

蝴蝶兰抗坏血酸过氧化物酶基因克隆及其表达研究

许传俊^{1,2}, 孙叙卓², 李玲^{2,*}, 茹志伟², 曾碧玉¹, 刘育梅³, 黄珺梅¹

(¹福建省亚热带植物研究所, 福建省亚热带植物生理生化重点实验室, 福建厦门 361006; ²华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; ³厦门华侨亚热带植物引种园, 福建厦门 361002)

摘要: 从蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 中克隆获得了抗坏血酸过氧化物酶基因 (APX) 同源序列, 命名为 *PhAPX* (GenBank 登录号为: FJ161977)。*PhAPX* cDNA 全长为 1 320 bp, 完整的编码框为 747 bp, 编码 249 个氨基酸。生物信息学分析结果表明, *PhAPX* 属于过氧化物酶家族 Class I 的成员, *PhAPX* 蛋白可能是胞质型 APX, 与其他植物的 APX 相似性较高。real-time PCR 分析表明 *PhAPX* 是一个广谱表达的基因, 在蝴蝶兰根、茎、叶、花等各个部位都有表达。机械伤害和盐处理都可以诱导 *PhAPX* 表达上调, 表明 *PhAPX* 在胁迫防御中起作用。

关键词: 蝴蝶兰; APX; 克隆; 表达; real-time PCR

中图分类号: S 682.31

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 04-0769-08

Molecular Cloning and Expression Analysis of Homological Gene *APX* from *Phalaenopsis*

XU Chuan-jun^{1,2}, SUN Xu-zhuo², LI Ling^{2,*}, RU Zhi-wei², ZENG Bi-yu¹, LIU Yu-mei³, and HUANG Jun-mei¹

(¹ Fujian Key Laboratory of Physiology and Biochemistry for Subtropical Plant, Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian 316006, China; ² Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; ³ Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen, Fujian 361002, China)

Abstract: The APX homolog sequence, *PhAPX* (GenBank accession No. FJ161977) was cloned from *Phalaenopsis* plant. The full length cDNA of *PhAPX* was 1 320 bp, has an open read frame of 747 bp, encoding a protein of 249 amino acids. Bioinformatic analysis showed that *PhAPX* protein shared the characters of Class I of peroxidase family. Amino acids sequence analysis suggested that *PhAPX* protein might locate in cytoplasm and *PhAPX* was highly similar to other APX proteins. Real-time PCR analysis showed that *PhAPX* mRNA, a broad-spectrum expression gene, was expressed in the organs in *Phalaenopsis* including root, stem, leaf and flower. *PhAPX* was also found to be up-regulated by wound and NaCl, which suggested that it might play a role on stress.

Key words: *Phalaenopsis*; APX; clone; expression; real-time PCR

收稿日期: 2012-01-09; 修回日期: 2012-03-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070618); 广东省自然科学基金项目 (05300272)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lilings02@126.com)

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 属热带气生兰, 是兰科植物中栽培最广泛、最普及的观赏植物之一。近年来, 农杆菌介导的遗传转化被应用于蝴蝶兰的分子遗传育种, 但组织培养中外植体易发生褐变的问题成为影响此技术进一步应用的障碍。在植物的初代培养过程中, 由于材料从母体上切割下来等机械损伤会导致材料体内的活性氧 (ROS) 含量增加, 活性氧破坏了膜的完整性 (Lee & Whitaker, 1995), 导致酚与酶区域化分布被破坏。有研究表明活性氧在组织褐变中起重要作用 (Takahama & Takayuki, 2000; Takahama, 2004; 林河通 等, 2005; Dan, 2008), 植物在长期进化过程中形成了一系列抗氧化保护机制来清除或降低 ROS 的毒性。植物组织在离体培养过程中, 处于高水平氧化胁迫环境, 具有较高抗氧化酶活性 (Park et al., 2004)。抗坏血酸过氧化物酶 (EC1.11.1.11, ascorbate peroxidase, APX) 以抗坏血酸为电子供体, 主要负责清除胞质和叶绿体中产生的 H_2O_2 (Jespersen et al., 1997; Ishikawa & Shigeoka, 2008)。目前从拟南芥、番茄、豌豆、甘薯、百合等多种植物中已经克隆了 APX 基因, 在干旱、高盐、高热以及微生物侵染等条件下活性增加, 与植物生物和非生物胁迫响应相关 (Mittler & Zilinskas, 1994; Jespersen et al., 1997; Park et al., 2004; Zhou et al., 2005; 陈莉 等, 2010)。植物组织离体培养过程中 APX 与抗氧化的关系报道较少, 本课题组前期从蝴蝶兰中克隆了 PPO 和 POD 基因 (许传俊 等, 2009; Xu et al., 2011), 为进一步了解在植物氧化与抗氧化相关酶在褐变中的作用, 本研究从蝴蝶兰中克隆了 APX 基因, 研究其在蝴蝶兰体内的时空表达情况及对机械伤害和高盐胁迫的响应, 为探讨氧化酶在蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中的作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 品种 ‘满天红’ 购自广东省花卉研究所。基因克隆工作于 2008 年在华南师范大学生命科学学院完成, 基因表达工作于 2010—2011 年在福建省亚热带植物研究所进行。

