

拟南芥应答低硼胁迫的基因表达谱分析

徐芳森, 曾长英, 彭李顺, 石磊

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/华中农业大学微量元素研究中心, 湖北武汉 430070)

摘要: 硼是植物生长发育所必需的微量营养元素, 参与广泛的生理生化功能。以拟南芥硼高效基因型为材料, 分别设置短期缺硼和长期低硼胁迫两个独立试验, 利用拟南芥 ATH1 2.2K 芯片及其技术, 研究分析低硼胁迫条件下拟南芥的基因表达谱。根据所注释的基因功能, 将差异表达的基因进行分类, 推测拟南芥响应低硼胁迫的代谢网络途径。试验从全基因组水平上研究低硼胁迫下拟南芥基因的表达变化, 所产生的基因表达谱及对应的代谢网络途径, 为理解硼参与生理生化功能的分子机理和开展相关的研究提供基础。

关键词: 拟南芥; 低硼胁迫; 基因芯片; 基因表达; 代谢网络

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-1004-06

Analysis of Gene Expression Profile in Response to Low Boron Stress in *Arabidopsis thaliana*

XU Fang-sen, ZENG Chang-ying, PENG Li-shun, SHI Lei

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Microelement Research Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Boron (B) is an essential microelement for the growth and development of higher plants, which performs many important physiological and biochemical functions. In the present study, using *Arabidopsis* B-efficient genotype as research material, the gene expression profile of *Arabidopsis* responding to low B stress was analyzed with *Arabidopsis* Affymatrix ATH1 2.2K genechip at two independent experiments of short-term B-deficient stress and long-term low-B stress, respectively. According to the gene functions annotated in GenBank and other related database, the differentially expressed genes indentified were classified into ten sorts, and then one putative metabolic pathway of *Arabidopsis* responding to low B stress was speculated. This is the first time to study the gene expression changes of *Arabidopsis* in response to low B stress at whole genome level, and construct gene expression profile and metabolic pathway, which will provide the basis for us to understand molecular mechanisms of B involving physiological and biochemical functions in plants and develop relative study.

Key words: *Arabidopsis*; low boron stress; genechip; gene expression; metabolic network

收稿日期: 2010-08-20

基金项目: 国家 863 计划(2007AA10Z117) 和国家自然科学基金资助项目(30471041)

作者简介: 徐芳森(1965—), 男, 江西玉山人, 博士, 教授, 博士生导师。1987年7月本科毕业于江西农业大学农学专业。现为华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室固定研究人员、农业部亚热带农业资源与环境重点开放实验室副主任。兼任中国植物营养与肥料学会常务理事、《植物营养与肥料学报》编委, 2005年入选教育部“新世纪优秀人才支持计划”。2001年5月—2002年3月获英国 Leverhulme 奖学金, 在英国 Wolverhampton 大学从事博士后研究。2004年4月—9月获日本 JST 资助, 在日本东京大学开展合作研究。主要从事作物养分高效利用的生理和分子机理研究, 先后主持国家 973 计划项目、863 计划项目、国家自然科学基金、高校博士点基金等课题 20 项, 发表论文 80 多篇, 其中 SCI 论文 20 多篇, 主(参)编专著 3 部, 获省部级奖 2 项。

自从1923年硼被确定为高等植物生长发育所必需的微量元素以来,在植物对硼的吸收利用、营养功能的生理生化机制、丰缺诊断与硼肥施用技术、土壤硼的有效性等方面涌现了大量的研究报道^[1-2]。比如,研究发现土壤有效硼的缺乏具有世界广泛性,全球共有80多个国家的132种植物出现缺硼症状,每年硼肥施用面积约达 $1.5 \times 10^7 \text{ hm}^2$ ^[3]。研究明确了油菜、棉花、花生、甜菜等多种作物硼营养诊断的植株和土壤硼的丰缺指标、硼肥施用技术^[4]。证实了硼影响细胞壁的结构和稳定的机制^[5-6],克隆出第1个植物硼转运子基因 *AtBOR1*^[7],揭示了硼的吸收与水通道蛋白(Aquaporin)密切相关^[8],利用蛋白质组学技术分离获得细胞膜上能与硼结合的蛋白等^[9]。从农作物中筛选获得一批抗低硼胁迫或高硼毒害的优异种质,并开展相应的生理和分子机理研究^[10-13]。然而,硼在参与酚类化合物代谢、生物膜的结构与功能、碳水化合物的运输、繁殖器官的发育、蛋白质和核酸代谢以及硼与其它营养元素的相互作用等方面,依然停留在生理试验的推导和现象中,缺乏直接的分子证据。

