



# 大豆 *Glyma. 05G222700. 2* 基因生物信息学与逆境表达分析

刘 晨,魏雅婷,于月华,倪志勇

(新疆农业大学 农学院,新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘 要:**为研究 *Glyma. 05G222700. 2* 基因编码的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在抗非生物胁迫过程的功能和原理,促进大豆抗逆候选基因的开发利用,本研究通过生物信息学方法对大豆 *Glyma. 05G222700. 2* 基因进行同源序列、蛋白结构、进化树和转录组分析,通过 qRT-PCR 分析盐胁迫下大豆不同组织中该基因的表达情况。结果表明:该基因编码区长 2 040 bp,编码 697 个氨基酸,预测分子量为 656. 54 kD,pI8. 026。多序列比对发现 *Glyma. 05G222700. 2* 蛋白包含 1 个 Pkinase 结构域。进化树分析表明该蛋白与野大豆、刺毛黧豆、赤豆一致性较高。转录组数据表明 *Glyma. 05G222700. 2* 基因在大豆各组织中均有表达,其中在种子中表达量最高,在根中表达量最低。qRT-PCR 结果发现 *Glyma. 05G222700. 2* 基因在毛状根、茎、叶中均有表达,在茎中表达量最高,在叶中表达量最低;在毛状根中盐胁迫 12 h 表达量达到极值,盐胁迫 24 h 表达量下降;在茎中表达量呈上升趋势,在 24 h 表达量达到极值;在叶中表达量不稳定,盐胁迫 2 h 该基因不表达,盐胁迫 6 h 该基因表达量达到极值并高于对照,盐胁迫 12 和 24 h 表达量低于对照。推断该基因可能在大豆抵抗盐胁迫过程中起到重要作用。

**关键词:**大豆; *Glyma. 05G222700. 2*; 生物信息学; qRT-PCR; 盐胁迫

## Bioinformatics and Expression Analysis Under Stress of Soybean *Glyma. 05g222700. 2* Gene

LIU Chen, WEI Ya-ting, YU Yue-hua, NI Zhi-yong

(College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** In order to study the function and principle of serine/threonine protein kinase encoded by *Glyma. 05g222700. 2* in the process of abiotic stress resistance, and promote the development and utilization of soybean stress resistant candidate genes, this study carried out the homology sequence, protein structure, phylogenetic tree and transcriptome analysis of soybean *Glyma. 05G222700. 2* gene by bioinformatics method, and analyzed the expression in different tissues of soybean with qRT-PCR under salt stress. The results showed that the coding region of this gene was 2 040 bp, encoding 697 amino acids, with predicted molecular weight of 656. 54 kD and pI8. 026. Multiple sequence alignment revealed that the *Glyma. 05G222700. 2* protein contained a Pkinase domain. Phylogenetic tree analysis showed that the protein had high consistency with wild soybean, mucuna, and red bean. Transcriptome data showed that the *Glyma. 05G222700. 2* gene was expressed in various tissues of soybean, among which the expression level was the highest in seeds and the lowest in roots. Fluorescence quantitative PCR results showed that the *Glyma. 05G222700. 2* gene was expressed in hairy roots, stems, and leaves under salt stress, with the highest expression in the stem and the lowest expression in the leaves. In the hairy roots, the expression reached the maximum at 12 h, and decreased at 24 h. The expression level in the stem increased and reached the maximum at 24 h. The expression of the gene was not stable in the leaves, and it didn't express in the leaves for 2 h under salt stress. The expression of the leaves reached the extreme value at 6 h under salt stress and was higher than that of the control, and the expression under salt stress was lower than that of the control at 12 and 24 h. It is inferred that this gene may play an important role in the resistance of soybean to salt stress.

