

## 山菠菜胆碱单氧化物酶基因(CMO)的克隆与分析

沈义国 杜保兴 张劲松 陈受宜\*

(中国科学院遗传研究所植物生物技术开放实验室 北京 100101)

**摘 要** 甜菜碱是一类广泛存在于生物体内的渗透保护剂。高等植物中,甜菜碱的生物合成经由胆碱→甜菜碱醛→甜菜碱两步反应完成,其中第一步反应,也是甜菜碱生物合成的限速反应,由胆碱单氧化物酶(CMO)催化。本研究以耐盐植物山菠菜(*Atriplex hortensis*)为材料构建了盐胁迫下的 cDNA 文库,用菠菜 CMO cDNA 为探针从中筛选获得一个长 1.77kb 的 cDNA 克隆,测序结果表明该克隆包含一个完整的开放读码框,编码一个由 438 个氨基酸构成的多肽,与菠菜和甜菜 CMO 的氨基酸序列同源性分别为 81% 和 72%。同菠菜和甜菜中的 CMO 序列相比,山菠菜 CMO 基因(*AhCMO*)也具有保守的 Rieske-Typ[2Fe-2S]簇结合区和保守的多铁原子核结合域。对盐处理条件下山菠菜 CMO 基因转录水平的研究表明 CMO 基因在盐胁迫情况下表达量增加约 3 倍。将 CMO 与 35S 启动子连接后转化烟草(*Nicotiana tabacum* var. Xanthi),获得了具有一定耐盐性状的转基因植株,在 1.2% NaCl 的盐浓度下生长良好。

**关键词** 山菠菜,甜菜碱,胆碱单氧化物酶,盐胁迫

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0001-06

干旱、盐害是生物体面临来自自然界的几种常见不利因素之一。长期以来的抗逆研究表明,生物体内存在着多种机制抵御外界的渗透压胁迫:如通过离子泵调节维持胞内外离子平衡,水分平衡,通过积累甜菜碱提高胞内渗透压。

自然界中广泛存在着的一类被称为渗透保护剂或渗透调节剂的无毒小分子化合物,当外界环境不利例如干旱、盐害、冷热时,许多生物体内便会积累一定浓度的渗透保护剂,起着调节胞内渗透压,保护胞内酶活性的作用。渗透保护剂主要包括甜菜碱、甘油、脯氨酸等。甜菜碱广泛存在于从大肠杆菌到动物的多种生物体内<sup>[1]</sup>,高等植物如藜科、锦葵科、茄科等都能在胞内积累甜菜碱<sup>[2]</sup>。高等植物中甜菜碱由胆碱经由两步氧化反应合成:胆碱→甜菜碱醛→甜菜碱,其中由胆碱单氧化物酶(CMO)催化的第一步氧化反应是限速步骤,甜菜碱醛脱氢酶(BADH)催化第二步氧化反应<sup>[3]</sup>。甜菜碱作为一种非常有效的渗透剂,它的相关代谢途径成为抗逆基因工程研究的重点。已先后从菠菜、山菠菜、高粱等植物中克隆到 BADH 基因并开展了转基因研究,我

们实验室已从山菠菜中克隆了 BADH 基因并进行了多种重要农作物的转基因研究,获得了耐盐的转 *AhBADH* 玉米、草莓和具有一定耐盐性状的转 *AhBADH* 水稻、小麦<sup>[4,5]</sup>。为在转基因植物中建立一条完善的甜菜碱合成途径,必须克隆得到其限速酶 CMO 的基因。本工作从构建的盐诱导山菠菜 cDNA 文库中以菠菜 CMO 基因<sup>[6,7]</sup>为探针筛选获得 CMO 基因克隆,分析了盐胁迫时山菠菜 CMO 基因随时间在转录水平上的变化,并选择模式植物烟草首先进行了转山菠菜 CMO 基因研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 植物材料和处理方法

