

荔枝类甜蛋白基因的克隆与表达分析

王树军^{1,2}, 冯超², 王凌云², 李焕苓¹, 刘保华², 王家保^{1,*}

(¹ 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海口 571101; ² 海南大学农学院, 海口 570228)

摘要: 以‘妃子笑’荔枝 (*Litchi chinensis*) 为试材, 通过 PCR 方法克隆了荔枝类甜蛋白基因 *LcTLP* (登录号 JF682821) 的 cDNA 全长和完整开放阅读框 (ORF) 对应的 gDNA 序列。序列分析表明: 该基因无内含子, cDNA 序列含有一个 672 bp 的 ORF, 编码 223 个氨基酸残基序列。荧光定量 PCR 结果表明: *LcTLP* 在花中表达量最高, 其次是果皮, 在果肉中表达量最低; 在果实发育过程中, 果皮中 *LcTLP* 表达量先上升后下降, 采后果皮中的表达量高于采前, 炭疽菌侵染诱导 *LcTLP* 的表达, 失水和低温能抑制 *LcTLP* 的表达。

关键词: 荔枝; 类甜蛋白基因; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S 667.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 07-1385-08

Cloning and Expression Analysis of Thaumatin-like Protein Gene from *Litchi chinensis*

WANG Shu-jun^{1,2}, FENG Chao², WANG Ling-yun², LI Huan-ling¹, LIU Bao-hua², and WANG Jia-bao^{1,*}

(¹ Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;
² College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The full length of cDNA sequence and the genome sequence corresponding to the open reading frame (ORF) of a thaumatin-like protein gene (*LcTLP*, Accession No: JF682821) were obtained from ‘Feizixiao’ litchi (*Litchi chinensis* Sonn. ‘Feizixiao’) by PCR method. The cDNA sequence was contained an ORF with 672 bp in length, encoding a polypeptide with 223 amino acid residues. There was no intron in *LcTLP* genome sequence. Quantitative real-time PCR results showed that the expression of *LcTLP* was the highest in the flower, followed by in the pericarp, and the lowest in the pulp. During the fruit development, the expression of *LcTLP* in the pericarp increased firstly, and then decreased. The expression of the gene in the pericarp of postharvested fruit was higher than that of developed fruit. The expression of *LcTLP* in the pericarp could be induced by *Colletotrichum* infection; However, it could be inhibited by water loss and low temperature.

Key words: litchi; thaumatin-like protein; gene cloning; gene expression

类甜蛋白 (Thaumatin-like protein, TLP) 是从植物中分离出来的一类抗菌物蛋白的总称, 其氨基酸序列与非洲植物西非竹笋的甜蛋白在结构和进化过程中具有紧密的相关性, 不具有甜味, 故称

收稿日期: 2015-04-01; 修回日期: 2015-06-12

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-33-02); 国家自然科学基金项目 (31272137)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fdabo@163.com)

为类甜蛋白,属于病程相关蛋白 PR-5 家族 (Liu et al., 2010)。近年来的研究证实, TLP 具有抑菌、抗病等功能,参与植物多种病害的抗性反应,在植物生物技术育种中具有重要的研究和应用价值。例如:接种白锈病菌的芥菜, TLP 基因表达量和蛋白质含量上升 (Kaur et al., 2011);原核表达的野黑麦 TLP 蛋白对多种真菌具有抑菌活性 (Chan et al., 1999);高表达外源 TLP 基因的小麦表现了对锈病的抗性 (Anand et al., 2003) 等。

荔枝果实在生长发育过程中易受炭疽菌等真菌侵染,降低产量和商品果率,挖掘抗病基因并用于育种来提高荔枝品种抗病性是防治病害的根本途径。

作者在前期工作中通过 cDNA 文库测序,获得了一条荔枝 TLP 基因的 cDNA 全长序列 (JF682821)。本研究在此基础上,对拼接获得的序列进行分析,并研究其表达规律,以期促进该基因的研究及应用。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

