

doi: 10.3969/j.issn.1672-5565.2014.02.01

基于 HMM 的齿肋赤藓 VOZ 转录因子的预测与分析

高 贝^{1,2}, 李小双^{1,2}, 张道远^{1,*}

(1.中国科学院干旱区生物地理与生物资源重点实验室,中国科学院新疆生态与地理研究所,乌鲁木齐 830011;
2.中国科学院大学,北京 100049)

摘要:VOZ (Vascular plant One Zinc finger protein) 作为与植物的进化与发育密切相关的基因,在极端耐旱荒漠苔藓植物齿肋赤藓 (*Syntrichia caninervis*) 中对 VOZ 基因进行挖掘和分析有利于更好的揭示 VOZ 基因的进化关系,且可作为抗逆基因进行更为深入的分子生物学研究。在 VOZ 转录因子蛋白中 VOZ-domain 是一个保守的 DNA 结合结构功能域,利用 VOZ-domain 多序列联配构建隐马尔可夫模型序列谱能够很好的进行家族成员的识别和预测。利用拟南芥、小立碗藓和水稻等植物已知的转录因子序列信息构建 HMM 序列谱模型,对荒漠苔藓齿肋赤藓转录组进行比对搜索。最终得到一条新的齿肋赤藓 VOZ 转录因子 ScVOZ1 (NCBI/EBI 检索号:HG764415),序列长度为 1 495 bp,具有完整的 VOZ-domain 结构域。生物信息学分析表明其具有转录调控功能和核定位潜能。多序列比对、进化和保守基序分析表明,ScVOZ1 蛋白序列与小立碗藓 VOZ 家族和拟南芥 AtVOZ1 相似度较高。本研究为进一步研究 ScVOZ1 基因的功能以及其进化起源奠定了基础。

关键词:齿肋赤藓;VOZ 转录因子;隐马模型;生物信息学

中图分类号: Q811.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2014)-02-077-07

Identification and characterization of a VOZ transcription factor in *Syntrichia caninervis* using profile HMM method

GAO Bei^{1,2}, LI Xiaoshuang^{1,2}, ZHANG Daoyuan^{1,*}

(1. Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: As VOZ gene is highly related with evolution and development in plants, the prediction and characterization of a VOZ gene in the stress-tolerant desert moss *Syntrichia caninervis* will help reveal its evolutionary history. Furthermore, it may also serve as a stress resistant gene for further molecular analysis. The VOZ-domain is a conserved functional DNA-binding domain in VOZ transcription factors. The HMM profile constructed based on multiple sequence alignment of VOZ-domain could be used for novel VOZ gene prediction and identification. Based on the transcriptome of *Syntrichia caninervis* and the HMM profile constructed from the VOZ genes in *A. thaliana*, *P. patens* and *O. sativa*, a novel VOZ transcription factor was identified in *Syntrichia caninervis* and named as ScVOZ1 with NCBI/EBI accession number HG764415, the mRNA sequence length 1 495 bp and containing complete VOZ-domain. Bioinformatics analysis showed that ScVOZ1 is provided with the function of transcription regulation and the potential of nuclear localization. Multiple sequence alignment, phylogenetic and conserved motif analysis showed ScVOZ1 has the highest similarity with PpVOZ1/2 in *P. patens* and AtVOZ1 in *A. thaliana*, this study laid foundation for further functional and phylogenetic study of this evolution and development important gene.

Keywords: *Syntrichia caninervis*; VOZ transcription factor; HMM; Bioinformatics

收稿日期:2013-11-08;修回日期:2014-01-14.

资助项目:国家“973”项目(2014CB954203);国家自然科学基金项目(U1170304)资助。

作者简介:高贝,男,硕士研究生,研究方向:生物信息学;E-mail: beig2048@gmail.com.

* 通信作者:张道远,女,研究员,研究方向:分子遗传育种;E-mail: zhangdy@ms.xjb.ac.cn.

