

研究报告 Original Papers

地黄内质网型(ER) Ca^{2+} -ATPase基因的克隆及表达分析刘驰¹, 李明杰¹, 王鹏飞¹, 杨艳会³, 王丰青¹, 张重义^{1,2}, 李春奇¹, 陈新建^{1,*}¹河南农业大学生命科学学院, 郑州450002; ²福建农林大学中药GAP研究所, 福州350002; ³河南工业大学生物工程学院, 郑州450001

摘要: 在分析和筛选我们前期建立的地黄转录组文库、抑制消减杂交文库及地黄相关EST文库基础上, 利用拼接、延伸及PCR方法, 成功克隆到一个全长2 681 bp的 Ca^{2+} -ATPase基因, 含有2 007 bp完整的开放阅读框, 编码568个氨基酸。分析表明, 地黄 Ca^{2+} -ATPase属于内质网型ATPase, 与大豆和葡萄有较近亲缘关系, Ca^{2+} -ATPase含有 Ca^{2+} 离子转运区、ATP结合区等保守区。随着生长, 正茬地黄 Ca^{2+} -ATPase表达量逐渐升高, 而连作地黄中的 Ca^{2+} -ATPase基因在块根伸长期表达突然升高, 之后降低。

关键词: 地黄; 连作障碍; 钙信号; Ca^{2+} -ATPase

Cloning and Expression Analysis of Endoplasmic Reticulum Type (ER) Ca^{2+} -ATPase in *Rehmannia glutinosa* Libosch.

LIU Chi¹, LI Ming-Jie¹, WANG Peng-Fei¹, YANG Yan-Hui³, WANG Feng-Qing¹, ZHANG Zhong-Yi^{1,2}, LI Chun-Qi¹, CHEN Xin-Jian^{1,*}¹School of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²GAP Institute of Chinese Herbal Medicine, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ³School of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Based on our previous constructed *Rehmannia glutinosa* transcriptome, suppression subtractive hybridization (SSH) libraries and EST, by using splicing, extension and PCR methods, we successfully cloned a 2 681 bp full length cDNA sequence of Ca^{2+} -ATPase gene containing an open-reading frame (ORF) with 2 007 bp encoding 568 amino acids. The results indicated that *Rehmannia glutinosa* Ca^{2+} -ATPase belonged to the endoplasmic reticulum type, had a closer genetic relationship with soybean and grape, and contained a Ca^{2+} ion transport area and a conservative ATP-binding domain. The expression level of Ca^{2+} -ATPase gradually increased with the grow in first-planting of *R. glutinosa*, but in continuous cropping of *R. glutinosa* appeared a higher peak during the root extend period and then decreased.

Key words: *Rehmannia glutinosa*; continuous cropping obstacle; calcium signal; Ca^{2+} -ATPase

地黄为玄参科多年生草本植物, 是我国著名的“四大怀药”之一, 是我国常用大宗药材, 目前在河南省焦作地区(道地产区)种植面积已近1.5万公顷, 产值在数十亿元。但在地黄生产中, 却存在着严重的连作障碍问题。连作障碍(continuous cropping obstacles)是指在正常的管理措施下, 同一块地连续多年种植相同作物(连作)造成作物产量降低、品质变劣、生长状况变差、病虫害发生加剧的现象。连作地黄表现为产量和品质明显下降, 每茬收获后须隔8~10年后方可再种(温学森等2002)。据统计, 约占70%的根类药材都存在不同程度的连作障碍(赵杨景2000; 张重义和林文雄

2009)。

钙信号是现代植物学研究的热点之一, 被形象的称为“钙语言”, 是细胞响应外界信号刺激, 调节各种生理过程的始作俑者。 Ca^{2+} -ATPase是存在于细胞膜上的最重要“钙泵”之一, 对于撤回细胞内钙信号响应钙离子, 使细胞恢复“平息”状态具有重要作用(Kudla等2010)。在地黄连作障碍的深入研究中, 已经追踪到 Ca^{2+} -ATPase响应异常和特殊的表达模式, 初步判断其在连作障碍的过程起着

