

苹果 PGIP 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

熊 帅,张军科,谌 悦

(西北农林科技大学 园艺学院,农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】从富士苹果幼果果实中克隆多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(PGIP)基因,并进行原核表达,为进一步研究 PGIP 的生物学功能奠定基础。【方法】根据 Genbank 中已经发表的苹果 PGIP 基因序列设计引物,采用 RT-PCR 从苹果果实中扩增 PGIP 基因 cDNA,回收目的基因片段并连接到 pMD18-T 载体,鉴定后进行测序。然后将 PGIP 全长 cDNA 和去信号肽的 cDNA 导入到 pET-32a(+)表达载体中,分别获得融合表达质粒 pET-PGIP 和 pET-PGIP-X,将其分别转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,用不同终浓度 IPTG 进行诱导表达,收集表达产物并进行 SDS-PAGE 电泳。对 pET-PGIP-X 基因工程菌表达产物的可溶性进行检测。【结果】苹果 PGIP cDNA 序列长为 1 091 bp,编码区为 993 bp,可编码 330 个氨基酸残基,将其命名为 *MaPGIP*;重组表达质粒 pET-PGIP 和 pET-PGIP-X 在宿主大肠杆菌中分别表达出分子质量约 49.6 和 46.1 ku 的融合蛋白,pET-PGIP-X 表达产物以包涵体的形式存在。【结论】成功克隆了苹果 PGIP 基因,并在大肠杆菌中获得高效表达。

[关键词] 苹果;多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白;基因克隆;内源多聚半乳糖醛酸酶

[中图分类号] S661.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)02-0123-06

Cloning of PGIP gene from *Malus domestica* M. and its fusion expression in *E. coli*

XIONG Shuai,ZHANG Jun-ke,SHEN Yue

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Key Lab of Northwestern Horticultural Germplasm Resource Application of Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】In order to lay a foundation for the study of the biological function of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), PGIP gene was cloned from apple fruit and its prokaryotic expression was induced by IPTG. 【Method】A pair of specific primers were designed according to the conserved sequences of apple PGIP genes in GenBank. The cDNA of apple PGIP gene was amplified from fruit by RT-PCR and cloned into plasmid of pMD18-T, then identified by sequencing. The full-length cDNA and the cDNA excluding signal peptide were respectively constructed into expression plasmid pET-32a(+), and the recons were respectively named pET-PGIP and pET-PGIP-X. Then the recombinant plasmid pET-PGIP and pET-PGIP-X were transformed into host bacterium BL21 and their expression were induced by different concentrations of IPTG. Expression products were analyzed by SDS-PAGE. The pET-PGIP-X expression product was detected by solubility analysis. 【Result】The results of sequencing and bioinformatical analysis showed that this fragment was 1 091 bp, including a 993 bp complete ORF, encoding 330 amino acid, which was named *MaPGIP*. The results of SDS-PAGE showed that the recombinant plasmid pET-PGIP and pET-PGIP-X could express interest protein and the molecular weight of which was 49.6 ku and 46.1 ku. Signal

* [收稿日期] 2009-06-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30671447)

[作者简介] 熊 帅(1983—),男,河南信阳人,在读硕士,主要从事果树抗逆基因克隆及功能研究。

[通信作者] 张军科(1969—),男,甘肃灵台人,副教授,硕士生导师,主要从事果树生物技术及抗性育种研究。

E-mail: zhangjk@nwsuaf.edu.cn

peptide excised protein expressed by pET-PGIP-X mainly existed in the form of inclusion bodies.【Conclusion】Apple PGIP gene was successfully cloned and high level expression existed in *E. coli*.