转录因子(Transcription factor)是一类种类繁多、功能多样的蛋白,又称反式作用因子,通过与诸如启动子(promoter)、增强子(enhancer)以及抑制子(suppressor)等顺式作用元件直接或者间接相互作用,起到增强或者抑制转录的作用。一般来讲,每一个转录因子家族成员均具有一类特异的DNA结合结构域(DNA binding domain),该结构域的氨基酸序列特征可用来很好的区分不同的转录因子家族。北京大学生物信息学中心专门构建了植物转录因子数据库 PlantTFDB^[1](<http://plantfdb.cbi.edu.cn/>),其中收录的转录因子主要针对常见的模式物种以及基因组已被测序的物种。

VOZ(Vascular plant One Zinc finger protein)转录因子家族是高等植物所特有的转录因子,该家族最早于2004年由Mitsuda等人在拟南芥中被克隆,VOZ转录因子家族在拟南芥中有两个成员:AtVOZ1和AtVOZ2,在拟南芥中VOZ转录因子能够结合AVP1基因上的一段花粉特异性的38 bp的顺式作用元件,从而调控花粉发育过程。实验表明,AtVOZ1在韧皮部组织中呈特异性表达,而AtVOZ2在根中表达丰度较高,同时在水稻和小立碗藓中也发现了其同源基因^[2]。最近的研究也证实,VOZ基因在拟南芥中能够调控花器官发育和开花时间,且AtVOZ2能够受到光调控由细胞质转位到细胞核中,进而发挥调控基因表达的功能^[3-4]。也有研究表明,VOZ能够响应生物和非生物胁迫,对于拟南芥voz1voz2双突变体,其对冷冻和干旱胁迫的耐受力均有增强,而对诸如真菌病原体感染等生物胁迫的耐受力减弱^[5];而AtVOZ2在拟南芥中过表达能增强对生物胁迫的耐受力但会削弱非生物胁迫的抗性^[6]。在苔藓植物中该基因的功能研究尚未被研究和报道。VOZ转录因子家族具有两个保守的结构域:Domain-A和Domain-B,其中Domain-B同时具有DNA结合结构域和蛋白二聚体化的重要功能。因此,Domain-B即被确定为VOZ转录因子家族成员的特征结构域VOZ-domain^[2]。

HMMER软件包是由哈佛大学Sean Eddy等人开发的用来进行同源蛋白家族或结构域搜索的软件包,现在已经被广泛应用于诸如Pfam、SMART、InterPro等重要的蛋白序列家族数据库。HMMER软件包采用构建蛋白家族或者结构域序列谱模型(profile HMMs)的方式来进行同源基因的识别和注释,一个序列谱模型即代表其一个家族或者结构域,HMMER在同源蛋白识别上具有更强的对远缘家族成员识别的潜力,且HMMERv3.0在比对速度上已经接近于Blast软件包^[7-8]。两个重要的植物转录

因子数据库 PlantTFDB 和 PlnTFDB 的构建均采用了此方法进行转录因子的识别和注释,即利用各植物转录因子家族所特定的DNA结合结构域的HMM序列谱就可识别出绝大多数的转录因子。莫晓婷等(2013)就曾利用 PlantTFDB 数据库搜集玉米的转录因子并进行综述^[9]。部分转录因子家族的序列谱模型尚未能在Pfam数据库中下载到,但可通过搜集种子序列并自建模型的方法实现该转录因子家族的识别和注释(见图1)。朱命喜等(2011)就曾使用HMMER软件包结合矫正的SBP结构域序列谱的方法对大豆SBP转录因子进行注释和分析^[10],得到了很好的注释结果。

迄今为止,在苔藓植物中除基因组已被测序的苔藓模式植物小立碗藓外^[11],VOZ基因在其他苔藓植物中未见报道。荒漠苔藓植物齿肋赤藓(*Syntrichia caninervis*)在国内主要分布于我国最大的固定半固定沙漠新疆古尔班通古特沙漠中,是该沙漠中苔藓生物结皮的优势藓种,具有重要的生态学研究价值;由于其极强的干旱耐受能力以及在复水后快速的复苏和光合恢复反应,亦是研究苔藓复水机制的理想藓种^[12-13]。