收稿 2013-01-18 修定 2013-03-23

资助 国家自然科学基金(30973875、81072983和81274022)。

* 通讯作者(E-mail: xinjian@371.net; Tel: 0371-63558722)。

重要作用(范华敏等2012; Yan等2012), 因此克隆其全长, 进一步详细阐明其功能及作用方式显得尤为重要。

材料与方 法

1 植物材料及处理

选取生产上广泛种植的‘温85-5’地黄品种(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)为供试材料, 在河南农业大学中药材研究所(温县基地)选择试验田, 搭建2个隔离池(5 m×10 m), 分别种植正茬和连作地黄。在苗期(5月22日)、块根伸长前期(6月22日)、块根膨大前期(7月22日)、块根膨大中期(8月22日)、块根膨大后期(9月22日)和成熟期(10月22日)采集根、茎和叶片的植物鲜样, 放入液氮罐中带回实验室, -80 °C保存备用。

2 地黄各组织总RNA的提取

用TRIzol试剂盒(Invitrogen公司, 美国)提取总RNA, 并用1%的琼脂糖凝胶电泳(180 V, 0.5 h)检测总RNA的28S和18S的比例; 在260 nm/280 nm波长下测定总RNA的吸光值, 并计算其浓度和纯度。根据RT-PCR (反转录)试剂盒RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas公司, 美国)进行cDNA合成。

3 地黄内质网型Ca²⁺-ATPase基因扩增引物

将课题组前期构建的地黄根转录组文库、叶转录组文库和连作地黄消减文库(张重义等2011; 杨艳会 2011; 范华敏等 2012; Yan等 2012)及NCBI地黄相关序列全部构建成地黄转录组序列集。在转录组序列集中共筛选到30个注释为内质网型(reticulum-type, ER) Ca²⁺-ATPase相关的EST序列, 进行Blastcluster后, 用CAP3进行序列拼接得到一个2 681 bp的较长序列, 其中ORF长2 007 bp。在ORF侧翼设计了2对特异引物进行扩增。预测扩增长度为2 681 bp。

4 地黄内质网型Ca²⁺-ATPase基因的获得及其表达分析

利用特异引物扩增正茬根茎叶cDNA模板, 扩增体系25 μL。其中正反引物各0.5 μL (10 μmol·L⁻¹)、10×LA PCR buffer 2.5 μL、dNTP 4 μL (2.5 mmol·L⁻¹)、cDNA样品1 μL (200 ng·μL⁻¹)、LA-Taq酶0.25 μL (5 U·μL⁻¹, 宝生物大连公司)和

ddH₂O 16.25 μL。PCR反应条件为95 °C预变性5 min; 94 °C 1 min、60 °C 30 s、72 °C 2 min进行35个循环; 72 °C 10 min。然后1.5%琼脂糖切胶回收与预期大小一致的条带, 将回收片段连接到pJET1.2/Blunt载体(Fermentas公司, 美国), 转化大肠杆菌DH5α, 直接筛选菌落进行测序。

cDNA样品分别用对应基因和内参基因18S (GenBank登录号DQ469606)进行定量PCR (表1), 且每个反应重复3次。反应体系为Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2×), no ROX 12.5 μL、正反引物各1 μL (5 μmol·L⁻¹)、Template DNA 1 μL、无菌水9.5 μL。扩增条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C 10 s、59 °C 30 s、72 °C 30 s进行40个循环, 溶解曲线检测条件是95 °C 1 min、60 °C 1 min, 然后以0.5 °C·s⁻¹的速度提高到95 °C, 连续检测荧光信号。基因的表达量以参照基因18S (DQ469606)作为标准进行相对定量分析, 相对定量方法采样普遍使用的是2^{-ΔΔCT}方法(Livak和Schmittgen 2001)。做目的基因表达模式分析时, 以对照正茬根成熟期(2012年10月22日取样)样品的Ct值的平均数设为1, 进行基因表达分析。

5 地黄内质网型Ca²⁺-ATPase基因生物信息学分析

用Molquest软件的子模块Bestorf预测所获得序列的ORF并进行翻译; 采用在线工具Protparam分析编码蛋白相对分子量、等电点等理化性质; 用ScanProsite软件和SOPMA分析蛋白结构和功能域; 利用PSORT服务器对蛋白进行亚细胞定位分析; TopPred 2进行蛋白跨膜区预测; 用ClustalX完成核苷酸和氨基酸序列的同源性比对; 用MEGA 4.0构建进化树; 用PredtopII预测蛋白的跨膜螺旋; 用CPHmodles在线服务器进行蛋白同源建模。

