

• 药材与资源 •

铁皮石斛镁离子转运蛋白基因的克隆及表达分析

张 岗^{1,2}, 翟清华¹, 张大为², 胡本祥¹, 郭顺星^{2*}

1. 陕西中医学院药学院 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 克隆珍稀濒危兰科药用植物铁皮石斛镁离子转运蛋白(magnesium transporter, MGT)基因(*DoMGT1*)并进行生物信息学和表达分析。方法 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 获得基因 cDNA 全长; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域及亚细胞定位等分子特征; 用 DNASTAR 6.0 和 MEGA 4.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助实时定量 PCR (qPCR) 检测基因表达模式。结果 克隆到 *DoMGT1* (GenBank 注册号 KJ995532), cDNA 全长 1 625 bp, 编码一条由 425 个氨基酸组成的肽链, 相对分子质量 47 400, 等电点 4.79; *DoMGT1* 蛋白含有 CorA 家族镁离子转运蛋白保守结构域(313~420)和镁离子转运蛋白 MRS2/LPE10 保守域(27~420); *DoMGT1* 与多种植物 MGTs 基因一致性为 46%~63%, 编码蛋白与水稻 OsMGTD、OsMGTE、OsMGTF 等聚在一起, 与 AtMGT4 共同构成植物 MGTs 基因的一大类群; *DoMGT1* 基因转录本在石斛根、茎、叶器官中为组成型表达, 叶中相对表达量较高, 为根中的 3.46 倍; 茎次之, 为根的 1.54 倍。结论 成功克隆到一个镁离子转运蛋白基因 *DoMGT1*, 其转录本在叶中高的表达特征暗示该基因可能在铁皮石斛叶的生长发育中发挥重要作用。

关键词: 铁皮石斛; 镁离子转运蛋白; 基因克隆; 序列分析; qPCR

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)23-3443-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.017

Cloning and expression analysis of a magnesium transporter gene in *Dendrobium officinale*

ZHANG Gang^{1,2}, ZHAI Qing-hua¹, ZHANG Da-wei², HU Ben-xiang¹, GUO Shun-xing²

1. Shaanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Basis & New Drugs Research College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective This study was carried out to clone a magnesium transporter gene *DoMGT1* from a medicinally important endangered orchid species *Dendrobium officinale*, followed by bioinformatics and expression analysis. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to isolate the full-length gene. The characteristics of physicochemical properties, conserved domains, and subcellular localization of *DoMGT1* protein were determined using a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 6.0 and MEGA 4.0 softwares, respectively. Real time quantitative PCR was employed for gene expression analysis. **Results** The full-length cDNA of *DoMGT1* was 1 625 bp in size, and encoded a 425-aa peptide chain with a molecular weight of 47 400 and an isoelectric point (*pI*) of 4.79; The deduced *DoMGT1* protein contained the magnesiumion transporter CorA-like (313—420) and MRS2/LEP10 (27—420) conserved domain. *DoMGT1* was highly similar (46%—63%) to MGTs genes from various plants. The deduced *DoMGT1* protein was closely related to rice OsMGTD, OsMGTE, and OsMGTF proteins, and belonged to one clade of plant MGTs gene together with AtMGT4. *DoMGT1* transcripts were constitutively expressed in leaves, stems, and roots of *D. officinale*. The transcription level of *DoMGT1* in leaves was the highest (3.46 fold higher than that of roots), followed by that of stems (1.54 fold). **Conclusion** The full-length *DoMGT1* gene has been successfully cloned. The high expression level of *DoMGT1* in *D. officinale* leaves suggests that the gene might play a vital regulatory role in the leaves.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; magnesiumion transporter; gene cloning; sequence analysis; real time quantitative PCR

收稿日期: 2014-07-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070300, 31101608); 陕西省青年科技新星项目(2012KJXX-44); 陕西省教育厅科研专项(2013JK0829)

*通信作者 郭顺星, 男, 博士, 研究员, 主要从事药用植物菌根生物学研究。Tel/Fax: (010)62829619 E-mail: sxguo1986@163.com

