

# 野生茄托鲁巴姆 LEA 蛋白基因的 克隆与序列分析

叶雪凌,周宝利

(沈阳农业大学 园艺学院 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**野生茄托鲁巴姆高抗黄萎病,是研究茄子黄萎病抗性的理想试材。胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA蛋白)是植物在逆境条件下生成的一类应激蛋白。研究以1个受黄萎病菌诱导的托鲁巴姆EST为种子序列,结合电子克隆及RT-PCR验证的策略,获得了LEA蛋白基因的全长cDNA序列,命名为*StLEA1*。该基因的完整开放阅读框为291 bp,编码96个氨基酸,编码蛋白的分子量为10.748 kDa,等电点为9.913。经序列分析,*StLEA1*为水溶性蛋白,不存在信号肽,具有LEA5家族的典型结构域和保守序列,预测含有多个磷酸化位点。表达分析表明,托鲁巴姆受黄萎病菌感染后,*StLEA1*在根系中上调表达。为探讨野生茄托鲁巴姆抗黄萎病分子机制提供了素材。

**关键词:**野生茄托鲁巴姆;黄萎病;胚胎发育晚期丰富蛋白

中图分类号:S641 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2013)03-0030-05

## Cloning and Sequence Analysis of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene in *Solanum torvum*

YE Xue-ling ZHOU Bao-li

(College of Horticulture, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** *Solanum torvum*, a wild species of eggplant, is highly resistant to *Verticillium* wilt. Therefore, it is the ideal material for studying the mechanism of resistance to *Verticillium* wilt in eggplant. Late embryogenesis abundant proteins (LEA proteins) are a group of stress-responsive proteins in higher plants that are induced by environmental stress. In this study, a up-regulated EST while infected by *Verticillium* wilt was used as a querying probe to blast the GenBank database. Based on the assembled homologous cDNA sequences, a 490 bp cDNA was amplified and cloned by RT-PCR, designated *StLEA1*. The ORF of *StLEA1* is 291 bp, coding a protein with 96 amino acids. The molecular weight of coding protein is 10.748 kDa and isoelectric point is 9.913. *StLEA1* protein is a soluble protein with multiple phosphorylation sites, conserve domain in *Lea5*, but without signal peptides. Quantitative RT-PCR analysis revealed that *StLEA1* was up-regulated in roots while *Solanum torvum* was infected by *Verticillium* wilt. The result provides the material for studying the resistance mechanism of wild eggplant to *Verticillium* wilt.

**Key words:** *Solanum torvum*; *Verticillium* wilt; Late embryogenesis abundant protein

茄子黄萎病(*Verticillium* Wilt)是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)侵染引起的一种世界性土传维管束病害,对茄子生产危害极大<sup>[1]</sup>。在普通茄子栽培种中,缺乏高抗黄萎病的种质资源<sup>[2-5]</sup>。野生茄托鲁巴姆(*Solanum torvum*)是栽培茄的近缘野生种,对黄萎病的抗性达到高抗甚至免疫的程度<sup>[6-7]</sup>。目前,野生茄抗黄萎病机制研究大多从生

理生化领域入手,分子机制研究相对匮乏。在遭受黄萎病菌侵染时,托鲁巴姆植株体内势必会产生一系列的防卫反应,其中涉及大量抗性相关基因的协同表达<sup>[8-10]</sup>。对于这些抗性相关基因的克隆与分析,将会为深入探讨托鲁巴姆抗黄萎病分子机制研究提供宝贵素材。沈阳农业大学设施园艺学部共建教育部重点实验室已成功构建了黄萎病菌侵染条件

收稿日期:2013-03-15

基金项目:高等学校博士点专项科研项目(20102103120005);辽宁省博士启动基金项目(20101104);辽宁省教育厅项目(L2010494);中国博士后基金项目(20100471472)

