

野生大豆紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因的克隆及分析

王军卫¹, 侯立江¹, 李 登¹, 程春明², 王瑞珍³, 赵现伟³, 赵朝森³

(1. 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 南昌市农业科学院, 江西 南昌 330038; 3. 江西省农业科学 作物研究所, 江西 南昌 330200)

摘要:以低磷胁迫处理的野生大豆 w343 叶片为材料, 根据大豆的 *GmPAP1* 基因设计一对特异引物, 采用同源克隆的方法获得了野生大豆紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因的 cDNA 序列, 并将其命名为 *GsPAP1*。该基因与已报道的大豆 *GmPAP1* 基因长度一致, 均为 999 bp, 编码 332 个氨基酸, 分子量为 37.71 kD, 等电点为 7.38。但在 cDNA 的编码区共有 9 处发生了碱基的替代, 其中有 5 处转换和 4 处颠换, 有 7 处编码的氨基酸残基不同, 其序列一致性达 99.38%。系统进化树分析表明, 野生大豆 *GsPAP1* 基因与大豆、羽扇豆、甘薯、葡萄等植物的 *PAP1* 基因有较高同源性。

关键词:野生大豆; 紫色酸性磷酸酶; 耐低磷基因; 抗逆性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)05-0596-05

Cloning and Sequence Analysis of Purple Acid Phosphatase *PAP1* Gene in Wild Soybean

WANG Jun-wei¹, HOU Li-jiang¹, LI Deng¹, CHENG Chun-ming², WANG Rui-zhen³, ZHAO Xian-wei³, ZHAO Chao-sen³

(1. College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling 712000, China; 2. Nanchang Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330038, China; 3. Crop Institute of Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract: In this study, *PAP1* gene was cloned from wild soybean w343 planted under deficient-Pi condition with designed primers according to the sequence of *GmPAP1* gene from cultivated soybean based on homologous cloning method and named *GsPAP1*. The cloned *GsPAP1* gene was 999 bp in size and encoded 332 amino acids as same as *GmPAP1* gene from soybean, with molecular weight of 37.71 kD and isoelectric point 7.38. Sequence alignment of *GmPAP1* with *GsPAP1* showed that there were 9 single nucleotide polymorphisms, including 5 locus transitions and 4 locus transversion. *GsPAP1* had higher homology to *GmPAP1* with the identities of 99.38%. Amino acid sequence alignment showed that 7 deduced amino acids of *GsPAP1* were different from *GmPAP1*. The phylogenetic tree results showed that *GsPAP1* gene from w343 shared high similarities to the previously reported *PAP1* genes from other plants, such as *Glycine max*, *Lupinus luteus*, *Ipomoea batatas*, *Vitis vinifera* and so on.

Key words: Wild soybean; Purple acid phosphatase; Low phosphorus tolerance gene; Resistance

磷是植物生长发育的必需营养元素之一, 对于植物新陈代谢和正常生长发育具有极其重要的作用。虽然土壤中总磷含量并不低, 但是植物仍然缺磷, 首要原因是土壤本身有效磷含量不足, 浓度仅为 $2 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[1]; 其次是磷肥利用效率低, 磷肥施入土壤后, 能很快地被吸附到土壤颗粒表面或与土壤中的 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 等生成难溶的磷酸盐变为无效态^[2]。就一般作物而言, 磷的当季利用率只有 10%~15%^[3]。土壤中有态磷的含量已成为农业生产中作物生长与产量的限制性因子。因此, 提高植株对土壤中有态磷的利用效率, 对于当前主要农作物产量提高和品质改良具有重要的意义。

许多研究表明, 作物在低磷胁迫下表现出各种适应机制, 在不同作物间, 甚至同一作物不同品种间对磷素的利用效率也存在显著差异。在对作物

产量提高和品质改良等方面, 磷高效品种的作用要大于施用磷肥所带来的效果^[4-8]。植物对低磷胁迫有适应性反应, 其中缺磷诱导根系分泌酸性磷酸酶是高等植物适应低磷胁迫的一个普遍机制。紫色酸性磷酸酶 (purple acid phosphatase, PAP) 作为一种特殊的酸性磷酸酶, 参与了植物对土壤中有态磷的利用和植株体内磷的重新分配过程。在以植酸盐为唯一磷源条件下, 转蕈藜苜蓿 *MtPAP1* 基因拟南芥植株的生物学产量、无机磷和全磷含量均明显提高^[9]。Ma 等^[10]将 *MtPAP1* 转入白三叶草, 在有机态磷条件下, 转基因植株的磷吸收量明显增加, 生物产量也较野生型有所提高, 植株利用有机态磷的能力得到明显改善。Wang 等^[11]将拟南芥紫色磷酸酶基因 *AtPAP15* 转入大豆, 在酸性土壤中生长的 3 个转基因株系产量性状均明显优于野生型。