**Keywords:** Soybean; *Glyma. 05G222700. 2*; Bioinformatics; qRT-PCR; Salt stress

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinase, STPK) 属于蛋白激酶中的一类,在生命活动过程中扮演着重要角色,它可以催化多种功能蛋白的磷酸化,如受体、调节蛋白、酶、核内蛋白等,

收稿日期:2020-02-27

基金项目:国家自然科学基金 (31860295, 31660295); 天山青年计划 (2018Q018, 2018Q002); 新疆农业大学校级大学生创新项目 (dxscx2020040)。

第一作者简介:刘晨 (1995-), 男,硕士,主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail:874287688@qq. com。

通讯作者:于月华 (1981-), 女,博士,高级实验师,主要从事作物抗逆分子育种研究。E-mail:yuyuehua1213@sina. com。

从而进一步调节细胞的多种生命活动<sup>[1]</sup>。近年来研究发现多种植物的耐盐性与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶有关<sup>[2]</sup>。因此,对于在盐胁迫下植物产生的应答反应,与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的相关性研究具有重要意义。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶最重要的功能是参与环境胁迫信号转导<sup>[3]</sup>。研究表明,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在植物受到非生物胁迫过程中起到了非常重要的作用<sup>[4]</sup>。花生在受到寒冷和盐胁迫下,自身应答过程中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶起着关键作用<sup>[5]</sup>。在拟南芥中已发现丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族 57 个成员,其中参与拟南芥盐胁迫、高渗胁迫、寒冷和热胁迫应答过程的有 23 个<sup>[6]</sup>。拟南芥的 *AtLecRK2* 基因属于植物 RLK 家族,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,并参与盐胁迫反应<sup>[7]</sup>。盐藻具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶功能的 *DSsTpK* 基因的表达在转录水平上受盐胁迫诱导<sup>[8]</sup>。*gma-miR4359b* 是大豆的非保守 miRNA<sup>[9]</sup>,许硕<sup>[10]</sup>利用 Solexa 高通量测序方法发现 *gma-miR4359b* 在盐胁迫下呈上调表达。Hai 等<sup>[11]</sup>也通过表达量分析发现 *gma-miR4359b* 在干旱、盐、碱胁迫下均上调表达。*Glyma. 05G222700. 2* 基因是 *gma-miR4359b* 预测得分最低的靶基因,并且具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶功能<sup>[12]</sup>,可能在大豆抵抗非生物胁迫过程中起到重要作用。本研究对 *Glyma. 05G222700. 2* 基因进行生物信息学与 qPT-PCR 分析,为进一步研究该基因的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆栽培材料为 Williams 82,由中国农业科学院作物科学研究所作物种质资源中心抗逆研究课题组所提供。

cDNA 第一链合成试剂盒、TRizol、qRT-PCR 试剂盒均订购于天根生化有限公司。

在数据库 Phytozome V 12. 1 (<http://www.phytozome.net/soybean.php>)<sup>[13]</sup> 搜索得到 *Glyma. 05G222700. 2* 基因序列。从 GenBank 上下载野大豆 (*Glycine soja*)、刺毛黧豆 (*Mucuna pruriens*)、木豆 (*Cajanus cajan*)、赤豆 (*Vigna angularis*) 等 CDS 区氨基酸序列,并与 *Glyma. 05G222700. 2* 基因 CDS 区进行同源性分析。

1.2 试验设计

挑选饱满均一的 Williams 82 籽粒在营养土中培养 20 d 后将营养土洗净,放入水中培养 5 d,再将大豆苗移入含有 250 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 的 Hoagland

营养液中分别处理 0,2,6,12 和 24 h,采集处理后的大豆叶片、茎与毛状根组织,每个时间段 3 个生物学重复。将取好的植物组织材料用锡纸包好,用液氮快速冷冻,保存于 -80 ℃ 冰箱,用于总 RNA 提取,qRT-PCR 分析组织特异性表达情况和盐胁迫不同时间 *Glyma. 05G222700. 2* 基因的表达变化情况。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件分析 *Glyma. 05G222700. 2* 基因的碱基组成、键能、等电点及蛋白质分子量等。利用 DNAMAN 软件与 MEGA 软件构建系统进化树<sup>[14]</sup>。利用 Predictprotein ([hops://open.predictprotein.org/](http://open.predictprotein.org/))<sup>[15]</sup> 与 SWISS-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>)<sup>[16]</sup> 在线软件预测 *Glyma. 05G222700. 2* 基因编码蛋白质的二级与三级结构进行。通过 Phytozome V 12. 1 在线软件预测 *Glyma. 05G222700. 2* 基因的组织特异性表达情况,并明确该基因在染色体上的定位。

1.3.2 总 RNA 提取 采用 TRizol 法<sup>[17]</sup> 提取大豆各组织样本的总 RNA。

1.3.3 cDNA 合成 利用天根生化有限公司的 FastKing RT Kit (With gDNase) FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)合成总 RNA 的 cDNA。

