

## 东亚砂藓类萌发素蛋白基因 *RjGLP* 的克隆及表达分析

张梅娟<sup>1</sup>, 沙伟<sup>1,2\*</sup>, 刘博<sup>2</sup>, 徐红红<sup>2</sup>

(1.东北林业大学生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2.齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**以东亚砂藓转录组测序获得的类萌发素蛋白基因序列为基础,采用 PCR 技术克隆得到该基因的 cDNA 全长序列,命名为 *RjbZIP*。该序列全长为 726 bp,包含 669 bp 的开放阅读框,编码 222 个氨基酸的蛋白质。生物信息学分析显示,该蛋白的相对分子质量为 23 397.9,等电点(*pI*)为 6.82,不稳定系数为 14.41,为稳定蛋白。序列预测分析表明,该蛋白疏水性强,具有信号肽序列,是一种胞外基质分泌蛋白。多序列比对分析结果显示,该基因编码的蛋白具有 GLPs 家族的典型特征。实时荧光定量 PCR 研究表明,在干旱胁迫处理过程中,东亚砂藓 *RjGLP* 基因的表达量高于正常生长的材料(CK),被诱导表达,推测该基因可能参与对干旱胁迫的应答。

**关键词:**东亚砂藓;类萌发素蛋白;*RjGLP* 基因;基因克隆;表达分析

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)01-0047-06

## Cloning and expression analysis on *RjGLP*, a germin-like protein gene from *Racomitrium japonicum*

Zhang Meijuan<sup>1</sup>, Sha Wei<sup>1,2\*</sup>, Liu Bo<sup>2</sup>, Xu Honghong<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, China; 2. College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

**Abstract:** A full length cDNA sequence of germin-like protein was cloned from *Racomitrium japonicum* using RT-PCR, and was named as *RjGLP*, which was 726 bp in length, contained an open reading frame (ORF) of 669 bp, and encoded with 222 amino acids. The results of bioinformatics demonstrated that the protein belonged to stable protein with molecular weight of 23 397.9 and with *pI* of 6.82. The sequence prediction showed that the protein, located in cytoplasm, was a transmembrane protein and had signal peptide. Multiple sequence alignment of GLP proteins revealed that the protein had typical characteristics of plant germin-like proteins. The RT-qPCR results showed that *RjGLP* gene could express in the process of quick dehydration, and the expression was higher than that of CK. Therefore, the *RjGLP* gene was speculated to participate in the stress reaction, and the results would lay the foundations for further study of desiccation-tolerant mechanism.

**Keywords:** *Racomitrium japonicum*; germin-like protein; *RjGLP* gene; gene cloning; expression analysis

萌发素(germin)是由 Thompson 等<sup>[1]</sup>于 1980 年研究小麦胚萌芽特定蛋白时发现的一种蛋白质。随着研究的不断深入,越来越多的与小麦 germin 结构非常相似的蛋白质被发现,人们将此类蛋白命名为类萌发素蛋白(germin-like proteins, GLPs)。GLPs

几乎分布于所有植物中,且含有众多家族成员,如水稻(*Oryza sativa*)有 42 个成员,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)有 32 个成员,大麦(*Hordeum vulgare*)有 21 个成员<sup>[2-3]</sup>,小立碗藓(*Physcomitrella patens*)有 77 个成员<sup>[4]</sup>,扭口藓(*Barbula unguiculata*)有 2 个成员<sup>[5-6]</sup>,

收稿日期: 2014-08-09

修回日期: 2014-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070180; 31270254); 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD201408)

作者简介: 张梅娟(1982—),女,山东海阳人,博士研究生,主要从事苔藓植物分子生物学方面的研究, zhangmeijuan\_002@163.com;