山菠菜(*Atriplex hortensis*)种植于温室内,生长到约 50d 时,每天定时用 2% NaCl 盐水处理,于处理前和处理后 1、2、3、4d 时收取新鲜叶片,于液氮中速冻后用于提取 RNA 和 DNA。

#### 1.2 cDNA 文库的构建和筛选

提取的山菠菜总 RNA 经 PolyATtract mRNA Isolation System II(Promega)分离出 mRNA,使用

Universal Riboclone cDNA Synthesis System (Promega)合成 cDNA 双链,与脱磷的 pExcell 载体 (Amersham)连接,连接产物经 Lambda Packaging Kit (Amersham)包装后与新鲜制备的 NM522 (Amersham)感受态细菌混和、吸附、铺平板。以菠菜 1.3kb CMO cDNA 为探针筛选了  $2.5 \times 10^5$  个未扩增克隆,得到 37 个阳性克隆,取插入 1.77kb 的克隆 pAhC1 用于测序分析。

### 1.3 DNA 提取和 Southern 杂交

DNA 抽提、Southern 杂交根据陈受宜等的方法进行<sup>[8]</sup>。3 $\mu$ g 山菠菜基因组 DNA 经 *Bam*H I、*Eco*R I、*Dra* I、*Hind* III 完全酶切后在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳分离,转移到尼龙膜 (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham)上供 Southern 杂交,用随机引物法标记山菠菜 CMO 探针,于 65 $^{\circ}$ C 杂交 18h,洗膜条件为 65 $^{\circ}$ C 下用  $2 \times 1 \times 0.5 \times$  SSC 和 0.1% SDS 分别洗 20min。

### 1.4 RNA 提取

参照张劲松等的方法进行<sup>[9]</sup>,水稻叶片在液氮中研碎,悬于 4mol/L 硫氰酸胍中,混合物用酸性苯酚:氯仿抽提,上清中加入无水乙醇沉淀总 RNA,再经 4mol/L LiCl 悬浮 RNA 沉淀,氯仿抽提一次,然后用乙酸钠/乙醇沉淀总 RNA,最后将 RNA 溶于水中,贮存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

### 1.5 Northern 杂交分析

30 $\mu$ g 总 RNA 在 1.2% 的甲醛变性胶中电泳分离后,转移至尼龙膜 (Hybond-N<sup>+</sup>) 上,膜在杂交前先用紫外线照射 3min。用随机引物标记法制备同位素标记的山菠菜 CMO 探针,杂交在 65 $^{\circ}$ C 进行 16h 以上,洗膜条件为  $2 \times 1 \times$  SSC,和 0.1% SDS 在 42 $^{\circ}$ C 各洗 20min,再用  $1 \times$  SSC 和 0.1% SDS 在 55 $^{\circ}$ C 洗 20min。同一杂交膜用煮沸的 0.5% SDS 洗去探针后用 18S rDNA 探针进行杂交。

### 1.6 DNA 序列分析

双链 DNA 测序采用 Taq Dye Primer Cycle Sequencing 试剂盒 (Amersham),在 ABI373A 型自动测序仪上进行。用 BLAST (GAPPED) 程序对核苷酸和氨基酸序列与 GenBank 中的序列进行同源性比较。本文报道的 *AhCMO* cDNA 全序列已纳入 GenBank 数据库,注册号为 AF270651。

### 1.7 基因转化和分析

从 pAhC1 克隆中将 CMO 基因切出后与含 35S 启动子的转化载体 pBI121 (Clontech) 连接,采用叶圆盘转化法转入烟草 (*Nictiana tabacum* var. Xan-

thi) 中。以卡那霉素作抗性筛选得到转基因烟草。转基因烟草苗生长在 MS 培养基中,处理时取出部分组织,在含有 0.9%、1.2% 和 1.5% NaCl 或含 10% PEG-6000 的 MS 培养基中继续培养。

