

芹菜韧皮部蛋白基因的分离与表达分析

马 静,王 枫,侯喜林,蒋 倩,李梦瑶,施 忆,熊爱生

(南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,南京 210095)

摘要:韧皮部蛋白在维持植物形态、物质转运以及植物伤口保护等方面起着重要作用。本研究以地域来源和性状特性差异均较大的2个芹菜品种六合黄心芹和美国西芹为试验材料,利用 RT-PCR 技术获得这2种芹菜韧皮部蛋白基因的 cDNA 序列。结果显示:这2种芹菜来源的韧皮部蛋白基因全长均为 546 bp,编码 181 个氨基酸。两者核苷酸序列有 3 个位点的不同,分别为:88G/A、399T/C 和 489T/C;在氨基酸序列上有 1 个位点的不同,为 30T/A。预测其蛋白质分子量为 19 kD,pI 值为 9.18。六合黄心芹和美国西芹的韧皮部蛋白与忽地笑等植物的韧皮部蛋白相似度较高,在保守位置分别具有 5 个亮氨酸残基和 4 个色氨酸残基。实时定量 PCR 表达分析表明,该基因主要在芹菜的茎和根等部位表达,具有明显的组织特异性。

关键字:芹菜;韧皮部蛋白;实时定量 PCR;基因克隆;表达分析

Isolation of Phloem Protein Gene and Expression Analysis in Celery

MA Jing, WANG Feng, HOU Xi-lin, JIANG Qian, LI Meng-yao, SHI Yi, XIONG Ai-sheng

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China /

State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement /

College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: The phloem proteins play important role in the maintenance of morphology, material transportation and wound protection in higher plant. Here, cDNA sequences of phloem protein were obtained using RT-PCR technology from two celery varieties Liu He Huang Xin Qin and Mei Guo Xi Qin. The full-length of the two phloem-protein genes were 546 bp, and encoded 181 amino acid residues, respectively. The nucleotide sequences alignment showed that there were 3 loci differences: 88G/A, 399T/C and 489T/C. The deduced amino acid sequences showed that there was 1 residue difference, 30T/A. Prediction of the proteins molecular weight were 19 kDa, and pI were 9.18, respectively. The P-proteins from Liu He Huang Xin Qin and Mei Guo Xi Qin have highly identity with *Lycoris aurea*. There were 5 leucine and 4 tryptophan amino acid residues in the conservative position, respectively. Real time RT-PCR analysis showed that the genes expression were tissue specificity, which mainly expressed in the stem and root.

Key words: *Apium graveolens*; Phloem protein; Quantitative real-time PCR; Gene cloning; Gene expression

芹菜(*Apium graveolens*)是伞形花科芹属植物,原产于地中海地区和中东。口感清脆爽口,具有药用价值,因此被誉为保健蔬菜,受到越来越多的种植者和消费者的喜爱^[1-2]。六合黄心芹是南京六合地区的优良地方品种,株型半直立,株高 60 cm 左右,抗逆性强,适应性广。美国西芹起源于美国,具有植

株高大,有光泽,品质脆嫩,抗病等特点,适宜冬春保护地及春秋露天栽培。

韧皮部蛋白(PP, phloem protein)是一种特殊的结合几丁质的凝集素^[2-4]。韧皮部蛋白的研究开展得较早,韧皮部蛋白在韧皮分泌物中的存在已经发现了较长时间,大多数植物韧皮部组织中韧皮部

收稿日期:2012-06-21 修回日期:2012-11-22 网络出版日期:2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1737.017.html>

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-11-0670);国家自然科学基金项目(31272175);江苏高校优势学科建设项目(2011PAPD);江苏省双创计划(2011JSSC)