‘妃子笑’荔枝 (*Litchi chinensis*) 样品采自中国热带农业科学院试验场基地。选取结果母枝中部成熟功能叶、春梢幼叶、未开放的花蕾和种子实生苗的吸收根,洗净,用吸水纸吸干水分。

从第 1 次生理落果后 1 周 (2010 年 3 月 2 日) 起,至果实采收 (5 月 14 日),每周田间摘取果实,3 h 内带回实验室后小心剥离果皮,使之不粘连果肉和果汁。每 20 个果为 1 次重复,重复 3 次。用于测定 *LcTLP* 的表达。

果实约八成熟 (5 月 14 日) 采收,3 h 内运回实验室,挑选成熟度相对一致,无病虫害和无机械伤的果实,用 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 扑海因浸泡 3 min,自然晾干 (约 10 min) 后进行 3 种处理:25 °C 不套袋、25 °C 套袋、4 °C 套袋 (均为聚乙烯袋)。以从树上新采摘的果实为 0 d,在采后贮藏 1、2、3、5、7、10、15 和 20 d 时各取样 1 次,小心剥离果皮,使之不粘连果肉和果汁,每 20 个果为 1 次重复,重复 3 次。

取上述挑选并杀菌处理的八成熟荔枝果实 300 个,用人工喷雾方法接种荔枝炭疽病菌分生孢子悬浮液 (10^4 个孢子 $\cdot \text{mL}^{-1}$),以果面滴水为度,以喷雾自来水作对照。用 0.01 mm 的 PE 袋包装,置于 25 °C 温度下贮藏,观察炭疽病发生情况。发病后每天取样 1 次,小心分离距发病病斑 0.5 cm 左右的健康果皮。每次取样 10 个果实,3 次重复。

上述样品分别经液氮速冻,置于 -70 °C 冷冻保存用于测定 *LcTLP* 的表达。

1.2 *LcTLP* 的 cDNA 和 gDNA 序列克隆和分析

根据 cDNA 文库中获得的 *LcTLP* 序列和发表的 β -actin 基因 (DQ990337.1) 序列设计各类引物 (表 1),由华大基因公司合成,溶解后均稀释到 $25\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用。

采用肖璇等 (2005) 的方法提取荔枝基因组 DNA,采用王家保等 (2006) 的改良 CTAB 法提取荔枝果皮总 RNA。按照 SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen) 说明书合成 cDNA 第一链。然后,分别以 cDNA 第一链和基因组 DNA 为模板,用 *LcTLP*-F 和 *LcTLP*-R 为引物扩增 *LcTLP* 基因。反应程序为 94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 40 s,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,循环 35 次后,72 °C 延伸 7 min。

1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果,割胶纯化目的条带并克隆测序。序列在 NCBI 数据库进行

BLAST 比对, 用 MEGA3.1 软件 (Kumar et al., 2004) 分析推导的氨基酸序列与其他物种类甜蛋白氨基酸序列的一致性。

表 1 引物及其序列
Table 1 Sequence of primers

引物用途 Application	引物名称 Name	引物序列 (5' - 3') Sequence
基因分离 Gene isolation	LcTLP-F	CATCATGAAGCTCTTCAAAATC
	LcTLP-R	ATCTTCTATTTCGTTTCGCACATC
基因表达 Gene expression	RT- LcTLP-F	GCAAGAACTAGACAAAGGCG
	RT-LcTLP-R	CAGGAGAGGTGGAGCTGAACTC
内参基因表达 Reference gene expression	RT-actin-F	GTCTTGGATTCTGGTGATGGTG
	RT-actin-R	ATTCCCGCTCAGCAGTAGTGG

1.3 荧光定量 PCR 检测基因表达

用 RT-LcTLP-F 和 RT-LcTLP-R 为引物, RT-actin-F 和 RT-actin-R 为内标引物, 以 cDNA 为模板, 按照 SYBR GreeScript RT-PCR Kit II (TaKaRa) 说明书的方法进行荧光定量 PCR 反应 (ABI7500 荧光定量 PCR 仪)。