## 2 结 果

### 2.1 山菠菜 CMO cDNA 的分离和鉴定

以盐胁迫的山菠菜植株为材料,构建了一个 cDNA 文库,以菠菜 1.3kb 的 CMO cDNA 作为探针筛选了  $2.5 \times 10^5$  个未扩增克隆,得到 37 个阳性克隆,插入片段长度 1.4~1.8kb,取其中插入片段最长的克隆 pAhC1 测序,结果表明该克隆长 1.77kb,包含一个 1314bp 的开放读码框,编码一个由 438 个氨基酸构成的多肽,其 5' 端非翻译区长 136 bp,3' 端非翻译区长 314 bp (图 1)。在 GenBank 中经比较发现它同菠菜和甜菜的 CMO 基因的氨基酸序列同源性分别为 81% 和 72%;用 DNASTar 软件分析表明,它们的氨基酸序列都具有多个相同的功能保守区(1)它们均含有相同的成熟肽链起始区“AVA”;(2)它们都具备保守的 Rieske-type [2Fe-2S] 结合区的两组 Cys-His 对;(3)保守的多铁原子核结合域。这些结果表明所得克隆 pAhC1 即为山菠菜中编码 CMO 基因的 cDNA 克隆。

### 2.2 CMO 基因在基因组中的分析

将山菠菜总 DNA 经 *Bam*H I、*Dra* I、*Eco*R I 和 *Hind* III 完全酶解后以山菠菜 CMO cDNA 为探针进行了 Southern 分析,结果 *Bam*H I 酶切时仅检测到一条杂交带,*Eco*R I 酶切检测到 3 条杂交带,而 *Dra* I 和 *Hind* III 酶切时都检测到 4 条杂交带(图 2)。由于 CMO cDNA 序列中仅有一个 *Eco*R I 和一个 *Hind* III 切点,不含 *Bam*H I 和 *Dra* I 切点,因此从 *Bam*H I 酶切的 Southern 杂交结果看,CMO 基因在山菠菜基因组中只有一个拷贝,而 *Dra* I 和 *Hind* III 酶切的杂交带型暗示,在 *AhCMO* 的基因组序列中应含多个内含子。