作者简介:马静,硕士研究生,主要从事蔬菜分子生物学研究。E-mail: 2012104079@njau.edu.cn

通信作者:熊爱生,教授,博士生导师,研究方向为蔬菜分子遗传学。E-mail: Xiongaisheng@njau.edu.cn

蛋白的浓度一般都较低,通常维持在 0.3 ~ 2.2 mg/mL 水平^[5-8],但在南瓜属 (*Cucurbita maxima*) 植物韧皮部中浓度却很高,达到 110 mg/mL^[9-10]。葫芦科植物中,韧皮部蛋白主要有 2 种存在形式,即:PP1 和 PP2^[5,11-12]。从笋瓜 (*Cucurbita maxima*) 幼苗 cDNA 文库中克隆出一个编码 PP2 的 cDNA,通过原位杂交发现 PP2 的 mRNA 特异性地定位于韧皮部伴胞中,而免疫细胞化学定位则表明 PP2 蛋白分布于伴胞和筛管分子中^[12-14]。从西葫芦 (*Cucurbita pepo*) 的 cDNA 文库中筛选出一个编码 PP2 的 cDNA,该 cDNA 编码的蛋白与 D. E. Bostwick 等^[15]报道的笋瓜 PP2 蛋白只有 9 个氨基酸残基的差别,二者 cDNA 同源性及由 cDNA 推导的氨基酸同源性均高达 96%。分析南瓜属的几个不同品种,发现 PP2 是由一个小的基因家族(2 ~ 8 个基因)构成,PP2 的 mRNA 高度保守^[15-17]。

韧皮部蛋白在韧皮部中起多种作用,当韧皮部渗出液接触到空气时,它会在伤口部位和 PP1 氧化交叉相连的半胱氨酸残基结合形成一个密封的机械系统作为防护^[18-19]。此外,韧皮部蛋白还可以参与转运过程^[19-21],同时又为非转运的韧皮部组织提供可以固定的机械框架,在植物形态的维持、抵御外界物理伤害有很大的意义^[22-26]。由于韧皮部是植物体内转运糖等有机养料的组织,极有可能被病虫害侵害,近年来的研究表明,韧皮部蛋白在抗病方面也有较大的作用^[25,27-28]。

本研究分别以地域来源不同和性状特性差异较大的 2 个芹菜品种六合黄心芹和美国西芹为材料,从中分别克隆得到芹菜韧皮部蛋白基因,并对其进行较为详尽的分析。采用荧光定量 PCR 方法进行了组织特异表达研究,为更深入研究芹菜中韧皮部蛋白的功能和机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与植物材料

大肠杆菌菌株 DH5 α ,由本实验室保存;质粒载体 pMD18-T vector、PCR 聚合酶、各类限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司。植物材料六合黄心芹和美国西芹由本实验室保存,种植于南京农业大学园艺学院人工气候室和江浦实验农场。1 月龄植物幼嫩的叶片用于 RNA 的提取及 cDNA 的合成。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用 RNA simple Total RNA Kit (Tiangen 公司)试剂盒提取试验材料的总 RNA,再用 1.2% 的琼脂

糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。利用 Prime Script RT reagent Kit (大连 TaKaRa 公司)将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。cDNA 合成体系的总体积为 20 μ L,反应条件及过程为:总 RNA 和 50 μ mol/L Oligo (dT)18 混液于 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;然后加入 M-MLV 反转录酶 (200 U)、dNTP (10 mmol/L)、RNase 抑制剂 (40 U) (TaKaRa) 及灭菌的双蒸水,置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 60 min,最后于 70 $^{\circ}$ C 水浴变性 15 min。

1.3 芹菜韧皮部蛋白基因的克隆

根据旱芹 (*A. graveolens* var *dulce* (Mill.) Pers.) phloem protein (AY114139) 的 cDNA 序列作为六合黄心芹 (*A. graveolens* cv. Liu He Huang Xin Qin) 和美国西芹 (*A. graveolens* cv. Mei Guo Xi Qin) 韧皮部蛋白基因克隆引物设计参考序列,设计 1 对引物,上游 NRX21: 5'-ATGGCTCAACTGAAT-TCAAGTC-3',下游 NRX22: 5'-TCAACAACTGGCA-CAATCAC-3'。RT-PCR 为 20 μ L 反应体系:cDNA 1.5 μ L, *LA Taq* (5U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times *LA PCR Buffer II* (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP Mixture 1.5 μ L, ddH₂O 12 μ L, 引物都加 1 μ L, 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,然后按照 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 RT-PCR 产物。切胶、回收,将回收后的 PCR 产物与 T 载体 16 $^{\circ}$ C 下连接过夜。将重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 进行蓝白斑筛选。随后进行质粒的酶切与鉴定,将提取的质粒在 37 $^{\circ}$ C 下水浴酶切 3 h, 1.5% 琼脂糖电泳检测。将鉴定好的菌液送到南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.4 序列分析

采用 DNAMAN 软件对序列进行多重比较并构建分子系统进化树,然后用 MEGA5 对进化树进行测试和编辑并生成报告图形^[29]。蛋白质基本性质分析用 <http://www.expasy.org> 网站相关软件完成^[30]。采用 E. Gasteiger 等^[31]的方法,对植物中的韧皮部蛋白进行氨基酸组成成分及理化性质分析。