镁离子 (Mg^{2+}) 是高等植物必需的矿质元素之一, 也是植物细胞中最为丰富的二价阳离子, 在植物生长发育中发挥极其重要的作用^[1]。研究表明, Mg^{2+} 可作为多种酶的激活剂参与植物多种生理生化代谢途径, 在维持细胞渗透势、质膜和核酸稳定性, 调节核糖体合成、光合作用和逆境胁迫, 以及调控有机物在韧皮部装载等过程起关键作用^[1-2]。因此, Mg^{2+} 在胞内外的转运特性是影响生物学功能的重要载体。目前, 在细菌、真菌、动物以及高等植物中, 共发现 5 大类镁离子转运蛋白 (magnesium ion transporter, MGT) 家族: CorA 家族、 Mg^{2+}/H^{+} 交换体、离子通道、P 型磷酸酶和 MgtE 基因家族^[3-4]。其中, CorA 家族是所有生物体普遍存在的一类主要镁离子转运蛋白家族。该类蛋白 N 端具有一较大的酸性周质区, C 端有两个疏水跨膜域, 近 C 端存在高度保守的 Mg^{2+} 转运所必需的 GMN (Gly-Met-Asn) 基序^[4]。晶体结构显示 CorA 家族镁离子转运体是漏斗状的同源五聚体, 且每个单体含有 2 个跨膜区^[5], 有利于 Mg^{2+} 的识别与转运。

高等植物镁离子转运蛋白包含 Mg^{2+}/H^{+} 交换体和 CorA 家族两大类。AtMHX 是早期鉴定的定位于液泡膜上的 Mg^{2+}/H^{+} 交换体基因^[6]。Li 等^[7] 早期利用功能克隆技术从拟南芥中鉴定了首个 CorA 家族镁离子转运蛋白新成员 AtMGT1。现在已报道拟南芥和水稻分别有 10 和 9 个 MGTs 基因, 苜蓿、大豆等其他植物也存在大量 MGTs 基因^[8-9]。AtMGTs 研究较为清楚, 依据基因结构及进化关系可划分为 5 个类群^[9], 编码蛋白定位于质膜、线粒体、叶绿体以及液泡膜等不同细胞器上^[10], 通过调节叶绿素代谢^[11]、控制花粉发育^[12]、纠正 RNA 自我剪接^[13]、抗铝离子^[14-15]及镉离子^[16]毒害等多种途径参与对高等植物生长发育的重要调控。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 药用部位为新鲜或干燥茎, 具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳、明目强身等功效^[17]。现代药理学研究表明, 铁皮石斛的多糖、生物碱、氨基酸等成分具有提高免疫功能、抗氧化、抑制肿瘤和降低血糖等功效^[18]。为解析兰科菌根互作的分子机制, 课题组前期利用 SSH 技术富集真菌侵染铁皮石斛根的差异表达基因^[19], 分离得到一条 558 bp 的 EST, BLASTx 分析显示其与水稻 MRS2-F

(GenBank 注册号 Q8L4S2) 相似性较高 (67%)。鉴于 MGTs 基因在植物细胞生理代谢中的重要作用, 该差异基因可能在铁皮石斛生长发育中起作用。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术从铁皮石斛分离到一个 MGT 基因 cDNA 全长 DoMGT1, 并进行生物信息学及表达模式分析, 为进一步研究其生物学功能提供理论依据。

1 材料

样品采自云南西双版纳, 经笔者鉴定为野生铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, 取根、茎、叶投入液氮中速冻后置 -80 °C 保存备用。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 中国) 操作说明提取总 RNA, NanoDropTM 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 测定 RNA 质量和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。使用 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, 美国) 将 RNA 反转录合成 cDNA 的第一链, -20 °C 保存备用。