实验结果

1 地黄内质网型Ca²⁺-ATPase基因的克隆

在对地黄叶和根高通量转录组文库、抑制消减文库、NCBI地黄EST序列的合并注释的过程中, 获得了30条注释为内质网型Ca²⁺-ATPase的EST序列, 将序列进一步拼接延伸后, 获得一条全长2 681 bp的基因序列。对该序列进行ORF预测(图1)发现一个2 007 bp的完整ORF, 起始密码子位于207 bp处, 并且起始密码子ATG周围-3

```

1 cctttccttaaaaaaaaaaaaaaaaaaacaatcttttacttctttaaagtttccc
61 atttcttattatttattttatgtttatgtccgagtgaaaataaaatcaTAAtagcgtgc
121 ttcattaggaaaaaaaaaataaaatcagattgtcaaggagccaaggaaccattttgttt
181 ctgtgataaataattcaagaacattggcgaacATGgaagatgctacgtagatcg
M E D A Y A R S 8
241 gccagcaggttttgaatcttcgctgtggatccgacaagaggcttgacagactccag
A S E V L E F F A V D P T R G L T D F Q 28
301 gttgcagagcatggtaggttatccgggaaaaatgtctccacaagaagaagcactcct
V A E H G R L Y G K N V L P Q E E S T P 48
361 ttttgagattggctaaagcagttgacgatttactgtaagatattaatcgctgct
F W R L V L K Q F D D L L V K I L I A A 68
421 gctgtagctcctcttttggccttgccaatggagagacaggtctatctgcttcttg
A V V S F F L A L A N G E T G L S A F L 88
481 gagccttcagtcctcctcatgatattggctcaaatgcagctgtcggagtaacacggaa
E P S V I L M I L A A N A A V G V I T E 108
541 acaaatgctgagaaggccttgaggaactcagtgcataccaagctgatgtgcaactgct
T N A E K A L E E L R A Y Q A D V A T V 128
601 ctgagaaatggtgttttcaatcttaccctgcagcagccttgcctggagatattgtg
L R N G C F S I L P A T D L V P G D I V 148
661 gaagtcagcgtgggtgcaagaaccagcagatagaggatgatagatgctgagtgat
E V S V G C K N P A D M R M I E M L S D 168
721 cagttacgtgctcagcagcagcttaccggtgagagctgctcgggaaaaaagcag
Q L R V D Q A I L T G E S C S V E K E L 188
781 gatgccaccaacgtgactaatgcagtataccaagaagacaacattctttcgggaa
D A T N V T N A V Y Q D K T N I L F S G 208
841 acagttgtagttgctggaaggctagagctgtgtcgttgggtgctcctaactgca
T V V V A G R A R A V V V G V G S N T A 228
901 atgggaagcatacgcgactctatgttgaacagaagatgaagcagaccactgaagaag
M G S I R D S M L K T E D E A T P L K K 248
961 aagctggatgaattggctacttttggcgaaggttatgcagcagatgatatttgggt
K L D E F G T F L A K V I A G I C I L V 268
1021 tgggtgtcaacattggctatttccggatcctgcgcatggctccttgcaagtgca
W V V N I G H F R D P A H G G F L Q G A 288
1081 atacattactcaagattgcagttgctcttgggtgagccatcctgaaggctacct
I H Y F K I A V A L A V A A I P E G L P 308
1141 gctgtttagcagctgctagctcttggaaacgaagcagcctgctttaaagctata
A V V T T C L A L G T K R M A R L N A I 328
1201 gttaggtcattgccctcagtagagccttagctgcacaacagtgattgagtgacaag
V R S L P S V E T L G C T T V I C S D K 348
1261 actgtactctgaccaccaatgatgctgctcaaggtatcgttcttctcattctgca
T G T L T T N M M S V S K V S V L H S A 368
1321 tatgatgtcccgtagctgaataggtgctcagtgccacacatagcaccagaaggt
Y D V P V V A E Y G V S G T T Y A P E G 388
1381 actatcttgacaactcggagggtgcagcttgatgctcagcaaatcttcttcttctt
T I F D N T A E V Q L D A P A N L H C L 408
1441 ctacatactgcaatgtgctcagctcttgaacagctcttattcaatacaaccctgag
L H T A M C S A L C N E S L I Q Y N P E 428
1501 aagagaagttatgagaagattggtagtgcactgaagtagccttcgagtagctggcgaa
K R S Y E K I G E S T E V A L R V L A E 448
1561 aagattggccttctggttttgattctatgccttggctcttaatatgcttccaagcat
K I G L P G F D S M P S A L N M L S K H 468
1621 gaacggcctcactatgtaactcggtattgggagaaccagttcaaaaaggtctcagtttg
E R A S Y C N R Y W E N Q F K K V S V L 488
1681 gaggctcactgctgcaagatgatgagtgcttggtaaccggaagcagatacagatt
E F T R D R K M M S V L C N R K Q I Q I 508
1741 atgttctcaaaaggtgctccagagatctcctctagatgcacaatattatgcgcaac
M F S K G A P E S I L P R C T N I M R N 528
1801 gatgatggttcaactgttctgctcaactcggaaattagatctgagatagaatcaaaatc
D D G S T V R L T S E I R S E I E S K F 548
1861 cacagtttgcaggaagaaactttaagatgcttggcgtagcgttgaagagtgcca
H S F A G K E T L R C L A L A L K R M P 568
1921 atgggacagcaggtttgtcctacagatgaaacagatcttcaattattgggtggca
M G Q Q A L S Y D D E T D L T F I G L A 588
1981 tgcttgatccaccaagggaagTAgaagatctattcttctgtatgactgctggaa
C L I H Q G R K * 596
2041 tacgtgcatagttgttactggagataacaaggttacggctgaatcattgtgcaaaagaa
2101 ttggtgctttagcacttggatgactttaccggccttcttatactgcttctgagtttg
2161 agaaacttcagcattgcagaagacagtgccattgcagcgaatgacaatttcaccggg
2221 ttgaacctctcacaagagatgcttgttgaagcattacaacatcaaaatgaaggttg
2281 caatgactggagatggagtaaacgatgcacctgcactgaagaagcagacattggaattg
2341 ccaatggatcagcactgcagtagcgaagagtgctcagataggttttggcagatgaca
2401 attttgcacaatgttgcagctgttgcaggggaaggctATTTAcaataacacgaagc
2461 agttcatcagatacatgatcttcaaatattggtgaagtagttgcattttctggctg
2521 cactgctggcatcctgacactcttgccttccagttgcttgggtgaattggtaa
2581 cagatggctgctgagcagcaattggcttAATAAcaagactctgatgtatgaagg
2641 ctaacctcgaaggtcaatgaagctgttgcactggat