\*通信作者,沙伟,博士,教授,主要从事苔藓植物遗传学及分子生物学研究, shw1129@263.net

地钱(*Marchantia polymorpha*)有 1 个成员<sup>[7]</sup>。研究发现, GLPs 是一类位于细胞外基质的由多基因编码的糖蛋白<sup>[8-11]</sup>。GLPs 家族成员的氨基酸序列相似性不高, 一般只有 30%~70%, 但都具有共同的结构特征, 如含有 Box A、Box B 和 Box C 3 个高度保守的结构框, 蛋白质糖基化位点(NXS/T), 成熟的 GLPs 在 N 端都有一个能帮助蛋白质分泌到胞外的信号肽<sup>[8,12-15]</sup>。GLPs 除了具有如草酸盐氧化酶和超氧化物歧化酶等酶类的结构和功能外, 还具有受体和结构蛋白的功能, 参与许多关键的生理生化过程, 在逆境胁迫下可保护植物免受生物和非生物胁迫带来的氧化损伤<sup>[11]</sup>。近年来, 对 GLPs 功能的相关研究多集中于拟南芥和经济作物, 很少涉及到苔藓植物, 目前仅见对扭口藓的研究报道<sup>[6]</sup>。

存放几年的东亚砂藓(*Racomitrium japonicum*)标本在复水后仍能恢复正常生长, 具有耐干燥、质量轻、附着性强、在无土的环境中能正常生长的特点。东亚砂藓在日本还被作为绿化材料来装饰建筑物的墙壁和屋顶, 缓解热岛效应<sup>[16-17]</sup>, 因此, 研究东亚砂藓的耐旱机制对提高其在造景上的应用具有重要意义。本研究中依据东亚砂藓转录组测序获得的与 GLPs 同源性较高的基因片段利用 RT-PCR 方法克隆获得东亚砂藓 *RjGLP* 基因, 采用生物信息学分析其编码蛋白序列特征, 同时通过荧光定量 PCR 技术比较在干旱和正常生长状态下 *RjGLP* 基因的表达模式, 旨在为进一步研究该基因的功能和苔藓植物的耐旱机制打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为齐齐哈尔大学遗传学实验室通过组织培养获得的无菌东亚砂藓配子体。选择高度约 1.5 cm、生长旺盛的植株用于试验。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

按照宋晓宏等<sup>[18]</sup>和沙伟等<sup>[19]</sup>改良的 SDS 法进行东亚砂藓总 RNA 的提取, 并进行琼脂糖凝胶电泳和 OD 值的检测。以 Oligo(dT)<sub>15</sub> 为引物, 利用反转录酶 M-MLV 试剂盒(Promega 公司)将所提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 用作基因的克隆。

#### 1.2.2 *RjGLP* 基因的克隆

根据获得的东亚砂藓转录组中编码 GLP 的序列, 利用 NCBI 中的 ORF Finder 查找其较长的完整开放阅读框(ORF), 并在 ORF 两端设计 1 对特异引物 *RjGLP-F* 和 *RjGLP-R*(表 1), 扩增该基因的全长 cDNA 序列, 预期大小为 726 bp。PCR 总体积为 25  $\mu$ L, 在 PCR 管中依次加入 2  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 1.4  $\mu$ L Mg<sup>2+</sup>, 1.0  $\mu$ L 上游引物, 1.0  $\mu$ L 下游引物, 1.0  $\mu$ L dNTP, 2 ng cDNA 模板, 0.2  $\mu$ L *Taq* 酶, 适量 ddH<sub>2</sub>O, 瞬时离心混匀, 然后于 PCR 仪上进行扩增。扩增程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 获得特异性片段。产物用北京三博远志生物技术有限责任公司的胶回收试剂盒回收, 通过 *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶连接到 pMD18-T 载体上, 并导入大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 挑取阳性克隆送北京华大生物技术有限公司测序。

表 1 *RjGLP* 基因克隆及实时荧光定量 PCR 所用的引物

Table 1 Primers for cloning and RT-qPCR of <i>RjGLP</i>		
引物用途	引物名称	引物序列(5'→3')
ORF 扩增	<i>RjGLP-F</i>	CAGTACCCGCTTCGGCTTCGAG
	<i>RjGLP-R</i>	CGACCGCCTGGTGCTGACTTAC
实时荧光定量 PCR	<i>RjGLP-qF</i>	CGGTACTGCTCGTGGGCGCTG
	<i>RjGLP-qR</i>	GGACGCCCGCGTGACGTTG
	<i>Actin-F</i>	GGCGATTGAGGAGTGTGTT
	<i>Actin-R</i>	TCAGTGCCTCCGTCAGT