2.2 5'-RACE 与 RT-PCR 验证

根据原 EST 序列, 设计 2 条基因特异引物, 按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 说明书进行 2 次巢式 5'-RACE。5'-RACE 引物为 DoMGT1-R1 (5'-GCCTCCT-ACGGTTCATAGGTGGTTTC-3') 和 DoMGT1-R2 (5'-TGTGAGGACAAGAGTTGCCATGCTG-3')。DoMGT1-R1 与 UPM 引物组合, 试剂盒中 Program 1 程序进行第一轮 5'-RACE。反应体系为 2.0 μ L 10 $\times$ Advantage[®] 2 PCR 缓冲液, 0.4 μ L 10 mmol/L dNTPs, 0.4 μ L 10 μ mol/L DoMGT1-R1/UPM, 0.5 μ L 5'-RACE ready cDNA, 0.4 μ L 5 U/ μ L 50 $\times$ Advantage[®] 2 Polymerase Mix, 补 ddH₂O 至 20 μ L。反应结束后, 取 1.0 μ L 产物作为模板, 以 DoMGT1-R1 与 UPM 引物组合, 进行第 2 轮巢式 5'-RACE。PCR 程序为 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1 min 32 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保温。PCR 产物经电泳分析, 回收目的条带、克隆并测序, 与原序列拼接分析后, 设计跨 ORF 引物 ORF-F (5'-TAGCGGAATTCAAGATGCGGTCG-3') 和 ORF-R (5'-CTGCTAGCAGGGGTTTAAATAAGC3'), 进行全长基因的 RT-PCR 验证。PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带、克隆

并测序。

2.3 序列分析

使用一系列网络在线工具进行 *DoMGT1* 基因核酸及编码蛋白的生物信息学序列分析。利用 NCBI 的 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 cDNA 序列; 用 ExPASy Proteomics Server 的 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>) 和 PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html) 分析 *DoMGT1* 蛋白质的结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 利用 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行分泌蛋白预测; 用 TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测蛋白跨膜域。PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 进行蛋白质亚细胞定位分析。用 DNASTAR 6.0 和 MEGA 4.0 分别进行 *DoMGT1* 蛋白的氨基酸序列比对和进化树构建。

2.4 实时定量 PCR 分析

分别用 2 μ g 根、茎、叶样品总 RNA 反转录成 cDNA, *Efla* 作为内参基因^[19], qRT-PCR 分析 *DoMGT1* 基因的组织表达模式。引物为 *DoMGT1*-qRT-PCR-F (5'-TAT CATACCCATCCAC-CATCCT-3') 和 *DoMGT1*-qRT-PCR-R (5'-ATTGATTTCATAACTTG GGACAGC-3') 的扩增产物长 247 bp。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行扩增。反应体系 25 μ L 包括 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Master Mix (Takara, 中国) 12.5 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ROX 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 9 μ L。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环, 反应结束绘制熔解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件 (Applied Biosystems, 美国) 生成的循环阈值 (Cycle threshold, C_t), 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[21]计算相对表达量。

3 结果与分析

3.1 *DoMGT1* 基因的克隆和全长验证

经过两轮 5'-RACE 反应, 克隆、测序获得 1 310 bp 的序列, 与原序列拼接得到 1 条 1 625 bp 的

cDNA。BLASTx 分析表明其与 GenBank 中已注册的多种植物 *MGTs* 基因有较高的相似性 (46%~63%), 定名为 *DoMGT1*, 提交 GenBank 获得注册号 KJ995532。*DoMGT1* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长 1 278 bp, 5'-UTR 长 93 bp, 3'-UTR 长 234 bp, 含有真核生物特有的 ployA 尾巴结构; 起始密码子附近碱基序列 GCAATGG 遵循 KOZAK 规则, 即 A/GNNATGG^[22]。用 *DoMGT1*-ORF-F/R 引物进行 PCR 扩增, 获得长 1 400 bp 的单一一条带 (图 1), 克隆、测序分析显示其含有完整的 ORF, 与拼接序列一致, 说明已成功获得 *DoMGT1* 基因的全长 cDNA。

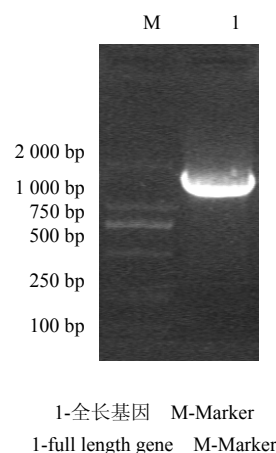


图 1 铁皮石斛 *DoMGT1* 基因全长 cDNA 克隆
Fig. 1 Clone of the full length cDNA of *DoMGT1* gene in *D. officinale*