基因芯片是指应用大规模集成电路的微阵列技术,将合成的数万个代表某生物整个基因组基因的寡核苷酸有规律地点样于固相支持物表面上,然后将要研究的目的材料中的DNA、RNA或cDNA用同位素荧光物标记后,与之杂交,通过放射自显影或荧光共聚焦显微镜扫描,对这些杂交图谱进行检测分析,获得目的材料中有关基因表达信息。目前基因芯片技术以其高通量的全基因组的检测能力研究整个基因组基因表达水平的变化,已广泛应用于植物的生长发育、产量和品质形成、抗生物和非生物逆境等各个研究领域。本研究利用Affymatrix公司生产的包含拟南芥基因组22 810个基因的拟南芥ATH1 2.2K寡聚核苷酸芯片及其技术,研究拟南芥响应低硼胁迫的基因表达谱,获取拟南芥在低硼胁迫条件下基因表达的变化,并从基因水平上探讨硼参与植物生理生化代谢的分子机理和作用网络。

1 材料与方法

1.1 试验材料与植株培养

本研究供试材料为由拟南芥生态型Columbia-4(Col-4)与Landsberg(*Ler*)杂交后连续自交6代发展的重组自交系群体中的一个硼高效株系CS1938及其硼低效亲本Col-4^[10]。种子经100 g/L次氯酸钠(*w/v*)表面消毒10 min、去离子水清洗3次后,放置在4℃黑暗条件下低温处理48 h,然后在22℃下育苗、成苗后移栽至光照培养室中培养。植株在光照培养室中的生长条件为:光周期为14/10 h,室内温度约(22±3)℃,湿度65%~85%。试验采用营养液培养方法,大量元素采用霍格兰配方:1.44 mmol/L NH_4NO_3 , 0.3 mmol/L NaH_2PO_4 , 0.5 mmol/L K_2SO_4 , 1.0 mmol/L CaCl_2 , 1.6 mmol/L MgSO_4 , 0.17 mmol/L NaSiO_3 。微量元素采用Arnon营养液配方,其全营养液组成是(mg/L:每升储备液中各成分的克数):1.81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.065 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 50 μmol/L Fe-EDTA。试验设短期缺硼胁迫和长期低硼胁迫两个试验,①短期缺硼胁迫:将硼高效株系CS1938在硼正常水平(0.05 mg/L H_3BO_3)培养30 d后移至没有硼的营养液中作缺硼饥饿处理,并分别在饥饿0, 3, 24, 72 h取地上部和根系的混合样,在液氮中保存,用于提取总RNA。短期硼胁迫的各个时间点均以CS1938在硼正常水平下的表达量为对照,以各自所在时间点的表达量为处理进行比较分析。②长期低硼胁迫:将硼高效株系CS1938与硼低效生态型Col-4分别在硼正常水平(0.05 mg/L H_3BO_3)与低硼水平(0.01 mg/L H_3BO_3)培养30 d后,分别取两处理的地上部和根系混合样,在液氮中保存,用于提取总RNA。

营养液3 d更换1次。各样品分别独立取2次,构成2次生物重复,每个重复取2个相同处理的不同单株混合。

1.2 总RNA提取和mRNA分离

总RNA的提取采用Trizol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)方法。提取总RNA经14 g/L琼脂糖胶电泳检测和浓度测定确认质量合格(18 S 28 S 2条主带清晰无拖尾, $OD_{260}/OD_{280}=2.0 \sim 2.2$)后方可进行后续试验。mRNA分离采用Dynabeads Oligo(dT)25方法,分离后测定浓度。

1.3 芯片杂交

试验所采用的芯片是Affymatrix拟南芥ATH1 2.2K寡聚核苷酸芯片,该芯片共包含22 810个探针组,覆盖拟南芥全基因组80%以上的基因。长期和短期实验的每份样品均设计了2次生物重复,每一生