1.2 *PhAPX* 全长基因克隆

根据已经登录的其他物种 APX 基因序列, 经 DNASTar 序列比对, 找出其中保守序列, 设计特异引物 APX1 和 APX2, 由上海生工生物工程技术有限公司合成 (下同)。采用 Trizol 法提取蝴蝶兰叶片总 RNA 逆转录 cDNA, PCR 扩增目的片段。以引物 3'RACE 1 作反转录获得的 cDNA 为模板, 用 APX3-1 与 3'通用引物 3'RACE 2 进行 3'cDNA 末端扩增。PCR 程序为: 94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 32 个循环, 72 °C 延伸 10 min。采用巢式 PCR 利用 5'特异引物 APX5-1、APX5-2 与 5'RACE Outer Primer 和 5'RACE Inner Primer (表 1) 进行 APX 基因 5'端扩增。PCR 程序为 94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。测序结果通过 Editseq 软件整合后, 获得 APX 全长序列。基于 Internet 的 DNA 和氨基酸序列分析, 利用 NCBI 的 BLAST 程序进行 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

使用 DNASTar 软件分析基因的预测读码框 (ORF), 并用 Clustal W 程序进行氨基酸序列多重排比 (multiple sequences alignment); 利用 MEGA3.1 软件进行进化树的构建, 采用 bootstrap 检验法, 默认的泊松校正 (Poisson Correction) 作为计算距离的方法, 1 000 次重复。采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对蝴蝶兰 APX 的二级结构进行预测, 并用软件 Weblab Viewerilte 4.0 进行分析。

表 1 用于蝴蝶兰 *APX* 基因克隆及表达的引物
Table 1 Primers used in the cloning of the full-length cDNA and real-time PCR of *PhAPX*

引物 Primer	序列 (5' - 3') Primer sequence
Oligo dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT _n N-3'
APX1	5'-CTATCCTACGCTGACTTCTACC-3'
APX2	5'-AGCAAAGAAAGCGTCCTCGTC-3'
APX3-1	5'-ACAACCTTACTTCACCGAGCTTCT-3'
APX5-1	5'-AGAACCTTTGTAGCATCAGGAGA-3'
APX5-2	5'-ACCTTCCTCTGGGGGTTTCAGGCTTA-3'
5'Race outer	5'-CATGGCTACATGCTGACAGCCTA-3'
5'Race inner	5'-CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG-3'
3'Race 1	5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'
3'Race 2	5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'
APX-Q1	5'-GCCGATCAAGGAGCAGTTTC-3'
APX-Q2	5'-TTGGTAGCATCAGGAGACG-3'
Actin1	5'-TGTAAGGGACGTGAAGGAGAAG-3'
Actin 2	5'-GGTCATTGATGGCTGGAAGAG-3'