本研究利用已有的VOZ转录因子家族特有的VOZ-domain进行多序列联配并构建HMM序列谱,从齿肋赤藓中成功发掘出一条VOZ转录因子,将其命名为ScVOZ1,NCBI/EBI核酸数据库登录号为:HG764415,转录本序列长度为1495 bp,ORFfinder预测其编码蛋白长度为452个氨基酸,具有完整的VOZ-domain,在进化上与小立碗藓VOZ基因和AtVOZ1具有较近的进化关系。

1 材料与方法

1.1 数据搜集和VOZ结构域序列谱构建

齿肋赤藓(*Syntrichia caninervis*)的转录组数据通过构建RNA测序文库利用Illumina二代测序技术拼接组装而得到。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)水稻(*Oryza sativa*)、高粱(*Sorghum bicolor*)和大麦(*Hordeum vulgare*)等的VOZ基因从PlantTFDB数据库下载。获取得到以上序列信息后,使用ClustalW进行多序列联配,并结合参考文献[2]对序列进行手工校对,获取得到VOZ-domain区域的多序列联配信息,使用HMMERv3.0软件包中的hmmbuild命令将其转化为HMM序列谱^[7],程序命令行为:#hmmbuild -informat afa VOZ.hmm VOZ.fas,得到VOZ.hmm,即VOZ基因家族的HMM序列谱模式文件,可用于后续的VOZ

基因家族成员的识别。

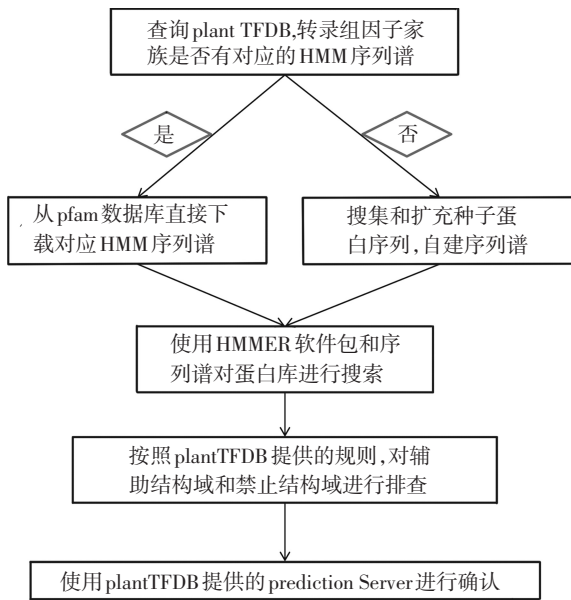


图 1 基于 HMM 进行转录因子注释流程

Fig.1 General workflow for transcription factor identification based on profile HMM method

1.2 齿肋赤藓转录因子的鉴定

对齿肋赤藓转录组测序得到的转录本进行 NR 蛋白库注释,按照最优比对结果和 ESTScan 软件包分析来预测转录本读框区域并翻译得到蛋白序列。按照 PlantTFDB 所列各转录因子家族的判定规则并参照图 1 流程即可注释所得到的蛋白序列库中的转录因子家族^[1]。在该研究中,使用上一步自建的 VOZ 转录因子家族 HMM 序列谱用 hmmsearch 命令来进行搜索,所使用的程序命令行为:#hmmsearch VOZ.hmm S_caninervis_protein.fasta,采用 HMMER 软件包默认的 e-value 阈值 0.01。

1.3 VOZ 转录因子的生物信息学分析

使用 ClustalW 以及 Boxshade 对搜集的 VOZ 蛋白序列和齿肋赤藓 VOZ 蛋白序列进行多序列联配并手工矫正获得 VOZ-domain 的多序列联配图谱。序列分析所使用的主要在线分析工具列于表 1 中。

利用 MEME 在线软件包对 VOZ 基因蛋白序列进行保守序列模式分析。使用 Gblocks v0.91b 工具确定多条联配的 VOZ 转录因子蛋白序列中的保守

区域,使用 MEGA v5.10 构建 NJ 进化树,并进行 1 000 次 Bootstrap 稳定性检验。使用 PSORT 在线工具预测 ScVOZ1 的亚细胞定位信息,用 NPSA 在线分析工具对其进行二级结构分析,使用 CBS 的 TMHMM 和 ProtFun 在线工具预测其跨膜结构和功能分类信息。

