

木榄幼苗叶片 cDNA 文库的构建 及其表达序列标签分析

叶波平*, 管悦, 许媛媛, 孙伟, 周峰, 高向东, 吴梧桐

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要: 应用 SMART 技术构建了 25‰ 盐度下生长 4 个月的木榄叶片的 cDNA 文库, 文库滴度为 10^6 cfu mL⁻¹, 重组率为 94.4%, 插入片断长度为 1~2 kb。从 cDNA 文库中随机挑选了 96 个重组克隆进行序列分析, 共获得 94 个表达序列标签 (ESTs), 经质量控制和聚类拼接后得到 81 个 unigenes, 包括 5 个片断聚合群和 76 个单一序列。Blastx 分析结果表明这些 unigenes 与 GenBank 的 Nr 数据库中已报道的基因具有较高的同源性 ($E < 10^{-5}$), 它们参与呼吸代谢、光合作用、糖代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢以及不饱和脂肪酸生物合成等重要的生理过程, 并与机体的损伤修复、胞吞作用以及 PPAR 信号途径等相关。

关键词: 木榄; 叶; cDNA 文库; EST 序列; 功能分析

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)02-0140-11

Construction of cDNA Library from Leaves of *Bruguiera gymnorrhiza* Seedlings and Its Expressed Sequence Tags Analysis

YE Bo-ping*, GUAN Yue, XU Yuan-yuan, SUN Wei, ZHOU Feng, GAO Xiang-dong, WU Wu-tong

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The seedlings of *Bruguiera gymnorrhiza* were cultured under 25‰ salinity for 4 months, then the total RNA were extracted from leaves. Following the protocol of SMART™ cDNA Library Construction kit, the higher quality cDNA library was constructed. The primary titer of the cDNA library was about 1×10^6 cfu mL⁻¹, its recombinant efficiency was calculated as 94.4%, and the size of the insert DNA fragments was ranged from 1 kb to 2 kb. Ninety-six randomly selected recombinant clones from the cDNA library were sequenced to produce 94 expressed sequence tags (ESTs), among which 81 unigenes (including 5 contigs and 76 singletons) were generated after quality control and assembly of sequences, they were all homologous to the sequences in NCBI Nr database by blastx analysis ($E < 10^{-5}$). These unigenes involved in the processes of respiration, photosynthesis, glucose metabolism, amino acid metabolism, fatty acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, etc, and had relation to the damage repair, endocytosis, and PPAR signaling pathway.

Key words: *Bruguiera gymnorrhiza*; Leaf; cDNA library; Expressed sequence tags; Functional analysis

红树植物是一类生长在热带和亚热带沿海潮间带并受周期性潮水浸淹的木本植物^[1], 有 16 科 22 属 65 种, 主要分布东南亚、加勒比和非洲等沿海地区^[2], 它们在长期适应高盐以及周期性海水浸淹的过程中产生了一系列耐盐机制^[2-7]。

木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*) 是红树科植物中的一种中度耐盐植物, 一般可在低于 25‰ 盐度环境下正常生长^[6,8], 是我国南部沿海海岸线生态造林的主要品种^[9]。该植物无盐腺结构, 不能将过多的盐分蓄积在盐腺中, 而只能通过自身的生理调节

作用来适应高盐环境,与能将过多的盐分排斥在木质部之外的其它无盐腺结构的耐盐植物(小花木榄 *B. parviflora*)相比,它可以将在体内过多的盐分蓄积在木质部导管内以抵御外界的高盐胁迫^[9],显示出该植物有别于其它盐生植物的结构和生理特点^[10-11],成为植物耐盐胁迫机理研究的良好生物模型。有关木榄耐盐机理的研究引起极大的关注。目前,已有关于盐胁迫下木榄的生理生化特征^[6,12]、基因表达变化^[13-16]和形态变化^[9,17]的研究报道,但对其功能基因和蛋白质的研究报道较少,对木榄耐盐胁迫分子机理的认识并不充分。因此,有必要加强对木榄相关功能基因的克隆和鉴定工作。

cDNA 文库技术是当前分子生物学研究中常用的技术之一,在重要功能基因的鉴定和克隆过程中发挥着重要的作用^[18]。本研究以 25‰ 盐度下生长的木榄幼苗叶片为材料,构建了高质量的 cDNA 文库,对文库中部分克隆的 EST 序列进行了测序,并分析了这些 ESTs 代表的基因的功能以及可能参与的代谢途径,为木榄中与盐胁迫相关功能基因的鉴定和克隆奠定了一个较好的工作基础。

1 材料和方法

1.1 材料和处理

于 2007 年 4 月上旬在广东省湛江市特呈岛 (N21°15', E110°44') 采集成熟健康的木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 胚轴,由广东海洋大学韩维栋教授协助鉴定,凭证标本保存于本实验室。

将采集后的胚轴种植于用海水晶盐(南京佳亚养殖用品开发部)配制的 25‰ 人工海水浸润的沙盆 (25 cm × 10 cm) 中,每个沙盆种植 15 个木榄胚轴,于 (28 ± 2) °C、相对湿度 85%,自然光照 12 h d⁻¹ 下萌发生长。实验期间(120 d),每天用相应盐度的人工海水浸润沙盆以保持水分和盐度,实验结束后,采集木榄第 2 对真叶并用液氮速冻后,于 -80 °C 保存供总 RNA 提取用。

1.2 木榄叶片总 RNA 提取和 mRNA 纯化

采用改进后的 CTAB 法^[19]提取木榄叶片总 RNA。将 1 g 叶片于液氮中充分研磨至粉状,加入 5 mL 2% CTAB 提取缓冲液 (2% (w/v) CTAB, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% (w/v) PVP, 100 mmol/L Tris, pH 8.5) 和 10 μL β-巯基乙醇,继续研磨至糊状,匀浆液转移至离心管中,65 °C 温育 10 min,每隔 2~3 min 混匀 1 次,温育结束后于