作者简介:叶雪凌(1978-),女,辽宁沈阳人,讲师,主要从事蔬菜抗病(逆)生理与分子生物学研究。

通讯作者:周宝利(1956-),男,辽宁绥中人,教授,博士生导师,主要从事蔬菜抗病生理与生态研究。

下野生茄托鲁巴姆根系的抑制性差减文库,并获得了一系列上调表达基因的 EST 序列。在进行序列分析时发现,EST187 与其他植物的胚胎发育晚期丰富蛋白(Late embryogenesis abundant proteins, LEA 蛋白)第 5 族基因具有较高的同源性。胚胎发育晚期丰富蛋白因在种胚发育晚期的表达量比胚胎发育中期或发芽早期丰富而得名,广泛存在于各种植物体内,是一种逆境表达蛋白,与植物抗逆及抗病相关<sup>[11-13]</sup>。本研究对 EST187 相应基因的全长 cDNA 进行了克隆,并对基因结构、表达特征等进行了初步分析,为深入研究该基因的功能以及探讨野生茄托鲁巴姆抗黄萎病分子机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试材野生茄托鲁巴姆和茄子黄萎病菌均由沈阳农业大学园艺学院提供。经变温催芽后,将托鲁巴姆播种于育苗盘中,于沈阳农业大学蔬菜基地日光温室自然条件下生长,育苗用基质全部经过高温灭菌。当幼苗长至两叶一心时,采用伤根法,于根部接种黄萎病菌孢子悬浮液 30 mL,孢子浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/mL,湿度 80% 左右以利于发病。分别于侵染后 0、5、12、24、48、72 h 截取幼苗根系,经液氮速冻后保存备用。

### 1.2 方法

1.2.1 *StLEA1* 基因克隆 总 RNA 提取按 TRIzol 试剂盒进行(Invitrogen 公司),用无 RNase 的 DNase I(天根公司)除去 RNA 中的痕量 DNA,调质量浓度至  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。第一链 cDNA 合成采用 SuperScript III 反转录系统(Invitrogen 公司),方法参照说明书。

采用 BLASTn 程序在 NCBI 的 EST 数据库中进行同源搜索,获取与 SSH 测序序列 H187 重叠区域大于 40 bp,同源性高于 99% 的 EST 序列,在 DNASTar 的 Seqman 程序中进行拼接,继而利用 EditSeq 程序搜索其可能存在的最大开放阅读框(Open reading frame, ORF),最后利用 BLASTx 测试是否已经获得完整的 ORF。如果经分析已经获得完整的 ORF,则根据拼接序列,设计全长扩增引物,以混合 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,验证拼接结果。PCR 反应程序为:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终反应 5 min。PCR 产物经回收、纯化后,与 pGEM-T Easy 载体(Promega 公司)连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经蓝白斑筛选后,挑取阳性克隆送交商业公司进行序列测定。

1.2.2 *StLEA1* 基因特征分析 利用 DNASTar 软件分析 *StLEA1* 基因开放阅读框,推导氨基酸序列;利用 NCBI 生物信息中心的 BLAST 服务器进行同源搜索;利用 ClustalX 2.0 和 GenDOC 进行序列同源比对;使用 SignalP 和 TargetP 程序预测编码蛋白可能存在的信号肽和亚细胞定位;利用 SOSUI 软件预测蛋白质的疏水性和跨膜结构域;使用 Prosite 程序推测可能存在的修饰性位点。

1.2.3 *StLEA1* 基因表达模式分析 根据 *StLEA1* 基因序列信息,设计基因特异性引物 H187-L(5'-GAATCCGTCTCTGCTCCTCG-3') 和 H187-R(5'-CAC AAGGTGCTGTTTCGGG-3'),以  $\beta$ -Actin 为内标基因(A-L: 5'-ACTGAGGCACCCCTTAATCCC-3' 和 A-R: 5'-ACACCATCACCAGAGTCCAACAC-3'),分别以侵染后 0、5、12、24、48、72 h 的根系 cDNA 为模版,以清水处理为对照,进行荧光定量 RT-PCR 扩增,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量,检测 *StLEA1* 在不同侵染时间点的表达变化。反应在 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行,反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,方法参照天根公司荧光定量试剂盒 Real Master Mix(SYBR Green I)说明书。PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 10 s, 60 °C 10 s, 68 °C 10 s, 40 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 *StLEA1* 全长基因的克隆