表 1 序列分析所用在线生物信息学工具

Table 1 Web-based bioinformatics tools for sequence analysis

分析内容 (Items)	分析工具 (Web-based Tools)
保守序列模式	http://meme.nbcnr.net/meme/
亚细胞定位	http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html
跨膜结构域	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
二级结构	http://npsa-pbil.ibcp.fr/
功能类预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/
多序列保守区选择	http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/one_task.cgi_task_type=gblocks

2 结果与分析

2.1 ScVOZ1 序列特征分析

利用以上方法从齿肋赤藓中成功识别出一条 VOZ 转录因子,该转录本核酸序列长度为 1 495 bp,进行 ORFfinder 预测其编码蛋白序列长度为 452 个氨基酸残基,读框具有起始和终止密码子。参考文献^[2]中 VOZ-domain 序列并利用多序列比对的方法,确定了 ScVOZ1 中由约 226 个氨基酸残基组成的 VOZ-domain 的位置为 167~392,与其他物种 VOZ 转录因子的 VOZ-domain 的多序列联配图谱(见图 2),在 VOZ 结构域蛋白序列联配图谱下方标出了部分苔藓 VOZ 蛋白序列的差异位点,如第一个差异位点在 ScVOZ1 中为脯氨酸,在其他物种中为亮氨酸;第二个变异位点中,在苔藓和 AtVOZ1 中为蛋氨酸,其余的则是苏氨酸;标注的第四个差异位点则是在苔藓 VOZ 蛋白序列中为组氨酸,其余的为赖氨酸残基。通过序列比对分析,说明各物种的 VOZ 结构域蛋白序列整体具有较高的保守性,但在苔藓 VOZ 基因中一些位点存在着差异。

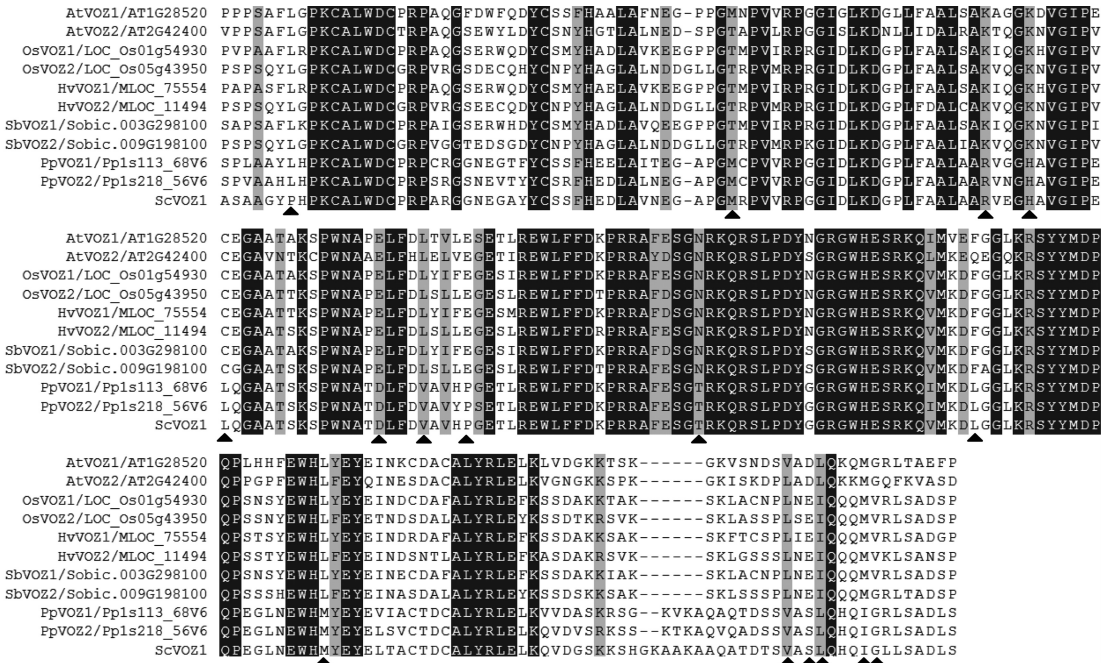


图2 VOZ 转录因子家族 DNA 结合结构域 VOZ-domain 结构域的多序列联配(序列下方黑色三角标识苔藓中氨基酸差异性位点)
 Fig.2 Multiple sequence alignment of the DNA-binding domain VOZ-domain in various VOZ protein sequence
 (Amino acid variable sites in moss were marked with black triangles under the sequences)