物重复样品为两个单株根、茎、叶、花等组织的 RNA 混合样。探针标记、芯片杂交、洗涤、扫描均遵循 Affymetrix 的操作规程 (Affymetrix Expression Analysis Technical Manual; <http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>)。芯片的所有操作都是在北京博奥芯片生物技术有限公司完成。芯片数据的全局均一化及校正参照 Affymetrix Statistical Algorithms Description Document 方法。

差异表达基因的筛选标准: ①2 次生物重复中对照与处理对应表达信号值在统计学上都有一致的显著性差异 (如 “I”: Increase “D”: Decrease “NC”: No Change)。②对照与处理的检测值至少有一个定义为表达 (Present) 或临界表达 (Marginal)。而对照与处理的检测值均定义为没有表达 (Absent) 的基因不予考虑。③2 次重复中对照与处理杂交信号的 Ratio 值的标准差不超过它们均值的 50%。④2 次生物重复中对照与处理杂交信号的 Ratio 值均大于 2 或小于 0.5 即 $\log_2 \text{ratio}$ 值大于 1 或小于 -1。同时满足以上 4 个标准的基因定义为有差异表达的基因。

1.4 差异表达基因的 Northern Blot 验证

为验证上述基因芯片结果的可靠性 本研究利用 Northern Blot 技术对部分基因的差异表达进行分析。提取自低硼胁迫下不同时间点和组织的总 RNA 20 mg 在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,然后转移到尼龙膜 (BrightStar-Plus, Ambion, Austin, TX) 上。转移上总 RNA 的尼龙膜转入杂交管 在分子杂交炉 (BFD 53#02-31270, BINDER, Germany) 68 °C 下预杂交 8 h,然后将标记有 [$a^{32}P$]dCTP 的目标基因的 cDNA 探针加入杂交管,在 68 °C 下杂交 12 h。杂交结束后 尼龙膜在室温 25 °C 条件下用 0.5 × SSC 0.5% SDS 清洗 2 次,每次 5 min。然后在 65 °C 条件下用 0.2 × SSC 0.2% SDS 清洗 2 次,每次 5 min 左右,以检测放射性信号强弱为准。洗膜完成后 将杂交膜压入暗盒的 X-光片上 然后放置在 -80 °C 中 5 ~ 7 d 冲洗 X-光片。65 °C 条件下洗膜时间和 -80 °C 压片时间的长短以检测放射性信号强弱为依据。

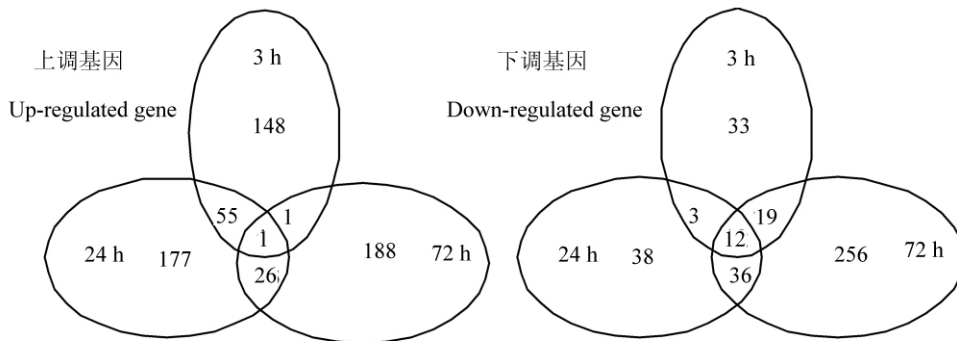


图 1 短期缺硼 3 h、24 h 和 72 h 上下调的基因

Fig. 1 The up- and down-regulated genes after short-term B deprivation for 3 h, 24 h and 72 h