从前期构建的 SSH-cDNA 文库中随机挑取 170 个阳性克隆进行测序,共计得到 159 个有效测序序列,最终获得 109 条非冗余 EST,最短的为 77 bp,最长的为 808 bp,片段平均长度为 275 bp。分析结果表明,89 条 EST 与已知功能蛋白或核酸序列的同源性较高,其中 H187 序列分析结果显示,该基因与 LEA 蛋白具有较高的同源性。LEA 蛋白广泛存在于各种植物体内,已有研究表明,LEA 蛋白与植物抗逆密切相关。因此,沈阳农业大学设施园艺省部共建教育部重点实验室启动了该基因全长的克隆工作。利用 H187 为种子序列,对 NCBI 的 EST 数据库进行了 BLAST 搜索,发现有 3 条野生茄托鲁巴姆 EST 序列与 H187 高度同源,重叠区域的序列一致性在 99% 及以上,分别为 FS125624(459 bp)、FS111713(552 bp) 和 FS111714(603 bp)。利用生物学软件进行拼接,共计获得全长 726 bp 的序列。根据拼接序列的末端序列设计全长扩增引物(Q-L: 5'-ATCTAACACTACCATTTCCTTC-3' 和 Q-R: 5'-CTG GATCCTAAATCAGCCATTT-3'),进行 PCR 扩增。电泳结果显示,扩增得到 700 bp 左右的扩增条带(图

1)。克隆测序表明,与拼接序列完全一致,序列全长 726 bp。

## 2.2 *StLEA1* 基因序列分析

利用 DNASTar 软件对该拼接序列进行分析,发现其最大开放阅读框为 291 bp,起始密码子 ATG 始于第 185 位,终止密码子 TAA 终于第 475 位,预测编码一个含有 96 个氨基酸的蛋白质。起始密码子 ATG 上游-3 位核苷酸为 G, +4 位为 G,是一个典型的 Kozak 结构,这一结构对于蛋白质合成的 40S 起始复合物正确识别起始密码子具有很重要的作用。Blast 分析表明,该基因和烟草 LEA5 的序列一致性

为 69%,说明该基因是一个编码托鲁巴姆胚胎发育晚期丰富蛋白的基因,命名为 *StLEA1* (图 2)。

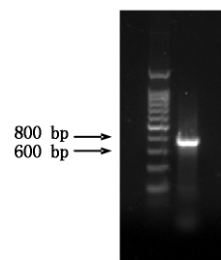


图 1 拼接序列的 PCR 验证结果

Fig. 1 PCR products of the assemble sequence

```
1   ATCTAACTACTACATTTCTCTTTTCATTACACACAATAAGAGTCTCTGCGACTCCAA
61  AAACAGAAAGATTTTCGATTTTGTGCTGCGGAAAGTAATTACAGATTCAAATTTCTTCC
121 TCTGCAGCATTTGATTTAAATTGGATCAAAATCGAATCGAATTCGCTTTTGACTCTT
181 AGCAATGGCACGTTATTTCTCAAACTCCAAAATTATCTCTGCTTTTGTGTAGACTCTGT
1   M A R Y F S N S K I I S A F V V D S V
241 TTCTGCAGTTATTCATAGGCGTGGATACACGGCCACATCACAAGGTGCTGTTTCGGGTAC
20  S A V I H R R G Y T A T S Q G A V S G T
301 TGGAGCCGTTAGAAACAATGTGATGATGAAGAAAGTAGCAGAAGAATCAAAGAAGACAAC
40  G A V R N N V M M K K V A E E S K K T T
361 TTCATGGGTACCAGATCTGTTACAGGTTATTACAGACCAGAAAGTTATGTTAAAGAAAT
60  S W V P D P V T G Y Y R P E S Y V K E I
421 TGATGCTGCTGAGCTTAGGAACATGTTATTGAAGTACAAACCTAGACAAAAC TAAAAAAA
80  D A A E L R N M L L K Y K P R Q N *
481 GGAAACATAGGATCAAGATTTCGCGTCTCGAGGACAGAGACGGATTCAAGATTGTAATGT
541 TGAGAGTTCTTGAAAAACCGTTGTACTTTTGGAAATTATGAGTTCCGGATGTAATGTTAG
601 TGGAAATATAATAATCTCTCACATATATGTTTGTGTTTCCCGCTAGTAAAAAATGTTGGA
661 TTCAGTTGAATTTGTTTGACCAAGATGCTTTGTTTGAGAGATAAAATGGCTGATTTAGG
721 ATCCAG
```

推导的氨基酸序列标示于相应的核苷酸序列之下。

The deduced amino acid sequence is shown under the corresponding nucleotide sequence.