1.3 real-time PCR 分析 *PhAPX* 在蝴蝶兰不同部位的表达

根据本试验克隆得到的蝴蝶兰 *APX* 序列和内参基因 (*Actin*) 设计荧光定量 PCR 引物, 分别为 APX-Q1、APX-Q2、Actin1 和 Actin2 (表 1)。提取蝴蝶兰根、茎、叶、花梗、花、花蕾的总 RNA, 反转录成 cDNA 为模板, 利用荧光定量 PCR 对 *APX* 在不同部位的表达进行分析。在 Bio-Rad CFX96 Real-time PCR 仪进行, 反应体系的配制, 反应参数等均按 TaKaRa SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行。95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 31 s。

1.4 蝴蝶兰 *PhAPX* 对机械伤害和盐胁迫的响应

对蝴蝶兰从上往下第 2 片叶进行针刺伤害处理, 每片叶针刺 30 ~ 50 次, 6、24 和 48 h 后分别取材, 分析 *PhAPX* 响应情况。分别采用 100 mmol · L⁻¹ NaCl 和 300 mmol · L⁻¹ NaCl 浇灌处理蝴蝶兰幼苗, 处理 6、24 和 48 h 后取第 2 片叶分析 *PhAPX* 表达, 以清水浇灌处理为对照, 幼苗在 24 °C 条件下培养。*PhAPX* 的表达分析方法同上。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰 *APX* 基因克隆和序列分析

根据已经报道的其他物种 *APX* 基因序列, 设计特异引物, PCR 产物在 400 ~ 500 bp 处有特异带扩增 (图 1, A)。将目的片段回收测序, 在 NCBI 搜索的结果表明, 该片段与已经报道的水稻 (*Oryza sativa*, NM0010672776)、玉米 (*Zea mays*, NM001112030) 的 *APX* 序列一致性分别为 81% 和 80%, 说明克隆得到的片段为 *APX* 基因序列。3'RACE 和 5'RACE 获得蝴蝶兰 *APX* cDNA 序列 3'端和 5'端 (图 1, B、C)。

经序列分析鉴定表明, 克隆获得的序列为蝴蝶兰的 *APX* 基因, 命名为 *PhAPX*, 属于过氧化物酶超基因家族的 Class I ascorbate peroxidase, 其序列在 GenBank 登记号为 FJ161977。*PhAPX* cDNA 全长为 1 320 bp, 读码框 (ORF) 为 747 bp, 两端分别为 173 bp 的 5' - 非翻译区 (5'-UTR) 和 396 bp 的 3' - 非翻译区 (3'-UTR)。

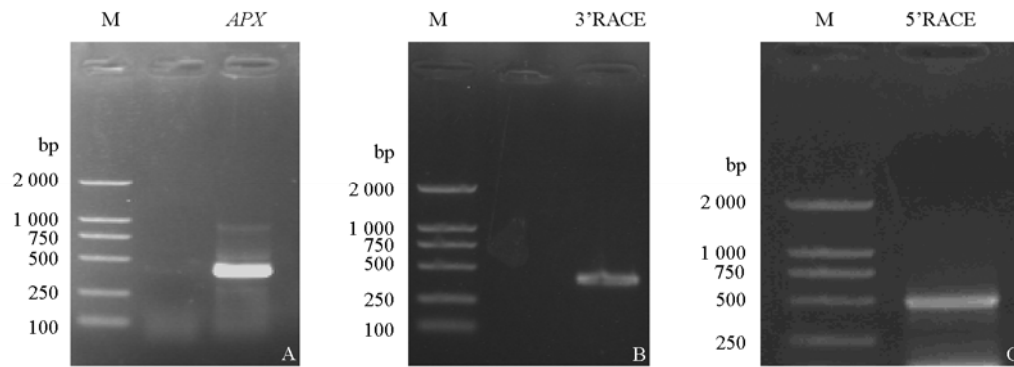


图1 蝴蝶兰 APX 克隆

A: APX 片段; B 和 C: APX 的 3'RACE 和 5'RACE。

Fig. 1 Molecular cloning of APX cDNA from *Phalaenopsis*A: Fragment of *Phalaenopsis* APX gene, B and C: PCR of 3'RACE and 5'RACE clone of APX.