### 2.3 盐胁迫下 CMO 基因在山菠菜叶片中的表达分析

以 2% 的盐水连续处理山菠菜 4d,分不同时间提取叶片的 RNA 作 Northern 分析(图 3),结果表明随着处理时间延长,CMO 基因表达量逐渐增加,比处理前约增强 3 倍,说明 CMO 基因的表达是受盐诱导的。正常生长情况下 CMO 基因也有表达,但水平较低。

```

      atacaggcctcgagggccgaattccggttgctgctgattgttgatcattcatctcatcactcct      64
      tataatattatattaaataaataataataataataacaaggaagtgttaagtgttgatcatacaacaatc      136

ATGGCAGCAAGTGC AACACAATGTTGCTAAAATACCCAACACTACTGTTTGTGGAATACCAAAATCATCCGCA      208
M A A S A T T M L L K Y P T T V C G I P N S S A      24
AACAAATCTACTGATCCTTCAAATAACATCGTCCAATTCACAACTACTACTACTAATAGCCCGCTACTT      280
N N S T D P S N N I V Q I P Q T T T T N S P L L      48
AAGTCCGCTACTCTAATAAACCCGTTAACCGCGTGCCTGCCCGGTTTCCGTCGTAACCCACTACA      352
K F R T P N K P V N *A V A A P A F P S V T T T T      72
ACCACCCTCGTCCATCCAATCACTTGTCAAGGATTCGATCCTCTGTGCCGGCCGAGGATGCTCTT      424
T T T P S S I Q S L V K D F D P L V P A E D A L      96
ACTCCTCCTAGCTCTTGGTATACCGAACCTGCCTTCTATGCTCATGAACTTGACCGTATCTTTTACAAAGGA      496
T P P S S W Y T E P A F Y A H E L D R I F Y K G      120
TGGCAAGTCGCAGGGTACAGTGATCAAGTTAAGGAGGCTAACCAATATTTACCGGAACGTTAGGAAATGTT      568
W Q V A G Y S D Q V K E A N Q Y F T G T L G N V      144
GAATATTTGGTGTGTCGAGATGGAGAAGGAAAAGTTCATGCATTCACAATGTTGCACCCTCGTGCATCT      640
E Y L V C R D G E G K V H A F H N V →C →H R A S      168
ATCCTTGCCTTGGGAAGTGGCAAAAAGTCATGTTTCGATGCCCTTATCATGGATGGGTATGGCATGAAT      712
I L A C G S G K K S C F V →C P Y →H G W V Y G M N      192
GGATCGCTTACGAAAGCTTCAAAGCAACACCAGAACAATCACTAAATCCCGATGAACTTGGGCTTGTACCA      784
G S L T K A S K A T P E Q S L N P D E L G L V P      216
CTAAAAGTTCAGATATGGGGCCCATTTATACTCATCAGTTTGGACAGATCAAGCCGTGAAGTAGGTGACGTT      856
L K V A V W G P F I L I S L D R S S R E V G D V      240
GGATCGAATGGTGGTGTGCTGAAGATGTTAAGGCCCATGCTTTGACCCGAATCTTCAGTTCATF      928
G S E W L G S C A E D V K A H A F D P N L Q F I      264
AATAGGATGAATTTCCAATGAATCTAATTTGGAAGATTTTCAGTGACAACATTTGGATAGCTCTTACCAT      1000
N R S E I F E S N W K I F S →D N Y L →D S S Y →H      238
GTTCCCTTATGCACACAAATACTATGCAACTGAGCTCGACTTTGATACTTACCAAACCGATATGGTTGGAAAT      1072
V P Y A →H K Y Y A T E L D F D T Y Q T D M V G N      312
GTCACGATTCAAAGGGTGGCTGGGACTTCAAACAATGGTTTAATAGACTTGGAACTCAAGCCTTCTATGCT      1144
V T I Q R V A G T S N N G F N R L G T Q A F Y A      336
TTTGCATACCCCTAAGTGTGCTGGAAGGATGGCCCTTGGATGACTACAATGCATATTTGTCATAGGA      1216
F A Y P N F A V E R Y G P W M T T M H I V P L G      360
CCAAGGAATGCAAACTAGTGGTGGACTACTATATTGAAAAATCAAAGCTGGACGACAAGGATTAACATCGAA      1288
P R K C K L V V D Y Y I E K S K L D D K D Y I E      384
AAGGGCATAGCAATCAATGATAATGTGCAGAAAGAAGATGGTGTGTGTGAAAGCGTCCAAAAAGGGTTG      1360
K G I A I N D N V Q K E D V V L C E S V Q K G L      408
GAGACACCAGCATATCGTAGTGAAGATATGTGATGCCAATTGAGAAAGGAATTCACCATTCCACTGCTGG      1432
E T P A Y R S G R Y V M P I E K G I H H F H C W      432
TTACCCAAGTGTGAAGTATgcaaccagattatatgtaactgttggtttccttccttctatgatgggata      1504
L H Q V L K *      438

ttataaagtaaaattataatgtcatcatttagttgagattgttgttagagttgagccttatgctcattagt      1576
aacgtgtgatgtgtgatgtgtttggcatggtaaaaaatglttgattgctagaattttataaataatag      1648
tatggtgctgatgtccagtataaataaagaacatagcaccctttccctacttaagaattatattccatat      1720
attttcagggaactatgagattgtctatgaacaaaaaaaaaaaaaaaaa      1767

```

图1 山菠菜 CMO 基因全序列及编码氨基酸序列

Fig. 1 The full nucleotide and deduced amino acid sequences of *AhCMO*

\* Indicates the start residue of *AhCMO* mature polypeptide shows the conserved Rieske-Typ2 [2Fe-2S] cluster-binding region and <sup>TM</sup> shows the conserved mononuclear Fe-binding motif. The accession number of *AhCMO* in GenBank is AF270651

