: 细胞器组成 Organelle part; i: 抗氧化活性 Antioxidant activity; j: 连接 Binding; k: 催化活性 Catalytic activity; l: 酶调节活性 Enzyme regulator activity; m: 分子传导活性 Molecular transducer activity; n: 动力活性 Motor activity; o: 结构分子活性 Structural molecule activity; p: 转录调控活性 Transcription regulator activity; q: 翻译调控活性 Translation regulator activity; r: 转运活性 Transporter activity; s: 生物调节 Biological regulation; t: 细胞过程 Cellular process; u: 发育过程 Developmental process; v: 定位建立 Establishment of localization; w: 定位 Localization; x: 大分子复合体亚基组成 Macromolecular complex subunit organization; y: 代谢过程 Metabolic process; z: 多细胞生物过程 Multicellular organismal process; ab: 色素沉着 Pigmentation; ac: 刺激响应 Response to stimulus; ad: 电子运载活性 Electron carrier activity.

KEGG是系统分析基因功能、基因组信息的数据库,它有助于研究者把基因及表达信息作为一个整体网络进行研究。基因组信息包括完整和部分测序的基因组序列,图解的细胞生化过程如代谢、膜转运、信号传递、细胞周期,同系保守的子通路以及关于化学物质、酶分子、酶反应等信息。KEGG提供的整合代谢途径查询十分出色,包括碳水化合物、核苷、氨基酸等的代谢及有机物的生物降解,不仅提供了所有可能的代谢途径,而且对催化各步反应的酶进行了全面的注解。KEGG是进行生物体内代谢分析、代谢网络研究的强有力工具<sup>[23]</sup>。使用KEGG对干旱胁迫下2种苜蓿的EST进行了分析,KEGG将其分成13个代谢过程(图2)。

### 2.3 ERN1 和 *MfCAS30/MtCAS31* 干旱胁迫下的表达

黄花苜蓿和蒺藜苜蓿具有很近的亲缘关系,两者之间的基因具有很高的相似性<sup>[24]</sup>。基于此点,分析了2种苜蓿同源基因在干旱胁迫下的表达差异。

*ERN1* 是 ERF 家族的转录因子,通过分析其在2种苜蓿中的表达(图3),表明随着干旱胁迫程度的增加该基因在黄花苜蓿中的表达量逐渐增加,而在蒺藜苜蓿中干旱响应上调后第6天表达量开始下降。

黄花苜蓿的 *MfCAS30* 和蒺藜苜蓿的 *MtCAS31* 均在各自的差减文库中被发现,半定量试验表明 *MfCAS30* 和 *MtCAS31* 均受干旱诱导上调表达,但是 *MfCAS30* 响应干旱比 *MtCAS31* 早,并且表达量高(图3)。

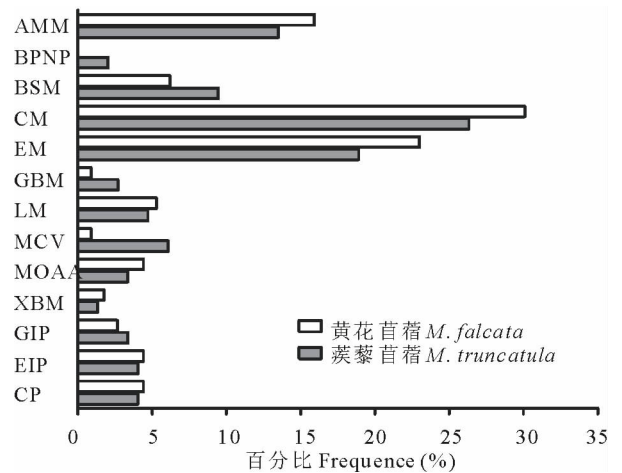


图2 黄花苜蓿和蒺藜苜蓿 EST 序列的 KEGG 分类

Fig. 2 KEGG category of ESTs from *M. falcata* and *M. truncatula* libraries

AAM: 氨基酸代谢 Amino acid metabolism; BPNP: 聚酮和非核糖体肽合成 Biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides; BSM: 次生代谢产物的合成 Biosynthesis of secondary metabolites; CM: 碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism; EM: 能量代谢 Energy metabolism; GBM: 多糖合成及代谢 Glycan biosynthesis and metabolism; LM: 脂类代谢 Lipid metabolism; MCV: 辅因子和维生素代谢 MCV: Metabolism of cofactors and vitamins; MOAA: 其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids; XBM: 生物异源物质降解及代谢 Xenobiotics biodegradation and metabolism; GIP: 遗传信息处理 Genetic information processing; EIP: 环境信息处理 Environmental information processing; CP: 细胞过程 Cellular processes.

