

油茶 *Phl1;1* 基因克隆及其表达分析

周俊琴¹, 谭晓风¹, 袁 军^{1,2}, 龙洪旭¹

(¹ 中南林业科技大学/经济林培育与保护教育部重点实验室, 长沙 410004; ² 北京林业大学, 北京 100083)

摘要: 以油茶湘林 4 号为材料, 通过 RT-PCR 和 RACE 的方法克隆出油茶磷酸转运子 *Phl1* 基因家族一个成员的全长 cDNA 序列, 命名为 *CoPhl1;1* (GenBank 登录号: JX403969), 通过实时定量 PCR 的方法检测了不同磷浓度下该基因在根系中的表达水平。结果表明: *CoPhl1;1* CDS 长度为 1626 bp, 编码 542 个氨基酸, 与其他物种的 *Phl1* 氨基酸序列具有较高的相似性, 其中与夹竹桃科长春花的 *Phl1* 相似性最高, 达到 88%; 蛋白质二级结构和拓扑结构预测表明, *CoPhl1;1* 具有跨膜蛋白的主要特征, 与其他物种的 *Phl1* 具有一致性; 实时定量 RT-PCR 结果表明, 油茶 *Phl1* 基因的表达受低磷诱导, 并在受磷胁迫处理 (P 浓度为 0.1 mmol/L) 15 d 时表达量最高。

关键词: 油茶; *Phl1;1*; 磷转运子; 基因表达模式

Isolation and Expression Analysis of *CoPhl1;1* from Oil Tea

ZHOU Jun-qin¹, TAN Xiao-feng¹, YUAN Jun^{1,2}, LONG Hong-xu¹

(¹ The Key Lab of Non-wood Forest Nurturing and Protection of the National Ministry of Education/Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004; ² Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: The phosphate transporter named *CoPhl1;1* was isolated from oil tea (*Camellia oleifera* Xianglin4) with the method of RT-PCR and RACE. Its expression under different phosphorus level at different time was checked with qRT-PCR. The CDS of *CoPhl1;1* is 1626 bp which codes a predicted protein of 542 amino acids. The amino acid identity compared with other phosphate transporters is highly conserved and showed the highest similarity (88%) with the *Phl1;1* of *Catharanthus roseus*. Putative secondary structure and topology of the encoding protein have the main feature of transmembrane protein which consistent with *Phl1* encoding protein in other species. The real-time RT-PCR result showed that expression of *CoPhl1;1* was induced by P-deficiency and reached a high level at 0.1 mmol/L phosphorus concentration after treated for 15 days.

Key words: *Camellia oleifera*; *Phl1;1*; phosphate transporter; gene expression pattern

油茶 (*Camellia oleifera*) 是中国南方重要的木本食用油料树种^[1]。目前全国油茶栽培面积达 366.6 万 hm^2 , 年产茶油 30 万 kg 左右, 平均产茶油仅 45 ~ 90 kg/hm^2 ^[2], 油茶林低产低效严重限制了油茶产业的发展。油茶主要分布在南方酸性红壤地区^[3], 磷缺乏是油茶增产的主要限制因子^[4-5]。

植物吸收磷的主要形式包括 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} , 而土壤中这些离子的浓度是微摩尔级的, 因此磷吸收是跨表皮及皮层细胞质膜的逆浓度主动运输过

程, 而该过程主要依靠根系细胞膜上 *Phl1* 基因家族高亲和力磷转运子调节^[6-7]。研究表明, 不同品种在不同磷梯度条件下 *Phl1* 基因表达具有明显差异^[8], 对其 *Phl1* 基因表达进行干扰将会导致根系吸收磷能力的降低^[9], 因此, *Phl1* 基因的表达是磷高效品种的重要指标之一。目前在水稻^[10]、小麦^[11]、玉米^[12]等重要农作物上克隆出了 *Phl1* 家族的基因, 并对这些基因进行了预测与表达分析, 许多耐低磷品种或无性系得以鉴定和筛选^[13], 而林木方面的

收稿日期: 2012-08-05 修回日期: 2012-08-26 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1732.001.html>

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2009BADB1B02)