#### 1.2.3 *RjGLP* 基因的生物信息学分析

编码蛋白的氨基酸序列的基本理化性质由 ProtParam 软件分析; 蛋白的保守结构域由 Conservered Domains 工具预测; 信号肽、跨膜结构域、序列的亲/疏水性、亚细胞定位和二级结构等分别用 SingalP 4.1、TmPred、ProtScale、PSORT Prediction 和 SOPMA 等软件进行预测与分析; 利用 NCBI 中的 Blastp 在线工具进行其他物种的同源氨基酸序列搜索; 利用 DNAMAN 和 MEGA 5.0 软件分别进行氨基酸序列同源性比对分析和系统进化树的构建。

#### 1.2.4 *RjGLP* 基因的实时荧光定量表达分析

为研究东亚砂藓 *RjGLP* 基因在干旱和正常生长状态下表达的差异情况, 将东亚砂藓组培苗取出, 用镊子快速去除附着于根部的培养基, 放入干燥器

中,用硅胶进行快速干旱处理,分别取处理 10、20、30、60 min 的样品,液氮速冻,-80 °C 保存,以正常生长的材料作为对照(CK)。提取以上处理时间点样品的总 RNA,反转录成 cDNA 用作反应模板。

以 *Actin* 基因为内参基因,根据 *RjGLP* 基因测序结果设计上、下游引物 *RjGLP*-qF 和 *RjGLP*-qR (表 1)进行荧光定量 PCR 扩增。扩增体系(20 μL)为 SsoFast EvaGreen Supermix(2×)10 μL,模板 2 μL (50 ng/μL),上、下游引物各 0.8 μL(10 μmol/L),适量 ddH<sub>2</sub>O,瞬时离心混匀,进行 95 °C 预变性 30 s、95 °C 变性 5 s、59 °C 退火 10 s、72 °C 延伸 30 s,30 个循环的扩增反应。每个循环结束后采集荧光信号,溶解曲线分析温度为 65~95 °C,每升高 0.5 °C 保温 5 s。所用定量 PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 CFX-96。每个反应设置 3 次重复,取平均值,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因的相对表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 *RjGLP* 基因的克隆及序列分析结果