图 2 *StLEA1* 基因的 cDNA 及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *StLEA1* cDNA and deduced amino acid sequence

*StLEA1* 分子量为 10.748 kDa,等电点 (PI) 为 9.913, pH 值 7.0 时的电荷为 7.077。*StLEA1* 蛋白含有 15 个强碱性氨基酸 (K、R), 15 个强酸性氨基酸 (D、E), 30 个疏水氨基酸 (A、I、L、F、W、V), 29 个极性氨基酸 (N、C、Q、S、T、Y)。SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测表明, *StLEA1* 并不存在信号肽。经 SOSUI (<http://bp.nu-ap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) 分析,发现 *StLEA1* 是一个可溶性蛋白,无跨膜结构域。通过 Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 数据库查询,发现 *StLEA1* 蛋白含有 2 个 N-豆蔻酰化位点 (34~39、40~45), 1 个 PKC 磷酸化位点 (55~57), 1 个 cAMP

和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 (56~59)。以上分析结果表明, *StLEA1* 是一个胞质蛋白,推测出的多个修饰性位点可能对其前体蛋白的加工或生物功能具有重要的调节作用。

*StLEA1* 编码的氨基酸序列与烟草 (*Nicotiana tabacum*, AAC06242)、龙葵 (*Solanum nigrum*, ADW66129)、橙 (*Citrus sinensis*, Q39644)、大豆 (*Glycine max*, AAB38782) 和田杨 (*Populus suaveolens*, ABF29697) 中相应的 LEA5 序列一致性分别达到 69%、71%、46%、48%、48%,拥有 LEA5 家族的典型结构域和特有序列 W (A/V) PDP (V/I) TGYYRP (图 3)。

```

ADW66129 : MARSEFSNSKILSAVVSDFSFAF-LSRRGY-AAASQGA VFGVAKGGVP : 45
StLEA1 : MARYFSNSKILSAFVVDVSFAV-IHRRGY-TATSQGA VSGT---GAV : 42
AAC06242 : MARSEFSNSKILSAFVVDTVSSF-VSRRGY-AAAS SASVPGG--VRGS : 43
ABF29697 : MARSEFSNAKVISGLISEAING----RGESAVASQGA AVSK---AR : 38
Q39644 : MARSLFKAKLILAPVADGISLS-LSRRGY-AAAP-----LGTISR : 39
AAB38782 : MARSLQAKRIGVLVAQSISLIPVHRRGY-AVASDVSVRVGLGNIGR : 46

ADW66129 : RSNVMMKKSGEESVKT-----SWVPDPVTGYRPEGQANEIDA AE : 85
StLEA1 : RNNVMMKKVAEESKKT-----SWVPDPVTGYRPE SYVKEIDA AE : 83
AAC06242 : GVNIMMMKKWEESKKT-----SWVPDPVTGYRPE SHAKEIDA AE : 84
ABF29697 : SGAAVMKKTGEEVTKTEKI---SWVPDPRTGFYRPE NVAQEIDA AE : 82
Q39644 : -TGIMKNDLRPAVREDSGA-SSAWAPDPTGYRPE NRAVEIDPAE : 84
AAB38782 : RNLIVGGVEEKPDTRDGSKAYSTDWAPDPVTGYRPE INHTPEIDPVE : 93

ADW66129 : LRKMLLK-----HR----- : 94
StLEA1 : LRNMMLK-----YKPRQN- : 96
AAC06242 : LRQMLLN-----HKPRQH- : 97
ABF29697 : LRAAFLK----- : 89
Q39644 : LREMLLN-----HKVRAH- : 97
AAB38782 : LRHRLLRSPPLEPRGVAGHP : 113