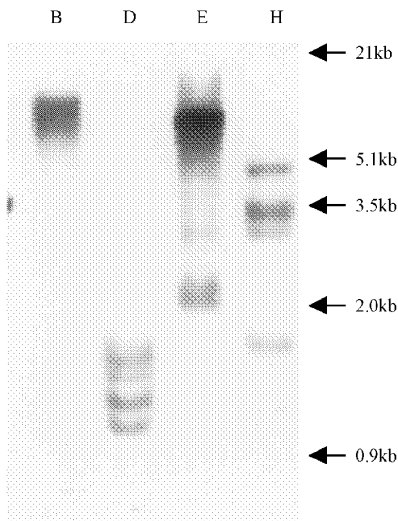


图2 山菠菜基因组 DNA 的 Southern 分析结果

Fig. 2 The southern blot analysis of *AhCMO*

The genomic DNA was completely digested with *Bam*H I (B), *Dra* I (D), *Eco*R I (E) and *Hind* III (H) subjected to hybridization using the full-length sequence of *AhCMO* as a probe

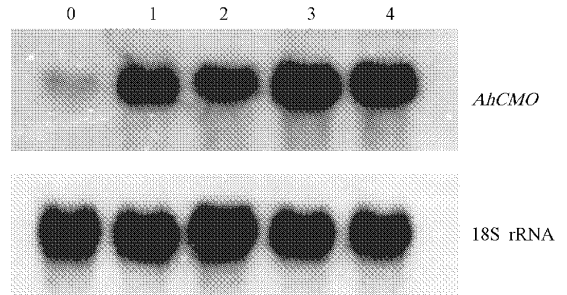


图3 2% NaCl 盐水诱导下山菠菜叶片中 CMO 基因表达的 Northern 分析结果, 分别于处理前、处理后 1、2、3 和 4d 时取样, 总 RNA 的 18S rRNA 杂交结果作为内标

Fig. 3 The Northern analysis of *AhCMO* in leaves when irrigated with brine containing 2% NaCl

Each lane contains 30μg total RNA sample and 18S rRNA is marked as control, the numbers under lanes mean the days after the plant was treated

## 2.4 转 CMO 基因烟草的耐盐性和耐旱性分析

经卡那霉素抗性筛选得到 7 株转 *AhCMO* 烟草,都能在含 50mg/L 卡那霉素的 MS 培养基中正常生长。将它们分别部分移植到含 0.9%、1.2% 和 1.5% NaCl 和含 10% PEG-6000 的 MS 培养基中继续生长,结果表明:在 0.9% 和 1.2% 的盐浓度下,7 株转基因烟草均叶片翠绿,长势良好,而同时移植的对照烟草则叶片发黄,发育停滞;但在 1.5% 的盐浓度下,转基因植株和对照均不能正常生长,叶片发黄并死亡(图 4);在 10% PEG-6000 中 7 株转基因烟草均叶片饱满,长势良好,而对照烟草植株萎蔫,生长停滞(图 5)。随机提取转基因烟草 1# 叶片组织的 RNA 作 Northern 分析,结果显示 CMO 基因在转基因烟草中正常表达(图 6),并且与盐胁迫无关。

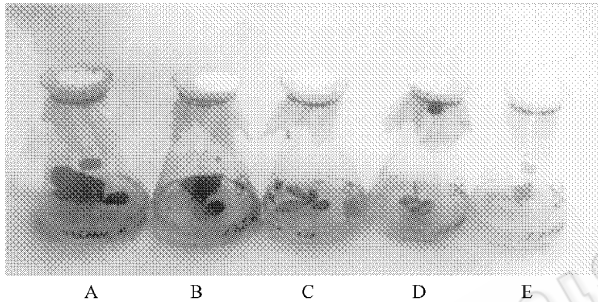


图 4 转 *AhCMO* 烟草 1#(A, B, D) 和对照(C, E) 在 0.9%(A)、1.2%(B, C)、1.5%(D, E) NaCl 的含盐 MS 培养基中生长状态对比