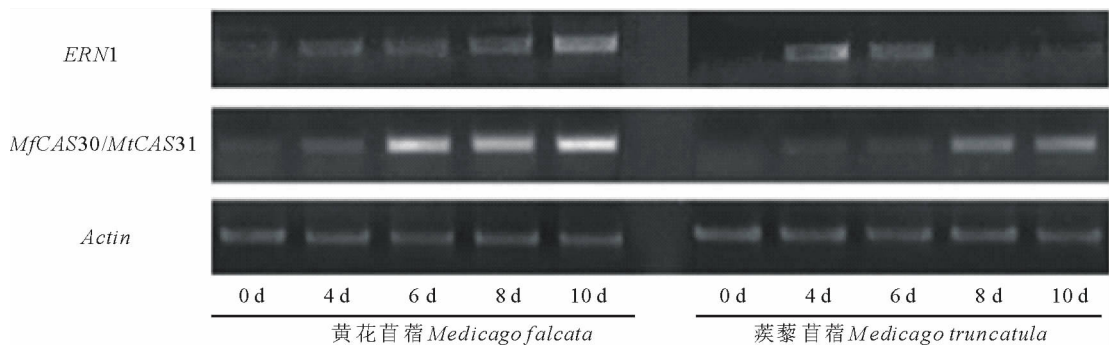


图3 *ERN1* 和 *MfCAS30/MtCAS31* 在干旱胁迫下的表达水平

Fig. 3 The expression level of *ERN1* and *MfCAS30/MtCAS31* under drought stress

## 3 讨论

### 3.1 差减文库的构建

抑制性差减杂交技术已广泛应用于筛选抗性基因的研究中,例如干旱<sup>[20,21]</sup>,低温<sup>[25]</sup>,盐<sup>[26]</sup>,高温<sup>[19]</sup>以及低磷<sup>[27]</sup>等。但是这些研究都是就1个物种进行差减文库的构建,而本研究平行构建黄花苜蓿和蒺藜苜蓿2个干旱相关的差减文库,不仅得到了各自干旱响应的基因,而且还可以通过2个文库的比较发现更加抵抗干旱胁迫的黄

花苜蓿中的特异基因。

### 3.2 差异基因的分析

通过比较黄花苜蓿和蒺藜苜蓿 EST 的 GO 分类,发现在细胞定位大类中的胞外区(extracellular region)和膜/内膜(membrane/enclosed lumen)是黄花苜蓿所特有的,这些基因编码的是细胞的组成部分,可能在干旱胁迫下对于稳定细胞结构起到了重要作用。在分子功能大类中黄花苜蓿的抗氧化活性(0.36%/0.17%)、分子传导活性(0.36%/0.17%)和转录调控活性(1.28%/0.71%)都比蒺藜苜蓿占的比例高,这可能有利于黄花苜蓿在干旱胁迫下感受信号,激活抗氧化系统,并且在基因转录水平上进行调控以应对干旱胁迫。生物功能大类中黄花苜蓿刺激响应(1.82%/1.06%)较蒺藜苜蓿高,表明黄花苜蓿受到胁迫后更易表达相应的基因以应对干旱。

KEGG 分析表明,干旱胁迫下黄花苜蓿的氨基酸代谢、碳水化合物代谢和能量代谢都比蒺藜苜蓿快速。黄花苜蓿氨基酸代谢加速也许是由于脯氨酸对干旱的响应造成的,而更加活跃的碳水化合物和能量的代谢不仅可以为黄花苜蓿在干旱胁迫下提供足够的能量,还可以提供植物其他代谢过程所必需的底物。这些变化都有利于黄花苜蓿可以在适度干旱的情况下保持正常的生长状态。