以采收 0 d 的果皮为对照样品, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量方法 (Livak & Schmittgen, 2001) 计算基因表达量。3 次独立重复。

2 结果与分析

2.1 LcTLP 基因克隆与序列分析

将前期通过 cDNA 文库测序获得的 5'端和 3'端序列进行拼接, 经 BLASTx 比对发现获得一条 897 bp 的荔枝 TLP 基因的 cDNA 全长序列, 3'末端具有 PolyA 结构。根据拼接产物设计一对包含 ORF 区在内的特异性引物 LcTLP-F 和 LcTLP-R, 以荔枝采收 0 d 果皮 RNA 反转录的 cDNA 第一链为模板扩增目的基因, 得到一条单一明亮的扩增片段, 约为 750 bp (图 1)。

测序获得包含完整 ORF 区的 cDNA 序列 773 bp, 该序列与 cDNA 文库测序获得的拼接序列完全一致。其 ORF 区域为 672 bp, 编码 223 个氨基酸。

以提取的荔枝基因组 DNA 为模板, 以 LcTLP-F 和 LcTLP-R 为引物扩增, 得到一条与 cDNA 扩增片段大小一致的片段 (图 1), 测序后发现获得的 gDNA 序列与 cDNA 序列完全一致, 表明该基因不含内含子序列 (图 2)。