3.2 *DoMGT1* 基因编码的蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 *DoMGT1* 基因编码的蛋白质分子式为 C₂₀₈₆H₃₃₅₈N₅₆₂O₆₅₇S₁₈, 包含 425 个氨基酸残基, 等电点 4.79, 相对分子质量为 47 400; *DoMGT1* 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 41, 负电残基 (Asp+Glu) 为 62。该蛋白不稳定系数为 44.76, 脂肪系数为 98.40, 亲水性系数为 -0.168。SOPMA 分析表明, *DoMGT1* 蛋白二级结构主要由 α 螺旋 (52.24%)、随机卷曲 (36%)、少量的延伸链 (8.24%) 和 β 转角 (3.53%) 组成。

3.3 *DoMGT1* 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

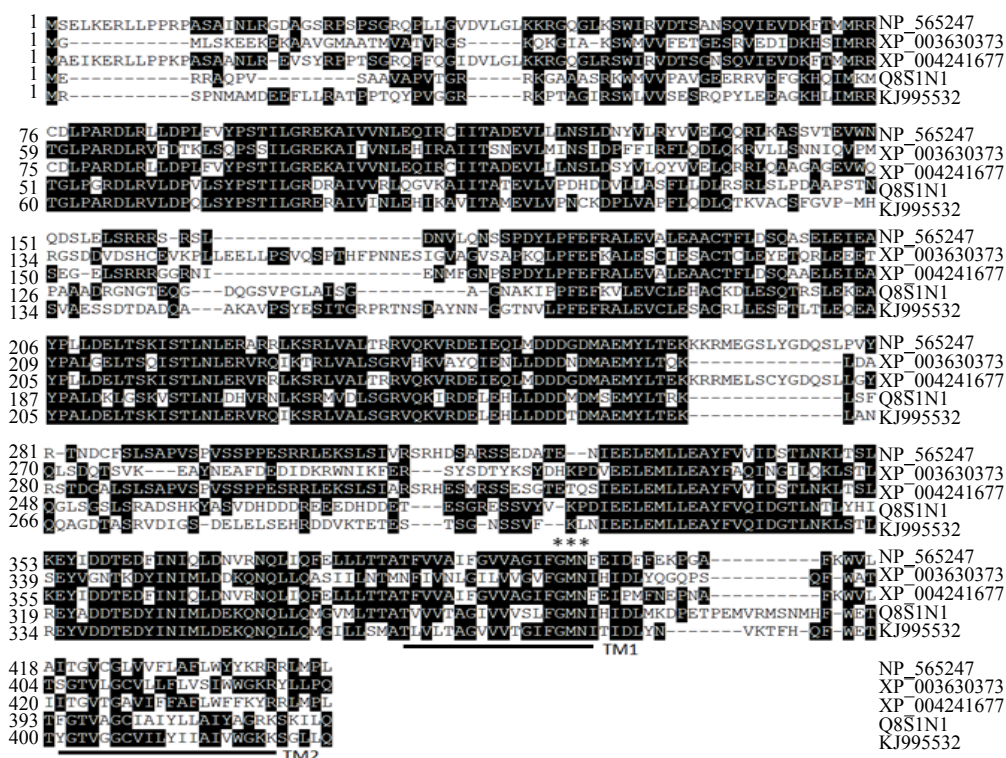
InterProscan 分析结果显示, *DoMGT1* 蛋白含有 CorA 家族镁离子转运蛋白保守结构域 (第 313~420 位氨基酸) 以及 MRS2/LPE10 保守域 (27~420), 具备已报道植物 *MGT* 的典型结构特征。PROSITE SCAN 分析表明, *DoMGT1* 蛋白含有数目不等的基