1.3.4 qRT-PCR 根据植物数据库 Phytozome V 12. 1 中的 *Glyma. 05G222700. 2* 基因序列,采用 DNAMAN 6. 0 软件设计 qRT-PCR 引物 05G222700. 2-F: 5'-TTGAAAATAATGGGCC-3' 和 05G222700. 2-R: 5'-AACCCATCTCAGACCTCG-3',扩增目的片段长度为 159 bp。参照倪志勇<sup>[17]</sup> 的反应体系和方法检测每份样品目的基因相对表达量,3 次重复。

1.4 数据分析

采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[17]</sup> 分析基因的表达水平,利用 GraphPad Prism 5 软件处理数据。

2 结果与分析

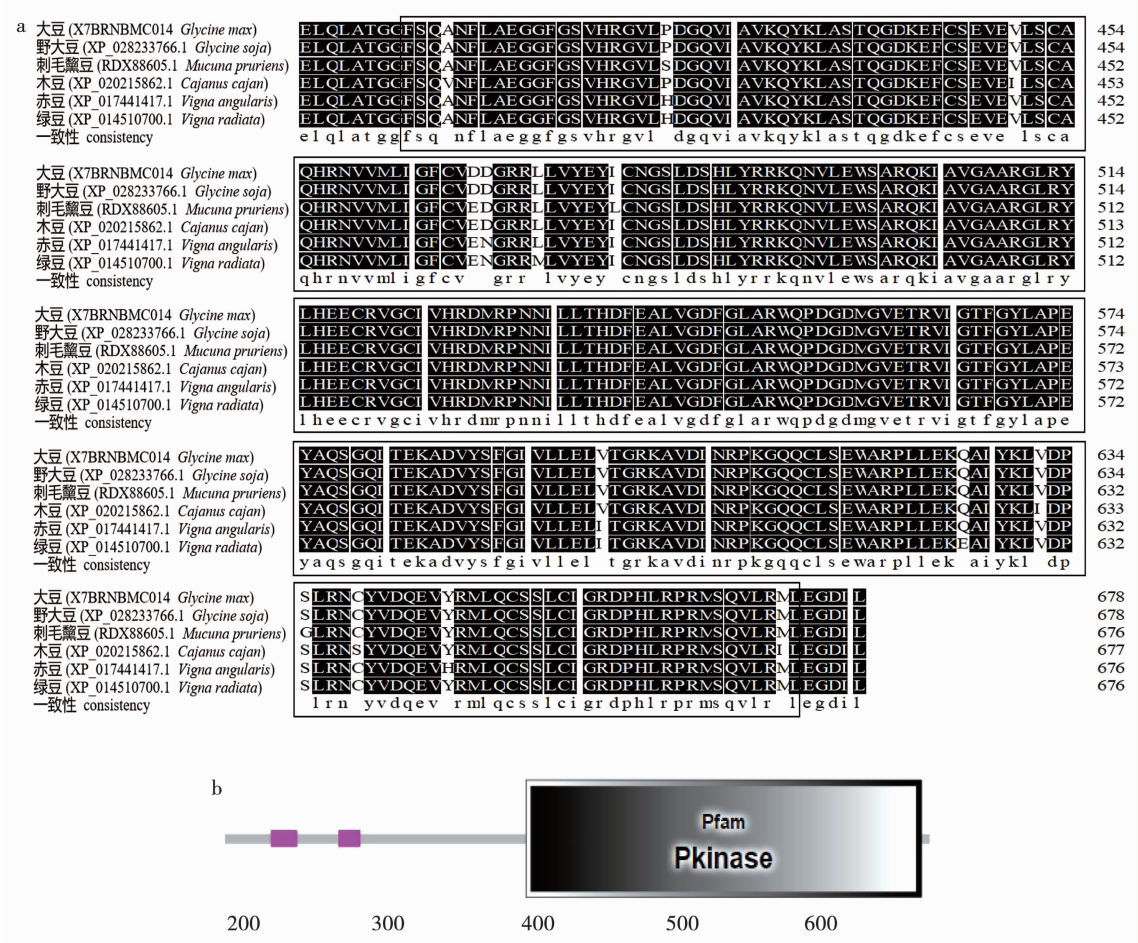
2.1 *Glyma. 05G222700. 2* 基因序列分析

分析得出 *Glyma. 05G222700. 2* 基因序列 4 832 bp,其中包括编码区长 2 040 bp,编码 697 个氨基酸,被定位于大豆 5 号染色体正向序列上,物理位置为 40205561 ~ 40214256。编码区包括 592 个碱基 A (29. 2%)、568 个碱基 T (27. 84%)、489 个碱基 G (23. 97%) 和 391 个碱基 C (19. 17%),分子量为 656. 54 kD,pI8. 026。

