

普通小麦中双脱氢抗坏血酸还原酶(TaDHAR)基因的克隆与生化特性分析

余春梅¹, 杨艳萍^{2,3}, 刘鑫燕¹, 周蓉¹, 华梁¹, 魏贺¹, 丁胜杰¹, 王道文²

1 南通大学生命科学学院, 南通 226007

2 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

3 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 利用同源克隆技术从六倍体普通小麦中获得了两个不同的双脱氢抗坏血酸还原酶(TaDHAR)基因的 cDNA 克隆。器官表达模式分析表明, 这两个 TaDHAR 基因(暂时命名为 TaDHAR1 和 TaDHAR2)在小麦根、茎、叶、幼穗以及开花后 10 d、20 d 和 30 d 的种子中均有表达, 为组成型表达基因。原生质体表达实验表明, 两个基因的产物均可能定位在细胞质中。在细菌中表达并提纯了两个基因的重组蛋白。体外生化测定表明两个重组蛋白均具有将双脱氢抗坏血酸还原成抗坏血酸的能力, 其最适 pH 为 7.5, 在 37°C 时的活性比 25°C 高, 但 25°C 条件下 pH 6.0 和 7.0 时, 两个 DHAR 蛋白的活性显著不同。本研究的结果为进一步揭示 TaDHAR 基因在小麦抗坏血酸代谢中的生理作用奠定了基础。

关键词: 普通小麦, 双脱氢抗坏血酸还原酶, 抗坏血酸, 双脱氢抗坏血酸, 表达模式, 酶活

Molecular and biochemical analysis of two genes encoding dehydroascorbate reductase in common wheat

Chunmei Yu¹, Yanping Yang^{2,3}, Xinyan Liu¹, Rong Zhou¹, Liang Hua¹, He Wei¹, Shengjie Ding¹, and Daowen Wang²

1 School of Life Sciences, Nantong University, Nantong 226007, China

2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Dehydroascorbate reductase (DHAR) plays an important role in the recycling of ascorbic acid. In this work, we isolated the full length cDNA clones of two different DHAR genes (tentatively named as TaDHAR1 and TaDHAR2, respectively) from common wheat. Semi-quantitative PCR experiments showed that TaDHAR1 and TaDHAR2 were transcribed in many vegetative and reproductive organs examined in this work. Transient expression analysis using wheat protoplasts indicated that the protein products of TaDHAR1 and TaDHAR2 may be located in the cytoplasm. The cDNAs of TaDHAR1 and TaDHAR2 were expressed in the bacterial cells, and resultant histidine tagged recombinant proteins could be efficiently purified using nickel chelate affinity chromatography. *In vitro* enzyme activity assays revealed that the recombinant TaDHAR1 and TaDHAR2 proteins could all convert dehydroascorbate (DHA) to AsA. The two proteins exhibited higher activity levels at 37°C than at 25°C. Under the two temperature conditions, the optimal pH for TaDHAR1 and TaDHAR2 was both around 7.5. The major difference between TaDHAR1 and

Received: July 13, 2009; **Accepted:** September 2, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30771306), Doctoral Foundation of Nantong University (No. 09B04).

Corresponding author: Chunmei Yu. Tel: +86-513-85015804; Fax: +86-513-85015908; E-mail: ychmei@ntu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30771306), 南通大学博士科研基金项目(No. 09B04)资助。

TaDHAR2 is the activity under pH 6.0 and 7.0 at 25°C. The results and resources obtained in this study may be useful for further research into the physiological role of *TaDHAR* genes in AsA metabolism in crop plants under normal or stressed conditions.