12000 × g 离心 5 min,取上清于新离心管中,加入等体积氯仿,涡旋 30 s 后,12000 × g 离心 10 min,取上层水相,重复 3 遍,直到看不见明显蛋白中间层。加 1/3 体积 8 mol/L LiCl 溶液,剧烈混匀, -70 °C 沉淀 3 h,12000 × g 离心 15 min,弃上清,用 75% 乙醇洗涤沉淀两遍,挥发干乙醇后,将沉淀溶于 10 μL RNase-free 的 ddH₂O 中,测定 RNA 溶液的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,并通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度和质量。采用磁珠法 (PolyA Tract mRNA Isolation System III, Promega) 对提取的总 RNA 进行分离,利用琼脂糖凝胶电泳检测获得的 mRNA 质量。

1.3 双链 cDNA 合成

根据 SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, USA) 说明书进行双链 cDNA 合成。取 3 μL (0.1~0.15 μg) mRNA 溶液作为模板,以 CDS III/3' PCR Primer 为引物,在逆转录酶作用下进行一链延伸反应,合成单链 cDNA。取 2 μL 一链反应产物作为模板,以 5' PCR Primer 和 CDS III/3' PCR Primer 为引物,在 DNA 聚合酶催化下进行长链 PCR 扩增反应,合成双链 cDNA。扩增完毕后,取 5 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,确定 cDNA 浓度和长度分布;取 50 μL 扩增产物加入 2 μL 蛋白酶 K,45 °C 消化 20 min,消化产物用酚/氯仿抽提、纯化,沉淀溶于 79 μL 去离子水中,再加入 *sf*I 酶切体系,50 °C 酶切 2 h 后,用 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) 进行回收,得到 1 kb 以上片段,取适量 cDNA 进行连接。

1.4 cDNA 文库构建

取 1 μL pDNR-LIB vector 和 5 μL cDNA 片段在 T4 DNA 连接酶催化下,14 °C 连接过夜。连接产物点样到分子透析膜 (Millipore, USA) 上脱盐 1 h。取 2 μL 脱盐产物,用电转仪 (Bio-Rad, USA) 在 2.1 kV 下电击转化到 50 μL 大肠杆菌 DH10B 感受态细胞 (Invitrogen, USA) 中。转化产物在 SOC 培养基 (2% (w/v) 蛋白胨, 0.5% (w/v) 酵母提取物, 0.05% (w/v) NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L 葡萄糖, pH 7.0) 中,37 °C 下 180 r min⁻¹ 复苏 1 h。文库加入 25% 甘油后, -80 °C 保存。

1.5 cDNA 文库质量鉴定

取 1 μL 复苏后的转化产物,加入 1 mL 液体 LB 培养基中混匀,取 100 μL 涂布于含 3 mg mL⁻¹

氯霉素的 LB 平板上, 37℃ 培养过夜。计算文库滴度(cfu mL^{-1}) = 菌落数 $\times 10 \times 1000$ 。

随机挑取 18 个单克隆, 各加入 50 μL 无菌水振荡混匀, 95℃ 加热 5 min。取 2 μL 做模板, 用 M13 引物进行菌落 PCR, 并对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 以鉴定插入片段大小和计算文库重组率。

1.6 ESTs 序列测定

从构建的 cDNA 文库中随机挑选 96 个阳性克隆, 提取质粒后, 以 M13 为引物, 按 MEGABACE DYEnamic ET DYE Terminator Kit (GE Healthcare, USA) 说明书在 MegaBACE 2000 测序仪 (GE Healthcare, USA) 上进行测序, 测序工作在北京华大基因中心完成。

1.7 ESTs 序列分析

用 Phred 软件对峰图数据进行碱基质量控制, 碱基质量标准设为 Q20。获得的序列去除载体序列和宿主菌、线粒体、核糖体污染序列以及去载体后长度小于 100 bp 的小片段序列后, 得到 clean ESTs 序列; 用 Phrap 软件进行聚类拼接, 得到 unigenes 序列。

在 GenBank 的非冗余核酸数据库和非冗余蛋白数据库中, 利用 Blastn 和 Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 对获得的 unigenes 序列进行同源搜索, E 值 $< 10^{-5}$ 时, 序列间有较高的同源性^[20]。利用 COG 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) 检索与 unigenes 序列对应的功能基因的功能, 将获得的功能基因在 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>)^[21] 中分析它们参与的代谢途径。

2 结果

2.1 木榄叶片总 RNA 提取及 mRNA 纯化

采用改进的 CTAB 法提取的木榄叶片总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见清晰的 18S 和 28S rRNA 条带, 比值接近 1:2, 无明显拖尾现象 (图 1A), 总 RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 2.0$, 证明提取的总 RNA 无明显降解且纯度高。经磁珠法纯化的 mRNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 显示有均匀的 smear, 且多数分布在 1 kb 以上 (图 1B), 证明 mRNA 质量较好, 可用于 cDNA 文库构建。

2.2 双链 cDNA 合成

长链 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 发

现双链 cDNA 片段在 1~5 kb 之间呈 smear 分布, 并有一些亮度明显高于其它区域的特征性条带 (图 2), 表明双链 cDNA 合成效果良好。

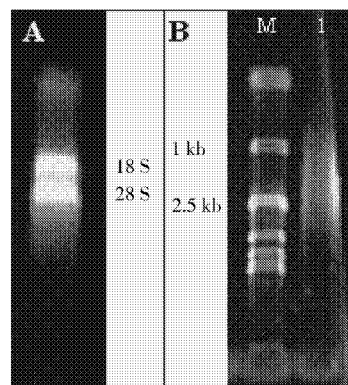


图 1 总 RNA (A) 和 mRNA (B) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Detection of the total RNA (A) and mRNA (B)

by 1% agarose gel electrophoresis

M: D15000 DNA marker

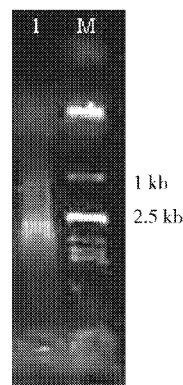


图 2 双链 cDNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Detection of the ds cDNA by 1% agarose gel electrophoresis

