

苹果属山荆子 *MbNramp1* 基因克隆、序列与表达分析

肖海华^{1,2,3}, 印莉萍³, 韩振海^{1,*}

(¹ 中国农业大学园艺植物研究所, 北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室, 北京 100193; ² 四川农业大学资源环境学院, 四川雅安 625014; ³ 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: 以苹果属山荆子为试材, 根据 *Nramp1* 同源序列保守区设计两对简并引物进行 PCR, 结合 RACE 技术获得了 3'末端和 5'末端片段, 将 3 段片段序列拼接, 根据拼接序列获取了 *MbNramp1* 基因全长 cDNA 序列。*MbNramp1* cDNA 长 2 090 bp, 包含一个长度为 1 656 bp 的开放阅读框, 编码 551 个氨基酸的多肽, 分子量约为 59.7 kD。该基因编码的蛋白是一个膜蛋白, 76%以上的氨基酸为非极性。*MbNRAMP1* 与二价铁、锰转运蛋白 NRAMP 基因家族保守性很高, 具有 NRAMP1 金属转运蛋白家族基因典型特征, 即含有推断的 N-端相连的糖基化位点、10 个预测的跨膜结构域 (TMs), 在第 6 和第 7 跨膜结构域间有一个相同的转运基序 (CTM)。低铁胁迫时 *MbNramp1* 在根中表达量增加。

关键词: 山荆子; *Nramp1*; *MbNramp1*; 铁转运蛋白; 锰转运蛋白

中图分类号: S 661

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 09-1409-07

MbNramp1 Gene Cloning, Sequence Analysis and Expression Analysis in *Malus baccata* (L.) Borkh.

XIAO Hai-hua^{1,2,3}, YIN Li-ping³, and HAN Zhen-hai^{1,*}

(¹ Institute for Horticultural Plants, Key Laboratory of Beijing Municipality of Stress Physiology and Molecular Biology for Fruit Trees, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ² College of Resources and Environment, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; ³ College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Degenerate primers corresponding to the conserved motifs of NRAMP1 in plants were used to amplify specific DNA fragments from *Malus baccata* (L.) Borkh. roots cDNA. Then the gene specific primers were designed based on the obtained specific DNA fragments, the 3' end and 5' end fragments were amplified by RACE. A 2 090 bp full length cDNA *MbNramp1* containing a 1 656 bp ORF was obtained based on specific DNA fragments. *MbNramp1* encodes a polypeptide of 551 amino acids with a predicted molecular mass of 59.7 kD and a membrane protein with more than 76% non-polar amino acids. All conserved features of NRAMP described previously were present in the predicted *MbNRAMP1* sequence, such as putative N-linked glycosylation sites, 10 transmembrane domains (TMS) and a

收稿日期: 2010-04-16; **修回日期:** 2010-08-17

基金项目: 国家转基因专项 (2009ZX08009-122B); 国家自然科学基金项目 (30971982, 30800741, 30700545, 30671441); 中国博士后科学基金特别资助项目 (200902153)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: rschan@cau.edu.cn)

consensus transporter motif (CTM) located between VI and VII TM. Expression of *MbNramp1* was increased in roots under iron deficiency, and its mRNA accumulation patterns differed with the induction time.

Key words: *Malus baccata*(L.)Borkh.; *Nramp1*; *MbNramp1*; iron transporter; manganese transporter