编码 697 个氨基酸,包括 82 种强碱性(+)氨基酸(K、R)、76 种强酸性(-)氨基酸(D、E)、225

种疏水性氨基酸 (A、I、L、F、W、V) 和 190 种极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)。在氨基酸序列 403 ~ 637 位置处与野大豆(XP\_028233766. 1 *Cajanus soja*)、刺毛黧豆 (RDX88605. 1 *Mucuna pruriens*)、木豆 (XP\_020215862. 1 *Cajanus cajan*)、赤豆 (XP\_017441417. 1 *Vigna angularis*)、木豆 (XP\_020215862. 1 *Cajanus cajan*)、赤豆 (XP\_017441417. 1

*Vigna angularis*) 和绿豆 (XP\_014510700. 1 *Vigna radiata*) 具有相似 Pkinase 蛋白结构域,一致性分别为 99. 85%、94. 55%、93. 68%、93. 37% 和 92. 68%。在 248 ~ 274、275 ~ 290 位置处存在 2 个低复杂度区域 (图 1)。



方框表示 Pkinase 结构域。  
Boxes indicate Pkinase domain.

图 1 大豆 *Glyma. 05G222700. 2* 蛋白与其它植物蛋白的同源性比对 (a) 及其结构域预测 (b)  
Fig. 1 Homologous comparison of *Glyma. 05G222700. 2* protein with other plant proteins (a) and its domain prediction (b)

系统进化树分析发现 *Glyma. 05G222700. 2* 与野大豆 (XP\_028233766. 1 *Cajanus soja*) 聚集在同一分支上,两者的一致性为 96%,与刺毛黧豆 (RDX88605. 1 *Mucuna pruriens*) 一致性为 94. 55%、与赤豆 (XP\_017441417. 1 *Vigna angularis*) 一致性为 93. 68% (图 2)。

2. 2 *Glyma. 05G222700. 2* 蛋白结构预测

*Glyma. 05G222700. 2* 蛋白由 26. 95% 的  $\alpha$ -阿尔法螺旋 ( $\alpha$ -helices)、21. 5% 延伸链 (extended strand)、51. 55% 的无规则卷曲 (random coil) 构成。

推测无规则卷曲是 *Glyma. 05G222700. 2* 最大量的二级结构原件,而  $\alpha$ -螺旋和延伸链散布于整个蛋白中 (图 3)。

2. 3 *Glyma. 05G222700. 2* 基因组织特异性表达预测与检测

预测分析结果表明:*Glyma. 05G222700. 2* 基因在大豆植物组织各部分均有表达。*Glyma. 05G222700. 2* 基因在种子中表达量最高,其次为芽中,表达量最低的部位是根 (图 4)。