Fig. 4 The photo of transgenic tobacco 1#(A, B, D) and the control(C, E)

MS Medium in different bottles contain 0.9%(A), 1.2%(B, C), 1.5%(D, E) NaCl

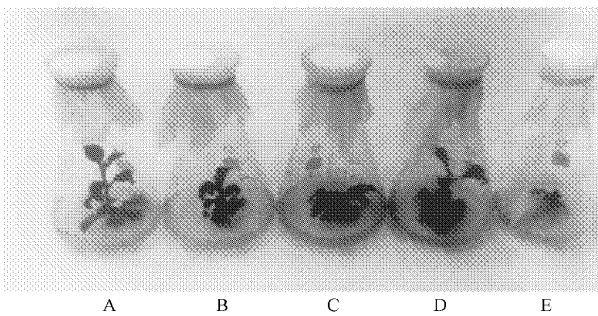


图 5 转 *AhCMO* 烟草 1~4#(A~D) 和对照(E) 在含 10% PEG-6000 的 MS 培养基中生长状态对比

Fig. 5 The photo of four transgenic tobacco(A, B, C, D) and the control plant(E).

These plants are all cultured on MS medium containing 10% PEG-6000

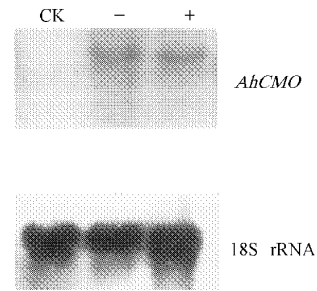


图 6 转 CMO 基因烟草的 Northern 验证结果

Fig. 6 The Northern blot of *AhCMO* in transgenic tobacco. The lanes from left to right are control plant(CK), transgenic tobacco 1# under normal condition(-) and stress condition(+)(treated with 1.2% NaCl for 1 day)

## 3 讨 论

自然界的干旱、盐害是长期以来导致农作物减产的重要原因,因此研究植物应答渗透压胁迫的分子机制,进而利用植物基因工程改造农作物和快速培育新的耐盐耐旱品种具有重要意义。利用差异显示技术,我们实验室已经从耐盐水稻中分离出多个参与盐胁迫应答的基因,如参与多胺合成的 *SAMDC* 及参与维持膜内外离子平衡的  $H^+$ -ATPase<sup>[10, 11]</sup>,目前正在开展进一步的转基因研究。

在自然界中生存着许多野生植物依靠其特有的代谢调节途径抵御外界渗透压胁迫,维持生命。如何利用这些相关代谢的基因改造重要农作物,提高耐盐耐旱能力,减少灾害损失,已成为近年来植物抗逆基因工程的主要目标之一。早在 80 年代甜菜碱的抗渗效果就引起了研究者的注意<sup>[12]</sup>,多年的研究结果证明渗透保护剂甜菜碱可在生物体内积累到很高浓度而无毒害,在细胞处于外界渗透压胁迫下时,一定浓度的胞内甜菜碱可以起到保护细胞膜和蛋白质,提高胞内渗透压的作用<sup>[13]</sup>,此外甜菜碱还可以提高种子萌发时的抗冻能力<sup>[14]</sup>。在许多种植物中甜菜碱被证明起着主要的耐渗透压胁迫作用<sup>[15]</sup>,因此克隆甜菜碱合成途径中的关键酶可用于在盐、旱敏感农作物中建立一条有效的耐盐胁迫调节途径,提高农作物耐盐能力。本工作在已克隆山菠菜 *BADH* 基因的基础上以高度耐盐的野生植物山菠菜为材料,克隆得到其甜菜碱合成限速酶 *CMO* 基因。我们的结果显示 *CMO* 在盐胁迫下表达量随时间逐渐增强,4 天后约增加 3 倍,预计它催化合成的甜菜碱累积倍数会更高。同已报道的菠菜、甜菜中 *CMO* 表达结果相比较,我们的结果显示山菠菜中 *CMO* 的表达丰度要高得多,这与山菠菜的喜盐特性是相

