

研究报告

Research Report

杜鹃花类菌根真菌硝态氮代谢 SSH 文库构建及分析

孙秋玲^{1,2}, 张春英¹, 戴思兰²

1. 上海市园林科学研究所, 上海, 200232

2. 北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京, 100083

✉ 通讯作者: mayzhang55@163.com; silandai@sina.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 52 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0052

收稿日期: 2012 年 09 月 03 日

接受日期: 2012 年 10 月 19 日

发表日期: 2012 年 12 月 01 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

孙秋玲等, 2012, 杜鹃花类菌根真菌硝态氮代谢 SSH 文库构建及分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.52 pp.1383-1389 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0052)

引用格式(英文):

Sun et al., 2012, Construction and Analysis of SSH cDNA Library of Ericoid Mycorrhizae Fungus Under Nitrate Induction, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.52 pp.1383-1389 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0052)

摘要 本研究选取铵态氮下生长及硝态氮诱导的杜鹃花类菌根真菌为材料, 利用抑制性差减杂交技术成功构建了硝态氮诱导下杜鹃花类菌根真菌的正向差减 cDNA 文库。挑取 300 个阳性克隆进行测序, 获得 223 条单一序列。经 Blast 分析, 其中 92 条序列为功能已知序列, 53 条序列为未知功能序列, 23 条序列能够找到相似性较高基因; 55 条序列未找到匹配基因。功能已知基因涉及能量代谢、物质合成与代谢、抗性、物质转运、信号转导等代谢活动。其中发现了硝酸盐转运蛋白、硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、氨基酸转运蛋白、磷酸转移酶等硝酸盐代谢相关基因, 为进一步研究 ERM 真菌硝态氮代谢提供了分子基础。

关键词 杜鹃花类菌根真菌; 硝态氮; 抑制性差减杂交

Construction and Analysis of SSH cDNA Library of Ericoid Mycorrhizae Fungus Under Nitrate Induction

Sun Qiuling^{1,2}, Zhang Chunying¹, Dai Silan²

1. Shanghai Landscape and Gardening Research Institute, Shanghai, 200232, P.R. China;

2. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing, 100083, P.R. China

✉ Corresponding author, mayzhang55@163.com; silandai@sina.com; ✉ Authors

Abstract The ericoid mycorrhizal fungi cultivated in the ammonium and induced by nitrate as experimental material, this study constructed a forward subtractive cDNA library to study the nitrate-induced genes in ericoid mycorrhizal fungi by suppression subtractive hybridization. We randomly picked 300 clones for sequencing, eventually won 223 single sequences. Similarity search by BLAST indicated that 92 uniESTs should be known function sequences, whereas 53 uniESTs might be unknown proteins and putative proteins, which were unmatched sequences, while the remaining 23 sequences were highly matched. The known function genes primarily involves in energy metabolism, material synthesis and metabolism, biological resistance, membrane transfer, and signal transduction and so on, and some genes related to nitrate metabolism were found, such as nitrite reductase, nitrate transporter, nitrite reductase, and amino acid permease and so on, These genes may provide a basis for further studies on nitrate metabolism of ericoid mycorrhizae fungus.

Keywords Ericoid mycorrhizal fungi; Nitrate; Suppression subtractive hybridization

研究背景

氮作为植物的生命元素, 不仅是生物有机体的组成成分, 还参与酶及叶绿素的合成, 植物的生长和产量完全依赖于土壤中的氮含量, 尤其是硝态氮、铵态氮等有效氮含量(Gobert and Plassard, 2008)。增强植物对于氮素的利用能力和效率, 对于植物生长和整个生态系统的稳定性有重要的意义。

大多数杜鹃花科植物自然生境土壤为酸性土, 通常认为在 PH 低于 5.5 的土壤中硝化作用几乎是可以忽略不计的(Paul and Clark, 1989), 酸性土壤中硝态氮不可利用(Kosola and Workmaster, 2007)。而 1919-1971 年间所发表的有关杜鹃花科重要植物蓝莓(*Vaccinium macrocarpon*)的研究论文均认为: 当施以硝态氮时, 蓝莓的生长量比无氮源条件下大, 甚