以东亚砂藓 *RjGLP* 基因完整 ORF 序列为基础设计的引物,经 PCR 扩增,产物由琼脂糖凝胶电泳分离后得到 1 条长约 700 bp 的特异性片段(图 1)。测序结果说明,所得条带为 726 bp,与预期片段大小一致。后续的生物信息学分析表明,此 cDNA 序列编码 GLP 蛋白,命名为 *RjGLP*。

```

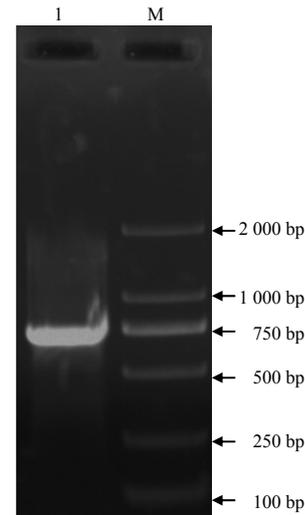
1      CAGTACCCGCTTCGGCTTCGAGGTGGGTGTGGCTTCGCCATGAGTTTCAGCTCCAACATGTGGACGGTGGCGGCGGGTACTG
1      M S F S S N M W T V A A A V L
85     CTCGTGGGCTGGTGGCCATGCTGGCCATGGCGGGGACGCCACCCCTCCAAGACTTCTGCGTGGCCGACAGGTTCCGGCGG
16     L V G L V P M L A M A A D A D P L Q D F C V A D R F G A
169    GTCACCATCAACGGCTTCCCGTGCAAGCCTGCAGCGCAAGCGTCCGTGGACGACTTCAAGTTCGTGGGGCTCAAGAACCCCGGC
44     V T I N G F P C K P A A Q A S V D D F K F V G L K N P G
253    AACACCAACAACGCCAACAGGCCAACGTCACGGCGGCGTCCGTGCTCCAGTTCCCGGGCTCAACACGCTCGGGATCTCCGCC
72     N T N N A N K A N V T A A S V V Q F P G L N T L G I S A
337    GC G C A T C G A C T T C G C C G C C G G G A T C A A C C C C C T C A C A C G C A C C C C G C C T C C G A G C T C C T G A T C C T G G T G A A G G G A
100    A R I D F A A G G I N P P H T H P R A S E L L I L V K G
421    G A G C T G T A C G T G G G A T T C G T G A G C A G C G G C G C C C C A A C A C C C T G T T C G C C A C C C C T G T A C C C C G G C G A G G C G T T C G T G
128    E L Y V G F V S S G G A A N T L F A T T L Y P G E A F V
505    T T C C C A A G G G C C T C G T G C A T T T C C A G C T G A A T G T G G G C A G A G G C C A G C G T G G C G T T C G C G G C T G A G C A G C C A G A A C C C G
156    F P K G L V H F Q L N V G R G P A L A F A A L S S Q N P
589    G G A G T G C A G C A G G T G G C C G G C G T G T T C C A G C C T G A C A T C A A G G A C G A G G T G C T G G A G A A G A G C T T C C G A T C G A C A C C C C
184    G V Q Q V A P A L F Q P D I K D E V L E K S F R I D T A
673    A C C G T G G A C A T G A T C C A G A A G C G G T T C C G C A T G T A A G T C A G C A C C A G G C G G T C G
212    T V D M I Q K R F R M *

```

下划线部分为信号肽;阴影部分为 N 端糖基化位点。

图 2 *RjGLP* 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *RjGLP* gene



M DNA Marker 2 000; 1 cDNA 产物。

图 1 *RjGLP* 基因 ORF 扩增结果

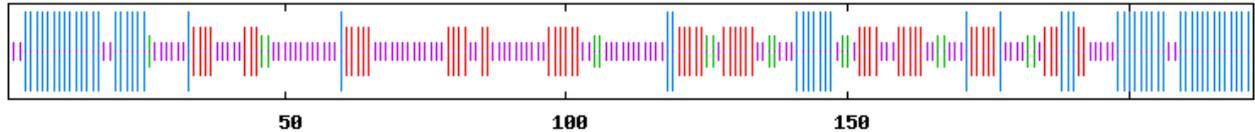
Fig.1 ORF amplification of *RjGLP* gene

获得的 cDNA 序列长为 726 bp,开放阅读框为 669 bp,可编码 222 个氨基酸(图 2)。Protparam 预测该蛋白的相对分子质量为 23 397.9,理论等电点(*pI*)为 6.82;有 16 个氨基酸残基(Asp + Glu)带正电荷,16 个氨基酸残基(Arg + Lys)带负电荷;不稳定系数为 14.41,属稳定型蛋白质(<40,蛋白稳定);脂肪族系数为 91.04,总亲水系数为 0.273。结构域预测显示,该蛋白具有保守的 cupin 基序。采用 SignalP 4.1 进行分析,结果表明,*RjGLP* 蛋白含有一段有 27 个氨基酸残基组成的 N 端信号肽序列(图 2),剪切位点可能位于第 26 和第 27 个氨基酸之间,

推测可能为一种分泌蛋白。蛋白质的跨膜结构域及疏水性预测和分析对其三维结构的预测有重要作用。应用 ProtScale 软件预测发现,该蛋白疏水性氨基酸所占比例大于亲水性氨基酸所占比例,推断为疏水性蛋白质。TMpred 分析结果表明,该蛋白为跨膜蛋白。用 PSORT Prediction 对 RjGLP 蛋白进行