```

图1 Ca²⁺-ATPase cDNA的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequences of Ca²⁺-ATPase

终止子用*标记, 左右两侧的数字分别标注核苷酸及氨基酸的位置, 下划线部分显示跨膜区域, 小写斜体为克隆引物片段, 大写ATTTA为非稳定信号, 大写斜体TAA为起始密码子同框终止子, AATAAA为加尾信号。

位为A, +4为G, 符合典型的KOAZK结构(AXX-ATGG), 此外, 在5'端发现一个同读码框终止密码子, 3'端下游非编码区有一个典型加尾信号(AATAAA), 还存在一个非稳定信号(ATTTA) (图1)。因此认为本文所电子克隆的内质网型Ca²⁺-ATPase应该是完整的。在预测的ORF上下游设计特异引物(表1), 用正茬地黄根茎叶进行PCR扩增后, 均获得了和预测大小一致的序列(图2), 两者完全匹配。

表1 实验的引物序列

Table 1 The sequences of the primers in the experiment

名称	引物序列(5'→3')
Ca ²⁺ -ATPase扩增克隆引物	F: TTGTTTATTGTCCGAGTGAA R: GGTTTAGCCTTCATAACATC
Ca ²⁺ -ATPase qRT-PCR引物	F: AGCGACACCACTGAAGAAGAA R: TCGTAACAACAGCAGGTAGCC
18S内参(DQ469606)	F: GTTCTTAGTTGGTGGAGCGATT R: CAGACCTGTTATTGCCTCAAAC

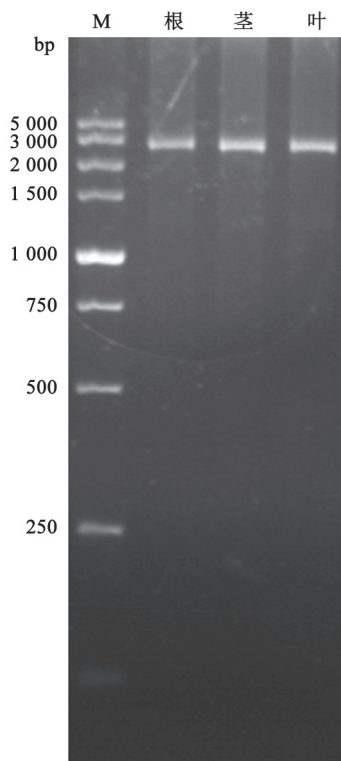


图2 Ca²⁺-ATPase基因全长cDNA的RT-PCR克隆
Fig.2 RT-PCR clone full length of Ca²⁺-ATPase gene
M: DL5000 marker.