收稿日期: 2013-03-12

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08004-005); 西北农林科技大学基本科研业务费项目 (QN2011003); 西北农林科技大学国际科技合作基金项目; 唐仲英育种基金。

第一作者简介: 王军卫 (1972-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: wjw@nwsuaf.edu.cn。

通讯作者: 程春明 (1972-), 男, 博士, 研究员, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: ccmccmcc@126.com。

在生物进化过程中,野生大豆适应各种逆境条件并保留了许多优良性状,如耐旱、耐盐碱、耐低磷、抗病等。大豆是需磷量较大的农作物之一,其籽粒含磷量远远高于水稻、小麦和玉米。据估算,每生产 100 kg 大豆籽粒约需要纯 P_2O_5 1.5 ~ 2.0 kg,一般大豆田的施磷总量(纯有效养分含量)约为 90 ~ 120 $kg \cdot hm^{-2}$,相当于过磷酸钙 300 ~ 375 $kg \cdot hm^{-2}$ 。大豆植株缺磷后表现明显的缺磷症状,并严重影响其产量和品质^[12-13]。本研究从野生大豆中克隆了紫色酸性磷酸化酶基因,并进行分子生物学分析,旨在为采用转基因的手段将紫色酸性磷酸化酶基因转入到普通大豆品种中,获得耐低磷胁迫的大豆品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生大豆 w343,由南昌市农业科学院程春明研究员提供。大肠杆菌(*E. coli*)菌株 DH5 α 由陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室保存。*Taq* DNA 聚合酶限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶、载体 T-easy vector 均购于 Takara 公司。反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。Trizol RNA 提取试剂盒购于天根公司。引物合成及测序由北京华大公司完成。

1.2 方法

1.2.1 野生大豆 w343 的低磷诱导 选取饱满的野生大豆种子,用 10% 的双氧水消毒,随后用蒸馏水冲洗干净,然后用小刀刮破种皮,种在盛有石英砂的盆中,用 1/2 浓度的 Hoagland 营养液将砂均匀湿润,放置在人工培养箱中,培养箱温度控制在 28℃ 左右。生长过程中,同时喷洒同样的营养液保持砂面湿润至移苗。待真叶完全展开后,移至盛有低磷的 1/2 浓度的 Hoagland 营养液($0.2 \mu mol \cdot L^{-1} KH_2PO_4$)的培养箱中,培养 7 d 后,准备提取 RNA。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 合成 将采集的幼叶用液氮研磨,参照 Trizol 试剂盒说明书,提取总 RNA,然后用 Dnase I(Takara)处理去除存在的痕量 DNA。cDNA 第一链合成采用 M-MLV 反转录酶(Invitrogen)进行。

1.2.3 野生大豆 w343 紫色磷酸酶基因 *PAP1* 的克隆 依据大豆 *GmPAP1*(基因登录号:AF236108)的 cDNA 序列,合成引物,其正向引物为 5'-ATGGGCACTCAGAGAAGCAA-3',反向引物为 5'-TTACATGTCCTGGAGTCAA-3'。以野生大豆叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。20 μL 反应体系:1 μL cDNA 模板,10 \times PCR Buffer 2 μL , dNTP

(2 $mmol \cdot L^{-1}$) 1.6 μL ,上游和下游引物(10 $mmol \cdot L^{-1}$)各 0.6 μL ,*Taq* DNA polymerase(5 $U \cdot \mu L^{-1}$) 0.2 μL , ddH₂O 补齐至 20 μL 。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后与 pMD18T 连接,转化感受态 *E. coli* DH5 α ,挑取转化子进行序列测定。

1.2.4 cDNA 序列和编码蛋白质特征分析 将测序得到的序列采用 Lasergene 软件进行序列拼接,应用 DNAMAN 软件进行序列比对;依据 ExPasy(<http://www.expasy.org/>)对野生大豆 *PAP1* 蛋白进行氨基酸组成、等电点等理化性质及亲水性/疏水性进行分析。