亚细胞定位,结果显示定位于胞外的可能性为 82.0%,是一种胞外分泌蛋白。

二级结构预测结果(图 3)显示,RjGLP 蛋白由 58 个  $\alpha$  螺旋(H),55 个延伸链(E)、15 个  $\beta$  转角(T)和 94 个无规则卷曲(HC)构成,所占总蛋白的比率分别为 26.13%、24.77%、6.76%和 42.34%。



蓝色部分为  $\alpha$  螺旋;红色部分为延伸链;绿色部分为  $\beta$  转角;紫红色部分为无规则卷曲。

图 3 RjGLP 蛋白二级结构预测

Fig.3 Prediction of the secondary structure of RjGLP protein

通过 NCBI 的 Blastp 比对(图 4)发现,RjGLP 蛋白与扭口藓、黄瓜(*Cucumis sativas*)、葡萄(*Vitis vinifera*)

等物种的 GLP 蛋白序列相似性较高,均高于 52%,且与扭口藓的一致性最高,达 75%。选取扭口藓



"△"表示半胱氨酸残基。

图 4 RjGLP 蛋白与其他植物 GLP 蛋白的多重比对

Fig.4 Multiple sequence alignment of RjGLP protein to other GLP proteins

(BAC53790.1)、黄瓜(XP\_004134614.1, XP\_004134 617.1, XP\_004158659.1)、葡萄(XP\_002266412.1)、谷子(*Setaria italica*, XP\_004952511.1)、节节麦(*Aegilops tauschii*, EMT14183.1)、可可(*Theobroma cacao*, XP\_007099749.1)、短花药野生稻(*Oryza brachyantha*, XP\_006647292.1)和拟南芥(AAB 51572.1 P92997.2)8 个物种的 11 个 GLP 蛋白质序列与东亚砂藓的 *RjGLP* 蛋白进行多序列比对, 结果显示, GLPs 家族成员的相似性不是很高, 但都具有完整的 cupin 特征结构域(图 4)。该结构域包含 2 个由高度保守的氨基酸序列框 Box B 和

Box C 组成的“萌发素框”, 其序列分别为 G-P-H-HPRATEXXX XX-G、GXXHFQ-N-G, 其中“-”代表任意氨基酸, “X”代表疏水性氨基酸。在 12 个 GLP 蛋白中, 还有 9 个含有完整的氨基酸序列框 Box A, 序列为 QDFCVAD。此现象符合类萌发素蛋白家族的特征, 说明它们可能有着共同的起源。将东亚砂藓 *RjGLP* 蛋白与其他 11 个 GLP 蛋白进行聚类分析, 构建系统进化树, 结果(图 5)显示, 东亚砂藓与黄瓜聚为一支, 亲缘关系最近。