作者简介: 周俊琴, 硕士, 研究方向为经济林栽培育种。E-mail: 476947827@qq.com

通信作者: 谭晓风, 博士, 教授, 研究方向为经济林栽培育种与林业生物技术。E-mail: tanxiaofeng@126.com

研究较少,仅见于毛果杨^[14]、巴西橡胶树^[15]。油茶作为重要的木本油料树种,关于磷酸转运子研究还处于空白。本研究以油茶湘林4号为试材,通过对油茶磷酸转运子 *Phl1* 基因的分离克隆和该基因在根系中表达情况进行检测,为探索油茶磷胁迫分子响应机制、磷高效种质资源筛选以及分子育种提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用1年生芽苗砧嫁接的油茶湘林4号(*Camellia oleifera*"Xianglin 4")为试验材料,将其种植于装有细沙的塑料盆(直径10 cm,高20 cm)中进行遮雨露天培养,采用 Hoagland 完全营养液培养,微量元素采用 Arnon 配方。试验设0、0.1、1.0 mmol/L 3个磷水平,P由 KH_2PO_4 提供,不同营养液中缺少的 K^+ 用等量的 KCl 补足。预先采用0.1 mmol/L 磷水平营养液培养苗木2周,采集0.1 mmol/L 磷水平营养液培养的幼苗根系用于 *Phl1* 基因克隆与分析。2012年5月13日开始磷处理,并于5月14日、5月29日和6月13日分别采集油茶幼嫩根系用于荧光定量PCR分析。

1.2 试剂

PureLink™ RNA Mini Kit, 5' RACE System For Rapid Amplification of cDNA Ends, 3' RACE System For Rapid Amplification of cDNA Ends 试剂盒购自 Invitrogen 公司; RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, 2 × Taq PCR MasterMix 购自 Fermentas 公司; pMD18-T Vector, PrimeSTAR HS DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶购自 Takara 公司; PCR 产物回收试剂盒为安比奥生物技术有限公司的 Gel Extraction Kit; 定量 PCR 试剂 2 × SYBR Green qPCR Mix 购自 TOYOBO 公司; pEASY-Blunt Simple Cloning Kit(平末端连接试剂盒), 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自全式金公司; 100 bp DNA Ladder Plus 购自 Solarbio 公司; 引物合成及测序分别由华大基因和博尚生物公司完成。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取 采用 CTAB 裂解和氯仿抽提,以 Invitrogen 公司的 PureLink™ RNA Mini Kit 试剂盒为基础,提取油茶幼苗根系总 RNA。利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,用紫外/可见光分光光度计(Lambda35, Perkin Elmer, USA)检测核酸的纯度。

1.3.2 油茶 *Phl1;1* 基因的克隆 根据已克隆的大豆(GenBank: EU496869.1)、蓖麻(GenBank: XP_002524621)、拟南芥(GenBank: AB005746)、辣椒(GenBank: EF091667.1)、杨树(GenBank: XP_002302047)、葡萄(GenBank: XM_002285117.2)和玉米(GenBank: NM_001111799.1)磷转运蛋白氨基酸序列中的保守区,利用 Primer Premier 5.0 软件设计简并引物 PHT1F 和 PHT1R。以油茶幼嫩根系总 RNA,逆转录后得到的第1条链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物链接入 pMD18-T 载体,经转化与菌落 PCR 筛选,挑选阳性克隆进行测序。在获得的片段序列上设计 3'RACE 和 5'RACE 的巢式扩增引物,参照 Invitrogen 5'RACE System For Rapid Amplification of cDNA Ends 和 3'RACE System For Rapid Amplification of cDNA Ends 试剂盒说明书的步骤进行 5'RACE 和 3'RACE,相应药品及接头引物均由试剂盒提供。根据 RACE 得到的序列信息,拼接后设计引物扩增全长 cDNA 序列。回收全长 cDNA 扩增片段,与 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 连接,然后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, LB/Amp 平板培养,挑选单菌落震荡培养 12 h,取 1 μL 菌液为模板,用载体通用引物 M13F 和 M13R 进行 PCR 鉴定,将鉴定的阳性克隆样品测序。引物序列见表1,PCR 扩增程序见表2。