1.2.5 同源蛋白的系统进化分析 以 cDNA 核苷酸序列为基础,在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST,找到其他植物种属同源的 *PAP1* 氨基酸序列,进行同源性分析;利用 Lasergene 软件建立系统进化树。

2 结果与分析

2.1 野生大豆紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因的克隆

以野生大豆 w343 经磷胁迫处理后提取的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳分析,结果得到 999 bp 的特异性 PCR 条带(图 1)。将目的片段与 pMD18-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5 α ,通过蓝白斑筛选,随机挑选 5 个白色菌落进行 PCR 检测,其中 2 个克隆扩增到目的条带,对其进一步测序分析。测序结果表明,该基因 cDNA 序列组成与已报道的大豆紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因(登录号:AF236108)高度同源,二者 cDNA 碱基的同一性为 99.1%。由此推断所克隆得到的 cDNA 序列为紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因序列,并将其命名为 *GsPAP1*。

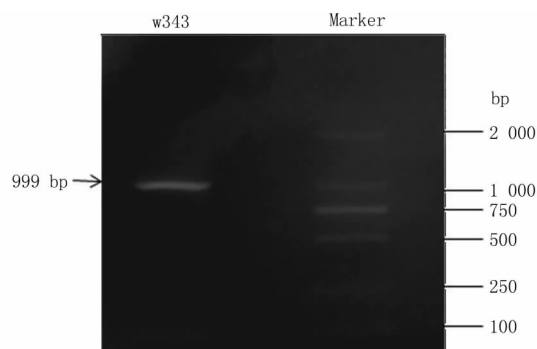


图 1 紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因克隆电泳检测

Fig. 1 The electrophoresis detection of *PAP1* gene cloning

2.2 全长 cDNA 及氨基酸序列的分析

野生大豆紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因与大豆 *GmPAP1* 基因长度一致,均为 999 bp,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA(图 2)。在 cDNA 的编码区共有 9 处发生了碱基的替代,其中 5 处转换和 4 处颠换(表 1)。编码的蛋白质含氨基酸数目为 332 个,

有 7 处编码的氨基酸残基不同,其序列一致性达 99.38%。蛋白质的等电点 7.38,分子量为 37.71 kD。蛋白质氨基酸序列保守结构域分析表明这 2 个蛋白一致。蛋白质的亲水性和疏水性只发生了非常微小的变化。

AF236108	ATGGGCACTCAGAGAAGCAAACCCAGTTGTACCATCGTTGCGATCTTTCTAGCATTTTGTGTTTGTTCCTCTTCGAA	80
<i>GsPAP1</i>	-----c-----	80
AF236108	AGCAAAGCTTGAGAGTCTCCAACATGCGCCAAAGCTGATGGGTCTCTAAGCTTCTTGGTGGTTGGAGACTGGGGTAGAA	160
<i>GsPAP1</i>	-----	160
AF236108	AAGGTGCTTATAACCAATCTCTGTGCTTTTCAGATGGGTGTAATAGGAGAGAAATTGGACGTTGATTTTGTGATCTCA	240
<i>GsPAP1</i>	-----	240
AF236108	ACGGGGGATAACTTCTACGACAATGGATTAACCGGAGTGTTTGATCCATCCTTCGAAGAATCATTACCAAAAATCTACAC	320
<i>GsPAP1</i>	-----a-----	320
AF236108	GGCACCTAGCTTGCAAGAAGTGGTACAACGTTTTGGGAAATCATGACTACAGGGGAAATGCCAAGGCACAAATAAGCC	400
<i>GsPAP1</i>	-----	400
AF236108	ATGTCCTTAGATACAGAGACAATAGATGGGTGTGCTTCAGATCATATACCCTCAATTCAGAAAATGTAGACTTCTTTTTT	480
<i>GsPAP1</i>	c-----	480
AF236108	GTAGACACAACCTCTTATGTTGATAAATACTTCATTGAGGATAAAGGCCATAACTACGATTGGAGAGGCATACTACCCAG	560
<i>GsPAP1</i>	-----t-----	560
AF236108	GAAGCGTTATACTTCTAACCTTCTCAAGGACGTGGATTTGGCACTAAGACAATCAACAGCAACCTGGAAGGTAGTGATTG	640
<i>GsPAP1</i>	-----c-t-----	640
AF236108	GCCATCATACAATCAAAAACATTGGGCATCATGGAGACACCCAAGAAGCTTTAATACATTTTCTCCCACTTCTTAAGGCA	720
<i>GsPAP1</i>	-----g-----	720
AF236108	AATAATGTTGATTGTACATGAACGGACACGATCACTGCTTGAACATATAAGTAGCCTTGACAGTTCAAGTTCAATTTT	800
<i>GsPAP1</i>	-----a-----	800
AF236108	GACAAGTGGTGGTGGATCGAAGGCATGGAGAGGTGACACGAAACAGAGCGAAGGAGATGAGATGAAGTTTACTACGACG	880
<i>GsPAP1</i>	-----	880
AF236108	GCCAAGGCTTCATGTCTGTGCATATTTCTCAAACCTCAGCTTCAATTTCTTTCTTTGATGTCTTCGGCAATGCCATCCAC	960
<i>GsPAP1</i>	-----t-----	960
AF236108	AAATGGAACACCTGCAAGTTTGACTCCAGTGACATGTAA	999
<i>GsPAP1</i>	-----	999