Key words: *Malus domestica* Mill; polygalacturonase-inhibiting protein; gene cloning; Endo-polygalacturonase

植物细胞壁可以有效地阻碍植物病原真菌的侵染,但植物病原真菌可分泌一系列的酶来降解植物细胞壁。内源多聚半乳糖醛酸酶(Endo-polygalacturonase, Endo-PG)即是病原真菌侵染寄主植物时所分泌的第一种酶,其能降解细胞初生壁中多聚半乳糖醛酸及其部分甲酯化衍生物,从而导致细胞液外渗,诱发植物发病^[1]。多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(Polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP)是存在于多种植物细胞壁中的一种糖蛋白,能专一性地抑制真菌 Endo-PG 酶活性,促进植物体内寡聚半乳糖醛酸的积累,从而可以有效地阻断真菌的侵染过程,抑制相应病害的发生^[2]。PGIP 还与果实的发育过程、胁迫反应、冷藏、浆果果实的病虫害等有一定的相关性^[3],因此 PGIP 受到国内外研究者的高度重视,并成为目前抗病虫害基因工程和果实耐贮藏基因工程研究的焦点。目前,研究者已从大豆^[4]、梨^[5]、树莓^[6]、梅^[7]、马哈利樱桃^[8]等植物中克隆出了 PGIP 基因,并进行了相应的功能研究。

苹果是我国北方栽培面积较大的果树品种之一,但长期以来遭受着各种病虫害和非生物逆境的威胁,其中以真菌病害居多,常见的主要有轮纹病、腐烂病、炭疽病、白粉病和黑点病等^[9]。因此,开展苹果 PGIP 基因克隆及转基因研究具有重要的理论和实践意义,而目前此方面的研究鲜见报道。为此,本研究对富士苹果幼果果实 PGIP cDNA 进行了克隆和生物信息学分析,并构建原核表达载体,在大肠杆菌中进行表达,以期 PGIP 的抑菌活性及其与多聚半乳糖醛酸酶 PGs 的相互作用等生物学功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为富士苹果(*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji)的幼果,取自西北农林科技大学园艺试验场,用液氮速冻后放入-70℃冰箱中保存待用。

M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒、rTaq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I、T/A 克隆载体 pMD18-T、T4 DNA 连接酶,均购自大连宝生物技术工程有限公司;表达载体

pET-32a(+)、宿主大肠杆菌 DH5 α 、BL21,均由西北农林科技大学园艺学院生物技术实验室保存。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中已经发表的苹果属植物的 PGIP 保守区域,设计 1 对特异引物,PGIPF1:5'-ACCCAAAACAATGGAAGTCAAG-3', PGIPR1:5'-CCATGACTGGTCGCTTATTTG-3',引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 苹果总 RNA 的提取

苹果幼果 RNA 的提取采用 SDS/热酚法^[10]。

1.4 苹果 PGIP 基因的 RT-PCR 扩增与测序

以提取的总 RNA 为模板,用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒,在 Oligo d(T)引物引导下,反转录合成 cDNA 第一条链,具体操作参照试剂盒说明书进行。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25 μ L:10 $\times$ PCR Taq buffer 2.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, dNTP (10 mmol/L)0.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L, rTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.3 μ L, 模板 DNA (50 ng/ μ L)0.5 μ L, ddH₂O 18.2 μ L。反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳分析后,用博大泰克胶回收试剂盒回收目的片段,将回收产物与克隆载体 pMD18-T 在 Ligation Mix 连接液中 16℃连接过夜。将连接物转化感受态细胞 DH5 α ,在含有 X-gal 和氨苄青霉素(Amp)的选择性培养基上进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落摇菌培养后,进行菌液 PCR(反应体系及程序同上),并将鉴定为阳性的克隆送上海生工生物工程有限公司测序,将正确的克隆载体命名为 pMD18-T-PGIP。

1.5 目的基因片段的序列分析

利用 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行相似性搜索;用 DNAMAN 软件分析 PGIP ORF,推导氨基酸序列,预测该蛋白质的分子质量、等电点、亲水性和疏水性,并分析序列同源性;用 SignalP 3.0 Server 预测信号肽。