至有试验发现蓝莓在以硝态氮为氮源的基质中生长量大于以铵盐为氮源的生长量(Kender and Childers, 1959)。由于蓝莓根系自然状态下均能形成杜鹃花类菌根(ericoid mycorrhizas, ERM), Read (1996)推测菌根可能增强了寄主植物利用硝态氮的能力(Read, 1996)。此后, 经过 ERM 真菌纯培养以及接种蓝莓(Kosola and Workmaster, 2007)、云锦杜鹃(*Rhododendron fortunei* L.) (尹丽娟等, 2010)试验进一步证明 ERM 真菌具有吸收利用硝态氮的能力。但研究者未曾就 ERM 真菌吸收硝态氮的机制进行深入研究。

抑制性差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)自 1996 年由 Diatchnoko 等发明以来, 由于其具备特异性高、假阳性率低, 对低丰度基因有较好的分离效果等优点, 被广泛用于分离各类生物体的差异表达基因, 这些基因主要涉及生命活动包括胚胎发育成花等机体发育(黄鑫, 2008; 侯雪丽, 2009)、形态建成(王永胜等, 2001; 张雷等, 2002, 自然科学进展, 12(3): 261-265)、生物与非生物胁迫(申贵, 2005)等。

本研究以 ERM 真菌中最为普遍的一类真菌为试验材料, 利用抑制性差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)首次构建了 ERM 真菌硝态氮诱导下的 cDNA 文库, 以期从中得到 ERM 真菌硝态氮代谢相关的基因序列, 为揭示 ERM 硝态氮代谢机理提供参考资料。

1 结果分析

1.1 总 RNA 质量检测及 mRNA 的分离纯化

提取的总 RNA 28S 和 18S 带型清晰, 与 EB 结合量比值接近 2:1, 且两条带之间未出现弥散现象, 几乎没有 DNA 污染(图 1)。对照和处理组总 RNA OD_{260}/OD_{280} 分别为 1.900 和 1.860, 介于 1.7~2.0 之间(表 1), 说明所提 RNA 样品受多糖、蛋白质等物质污染程度较小, 质量较好, 纯度高。分离的 mRNA 在琼脂糖凝胶上呈均匀的弥散状(图 2), 说明采用 Promega 公司的 PolyA Tract Systems III (9Z5300)纯化出的 mRNA 具有较好的完整性, 未被降解, 可用于后续文库构建。

1.2 SSH 文库构建效果检测

1.2.1 *Rsa* I 酶切效率分析

取处理组和对照组 mRNA 各 2 μ g, 反转录成双链 cDNA 后, 经 *Rsa* I 酶切, 并用 2% 琼脂糖/EB 胶电泳检测酶切效率(图 3), 处理组和对照组的完整

M 1 2 3 4 CK CK CK CK

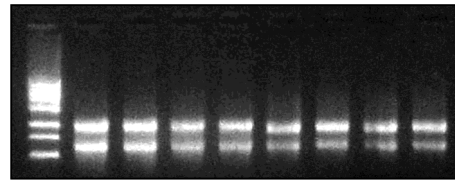


图 1 总 RNA 电泳图

注: CK 及 1, 2, 3, 4 分别为四个取材时间的对照和处理样品 RNA; M: DL2000 maker

Figure 1 The agarose gel electrophoresises of total RNA

Note: CK and 1, 2, 3, 4 are the agarose gel electrophoresises of total RNA from control and treated samples taken at four different times; DL2000 maker

M D T

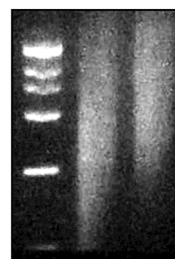


图 2 mRNA 电泳图

注: D: 对照; T: 处理; M: DL2000 marker

Figure 2 The agarose gel electrophoresises of mRNA

Note: D: Control; T: Treated; M: DL2000 marker

cDNA 从 100 bp 到点样孔成弥散状分布, 主要集中在 150~2 000 bp 以上, 酶切后 cDNA 较酶切前分布范围明显下移, 亮度主要集中在 200~700 bp 之间, 说明酶切效果较好, 可用于后续接头的连接和差减杂交。