Keywords: common wheat, dehydroascorbate reductase, ascorbic acid, dehydroascorbate, expression pattern, enzyme activity

在真核细胞中,还原型抗坏血酸(Ascorbic acid, AsA)在参与活性氧清除的过程中被氧化形成单脱氢抗坏血酸(Monodehydroascorbate, MDA),MDA 或通过单脱氢抗坏血酸还原酶(Monodehydroascorbate reductase, MDHAR)再生成 AsA,或自氧化形成双脱氢抗坏血酸(Dehydroascorbate, DHA)。DHA 可进一步不可逆地分解形成 2,3-二酮古洛糖酸(Diketogulonic acid),或通过双脱氢抗坏血酸还原酶(Dehydroascorbate reductase, DHAR)与还原型谷胱甘肽偶联,再循环形成 AsA。因此, DHAR 对于保持真核细胞中 AsA 的水平具有重要意义^[1-2]。

AsA 作为植物体内重要的还原剂之一,不仅参与清除植物光合、呼吸作用过程中产生的活性氧,同时还参与维生素 E 的再生和作为多个酶的辅酶发挥作用^[2]。已有研究表明 DHAR 参与了植物细胞中 AsA 的再生,并通过该过程在植物耐逆反应中发挥重要作用。Chen 等从小麦中分离到的 *DHAR* 基因在玉米和烟草中过量表达,玉米籽粒和烟草叶片中的 DHAR 表达分别提高了 100 和 32 倍,AsA 的含量大幅度增加^[3]。在过表达小麦 *DHAR* 的转基因烟草株系中,细胞中 AsA 水平的增加降低了叶片中 H₂O₂ 的含量,对气孔中的信号传递和运动表现出调节作用^[4]。另外,在过表达烟草株系中,叶片的衰老延缓,叶绿素和叶黄素增加^[5]。在强光下,过表达 *DHAR* 基因的株系比野生型植株的光抑制要弱^[6]。上述结果不仅证实了 DHAR 参与了植物中 AsA 的再生,而且表明维持较高水平的 DHAR 活性有利于植物对逆境的抗性。

在模式植物拟南芥中有多个基因编码 DHAR,分别为 *AtDHAR1*(*At1g19750*)、*AtDHAR2*(*At1g75270*)和 *AtDHAR3*(*At5g16710*)(www.arabidopsis.org),这些 DHAR 在体内发挥的功能不完全相同。不同的 *AtDHAR* 在不同的环境胁迫中有着不同的应答水平^[7]。细胞质型的 *AtDHAR2* 在臭氧的胁迫下起主要作用^[8]。利用拟南芥的 *DHAR* 基因搜索水稻基因组序列资源,发现在水稻中有两个基因注释为 DHAR

功能 (*Os05g0116100* 和 *Os06g0232600*),其中 *Os05g0116100* (*OsDHAR1*)编码细胞质型的 DHAR。研究表明, *OsDHAR1* 在水稻的各个发育时期均表达,且受高温诱导^[9]。将 *OsDHAR1* 在拟南芥中过量表达,能显著提高转基因拟南芥耐盐能力^[10],表明 DHAR 在水稻耐逆反应中起重要作用。

小麦是世界最重要的粮食作物之一,在小麦中开展重要基因的功能研究和挖掘优异等位变异对小麦遗传改良具有重要意义。到目前为止,除上述将普通小麦的 *DHAR* 基因转入烟草和玉米中进行研究外^[3-6],尚无对 *TaDHAR* 进行系统分子生物学的报道。基于上述讨论,本研究的主要目的是认识两个 *DHAR* 基因在普通小麦不同器官中的表达模式以及其原核表达蛋白产物的生化特性。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦为栽培品种小偃 54(由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供)。利用培养箱(25°C)生长小麦幼苗,取 2 周幼苗的根和叶片用于总 RNA 的提取。在温室中生长至孕穗期的小麦,取幼穗(2 cm 长)和茎等材料。抽穗后小麦,取开花当天的小花,并于授粉后(Days post anthesis, DPA)10 d、20 d 和 30 d 分别取籽粒,置-70°C 冰箱备用。

1.2 酶和试剂

PrimerSTAR HS DNA 聚合酶、dNTP、内切酶和 DNA Marker 购自大连宝生物公司。T 载体购自 Promega 公司。胶回收试剂盒购自鼎国生物技术有限公司。质粒提取试剂盒购自碧云天生物技术公司。蛋白 Marker 购自北京全式基因公司。还原型谷胱甘肽和氧化型抗坏血酸购自 Sigma。所用其他化学试剂均来自 Amresco。