1.6 苹果 PGIP 基因原核表达载体的构建

根据对原核表达载体 pET-32a(+)多克隆位点

和重组克隆载体 pMD18-T-PGIP 酶切位点分析,设计 2 对 PGIP 扩增引物,在上、下游引物 5' 端分别引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点,引物序列如下:

PGIPF01:5'-CT GGATCC ATGGA AACTCAAGT TCTCC-3',PGIPR01:5'-TT GTCGAC TACTTGCAG CTTGGGAG-3';PGIPF02: 5'-CT GGATCC ATGGA TCTCTGCAACCCC-3',PGIPR02: 5'-TT GTCGAC T TACTTGCAGCTTGGGAG-3'(下划线部分为酶切位点)。其中 PGIPF01 和 PGIPR01 用于扩增含有信号肽序列的目的片段;PGIPF02 和 PGIPR02 用于扩增切除信号肽序列的目的片段。以重组克隆载体 pMD18-T-PGIP 为模板,分别扩增带有信号肽和不含信号肽的目的片段。PCR 反应体系 25 μ L:10 $\times$ PCR *Taq* buffer 2.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,dNTP (10 mmol/L)0.5 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L,*rTaq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.3 μ L,质粒 DNA 1.0 μ L,ddH₂O 17.7 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,64 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收 PCR 产物,酶切后纯化的目的片段,与酶切纯化的 pET-32a(+)空载体产物经 T4 DNA 连接酶相连,连接产物转化感受态细胞 DH5 α 。分别随机挑取阳性菌落摇菌,提取质粒进行 PCR 扩增和 *Bam*H I 与 *Sal* I 双酶切鉴定。经鉴定正确的克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序,重组质粒分别命名为 pET-PGIP(含信号肽)和 pET-PGIP-X(切除信号肽)。

1.7 重组载体 pET-PGIP 和 pET-PGIP-X 的诱导表达

将原核表达载体 pET-PGIP 和 pET-PGIP-X 分别转化表达菌株 *E. coli* BL21,进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的重组菌置于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜后,按 1:100 的比例(体积比)接种于相同的 LB 培养基,培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0 时,加 IPTG 至终浓度分别为 0.01,0.1,0.3,0.5,1.0 和 2.0 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导表达。于诱导表达后 6 h,分别取菌液 2 mL,12 000 r/min 室温离心 1 min,弃去上清液,用 100 μ L 1 $\times$ SDS 上样缓冲液重悬沉淀,沸水浴 3 min,12 000 r/min 室温离心 1 min,取 20 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 电泳,检测蛋白表达情况。

1.8 目的蛋白的可溶性分析

将含表达载体 pET-PGIP-X 的菌液用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 分别于 15,25 和 37 $^{\circ}$ C 条件下诱导 20 h,取 2 mL 菌液,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15

min,弃上清液,加入细菌裂解液 Super Elysis Solution,超声波破碎至菌液变澄清,离心,分别收集上清液和沉淀。向上清液和沉淀中分别加入等体积 SDS-PAGE 上样缓冲液(1 倍稀释),沸水浴 5 min 后,立即冰浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳,检测目的融合蛋白的可溶性。

2 结果与分析

2.1 苹果 PGIP 基因的 RT-PCR 扩增与生物信息学分析

以富士苹果果实总 RNA 为模板,通过 RT-PCR,获得了预期长度(1 100 bp)的 cDNA 片段(图 1)。将该片段克隆到 pMD18-T 载体后,经酶切、PCR 和测序鉴定,该 cDNA 序列全长为 1 091 bp,ORF 为 993 bp,编码 1 个由 330 个氨基酸残基组成的蛋白质(图 2),其中酸性氨基酸 27 个(约占 8.2%),碱性氨基酸 27 个(约占 8.2%);中性亲水氨基酸 120 个(约占 36.3%),中性疏水氨基酸 109 个(约占 33.3%);亮氨酸最多,为 63 个(约占 19.1%)。经 BLAST 比对,发现本试验所克隆的 PGIP 基因,与 GenBank 公布的苹果 PGIP 基因核苷酸序列同源性为 99%,将其命名为 *Ma*PGIP。将该基因编码的氨基酸序列分别采用隐马尔科夫模型和神经网络方式进行信号肽预测,结果均表明该蛋白质信号肽为 N 端的 24 个氨基酸残基,蛋白质裂解点位于第 24 位丝氨酸(Ser)与第 25 位精氨酸(Asp)残基之间。