ERF 家族基因在植物抵抗生物胁迫和非生物胁迫过程中起到重要的作用,如调节与植物生物胁迫有关的 PR 基因和 *rd29A*, *rd17* 等植物的非生物胁迫有关的基因表达<sup>[28-30]</sup>。超表达苜蓿 ERF 家族的 WXP1 基因可以增强植物对干旱的抗性<sup>[17]</sup>。*MtERN1* 最早被发现对苜蓿根瘤的发育具有重要作用<sup>[31]</sup>,本研究发现该基因也响应干旱胁迫,预测对抵抗干旱胁迫也具有一定的作用。但是 2 种苜蓿的表达模式不尽相同(图 3),蒺藜苜蓿在受到较轻的干旱胁迫时便已经大量表达,黄花苜蓿此时也开始上调表达,但是上调倍数较蒺藜苜蓿小,可能是因为蒺藜苜蓿对干旱胁迫更加敏感。随着干旱的加剧,黄花苜蓿该基因表达量不断上调,而蒺藜苜蓿却出现下降的趋势。黄花苜蓿该基因在较强干旱胁迫的条件下仍能保持较高的表达量,这可能有助于增强其对干旱的抵抗能力。

脱水素属于胚胎发育晚期丰富蛋白的 DII 家族,在植物中普遍存在,其表达受到干旱、低温、盐和外界 ABA 等的诱导<sup>[32]</sup>。黄花苜蓿中的 *MfCAS30* 和蒺藜苜蓿中的 *MtCAS31* 是一对同源脱水素蛋白,最早发现受低温诱导,并且 *MfCAS30* 在黄花苜蓿中为多拷贝,而 *MtCAS31* 在蒺藜苜蓿中为单拷贝,再加之 *MfCAS30* 上游存在多个识别低温信号的 CRT/DRE 元件,使得 *MfCAS30* 在受到低温胁迫时能够更快更多的表达<sup>[7]</sup>。这 2 个基因都能受水分胁迫的诱导而大量表达,而且趋势与低温胁迫下相似,都是 *MfCAS30* 受胁迫诱导早且表达量高。已将该基因进行拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和苜蓿的遗传转化,以进一步研究其在非生物胁迫下的功能。

### 参考文献:

- [1] Boyer J S. Plant productivity and environment[J]. Science, 1982, 218: 443-448.
- [2] 山仑, 黄占斌, 张岁岐. 节水农业[M]. 北京:清华大学出版社和暨南大学出版社, 2000: 12-13.
- [3] 陶岩. 中国东北地区天然草地中豆科植物的分布规律研究[D]. 长春:东北师范大学, 2005.
- [4] 温都苏, 阿拉塔, 于斌. 内蒙古野生苜蓿种质资源及其开发利用前景[J]. 畜牧与饲料科学, 2004, 25(6): 72-74.
- [5] 景艳霞, 袁庆华. NaCl 胁迫对苜蓿幼苗生长及不同器官中盐离子分布的影响[J]. 草业学报, 2011, 20(2): 134-139.
- [6] 刘晓静, 郝凤, 张德罡, 等. 抗冻基因 *CBF<sub>2</sub>* 表达载体构建及转化紫花苜蓿的研究[J]. 草业学报, 2011, 20(2): 193-200.
- [7] Pennycooke J C, Cheng H, Stockinger E J. Comparative genomic sequence and expression analyses of *Medicago truncatula* and alfalfa subspecies *falcata* COLD-ACCLIMATION-SPECIFIC genes[J]. Plant Physiology, 2008, 146: 1242-1254.
- [8] Zhang L L, Zhao M G, Tian Q Y, et al. Comparative studies on tolerance of *Medicago truncatula* and *Medicago falcata* to freezing[J]. Planta, 2011, 234: 445-457.
- [9] Li Y S, Gao Y, Tian Q Y, et al. Stimulation of root acid phosphatase by phosphorus deficiency is regulated by ethylene in *Medicago falcata*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2011, 71: 114-120.
- [10] Li Y S, Mao X T, Tian Q Y, et al. Phosphorus deficiency-induced reduction in root hydraulic conductivity is mediated by ethylene in *Medicago falcata*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 67: 172-177.