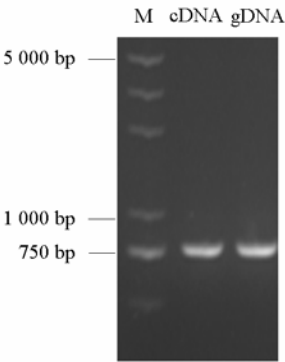


图 1 LcTLP 序列 PCR 扩增
Fig. 1 Products of LcTLP gene amplification

gDNA		-----CATCATGA
cDNA	1	CACCAACCAAAAAACACAKTACATTTTTGTTACTCCATTTCTATAAATCATCTATACATCATGA
aa	1	M
gDNA		AGCTCTTCAAAATCCTCCTTTCTTTTGGCATTGCACTCTCCACCACCTTGGTTTATGCAG
cDNA	64	AGCTCTTCAAAATCCTCCTTTCTTTTGGCATTGCACTCTCCACCACCTTGGTTTATGCAG
aa	2	K L F K I L L S F F A I A L S T T L V Y A
gDNA		CCAAATTTGACATCACCAACAACGTCTGAGACTATTTGGGCAGCTGCCGTGCCTGGTGGTG
cDNA	127	CCAAATTTGACATCACCAACAACGTCTGAGACTATTTGGGCAGCTGCCGTGCCTGGTGGTG
aa	23	A K F D I T N N C P E T I W A A A V P G G
gDNA		GCAAGAACTAGACAAAGGCGAAACATGGACCATAACTGCCGCCCCAGGTACCAAAGAAGCCA
cDNA	190	GCAAGAACTAGACAAAGGCGAAACATGGACCATAACTGCCGCCCCAGGTACCAAAGAAGCCA
aa	44	G K K L D K G E T W T I T A A P G T K E A
gDNA		GAATTTGGGGACGTACCAAGTGCATTTTCGATGCCAGCGGAAAGGCAAGTGTGAGACAGGTG
cDNA	253	GAATTTGGGGACGTACCAAGTGCATTTTCGATGCCAGCGGAAAGGCAAGTGTGAGACAGGTG
aa	65	R I W G R T K C N F D A S G K G K C E T G
gDNA		ACTGCAACGGCGTCTCGAGTGCCAAGGCTATGGATCCCCTCCCAATACCTTGGCTGAGTACG
cDNA	316	ACTGCAACGGCGTCTCGAGTGCCAAGGCTATGGATCCCCTCCCAATACCTTGGCTGAGTACG
aa	86	D C N G V L E C Q G Y G S P P N T L A E Y
gDNA		CGTTGCAGCAGTTCAACAACATGGACTTCATTGACATGTCCAACATTGATGGTTTTAATGTCC
cDNA	379	CGTTGCAGCAGTTCAACAACATGGACTTCATTGACATGTCCAACATTGATGGTTTTAATGTCC
aa	107	A L Q Q F N N M D F I D M S N I D G F N V
gDNA		CAATGGAGTTCAAGTCCACCTCTCTGATGCAACCGTGTGATCAAATGCACGGGTGACTTGG
cDNA	442	CAATGGAGTTCAAGTCCACCTCTCTGATGCAACCGTGTGATCAAATGCACGGGTGACTTGG
aa	128	P M E F S S T S P G C N R V I K C T G D L
gDNA		TAGGGCAGTGCCTAATGAGCTCAAAGTACCAGGAGGATGTCAAGGGCCATGCTGGGTGTTCA
cDNA	505	TAGGGCAGTGCCTAATGAGCTCAAAGTACCAGGAGGATGTCAAGGGCCATGCTGGGTGTTCA
aa	149	V G Q C P N E L K V P G G C Q G P C W V F
gDNA		AGACCAACGAGCACTGTTGCAATTCTGGTAGNTGTGGACCTACANATTTCTCCAGGTTTTTCA
cDNA	568	AGACCAACGAGCACTGTTGCAATTCTGGTAGNTGTGGACCTACARATTTCTCCAGGTTTTTCA
aa	170	K T N E H C C N S G X C G P T X F S R F F
gDNA		AAGATAGGTGCCCGGATGTTTATAGTTATCCAAAAGATGATGCAACAAGTGTTTTTACTTGCC
cDNA	631	AAGATAGGTGCCCGGATGTTTATAGTTATCCAAAAGATGATGCAACAAGTGTTTTTACTTGCC
aa	191	K D R C P D V Y S Y P K D D A T S V F T C
gDNA		CTAGTGGAACAGACTATAAGGTTGTCTTTTGGCCCTGAAGCATGCACATGTGCATTTCGTCGTC
cDNA	694	CTAGTGGAACAGACTATAAGGTTGTCTTTTGGCCCTGAAGCATGCACATGTGCATTTCGTCGTC
aa	212	P S G T D Y K V V F C P *
gDNA		AAGCAAAATTAGATATGTTCTGAATAAATGTCATTGTATGCACATGTAGTGATGTGCGAACGA
cDNA	757	AAGCAAAATTAGATATGTTCTGAATAAATGTCATTGTATGCACATGTAGTGATGTGCGAACGA
gDNA		ATAGAAGG-----
cDNA	820	ATAGAAGATATATGATCGGTGGTTGAAATAAATGTCATGACATCAAAAATGAAATAAAATTTT
gDNA		-----
cDNA	883	TTATTTTCATATACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图2 妃子笑 *LcTLP* 基因的 cDNA 序列、gDNA 序列及其编码的氨基酸序列
Fig.2 Sequences of cDNA, gDNA and the deduced amino acid sequence of *LcTLP*

LcTLP 推导的氨基酸序列含有 Thaumatin superfamily 结构域, 与蓖麻 (*Ricinus communis*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 和猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*) 有较高的序列相似性, 分别为 72%、72% 和 66%。将推测的氨基酸序列在 NCBI 上比对, 结果显示该基因与已知功能的 *TLP* 基因的氨基酸序列有很高的同源性。

选取部分氨基酸序列用 Clustalx 进行比对, 将比对结果用 MEGA3.1 的 Neighbor-Joining 构建系统发育树, 结果表明, 该基因编码的氨基酸和琴叶鼠耳芥 (*Arabidopsis lyrata* subsp.)、毛果杨和蓖麻编码的遗传距离较近 (图 3)。