1.3 RNA 提取和总 cDNA 的合成

用 Trizol®(Invitrogen 公司),并按参照试剂说明手册提取总 RNA。总 cDNA 的合成按 M-MLV 逆转录酶(Promega 公司)反转试剂盒说明书进行。

1.4 TaDHAR 基因的克隆

根据已知 TaDHAR 的序列(GenBank Accession No. AY074784)设计引物 DHAR F1 和 R1(表 1)。以小麦叶片总 cDNA 为模板, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收, 并进行 T/A 克隆。阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。所得的克隆的序列为 2 次独立 PCR 和 3 个以上质粒测序的结果。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
DHAR F1	CAACATGACCGAGGTCTGCGT
DHAR R1	CACACACACAAGCCAGGCAG
DHAR F2	GATGCCAGCGATGGTTCGGAG
DHAR R2	CCTACTGCTGCCATCACTACCG
DHAR R3	CGCATTATCCAACCTAGACAGATGAG
TaDHAR Hind III F	GTAAGCTTATGACCGAGGTCTGCGTCAA GGC
TaDHAR BamH I R	AGGGATCCCGGGTTCACCTTCGGCGCCC AC
TaDHAR Nde I F	GTCATATGACCGAGGTCTGCGTCAAGGC
TaDHAR Xho I R	AGCTCGAGCGGGTTCACCTTCGGCGCCC AC
Taβ-tubulin 2 F	GTGCATGGTTCTTGACAACG
Taβ-tubulin 2 R	CCTTAGGCAGCAGGTGACTC

1.5 半定量 PCR 分析 TaDHAR 组织器官表达模式

根据测序结果, 设计基因特异的反向引物 DHAR R2 和 DHAR R3 分别与上游保守的引物 DHAR F2 配对, 用于 TaDHAR 基因组织器官的表达模式分析(表 1)。内参基因为普通小麦 β-tubulin (GenBank Accession No. TAU76745)基因特异引物。

1.6 原生质体表达载体的构建和小麦原生质体的转化

用 TaDHAR Hind III F 和 TaDHAR BamH I R 引物, 通过 PCR 扩增、酶切回收和 DNA 连接反应将两个 TaDHAR 基因的全长分别克隆到 p163-GFP 载体(含 35S:GFP 表达框^[11])中 GFP 编码序列的上游, 制备了两个 35S:DHAR-GFP 表达载体。经测序验证为正确的质粒用于原生质体的转化。小麦籽粒于 25°C 黑暗培养至高度约 4~5 cm 的黄花苗, 用于制备原生质体和转化^[12]。转化后的原生质体于 Olympus FV500 激光共聚焦显微镜下观察, 并拍照。

1.7 原核表达载体的构建、融合蛋白的诱导表达和检测

用 TaDHAR Nde I F 和 TaDHAR Xho I R 引物, 通

过 PCR 扩增、酶切回收和 DNA 连接反应将两个 TaDHAR 基因的全长 cDNA 分别克隆到细菌表达载体 pET30a 载体中, 表达带组氨酸标签(位于 DHAR 的 C 端)的融合蛋白。阳性克隆经测序验证正确后, 转化大肠杆菌 BL21 菌株。5 mL LB 培养的细胞至 OD₆₀₀ = 0.4~0.6, 用 2 mmol/L 的 IPTG(Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid)小量诱导, 经 12% SDS-PAGE 电泳检测有表达后, 用 Western blotting 杂交检测。组氨酸标签抗体和二抗(购自 Sigma), 最后经硝基四氮唑盐(Nirto blue tetrazolium, NBT)和 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯(BICP)显色后, 照相。

1.8 原核表达蛋白的纯化

1L LB 培养基中, 用 2 mmol/L 的 IPTG 分别诱导转化了 PET-TaDHAR1 和 pET-TaDHAR2 的菌株。按 Novagen 公司的 pET 系统的操作手册进行 Ni 柱纯化(Ni 柱购自 QIAGEN 公司), 所获得的蛋白分别命名为 TaDHAR1 和 TaDHAR2。