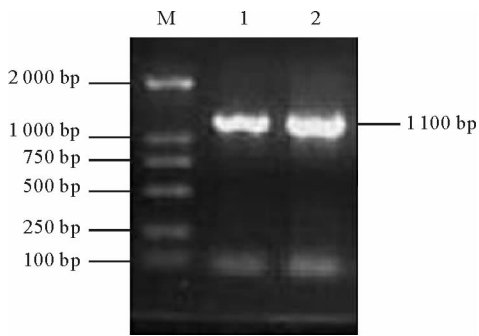


图 1 苹果 PGIP 基因片段的 RT-PCR
M. DNA Marker;1~2. 苹果 PGIP 基因 RT-PCR 产物
Fig.1 Apple PGIP gene fragment acquired by RT-PCR
M. DNA Marker;1-2. Apple PGIP products by RT-PCR

2.2 苹果 PGIP 基因原核表达载体的鉴定

构建的表达载体 pET-PGIP(含信号肽)和 pET-PGIP-X(切除信号肽)均经 *Bam*H I 与 *Sal* I 双酶切,分别得到约 1 000 bp(图 3)和 900 bp(图 4)的片段,长度与预期结果相同,说明目的基因已经整合到 pET-32a(+)载体上。测序结果表明,目的片

段序列无误,插入表达载体的位置和读码框正确。



图 2 苹果 PGIP 基因 cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

粗下划线部分为信号肽序列;浅阴影为亮氨酸重复单位(LRR)基序,其中下划线部分为核心基序序列;
深阴影为发生突变的氨基酸;ATG 为起始密码子;TAA 为终止密码子

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of apple PGIP cDNA

Bold underlined sequence indicates the signal peptide;Thin underlined sequence indicates the LRR core motif ;Light shadow sequence indicates the LRR motif;Deep shadow indicates mutated amino acid;ATG indicates the start codon;TAA indicates the stop codon

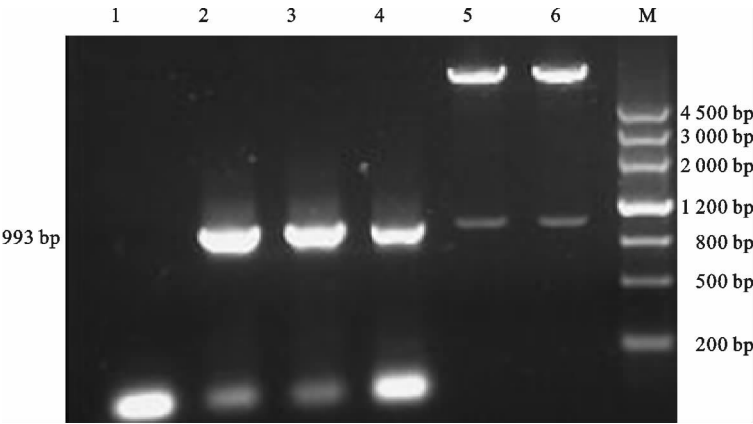


图 3 苹果 PGIP 基因重组质粒 pET-PGIP 的 PCR 和酶切鉴定

M. DNA Marker;1. 空质粒 pET-32a(+) 的 PCR 产物;2~4. PCR 产物;5,6. pET-PGIP 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切产物

Fig. 3 PCR and restriction identification of apple PGIP gene recombinant pET-PGIP

M. DNA Marker;1. Amplification of plasmid pET-32a(+) by PCR;2—4. PCR product;5,6. pET-PGIP digested with *Bam*H I and *Sal* I