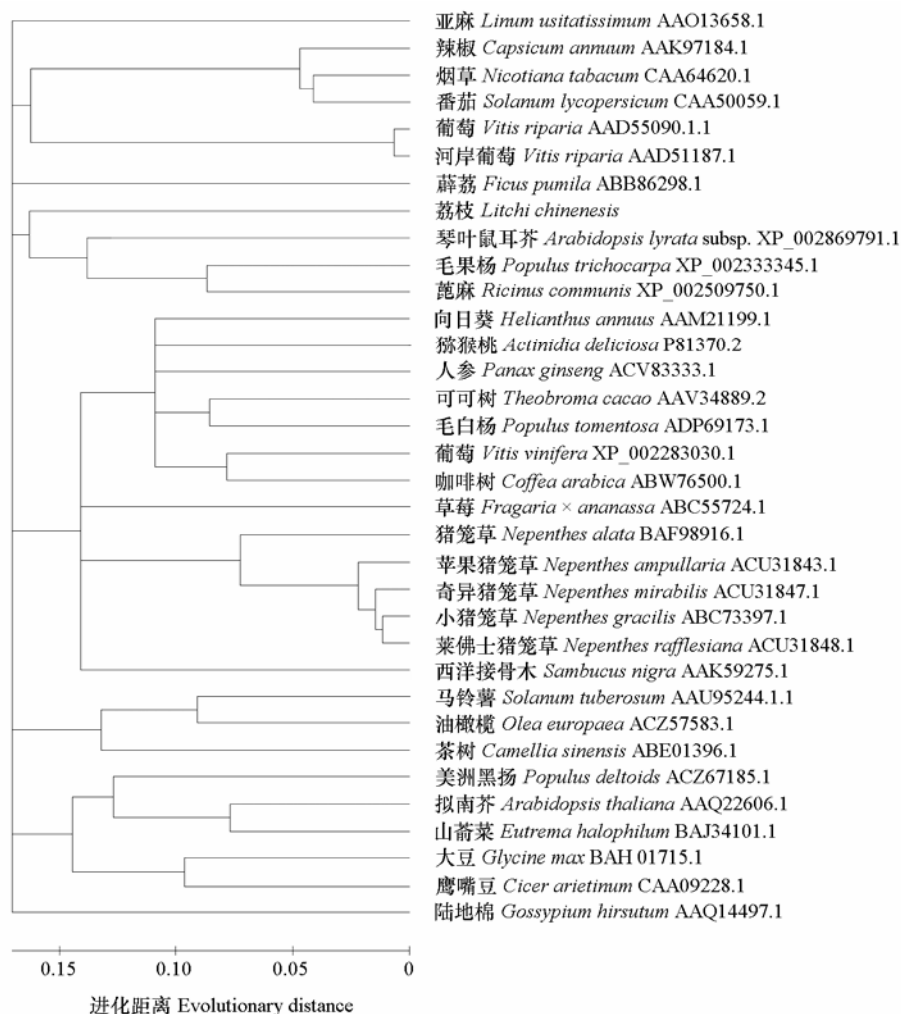


图 3 荔枝与其他植物同源的 TLP 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of homologous amino acid sequences of TLP from litchi and other plants