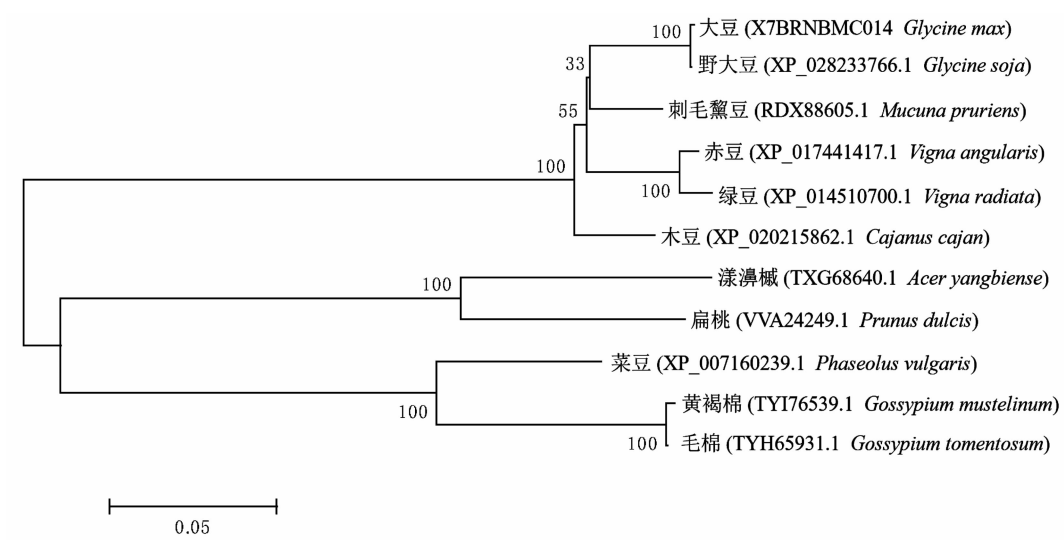
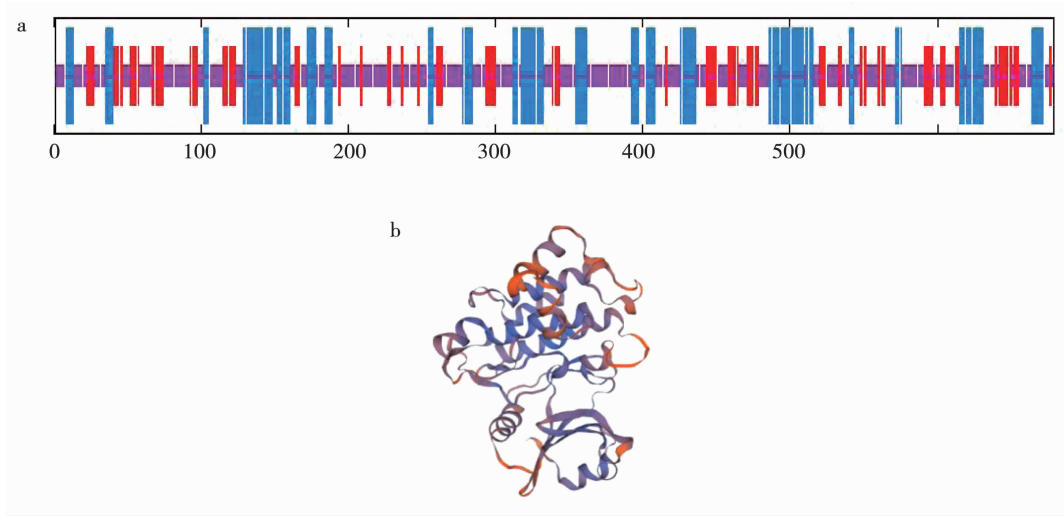


图2 Glyma.05G222700.2 蛋白与其同源蛋白系统进化树分析  
Fig.2 Phylogenetic tree analysis of Glyma.05G222700.2 protein and the homologous proteins



蓝色:α-螺旋; 红色:延长链; 橙色:随机线圈。  
Blue; α-helix; Red; Extension chain; Orange; Random coil.

图3 大豆 Glyma.05G222700.2 蛋白质二级结构(a)及三级结构(b)预测  
Fig.3 Secondary structure(a) and tertiary structure(b) prediction of soybean Glyma.05G222700.2 protein

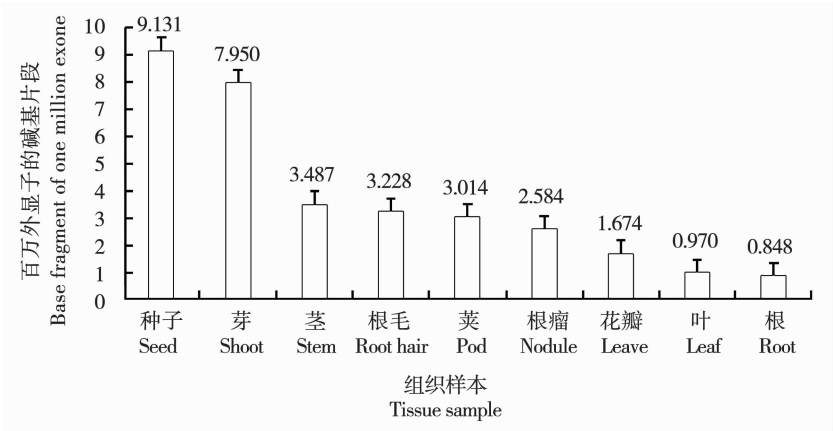
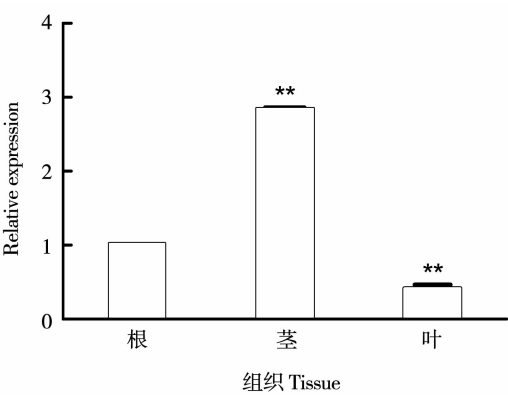