```

下划线部分为 LEA5 家族的典型结构域和特有序列

LEA5-specific sequence is underlined

图 3 *StLEA1* 基因推导的氨基酸序列同其它植物 *StLEA1* 蛋白的同源比对

Fig. 3 Alignment of the predicted amino acid sequences of *StLEA1* and those of several other organisms

### 2.3 *StLEA1* 表达模式分析

分别提取黄萎病菌侵染条件下,不同时间点托鲁巴姆根器官的总 RNA,进行荧光定量 RT-PCR,以分析 *StLEA1* 的表达模式。结果表明,在黄萎病菌侵染条件下,根系中 *StLEA1* 基因上调表达,在设置的 6 个时间点中,侵染后 24 h 的表达量最高,说明 *StLEA1* 基因表达明显受到黄萎病菌的诱导(图 4)。

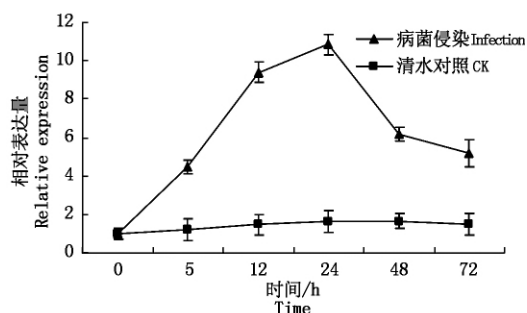


图 4 黄萎病菌侵染后 *StLEA1* 表达模式

Fig. 4 The expression pattern of *StLEA1* after verticillium wilt infection

## 3 讨论

黄萎病是茄子生产中的主要真菌病害,其病原菌主要为大丽轮枝菌。到目前为止,植物抗黄萎病分子机制研究还很少,茄子黄萎病的抗病基因定位和有关基因克隆也鲜有报道。在经济作物上(主要是棉花),抗黄萎病的理论研究和生产实践表明,选育和种植抗病品种是控制黄萎病最为经济有效的措施<sup>[14]</sup>。但茄子黄萎病抗病品种的培育尚存在 2 个问题:一是缺乏对茄子黄萎病抗性深入系统的了解,二是在栽培型茄子中缺少可利用于抗茄子黄萎病的高效基因。野生茄中含有许多重要的遗传资源,特别是经过长期的自然选择和进化,野生茄的抗逆性

已被研究者高度重视。已有研究表明,野生茄托鲁巴姆对黄萎病达到了高抗或免疫的程度。在野生茄的抗黄萎病反应中,势必有大量基因的表达模式发生改变,具体涉及到的基因及其行使的功能将会为野生茄抗黄萎病分子机制研究提供大量的素材。

LEA 基因是在种子成熟和发育阶段高表达的基因,在组织器官水平上不存在明显的组织特异性,同时其表达也受多种逆境胁迫(高温、低温、干旱、病害等)的诱导<sup>[13,15-18]</sup>。虽然关于 LEA 蛋白行使功能的具体机制仍不十分清楚,但 LEA 蛋白被认为是一种逆境响应蛋白,具有保护植物正常代谢的功能<sup>[13,19]</sup>。例如,玉米叶片中的 *ZmLEA3* 基因表达受高盐、低温、渗透、氧化胁迫及 ABA、SA、MeJA 等信号分子和某些病原菌的诱导,将其过表达转入烟草植株时发现,该转基因植株在受到丁香假单胞杆菌 *DC3000* 侵染时,过敏性细胞死亡增加,病程相关基因表达增强,植株抗性提高<sup>[19]</sup>。

在前期研究中,笔者利用抑制消减杂交技术构建了野生茄托鲁巴姆幼苗根器官经黄萎病菌侵染后的上调表达 cDNA 文库,富集了 109 个非冗余 EST,其中有 89 个 EST (81.7%) 与已有基因同源性较高,EST187 与胚胎发育晚期丰富蛋白基因同源性较高。在本研究中,借助 NCBI 中已经收录的野生茄 EST 信息资源,采用电子延伸结合 RT-PCR 验证的方法,克隆了 1 个 LEA 基因,并对其基本序列特征基因进行了分析,发现该基因编码蛋白与植物 LEA 第 5 族具有较高的同源性,并且含有该族的保守序列。黄萎病菌侵染后, *StLEA1* 在根系中上调表达,这也暗示了 *StLEA1* 可能在野生茄抗黄萎病反应中扮演重要角色。