2.2 二级结构与跨膜区分析

通过 NPSA 在线分析工具提供的 SOPMA 方法对 ScVOZ1 的二级结构预测分析结果表明, ScVOZ1 的蛋白二级结构主要由三种形式组成, 具体预测分析结果见表 2, 其中无规卷曲(Random Coil) 占有的比例最高, α 螺旋结构(α -Helix) 较少, 另外还包括少量的不到百分之十的延伸链(Extended strand) 结构(见图 3)。

表 2 齿肋赤藓 ScVOZ1 的二级结构预测分析

Table 2 Secondary structure prediction of ScVOZ1

二级结构类型	氨基酸数目	百分比(%)
Alpha helix (α 螺旋)	141	30.45
Extended strand (延伸链)	44	9.50
Random coil (无规卷曲)	278	60.04

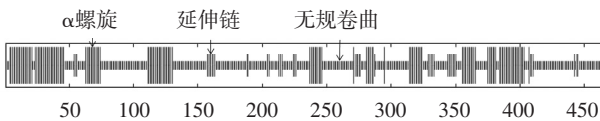


图 3 预测齿肋赤藓 ScVOZ1 的二级结构

Fig.3 Predicted secondary structure of ScVOZ1

使用 TMHMM 在线预测工具对 ScVOZ 跨膜结构域的预测结果表明在 ScVOZ1 转录因子蛋白序列

中不含有潜在的跨膜区结构域, 说明 ScVOZ1 可能不是跨膜蛋白(见图 4)。

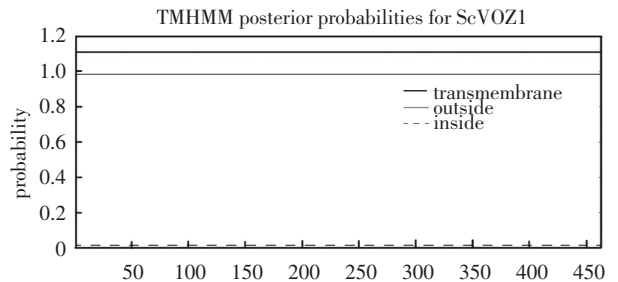


图 4 齿肋赤藓 ScVOZ1 跨膜结构预测

Fig.4 Transmembrane region prediction of ScVOZ1 protein

2.3 亚细胞定位和功能预测

使用 PSORT 对 ScVOZ1 进行亚细胞定位预测, 结果表明 ScVOZ1 定位于细胞核内, 通过 WoLFPSORT 进行同源比较, 其定位于核内(nuclear) 的概率大约为 0.89, 该预测结果与 VOZ 转录因子在细胞核内发挥转录调控功能是相符合的。

利用 CBS 的 ProtFun 软件对 ScVOZ1 的功能分类进行预测, ScVOZ1 预测功能类别列于表 3 中。由预测结果可知, ScVOZ1 具有转录和转录调控功能的可能性概率最高, 分别为 1.657 和 1.545。该功能预测结果与转录因子发挥转录调控功能的特征也是一致的。

表 3 齿肋赤藓 VOZ 蛋白 GO 功能预测

Table 3 GO functional category prediction of ScVOZ1 protein

Gene Ontology category (功能类)	Prob	Odds
Signal_transducer (信号传递)	0.078	0.365
Receptor (受体)	0.004	0.022
Hormone (激素)	0.001	0.206
Structural_protein (结构蛋白)	0.001	0.045
Transporter (转运)	0.025	0.231
Ion_channel (离子通道)	0.010	0.175
Voltage-gated_ion_channel (电压门控离子通道)	0.006	0.276
Cation_channel (阳离子通道)	0.010	0.215
Transcription (转录)	0.198	1.545
Transcription_regulation (转录调控)	0.207	1.657
Stress_response (胁迫响应)	0.006	0.065
Immune_response (免疫应答)	0.013	0.151
Growth_factor (生长因子)	0.005	0.372
Metal_ion_transport (金属离子转运)	0.028	0.061