图 2 野生大豆 *GsPAP1* 基因与大豆 *GmPAP1* 基因的序列比对
Fig.2 Sequence alignment of *GmPAP1* with *GsPAP1* gene of w343

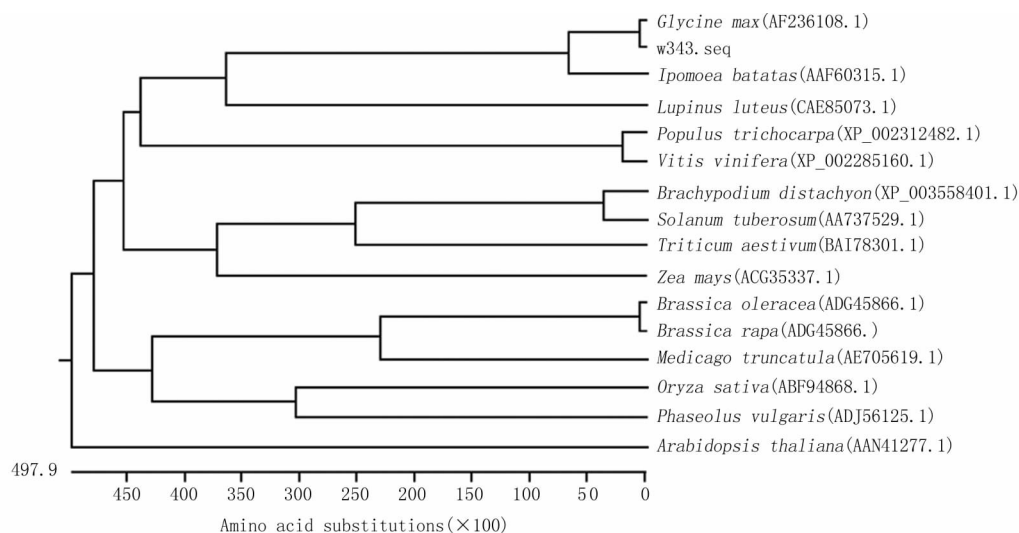
表 1 野生大豆 *GsPAP1* 基因与大豆 *GmPAP1* 基因的比较分析
Table 1 Sequence analysis of *GmPAP1* and *GsPAP1* gene of w343

基因		位点 Locus								
Gene		42	281	401	497	570	572	659	741	952
碱基 Base	<i>GmPAP1</i>	G	T	A	A	T	C	A	G	C
	<i>GsPAP1</i>	C	A	C	T	C	T	G	A	T
氨基酸 Amino acid	<i>GmPAP1</i>	A	F	H	Y	Y	T	N	M	A
	<i>GsPAP1</i>	A	Y	P	F	Y	I	S	I	V

2.3 不同植物紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因系统进化分析

将获得的野生大豆紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因氨基酸序列与 GenBank 蛋白质数据库进行氨基酸序列同源性 (BlastP) 比对,发现与大豆 (*Glycine max*)、羽扇豆 (*Lupinus luteus*)、甘薯 (*Ipomoea batatas*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、高粱

(*Sorghum bicolor*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、油菜 (*Brassica napus*)、苜蓿 (*Medicago truncatula*) 等的 *PAP1* 基因有较高的同源性,与这些基因的一致性都在 80% 以上。基于氨基酸序列的系统进化树分析(图 3)表明,野生大豆 *GsPAP1* 基因与大豆、甘薯、羽扇豆、毛果杨和葡萄亲缘关系较近,与拟南芥、菜豆、水稻和苜蓿等植物的亲缘关系较远。