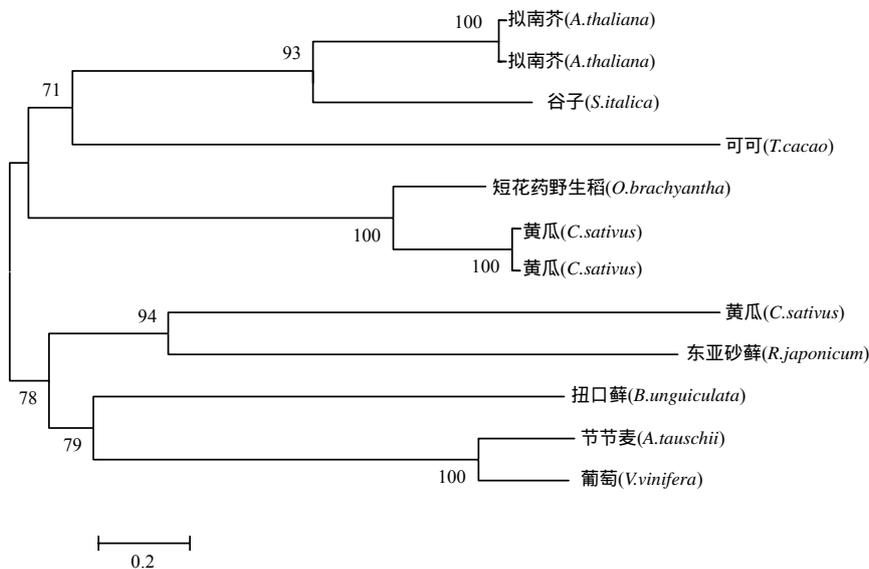


图 5 东亚砂藓 *RjGLP* 蛋白与其他植物 GLP 蛋白的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of *R. japonicum* *RjGLP* protein and GLP proteins from other plants

### 2.2 *RjGLP* 基因的表达特性分析

利用实时荧光定量 PCR 方法对 *RjGLP* 基因在干旱胁迫时的表达水平进行研究, 结果表明 *RjGLP* 基因的表达量呈现先升高后降低的趋势(图 6)。快速干旱 10 min 时, 基因的表达量迅速上升, 约为 CK 的 4.3 倍, 20 min 时表达量急剧上升, 约为 CK 的

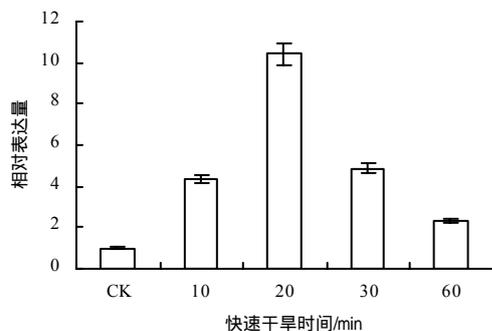


图 6 快速干旱胁迫下 *RjGLP* 基因的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *RjGLP* gene under quick dehydration

10.4 倍; 随着干旱胁迫时间的延长, *RjGLP* 基因的表达量逐渐降低, 干旱 60 min 时的表达量约为 CK 的 2.3 倍。该结果说明 *RjGLP* 基因受到干旱胁迫的诱导表达, 可能参与了对非生物胁迫的防御反应。

### 3 结论与讨论

对 *RjGLP* 基因进行生物信息学分析发现, 该基因所编码的蛋白在 N 末端具有一段信号肽序列, 还含有 Box A、Box B 和 Box C 这 3 个保守的氨基酸序列框, 1 个 N-糖基化位点, 2 个半胱氨酸残基形成的稳定 N 端的二硫键。Woo 等<sup>[20]</sup>的研究显示, 萌发素蛋白的酶活性是由 3 个组氨酸残基构成的, 可用来结合金属离子, 而 *RjGLP* 蛋白的 Box B 和 Box C 中则含有这 3 个组氨酸(H)和 1 个谷氨酸(E)残基, 同时, PSORT Prediction 预测该蛋白是一种胞外分泌蛋白, 这与信号肽是分泌蛋白的标记的特

点相吻合;因此,根据上述特征,初步推断 *RjGLP* 基因是典型的 GLPs 蛋白家族基因。GLPs 家族成员中有一半以上在 C 端有 1 个特异三肽(RGD/KGD/KGE)。动物细胞中含有的特异三肽为 RGD,是一种黏连蛋白,能与整合素互相作用,从而参与到细胞信号转导的过程,故有类似于 RGD 三肽的 GLPs 都被推断为可能起着类似受体的作用<sup>[3,8]</sup>。豌豆根部的 GLP 以 RGD 为受体,与根瘤菌表面蛋白发生相互作用<sup>[21]</sup>。东亚砂藓的 *RjGLP* 蛋白具有类似于三肽的 PGE,推测可能是位于胞外基质的黏连蛋白起着类似受体的功能。