1.5 实时定量 PCR 反应

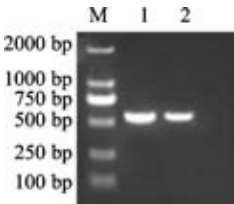
实时定量 PCR 采用 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒 (TaKaRa 公司),按照操作说明进行。相对定量使用参照基因的 ΔC_T 法,表达差异等于 $2^{-\Delta C_T}$, $\Delta C_T = C_{T_i}$ 目标基因 - $C_{T_{actin}}$ 。相对定量是基于处理和对照之间,目标基因对参考基因的表达量的比较^[32]。采用 7300

System software 和 ABI 7300 Real-time PCR System 完成荧光定量 PCR (Relative quantitative real-time RT-PCR)。以 ACTIN-F: 5'-CTTCCTGCCATATATGATTGG-3'和 ACTIN-R: 3'-GCCAGCACCTCGATCTTCATG-5' 为表达检测引物,用芹菜 *actin* 基因作为参考基因,与目标基因一起扩增。根据芹菜中扩增 *Phloem Protein* 基因序列分别设计表达检测上游引物 NXR79 为: 5'-ACCAGAGTGTGATGTTTCTG -3'和下游引物 NXR80 为: 3'-CTGTGACAAGTGCGAGCATT-5'。

2 结果与分析

2.1 芹菜韧皮部蛋白基因的克隆

分别以六合黄心芹和美国西芹 1 月龄植株幼嫩叶片的 cDNA 为模板,用 NRX21 和 NRX22 为引物,利用 RT-PCR 技术扩增,分别得到约 600 bp 扩增产物(图 1)。克隆后序列测定与分析表明,来源于六合黄心芹和美国西芹的韧皮部蛋白基因均含有一个 546 bp 的开放阅读框(ORF, open reading frame),编码 181 个氨基酸(图 2)。两者核苷酸水平上有 3 个碱基的差异,分别为第 88 位 G/A、399 位 C/T 和 489 位 C/T,编码的氨基酸有 1 个位点的差异,为 30 位的 T/A(图 2、图 3)。



M: marker; 1: 六合黄心芹; 2: 美国西芹

M: marker, 1: Liu He Huang Xin Qin, 2: Mei Guo Xi Qin

图 1 RT-PCR 克隆芹菜韧皮部蛋白基因

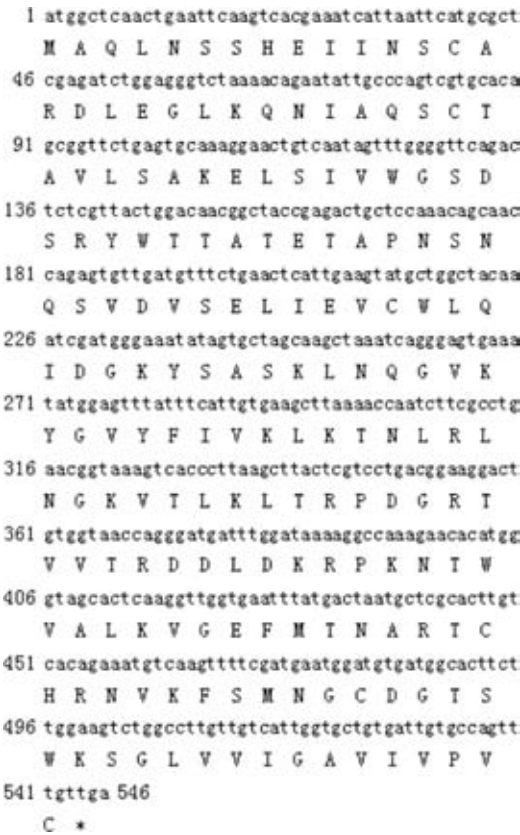
Fig. 1 Phloem protein gene from celery amplified by RT-PCR method

2.2 芹菜韧皮部蛋白基因的氨基酸序列分析

利用 BLAST 同源检索进行芹菜 P-protein 氨基酸保守序列的检测以及序列比对分析,结果显示忽地笑(*Lycoris aurea*)、冬瓜(*Benincasa hispida*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、大豆(*Glycine max*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、苹果(*Malus domestica*)、香瓜(*Cucumis melo*)、笋瓜(*Cucurbita maxima*)、金瓜(*Cucurbita digitata*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)和日