1.2.2 抑制性差减杂交(SSH)后二次 PCR 产物分析

差减片段经两轮 PCR 扩增后, 二次 PCR 产物电泳结果(图 4)显示, 差异片段得到了有效富集, 扩增 cDNA 片段成弥散状分布, 未见明显特异性条带, 说明抑制性差减杂交和 PCR 扩增效果较好。

1.2.3 文库插入片段的大小检测

随机挑选 46 个克隆进行 PCR 扩增, 检测所构建文库中插入片段的大小, 结果如图 5 所示: 插入片段最小为 200 bp, 最大为 1 000 bp, 大部分集中在 400 bp 左右。表明连接、转化效果较好, 片段大小符合文库构建质量要求。

1.2.4 cDNA 文库中 ESTs 序列及功能分析

300 个阳性克隆测序完成后, 共有 270 个克隆

表 1 总 RNA 紫外分光光度计检测值

Table1 Detection of total RNA quality by UV spectrophotometer

样品 Sample	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度(μg/μL) Concentration (μg/μL)
对照 CK	0.351	0.185	1.900	1.404
处理 Treatment	0.346	0.186	1.860	1.384

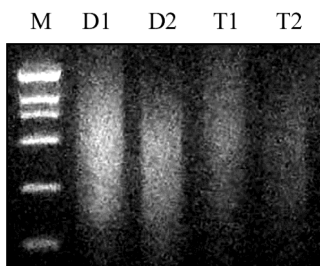


图 3 酶切效率电泳图

注: D1 与 D2 分别为酶切前后的对照, T1 与 T2 分别为酶切前后的处理; M: DL2000 marker

Figure 3 The efficiency s of mRNA digestion

Note: D1 and D2 are the Double strand cDNA of control samples before and after digestion respectively; T1 and T2 are the Double strand cDNA of treated samples before and after digestion respectively; M: DL2000 marker

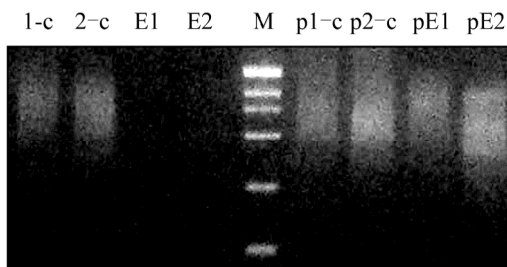


图 4 二次 PCR 产物电泳图

注: E1: 差减第一次 PCR 产物, 1-c: 未差减第一次 PCR 产物, pE1: 正向差减第二次 PCR 产物; p1-c: 正向未差减第二次 PCR 产物; M: DL2000 marker

Figure 4 Analysis of the second PCR product after SSH

Note: E1: first PCR product of forward subtracted cDNA; 1-c: First PCR product of forward unsubtra-cted cDNA; pE1: Second PCR product of forward subtracted cDNA; p1-c: econd PCR product of forward unsubtracted cDNA; M: DL2000 marker

测序成功, 去除低质量序列、小于 100 bp 序列以及冗余序列后, 得到 223 条单一序列。序列最短为 181 bp, 最长 1 007 bp, 平均 509 bp, 绝大多数都集中在 300~600 bp 之间, 与 PCR 检测结果相一致。

经 Blast 分析, 发现 223 条序列中 92 条为功能已知序列, 53 条为未知功能序列, 分别占全部基因

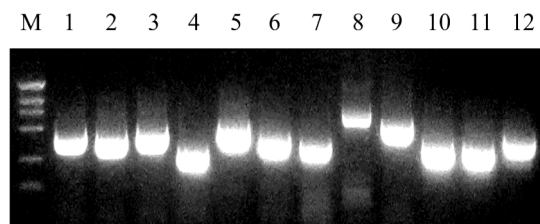


图 5 差减 cDNA 文库部分克隆的 PCR 检测

注: M: DL2000 marker

Figure 5 The PCR detection of parts of cDNA reduction library cloning

Note: M: DL2000 marker

的 41.26% 和 23.77%。23 条序列能够找到相似性较高基因; 55 条序列未找到匹配基因, 占到全部基因的 24.66%。为进一步了解文库中 ESTs 所涉及的生命活动, 结合本试验的研究目的, 将所得全部 ESTs 具体分为八类, 包括能量代谢、物质合成与代谢、抗性、物质转运、细胞结构、信号转导、其他功能、未知功能。按照基因在所得文库中所占的比例, 绘制饼状图(图 6)。未知功能基因所占比例最大, 占到了全部基因的 47%; 物质合成代谢相关 ESTSS 在功能已知基因序列中所占比例最大为 12%, 其中包含与硝态氮代谢相关基因有硝酸还原酶、亚硝酸还