2.3 苹果 PGIP 基因在大肠杆菌中的诱导表达

融合表达工程菌 pET-PGIP 和 pET-PGIP-X 在 37 °C 下诱导后,与空载体对照菌相比,分别在分子质

量约为 49.6 ku(图 5)和 46.1 ku(图 6,包括硫氧还蛋白 12 ku)处出现了新的蛋白条带,与预期结果相符,说明 2 种融合蛋白在 *E. coli* BL21 中能够表达。SDS-

PAGE 电泳检测结果还表明,不同浓度的 IPTG 于 37 ℃ 诱导融合蛋白的表达情况无明显差异。

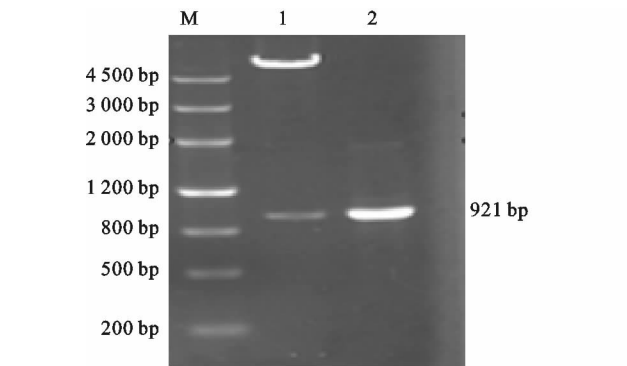


图 4 苹果 PGIP 基因重组质粒 pET-PGIP-X 的 PCR 和酶切鉴定
M. DNA Marker;1. pET-PGIP-X 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切产物;2. pET-PGIP-X 的 PCR 产物

Fig. 4 Amplification of PCR and restriction identification of apple PGIP gene recombinant pET-PGIP-X
M. DNA Marker;1. pET-PGIP-X digested with *Bam*H I and *Sal* I ;2. PCR product of pET-PGIP-X

2.4 蛋白的可溶性分析

经 Bandscan 4.5 扫描分析,切除信号肽的融合蛋白表达量占总蛋白的 39.5%,而含信号肽的融合蛋白

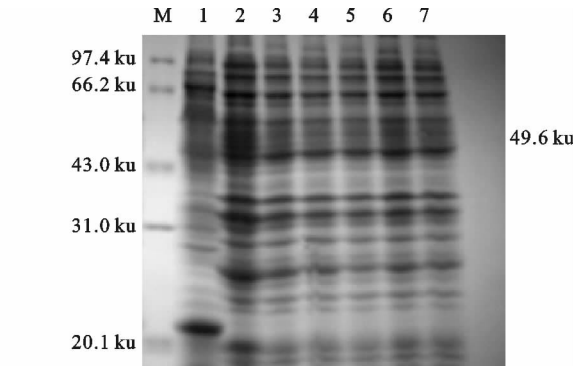


图 5 苹果 PGIP 融合蛋白的诱导表达
M. TaKaRa 蛋白分子标准;1.空载体 pET-32a(+)经 0.1 mmol/L IPTG 诱导 5 h 的表达产物;2~7. 分别为 pET-PGIP 经 0.01, 0.1,0.3,0.5,1.0 和 2.0 mmol/L IPTG 诱导 5 h 的表达产物

Fig. 5 Induced fusion expression protein of apple PGIP
M. TaKaRa protein molecular weight marker;1. Expression of vector pET-32a(+) at 5 h after inducement with 0.1 mmol/L IPTG; 2—7. Expression of fusion protein pET-PGIP at 5 h after inducement with 0.01,0.1,0.3,0.5,1.0,2.0 mmol/L IPTG respectively