M: D15000 DNA marker

根据 LB 平板上的菌落数计算, 木榄叶片 cDNA 文库滴度为 10^6 cfu mL^{-1} , 菌落 PCR 扩增结果 (图 3) 显示文库的重组率为 94.4%, 且所有插入片段均大于 1 kb, 证明构建的木榄叶片 cDNA 文库质量良好。

2.3 ESTs 序列分析

从 cDNA 文库中随机挑选了 96 个重组克隆进行 5' 端测序, 得到 94 条原始 ESTs 序列, 去除载体序列和低质量序列 ($\leq 120 \text{ nt}$) 后得到 88 条 clean ESTs 序列, 它们的平均长度为 546.64 bp。这 88 个 ESTs 经序列聚类拼接得到 81 个 unigenes, 其中包含 5 个片段重叠群 (contig) 和 76 个单一序列 (singleton), 每个 contigs 含 2~3 条 ESTs, 冗余度为 7.95%。

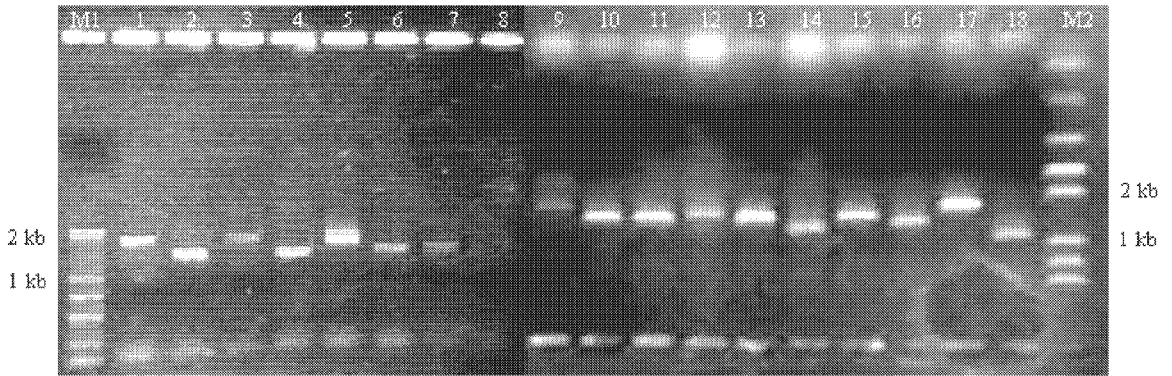


图 3 cDNA 文库的 PCR 扩增结果

Fig. 3 Analysis of the cDNA library by PCR amplification

M1: DL 2000 marker; M2: DL 2000 Plus marker; 1~18: 随机克隆 Random clones

2.4 Unigenes 的功能分析

利用 Blastx 对获得的 81 个 unigenes 进行了同源比对分析,结果表明这些 unigenes 与 Nr 数据库中已知的基因有较高的同源性($E \leq 10^{-5}$),其中有 54 个 unigenes 在 COG 数据库中有明确的功能注释:氨基酸运输和代谢(3 个,占 3.4%)、碳水化合物运输和代谢(7 个, 8.0%)、辅酶运输和代谢(2 个, 2.3%)、细胞骨架(2 个, 2.3%)、防御机制(1 个, 1.1%)、能量产生和转变(6 个, 6.8%)、一般功能预测(8 个, 9.1%)、无机离子运输和代谢(3 个, 3.4%)、胞内运输/分泌和囊泡运输(5 个, 5.7%)、脂质运输和代谢(3 个, 3.4%)、翻译后修饰/蛋白折叠和分子伴侣(4 个, 4.6%)、信号传导机制(4 个, 4.6%)、转录/复制/重组和修复(5 个, 5.7%)以及功能未知蛋白(1 个, 1.1%),其它 34 个 unigenes (38.6%)未找到对应的功能(表 1)。

将上述 54 个有明确功能注释的 unigenes 输入到 KEGG 数据库中进行分析,发现其中有 17 个 unigenes 分别参与了呼吸作用、光合作用、糖代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢以及不饱和脂肪酸生物合成等重要的生理过程,并涉及到机体的损伤修复、抗逆胞吞作用以及 PPAR 信号途径等(表 2)。

3 讨论

在本研究中,我们构建了 25‰ 盐度下生长的木榄幼苗叶片的高质量 cDNA 质粒文库,对 96 个随机克隆进行了 5' 端序列分析,对获得的 81 个 Unigenes 进行了生理功能和参与途径预测,为进一步深入了解木榄的遗传背景以及鉴定和克隆相关重要功能基因奠定了较好的工作基础。

已有研究探讨了氧化应激酶类在红树植物耐盐胁迫过程中的变化^[5-6],但关于红树植物中代谢酶类在盐胁迫过程中的变化尚未见报道,可能与对红树植物代谢相关酶类的基因序列或蛋白的认识较少有关。在本研究中,我们鉴定到 2 种编码戊糖磷酸途径的相关酶(果糖二磷酸醛缩酶和 5'-磷酸尿苷葡萄糖脱氢酶)的 unigene,前者可催化果糖-1,6-二磷酸与甘油醛-3-磷酸的互变,在糖酵解、戊糖磷酸途径以及果糖和甘露糖的代谢等途径中发挥着重要的作用。研究表明,植物戊糖磷酸途径中的关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与多种环境胁迫应答有关^[22-23],盐胁迫下水稻 (*Oryza sativa*)^[23] 和小麦 (*Triticum aestivum*)^[24] 的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的表达增强。在鉴定和克隆木榄的果糖二磷酸醛缩酶和 5'-磷酸尿苷葡萄糖脱氢酶基因的基础上,进一步分析它们在盐胁迫下的表达变化将有助于认识木榄的耐盐胁迫机理。