表1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

用途 Function	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>Phl1</i> 基因片段的分离	<i>Phl1</i> F	TGGGHTTYTTYACHGATGC
	<i>Phl1</i> R	TCWGGCATYTTTCATWCGC
3'末端扩增 3'RACE	<i>Phl1</i> -F-GSP1	GGGTCTTTGCTCTCTAATGTCTCGG
	<i>Phl1</i> -F-GSP2	AACTCTTCTTCGGGTGGCTCGGTGA
	<i>Phl1</i> -F-GSP3	CATCGGTGGCGACTACCCTCTTCT
5'末端扩增 5'RACE	<i>Phl1</i> -R-GSP1	TGAAGGCACCACGAGTT
	<i>Phl1</i> -R-GSP2	CCACCGATGCCAAATCCTAGCCAGAA
	<i>Phl1</i> -R-GSP3	TCACCGAGCCACCCGAAGAAGAGTT
	<i>Phl1</i> -R-GSP4	GCAGCCGAGACATTAGGAGGCCAAAGAC
<i>Phl1</i> CDS 全长扩增	<i>Phl1</i> QF	ATGGCCAAAGAACAGTTGCAAGT
	<i>Phl1</i> QR	TTAAACCGGAACTGTCTAATGTTCAT
<i>Phl1</i> 实时定量 RT-PCR	<i>Phl1</i> -F1	GTGGCTCGGTGACAAGATGGG
	<i>Phl1</i> -R1	CATAATGGTAGCAGAAAGAGGGT
β-actin 实时定量 RT-PCR	β-actin-F	TCTTTATGCCAGTGGTCTGAC
	β-actin-R	TCTTCGAGTCTCCAACCTCTT

表 2 PCR 扩增程序

Table 2 The processes of PCR amplification

PCR	PCR 引物 Primers of PCR	程序 PCR procedure
简并 PCR	<i>Phl1</i> F, <i>Phl1</i> R	94 °C, 3 min; 94 °C, 40 s; 54 °C, 40 s; 72 °C, 2 min; 35 cycles
5'末端扩增	<i>Phl1</i> -R-GSP2, AAP	94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 65 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 5 cycles; 94 °C, 30 s; 63 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 30 cycles
	<i>Phl1</i> -R-GSPN, AUAP	94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 63 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 30 cycles
3'末端扩增	<i>Phl1</i> -F-GSP1, AUAP	94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 30 cycles
	<i>Phl1</i> -F-GSPN, AUAP	94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 62 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 30 cycles
全长 cDNA 扩增	<i>Phl1</i> QF, <i>Phl1</i> QR	94 °C, 5 min; 94 °C, 40 s; 57 °C, 40 s; 72 °C, 2 min; 30 cycles

1.3.3 序列分析和结构预测 利用 NCBI BLAST 对测序结果进行检索, Vector NTI 10.3.0 和 GENDOC 进行序列分析和氨基酸翻译, 用 MEGA4.0 进行多序列比对并计算构建聚类分析图。运用在线分析软件 (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析和预测蛋白质的理化性质, 并运用蛋白质二级结构预测软件 (<http://www.predictprotein.org/>) 以及跨膜区拓扑结构预测软件 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) 对油茶 *Phl1*;1 蛋白质二级结构及拓扑结构进行分析和预测。

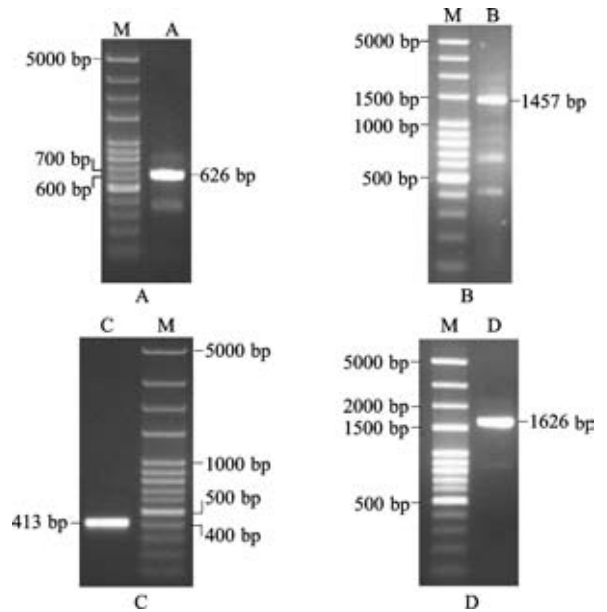
1.3.4 实时定量 RT-PCR 取各试材的总 RNA, 以 Oligo-d (T) 为引物, 反转录按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行。用反转录后的 cDNA 作模板。实时定量 PCR 特异引物 (*Phl1*-F1 和 *Phl1*-R1) (表 1), 扩增长度为 190 bp。

琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, *Phl1*-F1 和 *Phl1*-R1 只扩增出预期大小的片段, 而且没有引物二聚体。实时定量 PCR 的反应体积为 20 μ L, 包括 1 μ L cDNA (RNA 为 2 μ g), 10 μ L 2 \times SYBR Green qPCR Mix, 浓度为 10 μ mol/L 的正反向引物各 1 μ L, 剩余体积用超纯水补足至 20 μ L。每个反应重复 3 次。定量 PCR 反应程序: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。使用 BIO-RAD 公司 Mini option 定量 PCR 仪, 八联排管完成 PCR 反应。以油茶 β -actin 作为内参基因^[16], 清水模板为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 油茶 *Phl1*;1 基因克隆与序列分析

在 NCBI 中下载并比较不同植物的 *Phl1* 基因序列, 根据保守区域设计简并引物, 获得 626 bp 的片段 (图 1A)。利用 5'RACE 和 3'RACE 得到的序列进行拼接, 得到 1 条完整的 cDNA 序列, 长度为 1901 bp。在 5'端和 3'端分别设计引物进行 cDNA 编码区全长的特异扩增, 克隆后测序结果表明, 该条带长度 1626 bp (图 1D), 其序列与拼接序列编码区全长的一致性为 100%。最终获得 1626 bp 的油茶 *Phl1*;1 基因 CDS 序列, 该基因编码 542 个氨基酸, 长度与其他物种的 *Phl1* 基因相近。