经 DNASTAR 分析(图 2), *PhAPX* 编码 249 个氨基酸的蛋白, pI 为 5.20。与油棕(*Elaeis guineensis*, ACF06591)、葡萄(*Vitis vinifera*, ABX79340)、玉米(*Zea mays*, NP001105500)、草莓(*Fragaria × ananassa*, AAD41405)、华东葡萄(*Vitis pseudoreticulata*, AAZ79357) APX 的氨基酸一致性分别为

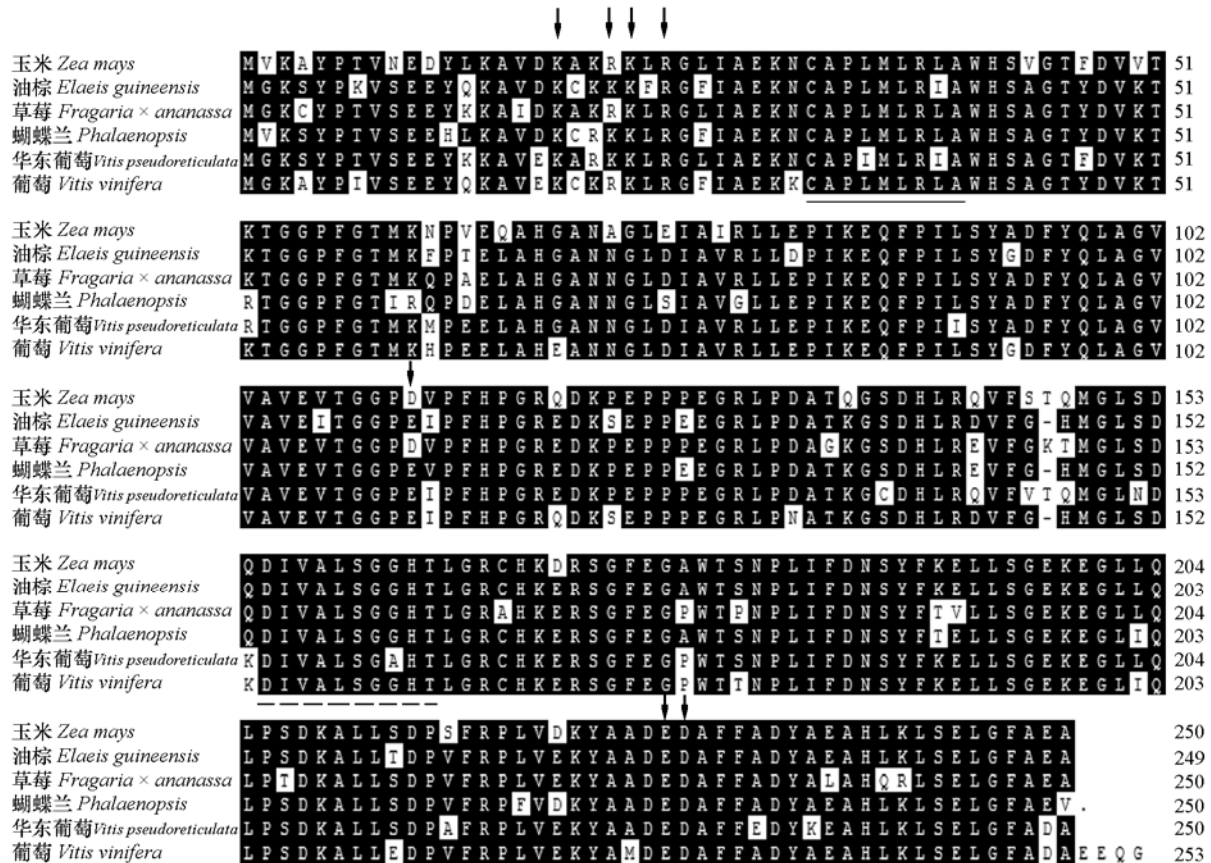


图2 PhAPX 与其他物种 APX 蛋白比对结果

黑色实线示底物结合位点, 黑色虚线示血红素结合位点, 箭头所指为与形成二聚体静电作用相关的 7 个保守的带电氨基酸。

Fig. 2 Alignment of APX sequences

Amino acids identical are highlighted in black residues conserved for ascorbate and heme are marked with real line and dotted line on the sequences, respectively; Arrow for residues involved in electrostatic interaction between dimmers.