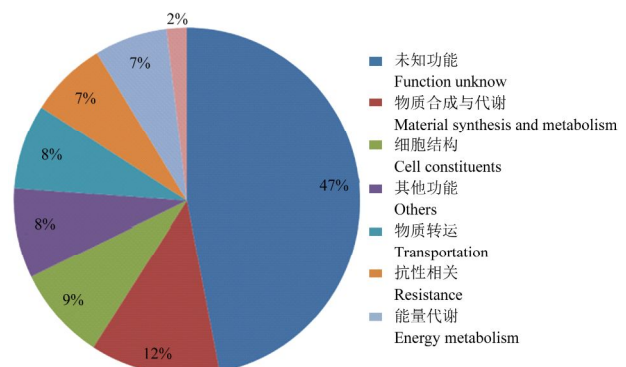


图 6 硝态氮诱导下 ERM 真菌差异表达基因功能分类图

Figure 6 Pie chart of molecular functional groups of differential expressed gene in the subtractive cDNA library

原酶基因、氨基酸合成酶等,除此还涉及到基因的转录和蛋白质的合成等生命活动;细胞结构基因所占比例仅次于物质代谢基因,其中包含 60s 核糖体蛋白、组蛋白、核仁蛋白、染色体、GPI 锚定蛋白等;物质转运相关基因所占比例 8%,其中包含多种物质的转运蛋白,如:硝态氮转运蛋白(NRT)、K 离子通道、氨基酸转移酶、磷酸转运酶以及 MFS 单糖转运蛋白等;能量代谢相关基因占到了全部基因的 7%,其中包含丙酮酸脱羧酶、糖原合成酶、异柠檬酸裂合酶、GTP 环水解酶、糖基转移酶、ATP 伴侣蛋白等;其它还有抗性相关基因包含一些热激蛋白、细胞色素 C 氧化酶、以及泛素代谢相关基因等。表 2 显示的是部分所得片段的 Blast 结果。

2 讨论

抑制性差减杂交理论上只适用于两个样本间的差异比较分析,而且要求样本间差异不可过大或过小。本试验中,ERM 真菌菌株 19 在初始浓度为 3.8 mmol/L 的 MMN 培养液中已生长 15 d,其生长所产生的次级代谢物势必导致培养液成分的变化,且氮源终浓度不确定,为了避免硝态氮诱导培养液与对照培养液成分差距过大,保证两种培养液的差别在可控制范围内,本试验在菌株培养结束时,先将菌丝转入新鲜铵态氮培养液重新培养 24 h,之后收集一部分菌丝作为对照,另一部分转入硝态氮培养液中培养作为试验方,最终成功获得了硝态氮代谢相关基因,说明该处理方法比较合理。

从所建文库中,我们共获得 3 条硝态氮转运蛋白基因、一条硝酸还原酶基因和一条亚硝酸还原酶基因,同时还得到 3 条氨基酸转运蛋白基因以及其它与物质合成代谢相关的基因序列。其中硝酸盐转运蛋白负责将外界硝酸盐转运至生物体内,这是生物体硝酸盐利用的第一步。植物体内的硝酸盐转运蛋白通常以多个成员组成的多基因家族的形式存在,依据生理特性不同,被划分为高亲和性转运系统(high-affinity transport systems, HATS)和低亲和性转运系统(low-affinity transport systems, LATS),当外界硝酸盐浓度较高时(>1 mmol),低亲和性转运系统起作用,当浓度较低时(<250 μ mol),高亲和性转运系统起作用。本试验氮浓度设为 100 μ m/L,硝酸盐转运蛋白基因共出现 6 次,说明此低浓度氮素条件下该基因的表达量很高,推测次 ERM 真菌的 NRT 属于高亲和转运系统家族成员之一,这仍需要生理