缺铁诱发的植物新叶变黄是全球普遍存在的主要农业问题之一 (Römheld & Marschner, 1986; Ling et al., 1999)。从分子水平克隆与鉴定植物中活化吸收利用铁的转运蛋白基因是目前很有必要开展的课题。目前, 已经发现植物中存在两类参与铁吸收的基因即 *Irt/Zip* 和 *Dmt/Nramp* (Eide et al., 1996; Belouchi et al., 1997; Curie et al., 2000; Thomine et al., 2000; Connolly et al., 2002; Vert et al., 2002; Bereczky et al., 2003)。NRAMPs (Natural resistance-associated macrophage proteins) 是具有高度保守膜蛋白, 广泛存在于细菌、真菌、植物、微生物中 (Cellier et al., 1996, 2001; Williams et al., 2000)。前人的研究表明, 不同物种中 *Nramps* 表现出功能差异。番茄中 *LeNramp1* 受铁营养状况调节在根中专一表达 (Bereczky et al., 2003)。拟南芥 *AtNramp1*, *AtNramp3* 和 *AtNramp4* 编码功能性金属转运蛋白, 当植株中供铁量低时表达量较高 (Curie et al., 2000; Thomine et al., 2000)。据报道, *AtNramp1* 作为金属转运蛋白能够互补酵母 Fe(II) 转运突变株 DEY1453 (Curie et al., 2000; Thomine et al., 2000)。*AtNramp3* 作为金属转运蛋白能够将液泡中的金属运输到液泡膜附近的细胞质中 (Thomine et al., 2003)。*AtNramp3* 和 *AtNramp4* 活化液泡中的铁对种子萌发有促进作用 (Lanquar et al., 2005)。*TjNramp4* 存在于 Ni 超富集植物 (*Thlaspi japonicum*) 中, 专一转运 Ni, 而不转运 Zn, Cd 或 Mn (Mizuno et al., 2005)。山荆子 [*Malus baccata* (L.) Borkh.] 具有极强的抗寒性, 能够耐 -45 °C 的低温, 在我国北方广泛用作苹果砧木 (韩振海和沈隽, 1991)。为了弄清 *Nramp* 家族基因是否在本木植物中存在并在金属元素铁的吸收转运过程中发挥着作用, 本试验中以山荆子为试材, 采用简并引物结合 RACE 技术克隆山荆子中的 *Nramp1* 基因, 并对基因全长序列进行生物信息学分析, 同时初步研究了低铁胁迫时该基因在根中的表达特性。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验于 2003 年 3 月—2004 年 10 月在中国农业大学北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室进行。取 2 个月苗龄山荆子 [*Malus baccata* (L.) Borkh.] 无菌苗于生根培养基中培养, 生根后的壮苗移入半完全营养液中培养, 1 周后更换完全营养液 (Han et al., 1994)。培养 3 个月分为正常处理与缺铁胁迫处理组。正常处理组供铁 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (EDTA- Fe^{2+}) 作为对照, 缺铁胁迫处理组供铁 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (EDTA- Fe^{2+}), 其余营养成分不变, 缺铁胁迫处理 15 d。胁迫期间进行取样, 取样时期为 5 d 和 15 d, 取样部位为新生幼嫩白根, 立即用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱中。

1.2 cDNA 的制备、引物设计、基因克隆与序列分析

总 RNA 提取采用 SDS 法。第一链 cDNA 合成按照 SuperScriptTMIII Reverse Transcriptase 试剂说明书操作。通过对高等植物中 NRAMP1 蛋白进行比对, 发现该类蛋白有 7 个保守区 (Region), 根据第 1, 4, 7 个保守区设计简并引物进行目的片段扩增, 各引物代码与序列见表 1。

目的片段扩增按照 LA Taq 酶说明书进行操作。PCR 法扩增反应体系: 模板 $10 \times \text{buffer II}$ 5 μL , dNTP mix (各 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 8 μL , 引物 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , cDNA 0.5 μL , LA Taq 酶 1.0 μL , ddH₂O 补充至总体积 50.0 μL 。PCR 程序设计参照 Sambrook 和 David (2003) 的方法: 94 °C 变性 3

min, 94 ℃ 变性 40 s, 58 ℃退火 40 s, 72 ℃延伸 2 min, 30 个循环, 72 ℃延伸 10 min。3'-RACE 和 5'-RACE 按照 Takara 试剂盒说明书进行。T-A 克隆按照 T-Vector 试剂盒说明书进行。感受态制备、转化、蓝白筛选参照文献（印莉萍和刘祥林, 2001）中的方法。

通过网站（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>）进行检索, 用 DNAMAN 6.0.3.48 进行进化树分析, 用 TMHMM 2.0 进行蛋白跨膜结构域分析。