89%、87%、86%、86%、85%；相似性分别为 94%、93%、93%、92%、92%。从多种植物中克隆的 APX 基因, 序列比对结果表明推导出的氨基酸序列同源性很高 (Lu et al., 2007)。

采用 DNASTar 软件的 Clustal W 方法进行多重序列比对, 也证实 APX 的保守性较高 (图 2), 通过 MEGA 3.1 构建 APX 系统进化树, 可见蝴蝶兰 PhAPX 蛋白与油棕 (ACF06591)、葡萄 (ABX79340) 最先聚成一类, 进化亲缘关系最近 (图 3)。

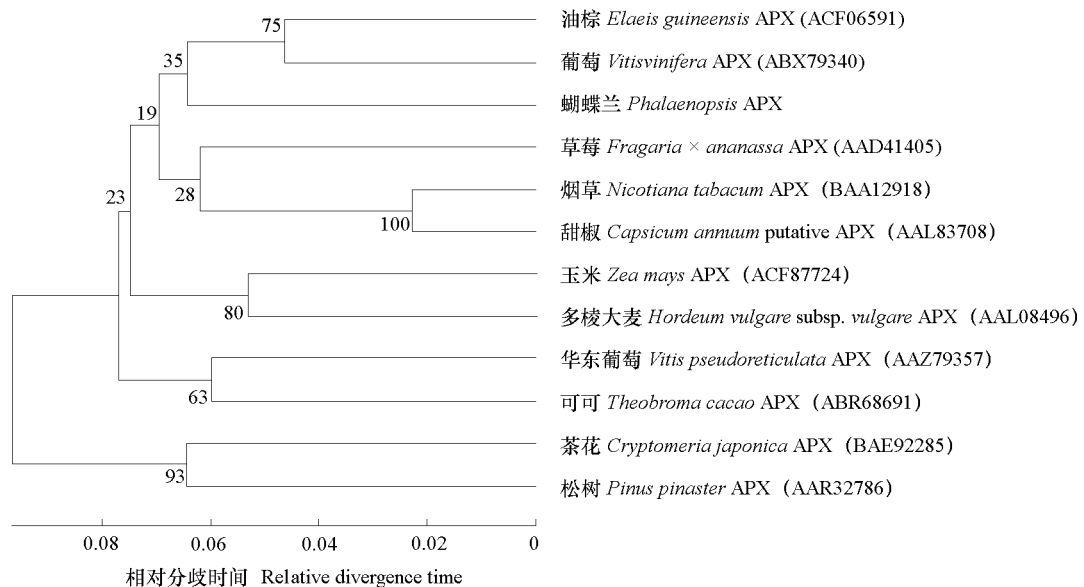


图 3 APX 系统进化树

基于 neighbor-joining 方法构建, MEGA 3.1. 各节点处数字表示 bootstrap 值, 重复 1 000 次。

Fig. 3 Phylogenetic tree showing relationship between PhAPX with other plant APX

The tree was constructed by neighbor-joining method, MEGA3.1 the numbers at each node represented the bootstrap value, with 1 000 replicates.

分别在 <http://www.cbs.dtu.dk/> 和 <http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/> 网站分析 PhAPX 亚细胞定位, 结果表明蝴蝶兰的 APX 蛋白不具有信号肽结构, 也不具有向叶绿体运输的导肽 (结果未给出), 蝴蝶兰 APX 表达的蛋白可能属于胞质型 APX。

利用 <http://www.expasy.org/prosite/> 的 ScanProsite 功能, 并结合 NCBI 的 CCD 分析功能对蝴蝶兰 APX 的功能域进行分析。PhAPX 具有抗坏血酸结合位点、血红素结合位点和 K 离子结合位点 (图 2)。Pro-34、Arg-38、His-42、Pro-111、His-162、Leu-163、Gly-165、Glu-192、Leu-210、Leu-211 为底物结合区活性位点保守的氨基酸; Pro-34、Trp-41、Pro-126、Lue-158、His-162、Leu-164、Gly-165、Ser-180 是血红素结合区保守的氨基酸 (图 4), 其中的 His-162 是底物和血红素结合位点; Thr-163、Thr-179 和 Asp186 为 K 离子结合区保守的氨基酸。