元, 包括 2 个糖基化位点 (301~304、382~385)、1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点 (28~31)、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (157~159、212~214、234~236、260~262、332~334)、8 个酪蛋白激酶 II (99~102、134~137、139~142、141~144、162~165、273~276、293~296、332~335)、4 个 *N*-豆蔻酰化位点 (359~364、372~377、380~385、402~407)、2 个酰胺化位点 (25~28、417~420)、1 个亮氨酸拉链 (348~369) 等。SignalP 4.0 分析 DoMGT1 不含信号肽, TMpred 分析蛋白 C 末端具有 2 个跨膜结构 (366~383、401~420), 符合 CorA 家

族镁离子转运蛋白跨膜域特征。PSORT 预测 DoMGT1 蛋白定位在质膜上的可能性最高为 60%, 定位于高尔基体、内质网、微体的可能性分别为 40%、30%、30%。

3.4 DoMGT1 与氨基酸序列比对和系统进化分析

运用 DNASTAR 6.0 中的 MegAlign 程序对 DoMGT1 蛋白和 4 种代表性植物的 MGTs 基因编码蛋白进行多序列比对分析 (图 2)。结果显示, DoMGT1 与水稻 *Oryza sativa* Linn. OsMGTE 蛋白 (Q8S1N1)、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. (XP_003630373)、番茄 *Solanum lycopersicum* Mill. (XP_004241677) 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana*



TM1 和 TM2 为 2 个跨膜域 ***为 Mg^{2+} 所必须的基序 GMN

TM1 and TM2 are two transmembrane domains *** indicates GMN motif indispensable for Mg^{2+} transport

图 2 DoMGT1 与植物 MGTs 蛋白的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of DoMGT1 and MGTs proteins from other plants

(Linn.) Heynh. AtMGT1 (NP_565247) 一致性分别为 52%、48%、48%、43.5%。DoMGT1 蛋白近 C 末端含有 GMTs 蛋白保守的 GMN 基序, 是镁离子转运所必需的元件^[4]。

为分析 DoMGT1 基因的进化关系, 从 GenBank 数据库中选取自真菌、高等动物和高等植物中具有代表性的 10 个物种的 34 条 MGTs 蛋白序列, 利用 MEGA 4.0 构建 DoMGT1 蛋白的系统进化树。图 3 结果表明, 不同物种 MGTs 基因的编码蛋白聚成

真菌、动物、植物 3 大类群; DoMGT1 与 OsMGTD、OsMGTE、OsMGTF 聚在一起, 共同与 AtMGT4 构成植物 MGTs 一大类群。

3.5 基因表达模式分析

分别提取铁皮石斛根、茎、叶等样品总 RNA, 利用 qPCR 技术检测 DoMGT1 基因的组织表达模式。图 4 结果表明, DoMGT1 基因为组成型表达, 相对表达量有明显差异。DoMGT1 基因在叶中表达量较高, 为根中的 3.46 倍, 茎中次之 (1.54 倍)。