图4 不同组织中 Glyma.05G222700.2 基因表达模式  
Fig.4 Glyma.05G222700.2 gene expression pattern in different tissues

qRT-PCR 结果表明: *Glyma. 05G222700. 2* 基因在大豆毛状根、茎、叶中均有表达,在茎中的表达量最高,在叶中表达量最低(图 5),与表达量预测分析结果趋势相同。*Glyma. 05G222700. 2* 基因在不同组织中的不同表达量暗示该基因可能对大豆组织发育进行调控。

2.4 *Glyma. 05G222700. 2* 基因在盐胁迫下的表达量分析

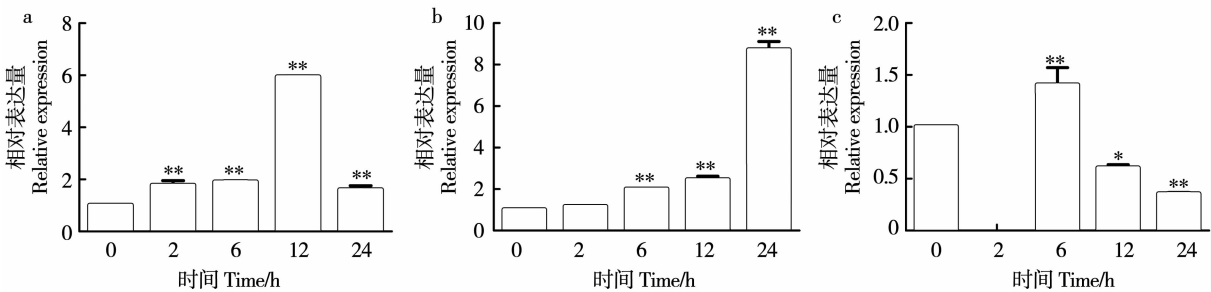
qRT-PCR 检测盐胁迫下基因表达情况表明: *Glyma. 05G222700. 2* 基因在毛状根中表达量随胁迫时间的延长而升高,胁迫 12 h 表达量达到最高,胁迫 24 h 时表达量下降(图 6a);在茎中随胁迫时间延长表达量随之升高,在 24 h 时达到最高(图 6b);在叶中表达量不稳定,胁迫 2 h 该基因不表达,胁迫 6 h 该基因表达量达到最高,随胁迫时间延长表达量随之降低(图 6c)。结果表明 *Glyma. 05G222700. 2* 基因受盐胁迫诱导表达,不同组织的表达规律存在差异,该基因可能参与调控盐胁迫应答。



\* 和 \*\* 分别表示  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平存在显著和极显著差异。下同。  
\* and \*\* mean significant or extremely significant difference at  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  level respectively. The same below.

图 5 *Glyma. 05G222700. 2* 基因在大豆不同组织中表达量分析

Fig. 5 *Glyma. 05G222700. 2* gene expression analysis in different tissues of soybean



a: 毛状根组织; b: 茎组织; c: 叶组织。  
a: Hairy roots tissue; b: Stem tissue; c: Leaf tissue.