一致的。

植物中甜菜碱的合成由 CMO 和 BADH 分两步完成。CMO 的生化特性分析显示它不同于植物中任何一种已知的氧化酶,同 CMO 相比,BADH 的催化作用并非不可替代,比如多胺合成途径中的一氨醛脱氢酶就具有 BADH 活性。BADH 基因不具备信号肽序列,在菠菜中它定位于叶绿体基质中,在水稻中则定位于溶酶体中<sup>[3]</sup>;比较已克隆的菠菜和山菠菜 CMO 序列发现,它们都具备信号肽序列,用于引导成熟肽链定位于叶绿体基质,利用光合作用产生的铁氧还蛋白作电子受体。因此单独转化 CMO 的转基因植物也可以完成甜菜碱的合成,而且与细菌中单独催化胆碱氧化生成甜菜碱的 CDH 相比,不存在信号肽引导定位和密码子偏好性的影响。实际上我们的转基因结果也证明了单独转 CMO 基因是有效的。

从转基因烟草的耐盐性,耐旱性分析可见,AhCMO 在烟草中能发挥一定效果,转基因烟草的耐盐、耐旱能力有一定增强。目前国际上也进行了甜菜碱基因工程研究,例如 Niccio 等分析了转菠菜 CMO 基因的烟草植株中从乙胺→胆碱→甜菜碱从头合成途径中各种中间代谢产物在盐胁迫前后的含量变化后,认为内源胆碱的低含量限制了甜菜碱的合成速度和最终浓度<sup>[6]</sup>;Kishitani 证实在转 BADH 基因水稻中外源甜菜碱醛能迅速增加胞内甜菜碱累积<sup>[17]</sup>,可见内源性底物的缺乏成为某些植物抗逆基因工程改造的限制因素之一。我们的实验证明:转山菠菜 CMO 基因的烟草植株普遍提高了耐盐性和耐旱性,其耐逆性效果远高于 Niccio 的报道,其原因可能是转基因实验的体系不同,也不排除不同来源基因间的差异。但是若要进一步提高转基因植株的耐逆性,尤其是要在缺乏甜菜碱生成途径的农作物中建立高效的甜菜碱调渗系统,还有必要完成胆碱合成或贮存关键酶的克隆和转化工作。

致谢 感谢方荣祥教授提供双元植物载体,刘凤华提供了部分植物材料,舒卫国提供了菠菜 CMO 探针。感谢李子银、龚继明和冉延超在本文完成过程中的建议和帮助。

## REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Rhodes D ,Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* ,1993 **44** :357~384