和分子试验证据证明。由于硝酸盐中的氮为高度氧化态氮,在参与合成体内多数还原态氮化合物之前,必须先被还原为还原态的氨,而硝酸还原酶和亚硝酸还原酶是该过程中的关键酶和限速酶,硝酸还原酶负责将硝酸盐还原为亚硝酸,亚硝酸经亚硝酸还原酶再还原为铵盐。菌根真菌中还原为铵盐之前的代谢过程很少被研究,但最近几年也引起了研究者的注意,主要围绕的是外生菌根真菌中上述基因的表达进行,证明了该类基因与植物基因不同,它不仅受硝酸盐的诱导,无氮条件下其依然上调表达(Jargeat et al., 2003; Guescini et al., 2007),ERM 真菌中该类基因的表达模式与此是否相同还需进行进一步的试验验证。铵盐后续代谢在 AM 菌根中的研究比较深入,外生菌根真菌也有涉及,已被证实 AM 菌根真菌中铵盐的后续代谢是一系列酶促反应的过程,其中涉及到多种氨基酸的合成和转运(Govindarajulu et al., 2005; Montanini et al., 2006),本研究中氨基酸转运蛋白共出现 4 次,共获得 3 条不同 ESTs 序列;精氨酸是 AM 真菌氮素代谢的关键中间产物,是氮素从根外菌丝进入根内菌丝的主要氮素形态,而精氨酸很可能是与多聚磷酸盐一起转运完成氮素从根外菌丝转至根内菌丝的过程(Guescini et al., 2007; Cruz et al., 2007),本研究中也获得两条磷酸转移酶的 EST 序列,这些都说明 ERM 真菌可能存在与 AM 菌根真菌同样的精氨酸转运模式。研究中获得了很多未知基因,已知基因也大多数没有明确的功能注释,ERM 真菌利用硝态氮的代谢途径还远未揭示,有待进一步研究。今后将针对筛选出的重要差异表达基因采用实时定量 PCR 和 Northern 法进一步进行验证,并进行全长基因的克隆及其表达和功能分析,逐步揭示 ERM 真菌硝态氮利用的机制,最终服务于植物菌根技术的应用。

3 材料与方法

3.1 材料

试验选取在硝态氮培养基上生长良好的 ERM 真菌“菌株 19”作为试验材料。该菌株为子囊菌门(Ascomycota)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)、粘毛菌科(Myxotrichaceae)、树粉孢属(Oidiodendron)真菌菌株,分离自浙江华顶山采集的云锦杜鹃根系。

试验所用生化试剂均为国产分析纯,购自国药集团;常用分子生物学试剂均购于鼎国昌盛生物技术有限公司;PolyA Tract Systems III (Z5300)购于

表 2 部分插入片段与 Genbank 中已知基因的相似性比较结果

Table2 The similarity of parts of fragments with the function identified genes in GenBank