表 1 引物代码与引物序列
Table 1 Primers' code and their sequence

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
R ₁ UP	gAR ACT gAT YTN CAA gCW ggW gC;	A1	5'-AgC AgA AgT AgC CgT CAT AgC g-3'
R ₄ LP	gC HgA gtg vAR RRA ADA gAT TRT gYg gCA T	S1	5'-TTC CgC CTT gCA TAA TTC TgA C-3'
R ₄ UP	gTD ATg CCR CAY AAT CTM TTC YTB CAC TC	A2	5'-TgA CAT ACC CgA AgT TAT Tgg C-3'
R ₇ LP	TCA TTg CHT CKA TGA THY TWT CCT TTG A	S2	5'-ggT TTg CTg AgA gAg ACT ggA T-3'
R ₁₋₇ UP	ggA gCA AAT CAC AGA TAC gAg C	GSUP for 3'-RACE	5'-CAT TAT Cgg Cgg ATC TTC Agg A-3'
R ₁₋₇ LP	CAA TgA TAA TgA gCC TTC CTg C	UP	5'-CAC ATT CAg gCA ATA CTA gTC ATC-3'
RT-primer	5' (p) -CA ggC CAA gAA ggA g-3'	3 sites Adaptor Primer	3'-Full RACE Core set

1.3 半定量 RT-PCR 分析

采用特异引物 R₁₋₇UP 和 R₁₋₇LP 进行 RT-PCR, 对照选用 *Actin* 基因, 引物为 AUP: gac atg gag aag atc tgg cac cac a; ALP: cgc cac gta cgc cag ctt cta ctt c。RT-PCR 反应 25 μL: 10 × PCR buffer 2.5 μL; dNTP mix (10 mmol · L⁻¹) 1 μL, 引物 (10 mmol · L⁻¹) 各 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 18 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL。94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 28 个循环。

2 结果与分析

2.1 *MbNramp1* 基因扩增、克隆与测序

依据 *Nramp1* 同源序列设计了两对简并引物 R₁UP/R₄LP 和 R₄UP/R₇LP。以 cDNA 为模板进行扩增, 两对简并引物分别扩增出了一条 500 bp 左右的片段。根据片段测序结果将两序列拼接, 根据拼接序列设计特异引物 R₁₋₇UP/R₁₋₇LP, 进行 PCR 获得产物为 1 000 bp 左右的基因片段, 将该片段命名为 *MbNramp1*R1-7。

3'-Full RACE PCR 产物片段 3'端长度为 836 bp, 该 cDNA5'端包含特异引物序列 GSUP 及已知 *MbNramp1*R1-7 的部分序列, 3'末端包含互补 Oligo dT-3sites Adaptor Primer 和一段 poly (A) 尾巴。5'-RACE 产物片段长为 628 bp, 其中包含已知 *MbNramp1*R1-7 的部分序列片段和相应的引物序列, 并含有起始密码子。

将已经得到的 5'端、*MbNramp1*R1-7、3'端 3 个片段进行序列拼读, 初步获得全长序列信息, 然后在上游设计特异引物 UP 与 3sites Adaptor Primer 配对扩增全长, 大小与拼读全长大小基本一致, 将该片段命名为 *MbNramp1*, 测序结果表明该序列含有 2 090 bp, 与拼读序列一致 (图 1)。