2 地黄内质网型Ca²⁺-ATPase编码的蛋白结构及同源性分析

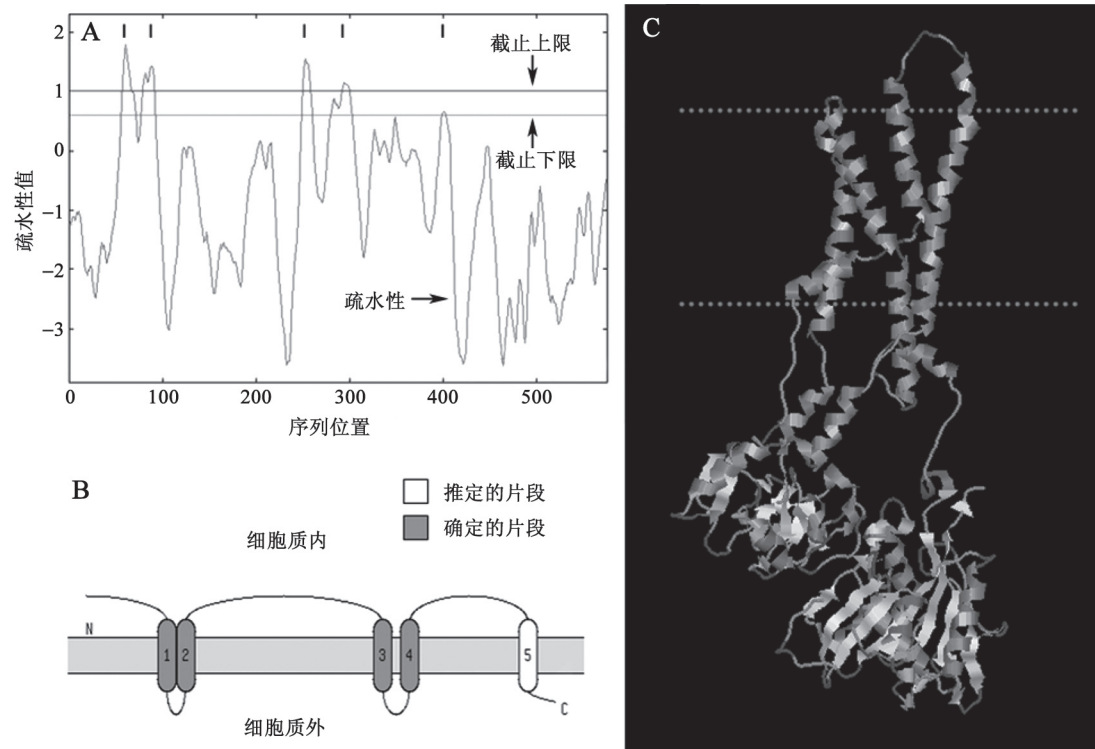
地黄内质网型Ca²⁺-ATPase基因的ORF编码596个氨基酸, 分子量为64 906.9, 等电点5.65, 属于酸性蛋白。用SOPMA软件预测Ca²⁺-ATPase蛋白的二级结构, 表明该蛋白含48.66%的 α 螺旋、30.20%的随机卷曲、15.60%的延伸串和5.54%的 β 转角。对地黄Ca²⁺-ATPase进行蛋白跨膜区预测, 发现其含有4个跨膜螺旋区(图3-A和B)。用PROST服务器对Ca²⁺-ATPase蛋白进行亚细胞定位分析, 初步定位在内质网膜上, 这与其功能是一致的。

目前在植物中, 有两种Ca²⁺-ATPase, 一种质膜型(PM) Ca²⁺-ATPase, 一种是内质网型(ER) Ca²⁺-ATPase, 筛选植物中含有完整序列的质膜型和内质网型Ca²⁺-ATPase基础上, 加入地黄电子克隆发现的Ca²⁺-ATPase, 进行N-J建树分析, 发现地黄处于内质网型Ca²⁺-ATPase组(图4), 与大豆(*Glycine max*)、葡萄(*Vitis vinifera*)和毛果杨(*Populus trichocarpa*)有较近的亲缘关系。内质网型Ca²⁺-ATPase多重比对发现, 彼此之间具有较高的保守性, 含有ATP结合区、离子结合区等较高保守性基元(motif) (图5)。