- [11] 高艳, 田秋英, 石凤翎, 等. 黄花苜蓿与蒺藜苜蓿对土壤低磷胁迫适应策略的比较研究[J]. 植物生态学报, 2011, 35(6): 632-640.
- [12] 吕世杰. 黄花苜蓿抗旱、耐盐生理特性及其抗性机理的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- [13] Cook D R. *Medicago truncatula* — a model in the making! Commentary[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2: 301-304.
- [14] Zhang J Y, Broeckling C D, Blancaflor E B, *et al.* Overexpression of *WXP1*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Plant Journal, 2005, 42: 689-707.
- [15] 魏臻武, 盖钧镒. 豆科模式植物——蒺藜苜蓿[J]. 草业学报, 2008, 17(1): 114-120.
- [16] Wang T Z, Chen L, Zhao M G, *et al.* Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 367.
- [17] Diatchenko L, Chrislau Y F, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probe[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93: 6025-6030.
- [18] Puckette M, Peal L, Steele J, *et al.* Ozone responsive genes in *Medicago truncatula*: Analysis by suppression subtraction hybridization[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166: 1284-1295.
- [19] 韩明鹏, 王彦华, 高永, 等. 高温胁迫下紫花苜蓿抑制消减文库的构建[J]. 草业学报, 2011, 20(5): 126-132.
- [20] Zheng J, Zhao J F, Tao Y Z, *et al.* Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55: 807-823.
- [21] Wang H G, Zhang H L, Gao F H, *et al.* Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115: 1109-1126.
- [22] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25: 25-29.
- [23] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28: 27-30.
- [24] Zhou C, Han L, Pislariu C, *et al.* From model to crop: functional analysis of a STAY-GREEN gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for Alfalfa improvement[J]. Plant Physiology, 2011, 157: 1483-1496.
- [25] 张党权, 明付焕, 江平, 等. 绵毛优若藜冷诱导 SSH 文库构建研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2000, 30(2): 65-69.
- [26] 叶武威, 赵云雷, 王俊娟, 等. 盐胁迫下陆地棉耐盐品种根系的抑制消减文库构建[J]. 棉花学报, 2009, 21(5): 339-345.
- [27] 张俊红. 低磷胁迫大豆 SSH 文库构建与分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2001.
- [28] Ohmetakagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element[J]. Plant Cell, 1995, 7: 173-182.
- [29] Zhou J, Tang X, Martin G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes[J]. EMBO Journal, 1997, 16: 3207-3232.
- [30] 刘强, 赵南明. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 11-16.
- [31] Middleton P H, Jakab J, Penmetsa R V, *et al.* An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for nod factor signal transduction[J]. Plant Cell, 2007, 19: 1221-1234.
- [32] 刘广宇, 魏令波, 陈吉龙, 等. 植物脱水素研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(2): 24-28.

**Construction and analyses of two suppression subtractive hybridization libraries of*****Medicago falcata* and *Medicago truncatula* under drought stress**

WANG Tian-zuo, ZHAO Min-gui, ZHANG Wen-hao

(State Key Laboratory of Vegetation and Environmental Change, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** Drought is one of the commonest abiotic stresses for plant growth and development. Understanding the mechanisms underlying the tolerance of plants to drought stress is of critical importance for the improvement of plant drought tolerance. Suppression subtractive hybridization (SSH) is a useful tool to identify genes that are differentially expressed. In this study, two cDNA libraries from the leguminous plants *Medicago falcata* and *M. truncatula* were constructed and sequenced. The sequences of the two cDNA libraries were classified by GO and KEGG, and the differential expression was analyzed. The number of genes associated with drought resistance was greater in *M. falcata* than in *M. truncatula*. The expression levels of the two genes were positively correlated with the tolerance of the two species to drought stress and were higher in *M. falcata* than in *M. truncatula*. These results may provide a molecular explanation for some of the greater tolerance to drought stress of *M. falcata* than *M. truncatula*.

**Key words:** *Medicago falcata*; *Medicago truncatula*; drought stress; suppression subtractive hybridization (SSH)