2.2 *LcTLP* 组织特异性表达分析

LcTLP 基因在妃子笑荔枝的根、茎、叶、花、果皮、果肉和种子中均表达。在花中表达量最高，果皮次之，果肉最低（图 4）。

2.3 果实发育过程中果皮 *LcTLP* 表达分析

4 月 2 日前果实生长较为缓慢，*LcTLP* 表达量较低。在果实成熟时期，*LcTLP* 表达量明显增加（图 5）。

从果实成熟到果实褐化阶段，*LcTLP* 表达量先增强后减弱，在采后 2 d 表达量达到最高（图 6）。

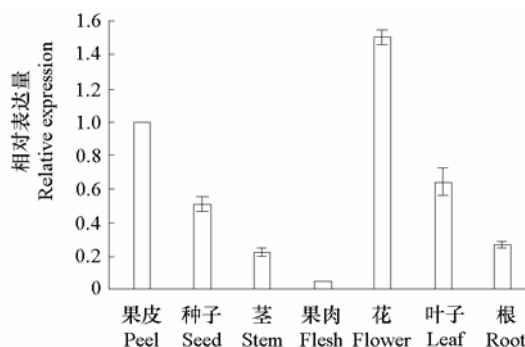


图 4 荔枝 *LcTLP* 组织特异性表达

Fig. 4 Specific expression of *LcTLP* in different tissues

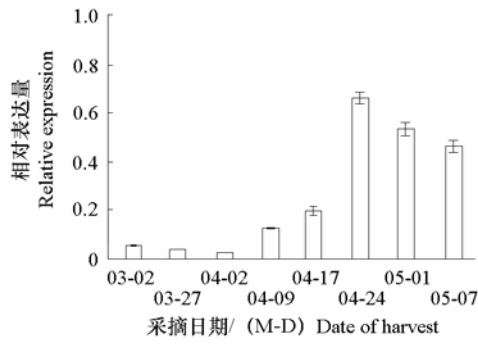


图5 荔枝果皮 *LcTLP* 基因动态发育表达
Fig. 5 Expression of the dynamic development of *LcTLP* from litchi pericarp

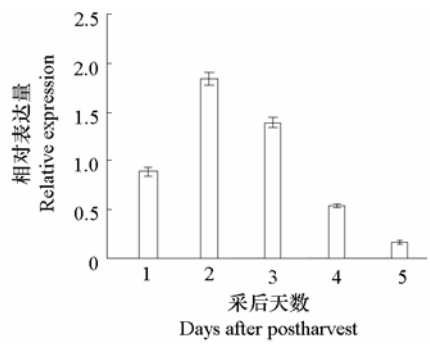


图6 荔枝果皮 *LcTLP* 基因动态发育表达
Fig. 6 Expression of the dynamic development of *LcTLP* from litchi pericarp

2.4 炭疽菌侵染果皮 *LcTLP* 表达分析

妃子笑果实接种炭疽菌后,4 d 果皮开始发病,7 d 完全发病。病果果皮中的 *LcTLP* 表达量明显高于正常果皮,6 d 表达量最高(图7),说明 *LcTLP* 表达受炭疽菌侵染诱导。

2.5 不同贮藏条件下果皮 *LcTLP* 表达分析

在室温贮藏下妃子笑果皮失水率逐渐上升(冯超等,2011),而果皮中 *LcTLP* 的表达量先上升然后逐渐下降;室温套袋控制失水时,果皮的 *LcTLP* 表达量明显高于不套袋的表达量,说明失水可能抑制了基因的表达;在低温处理下, *LcTLP* 表达变化不明显,低于室温贮藏处理,说明低温抑制了 *LcTLP* 表达(图8)。

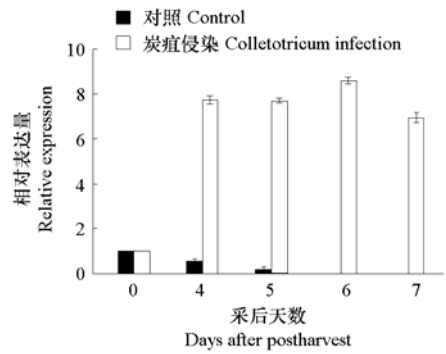


图7 炭疽菌侵染荔枝果皮 *LcTLP* 表达量的变化
Fig. 7 Changes of *LcTLP* relative expression during colletotrichum infect litchi pericarp

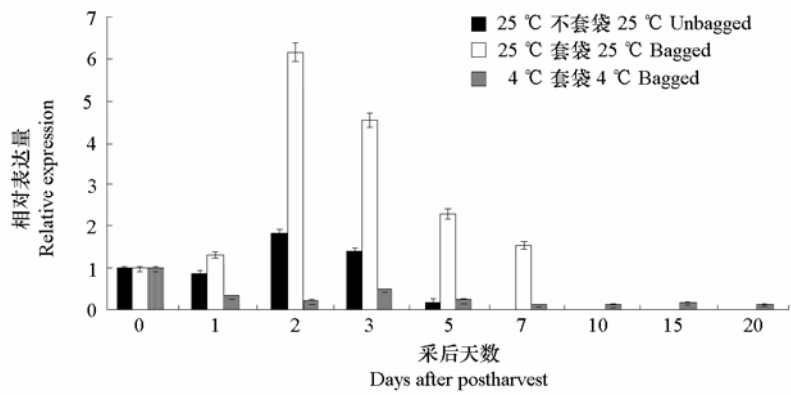


图8 不同贮藏条件下荔枝果皮 *LcTLP* 表达量的变化
Fig. 8 Changes of *LcTLP* relative expression of litchi pericarp under different storage conditions