图3 紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因的分子进化分析Fig.3 Molecular evolution analysis of *PAP1* gene

3 讨论

华南是我国南方大豆重要产区,但由于该地区主要为丘陵山区旱地,土壤肥力差,酸性强,铁、铝、锰含量高,磷极易被固定,有效磷元素缺乏严重,导致单产较低,极大地影响了该地区大豆生产的发展。从遗传改良方面着手,在野生大豆中筛选磷高效资源,挖掘出磷高效 QTL 位点、重要功能基因,利用常规育种、分子标记辅助育种及转基因育种等技术培育适应酸性低磷土壤条件的优良大豆新品种,是解决该地区大豆产量较低的重要途径之一。

植物抗逆性状的形成是植物适应环境逐步进化的结果。为了获得植物的抗逆性状,人们往往在逆境中寻找适应环境的抗逆个体,获得生产中可以利用的材料^[13-14]。南方作为野生大豆资源的主要分布地区,主要是酸性红壤,其特点是养分易流失、含量低,其中以磷素缺乏最为明显。野生大豆在漫长的生物进化过程中,逐步适应了这种生长环境,因此在野生大豆资源中必然蕴藏着磷营养高效基因型。紫色酸性磷酸酶(PAP)是含铁的糖蛋白,具有双核金属脱氢酶特征的一类酸性磷酸酶,在构成该酶活性位点的双金属核中心有7个保守的氨基酸残基,具有较强的催化部分有机态磷化合物分解的功能^[15-18]。植物受低磷胁迫诱导时 PAP 会大量表达,并分泌到根际土壤中水解根际土壤中的磷脂化合物释放出磷供植物利用^[19]。通过低磷诱导证实了已克隆的大豆 *GmPAP1* 和 *GmPAP2* 基因均与磷效率相关,且均属低磷诱导基因,前者主要在叶部和根部表达,而后者主要在根部表达^[20-22]。

本研究从耐低磷较好的湖南野生大豆材料 w343 中克隆了酸性磷酸酶 *PAP1* 基因。该基因

cDNA序列组成与已报道的大豆紫色酸性磷酸酶 *PAP1* 基因高度同源,二者在 cDNA 碱基的同一性为 99.1%,但是在 cDNA 的编码区存在多处单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)差异,编码的蛋白质和氨基酸发生了非同义突变。由此推测这些 SNP 差异提高了野生大豆材料 w343 耐低磷能力。

参考文献

- [1] Raguthama K G. Phosphate acquisition [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 665-693.
- [2] Raboy V. The biochemistry and genetics of phytic acid synthesis [M]//Morre D J, Boss W, Loewus F A. Inositol metabolism in plants. New York: Alan R. Liss, 1990: 55-76.
- [3] 李继云, 刘秀娣, 周伟, 等. 有效利用土壤养分元素的作物育种新技术研究[J]. 中国科学: B 辑, 1995, 25(1): 41-48. (Li J Y, Liu X D, Zhou W, et al. Research on new technology of crop breeding in effective use of the soil nutrient element [J]. Science in China (Series B), 1995, 25(1): 41-48.)
- [4] 张恩和, 张新慧, 王慧珍. 不同基因型春蚕豆对磷胁迫的适应反应[J]. 生态学报, 2004, 24(8): 1590-1593. (Zhang E H, Zhang X H, Wang H Z. Adaptable effects of phosphorus stress on different genotypes of faba-bean [J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(8): 1590-1593.)
- [5] 沈宏, 施卫明, 王校常, 等. 不同作物对低磷胁迫的适应机理研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(2): 172-177. (Shen H, Shi W M, Wang X C, et al. Study on adaptation mechanisms of different crops to low phosphorus stress [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2001, 7(2): 172-177.)
- [6] 廖红, 严小龙. 菜豆根构型对低磷胁迫的适应性变化及基因型差异[J]. 植物学报, 2000, 42(2): 158-163. (Liao H, Yan X L. Adaptive changes and genotypic variation for root architecture of common bean in response to phosphorus deficiency [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(2): 158-163.)
- [7] 何文寿. 宁夏不同基因型小麦磷营养的差异[J]. 作物学报, 2000, 26(1): 105-110.