本南瓜(*Cucurbita argyrosperma*)等物种的 P-protein 或相似蛋白与本研究从芹菜中克隆的 Phloem Protein 相似度较高。其中,与忽地笑的相似度约为 39%。六合黄心芹的 P-protein 具有 PP2 保守结构域(图 3A)。将本试验中得到的六合黄心芹和美国西芹 P-protein 与上述植物中的 Phloem Protein 或相似氨基酸序列进行多重比对,结果显示上述韧皮部蛋白在保守位置有 5 个亮氨酸残基和 4 个色氨酸残基,另外,还有 1 个甘氨酸、1 个缬氨酸和 1 个缬氨酸残基完全保守(图 3B)。

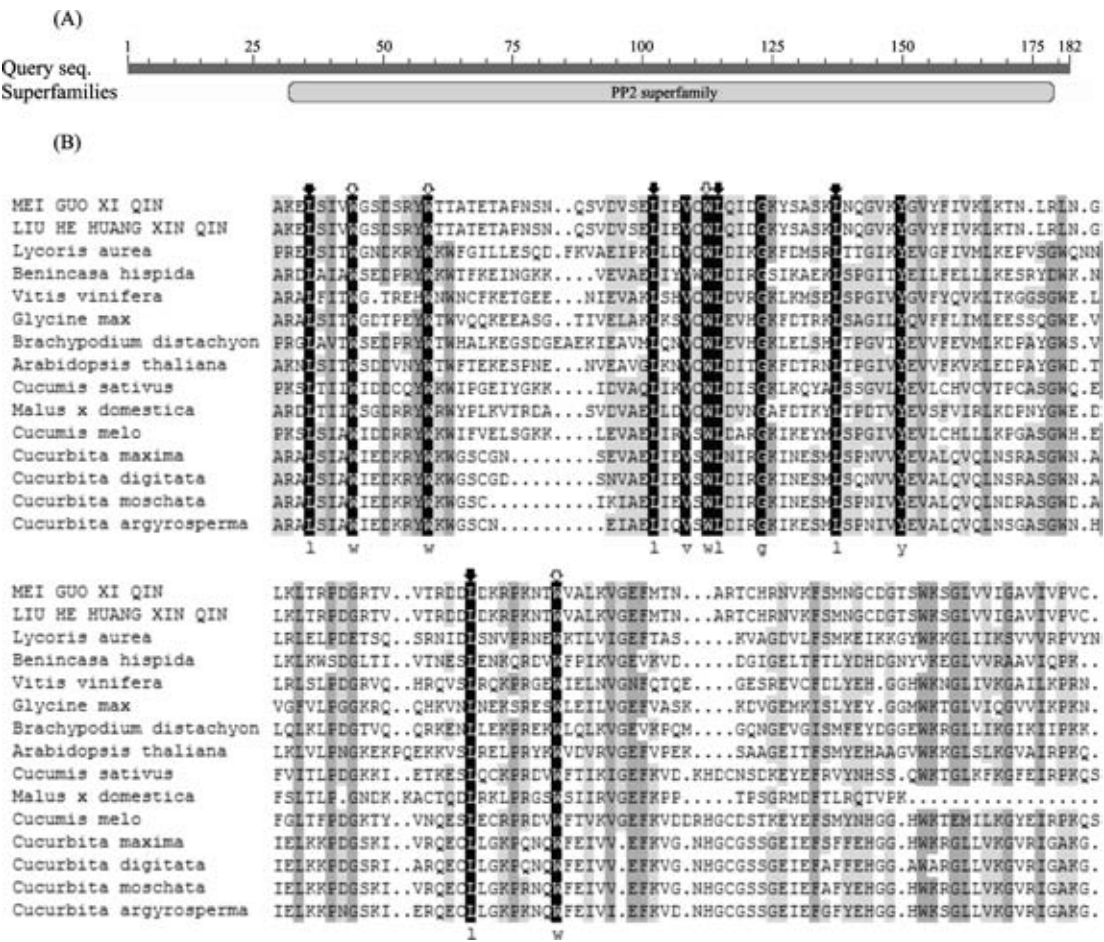
对上述植物中的韧皮部蛋白进行氨基酸组成成分及理化性质分析,结果见表 1。这些植物中的韧皮部蛋白氨基酸残基数较多,且变化幅度较大,为 170 ~ 300 个,分子量变化也较大,为 15 ~ 35 kDa。进一步分析结果显示,上述韧皮部蛋白的碱性氨基酸略多于酸性氨基酸,理论等电点在 8 上下,是碱性蛋白。脂肪族氨基酸所占比例较高,芳香族氨基酸占 10% 左右,蛋白质可溶性预测中不溶蛋白的比例为 51.5% ~ 89.3%。