EST 编号 EST No.	长度(bp) Length (bp)	同源基因 Homologous gene	物种 Organism	相似度 Identities	期望值 E-value
1	709	氨基转移酶 branched-chain-amino-acid aminotransferase	核盘菌 Sclerotinia sclerotiorum	192/230 (83%)	4.00E-139
2	967	氨基转移酶 branched-chain-amino-acid	核盘菌 Sclerotinia sclerotiorum	219/280 (78%)	4.00E-158
3	434	丙酮酸脱羧酶 pyruvate decarboxylase	灰葡萄孢霉 Botryotinia fuckeliana	112/135 (83%)	6.00E-61
5	551	钾离子通道 Voltage-gated potassium channel subunit beta-1	Glarea lozoyensis	92/130 (71%)	1.00E-61
8	532	钾离子通道 voltage-gated K channel beta subunit, putative	Talaromyces stipitatus	144/205 (70%)	7.00E-14
10	367	硝酸盐转运蛋白 Nitrate transporter	构巢曲霉 Aspergillus nidulans	71/89 (80%)	7.00E-12
45	710	核糖体蛋白 60S ribosomal protein L2560s	核盘菌 Sclerotinia sclerotiorum	115/126 (91%)	4.00E-73
52	939	硝酸还原酶 nitrate reductase	黑曲霉 Aspergillus niger	173/291 (59%)	2.00E-113
54	386	异柠檬酸裂合酶 putative Isocitrate lyase	Glarea lozoyensis	32/35 (91%)	6.00E-13
103	570	氨基酸通透酶 amino acid permease	Grosmannia clavigera	135/178 (76%)	4.00E-76
113	506	自噬蛋白 similar to autophagy protein Atg27	灰葡萄孢霉 Botryotinia fuckeliana	58/132 (44%)	8.00E-38
115	569	氨基酸通透酶 amino acid permeas e	Grosmannia clavigera	134/178 (75%)	1.00E-75
120	715	氨基酸通透酶 amino acid permease 2	Metarhizium acridum	131/232 (56%)	2.00E-92
143	495	硝酸盐转运蛋白 nitrate transporter	土曲霉 Aspergillus terreus	97/132 (73%)	7.00E-45
144	367	硝酸盐转运蛋白 nitrate transporter CmA	Talaromyces stipitatus	52/116 (45%)	2.00E-16
145	366	硝酸盐转运蛋白 nitrate transporter	小巢状曲菌 Emericella nidulans	71/89 (80%)	7.00E-12
156	649	组蛋白 histone 1-like protein mRNA, complete cds	嗜热毁丝霉 Myceliophthora thermophila	115/153 (75%)	4.00E-18
158	497	硝酸盐转运蛋白 nitrate transporter	土曲霉 Aspergillus terreus	111/151 (74%)	4.00E-46
174	426	氨基酸通透酶 amino acid permease	Grosmannia clavigera	99/129 (77%)	1.00E-68
179	908	核糖体蛋白 60S ribosomal protein L2560S	核盘菌 Sclerotinia sclerotiorum	115/126 (91%)	4.00E-72
183	367	硝酸盐转运蛋白 nitrate transporter	Talaromyces stipitatus	52/116 (45%)	2.00E-16
186	578	组蛋白 H3 histone H3	白僵菌 Beauveria bassiana	52/52 (100%)	5.00E-27
204	312	核糖体蛋白 60S ribosomal protein L26 60S	灰葡萄孢霉 Botryotinia fuckeliana	67/74 (91%)	4.00E-40
206	751	组蛋白 H1 histone H1	粗糙脉孢菌 Neurospora crassa	317/479 (66%)	2.00E-23

Promega 公司, PCR-selectTM cDNA subtraction kit 以及 AdvantageTM cDNA Polymerase Mix 购于 Clontech 公司, pMD-19T 载体购于 TAKARA 公司。

试验菌丝培养所用基本培养液为 MMN (Melin-Norkrans Medium) 培养液, 去除其中的麦芽提取物, 所用氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 终浓度 3.8 mmol/L, 转速 150 r/min 摇床内连续暗培养 15 d, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

3.2 方法

3.2.1 试验材料处理

菌株培养 15 d 后, 过滤收集菌丝, 重悬于新鲜 MMN 培养液中振荡培养 24 h, 再次过滤, 一半重悬于新鲜 MMN 培养液中振荡培养, 作为对照组; 一半重悬于以 100 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 为唯一氮源的 MMN 培养液中, 进行硝态氮诱导, 作为处理组, 分别振荡培养 4 h、8 h、24 h、36 h 取材, 液氮速存。

3.2.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

菌丝总 RNA 利用鼎国公司的 PlantRNAzol 试剂盒提取, 步骤同试剂盒说明书。用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 提取质量, 并用微量紫外分光光度计测定其纯度和浓度; 采用 Promega 公司的 PolyA Tract Systems III (Z5300) 分离 mRNA, 并利用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

3.2.3 抑制性差减杂交

采用 Clontech 公司的 PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit 试剂盒, 并按其说明书进行。

3.2.4 差减 cDNA 文库的构建及序列分析

第二轮 PCR 扩增结束后, 将产物与载体 pMD-19T 连接, 再转化大肠杆菌感受态细胞 DH5a, 完成 cDNA 文库构建。随机选择 300 个阳性克隆进行测序, 去除测序序列中的载体序列和接头序列后, 即得 EST 序列, 于 NCBI 上进行 Blast 同源比对及功能注释后, 将所得 ESTs 进行基因功能分类。

作者贡献

张春英、孙秋玲是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 张春英是项目的构思者和负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 戴思兰指导论文的写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(30972409)资助。作者感谢上海市园林科学研究所尹娟娟、魏翔莺、黄芳以及师姐