3 讨论

本研究中克隆获得了妃子笑荔枝类甜蛋白基因的 cDNA 和 DNA 序列。该序列推导的氨基酸序列具有典型的类甜蛋白结构域, 这与番茄和其他物种中具有类甜蛋白结构域 (Batalia et al., 1996) 相吻合。Blastx 比对分析表明 *LcTLP*-cDNA 推导的氨基酸序列与蓖麻类甜蛋白序列相似性达 72%。

组织特异性表达结果表明: *LcTLP* 基因在荔枝花中表达量最高, 果皮次之, 果肉最低。Richard 等 (1992) 在烟草的花分化时期检测到类甜蛋白基因, 并通过免疫分析了 TH1 蛋白的出现与花分化有关, 综上可知, *LcTLP* 基因可能与花发育形成有关。Zhang 和 Shih (2007) 研究发现草莓 *TLPs* 基因在叶和花冠中表达量最多, 在根中表达量中等, 在未成熟果实中表达量最少。本试验结果与之吻合。荔枝刚开始坐果时, 荔枝果皮中 *LcTLP* 表达量处于较低水平, 当荔枝坐果到 25 d 左右, *LcTLP* 表达量明显开始增加, 一直到采后 2 d 达到最大值, 随后开始逐渐下降。*LcTLP* 基因的表达规律说明该基因可能参与调控果皮的发育与衰老。

炭疽菌侵染妃子笑果皮 4 d 时果皮明显发病。从 4~7 d, 病果果皮 *LcTLP* 大量表达, 显著高于正常的荔枝果皮。荔枝炭疽病是由胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz Sacc.) 引起的, 危害植物叶片、花、果等器官组织 (张新春 等, 2014)。已有研究表明, 小麦冠腐病菌 (*Fusarium pseudograminearum*) 侵染 4 d 后, 小麦抗病品种中 *TLPs* 基因表达显著高于感病品种 (Desmond et al., 2006)。Thaumatococcus 是一个和植物病理病程相关的蛋白家族 (窦世娟 等, 2014), *TLPs* 具有的葡聚糖酶可以对真菌细胞膜上的 β -1,3-葡聚糖发挥作用, 从而改变真菌细胞膜的渗透压来破坏细胞膜的完整性, 其葡聚糖酶活性与其抗真菌活性有关。荔枝 *LcTLP* 表达受炭疽菌侵染诱导, 说明 *LcTLP* 可能参与了荔枝果皮的防御反应, 在荔枝抗真菌侵染过程中起一定作用。

在室温贮藏条件下, 妃子笑果皮中 *LcTLP* 表达量大体呈先上升后下降的趋势。但是室温套袋的妃子笑果皮的失水量少, 保湿效果好, *LcTLP* 基因的表达量明显高于室温不套袋的妃子笑。这可能是因为 *LcTLP* 参与果皮失水机制的调控, 果皮失水能抑制 *LcTLP* 在荔枝果皮中的表达, 同时套袋保湿条件下贮藏环境湿度大, 可能有利于果皮潜伏真菌发病, 从而诱导该基因表达。

此外, 4℃条件下妃子笑果皮中 *LcTLP* 表达量处于较低水平, 没有明显变化, 而且 4℃条件下妃子笑果皮中 *LcTLP* 表达量明显低于室温贮藏下妃子笑果皮中 *LcTLP* 基因的表达量, 由此可见, 该基因表达受低温抑制。