2 结果与分析

2.1 短期缺硼胁迫下基因的表达

如图 1 所示,在短期胁迫试验中以样品 CS1938 的 0 h 为对照,在 3 h、24 h 和 72 h 3 个时间点内共有 843 个基因的表达发生显著变化,占整个基因组的 3.306% (843/25 498)。在 843 个基因中 446 个基因表现为上升表达,397 个基因为下降表达。在 3 h、24 h 和 72 h 时间点上差异表达的基因数目分别为 222 (155 上升表达,67 下降表达)、198 (109 上调,89 下调表达) 和 539 (216 上调,323 下调表达),分别占总表达数目的 26.3%、23.5% 和 63.9%。其中,3 h 和 24 h 时间点上有 21 个基因 (6 个上升,15 个下降),24 h 和 72 h 有 75 个基因 (27 个上升,48 个下降),3 h 和 72 h 两个时间点上有 33 个基因 (2 个上升,31 个下降) 的表达趋势相同,3 个时间点表达变化趋势相同的基因有 13 个 (1 个上升,12 个下降)。在这些显著的差异表达基因中,有 9 个基因在胁迫 3 h 表现为上升或下降表达,而在其它时间点中相反。

2.2 长期低硼胁迫下基因的表达

长期胁迫实验的差异表达基因可分为基因型特异表达基因和低硼诱导表达的基因。在基因型特异表达的基因里,统计两个生物重复向同一方向变化的为可靠的差异基因,在长期胁迫条件下差异表达的共

有 17 728 个, 占基因总数的 69.5%, 多于在正常硼条件下差异表达的 1 486 个基因, 其占基因总数 5.8%。如果以基因型之间的表达丰度的差异大于 2 来计算, 长期低硼下, 在 CS1938 和 Col-4 之间差异大于 2 倍的基因有 3 669 个, 而正常硼下, 只有 665 个。长期低硼条件下, 无论是差异表达的绝对数, 还是占基因总数的相对值, 低硼都能引起植物基因组内更大数量基因的差异表达。

低硼诱导特异表达的基因里, CS1938 受低硼诱导后的表达数目要大于 Col-4 的差异表达基因数目。在整体水平上, 5 740 (22.5%) 的基因在 CS1938 的 2 个生物重复中表达趋势相同, 而只有 3 380 (13.3%) 个基因在 Col-4 材料的 2 个生物重复中表达趋势相同。在 CS1938 中基因被低硼诱导表达的比例为 11.0%, Col-4 中的比例为 6.8%, 表明高效材料 CS1938 比低效材料 Col-4 对低硼胁迫的反应更为活跃。

2.3 差异表达基因的 Northern Blot 分析

为分析芯片结果的可靠性, 试验选用 6 个差异表达基因开展 Northern Blot 分析。这 6 个基因分别为 *At2g33790*、*At2g41730*、*At4g15750*、*At5g60660* 和 *At5g46900*。从图 2 (A) 可见, *At2g33790* 在缺硼 3 h 时为下降表达, 其他 2 个时间点没有检测到表达信号, 说明该基因随缺硼胁迫的延长, 表达成下降的趋势, 这与图 2 (B) 基本一致。*At2g41730*、*At5g60660* 和 *At5g46900* 3 个基因都有类似的结果 [图 2 (A) 和 (B)]。图 2 (A) 中缺硼胁迫 72 h 检测到表达, 与图 2 (B) 72 h 下上升表达 43.71 倍相一致, 说明该基因受缺硼胁迫诱导表达。这 6 个基因的 Northern Blot 结果与其芯片表达的一致性表明芯片结果的可靠性。

2.4 差异表达基因的功能分类

利用 MapMan 分级分类法^[14-15], 将所有鉴定的差异表达基因分为 36 个大类, 800 个亚类。分析这些分类的基因发现, 低硼短期胁迫下差异表达基因主要涉及细胞壁代谢、次生代谢、各种酶类、应答胁迫反应、激素代谢、RNA 转录调控、蛋白修饰和降解、信号转导、发育和物质转运等。而在长期低硼胁迫下, 大多下降表达的基因涉及碳水化合物和核酸代谢、DNA 合成与修复、RNA 合成与加工、蛋白合成代谢、细胞分裂与周期等。根据上述分类, 进一步将检测到的差异表达基因按功能分成细胞组分发生 (占 10%)、发育 (占 3%)、胁迫与防御反应 (占 14%)、信号传导 (占 6%)、离子通道和转运 (占 8%)、蛋白修饰 (占 2%)、转录调控 (占 11%)、能量 (占 4%)、代谢 (占 38%) 和其他 (占 4%) (图 3)。