本研究中鉴定的脂酰-CoA 氧化酶 (acyl-CoA oxidase) 可催化脂酰-CoA 生成 Δ^2 -烯酰-CoA,在脂肪酸的 β -氧化过程中起着重要的作用^[25]。有研究表明,脂肪酸代谢可以通过影响吲哚乙酸和茉莉酸代谢途径来调节植物的生长发育和胁迫应答^[26],植物耐盐生长过程需要消耗大量的能量,如盐离子的跨膜运输、耐盐相关基因合成以及蛋白质的合成与降解等,我们推测由脂肪酸 β -氧化产生的能量对植物适应高盐环境具有重要的生理意义。

在本研究中鉴定的 SKP1^[27]、桂皮烯醛基辅酶 A 还原酶^[28]、DNA 修复蛋白 RAD 23-3^[29] 以及谷胱甘肽 S 转移酶^[5]等在植物适应胁迫环境过程中发挥着重要的作用,如:SKP1 是 single RING-finger

表 1 Unigenes 在 COG 数据库中的功能分类

Table 1 Functional cluster of the unigenes in COG database

克隆编号 Clone No.	收录号 Accession No.	单基因长 Unigene length (bp)	收录号 Accession No.	鉴定 Identity	得分 Score	E 值 E-value	NCBI 的 Nr 数据库中的 BlastX 分析 Blastx in NCBI Nr	
							功能注释 Functional annotation	功能注释 Functional annotation
氨基酸运输和代谢 Amino acid transport and metabolism								
hjdkab0_0002_C02	GR902325	661	EEF46521.1	90	179	2e-43	5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸高半胱氨酸甲基转移酶 5-Methyl tetrahydropteroyl triglutamate-homo-cysteine methyltransferase [长春花 <i>Ricinus communis</i>]	
hjdkab0_0002_C08	GR902331	635	XP_002321148.1	77	282	1e-74	硝酸盐载体, H ⁺ /寡肽共输送体 POT 家族 Nitrate transporter, H ⁺ /oligopeptide symporter POT family [白杨 <i>Populus trichocarpa</i>]	
hjdkab0_0002_C07	GR902330	623	EEF40526.1	85	308	3e-82	多肽载体 Peptide transporter [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
碳水化合物运输和代谢 Carbohydrate transport and metabolism								
hjdkab0_0002_D07	GR902342	589	XP_002315171.1	91	225	3e-68	水通道, MIP 家族, PIP 亚家族 Aquaporin, MIP family, PIP subfamily [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]	
hjdkab0_0002_E02	GR902313	651	EEF30862.1	88	251	4e-65	果糖二磷酸缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hjdkab0_0002_G07	GR902378	541	NP_180802.1	47	57	8e-07	半乳糖转移酶家族蛋白 Galactosyltransferase family protein [拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>]	
hjdkab0_0002_G12	GR902383	636	EEF52893.1	93	326	9e-88	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hjdkab0_0002_F10	GR902369	583	EEF43857.1	88	275	2e-72	乳酸谷胱甘肽裂解酶 Lactoylglutathione lyase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hjdkab0_0002_H07	GR902390	688	EEF43857.1	91	265	2e-88	乳酸谷胱甘肽裂解酶 Lactoylglutathione lyase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hjdkab0_0002_E02	GR902349	693	ABP04019.1	93	216	1e-54	5'-磷酸尿苷葡萄糖脱氢酶 UDP-glucose dehydrogenase [桉树 <i>Eucalyptus grandis</i>]	
辅酶运输和代谢 Coenzyme transport and metabolism								
hjdkab0_0002_B08	GR902319	631	BAB44157.1	99	274	5e-72	类脂酸合成酶 Lipoic acid synthase [木榄 <i>Bruguiera gymnorhiza</i>]	
hjdkab0_0002_E04	GR902351	698	EBAB44157.1	100	284	6e-75	类脂酸合成酶 Lipoic acid synthase [木榄 <i>B. gymnorhiza</i>]	
细胞骨架 Cytoskeleton								
hjdkab0_0002_B06	GR902317	625	ABO47740.1	98	254	3e-66	α -微管蛋白 α -Tubulin [陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>]	
hjdkab0_0002_C09	GR902332	596	EEF52197.1	95	231	4e-59	微管蛋白 α 链 Tubulin α chain [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
防御机制 Defense mechanisms								
hjdkab0_0002_H01	GR902384	670	EEF5783.1	78	278	3e-73	桂皮烯醛基辅酶 A 还原酶 Cinnamoyl-CoA reductase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
能量产生和转变 Energy production and conversion								
hjdkab0_0002_G02	GR902373	650	NP_194568.1	69	166	2e-39	ADP/ATP 载体 3, ATP-ADP 反向转运体 AAC3 (ADP/ATP carrier 3); ATP:ADP antiporter/binding [拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>]	
hjdkab0_0002_G11	GR902382	636	EEF51796.1	80	216	1e-54	AMP 激活蛋白激酶, γ 调节亚基 AMP-activated protein kinase, gamma regulatory subunit [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hjdkab0_0002_G06	GR902377	636	NP_054483.1	100	111	6e-23	ATP 合成酶 CF0 的 C 亚基 ATP synthase CF0 C subunit [烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>]	

续表 (Continued)