表达量约占 5%。pET-PGIP-X 表达产物的可溶性分析表明,目的融合蛋白仅在沉淀中出现,而上清液中未出现(图 6),表明该融合蛋白以包涵体形式表达。

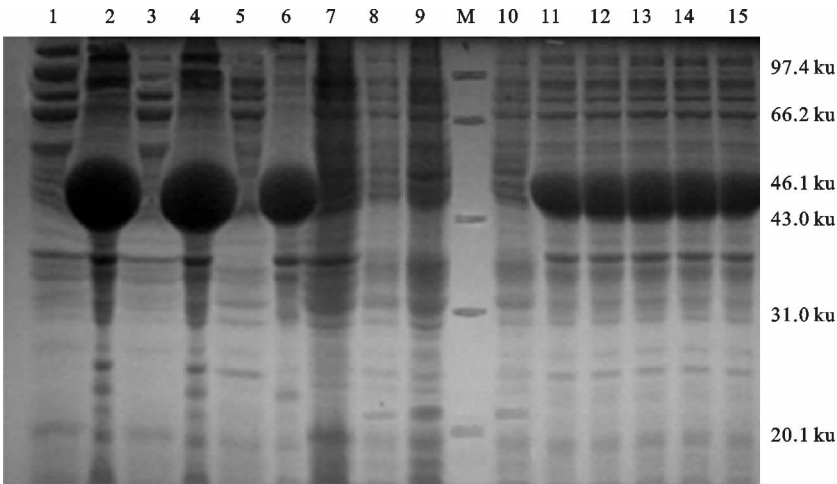


图 6 pET-PGIP-X 在 *E. coli* BL21 中表达产物的可溶性分析
M. TaKaRa 蛋白分子标准;1,3,5. 分别为 37,25 和 15 ℃ 下诱导 20 h 的可溶性蛋白;
2,4,6. 分别为 37,25 和 15 ℃ 下诱导 20 h 的不溶性蛋白;7.37 ℃ 下未诱导融合表达工程菌的总蛋白;
8. pET-32a(+)非重组对照未诱导;9. pET-32a(+)非重组对照诱导 6 h 产物;10. pET-32a(+)空载体转化子诱导 6 h 的总蛋白;
11~15. 分别为 37 ℃ 下 0.01,0.1,0.3,0.5,1.0,2.0 mmol/L IPTG 诱导 6 h 的总蛋白

Fig. 6 Solubility analysis of pET-PGIP-X expressed protein in *E. coli* BL21
M. TaKaRa protein molecular weight marker;1,3,5. Supematants total protein induced for 20 h under 37,25 and 15 ℃ ;
2,4,6. Precipitates total protein of post-sonicated engineering bacteria strains induced for 20 h under 37,25 and 15 ℃ ;7. Total protein of uninduced recombinants after 6 h under 37 ℃ ;8. Expression production of control pET-32a(+);9. 6 h induced expression product of control pET-32a(+);10. Total proteins of strains harbouring pET-32a(+) after induced 6 h;11-15. Expressed product 6 h induced with 0.01,0.1,0.3,0.5,1.0,2.0 mmol/L IPTG, respectively

3 讨 论

PGIP 富含 LRR, 具有典型的 LRR 结构特征, 属于高等植物 LRR 蛋白家族^[11], 其与 PGs 相互作用是从分子水平上研究植物 LRR 介导特异识别的一种模式系统^[12]。在植物中, 大多数已知抗性基因 (Resistance gene, R) 的表达产物都是 LRR 蛋白^[13-14]。LRR 具有 LXXLXXLXXLXXNXLXG-XIPXX 序列, 其中核心保守序列为 LXXLXXLXX-NXL, 是多数植物 PGIP 抗病基因表达蛋白特有的保守序列^[11]。PGIP 通过 LRR 基序上暴露于外表面的氨基酸残基来发挥其抑制 PGs 活性的作用^[15], 这些暴露于外表面的氨基酸残基发生突变则会严重影响其活性^[16], 表明 LRR 基序在 PGIP 识别和抑制 PGs 家族蛋白中起着关键的作用。将本研究克隆的富士苹果 PGIP 基因所编码的氨基酸与已发表的苹果 PGIP 的氨基酸进行比对, 发现两者都含有 2 个基本一致的 LRR 基序, 但在这些基序中有少数氨基酸发生了变化, 如 158 位 (T→A) 和 173 位 (R→H) 氨基酸。由于 PGIP 由复杂的多基因家族编码, 而且 PGIP 家族的不同成员具有几乎相同的生化性质, 只是特异性不同, 而不同病原物分泌的 PGs 不同, PGIP 对其抑制程度也不同^[17], 所以这些氨基酸变化对 PGIP 抑菌活性的影响还有待进一步研究。