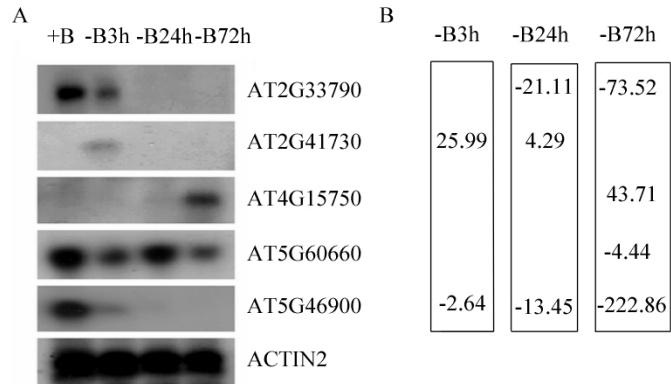


图 A 为 6 个基因在正常硼 (+B) 和缺硼 (-B) 胁迫 3, 24 和 72 h 的 Northern 杂交结果; B 为 A 对应的基因在缺硼胁迫下相对于正常硼的表达倍数, 负值表示下降表达。

A denotes the Northern hybridization results of six genes at normal boron (+B) and boron deficiency (-B) at 3 h, 24 h and 72 h. B denotes the expression times of the relevant genes in Fig. 2A in -B to +B, and the negative means down-regulated expression.

图 2 差异表达基因 Northern Blot (A) 分析与基因芯片结果 (B) 的比较

Fig. 2 Comparison of Northern Blot analysis and gene chip result

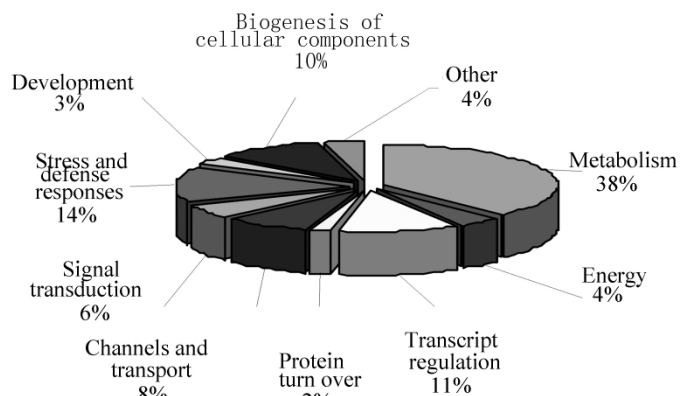
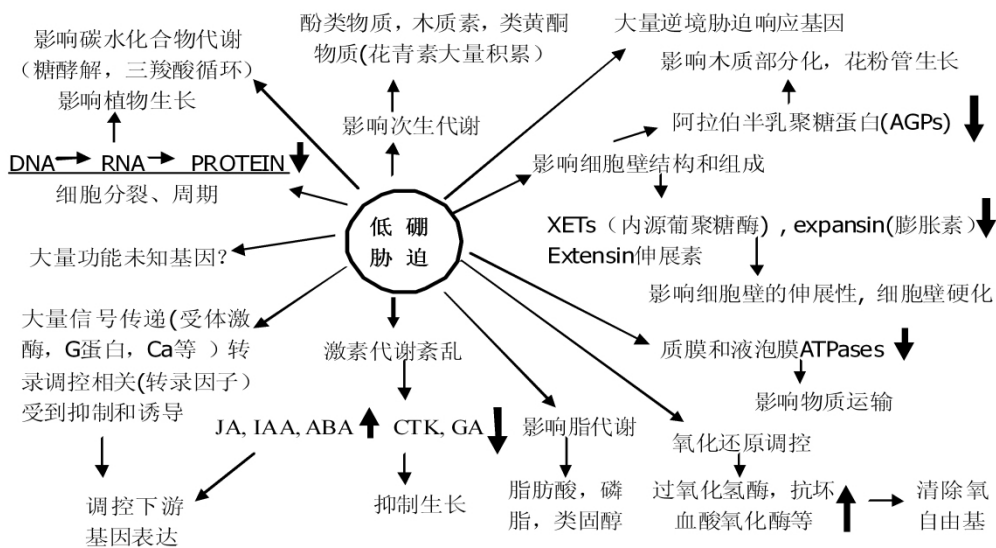