1.9 酶的活性测定

纯化带有组氨酸标签的 TaDHAR1 和 TaDHAR2, 经 Bio-Rad protein assay 测定蛋白浓度后, 0.1 μg 蛋白用于测定酶的相对活性。活性测定方法参照文献[3]和[9], 其检测产物是 AsA。分别用 pH 6.0、7.0、7.5 和 8.0 的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液于 25°C 和 37°C 条件, 反应 5 min 后, 终止反应, 测定 OD₂₆₅ 的变化。

2 结果

2.1 TaDHAR 基因的 cDNA 克隆以及禾本科主要作物 DHAR 蛋白氨基酸序列比对

通过生物信息学和分子克隆的方法, 在普通小麦品种小偃 54 中, 获得了两种 DHAR 基因的 cDNA 克隆, 将它们分别命名为 TaDHAR1 和 TaDHAR2。其中 TaDHAR1 与已经报道的 AY074784 序列相同^[3], 而 TaDHAR2 在基因的 3'UTR 区(非翻译区)明显与 TaDHAR1 不同, 推测其来源于六倍体小麦中一个尚未报道的 DHAR 基因。比较 TaDHAR1 和 TaDHAR2 的氨基酸序列, 发现仅在 47 和 93 位置有两个氨基酸的替换(Ala47→Pro47, Pro93→Ala93, 图 1)。

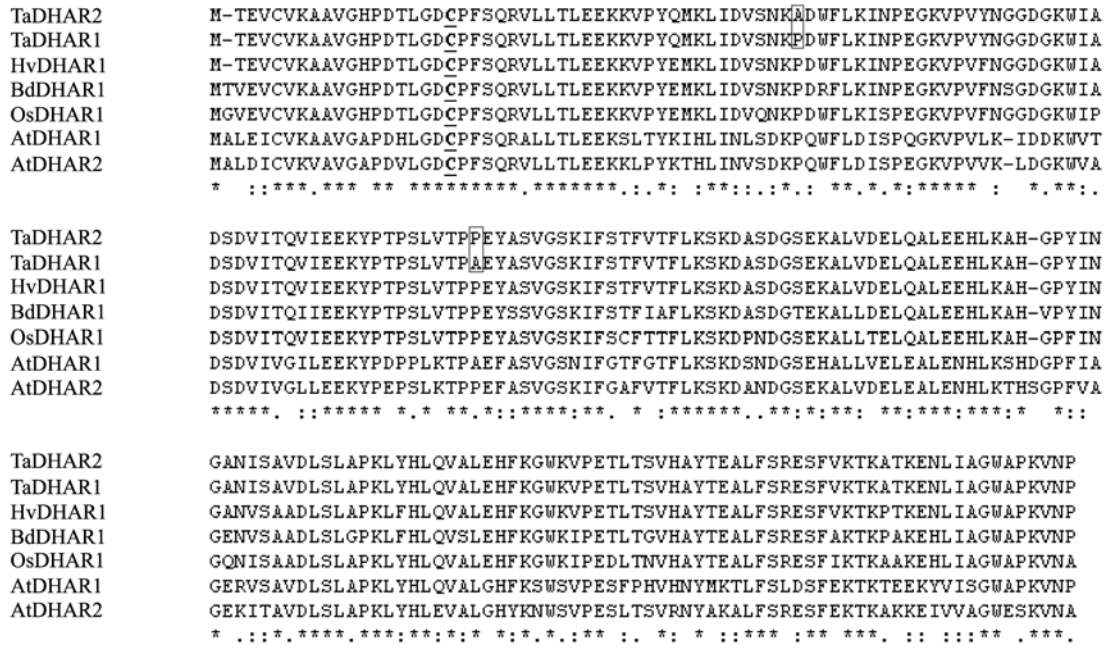


图 1 拟南芥(*AtDHAR2*)、水稻(*OsDHAR1*)，短柄草(*BdDHAR1*)，大麦(*HvDHAR1*)和普通小麦中 *DHAR* (*TaDHAR*)氨基酸序列的多重比对

Fig. 1 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *DHAR* proteins from *Arabidopsis* (*AtDHAR*), *Brachypodium distachyon* (*BdDHAR*), barley (*HvDHAR1*), rice (*OsDHAR*) and common wheat (*TaDHAR*). The conserved cysteine residue is underlined. The amino acid substitutions occurred between *TaDHAR1* and *TaDHAR2* are boxed. Asterisks mark the presence of identical residues among the compared proteins. The conserved and semi-conserved substitutions are indicated by the symbols “.” and “:”, respectively.