克隆编号		收录号		单基因长		NCBI 的 Nr 数据库中的 BlastX 分析 Blastx in NCBI Nr				功能注释		
Clone	No.	Accession	No.	length (bp)	Unigene	收录号	鉴定	得分	E 值	得分	E 值	Functional annotation
No.	No.	No.	No.			Accession No.	Identity	Score	E-value	Score	E-value	
hzjkab0_0002_A03		GR902303		692		AAQ72788.1	87	248	3e-64			超敏诱导反应蛋白 Hypersensitive-induced response protein [黄爪 <i>Cucumis sativus</i>]
hzjkab0_0002_B09		GR902320		685		AAF73006.1	77	239	2e-61			NADP 依赖的苹果蛋白 NADP-dependent malic protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]
hzjkab0_0002_C04		GR902327		638		EEF48334.1	99	182	2e-44			液泡 ATP 合成酶的 1,2,3 亚基 Vacuolar ATP synthase proteolipid subunit 1, 2, 3 [蓖麻 <i>R. communis</i>]
一般功能预测 General function prediction only												
hzjkab0_0002_C01		GR902324		691		EEF44561.1	98	312	2e-83			乙酰转移酶复合体 arcl1 亚基 Acetyltransferase complex arcl1 subunit [蓖麻 <i>R. communis</i>]
hzjkab0_0002_G05		GR902376		681		EEF47325.1	65	217	6e-55			乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase [蓖麻 <i>R. communis</i>]
hzjkab0_0002_D02		GR902337		663		EEF49509.1	91	292	2e-77			醛酮还原酶 Aldo-keto reductase [蓖麻 <i>R. communis</i>]
hzjkab0_0002_E07		GR902354		583		AAO37645.1	64	150	7e-35			NBS-LRR 抗性蛋白 RGHI NBS-LRR resistance protein RGHI [木薯 <i>Manihot esculenta</i>]
hzjkab0_0002_D09		GR902344		589		NP_001151178.1	59	163	8e-39			磷酸酶 DCR2 Phosphatase DCR2 [玉米 <i>Zea mays</i>]
hzjkab0_0002_F02		GR902361		713		NP_001148933.1	61	96.3	2e-18			纤溶酶原激活抑制剂 1RNA 结合蛋白 Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein [玉米 <i>Z. mays</i>]
hzjkab0_0002_F08		GR902367		594		AAQ72787.1	99	262	2e-68			假定的 GTP 结合蛋白 Putative GTP-binding protein [黄爪 <i>Cucumis sativus</i>]
hzjkab0_0002_D04		GR902339		656		EEF48805.1	53	84.3	8e-15			Yth 结构域包含蛋白 Yth domain-containing protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]
无机离子运输和代谢 Inorganic ion transport and metabolism												
hzjkab0_0002_F06		GR902365		621		EEF37661.1	79	288	2e-76			碳酸酐酶 Carbonic anhydrase [蓖麻 <i>R. communis</i>]
hzjkab0_0002_B12		GR902323		659		XP_0023332052.1	94	307	6e-82			镁离子转运体 Magnesium transporter [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]
hzjkab0_0002_H11		GR902394		671		XP_002312786.1	88	291	4e-77			细胞外膜孔道蛋白/电压依赖阴离子选择性通道蛋白 Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]
胞内运输、分泌和囊泡运输 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport												
hzjkab0_0002_F07		GR902366		611		AAM61431.1	89	208	3e-52			发育蛋白 Developmental protein [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]
hzjkab0_0002_B11		GR902322		679		AAD55650.1	92	179	9e-50			与发育蛋白 DG1118 高相似的蛋白 Highly similar to developmental protein DG1118 [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]
hzjkab0_0002_C06		GR902329		584		NP_568351.1	62	186	1e-45			PEX19-2 [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]
hzjkab0_0002_D10		GR902345		583		EEF37234.1	82	239	5e-62			受体表达增强蛋白 Receptor expression-enhancing protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]
hzjkab0_0002_D08		GR902343		552		EEF41263.1	87	199	8e-50			小囊泡相关的膜蛋白 Vesicle-associated membrane protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]
脂质运输和代谢 Lipid transport and metabolism												
hzjkab0_0002_A04		GR902304		655		AAL01888.1	88	155	3e-44			乙酰辅酶 A 氧化酶 Acyl-CoA oxidase [大豆 <i>Glycine max</i>]
hzjkab0_0002_D05		GR902340		646		EEF44462.1	71	206	1e-51			环氧化物水分解酶 Epoxide hydrolase [蓖麻 <i>R. communis</i>]

续表 (Continued)