2.4 同源性和序列模式分析

通过序列比对,ScVOZ1 与 PpVOZ1 和 PpVOZ2 蛋白序列的相似度 (Identity) 分别为 0.68 和 0.66,与 AtVOZ1 和 AtVOZ2 的蛋白序列相似度分别为 0.52 和 0.45。使用 Gblocks 软件 (见表 1) 对多序列联配中的保守区域进行选择得到了长度为 286 个氨基酸的保守区段,利用该段氨基酸序列构建进化树。通过对 VOZ 转录因子蛋白序列构建进化树分析,ScVOZ1 与小立碗藓 PpVOZ1/2 和 AtVOZ1 最为接近 (见图 5),而拟南芥 AtVOZ1 是与苔藓 VOZ 基因亲缘关系是最为接近的,且其保守序列模式也最为相似 (见图 6)。

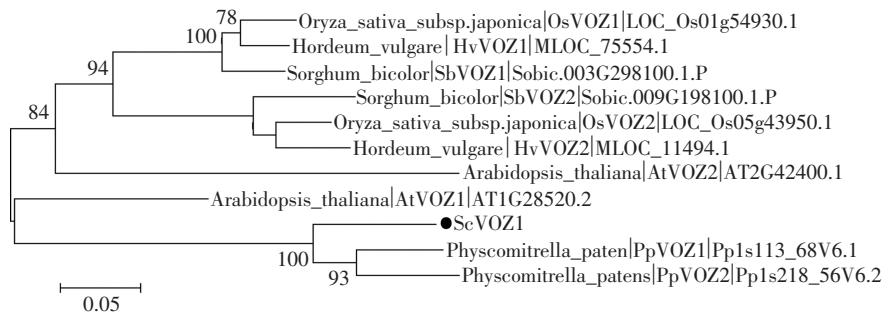


图 5 不同物种 VOZ 转录因子蛋白序列系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree inferred from the protein sequences of VOZ transcription factors in different species

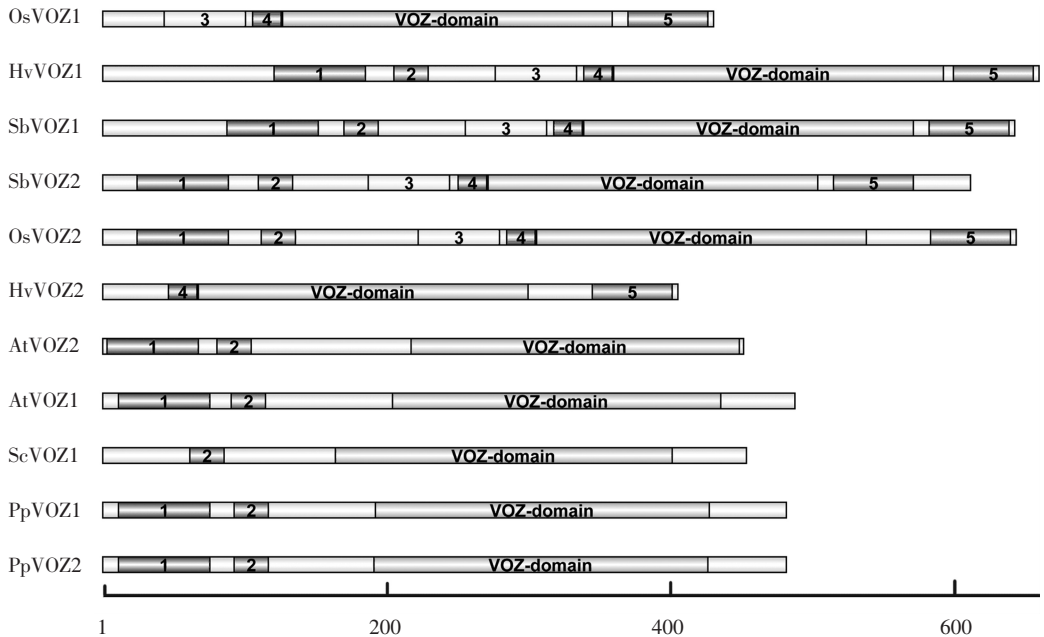


图 6 VOZ 转录因子家族不同成员的保守序列模式分析

Fig.6 Analysis of conserved motif structures in VOZ transcription factors

通过 MEME 进行保守序列模式分析发现 ScVOZ1 缺少 PpVOZ1/2 所具有的保守基序 motif-1, 苔藓的保守序列串联形式与拟南芥最为相近 (见图 6)。从 VOZ 转录因子蛋白质序列的保守序