用本实验中已经克隆的 *TaDHAR* 序列和已经报道的拟南芥、水稻^[9]*DHAR* 基因的序列，搜索数据库中主要禾本科植物编码 *DHAR* 的 EST 序列，鉴定出大麦、短柄草(*Brachypodium distachyon*)的 *DHAR* 基因并获得其推导的氨基酸序列。根据 Dixon 等的报道^[7]，将编码细胞质型且具全长的 ESTs 推测它们编码的氨基酸。通过多重比对后发现，它们均具有一个保守的半胱氨酸残基。Dixon 等报道该半胱氨酸残基是酶的活性中心，与底物谷胱甘肽形成二硫键。将该半胱氨酸残基突变为丝氨酸残基后，几乎丧失了酶的活性。分析这些 *DHAR* 序列的相似性表明，*AtDHAR2* 与禾本科植物 *DHAR* 的相似性均达到了 65% 以上，而禾本科植物之间的序列的相似性在 88%~99% 之间。本实验中获得 *TaDHAR1* 和 *TaDHAR2* 的相似性达到了 99%。从一级结构的相似性和所具备的保守活性中心的氨基酸残基可以推测，大麦、短柄草和小麦中的 *DHAR* 可能具有生物学活性。

2.2 *TaDHAR1* 和 *TaDHAR2* 的组织器官转录模式分析

根据 *TaDHAR* cDNA 克隆测序的结果，在基因的 3' UTR 设计了特异的引物(表 1)。引物 *DHAR* F2 分别与 *DHAR* R2 和 *DHAR* R3 配对，能特异扩增地 *TaDHAR1* 或 *TaDHAR2* 的转录本。从图 2 中可以看出，两个 *DHAR* 成员的转录本在普通小麦的各个器官中均有表达，因此这两个成员为组成型表达的基因。两个成员具有十分相似的表达模式，均表现为在幼穗中转录本水平最高，在根和小花中的转录本水平相对较低。

2.3 *TaDHAR* 蛋白亚细胞定位的研究

尽管氨基酸基序分析的结果表明，本实验所克隆的 *TaDHAR* cDNA 序列中缺乏亚细胞定位信号肽的编码序列，但为了进一步确认两个 *TaDHAR* 蛋白的亚细胞定位，分别构建了其与 GFP 的融合蛋白的表达框，并转化了小麦原生质体。图 3 显示在表达 *TaDHAR2-GFP* 的原生质体中，GFP 荧光位于细胞质

中, 表明该融合蛋白定位于细胞质中。利用相同方法发现 TaDHAR1-GFP 也定位于细胞质中(数据未显示)。上述结果表明本研究发现的两个 *TaDHAR* 基因的产物很可能定位在小麦的细胞质中。

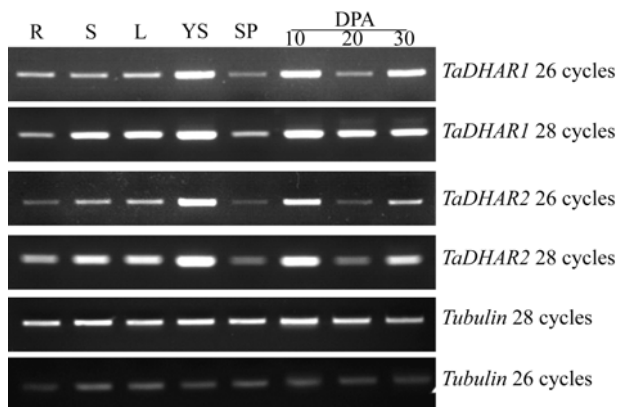


图 2 普通小麦中两个 *DHAR* 成员在不同的器官中的转录模式分析

Fig. 2 Transcriptional pattern analysis of two *TaDHAR* members in different organs of common wheat (*T. aestivum*). Transcripts were amplified using gene specific primers, with the PCR products separated using 1% agarose gel. Equal loading was maintained for all samples. R: root; S: stem; L: leaf; YS: young spike; SP: spikelet; DPA, days past anthesis.