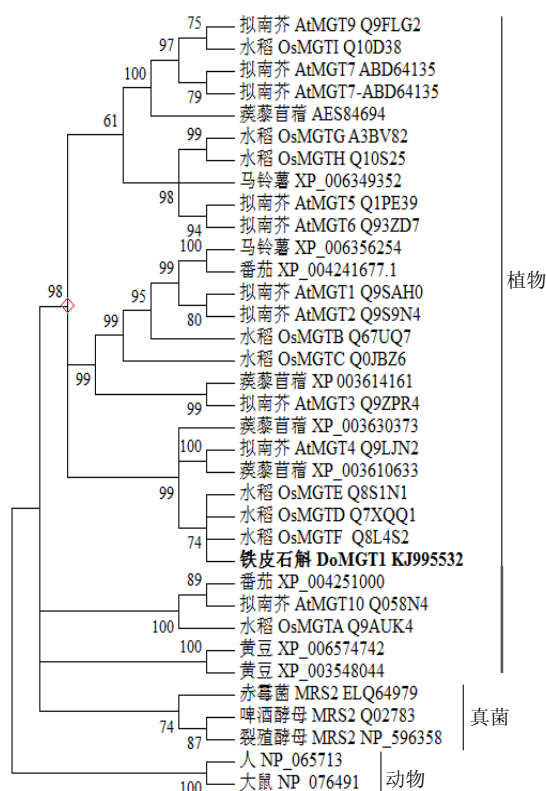


图3 *DoMGT1* 基因编码蛋白的分子进化树

Fig. 3 A Phylogenetic tree of deduced *DoMGT1* protein

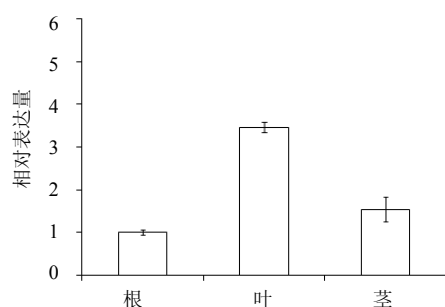


图4 利用 qPCR 分析 *DoMGT1* 基因的组织表达模式

Fig. 4 Tissue-specific expression pattern of *DoMGT1* gene using qPCR analysis

4 讨论

镁离子转运蛋白在植物吸收、转运及维持体内镁离子稳态方面有极其重要的作用^[2]。对拟南芥、水稻等模式植物研究表明, MGTs 家族基因成员间协同作用参与调控植物多种生命活动过程^[8-9,15]。然而, 镁离子运输、分配的分子机制尚不清楚, 药用植物的相关研究鲜有报道。本研究利用 RACE 技术首次从珍稀濒危兰科药用铁皮石斛中分离到一个镁离子转运蛋白基因 cDNA 全长 *DoMGT1*, 起始密码

子附近序列遵循 KOZAK 规则^[22]; 该基因的编码蛋白含有 CorA 家族和 MRS2/LPE10 蛋白的保守结构域。推定的 *DoMGT1* 蛋白近 C 末端存在典型的 GMN 基序, 对蛋白转运 Mg^{2+} 是不可或缺的功能元件^[4]; 同时还包含 2 个跨膜区, 印证 PSORT 关于该蛋白膜定位的预测, 这些序列特征与已报道植物 MGTs 蛋白一致^[6-9,12-13]。系统进化分析显示 *DoMGT1* 与单子叶植物水稻亲缘关系最近。鉴于植物 MGTs 的多基因家族特性, 而兰科是单子叶植物中最进化的类群, 结合 *DoMGT1* 基因的生物信息学分析结果, 说明 *DoMGT1* 系铁皮石斛镁离子转运蛋白基因家族的一个成员。

植物 MGTs 基因不仅具有组织表达特异性, 而且受镉离子、铝离子、低钙或高镁等胁迫因子诱导^[2,14-15]。拟南芥的 10 个 MGTs 基因在角果、花、根、茎和叶等器官中有不同的表达模式, *AtMGT5* 基因仅在花和幼嫩角果特异表达, *AtNGT8* 转录本无法在茎中检测到, 其余基因为组成型表达, 相对表达量有差异, 说明它们通过不同的作用模式参与调控植物生理代谢^[7]。如 *AtMGT10* 基因在幼嫩的植株叶片或成熟植株的微管组织中表达, 介导叶绿体镁离子的转运而影响叶绿素的代谢^[10]。水稻的 9 个 MGTs 基因在未展开的黄绿叶片中低表达, 随着叶片成熟表达量增加^[8]。尽管水稻和拟南芥 MGTs 基因的表达模式差异较大, 但该蛋白家族所有成员均能转运镁离子参与植物的生长发育^[8,15]。本研究 qPCR 分析表明, *DoMGT1* 基因为组成型表达, 相对表达量有显著性差异, 依次为叶>茎>根, 说明该基因通过特异的分子表达机制参与植物不同组织的生长发育。*DoMGT1* 基因在石斛叶中的高表达特征, 暗示其可能与石斛叶中镁离子转运密切相关, 而该基因具体参与的生理过程和调控机制值得深入分析。