2.2 蝴蝶兰 APX 二级结构预测

SWISS-MODEL 预测的 PhAPX 具有 10 个 α 螺旋, 4 个 β 折叠, 血红素通过 Fe 与 APX 蛋白的 His-162 形成配位键, 同时与 His-168 (未示出) 形成氢键与 APX 蛋白相结合 (图 4)。PhAPX 二级结构与杨树 PpAPX、拟南芥 APX 的二级结构相似, 保守的催化区域位于 10 个 α 螺旋之中 (Patterson et al., 1995; Jespersen et al., 1997)。

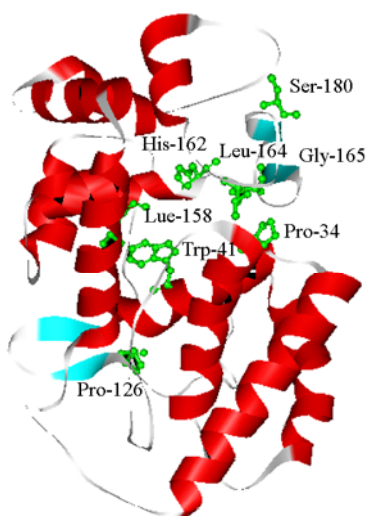


图 4 SWISS-MODEL 预测的 PhAPX-3D 结构图

图中绿色示与血红素结合氨基酸。

Fig. 4 The tertiary structure of PhAPX predicted with SWISS-MODEL and edited with Weblab Viewerlite 4.0

The conservative active residues, which contract with heme, are signified with line-ball and stick spatial configurations, respectively (green).

2.3 *PhAPX* 在蝴蝶兰各器官的表达

利用荧光定量 PCR 技术, 分析 *PhAPX* 在蝴蝶兰植株中的表达, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因相对表达量, 以花的表达量为参照基准, 结果表明蝴蝶兰根、茎、叶、花和花梗都可以检测到 *APX* 的表达。其中在茎和成熟叶的表达量比较高, 花内表达量较低 (图 5)。

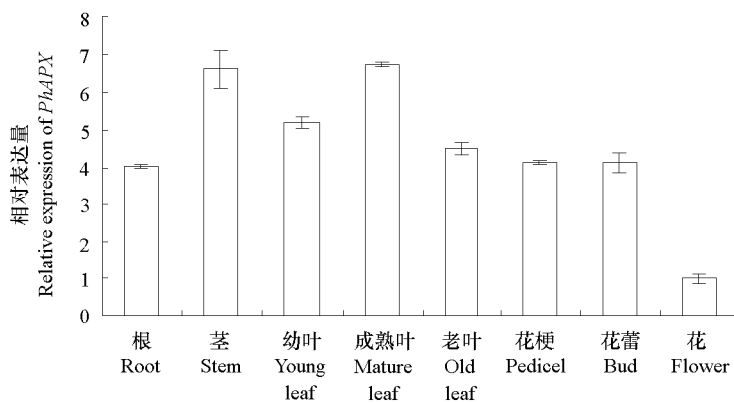


图 5 *PhAPX* 基因在蝴蝶兰不同部位表达

Fig. 5 Comparison of the relative expression level of *PhAPX* gene in difference tissue

2.4 *PhAPX* 对机械伤害和盐胁迫的响应

采用荧光定量 PCR 技术分析蝴蝶兰 *APX* 表达, 以未处理的蝴蝶兰为对照, 以其叶片表达量为基准, 结果表明, 机械伤害处理 6 h 表达量较低, 在 24 h 显著上升, 到 48 h 表达量显著下降, 可见 *APX* 基因对伤害响应较慢。 *APX* 对 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 处理与 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 响应相似, 在 6 h