* 表示终止密码子 * Represents the stop codon

图 2 六合黄心芹韧皮部蛋白基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of phloem protein from celery Liu He Huang Xin Qin



A:保守域预测;B:序列比对。实心箭头所示为5个亮氨酸残基保守位点,空心箭头所示为4个色氨酸残基保守位点

A: Prediction of the conserved domain, B: Alignment of amino acid. The stuffed arrow marks the 5 leucine amino acid residues in the conservative positions, the hollow arrow marks the 4 tryptophan amino acid residues in the conservative positions

图3 芹菜韧皮部蛋白保守域预测及其与其他物种类似蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig. 3 Prediction of the conserved domain and alignment of amino acid of phloem protein from celery and other different plants

2.3 芹菜韧皮部蛋白的进化分析

根据检索结果,选取了上述13种植物的韧皮部蛋白或相似蛋白与六合黄心芹和美国西芹的韧皮部蛋白进行同源进化比对,构建同源进化树,并进一步分析进化关系。结果显示,六合黄心芹和美国西芹来源的韧皮部蛋白在进化关系上同忽地笑最近,三者属于同一个分支。葫芦科南瓜属的笋瓜、金瓜、南瓜和日本南瓜属于另外一个分支(图4)。

通过这些蛋白序列的组成成分和理化分析(表1),结果显示,六合黄心芹和美国西芹除了理论分子量有细微差异外,其他各理化性质均一致,而这2种芹菜的韧皮部蛋白与其他物种的韧皮部蛋白及类似蛋白序列的理化性质还是有较大差异的。其中,就氨基酸残基的数量上来看,冬瓜最高,为303,苹果最低,为131;理论分子量上看,冬瓜最高,为

34974.25,苹果最低,为15278.48,差异较为显著;理论等电点从5.50到9.47不等,其中,冬瓜最低;碱性氨基酸比例、酸性氨基酸比例、芳香族氨基酸比例以及脂肪族氨基酸比例差异不大;蛋白质可溶性预测从51.5%到89.3%不等,其中,冬瓜最低,差异较为明显。根据 Hierarchical Neural Network 的分析^[33],六合黄心芹韧皮部蛋白由27.07%的 α -螺旋(alpha helix)、30.94%的延伸主链(extended strand)、6.63%的 β -转角(beta turn)和35.36%的随机卷曲(random coil)组成。其中延伸主链和随机卷曲是六合黄心芹韧皮部蛋白的主要组成部分,而 α -螺旋和 β -转角则散落在蛋白序列中。美国西芹韧皮部蛋白由24.86%的 α -螺旋(alpha helix)、31.49%的延伸主链(extended strand)、5.52%的 β -转角(beta turn)和38.12%的随机卷曲(random coil)组成。其中

延伸主链和随机卷曲是美国西芹韧皮部蛋白的主要组成部分,而 α -螺旋和 β -转角则散布在蛋白序列

中。根据蛋白折叠结构的分析,这 2 个品种的蛋白结构很相似。

表 1 芹菜和不同物种来源的韧皮部蛋白和类似蛋白氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 A comparison of composition and physical and chemical characterization of amino acid sequences of Phloem Protein among the different plants

物种名 Name of plants	氨基酸 残基数 No. of amino acid	理论 分子量 Theoretical MW/Da	理论 等电点 Theoretical pI	碱性氨基 酸比例(%) Percentage of basic amino acid	酸性氨基 酸比例(%) Percentage of acid amino acid	芳香氨基 酸比例(%) Percentage of Aromatics amino acid	脂肪族氨 基酸比例(%) Percentage of Aliphatic amino acid	不溶蛋白 的比例(%) Percent of insolubility
六合黄心芹 <i>A. graveolens</i>	181	19983.95	9.18	14	9	7	24	86.1
美国西芹 <i>A. graveolens</i>	181	19953.93	9.18	14	9	7	24	86.1
忽地笑 <i>L. aurea</i>	171	19754.04	9.19	15	12	12	26	84.9
冬瓜 <i>B. hispida</i>	303	34974.25	5.50	14	15	12	27	51.5
葡萄 <i>V. vinifera</i>	181	21018.23	9.47	19	11	10	22	78.4
大豆 <i>G. max</i>	173	19430.38	7.72	13	11	10	23	84.6
二穗短柄草 <i>B. distachyon</i>	215	24503.45	8.27	16	13	8	21	65.0
拟南芥 <i>A. thaliana</i>	246	28101.51	9.18	16	12	10	22	89.3
黄瓜 <i>C. sativus</i>	225	26059.41	8.85	16	10	12	24	73.1
苹果 <i>M. domestica</i>	131	15278.48	8.56	15	13	13	22	75.9
香瓜 <i>C. melo</i>	226	26230.23	8.32	16	12	13	21	80.5
笋瓜 <i>C. maxima</i>	218	24566.41	8.81	16	11	11	25	88.5
金瓜 <i>C. digitata</i>	218	24380.06	8.46	15	11	11	24	82.9
南瓜 <i>C. moschata</i>	216	24499.36	8.81	17	12	11	25	84.3
日本南瓜 <i>C. argyrosperma</i>	216	24523.44	8.79	17	12	11	24	85.4