克隆编号 Clone No.	收录号 Accession No.	单基因长 Unigene length (bp)	收录号 Accession No.	鉴定 Identity	得分 Score	E 值 E-value	NCBI 的 Nr 数据库中的 BlastX 分析 Blastx in NCBI Nr	
							功能注释 Functional annotation	功能注释 Functional annotation
hzjkab0_0002_B10	GR902321	660	NP_177742.2	73	232	2e-59	macC 样脱水酶结构域包含蛋白 MaoC-like dehydratase domain-containing protein [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
翻译后修饰、蛋白折叠和分子伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones								
hzjkab0_0002_A01	GR902301	626	EEF44983.1	65	209	2e-52	ATP 结合蛋白 ATP binding protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_A12	GR902311	636	EEF29553.1	80	258	3e-67	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_H19	GR902392	553	ABS17589.1	89	228	2e-58	S 期激酶相关蛋白 1 SKP1 component-like 1 [啤酒花 <i>Humulus lupulus</i>]	
hzjkab0_0002_G10	GR902381	564	NP_001148325.1	91	174	3e-42	泛素样蛋白 SMT3 Ubiquitin-like protein SMT3 [玉米 <i>Z. mays</i>]	
信号传导机制 Signal transduction mechanisms								
hzjkab0_0002_E06	GR902353	623	ABI91231.1	69	174	5e-66	CBL 相互作用蛋白激酶 25 CBL-interacting protein kinase 25 [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]	
hzjkab0_0002_F05	GR902364	670	AAQ14867.1	83	244	5e-63	细胞分裂素激活的蛋白激酶 2 Mmitogen-activated protein kinase 2 [大豆 <i>G. max</i>]	
hzjkab0_0002_F11	GR902370	635	AAC36698.1	49	79.7	2e-13	蛋白磷酸酶 2C Protein phosphatase-2C; PP2C [冰叶日中花 <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	
hzjkab0_0002_B07	GR902318	607	EEF50687.1	85	296	6e-79	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Serine/threonine protein kinase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
转录、复制、重组和修复 Transcription, replication, recombination and repair								
hzjkab0_0002_F03	GR902362	670	NP_186903.1	73	265	3e-69	假定的 DNA 修复蛋白 RAD 23-3, 损伤 DNA 结合蛋白 Putative DNA repair protein RAD 23-3; damaged DNA binding [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_H03	GR902386	666	NP_197491.2	86	246	1e-63	SOHL 家族蛋白 SOHL family protein [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_H04	GR902387	687	EEF49927.1	68	128	4e-28	真核翻译起始因子亚基 3 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_E03	GR902350	675	NP_568559.2	73	259	1e-67	核糖核酸外切酶相关蛋白 Exoribonuclease-related [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_C03	GR902326	623	XP_002298606.1	56	68.2	5e-10	预测蛋白 Predicted protein [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]	
功能未知 Function unknown								
hzjkab0_0002_B05	GR902316	689	EEF52186.1	97	357	7e-97	泛素折叠修饰耦合酶 Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
COG 中无功能匹配 NO match in COG								
hzjkab0_0002_E05	GR902352	628	EEF51019.1	89	88.2	5e-16	氨基酸结合蛋白 Amino acid binding protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_C10	GR902333	685	NP_175697.1	86	268	2e-70	NAC 结构域包含蛋白 19, 转录因子 NAC domain containing protein 19; transcription factor [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_G09	GR902380	658	EEF49507.1	81	305	3e-81	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_B04	GR902315	672	BAB60850.1	98	363	7e-99	BUJP 结构域包含蛋白 BUJP domain-containing protein [木槿 <i>B. gymnorhiza</i>]	
hzjkab0_0002_D12	GR902347	581	BAB60849.1	100	266	8e-70	BUJP 结构域包含蛋白 BUJP domain-containing protein [木槿 <i>B. gymnorhiza</i>]	
hzjkab0_0002_H02	GR902385	672	BAB60849.1	100	284	5e-75	BUJP 结构域包含蛋白 BUJP domain-containing protein [木槿 <i>B. gymnorhiza</i>]	

续表 (Continued)

克隆编号 Clone No.	收录号 Accession No.	单基因长 Unigene length (bp)	收录号 Accession No.	鉴定 Identity	得分 Score	E 值 E-value	NCBI 的 Nr 数据库中的 BlastX 分析 Blastx in NCBI Nr	
							功能注释 Functional annotation	功能注释 Functional annotation
hzjkab0_0002_F12	GR902371	581	BAB60848.1	90	214	4e-54	BURP 结构域包含蛋白 BURP domain-containing protein [木榄 <i>B. gymnorhiza</i>]	
hzjkab0_0002_H08	GR902391	682	ABO41834.1	65	90.5	1e-16	咖啡酸甲基转移酶 Caffeic acid methyltransferase [雷蒙德氏棉 <i>G. raimondii</i>]	
hzjkab0_0002_E03	GR902314	622	EEF37774.1	93	310	5e-83	叶绿素 A/B 结合蛋白 Chlorophyll A/B binding protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_E12	GR902359	587	EEF42958.1	64	249	8e-65	保守的假定蛋白 Conserved hypothetical protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_C11	GR902334	661	NP_176207.1	58	110	1e-22	DEAD/DEAH 盒解螺旋酶 DEAD/DEAH box helicase [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_A0	GR902307	661	NP_172893.1	57	190	8e-47	DNA 结合/端粒 DNA 结合蛋白 DNA binding / telomeric DNA binding [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_F04	GR902363	646	EEF29680.1	80	163	1e-38	内膜相关蛋白 Endomembrane-associated protein [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_H10	GR902393	612	EEF50261.1	45	114	8e-24	乙烯响应转录因子 Ethylene-responsive transcription factor [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_D06	GR902341	612	EEF38355.1	76	125	2e-27	叶绿体中铁氧还蛋白的前体 Ferredoxin-3, chloroplast precursor [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_D01	GR902336	626	XP_002275792.1	55	137	9e-31	假定蛋白 Hypothetical protein [葡萄 <i>Vitis vinifera</i>]	
hzjkab0_0002_E08	GR902355	610	BAF01343.1	51	93.6	1e-17	假定蛋白 Hypothetical protein [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_E11	GR902358	611	EEF41623.1	55	177	6e-43	假定蛋白 RCOM_0555330 Hypothetical protein RCOM_0555330 [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_E09	GR902356	646	BAG68655.1	41	84.7	6e-15	茉莉酮 ZIM 结构域蛋白 1 Jasmonate ZIM-domain protein 1 [烟草 <i>N. tabacum</i>]	
hzjkab0_0002_G08	GR902379	545	BAG68655.1	41	84.7	4e-15	茉莉酮 ZIM 结构域蛋白 1 Jasmonate ZIM-domain protein 1 [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_E01	GR902348	685	BAG68655.1	41	84.7	7e-15	茉莉酮 ZIM 结构域蛋白 3 Jasmonate ZIM-domain protein 3 [烟草 <i>N. tabacum</i>]	
hzjkab0_0002_G04	GR902375	658	NP_566590.1	49	85.9	3e-15	茉莉酮 ZIM 结构域蛋白 3 Jasmonate ZIM-domain protein 3 [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_E10	GR902357	589	NP_197608.1	82	256	1e-66	富含亮氨酸重复单元的蛋白 Leucine-rich repeat protein [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_F01	GR902360	617	XP_002306280.1	75	184	4e-45	NAC 结构域蛋白 IPR003441 NAC domain protein, IPR003441 [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]	
hzjkab0_0002_A02	GR902302	635	EEF42077.1	64	134	5e-30	O-甲基转移酶 O-methyltransferase [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_G01	GR902372	658	NP_565288.1	56	166	2e-39	PLPB(PAS/LOV 蛋白 B), 信号传导子/双元传感器 PLPB (PAS/LOV protein B); signal transducer/ two-component sensor [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_B01	GR902312	667	XP_002329261.1	83	197	5e-49	预测蛋白 Predicted protein [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]	
hzjkab0_0002_H05	GR902388	619	XP_002315013.1	73	204	6e-51	预测蛋白 Predicted protein [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]	
hzjkab0_0002_H06	GR902389	639	XP_002307800.1	56	66.6	2e-09	预测蛋白 Predicted protein [白杨 <i>P. trichocarpa</i>]	
hzjkab0_0002_A06	GR902306	669	NP_200004.1	71	115	2e-31	TCP 家族转录因子 TCP family transcription factor [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_F09	GR902368	519	NP_683291.2	59	63.2	1e-08	未知蛋白 Unknown protein [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_A08	GR902308	679	NP_179079.1	79	348	2e-94	VSP-2, 钙离子结合蛋白 VSR-2; calcium ion binding [拟南芥 <i>A. thaliana</i>]	
hzjkab0_0002_A10	GR902309	660	EEF36169.1	89	287	5e-76	木葡聚糖水解酶蛋白 22 前体 Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 [蓖麻 <i>R. communis</i>]	
hzjkab0_0002_D03	GR902338	658	EEF36165.1	76	244	3e-63	木葡聚糖水解酶蛋白 22 前体 Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22 precursor [蓖麻 <i>R. communis</i>]	