列模式分析结果来看,所有的 VOZ 家族成员均具有十分保守的 VOZ-domain,这与该结构域在 VOZ 基因中具有重要的生物功能的研究结果是一致的^[2]。AtVOZ1/2 和苔藓 VOZ 转录因子均不含有 Motif3、4

和5,其中 motif-5 存在于除拟南芥和苔藓之外的其他物种当中。

通过对多条 VOZ 转录因子的保守序列模式分析,说明了该家族在进化上的复杂性和多样性,但同时在关键的功能结构域上又保持着较高的一致性。

3 讨论

本研究根据 PlantTFDB 数据库归纳总结了基于 HMMER v3.0 软件包进行转录因子预测的一般流程,并利用已测序物种的 VOZ 转录因子蛋白序列自建了用于识别 VOZ 转录因子的 HMM 序列谱模型,该序列谱模型即代表了 VOZ 转录因子家族的 VOZ-domain 核心结构域,并可用于将来其他植物 VOZ 转录因子的识别和注释。

通过对 SeVOZ1 的序列模式分析,推测其 5' 端可能是不完整的,而在转录组测序拼接文库中也未能通过电子克隆的方法对其进行延伸,在公共核酸序列数据库中齿肋赤藓的 EST 序列信息极少。将来可能还需要 RACE 实验来获取其全长序列,但随着 EST 测序数量的增加,仍有可能通过电子克隆的方法进行拼接延伸得到其全长序列,如甘蔗 MYB2 转录因子即是通过利用 EST 序列电子克隆得到的^[14]。

此次在荒漠苔藓植物齿肋赤藓中成功鉴定出一条 VOZ 转录因子,该 VOZ 转录因子的成功预测再一次证实了 VOZ 转录因子在苔藓植物中的存在,而该基因尚未在藻类中被发现和报道。VOZ 基因在拟南芥中主要定位于韧皮部和根系中^[2],而苔藓植物虽不具备维管组织和真正的根,但已经进化出了茎叶体和假根,并且具备了对水分和光合产物进行长距离运输的机制。该长距离运输机制的实现依赖于类韧皮部组织 (leptoid) 和类木质部组织 (hydroid),并且显微结构分析也发现 leptoid 与维管植物的筛管具有十分类似的结构,表明 leptoid 和维管植物的筛管均起源于早期的类韧皮部组织^[15]。通过序列分析发现苔藓 VOZ 基因与 AtVOZ1 有着比较近的进化关系和较为一致的基序组合模式,因此 VOZ 基因家族有可能是与韧皮部的发育和进化是相关的。

近年的分子生物学研究证实,AtVOZ 在拟南芥中能够调控花器官发育和开花时间,已经有大量的研究证明光照是影响开花的主要外界环境因素之一,在拟南芥中 AtVOZ2 能够响应远红光照射而移位至细胞核内,且其在核内的稳定性也会受到光照性质的影响^[3]。类似的,在小立碗藓中也发现了调

控开花的 CO-like 基因会受到光照的调控,且与拟南芥 CO-like 基因序列相似性较高,CO 和 CO-like 基因存在于所有的有花植物中,因而高等植物 CO 基因调控开花时间的功能极有可能是来源于早期登陆植物对光信号的传递响应^[16]。VOZ 转录因子极有可能起源于早期的登陆植物类群苔藓,但其在苔藓中的功能还有待于进一步研究,但毫无疑问该基因是一个对植物的进化和发育 (Evo-Devo) 具有重要研究价值的基因。