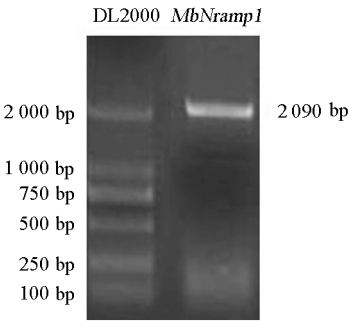


图 1 *MbNramp1* 全长 PCR 产物
Fig. 1 *MbNramp1* PCR product

2.2 序列比对与进化树分析

利用生物学软件 DNAMAN6.0 对 *MbNramp1* 全长序列进行分析 (图 2), *MbNramp1* cDNA 包含一个长度为 1 656 bp 的开放阅读框, 其中 A、T、G、C 4 种碱基含量分别为 27.85% (A), 28.37% (T), 21.39% (G) 和 22.30% (C), 3'非翻译区长度为 345 bp, 5'非翻译区为 89 bp, 由此 cDNA 核苷酸序列推导出一条编码 551 个氨基酸的多肽, 分子量约为 59.7 kD。

```

CACATTCAGGCAACTACTAGTCATCCCTACTCAATTTAACTAGCTGCTGCAGATCACAGACACAGAGAGAGATGGAAAACAAA
1
ATACAAGATCAGCAACAGGGAACGAGTACAGATGGAGCTTCCAAACGCATATCAGCCATCTATTAGAACCCACACCACCA
I Q D Q Q Q G T S T D G A S K R I S A I Y S E P T P P
CCACCCAGCGAACACTTTGATCTTGAGCTTGATCATAATACTGACCTAAGGATGAGCCTCAGAAGCCTGGATTGAGAAA
P P S E H F D L E L D H N T D P K D E P Q K P G L R K
GTTTCTAGCACATGTTGGCCCTGGCTTCCTTGTCTCTTTGGCTTACCTTGATCCTGGCAACTTGGAACTGATCTCCAAGC
F L A H V G P G F L V S L A Y L D P G N L E T D L Q A
TGGAGCAAATCACAGATACGAGCTGCTATGGGTGATTCTTATGGATTGATCTTCGCTCTCATAATCCAGTCTCTCTCAGC
G A N H R Y E L L W V I L I G L I F A L I I Q S L S A
AAACCTTGGTGTGATAACTGGGAAACATTTGTCAGAATTATGCAAGCGGAATACCCACCATTGTGAAGTATTGTTTGTG
N L G V I T G K H L S E L C K A E Y P P F V K Y C L W
GTTGCTAGCAGAAGTAGCCGTCATAGCGGCTGACATACCCGAAGTTATTGGCACAGCGTTGCCCTAAATATACTGTTCAA
L L A E V A V I A A D I P E V I G T A F A L N I L F N
TATTCCAGTTTGGACTGGAGTACTCTTAAGTGGTTTTCAGTACTCTTCTCTTCTTGGCCTGCAGAAATATGGGGTGAGGAA
I P V W T G V L L T G F S T L L L L G L Q K Y G V R K
GCTGGAAATGCTGATAGCAGTGTGTTGTTGTGATGGCTGCCTGTTTCTTGGGGAATGAGTTATGTGAAGCCTCCGGC
L E M L I A V L V F V M A A C F F G E M S Y V K P P A
ATCCGGTGTGCTCAAAGGCATGTTTCATCCCTAAGCTCAGCGCCAGGGAGCCACCGGAGATGCCATTGCCCTCTTGGGTGC
S G V L K G M F I P K L S G Q G A T G D A I A L L G A
CCTTATTATGCCGCACAATCTTTTCTCCACTCAGCTCTTGTGCTTTCAAGGAAAATTCCAAATTCGTCCGTGGCATGAA
L I M P H N L F L H S A L V L S R K I P N S V R G M N
CGATGCATGTCGATATTTCTTGATAGAGAGTGGATTTCGATTATTTGTAGCATTTTAAATCAATGTTGCTATTATATCCGT
D A C R Y F L I E S G F A L F V A F L I N V A I I S V
ATCCGGCACCCTTTGCCATCAGAGCAACCTCTCGGATAAGAACAACGACACATGCAGTGATCTTACTCTCAATTCGTCTTC
S G T V C H Q S N L S D K N N D T C S D L T L N S A S
CTTTCTCTCCAGAATGTGTTGGGACGATCAAGCAAAATCTTGATGCCATTGCAGTATTAGCCTCAGGCCAAAGCTCCAC
F L L Q N V L G R S S K I L Y A I A L L A S G Q S S T