图 6 NaCl 胁迫后 *Glyma. 05G222700. 2* 基因在不同组织中表达量变化分析

Fig. 6 Analysis of *Glyma. 05G222700. 2* gene expression in different tissues of soybean under NaCl stress

3 讨论

植物细胞的丝氨酸/苏氨酸激酶在蛋白质网络中起着“中央处理器”的作用,该激酶能感知环境条件、分析植物激素和其它外部因素受体的输入信息,并将其转换为适当的输出信息,例如代谢、基因表达以及细胞生长和分裂的变化<sup>[18]</sup>。蛋白激酶在植物的生长发育和抵抗非生物胁迫反应中发挥着重要作用<sup>[19]</sup>。Xiao 等<sup>[20]</sup>通过微阵列分析,确定 *GsSRK* 为碱性 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 应答基因,具有高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域,并通过同源克隆方法从大豆中分离得到 *GsSRK*。CDPKs 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,水稻的 *OsCDPK7* 基因在受到低温与盐胁迫时,在茎与根 2 个组织当中超量表达,*OsCDPK7* 基因参与水稻的低温、盐胁迫反映信号转导<sup>[21]</sup>。许硕<sup>[10]</sup>研究发现 *gma-miR4359b* 在大豆盐胁迫下差异表达,本研究通过生物信息学方法对被预测为 *gma-miR4359b* 靶基因的 *Glyma.*

*05G222700. 2* 基因进行分析,序列分析表明该基因编码 697 个氨基酸,在氨基酸序列中 403 ~ 637 bp 位置处为 Pkinase 蛋白结构域,在 248 ~ 274 bp 和 275 ~ 290 bp 位置处存在 2 个低复杂度区域,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶功能结构域。系统进化树分析发现与 *Glyma. 05G222700. 2* 蛋白亲缘较近的有野大豆 XP\_028233766. 1 蛋白(96%)、刺毛黧 RDX88605. 1 蛋白(94. 55%)、赤豆 XP\_017441417. 1 蛋白(93. 68%),这些同源蛋白均含有 Pkinase 蛋白结构域,表明这些蛋白的编码基因具有保守结构。

Xiao 等<sup>[20]</sup>研究编码具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶功能蛋白的大豆 *GsSRK* 基因,干旱和盐胁迫处理 0. 5 h 时叶片和根系的 *GsSRK* 表达量都增加,1 h 达到最大水平,处理后 3 ~ 6 h 下降,表明 *GsSRK* 可能参与盐、干旱等渗透胁迫信号转导。Hao 等<sup>[22]</sup>分析发现 *OsMAPK2* 基因在所有植物器官中都有表达,在受到低温胁迫时 *OsMAPK2* 表达量明显上升,表明该基因在水稻发育过程中起作用。本研究通过植物数

数据库 Phytozome V 12.1 分析发现 *Glyma. 05G222700. 2* 基因在大豆多个组织中均表达,在种子中表达量最高,其次为芽中,表达量最低的部位是根。qRT-PCR 分析发现在毛状根、茎、叶中 *Glyma. 05G222700. 2* 基因均表达,并对大豆进行 NaCl 胁迫 0 ~ 24 h, qRT-PCR 分析发现随胁迫时间的变化,基因表达量随之变化,由此可以推断 *Glyma. 05G222700. 2* 基因可能是 *gma-miR4359b* 调控的靶基因,在大豆抵抗盐胁迫过程中起到重要作用。本研究对 *Glyma. 05G222700. 2* 基因的研究提供理论基础, *gma-miR4359b* 基因与 *Glyma. 05G222700. 2* 基因二者的关系需要进一步的研究证明。

4 结 论

*Glyma. 05G222700. 2* 基因序列长度为4 832 bp, 其中包括编码区长2 040 bp, 编码 697 个氨基酸, 定位在大豆 5 号染色体正向 40205561 ~ 40214256 上。氨基酸序列 403 ~ 637 位置处为 Pkinase 蛋白结构域,与野大豆、刺毛黧豆等具有亲缘关系相近的基因,且均含有 Pkinase 蛋白结构域,表明这些基因具有保守的基因结构。*Glyma. 05G222700. 2* 在大豆毛状根、茎、叶中均有表达,在茎中的表达量最高,在叶中表达量最低。该基因的表达量随 NaCl 胁迫时间的变化而改变,推断 *Glyma. 05G222700. 2* 基因可能在植物抵抗盐胁迫过程中起到重要作用。

参考文献

[1] Sébastien P, Faucher, Charles V, et al. The *prpZ* gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in salmonella enterica serovar Typhi survival in human macrophages [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 281(2): 160-166.