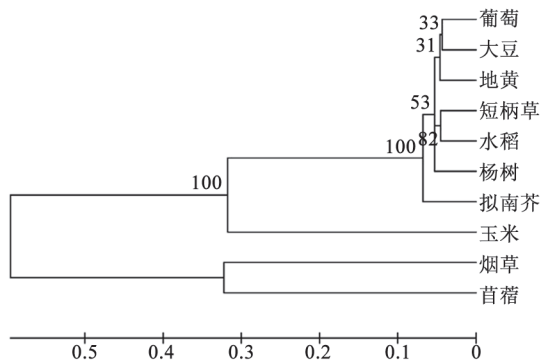
通过Predtop对Ca²⁺-ATPase进行跨膜分析表明, 地黄Ca²⁺-ATPase有4个跨膜螺旋(图3-B)。利用CHPMODEL服务器对地黄Ca²⁺-ATPase进行同源搜索结果显示, 与牛肌肉(bovine muscle)的内质网型Ca²⁺-ATPase (PDB编号: 3TLM.A)有50.2%的一致性, 根据同源建模原理, 只要目标蛋白与模板蛋白的同源性大于30%, 即可进行蛋白三级结构的同源建模。对地黄Ca²⁺-ATPase进行同源建模模拟, 含有明显4个跨膜结构(图3-C)。

3 Ca²⁺-ATPase在正茬和连作地黄中的差异表达分析

RT-PCR定量分析显示, Ca²⁺-ATPase基因在正茬和连作地黄中的根组织、茎组织和叶组织均有表达, 但在各组织和各取样时期中的表达量都不同(图6)。正茬地黄从苗期开始, 随着生长进程的推进, 表达量逐渐升高, 到成熟期出现降低, 根、茎、叶表现几乎一致, 但在叶组织中下降较早(图6-C), 茎组织中后期下降不明显(图6-B)。而Ca²⁺-ATPase在连作地黄中却表现出不同的表达模式(图

图3 Ca²⁺-ATPase蛋白二级和三级结构分析预测Fig.3 Analysis and prediction of protein secondary and tertiary structure of Ca²⁺-ATPase

A: 蛋白疏水性分析; B: 跨膜区预测; C: 蛋白结构预测三维图。

图4 不同植物中ER型Ca²⁺-ATPase进化树分析Fig.4 Phylogenetic analysis of ER type Ca²⁺-ATPase in various plant species

6), 从苗期开始骤然升高, 伸长期(7月22日)达到最大, 此后出现剧烈下降, 且根、茎、叶表达模式几乎一致, 这表明连作地黄可能在连作危害的关键期, 遭受胁迫影响, 钙离子大量从细胞钙库中释放, 间接促进了Ca²⁺-ATPase基因的表达。而正常生长发育的地黄Ca²⁺-ATPase表达随着生长周期的推进,

是逐渐缓慢表达的, 没有出现过多表达变动。

讨 论

在植物的生长发育过程中, 经常会遭受逆境胁迫的影响, 而植物对逆境的感知必须通过细胞膜的一系列变化, 再通过膜受体的一系列磷酸化反应激活膜上的钙离子通道, 引起钙离子从钙库释放到细胞质中, 进而导致细胞质内钙离子浓度增加, 产生钙信号(Alvarez等2010; Hashimoto和Kudla 2011)。本课题组利用抑制消减杂交技术, 构建了正反两个抑制消减cDNA文库, 在对正反文库的细致分析后, 发现大量钙依赖蛋白激酶(CDPK)、钙调素(CaM)、Ca-ATPase相关基因在连作地黄中异常表达(范华敏等2012)。由此, 我们提出, 钙信号系统异常是地黄响应连作而产生毒害的主要原因。由于消减杂交技术通量较小, 一次得到的差异表达的特异基因也相对较少, 为了能更全面地了解正茬及连作地黄体内基因表达的差异模式, 课题组利用Solexa高通量测序技术, 构建了地黄根