图 3 拟南芥响应低硼胁迫的差异表达基因的功能分类

Fig. 3 Functional categories of differentially expressed genes in response to low B stress in *Arabidopsis*

3 讨 论

植物硼的生理生化功能涉及到细胞壁和细胞膜的结构与稳定、碳水化合物运输、蛋白质和核酸的代谢、花粉萌发和花粉管的生长等诸多方面,可以推测这些生理生化功能都是受基因或蛋白等一系列调控的。本研究检测到拟南芥在短期缺硼胁迫下 3 个时间点共有 843 个基因的表达发生显著变化,其中有 446 个基因表现为上升表达,397 个基因为下降表达。而在长期低硼胁迫下检测到的差异表达基因更多,达到有 17 728 个,占基因总数的 69.5%。根据注释的基因功能,将这些差异表达基因分为细胞组分发生、发育、胁迫与防御反应、信号传导、离子通道和转运、蛋白修饰、转录调控、能量、代谢和其他共 10 类(图 3),并进一步推导出拟南芥响应低硼胁迫的代谢网络。这一代谢网络反应了硼参与生理生化功能的各个方面(图 4)。



图中细箭头表示代谢网络途径,粗箭头表示相关基因表达的上升或下降。

The fine arrow in the network denotes the pathway, and the thick arrow beside the metabolites denotes up (↑) or down (↓) regulation.

图 4 甘蓝型响应低硼胁迫的代谢网络

Fig. 4 Putative metabolic network of *Arabidopsis* in response to low B stress

3.1 响应缺硼胁迫信号传导系统

当植物在局部受到损伤时,可通过植物的信号传递系统在整个植物水平上发生防御反应。而在硼供应不足时,首先是新生组织细胞壁结构的完整性受到影响^[16-17]。本研究的芯片结果显示,在缺硼处理仅 3 h 时,参与植物系统防御的信号物质茉莉酸(JA)合成相关的基因 *ACO1*、*OPR2* 就呈现上调表达,这也就意味着正在生长组织受到低硼胁迫的影响后,能够马上合成茉莉酸这种系统信号物质来诱导整个植株的防御反应。随着胁迫的持续我们检测到了更多参与茉莉酸生物合成的基因呈现更高的上调表达。这表明茉莉酸在植物响应低硼胁迫的信号网络中起着重要作用(图 4)。在我们的芯片结果中还发现几个参与乙烯生物合成和乙烯响应因子 ERF 被上调表达,其中 1 个 ERF (*AT1G06160*) 已被证明是茉莉酸和乙烯信号传导途径中一个必需的协调因子^[18]。这说明茉莉酸与乙烯之间可能存在一个协同作用,这些信号还可能因硼缺乏引起细胞壁完整性受到影响所传递出^[19]。

硼缺乏导致另一种胁迫信号分子活性氧自由基类(ROS)的产生^[20-21],在本研究中,缺硼 3 h 就能检测到相关基因的表达,表明植物体可能在缺硼后很快就受到氧化胁迫,并作出了应激反应。同时,我们发现在低硼胁迫 3 h,有 2 个钙调蛋白和 1 个钙离子泵基因(*ACA12*)被诱导表达,在胁迫 72 h 和长期胁迫的条件下有更多与钙离子信号相关的基因被诱导表达。可能是因为硼缺乏导致细胞壁伸缩性变弱,难以维持正常膨压,然后通过钙调蛋白和钙离子泵调节引起 Ca^{2+} 的内流从而激活 ROS 信号产生,而前面提到的茉莉酸和乙烯信号则可能处于 ROS 的下游。

3.2 缺硼对膜转运系统的影响

当植物缺硼时,最为有效方式是通过增加硼的吸收或转运来应对。首个被克隆的硼转运子 *At-*

BOR1 已被鉴定是在蛋白水平上调控的,在转录水平没有变化。而硼酸通道 NIP5;1 则已被证明是主要是在硼缺乏的根中被诱导表达^[8],但在我们的结果中并没有检测到这个基因在胁迫前后的表达变化。这可能与本试验设计的一个相对低的硼浓度(1 $\mu\text{mol/L}$)作为对照有关,在1 $\mu\text{mol/L}$ 这样一个硼浓度对于硼高效株系 CS1938 在前30 d的生长不会产生任何可见硼缺乏表型(数据没有显示)。这与 Camacho-Cristóbal 等(2008)利用2 $\mu\text{mol/L}$ 硼作对照处理研究拟南芥 Col-0 根在缺硼条件下的转录组变化相一致^[22]。由此推测,NIP5;1 很可能是一个响应外部硼浓度变化的基因,在媒介硼酸浓度至少低于10 $\mu\text{mol/L}$ 就已被诱导表达来帮助植株更高效的吸收硼。