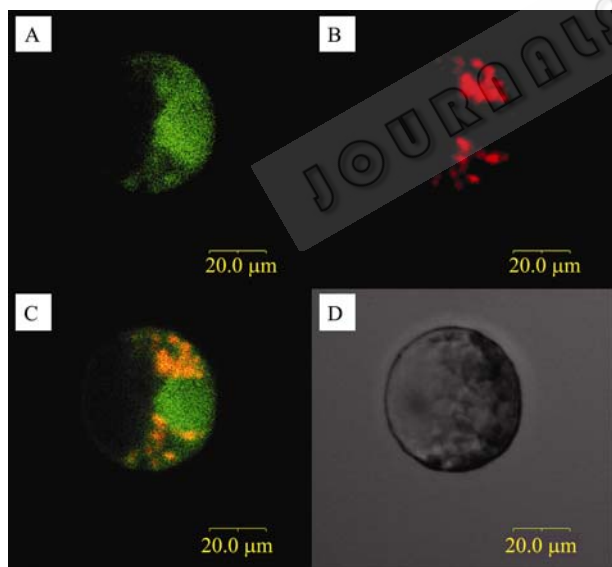


图 3 *TaDHAR2*-GFP 融合蛋白的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of *TaDHAR2*-GFP fusion protein. (A) GFP signal detected in the cytoplasm. (B) Background autofluorescence of chloroplasts. (C) A merged image of (A) and (B) showing the different localization patterns of *TaDHAR2*-GFP fusion protein and chloroplasts. (D) Bright-field image of the same protoplast shown in (A) and (B). Bar = 20 μ m.

2.4 *TaDHAR* 原核表达与 Western blotting 检测

利用 *TaDHAR1* 和 *TaDHAR2* cDNA 构建的表达载体分别转化大肠杆菌(BL21)细胞, 经 IPTG 诱导后发现 *TaDHAR* 成员的 cDNA 能有效地在大肠杆菌中表达(图 4A, 泳道 2)。通过镍柱亲和和层析纯化后, 获得了两个成员的重组蛋白(图 4A, 泳道 3 和 4)。通过与蛋白分子量标准比对, 融合蛋白的分子量介于 18~27 kD 之间(图 4A, 泳道 1、2 和 3), 与预测的蛋白(DHAR-组氨酸标签)的分子量(23.998 kD)基本吻合。用组氨酸标签抗体经 Western blotting 杂交进一步验证了两个重组蛋白是带有组氨酸标签的融合蛋白(图 4B)。

2.5 重组 *TaDHAR* 蛋白的生化特征

将纯化的带有组氨酸标签的重组蛋白分别在 pH 6.0、7.0、7.5 和 8.1 条件下测定相对酶活性。从图 5 可以看出, 在两种温度条件下(25°C 和 37°C), *TaDHAR1* 和 *TaDHAR2* 均在 pH 7.5 时具有最高的活性。两个 *TaDHAR* 在 37°C 条件下比 25°C 的活性要高。尽管两个 *TaDHAR* 在不同的 pH 和温度条件