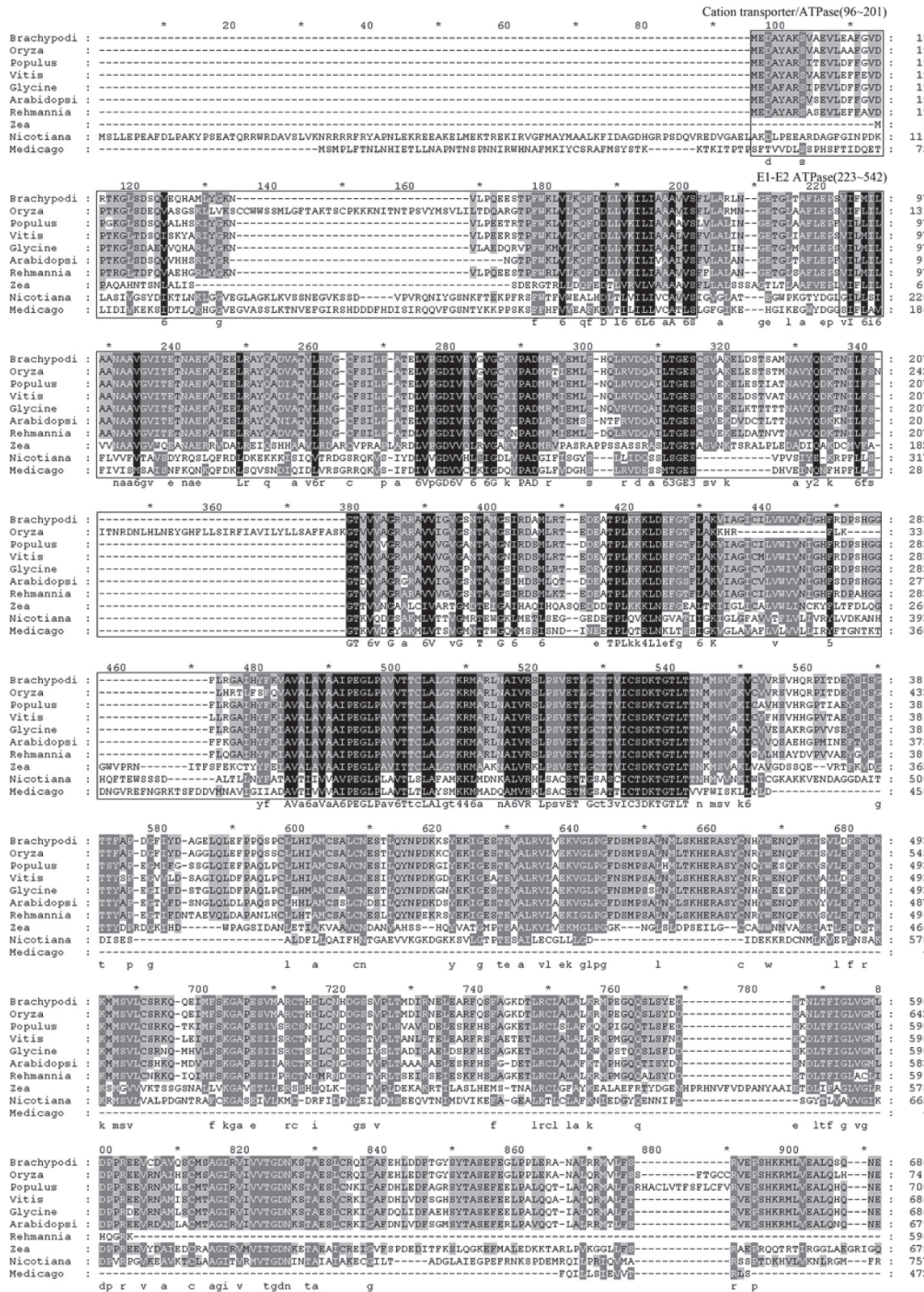
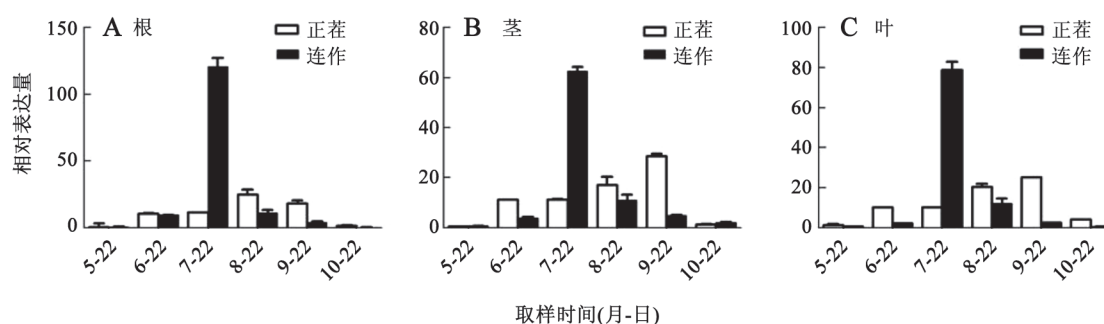