表达量显著上升, 到 24 h 都维持在较高水平表达, 48 h 时降低, 表明 *APX* 对盐胁迫反应灵敏, 而且没有显著的浓度差异 (图 6)。

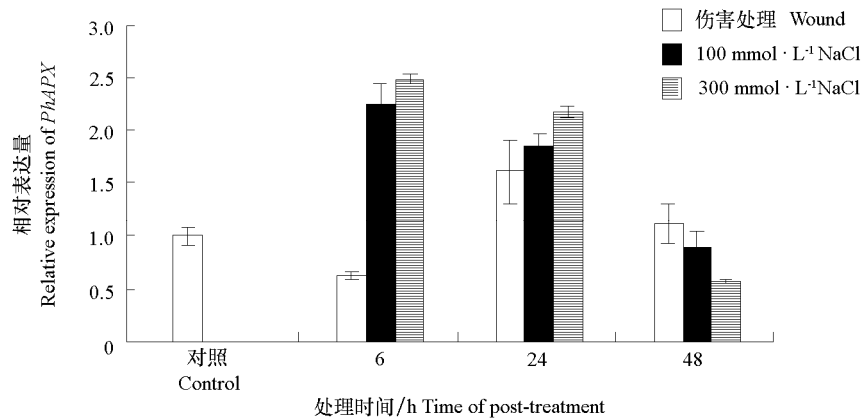


图 6 *PhAPX* 对伤害和盐胁迫的响应

Fig. 6 Comparison of the relative expression level of *PhAPX* gene in response to wound and NaCl

3 讨论

APX 在进化中保守性较高, 序列分析证实 *PhAPX* 的氨基酸序列与其他物种同源性很高, 具有抗坏血酸结合位点、血红素结合位点、K⁺ 离子结合位点、底物结合区, 与其他物种 *APX* 具有相同的保守结构域。在高等植物中已报道有 4 种不同细胞定位同工酶型, 分别为 *cAPX* (分布于光合或非光合细胞质中), *mbAPX* (存在于过氧化物酶体或微体), *tAPX* (类囊体 *APX*) 和 *sAPX* (基粒 *APX*) (Shigeoka et al., 2002)。本试验中克隆的 *PhAPX* 编码的蛋白不具备信号肽结构, 可能分布于胞质中, 为 *cAPX*。结构分析也表明 *PhAPX* 可能是属于胞质型的 *APX*。它含有所有的胞质型 *APX* 都具有的十分保守的 7 个带电残基 (图 2), 这些残基参与二聚体的表面静电作用 (Patterson & Poulos, 1995; Jespersen et al., 1997), 说明蝴蝶兰 *APX* 与其他胞质型 *APX* 一样可能是二聚体结构。保守区分析还发现, *PhAPX* 与分布于其他部位的 *APX* 不同, 没有 2 个 Ca²⁺ 结合位点, 与拟南芥 *cAPX* 一样 (Jespersen et al., 1997), 只有一个单价金属 K⁺ 结合位点 (Thr-163、Thr-179、Asp-186)。

APX 属于末端氧化酶的一种, 能提高氧化耐受性的作用已在许多植物中有报道, 分析 *PhAPX* 基因对伤害和盐胁迫的响应可见, 蝴蝶兰胞质型 *APX* 对机械伤害和盐胁迫都有响应, 对盐胁迫的响应更灵敏。转入水稻胞质型 *APX* 的转基因烟草提高对盐胁迫的抗性 (管清杰 等, 2007)。由于各种植物抗氧化胁迫的机制不同, 因此在用基因工程方法增加各种抗氧化酶合成的同时, 应该看到植物中许多抗氧化剂参与活性氧的清除过程, 所以单纯地转化某一个基因使之过量表达难以达到预期效果。本课题组在蝴蝶兰抗褐变抑制剂筛选中也发现, 单纯抑制 *PPO* 活性不能完全抑制褐变的发生 (陈冬茵 等, 2009), 在抗氧化中多种酶的存在共同作用, 探讨在褐变过程中的多种酶共同作用机制将是下一步的研究目标。

References

- Chen Dong-yin, Lai Yan-yan, Xu Chuan-jun, Li Ling. 2009. Influences of *PPO* inhibitors on browning in *Phalaenopsis* explants. *Subtropical Plant Science*, 38 (12): 15 - 18. (in Chinese)