在抗病研究中,研究者往往通过基因表达谱分析,可以获得大量的在寄主抗病反应中差异表达的基因,这些基因有的可能和寄主抗病性有直接的关系,有的为间接关系,有的可能并无关系,这也说明了植物抗病反应的复杂性。这类通过表达谱分析技术获得的差异表达基因是否真正与抗病相关,则需要进一步的分子证据,例如对于在抗病反应中上调和下调表达的基因,可以分别采用基因沉默和超表达的策略,通过检测转基因后代的抗病性变化来确定这些基因是否处于抗病基因网络中。因此,作为逆境响应蛋白,对于 *LEA* 基因(包括 *StLEA1*)是否在托鲁巴姆抗黄萎病反应中扮演重要角色还需要进一步的转基因功能验证。

#### 参考文献:

- [1] Hashimoto K. Studies on *Verticillium* wilt of Eggplant [J]. Bulletin of the Saitama Horticultural, 1989, 2(3): 110.
- [2] Zeng H L, Ye P S, He L. Resistance evaluation of eggplant resources to *Verticillium* wilt in sichuan province [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(5): 123 - 125, 146.
- [3] 连勇, 刘富中, 冯东昕. 应用原生质体融合技术获得茄子种间体细胞杂种[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 39 - 42.
- [4] 肖蕴华, 林柏青. 茄子种质资源黄萎病抗性鉴定[J]. 中国蔬菜, 1995(1): 32 - 33.
- [5] 井立军, 常彩涛, 孙振久. 茄子黄萎病抗性的杂种优势及遗传[J]. 华北农学报, 2001, 16(2): 58 - 61.
- [6] 史仁玖, 殷玥, 王忠. 野生茄子 (*Solanum torvum*) 抗黄萎病相关基因 *StoVe1* 的克隆与分析[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 638 - 642.
- [7] 周宝利, 尹玉玲, 李云鹏, 等. 嫁接茄根系分泌物与抗黄萎病的关系及其组分分析[J]. 生态学报, 2010, 30(11): 3073 - 3079.
- [8] 张映霞, 杨郁文, 倪万潮. 陆地棉黄萎病菌诱导抑制消减杂交 cDNA 文库的构建与分析[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 17 - 21.
- [9] 朱龙付, 涂礼莉, 张献龙. 黄萎病菌诱导的海岛棉抗病反应的 SSH 文库构建及分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 528 - 532.
- [10] Soria-Guerra R E, Rosales-Mendoza S, Chang S, et al. Transcriptome analysis of resistant and susceptible genotypes of *Glycine tomentella* during *Phakopsora pachyrhizi* infection reveals novel rust resistance genes [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(7): 1315 - 1333.
- [11] Dure III L, Crouch M, Harada J, et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants [J]. Plant Molecular Biology, 1989, 12: 475 - 486.
- [12] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 47: 377 - 403.
- [13] Liu R L, Liu M Q, Liu J, et al. Heterologous expression of an *Ammopiptanthus mongolicus* late embryogenesis abundant protein gene (*AmLEA*) enhances *Escherichia coli* viability under cold and heat stress [J]. Plant Growth Regulation, 2010, 60(2): 163 - 168.
- [14] 徐理, 朱龙付, 张献龙. 棉花抗黄萎病机制研究进展[J]. 作物学报, 2012, 38(9): 1553 - 1560.
- [15] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 6 - 24.
- [16] Wise M J. LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles [J]. BMC Bioinformatics, 2003, 4: 52.
- [17] 付桂, 范伟, 畅文军. 海马齿胚胎发育晚期丰富蛋白基因 *SpLea5* 的克隆与表达分析[J]. 热带作物学报, 2011, 32(1): 89 - 93.
- [18] Grelet J, Benamar A, Teyssier E, et al. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying [J]. Plant Physiology, 2005, 137: 157 - 167.
- [19] Liu Y, Wang L, Xing X, et al. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses [J]. Plant Cell Physiology, 2013( published online ).