表 2 Unigenes 参与的途径

Table 2 The unigenes participated in the pathways

克隆编号 Clone No.	收录号 Accession No.	单基因 Unigene	途径 Pathway
hzjkab0_0002_G09	GR902380	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism
hzjkab0_0002_G12	GR902383	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase	光合生物中的碳固定 Carbon fixation in photosynthetic organisms
hzjkab0_0002_F07	GR902366	发育蛋白 Developmental protein	胞吞作用 Endocytosis
hzjkab0_0002_B11	GR902322	与发育蛋白 DG1118 高相似性蛋白 Highly similar to developmental protein DG1118	胞吞作用 Endocytosis
hzjkab0_0002_A04	GR902304	乙酰辅酶 A 氧化酶 Acyl-CoA oxidase	脂肪酸代谢、 α -亚油酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成和 PPAR 信号途径 Fatty acid metabolism, α -linolenic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, PPAR signaling pathway
hzjkab0_0002_B02	GR902313	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase	糖酵解、戊糖磷酸途径、果糖和甘露糖代谢、光合生物的碳固定 Glycolysis, pentose phosphate pathway, fructose and mannose metabolism, carbon fixation in photosynthetic organisms
hzjkab0_0002_B08	GR902319	类脂酸合成酶 Lipoic acid synthase	类脂酸代谢 Lipoic acid metabolism
hzjkab0_0002_E04	GR902351	类脂酸合成酶 Lipoic acid synthase	类脂酸代谢 Lipoic acid metabolism
hzjkab0_0002_C02	GR902325	5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸高半胱氨酸甲基转移酶 5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	甲硫氨酸代谢 Methionine metabolism
hzjkab0_0002_F05	GR902364	细胞分裂素激活的蛋白激酶 Mitogen-activated protein kinase 2	自然杀伤细胞介导的细胞毒 Natural killer cell mediated cytotoxicity
hzjkab0_0002_F06	GR902365	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	氮代谢 Nitrogen metabolism
hzjkab0_0002_F03	GR902362	假定的 DNA 修复蛋白 23-3, 损伤 DNA 结合蛋白 Putative DNA repair protein RAD 23-3; damaged DNA binding	核苷酸切除修复 Nucleotide excision repair
hzjkab0_0002_G06	GR902377	ATP 合成酶 CF0 C 亚基 ATP synthase CF0 C subunit	氧化磷酸化、光合作用 Oxidative phosphorylation, photosynthesis
hzjkab0_0002_E02	GR902349	5'-磷酸尿苷葡萄糖脱氢酶 UDP-glucose dehydrogenase	戊糖和葡萄糖醛酸互变、淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷糖代谢 Pentose and glucuronate interconversions, starch and sucrose metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism
hzjkab0_0002_D06	GR902341	叶绿体中铁氧还蛋白的前体 Ferredoxin-3, chloroplast precursor	光合作用 Photosynthesis
hzjkab0_0002_B09	GR902320	NADP 依赖的苹果蛋白 NADP-dependent malic protein	丙酮酸代谢、光合生物的碳固定 Pyruvate metabolism, Carbon fixation in photosynthetic organisms
hzjkab0_0002_H09	GR902392	S 期激酶相关蛋白 1 SKP1 component-like 1	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis

型泛素连接酶(E3)的重要组成部分,催化泛素的 C-末端与目的蛋白的 Lys 残基结合,结合后被 26S 蛋白酶识别并降解,在蛋白质的合成和降解过程中发挥着重要的作用。大量研究表明,泛素/26S 蛋白酶途径参与了茉莉酸反应^[27]、生长素反应^[30]以及细胞周期调控^[31]等重要生理过程,在植物生长发育中有重要作用。植物遭受盐胁迫时会产生大量的异常蛋白,SKP1 等与泛素/26S 蛋白酶途径相关蛋白的表达能维持植物的正常生长发育。本研究还鉴定了另外两个与植物胁迫反应有关的蛋白:超敏诱导反应蛋白(hypersensitive-induced response protein)和 NBS-LRR 抗性蛋白 RGHI (NBS-LRR resistance protein RGHI),它们在木榄适应盐胁迫的过程中可能也具有重要的作用。