- [ 2 ] Matoh T ,Watanabe J ,Takahashi E. Sodium ,potassium ,chloride ,and betaine concentrations in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. *Plant Physiol* ,1987 **84** :173~177
- [ 3 ] Scott D ,McNeil ,Michael L. Nuccio ,Andrew D. Hanson. Betaines and related osmoprotectants targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol* ,1999 **120** :945~949
- [ 4 ] XIAO G (肖岗) ,ZHANG G Y (张耕耘) ,LIU F H (刘凤华) *et al.* The study of BADH gene in *Atriplex hortensis*. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* ,1995 **40** :741~745
- [ 5 ] GUO Y (郭岩) ,ZHANG L (张莉) ,XIAO G (肖岗) *et al.* Expression of BADH gene and salinity tolerance in rice transgenic plant. *Science in China(中国科学)(Series C)* ,1997 **27** :151~155
- [ 6 ] Rathinasabapathi B ,Burnet M ,Russell Bl *et al.* Choline monoxygenase an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants :prosthetic group characterization and cDNA cloning ,*Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 **94** :3454~3458
- [ 7 ] Russell BL ,Rathinasabapathi B ,Hanson AD. Osmotic stress induces expression of choline monoxygenase in sugar beet and amaranth ,*Plant Physiol* ,1998 **116** :859~865
- [ 8 ] CHEN S Y (陈受宜) ,ZHU L H (朱立煌) ,HONG J (洪建) . Molecular biological identification of a rice salt tolerant line. *Acta Botanica Sinica(植物学报)* ,1991 **33** :569~573
- [ 9 ] ZHANG J (张劲松) ,ZHOU J M (周骏马) ,ZHANG C (张驰) *et al.* Differential gene expression in salt-tolerant rice mutant and its parental variety. *Science in China(中国科学)(Series B)* ,1995 **25** :659~669
- [ 10 ] Zhang J-S ,Xie C ,Li Z-Y ,Chen S-Y. Expression of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene in response to salt stress in a rice salt -tolerant mutant and its original variety. *Theor Appl Genet* ,1999 **99** :1006~1011
- [ 11 ] Li Z-Y ,Chen S-Y. Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor Appl Genet* ,2000 **100** :782~788
- [ 12 ] Le Rudulier D ,Strom A R ,Dandekar A M *et al.* Molecular biology of osmoregulation. *Science* ,1984 **224** :1064~1068
- [ 13 ] Carpenter J F ,Grove J H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* ,1988 **25** :244~255
- [ 14 ] Hayashi A H ,Chen THH ,Murata N. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of Arabidopsis During germination and early growth. *Plant Cell and Environment* ,1998 **21** :232~239
- [ 15 ] Saneoka H ,Nagasaka C ,Hahn D T *et al.* Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and containing maize lines. *Plant Physiol* ,1995 **107** :631~638
- [ 16 ] Nuccio M L ,Russell B L ,Nolte K D *et al.* The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing cho-line monoxygenase. *Plant J* ,1998 **16** :487~498
- [ 17 ] Kishitani S ,Takanami T ,Suzuki M *et al.* Compatibility of glycinebetaine in rice plants :evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from

## Cloning and Characterization of CMO Gene from *Atriplex hortensis*

SHEN Yi-Guo DU Bao-Xing ZHANG Jin-Song CHEN Shou-Yi\*

(Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Glycine betaine is a widespread osmoprotectant existed in many organisms. In higher plant, glycine betaine is synthesized via a two-step oxidation reaction: choline → betaine aldehyde → glycine betaine. The first step, also the speed-limiting step, is catalyzed by choline monooxygenase (CMO). Choosing halophyte *Atriplex hortensis* as material, we constructed a salt stress-induced cDNA library and isolated a 1.77 kb length cDNA clone with spinach CMO cDNA as probe. The sequencing result showed a complete Open Reading Frame encoding a 438-amino-acid polypeptide which was 81% and 72% identified to CMO sequences of spinach and sugar beet in amino acid homology respectively. Compared with the CMO from spinach and sugar beet, the AhCMO had one conserved Rieske-Type [2Fe-2S] cluster-binding region and one conserved mononuclear Fe-binding motif. The expression pattern of AhCMO under salt stress was also studied, the transcriptional level of AhCMO raised about three folds after the plant was treated with brine for 4 days. The AhCMO was then transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) with 35S promoter and seven transgenic plants were certified by northern blot, these plants displayed some salt- and drought- stress tolerance when grew well on MS medium contained 1.2% NaCl or 10% PEG while the control was stagnated under the same condition.

**Key words** *Atriplex hortensis*, glycine betaine, choline monooxygenase, salt stress

Received July 19, 2000

This work was supported by grant from National High Technology Program (819-08-01) and NKBRSF, P. R. China No. G1999011703.

\* Corresponding author. Tel 86-10-64886859; Fax 86-10-64873428; E-mail: sychen@igtp.ac.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>