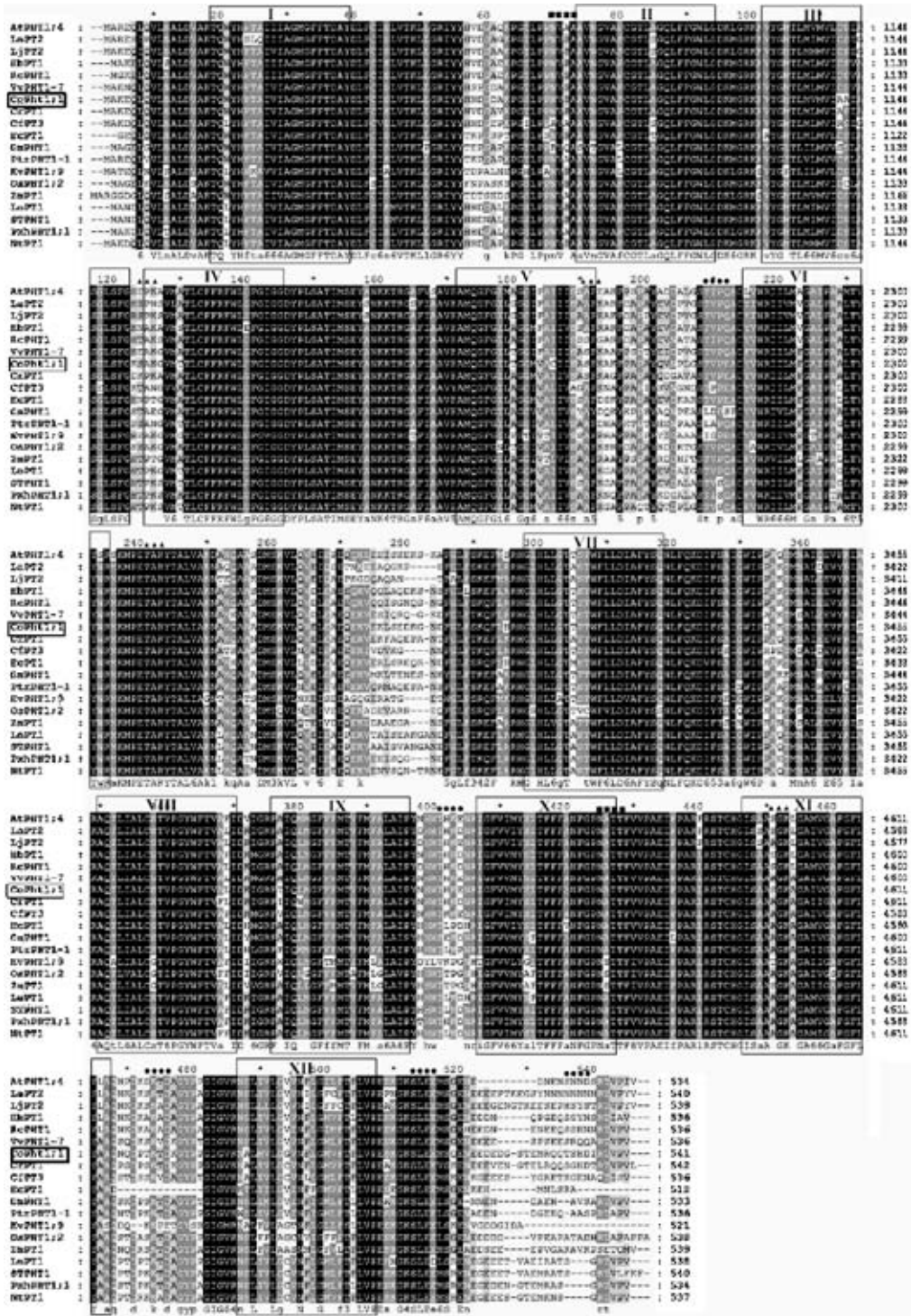


M: 100 bp plus DNA ladder; A: 简并 PCR 产物;
B: 3'RACE 扩增产物; C: 5'RACE 扩增产物;
D: 油茶 *Phl1* 编码区全长扩增产物
M: 100 bp plus DNA ladder; A: Amplification product of degenerate PCR; B: Amplification product of 3'RACE;
C: Amplification product of 5'RACE;
D: Full-length amplification product of *CoPhl1*;1

图 1 油茶 *Phl1*;1 扩增结果

Fig. 1 Amplification product of *Phl1*;1 gene from oil tea

将克隆得到的油茶 *Phl1*;1 cDNA 序列推导出的氨基酸序列与其他物种的 *Phl1* 基因所编码的氨基酸通过软件 Vector NTI 10.3.0 和 GENDOC 进行同源性分析, 发现油茶 *Phl1*;1 与其他植物的 *Phl1* 基因所编码的氨基酸同源性大多在 70% 以上, 其中与夹竹桃科的长春花相似度达 88%, 与橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 和毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 相似度分别达 83% 和 79.5% (图 2)。



罗马数字 I -XII 表示 12 个跨膜区; ■表示 N-糖基化位点; ▲表示蛋白激酶 C 磷酸化位点; ●表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点

Roman numerals (I -XII) represent 12 transmembrane domains, ■ represents N-glycosylation site,

▲ represents protein kinase C phosphorylation site, ● represents casein kinase II phosphorylation site

AtPHT1;4: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; LaPT2: 白羽扇豆 *Lupinus albus*; LjPT2: 百脉根 *Lotus japonicus*; HbPT1: 橡胶树 *Hevea brasiliensis*;

RcPHT1: 蓖麻 *Ricinus communis*; VvPHT1-7: 葡萄 *Vitis vinifera*; CoPh1;1: 油茶 *Camellia oleifera*; CrPT1: 长春花 *Catharanthus roseus*;

CfPT2: 辣椒 *Capsicum frutescens*; EcPT1: 赤桉 *Eucalyptus camaldulensis*; GmPHT1: 大豆 *Glycine max*; HvPHT1;9: 大麦 *Hordeum vulgare*;

OsPHT1;2: 水稻 *Oryza sativa*; ZmPT1: 玉米 *Zea mays*; PtrPHT1-1: 毛果杨 *Populus trichocarpa*; LePT1: 番茄 *Lycopersicon esculentum*;

STPHT1: 马铃薯 *Solanum tuberosum*; PxpPHT1;1: 矮牵牛 *Petunia x hybrida*; NtPT1: 烟草 *Nicotiana tabacum*

图 2 油茶 *Phl1;1* 与其他植物 *Phl1* 基因编码的氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of deduced amino acids of *CoPh1;1* and other plant *Phl1*-like genes