References

- Anand A, Zhou T, Trick H N, Gill B S, Bockus W W, Muthukrishnan S. 2003. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany*, 54 (384): 1101 - 1111.
- Batalia M A, Monzingo A F, Ernst S, Roberts W, Robertus J D. 1996. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nature Structural Biology*, 3 (1): 19 - 23.
- Chan Y, Tung W, Griffith M, Chow K. 1999. Cloning of a cDNA encoding the thaumatin-like protein of winter rye (*Secale cereale* L. Musketeer) and its functional characterization. *Journal of Experimental Botany*, 50 (339): 1627 - 1628.
- Dou Shi-juan, Guan Ming-li, Li Li-yun, Liu Guo-zhen. 2014. Pathogenesis-related genes in rice. *Chinese Science Bulletin*, 59 (3): 245 - 258. (in Chinese)
- 窦世娟, 关明俐, 李莉云, 刘国振. 2014. 水稻的病程相关基因. *科学通报*, 59 (3): 245 - 258.
- Desmond O J, Edgar C I, Manners J M, Maclean D J, Schenk P M, Kazan K. 2006. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delay

- symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67 (3/5): 171 - 179.
- Feng Chao, Liu Bao-hua, Xiao Qian, Zhang Xin-chun, Li Huan-ling, Chen Rui-qin, Wang Jia-bao. 2011. Comparative study on postharvest quality of different litchi cultivars in Hainan. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32 (6): 1046 - 1050. (in Chinese)
- 冯超, 刘保华, 肖茜, 张新春, 李焕苓, 陈瑞琴, 王家保. 2011. 不同海南荔枝品种果实采后生理及品质变化的比较研究. *热带作物学报*, 32 (6): 1046 - 1050.
- Kaur P, Jost R, Sivasithamparam K, Barbetti M J. 2011. Proteome analysis of the *Albugo candida* - *Brassica juncea* pathosystem reveals that the timing of the expression of defence-related genes is a crucial determinant of pathogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 62 (3): 1285 - 1298.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief in Bioinform*, 5 (2): 150 - 163.
- Liu J J, Sturrock R, Ekramoddoullah A K. 2010. The superfamily of thaumatin-like proteins: Its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports*, 29 (5): 419 - 436.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Richard L, Arro M, Hoebeke J, Meeks-Wagner D R, Van K T. 1992. Immunological evidence of thaumatin-like proteins during tobacco floral differentiation. *Plant Physiology*, 98 (1): 337 - 342.
- Wang Jia-bao, Xu Bi-yu, Du Zhong-jun, Lai Jian-xun, Jin Zhi-qiang. 2006. Extracting total RNA from pericarp of postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit by improved CTAB method. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14 (6): 998 - 999. (in Chinese)
- 王家保, 徐碧玉, 杜中军, 赖建勋, 金志强. 2006. 改良 CTAB 法从采后荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 果皮中提取总 RNA. *农业生物技术学报*, 14 (6): 998 - 999.
- Xiao Xuan, Sun Min, Wang Xin-yan, Qiao Ai-min. 2005. Study on genomic DNA extraction from recalcitrant *Dimocarpus longan* Lour. *Biotechnology*, 15 (1): 44 - 46. (in Chinese)
- 肖璇, 孙敏, 王心燕, 乔爱民. 2005. 顽拗植物龙眼基因组 DNA 提取方法的研究. *生物技术*, 15 (1): 44 - 46.
- Zhang Y, Shih D S. 2007. Isolation of an osmotin-like protein gene from strawberry and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 164 (1): 68 - 77.
- Zhang Xin-chun, Xiao Qian, Gao Zhao-yin, Wang Jia-bao. 2014. The detection of pathogenicity for *Colletotricum* from different litchi cultivars and regions. *Journal of Fruit Science*, 31 (2): 296 - 301. (in Chinese)
- 张新春, 肖茜, 高兆银, 王家保. 2014. 不同来源荔枝炭疽菌致病性差异的测定. *果树学报*, 31 (2): 296 - 301.