通过保守序列模式分析在其他物种中发现了苔藓 VOZ 转录因子所不具备的基序,如 motif-3、4、5 等,这些新的基序在其他物种 VOZ 转录因子蛋白序列中的串联整合极有可能使 VOZ 转录因子的功能发生一定的改变,有可能在进化过程中获得了新的结构域和功能。对 VOZ-domain 蛋白序列的多序列比对和保守基序模式分析(见图 2 和图 6)发现 VOZ 转录因子的 DNA 结合结构域是比较保守的一段蛋白序列,正是由于该重要功能结构域的保守性,为更好地识别 VOZ 转录因子家族成员提供了基础。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG He, JIN Jinpu, TANG Liang, et al. Plant TFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl 1): D1114-D1117.
- [2] MITSUDA N, HISABORI T, TAKEYASU K, et al. VOZ: Isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant & cell physiology*, 2004, 45(7): 845-854.
- [3] YASUI Y, MUKOUGAWA K, UEMOTO M, et al. The phytochrome-interacting vascular plant one-zinc finger1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in *Arabidopsis* [J]. *The Plant cell*, 2012, 24(8): 3248-3263.
- [4] CELESNIK H, ALI G S, ROBISON F M, et al. *Arabidopsis thaliana* VOZ (Vascular plant One-Zinc finger) transcription factors are required for proper regulation of flowering time [J]. *Biology open*, 2013, 2(4): 424-431.
- [5] NAKAI Y, NAKAHIRA Y, SUMIDA H, et al. Vascular plant one-zinc-finger protein 1/2 transcription factors regulate abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 2013, 73(5): 761-775.
- [6] NAKAI Y, FUJIWARA S, KUBO Y, et al. Overexpression of VOZ2 confers biotic stress tolerance but decreases abiotic stress resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant signaling & behavior*, 2013, 8(3): e23358.
- [7] EDDY S R. A new generation of homology search tools

- based on probabilistic inference [J]. *Genome informatics International Conference on Genome Informatics*, 2009, 23(1):205-211.
- [8] EDDY S R. Accelerated Profile HMM Searches [J]. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7(10):e1002195.
- [9] 莫晓婷, 赵军, 范云六, 等. 玉米转录因子结构与功能研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, (03):7-17.
MO Xiaoting, ZHAO Jun, FAN Yunliu, et al. Research progress on structure and function of maize transcription factors [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, (03):7-17.
- [10] 朱命喜, 刘洋, 吴琼, 等. 大豆 SBP 转录因子家族的预测分析[J]. *大豆科学*, 2011, (02):177-183.
ZHU Mingxi, LIU Yang, WU Qiong, et al. Forecasting analysis of SBP transcription factor families in soybean [J]. *Soybean Science*, 2011, (02):177-183.
- [11] RENSING S A, LANG D, ZIMMER A D, et al. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants [J]. *Science*, 2008, 319(5859):64-69.
- [12] ZHANG J, ZHANG Y M, DOWNING A, et al. Photosynthetic and cytological recovery on re-moistening *syntrichia caninervis* Mitt., a desiccation-tolerant moss from Northwestern China [J]. *Photosynthetica*, 2011, 49(1):13-20.
- [13] 魏美丽, 张元明. 脱水对生物结皮中齿肋赤藓光合色素含量和叶绿体结构的影响[J]. *中国沙漠*, 2010(06):1311-1318.
WEI Meili, ZHANG Yuanming: Effects of dehydration on photosynthetic pigment content and chloroplast ultrastructure of *syntrichia caninervis* in biological soil crusts [J]. *Journal of Desert Research*, 2010, (06):1311-1318.
- [14] 李国印, 阙友雄, 许莉萍, 等. 甘蔗 MYB2 转录因子的电子克隆和生物信息学分析[J]. *生物信息学*, 2011, 9(01):24-27.
LI Guoyin, QUE Youxiong, XU Liping, et al. Electronic cloning and characterization of MYB2 gene from *saccharum officinarum* using bioinformatics tools [J]. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 2011, 9(01):24-27.
- [15] BEHNKE H D, SJOLUND R D. Sieve elements: comparative structure, induction and development [M]. Berlin: Springer, 1990.
- [16] ZOBELLO, COUPLAND G, REISS B. The family of CONSTANS-like genes in *physcomitrella patens* [J]. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 2005, 7(3):266-275.