GATTACAGGCACTTACGAGGACAATTTGTCATGCAGGGTTTCTTGACATTAAGATGAAAAATGGGCTAGAACTTGAT
I T G T Y A G Q F V M Q G F L D I K M K K W A R N L M
GACGAGGTGCATTGCCATTACCAAGCCTCATTTGTTTCCATTATCGGTGGATCTTCAGGAGCAGGAAGGCTCATTATCAT
T R C I A I T P S L I V S I I G G S S G A G R L I I I
TGCTCGATGATACTATCTTTTGTAGCTCCCATTTGCTCTAATTCCTACTCCTCAAATTCAGCGGTAGTGCCACCAAAATGGG
A S M I L S F E L P F A L I P L L K F S G S A T K M G
ACCCCAAGAATTCATCTATATCATTTGTGATATCATGGATTATAGGAATGGCAATCATAGGCATCAACATCTACTACCT
P H K N S I Y I I V I S W I I G M A I I G I N I Y Y L
CAGCACAGGATTTGTAGGTGGATAATCCACAGCAGTCTACCCAAAGTTGCAACTGTGTTCATTGGGATCTTGGTGTTCCT
S T G F V G W I I H S S L P K V A T V F I G I L V F P
TATCATGGCCATTACATCCTTGACAGTCTTTACCTAGCCCTAAGAAAAGACAGTGTGGTAACCTTTTGTGAGCCACAAA
I M A I Y I L A V L Y L A L R K D S V V T F V E P T K
GAACGACCCAGCAGCCCAAAACCAATGGAAAATGGGCTTCCCAACTATGGTGAGCCCCAGTGCCTTTCAGAGAGGACTT
N D P A A Q N Q M E N G L P N Y G E P P V P F R E D L
GGCTGACGTATCTTTACCTCAATAGAGGACATATATTTTCATATGCATATGCTTCCCACTTTGCATTACGAGTGTTAGT
A D V S L P Q *
CGAACCTAATACCTGTTGAACCTTCGTACCGGTTCAAGACCTTCGAGGAAAAGAGACGAGCCGTGTTAGTTCGAACCTAATAC
CTGCCGAATCTTTGTACCGTTTCGAGACCTTGAGAGGAAAGGACGAGCGTTGCACTTAAGAATTAAGATTGTAATGGTTT
TTTATGAAC TAGAAGATAGAAGCTCTTAAAGAAGTAGTAGGACTCTTATTGTATCACTCGGATAGTGCCCCGAGAGGATT
ATGTGGTGTATTATCATATTGAATAATAATATCTAAGGGAAGAATAATCAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 *MbNramp1* 基因序列及其编码蛋白质

Fig. 2 The nucleotide sequence and amino acid sequence of *MbNramp1* gene

MbNramp1 基因的保守结构域分析结果 (图 3) 表明: *MbNramp1* 与 *Nramp* 基因家族的 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 转运蛋白极保守, E 值 (E value) 为 $2e-122$, 得分 (Score) 434 bits。

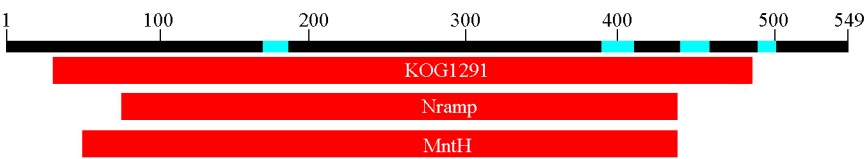


图 3 *MbNramp1* 保守结构域分析

Fig. 3 Analysis conserved domain of *MbNramp1*

用 TMHMM 2.0 对蛋白质结构进行预测, MbNRAMP1 蛋白含有推断的 N - 端相连的糖基化位点、10 个推断的跨膜域 (TMs) (图 4), 在第 6 和第 7 跨膜结构域间有一个相同的转运基序 (CTM)。

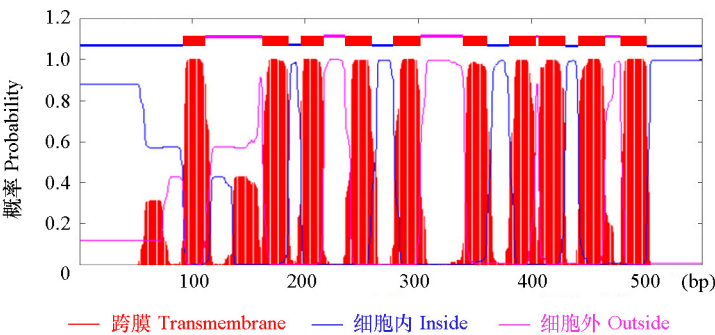


图 4 MbNRAMP1 蛋白跨膜结构域预测

Fig. 4 Prediction of trans-membrane helices in MbNRAMP1 protein

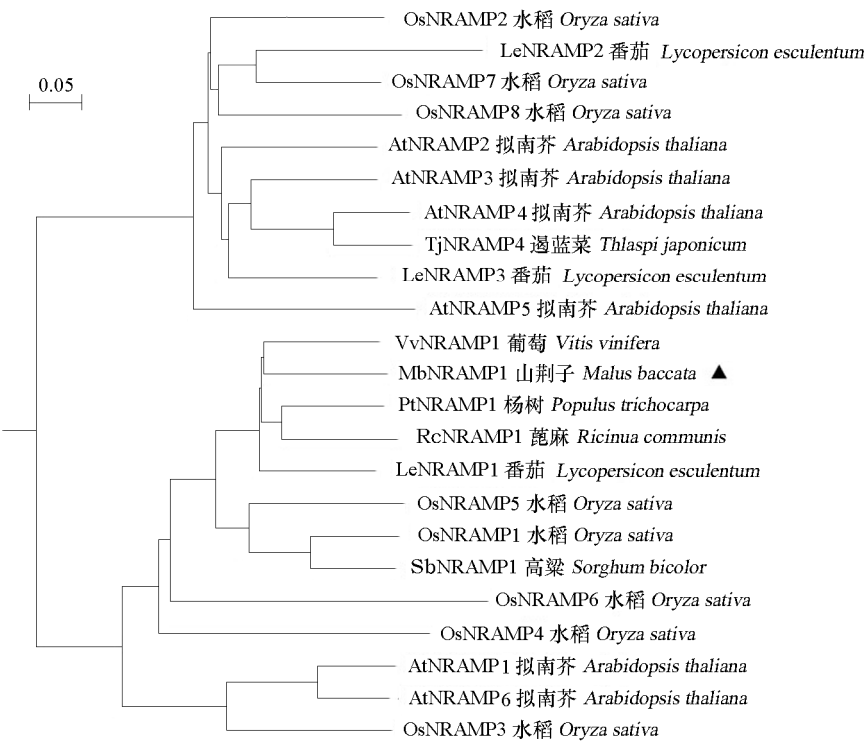


图 5 植物中 *Nramp* 基因家族亲缘关系进化分析

Fig. 5 Dendrogram showing amino acid sequence similarity among plants *Nramps*