由于转 PGIP 基因的植株可能不会表现出对特定 PGs 的抑制作用^[18], 因此在通过转 PGIP 基因进行植物抗病育种前, 有必要进行体外抑菌试验, 而大肠杆菌是最常用的外源基因表达宿主。本试验成功地从“富士”苹果幼果中克隆了 PGIP 基因, 并将其 cDNA 序列和去除编码信号肽的 PGIP 基因 cDNA 序列分别定向插入到原核表达载体中, 并在 BL21 (DE3) 宿主菌中进行诱导表达, 结果发现分别在 49.6 和 46.1 ku 处有清楚的目的蛋白条带出现, 且蛋白以包涵体形式存在。在相同的条件下去除信号肽序列提高了 PGIP 的表达量, 这与龚婷等^[19]对鸡 IL-2 基因原核表达的研究结果一致, 究其原因可能与原核生物翻译过程的正确起始与 mRNA 5' 端的 SD 序列及其 SD 序列与起始密码子之间的距离有关。本研究对苹果含信号肽和切除信号肽 PGIP 在原核表达系统中的表达进行了探索, 为其他植物 PGIP 在原核系统中的大量表达提供了一条途径, 为研究原核表达的 PGIP 对致病真菌 PGs 的抑制效果, 及通过转 PGIP 基因进行抗真菌病害植物的育种工作奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Albersheim P, Anderson A J. Protein from plant cell wall inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1971, 68(8): 1815-1819.
- [2] D'ovidio R, Mattei B, Roberti S, et al. Polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant pathogen interactions [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1696(2): 237-244.
- [3] Yao C L, Ren R H, David S, et al. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 39(6): 1231-1241.
- [4] Favaron F, D'ovidio R, Poreddu E, et al. Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein [J]. Planta, 1994, 195: 201-206.
- [5] Stotz H U, Powell A L, Damon S E, et al. Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* cv Bartlett [J]. Plant Physiology, 1993, 44: 971-976.
- [6] Johnston D J, Ramanathan V, Williamson B. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other microorganisms [J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 44: 971-976.
- [7] Li G P, Fang J G, Cai B H, et al. Cloning and sequencing of PGIP gene from *Prunus mume* [J]. Acta Horticulture Sinica, 2006, 33(1): 125-127.
- [8] 张军科, 张开春, 李嘉瑞. 马哈利樱桃 PGIP cDNA 克隆及序列分析 [J]. 西北植物学报, 2001, 21(6): 1123-1127.
Zhang J K, Zhang K C, Li J R. Cloning and sequencing of PGIP cDNA from *Prunus mahaleb* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2001, 21(6): 1123-1127. (in Chinese)
- [9] 邓振山, 赵立恒, 王红梅. 苹果常见主要真菌性病害的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(5): 932-935.
Deng Z S, Zhao L H, Wang H M. Research advance in common and primary fungi disease [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(5): 932-935. (in Chinese)
- [10] 侯义龙. 果树组织中总 RNA 提取的新方法 [J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(2): 122-125.
Hou Y L. New methods for total RNA extraction in fruit trees [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2002, 33(2): 122-125. (in Chinese)
- [11] De Lorenzo G, D'Ovidio R, Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi [J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39: 313-335.
- [12] Jones D A, Jones D G. The role of leucine-rich repeats in plant defences [J]. Advances in Botanical Research, 1997, 24: 89-167.
- [13] Ellis J, Dodds P, Pryor T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes [J]. Current Opin Plant Biol, 2000(3): 278-284.