- 陈冬茵, 赖艳艳, 许传俊, 李 玲. 2009. 多酚氧化酶抑制剂对蝴蝶兰叶外植体褐变的影响. 亚热带植物科学, 38 (12): 15 - 18.
- Chen Li, Xin Hai-bo, Sun Xiang-rong, Yin Hui, Li Xiao-xin, Yi Ming-fang. 2010. Molecular cloning *APX* from *Lilium longiflorum* and overexpressing to *Arabidopsis thaliana* enhanced salt tolerance. Acta Horticulturae Sinica, 37 (12): 1983 - 1990. (in Chinese)
- 陈 莉, 辛海波, 孙向荣, 尹 慧, 李晓昕, 义鸣放. 2010. 百合 *APX* 基因的克隆及转 *LIAPX* 提高拟南芥耐盐性. 园艺学报, 37 (12): 1983 - 1990.
- Dan Y H. 2008. Biological functions of antioxidants in plant transformation. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 44: 149 - 161.
- Guan Qing-jie, Luo Qiu-xiang, Xia De-xi, Li Yao-wen, Liang Han, Zhang Xin-xin, Shunsaku Nishiuchi, Tetsuo Takano, Liu Shen-kui. 2007. expression of rice *OsAPX1* gene and its salt tolerance in tobacco. Molecular Plant Breeding, 5 (1): 1 - 7. (in Chinese)
- 管清杰, 罗秋香, 夏德习, 李耀文, 梁 涵, 张欣欣, 西内俊策, 高野哲夫, 柳参奎. 2007. 水稻 *OsAPX1* 基因在烟草中的表达及其抗盐性研究. 分子植物育种, 5 (1): 1 - 7.
- Ishikawa T, Shigeoka S. 2008. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. Biosci Biotechnol Biochem, 72 (5): 1143 - 1154.
- Jespersen H M, Kåjaersgård I V H, Ostergaard L, Welinder K G. 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. Biochemical Journal, 326 (2): 305 - 310.
- Lee C Y, Whitaker J R. 1995. Enzymatic browning and its prevention. Washington: American Chemical Society: 388.
- Lin He-tong, Xi Yu-fang, Chen Shao-jun. 2005. The relationship between the desiccation-induced browning and the metabolism of active oxygen and phenolics in pericarp of postharvest longan fruit. J Plant Physiology and Molecular Biology, 31 (3): 287 - 297. (in Chinese)
- 林河通, 席珣芳, 陈绍军. 2005. 龙眼果实采后失水果皮褐变与活性氧及酚类代谢的关系. 植物生理与分子生物学学报, 31 (3): 287 - 297.
- Mittler R, Zilinskas B A. 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. Plant J, 5 (3): 397 - 405.
- Park S Y, Ryu S H, Jang I C, Kwon S Y, Kim J G, Kwak S S. 2004. Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweet potato and its expression in response to stress. Mol Genet Genomics, 271 (3): 339 - 346.
- Patterson W R, Poulos T L. 1995. Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. Biochemistry, 34: 4331 - 4341.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J Exp Bot, 53 (372): 1305 - 1319.
- Takahama U, Takayuki O. 2000. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. J Plant Res, 113: 301 - 309.
- Takahama Umeo. 2004. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. Phytochemistry Reviews, 3: 207 - 219.
- Xu Chuan-jun, Zhou Wen-ling, Chen Dong-yin, Lai Yan-yan, Li Ling. 2009. Molecular cloning and analysis of homologous gene PPO from *Phalaenopsis*. Acta Horticulturae Sinica, 36 (12): 1799 - 1804. (in Chinese)
- 许传俊, 周文灵, 陈冬茵, 赖艳艳, 李 玲. 2009. 蝴蝶兰多酚氧化酶基因克隆及其序列分析. 园艺学报, 36 (12): 1799 - 1804.
- Xu Chuanjun, Sun Xuzhuo, Chen Dongyin, Lai Yanyan, Li Ling. 2011. Cloning and characterization of peroxidase gene in *Phalaenopsis*. Pak J Bot, 43 (4): 2161 - 2165.
- Zou L P, Li H X, Ouyang B, Zhang J H, Ye Z B. 2005. Molecular cloning, expression and mapping analysis of a novel cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato. DNA Seq, 16 (6): 456 - 461.