木榄幼苗叶片 cDNA 文库的构建和部分 EST 序列的分析为相关功能基因的鉴定和克隆奠定了较好的基础。研究木榄上述功能基因在盐胁迫下的表达将有助于揭示耐盐植物适应盐环境的分子机理。

致谢 本工作中的 EST 序列分析工作得到华大基因公司董伟博士的大力支持,谨此致谢。

参考文献

- [1] Lin P(林鹏). A review on the mangrove research in China [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci) (厦门大学学报:自然科学版), 2001, 40(2): 592-603.(in Chinese)
- [2] Kathiresan K, Bingham B L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems [J]. Adv Mar Biol, 2001, 40: 81-251.
- [3] Waditee R, Hibino T, Tanaka Y, et al. Functional characterization of betaine/proline transporters in betaine-accumulating mangrove [J]. Biol Chem, 2002, 277(21): 18373-18382.
- [4] Mimura T, Kura-Hotta M, Tsujimura T, et al. Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress [J]. Planta, 2003, 216(3): 397-402.
- [5] Parida A K, Das A B, Mohanty P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*. Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes [J]. Plant Physiol, 2004, 161(5): 531-542.
- [6] Takemura T, Hanagata N, Sugihara K, et al. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza* [J]. Aqua Bot, 2000, 68(1): 15-28.
- [7] Cram W J, Torr P G, Rose D A. Salt allocation during leaf development and leaf fall in mangroves [J]. Trees, 2002, 16(2/3): 112-119.
- [8] Macnae W. A general account of the fauna and flora of mangrove swamps and forests in the Indo-West-Pacific region [J]. Adv Mar Biol, 1968, 6: 73-270.
- [9] Wang W, Xiao Y, Chen L, et al. Leaf anatomical responses to periodical waterlogging in simulated semidiurnal tides in mangrove *Bruguiera gymnorhiza* seedlings [J]. Aquat Bot, 2007, 86(3): 223-228.
- [10] Nandy (Datta) P, Das S, Ghose M, et al. Effects of salinity on photosynthesis, leaf anatomy, ion accumulation and photosynthetic nitrogen use efficiency in five Indian mangroves [J]. Wetlands Ecol Manag, 2007, 15(4): 347-357.
- [11] Parida A K, Das A B, Mitra B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora* [J]. Trees, 2004, 18(2): 167-174.
- [12] Naidoo G. Effects of nitrate, ammonium and salinity on growth of the mangrove *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam [J]. Aquat Bot, 1990, 38(2/3): 209-219.
- [13] Miyama M, Shimizu H, Sugiyama M, et al. Sequencing and analysis of 14842 expressed sequence tags of Burma mangrove, *Bruguiera gymnorhiza* [J]. Plant Sci, 2006, 171(2): 234-241.
- [14] Miyama M, Hanagata N. Microarray analysis of 7029 gene expression patterns in Burma mangrove under high-salinity stress [J]. Plant Sci, 2007, 172(5): 948-957.
- [15] Takemura T, Hanagata N, Dubinsky Z, et al. Molecular characterization and response to salt stress of mRNAs encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and catalase from *Bruguiera gymnorhiza* [J]. Trees, 2002, 16(2-3): 94-99.
- [16] Banzai T, Hershkovits G, Katcoff D J, et al. Identification and characterization of mRNA transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differential display in the mangrove, *Bruguiera gymnorhiza* [J]. Plant Sci, 2002, 162(4): 499-505.
- [17] Liu R(刘睿), Sun W(孙伟), Cao M X(巢牡香), et al. Leaf anatomical changes of *Bruguiera gymnorhiza* seedlings under salt stress [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2009, 17(2): 169-175.(in Chinese)
- [18] Schuler G D. Pieces of the puzzle: Expressed sequence tags and the catalog of human genes [J]. J Mol Med, 1997, 75(10): 694-698.
- [19] Fu X H, Deng S L, Su G H, et al. Isolating high-quality RNA from mangroves without liquid nitrogen [J]. Plant Mol Biol Rep, 2004, 22(2): 197a-197e.
- [20] Fung M C, Lau M T, Chen X G. Expressed sequence tag (EST) analysis of a *Schistosoma japonicum* cercariae cDNA library [J]. Acta Trop, 2002, 82(2): 215-224.
- [21] Ogata H, Goto S, Sato K, et al. Kegg: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. Nucl Acid Res, 1999, 27(1): 29-34.
- [22] Sindelar L, Sindelarova M, Burketova L. Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts [J]. Plant Physiol Biochem, 1999, 37(3): 195-201.
- [23] Huang J, Zhang H S, Wang J F, et al. Molecular cloning and characterization of rice 6-phosphogluconate dehydrogenase gene that is up-regulated by salt stress [J]. Mol Biol Rep, 2003, 30(4): 223-227.
- [24] Nemoto Y, Sasakuma T. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PDH*) gene by salt stress in wheat

- [J]. *Plant Sci*, 2000, 158(1/2): 53–60.
- [25] Cooper T G, Beevers H. Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm [J]. *Biol Chem*, 1969, 244(13): 3514–3520.
- [26] Schaller F, Schaller A, Stintzi A. Biosynthesis and metabolism of jasmonates [J]. *Plant Growth Regul*, 2005, 23(3): 179–199.
- [27] Turner J G, Ellis C, Devoto A. The jasmonate signal pathway [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 153–164.
- [28] Humphreys J M, Chapple C. Rewriting the lignin roadmap [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(3): 224–229.
- [29] Prakash S, Prakash L. Nucleotide excision repair in yeast [J]. *Mut Res Fund Mol Mech Mutag*, 2000, 451(1/2): 13–24.
- [30] Gray W M, del Pozo J C, Walker L, et al. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genes*, 1999, 13(13): 1678–1691.
- [31] Ren H, Santner A, del Pozo J C, et al. Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases [J]. *Plant*, 2008, 53(5): 705–716.