从我们芯片结果中发现,缺硼对膜转运系统影响最大的就是在长期胁迫下5个质膜和2个液泡膜 H^+ -ATPase 被抑制表达2~24倍。众所周知, H^+ -ATPase 通过驱动 ATP 水解产生大量质子并将其泵出细胞质,从而引起跨膜电位梯度为物质的运输提供驱动力。它们被抑制表达必然对依赖于这一转运系统的营养物质,尤其是阳离子的运输产生重大影响。而以前的研究显示低硼处理对 H^+ -ATPase 的影响大多是通过改变它的活性,而不是影响蛋白的数量^[23-24]。Camacho-Cristóbal 和 González-Fontes^[25]在对烟草根的研究中得到了和我们类似的结果,他们发现缺硼处理减少了质膜 H^+ -ATPase 基因 PMA2 的转录。这也说明硼的缺乏除了通过改变 H^+ -ATPase 活性外,还可以通过转录水平的调控来降低 H^+ -ATPase 的数量。

缺硼时质膜 H^+ -ATPase 的表达下降也必将影响依赖于其产生跨膜电位梯度作为驱动力的钾离子的吸收。本研究发现硼的缺乏可以直接影响多个钾转运子和通道基因的表达,缺硼对外向型钾离子通道基因 SKOR 的影响可能早于对质膜 H^+ -ATPase 的影响,在胁迫24 h后,SKOR 就被下调表达3.7倍,随着胁迫的持续它的表达被更强烈的抑制,在72 h和长期胁迫条件下它分别被抑制表达4.3和10.9倍。这也是首次发现硼的缺乏能够对编码钾的转运子和通道基因的转录产生影响。

参考文献:

- [1]石磊,徐芳森.植物硼营养研究的几个重要进展与展望[J].植物学通报 2007 24(6):789-798.
- [2]Wang Y H, Lei S, Cao X G, et al. Studies on plant boron nutrition and boron fertilization in China[M]//Xu F S. Advances in Plant and Animal Boron Nutrition. Netherlands: Springer, 2007:93-101.
- [3]Shorrocks V M. The occurrence and correction of boron deficiency[J]. Plant Soil, 1997, 193:121-148.
- [4]刘武定.微量元素与微肥施用[M].北京:中国农业大学出版社,1995.
- [5]O'Neill M A, Eberhard S, Albersheim P, et al. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth[J]. Science, 2001, 294:846-849.
- [6]O'Neill M A, Ishii T, Albersheim P, et al. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55:109-139.
- [7]Takano J, Noguchi K, Yasumori M, et al. *Arabidopsis* B transporter for xylem loading[J]. Nature, 2002, 420:337-340.
- [8]Takano J, Wada M, Ludewig U, et al. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation[J]. Plant Cell, 2006, 18:1498-1509.
- [9]Wimmer M A, Lochnit G, Bassil E, et al. Membrane-associated, boron-interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography[J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50:1292-1304.
- [10]Zeng C Y, Xu F S, Wang Y H, et al. Physiological basis of QTLs for boron efficiency in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Soil, 2007, 296:187-196.
- [11]Zeng C Y, Han Y L, Shi L, et al. Genetic analysis of the physiological responses to low boron stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant, Cell and Environment, 2008, 31:112-122.
- [12]Zhao H, Shi L, Duan X L, et al. Mapping and validation of chromosome regions conferring a new boron-efficient locus in *Brassica napus* [J]. Molecular Breeding, 2008, 22(3):495-506.
- [13]Jefferies S P, Barr A R, Karakousis A, et al. Mapping of chromosome regions conferring boron tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98:1293-1303.
- [14]Thimm O, Blasing O, Gibon Y, et al. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes[J]. Plant Journal, 2004, 37:914-939.
- [15]Usadel B, Nagel A, Thimm O, et al. Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses[J]. Plant Physiology, 2005, 138:1195-1204.