图5 不同植物来源Ca²⁺-ATPase氨基酸序列比对

Fig.5 Comparison of the Ca²⁺-ATPase amino acid sequences in different plants

Brachypodium: 短柄草; Oryza: 水稻; Populus: 杨树; Vitis: 葡萄; Glycine: 大豆; Arabidopsis: 拟南芥; Rehmannia: 地黄; Zea: 玉米; Nicotiana: 烟草; Medicago: 苜蓿。

图6 正茬与连作地黄中各部位 Ca^{2+} -ATPase的表达量Fig.6 Expression analysis of Ca^{2+} -ATPase gene in different parts of first-planting and continuous cropping of *R. glutinosa*

和叶的转录组文库,同时利用数字基因表达谱(DGE)技术详细研究了两者根和叶差异表达基因,同样得到了连作地黄钙信号系统异常的结论(杨艳会2011; Yan等2012)。由于内质网 Ca^{2+} -ATPase是钙信号途径中的一个主要成员,所以本研究克隆了该基因全长序列。

本文研究结果也表明内质网型 Ca^{2+} -ATPase在正茬地黄的生长周期中表达量几乎没有太大波动;而连作地黄在连作毒害的关键时期(膨大初期)出现显著的上调表达,此后迅速下降。结合前期工作可以推测, Ca^{2+} -ATPase可能在连作伤害前期,由于胁迫影响导致 Ca^{2+} -ATPase表达活性迅速升高,撤出细胞内钙离子,以避免钙信号的长时间响应。但在连作土壤中的地黄植株由于不能改变周围的土壤环境,因此随着长时间的胁迫,最终使 Ca^{2+} -ATPase受到“疲惫性”伤害,而表达下降。因此 Ca^{2+} -ATPase在连作障碍中必然起着关键作用,通过外力调控 Ca^{2+} -ATPase活性状况或许能间接缓解连作危害障碍的影响。

目前,课题组已经建立了地黄外植体再生系统,拟利用反向遗传学的方法详细研究内质网型 Ca^{2+} -ATPase基因在连作障碍中作用机制,为阐明连作障碍机理和进一步消滅连作障碍提供理论依据。

参考文献

- 范华敏,李明杰,郑红艳,杨艳会,古力,王丰青,陈新建,张重义(2012).地黄中响应连作基因的时空表达与功能分析.中国中药杂志,37(20):3029~3035
- 温学森,杨世林,魏建和,郑俊华(2002).地黄栽培历史及其品种考证.中草药,33(10):946~949
- 杨艳会(2011).地黄转录组的构建及响应连作障碍关键基因和特异miRNAs的鉴定[博士论文].郑州:河南农业大学.
- 张重义,林文雄(2009).药用植物化感自毒作用与连作障碍.中国生态农业学报,17(1):189~196
- 张重义,范华敏,杨艳会,李明杰,李娟,许海霞,陈军营,陈新建(2011).连作地黄cDNA消滅文库的构建及分析.中国中药杂志,36(3):276
- 赵杨景(2000).植物化感作用在药用植物栽培中的重要性和应用前景.中草药,31(8):1~4
- Alvarez ME, Nota F, Cambiagno DA (2010). Epigenetic control of plant immunity. Mol Plant Pathol, 11(4):563~576
- Hashimoto K, Kudla J (2011). Calcium decoding mechanisms in plants. Biochimie, 93(12):2054~2059
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. Plant Cell, 22(3):541~563
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. Methods, 25:402~408
- Yang YH, Zhang ZY, Fan HM, Zhao YD, Li MJ, Li J, Chen JY, Lin WX, Chen XJ (2012). Construction and analysis of different expression cDNA libraries in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping. Acta Physiol Plant, DOI 10.1007/s11738-012-1105-9