用软件 MEGA 4.0 对图 2 中 19 种植物的 *Phl1* 氨基酸序列进行比对,结果显示,油茶 *Phl1;1* 基因编码蛋白首先与夹竹桃科的长春花 (*Catharanthus roseus*) *Phl1* 基因编码蛋白聚在一起(图 3),这可能与二者均分布在酸性土壤地区有关。

2.2 CoPhl1;1 蛋白二级结构及拓扑结构预测

蛋白二级结构预测显示,在氨基酸序列中存在糖基化位点、蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶介导的磷酸化位点(图 2)。整个蛋白质基本上是表现出疏水性的,二级结构中 α -螺旋所占比例最高,具有跨膜蛋白的主要特征。对 CoPhl1;1 进行的跨膜区拓扑结构预测结果(图 4)显示:CoPhl1;1 具有 12 个跨膜域,每个跨膜结构域是由 20 个氨基酸残基组成的螺旋,同时跨膜蛋白的 N 端和 C 端位于细胞膜胞质的一侧,保守序列 GGDYPLSATIMSE 位于第 4 个跨膜域,预测结果与报道的其他物种 *Phl1* 跨膜区结构一致^[11-12]。

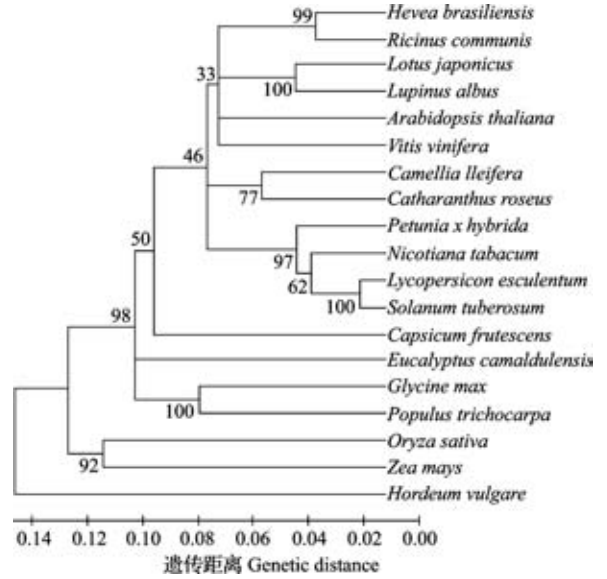


图 3 油茶 *Phl1;1* 蛋白和其他植物 *Phl1* 蛋白的聚类分析
Fig. 3 Phylogenetic tree of the predicted CoPhl1;1 and other homologous proteins from different species

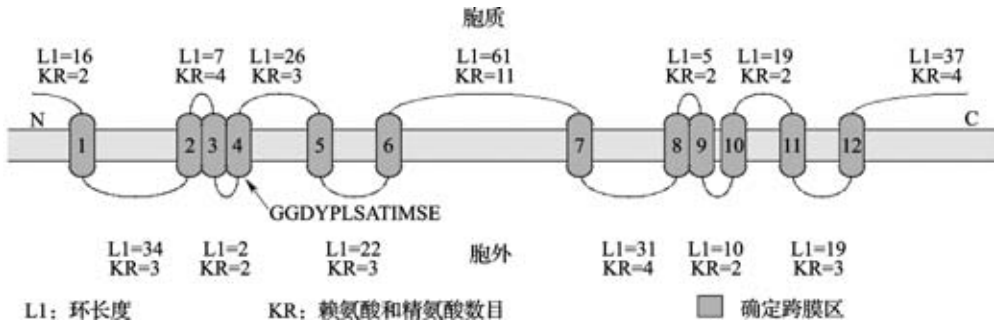
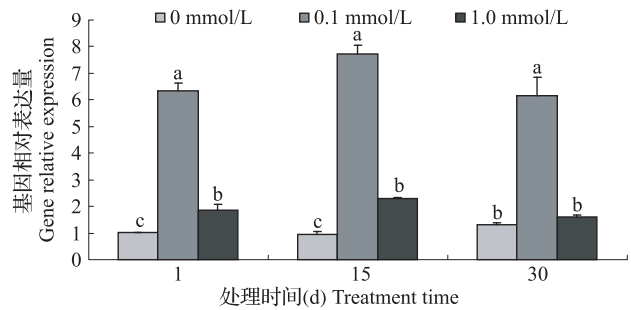