已知生物体中 *Nramps* 是一个基因家族。将 MbNRAMP1 与 3 个番茄蛋白、8 个水稻蛋白、6 个拟南芥蛋白、1 个葡萄蛋白、1 个杨树蛋白、1 个蓖麻蛋白、1 个遏蓝蛋白和 1 个高粱蛋白进行进化树分析 (图 5), 结果表明 MbNRAMP1 与葡萄中 VvNRAMP1 亲缘关系最近。

2.3 山荆子 *MbNramp1* 基因在根中的表达特性分析

在克隆到山荆子 *MbNramp1* 基因的特异片段 *MbNramp1*R1-7 后, 对其进行半定量 RT-PCR 分析, 结果表明 (图 6), 与正常供铁 ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, 低铁 ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 胁迫后, *MbNramp1* 基因在山荆子根中加强表达, 低铁胁迫 5 d 时, 表达量最高, 随着时间延长, 低铁胁迫达到 15 d 时, 表达量减弱, 但是与对照相比, 表达量仍稍微高一些。

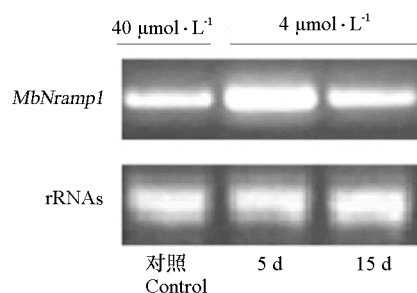


图 6 *MbNramp1* 基因表达特性分析

Fig. 6 Expression of *MbNramp1* in *Malus baccata* (L.) Borkh.

3 讨论

作者从苹果属山荆子中获得了 NRAMP 金属离子转运蛋白的 cDNA 克隆, *MbNramp1*。推测的氨基酸序列分析表明该基因编码一个膜蛋白, 76% 以上的氨基酸都是非极性的, 且和已知的植物中 NRAMP 蛋白具有较高的同源性, 尤其和葡萄中的 VvNRAMP1 同源性最高, 因而将该基因命名为 *MbNramp1*。*MbNramp1* 具有 *Nramp* 金属转运蛋白家族典型特征。RT-PCR 分析结果表明, 山荆子中 *MbNramp1* 的时空表达受外界供铁状况影响, 在正常供铁条件下, 根中有少量转录, 当受到低铁胁迫时, *MbNramp1* mRNA 表达呈增加趋势。这些结果与 Eide 等 (1996) 在植物生理方面的研究结果一致, 在供铁充足条件下, 植物对铁吸收处于一个较低的基本水平, 当铁缺乏时, 吸铁速率是供铁充足的 2.8 倍。铁胁迫时诱导 *MbNramp1* 表达量增加, 这表明 *MbNramp1* 在苹果体内可能参与了缺铁应答反应。然而低铁胁迫 5 d 后, *MbNramp1* 在根中表达随时间延长, 表达量减弱。这表明在缺铁的苹果根中 *MbNramp1* mRNA 表达量迅速增加。低铁胁迫条件下苹果中 *MbNramp1* 表达受到正向调控。对此可能的解释是, 一旦植物感应到其生长环境中受到低铁胁迫, 植物细胞将大规模吸收铁。植物自身必须防止细胞质中迅速累积大量自由态铁, 以免对细胞造成损伤, 这样 *MbNramp1* 开始将胞内自由态铁运输到细胞的各区域。

本试验中仅克隆了山荆子中的 NRAMPs 蛋白家族其中一个成员基因 *MbNramp1*, NRAMPs 蛋白家族其它成员基因克隆工作已经展开, 以期全面了解 NRAMPs 蛋白在山荆子铁营养吸收、转运方面发挥的作用。

References

- Bereczky Z, Wang H Y, Schubert V, Ganai M, Bauer P. 2003. Differential regulation of nramp and irt metal transporters gene in wild type and iron uptake mutants of tomato. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 24697 - 24704.

- Belouchi A, Kwan T, Gros P. 1997. Cloning and characterization of the OsNRAMP family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, 33: 1085 – 1092.
- Cellier M, Belouchi A, Gros P. 1996. Resistance to intracellular infections: Comparative genomic analysis of NRAMP. *Trends in Genetics*, 12: 201 – 204.
- Cellier M F M, Bergevin I, Boyer E, Richer E. 2001. Polyphyletic origins of bacterial NRAMP transporter. *Trends in Genetics*, 17: 365 – 370.