- RR, Zibadi S, Preedy VR. Dietary Components and Immune Function Springer 201: 553 – 565.
- [40] Cao H, Kelly M A, Kari F et al. Green tea increases anti-inflammatory tristetraprolin and decreases pro-inflammatory tumor necrosis factor mRNA levels in rats [J]. J Inflamm (Lond), 2007, 4(1): 1.
- [41] Cao H, Qin B, Panickar K S et al. Tea and cinnamon polyphenols improve the metabolic syndrome [J]. Agro Food industry high-tech, 2008, 19(6): 14 – 17.
- [42] Worthington M T, Amann B T, Nathans D et al. Metal binding properties and secondary structure of the zinc-binding domain of Nup475 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(24): 13754 – 13759.
- [43] Chrestensen C A, Schroeder M J, Shabanowitz J et al. MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding [J]. J Biol Chem, 2004, 279(11): 10176 – 10184.
- [44] Kedar V P, Darby M K, Williams J G et al. Phosphorylation of human tristetraprolin in response to its interaction with the Cbl interacting protein CIN85 [J]. PLoS One, 2010, 5(3): 9588.
- [45] Cao H, Sullivan T D, Boyer C D et al. Bt1, a structural gene for the major 39 – 44 kDa amyloplast membrane polypeptides [J]. Physiol Plant, 1995, 95(2): 176 – 186.
- [46] Sullivan T D, Kaneko Y. The maize brittle 1 gene encodes amyloplast membrane polypeptides [J]. Planta, 1995, 196(3): 477 – 484.
- [47] Cao H, Shannon J C. BT1, a protein critical for in vivo starch accumulation in maize endosperm, is not detected in maize endosperm suspension cultures [J]. Physiol Plant, 1996, 97(4): 665 – 673.
- [48] Cao H, Shannon J C. BT1, a possible adenylate translocator, is developmentally expressed in maize endosperm but not detected in starchy tissues from several other species [J]. Physiol Plant, 1997, 100(2): 400 – 406.
- [49] Shannon J C, Pien F M, Cao H et al. Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial synthesized ADP—glucose into amyloplasts of maize endosperms [J]. Plant Physiol, 1998, 117(4): 1235 – 1252.

(上接第 1009 页)

- [16] Findelee P, Goldbach, H E. Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in *Cucurbita pepo* roots [J]. Botany Acta, 1996, 109: 463 – 465.
- [17] Goldbach H E, Yu Q, Wingender R, et al. Rapid response reactions of roots to boron deprivation [J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 2001, 164: 173 – 181.
- [18] Pré M, Atallah M. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense [J]. Plant Physiology 2008, 147: 1347 – 1357.
- [19] Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, et al. The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses [J]. Plant Cell 2002, 14: 1557 – 1566.
- [20] Kobayashi M, Mutoh T, Matoh T. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. IV. Genes induced under low boron supply [J]. Journal of Experimental Botany 2004, 55: 1441 – 1443.
- [21] Koshiba T, Kobayashi M, Matoh T. Boron nutrition of tobacco BY-2 cells. V. oxidative damage is the major cause of cell death induced by boron deprivation [J]. Plant Cell Physiology 2009, 50(1): 26 – 36.
- [22] Camacho-Cristóbal J J, Herrera-Rodríguez M B, Beato V M, et al. The expression of several cell wall-related genes in *Arabidopsis* roots is down-regulated under boron deficiency [J]. Environmental and Experimental Botany 2008, 63(1-3): 351 – 358.
- [23] Schon M K, Novacky A, Blevins D G. Boron induces hyperpolarization of sunflower root cell membrane and increases membrane permeability to K⁺ [J]. Plant Physiology, 1990, 93: 566 – 571.
- [24] Ferrol N, Belder A, Roldan M, et al. Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes [J]. Plant Physiology, 1993, 103: 763 – 769.
- [25] Camacho-Cristóbal J J, González-Fontes A. Boron deficiency decreases plasmalemma H⁺-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots [J]. Planta 2007, 226: 443 – 451.