图 4 油茶 *Phl1;1* 蛋白的跨膜拓扑结构预测图

Fig. 4 Transmembrane topology structure of CoPhl1;1 protein

2.3 不同时间和磷浓度条件下 *CoPhl1;1* 基因在根系中的表达情况

实时定量 RT-PCR 检测结果表明,油茶 *Phl1* 基因的表达量在不同磷浓度梯度条件下,存在显著差异,并随磷处理时间的不同而不同(图 5)。进行胁迫处理后 1 d 和 15 d 时,油茶根系中 *Phl1;1* 基因在磷浓度为 0.1 mmol/L 时表达量最高,其次是在 1.0 mmol/L,无磷时最低。到处理 30 d 时,无磷处理的基因相对表达量升高,并和处理 1 d 和 15 d 时的表达量有显著差异($P=0.05$)。在 0.1 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时,根系中 *Phl1;1* 基因均在 15 d 时表达量最高。



不同字母表示同一时期不同处理间差异达到显著水平($P=0.05$)
Different letters indicate significant difference at $P=0.05$ level

图 5 不同磷水平条件下油茶根系中 *Phl1;1* 基因在不同时间的表达情况

Fig. 5 Expression of *CoPhl1;1* in different phosphorus level at different time in the root

3 讨论

溶质转运蛋白家族 MFS(major facilitator super-family)的基因负责着对磷的吸收和体内转运的基本过程,其中的 *Phl1* 小家族都属于高亲和力的磷转运

蛋白基因,即利用质膜上的氢离子浓度梯度来驱动植物对磷的吸收,目前克隆得到的基因主要属于这

类^[17]。本试验克隆得到的油茶 *Phl1;1* 基因也属于这类基因,并和其他物种的 *Phl1* 家族成员编码的蛋白大小相似,约为 59kDa,含 542 个氨基酸残基,同时其二级和拓扑结构具有疏水性、 α -螺旋所占比例高等跨膜蛋白的主要特征,保守序列 GGDYPLSA-TIMSE 位于第 4 个跨膜域,与其他物种的 *Phl1* 基因编码蛋白具有一致性^[18-19]。该研究还发现,油茶 *Phl1;1* 基因在油茶根系中的表达在磷水平为 0.1 mmol/L 明显高于 1.0 mmol/L,表明低磷会诱导 *Phl1;1* 的表达,这和其他物种上的研究一致^[12],但是在本研究中无磷限制该基因的正常表达,可能是由于受到其他胁迫的原因。以上研究表明 *CoPhl1;1* 与油茶磷吸收和转运关系密切。

油茶长期生长在磷缺乏的酸性红壤地区,对低磷有极强的适应性,本研究虽然从油茶根系组织中克隆到 *CoPhl1;1* 基因并对其表达进行了分析,但是油茶 *Phl1* 基因家族成员的数量以及各成员的相互调控方式还不清楚,各成员的主要功能仍然有待验证,下一步应继续克隆 *Phl1* 基因家族的成员,利用过量表达或 RNA 干涉技术,来分析基因在植物体内的生理功能^[20],并对其结构特征、表达模式、生化特性以及调控方式等进行研究,探索如何增加转运子在根系中的表达和提高其亲和力,为筛选和培育耐低磷品种及林分磷素管理提供资料。

参考文献

- [1] 庄瑞林. 中国油茶[M], 2 版. 北京:中国林业出版社,2008:3
- [2] 国家林业局. 全国油茶发展规划(2009-2020)[M]. 北京:中国林业出版社,2009:12-16
- [3] 何方,何柏. 油茶栽培分布与立地分类的研究[J]. 林业科学, 2002,38(5):64-72
- [4] 袁军. 普通油茶营养诊断及施肥研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2010