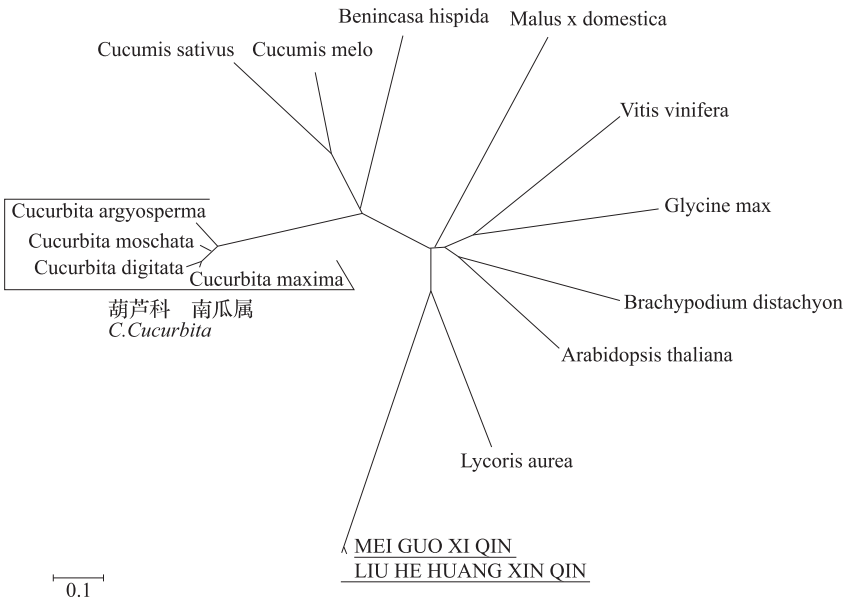


图 4 部分物种的韧皮部蛋白以及相似蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of the phloem protein and the liked protein from several plant species

2.4 韧皮部蛋白基因在两个芹菜品种中不同组织部位的表达分析

通过荧光定量 PCR 检测韧皮部蛋白基因在六合黄心芹和美国西芹不同组织中的表达情况,结果显示,该基因在六合黄心芹和美国西芹的茎和根组织中表达相对较高,而在叶片和茎尖分生组织表达则相对较弱。根中的相对表达量美国西芹较六合黄心芹高;而在叶片和茎尖分生组织中则相反,美国西芹均较六合黄心芹低(图 5)。芹菜中韧皮部蛋白基因相对表达最高的部位均出现在茎中,这也与该韧皮部蛋白的特性相吻合。从上述数据中可以看出,相对表达量还是差异很明显的,均达到极显著水平。从表达量的高低上可以看出该基因在两种地域来源、品种的形态特征不同的芹菜中表达存在明显的差异。

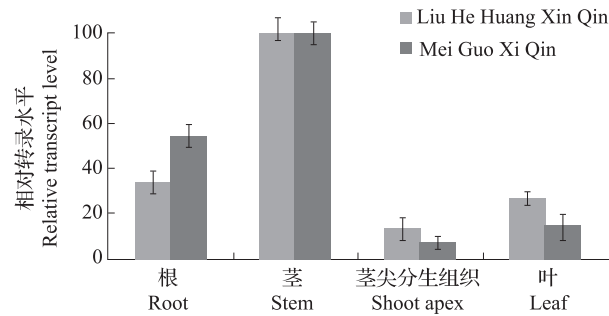


图 5 芹菜韧皮部蛋白基因在不同组织中的表达水平
Fig.5 Expression analysis of *Phloem Protein* gene in different tissues of celery