近年来的研究<sup>[22]</sup>表明, *GLPs* 是一类参与植物对逆境胁迫响应的重要基因,可受多种非生物胁迫的诱导,在植物防御反应的调节上发挥着重要作用。Membré 等<sup>[23]</sup>在烟草(*Nicotiana tabacum*)中过表达拟南芥类萌发素基因(*AtGER1*、*AtGER2*、*AtGER3*),发现烟草的抗高温能力得到明显提高。Komatsu 等<sup>[24]</sup>研究发现,大豆(*Glycine max*)在遭受水分胁迫时,根和下胚轴的生长受到抑制,4 个 GLPs 前体表达量下调。刚毛怪柳(*Tamarix hispida*) 在受到干旱、盐、低温、CdCl<sub>2</sub> 和脱落酸胁迫时, *ThGLP* 基因被诱导表达,并且受 ABA 信号转导途径调控<sup>[25]</sup>。刘超等<sup>[26]</sup>对天山雪莲(*Sasussured involucrata*) *SikGLP* 基因在低温、MV 和 PEG 处理下的表达情况进行了分析,结果显示该基因均被诱导表达,可能提高了天山雪莲抗逆境的氧化胁迫能力。大豆 *GmGER* 基因在 IAA 胁迫下可诱导表达,将其转入番茄后,过表达 *GmGER* 可提高番茄的抗盐能力<sup>[27]</sup>。晋文娟等<sup>[28]</sup>将从番茄中获得的 *Mdip1* 基因重新遗传转化到番茄中,使其过表达,发现番茄的抗低温诱导能力得到明显提高。本研究荧光定量 PCR 结果显示,在东亚砂藓受到干旱胁迫时, *RjGLP* 基因的表达量迅速上升 随后呈现下降趋势,但整体来说,表达量始终明显高于 CK,这说明 *RjGLP* 基因可能参与了对干旱胁迫的应答。

#### 参考文献:

[1] Thompson E W, Lane B G. Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translational capacities of bulk mRNA from dry and imbibing embryos [J]. Journal of Biological Chemistry, 1980, 255(12): 5965-5970.

[2] Zimmermann G, Bäumlein H, Mock H P, et al. The multigene family encoding germin-like proteins of barley: Regulation and function in basal host resistance [J]. Plant Physiology, 2006, 142(1): 181-192.

[3] 刘海林. 植物类萌发素蛋白基因家族生物信息分析及拟南芥 *AtCOPT1* 基因的功能分析 [D]. 广州: 华南师范大学, 2008.

[4] Nakata M, Watanabe Y, Sakurai Y, et al. Germin-like protein gene family of a moss, *Physcomitrella patens*, phylogenetically falls into two characteristic new clades [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(3): 381-395.

[5] Yamahara T, Shiono T, Suzuki T, et al. Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss *Barbula unguiculata* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(19): 33274-33278.

[6] Nakata M, Schiono T, Watanabe Y, et al. Salt stress-induced dissociation from cells of a germin-like protein with Mn-SOD activity and an increase in its mRNA in a moss, *Barbula unguiculata* [J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(12): 1568-1574.

[7] Nagai J, Yamato K T, Sakaida M, et al. Expressed sequence tags from immature female sexual organ of a liverwort, *Marchantia polymorpha* [J]. DNA Research, 1999, 6(1): 1-11.

[8] Bernier F, Berna A. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39: 545-554.

[9] Lane B G. Oxalate, germins, and higher-plant pathogens [J]. IUBMB Life, 2002, 53(2): 67-75.

[10] 唐源江, 闵伶俐, 高桂兰, 等. 拟南芥 *GLP13* 基因在植物抗氧化胁迫响应中的作用 [J]. 植物学报, 2011, 46(2): 147-154.

[11] 刘亚龙, 李红丽, 刘迪秋, 等. 岷江百合类萌发素蛋白基因 *LrGLP2* 的克隆及表达特性分析 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(10): 1063-1070.

[12] Gucciardo S, Wisniewski J P, Brewin N J, et al. A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(5): 1161-1171.

[13] Carter C, Thornburg R W. Tobacco nectarin I. Purification and characterization as a germin-like, manganese superoxide dismutase implicated in the defense of floral reproductive tissues [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(47): 36726-36733.

[14] Khuri S, Bakker F T, Dunwell J M. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins [J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(4): 593-605.