- [5] 丁锐,邓小梅,奚如春,等. 广东省油茶林地不同母岩红壤养分限制因子研究[J]. 经济林研究,2012,30(2):61-67
- [6] Rausch C, Daram P, Brunner S, et al. Phosphorus transport mechanisms in vascular plants; supply meets complementarity[J]. Develop Plant Soil Sci,2002,92:18-19
- [7] Shen J, Yuan L, Zhang J, et al. Phosphorus dynamics: From soil to plant[J]. Plant Physiol,2011,156:997-1005
- [8] Misson J, Thibaud M C, Bechtold N, et al. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* *Phl1;4*, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants[J]. Plant Mol Biol,2004,55:727-741
- [9] Shin H, Shin H S, Dewbre G R, et al. Phosphate transport in *Arabidopsis*: *Phl1;1* and *Phl1;4* play a major role in phosphate acquisition from both low-and high-phosphate environments[J]. Plant J,2004,39:629-642
- [10] Ai P H, Sun S B, Zhao J N, et al. Two rice phosphate transporters, *OsPhl1;2* and *OsPhl1;6*, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation[J]. Plant J,2009,57:798-809
- [11] Davies T G E, Ying J, Xu Q, et al. Expression analysis of putative high-affinity phosphate transporters in Chinese winter wheats[J]. Plant Cell Environ,2002,25:1325-1339
- [12] Derek P, Julie D W, David J S, et al. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection[J]. New Phytol,2005,167:881-896
- [13] Du Y M, Tian J, Liao H, et al. Aluminium tolerance and high phosphorus efficiency helps *Stylosanthes* better adapt to low-P acid soils[J]. Ann Bot-London,2009,103:1239-1247
- [14] 王策,秦静静,甘红豪,等. 毛果杨全基因组磷酸根转运蛋白家族成员序列分析[J]. 浙江农林大学学报,2012,29(4):516-526
- [15] 汤银辉,何鹏. 巴西橡胶树磷转运蛋白基因的克隆及生物信息学分析[J]. 热带作物学报,2010,31(5):758-766
- [16] 孙美莲,王云生,杨冬青,等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 植物学报,2010,45(5):579-587
- [17] 王萍,陈爱群,余玲,等. 植物磷转运蛋白基因及其表达调控的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报,2006,12(4):584-591
- [18] 李立芹. 农作物 *Phl1* 家族磷转运体蛋白的生物信息学分析[J]. 作物杂志,2011(3):320-324
- [19] 杨存义,刘灵,沈宏,等. 植物 *Phl1* 家族磷转运子的分子生物学研究进展[J]. 分子植物育种,2006,4(2):153-159
- [20] 李喜焕,常文锁,张彩英. 提高植物磷营养效率(候选)基因研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(1):83-97

(上接第 506 页)

- [24] Velculescu E, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression[J]. Science,1995,270:484-487
- [25] Wang Z, Brown D D. A gene expression screen[J]. PNAS,1991,88(24):11505-11509
- [26] 刘炜. 水稻 I 型酪蛋白激酶的分离及生理功能研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2003
- [27] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens[J]. Plant Physiol,1994,105(2):467-472
- [28] 芦光新. 活性氧与植物抗病性的关系[J]. 青海大学学报,2002,20(2):11-15
- [29] Shirasu K, Lahaye T, Tan M W. A novel class of eukaryotic zinc binding protein is required for disease resistance signaling in barley and development in *Celegans*[J]. Cell,1999,99(4):355-366
- [30] Muskett P R, Kahn K, Austin M J, et al. *Arabidopsis* *RARI* exerts

- rate limiting control of *R* gene-mediated defenses against multiple pathogens[J]. Plant Cell,2002,14(5):979-992
- [31] Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, et al. The *RARI* interactor *SGT1*: an essential component of *R* gene triggered disease resistance[J]. Science,2002,295:2073-2076
- [32] 王丽娟,田颖川,何朝族. 新基因水稻 *OsLSD1* 的克隆及拟南芥和水稻类 *LSD1* 基因家族的生物信息学分析[J]. 生物化学与生物物理进展,2005,32(3):268-274
- [33] Devoto A, Muskett P R, Shirasu K. Role of ubiquitination in the regulation of plant defense against pathogens[J]. Curr Opin Plant Biol,2003,6(4):307-311
- [34] Glickman M H, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction[J]. Physio Rev,2002,82(2):373-428
- [35] Ingvarsdson C, Veierskov B. Ubiquitin and proteasome-dependent proteolysis in plants[J]. Physiol Plantarum,2001,112(4):451-459