陈真在本实验过程中的帮助。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

- Cruz C., Egsgaard H., Trujillo C., Ambus P., Requena N., Martins-Loução M.A., and Jakobsen I., 2007, Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi, *Plant. Physiol.*, 144(2): 782-792 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.090522> PMID:17142485 PMCID:1914155
- Gobert A., and Plassard C., 2008, The beneficial effect of mycorrhizae on N utilization by the host-plant: myth or reality? In: *Mycorrhiza*, Springer, GER, pp.209-240 http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_11
- Guescini M., Zeppa S., and Pierleon R., 2007, The expression profile of the Tuber borchii nitrite reductase suggest its positive contribution to host plant nitrogen nutrition. *Curr. Genet.*, 51(1): 31-41 <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-006-0105-y> PMID:17082947
- Hou X.L., 2009, Studies on the differentially expressed genes in accessory sex gland and function of eriocheir sinensis, Thesis for M.S., East China Normal University, Supervisor: Wang Q., pp.1-74 (侯雪丽, 2009, 中华绒螯蟹副性腺差减cDNA文库的构建及内容物功能的研究, 硕士学位论文, 华东师范大学, 导师: 王群, pp.1-74)
- Huang X., 2008, Cloning and analysis of genes associated with the release of dormant floral buds in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.), Thesis for Ph.D., Beijing Forestry University, Supervisor: Zheng G.S., Dai S.L., pp.1-104 (黄鑫, 2008, 牡丹花芽内休眠解除相关基因的分离与功能分析, 博士学位论文, 北京林业大学, 导师: 郑国生, 戴思兰, pp.1-104)
- Jargeat P., Rekanalt D., Verner M.C., Gay G., Debaud J.C., Marmeisse R., and Fraissinet-Tachet L., 2003, Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporium*. *Curr. Genet.*, 43(3): 199-205
- Kender W.J., and Childers N.F., 1959. Growth of cranberry plants (*Vaccinium macrocarpon*) with various sources of nitrogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 74: 407-413
- Kosola K.R., and Workmaster B.A.A., 2007. Mycorrhizal colonization of cranberry effects of cultivar, soil type, and leaf litter composition. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 132(1): 134-141
- Govindarajulu M., Pfeffer P.E., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers P.J., and Shachar-Hill Y., 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435(7043): 819-823 <http://>

- dx.doi.org/10.1038/nature03610 PMID:15944705
- Montanini B., Viscomi A.R., Bolchi A., Martin Y., Siverio J.M., Balestrini R., Bonfante P., and Ottonello S., 2006, Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochem. J.*, 394(1): 125-134 <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20051199> PMID:16201972 PMCID:1386010
- Paul E.A., and Clark F.E., 1989, *Soil microbiology and biochemistry*, Academic Press, San Diego, CA, USA, pp.273
- Read D.J., 1996, The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Ann. Bot.*, 77(4): 365-374 <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1996.0044>
- Shen G., 2005, Differentially expressed genes during early infection of *Phytophthora Sojae* with soybean plant and functional analysis of some genes, Thesis for Ph.D., Nanjing Agricultural University, Supervisor: Zheng X.B., PP.1-158 (申贵, 2005, 大豆疫霉侵染大豆早期差异表达基因的筛选与功能分析, 博士学位论文, 南京农业大学, 导师: 郑小波, pp.1-158)
- Wang Y.S., Wang J., Li F.Q., Liu X.B., and Liu L.S., 2001, Identification of cDNA fragments differentially expressed between a rice mutant dwarf69 and wild type TGA-2 suppressive subtraction hybridization, *GaoJishu Tongxun (High Technology Letters)*, 11(5): 20-24 (王永胜, 王景, 李发强, 刘筱斌, 刘良式, 2001, SSH法获取水稻矮化突变体相关的cDNA片段, 高技术通讯, 11(5): 20-24)
- Yin L.J., Zhang C.Y., Yang B., 2010, Characteristics of nitrogen absorbed by Ericoid Mycorrhizal fungi and impact on growth of *Rhododendron fortunei*, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 43(4): 868-872 (尹丽娟, 张春英, 杨兵, 2010, 云锦杜鹃菌根真菌吸收氮源特性及其接种效应, 中国农业科学, 43(4): 868-872)