[2] Franz S, Ehlert B, Liese A, et al. Calcium-dependent protein kinase *CPK21* functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Plant, 2011, 4(1): 83-96.

[3] Schenk P W, Snaar B E. Signal perception and transduction: The role of protein kinases [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1999, 1449(1): 1-24.

[4] Ferreira P C G, Hemerly A S, Villarreal R, et al. The *Arabidopsis* functional homolog of the p34 cdc2 protein kinase[J]. The Plant Cell, 1991, 3(5): 531-540.

[5] Rudrabhatla P. Developmentally regulated dual-specificity kinase from peanut that is induced by abiotic stresses [J]. Plant Physiology, 2002, 130(1): 380-390.

[6] Rudrabhatla P, Reddy M M, Rajasekharan R. Genome-wide analysis and experimentation of plant Serine/Threonine/Tyrosine specific protein kinases [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60(2): 293-319.

[7] He X J, Zhang Z G, Yan D Q, et al. A salt-responsive receptor-like kinase gene regulated by the ethylene signaling pathway encodes a plasma membrane serine/threonine kinase [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(2): 377-383.

[8] 陶晓迎, 柴晓杰, 薛飞, 等. 盐藻丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因 *DsSTPK* 的克隆、原核表达及纯化[J]. 中国农学通报, 2014, 30(2): 45-49. ( Tao X Y, Chai X J, Xue F, et al. Cloning, prokaryotic expression and purification of the dhalostem Serine/Threonine protein kinase gene *DsSTPK* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(2): 45-49. )

[9] Hartley J L, Temple G F, Brash M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination [J]. Genome Research, 2000, 10(11): 1788-1795.

[10] 许硕. 野生大豆盐胁迫相关 microRNA 的功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011: 1-56. ( Xu S. Functional analysis of microRNA related to salt stress in wild soybeans[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011: 1-56. )

[11] Hai Y L, Yuan Y D, Hai L Y, et al. Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 1-12.

[12] 刘晨, 唐洁, 王怡, 等. 大豆 *gma-miR4359b* 生物信息学分析及植物表达载体构建[J/OL]. 分子植物育种: 1-8. [2020-06-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20191021.1710.004.html>. ( Liu C, Tang J, Wang Y, et al. Bioinformatics analysis of soybean *gma-miR4359b* and construction of plant expression vector [J]. Molecular Plant Breeding: 1-8. [2020-06-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20191021.1710.004.html>. )

[13] Goodstein D M, Shu S, Howson R, et al. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 40(1): 78-86.

[14] 王萍, 于月华, 白玉翠, 等. 大豆 *GmNAC23* 基因的克隆及特征分析[J]. 华北农学报, 2019, 34(1): 50-57. ( Wang P, Yu Y H, Bai Y C, et al. Cloning and characterization of soybean *GmNAC23* gene [J]. Journal of North China Agriculture, 2019, 34(1): 50-57. )

[15] Kaján L, Yachdav G, Vicedo E, et al. Cloud prediction of protein structure and function with Predict Protein for debian [J]. Biomed Research International, 2013: 398968.

[16] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W): 252-258.

[17] 倪志勇. 大豆抗逆相关 *miR169c* 及其靶位点 *GmNFYA3* 和 *miR394a* 的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 1-89. ( Ni Z Y. Functional study of soybean stress resistance related *miR169c* and its target sites *GmNFYA3* and *miR394a* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013: 1-89. )

[18] Hardie D G. Plant protein Serine/Threonine kinase: Classification and functions [J]. Annual Review of Plant Biology, 1999, 50(50): 97-131.

[19] Dombrowski J E, Martin R C, et al. Abiotic stresses activate a MAP kinase in the model grass species *lolium temulentum* [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(9): 915-919.

[20] Xiao L S, Qing Y Y, Li L T, et al. GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like Serine/Threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 176: 505-515.

[21] Yusuke S, Shingo H, Jen S, et al. cDNA cloning and prokaryotic expression of maize calcium-dependent protein kinases [J]. Biochimica Et Biophysica Acta Gene Structure and Expression, 1997, 1350(2): 109-114.

[22] Hao J H, Shin F F, Ying H T, et al. Expression of *Oryza sativa* MAP kinase gene is developmentally regulated and stress-responsive [J]. Physiologia Plantarum, 2002, 114(4): 572-580.