- 2004,30(2):131-137. (He W S. Differences in phosphorus nutrition in spring wheat of different genotypes in Ningxia province[J]. Acta Agronomica Sinica,2004,30(2):131-137.)
- [8] 汤翠凤,徐福荣,余腾琼,等. 水稻耐低磷种质的初步筛选[J]. 分子植物育种,2005,3(5):711-715. (Tang C F,Xu F R,Yu T Q,et al. Preliminary screening of rice germplasms for tolerance to low-phosphorous[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(5): 711-715.)
- [9] 肖凯,谷俊涛,Maria Harrison,等. *MtPAP1* 表达特性及异源表达对拟南芥有机态磷吸收的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报,2006,32(1):99-106. (Xiao K,Gu J T,Harrison M,et al. Expression characteristics of *MtPAP1* and its exotic expression in arabidopsis affecting organic phosphorus absorption of plants[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2006,32(1):99-106.)
- [10] Ma X F,Wright E,Ge Y X,et al. Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes[J]. Plant Science,2009,176:479-488.
- [11] Wang X R,Wang Y X,Tian J,et al. Over expressing *AtPAP15* enhances phosphorus efficiency in soybean[J]. Plant Physiology, 2009,151:233-240.
- [12] Howell R W. Phosphorus nutrition of soybeans[J]. Plant Physiology, 1954,29:477-483.
- [13] 曹敏建,佟占昌,韩明祺,等. 磷高效利用的大豆遗传资源的筛选与评价[J]. 作物杂志,2001(4):22-24. (Cao M J,Tong Z C,Han M Q,et al. Select ion and evaluation of soybean strains with high efficient utilization phosphorus[J]. Crops,2001(4):22-24.)
- [14] 李喜焕,常文锁,张彩英. 中国大豆磷素营养及磷高效品种筛选最新进展[J]. 大豆科学,2011,30(2):322-327. (Li X H,Chang W S,Zhang C Y. Advances of soybean (*Glycine max* L.) phosphorus nutrition and high P-efficient germplasms screening in China[J]. Soybean Science,2011,30(2):322-327.)
- [15] 张小红,陈耀锋,任惠莉,等. 两个小麦抗赤霉变异系的抗性 & RAPD 分析[J]. 中国农学通报,2005,21(6):79-82. (Zhang X H,Chen Y F,Ren H L,et al. Resistance and RAPD analysis of two variant lines with resistant to scab in wheat[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2005,21(6):79-82.)
- [16] Jin Y,Wei N S,Nevo E. A MAPK gene from a Dead Sea fungus confers stress tolerance to lithium salt and freezing-thawing: Prospects for saline agriculture[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2005,102:18992-18997.
- [17] 程春明,杨存义,马启彬,等. 华南野生大豆 *GmPAP1* 基因多样性分析[J]. 大豆科学,2010,29(6):920-924. (Cheng C M,Yang C Y,Ma Q B,et al. Diversity analysis of *GmPAP1* of wild soybean in South China[J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 920-924.)
- [18] 张斌,秦岭. 植物对低磷胁迫的适应及其分子基础[J]. 分子植物育种,2010,8(4):776-783. (Zhang B,Qing L. Plants tolerance to low phosphorus and its molecular basis[J]. Molecular Plant Breeding,2010,8(4):776-783.)
- [19] Vogel A,Börchers T,Marcus K,et al. Heterologous expression and characterization of recombinant purple acid phosphatase from red kidney bean[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2002,401:164-172.
- [20] Li D,Zhu H,Liu K,et al. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation[J]. Journal of Biological Chemistry,2002,277:27772-27781.
- [21] 李东屏,王道文. 拟南芥紫色酸性磷酸酶基因 (*AtPAP*) 对磷饥饿的响应[J]. 生命科学研究,2003,7(1):65-69. (Li D P,Wang D W. Responses of putative purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis thaliana* (*AtPAPs*) to phosphorus starvation[J]. Life Science Research,2003,7(1):65-69.)
- [22] Schenk G,Guddat L W,Ge Y,et al. Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants[J]. Gene, 2000,250:117-125.
- [23] Hegeman C E,Grabau E A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings [J]. Plant Physiology, 2001, 126: 1598-1608.
- [24] Liao H,Wonga F L,Phang T H,et al. *GmPAP3*, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency[J]. Gene,2003,318:103-111.