3 讨论

六合黄心芹是南京六合地区的优良地方品种,植株相对较矮小,颜色心黄;美国西芹则来源于美国,植株高大,颜色鲜亮。由于地域来源的不同,这 2 个品种的形态特征有较大的差异^[2,34]。本研究从这 2 个品种中分别分离的韧皮部蛋白是非常保守的,核苷酸序列和氨基酸分别只有 3 个和 1 个位点的差异。植物韧皮部蛋白是一种存在于植物韧皮部的功能性蛋白,在植物的生长发育等方面有着重要的作用,可以为非转运的韧皮部组织提供可以固定的机械框架^[19,24-26]。韧皮部蛋白在植物对逆境和抗病虫害方面也起着重要的作用^[35-36],韧皮部蛋白可以在当韧皮部渗出液接触到空气时,在伤口部位和 PP1 氧化交叉相连的半胱氨酸残基结合形成一个密封的机械系统作为防护^[18-19,37]。韧皮部是植物维管组织的一部分,负责植物体内从叶到其他组织器官之间糖等有机养料的转运而成为许多植物病

虫害的侵害对象。因此,研究韧皮部蛋白的作用并运用于植物抗病虫害侵害是十分必要的^[38-40]。虽然国内外对韧皮部蛋白的研究开展得较早,从伞形花科典型植物芹菜中克隆出相关韧皮部蛋白基因,并进行相关分析的研究很少。本研究发现来源于不同大陆,形态差异较为明显的不同芹菜种质资源中的韧皮部蛋白非常保守,说明该韧皮部蛋白在芹菜较为重要,相对变异较少。

本研究通过进化树分析,发现六合黄心芹和美国西芹的韧皮部蛋白在进化关系上同忽地笑和葡萄最近。忽地笑和葡萄分别属于天门冬目和葡萄目,而芹菜属于伞形目,该蛋白的进化关系分析显示,伞形目与天门冬目进化关系可能也较近。冬瓜、黄瓜、香瓜、笋瓜、金瓜、南瓜等都属于葫芦科植物,所以这些植物的韧皮部蛋白及相似蛋白在进化上共处一个大的分支,由于进化的不同层次和阶段,大的分支出现小的分支。另外,进化树的分析与绘制与选择的植物种类和数目相关,因此本研究通过不同植物韧皮部蛋白绘制的进化树与植物物种进化可能存在一定的偏差。通过韧皮部蛋白绘制的进化树可以为植物进化提供一定的参考。本研究中不同物种的韧皮部蛋白的进化呈现一定的种属特性,为研究伞形目和伞形花科植物的进化提供一定的借鉴意义。

六合黄心芹和美国西芹中的韧皮部蛋白基因表达分析显示,该基因呈现较明显的组织特异性。上述两芹菜品种中的韧皮部蛋白基因主要在韧皮部组织发达的茎和根中表达。在叶中也有较高水平的表达,这可能与叶片中叶脉等也含有较多的韧皮部组织相关。该基因在两种芹菜中韧皮部相对少的茎尖分生组织中表达相对最低。上述结果显示该韧皮部蛋白基因表达与韧皮部组织分布呈现相关性。芹菜中韧皮部蛋白可能对于维持芹菜形态特征、物质转运、抗病以及植物伤口保护等方面的重要特性有关。

参考文献

[1] 王武台,古瑜,韩启厚,等. 芹菜种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 中国蔬菜,2011(8):22-27
[2] 王述民,李立会,黎裕,等. 中国粮食和农业植物遗传资源状况报告(1). 植物遗传资源学报,2011,12(1): 1-12
[3] 蒋浩,秦红敏,虞红梅,等. 笋瓜韧皮部蛋白基因启动子的克隆及其功能初探[J]. 农业生物技术学报,1999,7(1): 63-68
[4] Koh A,Nobuo S,Shu F,et al. Destination-selective long-distance movement of phloem proteins[J]. Plant Cell,2005,17(6): 1801-1814
[5] Zhang C,Shi H,Chen L,et al. Harpin-induced expression and transgenic overexpression of the phloem protein gene AtPP2-A1 in Arabidopsis repress phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae*[J]. BMC Plant Biol,2011,11: 11