目前, 植物体镁离子的转运机制研究只是冰山一角, 不同植物镁离子转运蛋白家族特性、表达规律和生物学功能等尚无系统研究。镁离子如何被根部吸收、在木质部怎样运输以及在库器官中的卸载和分配等分子机制都不清楚。因此, 解析植物 MGTs 作用机制尚需大量细致的研究工作。开展药用植物 MGTs 基因克隆与功能分析, 将为解析药用植物生理适应机制乃至品质的遗传改良打下基础。本研究的后续工作需要进一步鉴定铁皮石斛 *DoMGT1* 和 MGTs 基因家族其他成员的生物学功能, 为珍稀濒危铁皮石斛遗传调控研究和品质改良提供理论依据。

参考文献

- [1] Shaul O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg [J]. *Bio metals*, 2002, 15: 309-323.
- [2] Waters B M. Moving magnesium in plant cells [J]. *New Phytologist*, 2011, 190: 510-513.
- [3] 郭照辉, 张德元, 毛丹丹, 等. 植物 Mg^{2+} 转运蛋白与相关基因及其功能的研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2008, 12(3): 207-210.
- [4] 丛悦玺, 骆东峰, 陈坤明, 等. 生物镁离子转运体研究进展 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(7): 837-848.
- [5] Lunin V V, Dobrovetsky E, Khutoreskaya G, *et al.* Crystal structure of the CorA Mg^{2+} transporter [J]. *Nature*, 2006, 440(7085): 833-837.
- [6] Shaul O, Hilgemann D W, de-Almeida-Engler J, *et al.* Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^{+} exchanger [J]. *EMBO J*, 1999, 18: 3973-3980.
- [7] Li L, Tutone A F, Drummond R S M, *et al.* A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2761-2775.
- [8] Saito T, Kobayashi N I, Tanoi K, *et al.* Expression and functional analysis of the CorA-MRS2-ALR-type magnesium transporter family in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(10): 1673-1683.
- [9] Gebert M, Meschenmoser K, Svidová S, *et al.* A root-expressed magnesium transporter of the MRS2/MGT gene family in *Arabidopsis thaliana* allows for growth in low- Mg^{2+} environments [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(12): 4018-4030.
- [10] Gardner R C. Genes for magnesium transport [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 263-267.
- [11] Drummond R S M, Tutone A, Li Y C, *et al.* A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system [J]. *Plant Sci*, 2006, 170(1): 78-89.
- [12] Jian C, Le G L, Zhen H L, *et al.* Magnesium transporter AtMGT9 is essential for pollen development in *Arabidopsis* [J]. *Cell Res*, 2009, 19: 887-898.
- [13] Mao D D, Tian L F, Li L G, *et al.* AtMGT7: an *Arabidopsis* gene encoding a low-affinity magnesium transporter [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50: 1530-1538.
- [14] Wei D, Keming L, Demou L, *et al.* Overexpression of an *Arabidopsis* magnesium transport gene, AtMGT1, in *Nicotiana benthamiana* confers Al tolerance [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(15): 4235-4243.
- [15] Chen Z C, Yamaji N, Motoyama R, *et al.* Up-regulation of a magnesium transporter gene OsMGT1 is required for conferring aluminum tolerance in rice [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159: 1624-1633.
- [16] Hermans C, Chen J, Coppens F, *et al.* Low magnesium status in plants enhances tolerance to cadmium exposure [J]. *New Phytologist*, 2011, 192: 428-436.
- [17] 张 岗, 胡本祥, 张大为, 等. 铁皮石斛咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶基因的分离与表达分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1143-1149.
- [18] 陈晓梅, 王春兰, 杨俊山, 等. 铁皮石斛化学成分及其分析的研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(19): 1634-1640.
- [19] 李 标, 唐 坤, 张 岗, 等. 菌根真菌诱导的铁皮石斛根差减 cDNA 文库构建 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(22): 1790-1795.
- [20] Zhang G, Song C, Zhao M M, *et al.* Characterization of an A-type cyclin-dependent kinase gene from *Dendrobium candidum* [J]. *Biologia*, 2012, 67(2): 360-368.
- [21] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29: e45.
- [22] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucl Acids Res*, 1987, 15: 8125-8132.