- Connolly E L, Fett J P, Guerinot M L. 2002. Expression of the IRT metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Physiology*, 116: 1063 – 1072.
- Curie C, Alonso J M, Jean M L E, Ecker J R, Briat J F. 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal*, 347: 749 – 755.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot M L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93: 5624 – 5628.
- Han Z H, Shen T. 1991. Iron Deficiency Chlorosis: A Literature Review. *Acta Horticulturae Sinica*, 18: 323 – 328.
- 韩振海, 沈 隽. 1991. 果树的缺铁失绿症——文献述评. *园艺学报*, 18: 323 – 328.
- Han Z H, Shen T, Korcak R F, Baligar V C. 1994. Screening for iron-efficient species in the genus *Malus*. *Journal of Plant Nutrition*, 17: 579 – 592.
- Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Brygø H B, Thomine S. 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal*, 24: 4041 – 4051.
- Ling H Q, Koch G, Baumlein H, Ganai M W. 1999. Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 96: 7098 – 7103.
- Mizuno T, Usui K, Horie K, Nosaka S, Mizuno N, Obata H. 2005. Cloning of three ZIP/NRAMP transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni^{2+} -transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 793 – 801.
- Römhelt V, Marschner H. 1986. Evidence for a specific system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, 80: 175 – 180.
- Sambrook J, David W R. 2003. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 597 – 701.
- Thomine S, Wang R C, Ward J M, Crawford N M, Schroeder J I. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97: 4991 – 4996.
- Thomine S, Lelièvre F, Debrabieux E, Schroeder J I, Barlier-Brygø H. 2003. AtNRAMP3, a multi-specific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant Journal*, 34: 685 – 695.
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gamard F. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. *Plant Cell*, 14: 1223 – 1233.
- Williams L E, Pittman J K, Hall J L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 104 – 126.
- Yin Li-ping, Liu Xiang-lin. 2001. *Molecular cell biology technology*. Beijing: Capital Normal University Press: 55 – 65. (in Chinese)
- 印莉萍, 刘祥林. 2001. *分子细胞生物学实验技术*. 北京: 首都师范大学出版社: 55 – 65.