- [6] Esau K, Cronshaw J. Tubular components in cells of healthy and tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana* [J]. *Virology*, 1967, 33 (1): 26-35
- [7] Kennecke M, Ziegler H, de Fekete M A R. Enzyme activities in the sieve sap of *Robinia pseudoacacia* L. and of other tree species [J]. *Planta*, 1971, 98: 330-356
- [8] Hall S M, Baker D A. The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate [J]. *Planta*, 1972, 106: 131-140
- [9] 胡桂兵, 张上隆, 徐昌杰, 等. 韧皮部特异性启动子的克隆及含绿色荧光蛋白报告基因新植物表达载体的构建 [J]. *华南农业大学学报*, 2005, 10(4): 118-120
- [10] Eschrich W, Evert R F, Heyer W. Proteins of the sieve tube exudate of *Cucurbita maxima* [J]. *Planta*, 1971, 100: 208-221
- [11] Bencharki B, Boissinot S, Revollon S, et al. Phloem Protein Partners of Cucurbit aphid borne yellows virus: Possible Involvement of Phloem Proteins in Virus Transmission by Aphids [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(6): 799-810
- [12] Read S M, Northcote D H. Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the Cucurbitaceae [J]. *Planta*, 1983, 158: 119-127
- [13] Fisher D B, Wu Y, Ku M S. Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100(3): 1433-1441
- [14] Cronshaw J. P-proteins in Phloem transport [J]. *Plenum Press*, 1975: 79-115
- [15] Bostwick D E, Skaggs M I, Thompson G A. Organization and characterization of *Cucurbita* phloem lectin genes [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(3): 887-897
- [16] Richardson P T, Baker D A, Ho L C. The chemical composition of cucurbit vascular exudates [J]. *J Exp Bot*, 1982, 33: 1239-1247
- [17] Bostwick D E, Dannenhoffer J M, Skaggs M I, et al. Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(12): 1539-1548
- [18] Beneteau J, Renard D, Marché L, et al. Binding Properties of the N-Acetylglucosamine and High-Mannose N-Glycan PP2-A1 Phloem Lectin in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 1345-1361
- [19] Read S M, Northcote D H. Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin) [J]. *Ear J Biochem*, 1983, 134(3): 561-569
- [20] Smith L M, Sabnis D D, Johnson R P C. Immunocytochemical localization of phloem lectin from *Cucurbita maxima* using peroxidase and colloidal-gold labels [J]. *Planta*, 1987, 170: 461-470
- [21] Thaine R. Movement of sugars through plants by cyto-plasmic pumping [J]. *Nature*, 1969, 222: 873-875
- [22] MacRobbie E A C. Phloem translocation. Facts and mechanisms; a comparative survey [J]. *Biol Rev*, 1971, 46: 429-481
- [23] Lee D R. Possible significance of filaments in sieve elements [J]. *Nature*, 1972, 235: 286
- [24] Weber C, Franke W W, Kartenbeck J. Structure and biochemistry of phloem-proteins isolated from *Cucurbita maxima* [J]. *Exp Cell Res*, 1974, 87(1): 79-106
- [25] Sabnis D D, Hart J W. The isolation and some properties of a lectin (haemagglutinin) from *Cucurbita* phloem exudates [J]. *Planta*, 1978, 142: 97-101
- [26] Allen A K. A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that has a specificity for beta-1, 4-linked N-acetylglucosamine oligosaccharides. [J]. *Biochem J*, 1979, 183(1): 133-137
- [27] Schulz A, Alosi M C, Sabnis D D, et al. A phloem-specific, lectin-like protein is located in pine sieve-element plastids by immunocytochemistry [J]. *Planta*, 1989, 179: 506-515
- [28] Giell C, Kauss H, Ziegler H. Affinity chromatography of a lectin from *Robinia pseudoacacia* L. and demonstration of lectins in sieve-tube sap from other tree species [J]. *Planta*, 1979, 144: 367-371
- [29] Rita M, Federica D M, Khaled F, et al. Phloem-specific protein expression patterns in apple and grapevine during phytoplasma infection and recovery [J]. *Bull Insect*, 2011, 64(S): 211-212
- [30] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [31] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(13): 3784-3788
- [32] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 531-552
- [33] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29: 45
- [34] 郑殿升. 中国引进的栽培植物 [J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(6): 910-915
- [35] Combet C, Blanchet C, Geourjon C, et al. NPS@: network protein sequence analysis [J]. *Trend Biochem Sci*, 2000, 25: 147-150
- [36] Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, et al. Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens* [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 57: 517-540
- [37] Vandenborre G, Smagghe G, Van Damme E J. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(13): 1538-1550
- [38] Dafoe N J, Zamani A, Ekramoddoullah A K, et al. Analysis of the poplar phloem proteome and its response to leaf wounding [J]. *Proteome Res*, 2009, 8(5): 2341-2350
- [39] 袁正强, 贾燕涛, 吴家和, 等. 三个韧皮部特异性启动子在转基因烟草中表达的比较研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(1): 6-9
- [40] Gómez G, Torres H, Pallás V. Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system [J]. *Plant J*, 2005, 41(1): 107-116