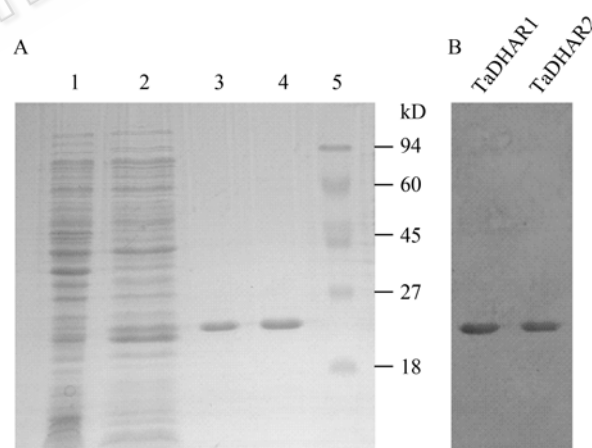


图 4 带组氨酸标签的 *TaDHAR1* 和 *TaDHAR2* 蛋白的表达与纯化

Fig. 4 Bacterial expression and purification of histidine tagged *TaDHAR1* and *TaDHAR2*. (A) 12% SDS-PAGE analysis. *TaDHAR1* was overexpressed in the bacterial cells induction by IPTG (lane 2, marked by asterisk) but not in the controls (lane 1). A similar finding was made for *TaDHAR2*. The recombinant *TaDHAR1* (lane 3) and *TaDHAR2* (lane 4) proteins could be purified by nickel affinity chromatography. Lane 5 is standard protein markers. (B) Western blotting analysis of recombinant *TaDHAR1* (lane 1) and *TaDHAR2* (lane 2) proteins using anti-histidine tag antibody. The molecular mass markers were obtained from TIANGENE BIOTECH (Beijing, China).

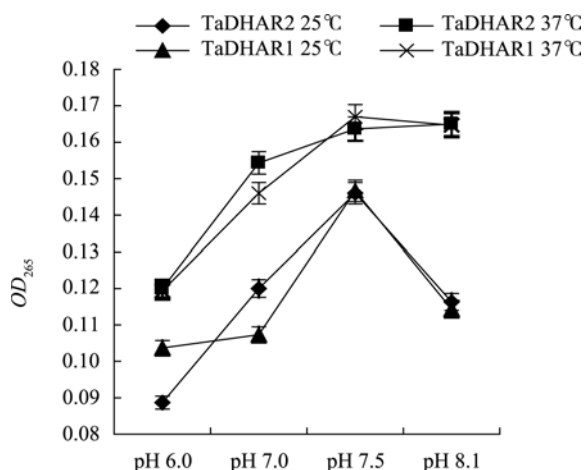


图 5 不同温度(25°C 和 37°C)和 pH 条件下 TaDHAR1 和 TaDHAR2 相对活性的比较

Fig. 5 Relative activity levels of histidine tagged recombinant TaDHAR1 and TaDHAR2 under different pH (6.0, 7.0, 7.5, 8.1) and temperature (25°C and 37°C) conditions. The OD_{265} readings, taken at 5 min after the start of the reactions, were used to measure the relative activity levels of recombinant TaDHAR1 and TaDHAR2.

下具有类似的特点,但从图中可看出,在 25°C 条件下, pH 6.0 时, TaDHAR1 的活性比 TaDHAR2 要高。

3 讨论

DHAR 酶在动植物体内广泛存在,参与细胞内 AsA 的代谢与再生,在生物体的正常生长和发育中发挥重要作用。深入研究重要农作物中 AsA 的代谢与再生对改良作物的逆境耐性可能具有重要指导和实践意义。本研究通过同源克隆的方法获得了两个不同的 *TaDHAR* cDNA 克隆,并对这两个 *TaDHAR* 基因在普通小麦不同器官中表达模式和生物学功能进行了分析。

由于普通小麦为异源六倍体,在其他物种中为单拷贝的基因在普通小麦中可能有 3 个拷贝(分别由 3 个亚基因组, A、B 和 D 编码),这些基因相互间称为部分同源等位基因^[13]。笔者在基因克隆过程中,曾试图通过大量的 cDNA 测序鉴定出其他 *TaDHAR* 成员,但目前为止尚未在 cDNA 水平上获得与 *TaDHAR1* 和 *TaDHAR2* 不同的成员。其可能的原因有 4 种。一是不同的亚基因组编码的基因,在 cDNA 水平上并没有区别;二是六倍体小麦在进化过程中,

由于异常重组丢失了部分同源基因的某个成员,如小麦中控制籽粒硬度的 *Ha* 位点的基因^[14];再者由于表观遗传学的修饰,导致某个成员不表达^[15];最后可能是某些 *TaDHAR* 基因在不同品种间存在单元型变异,基因的启动子区域发生了变化,导致某个成员不表达。笔者正在进行相关的研究,以期在遗传学上对该基因的存在和表达状况获得比较全面的认识。

在本研究获得的 cDNA 序列中, *TaDHAR1* 与 Chen 等^[3]获得的序列相同, *TaDHAR2* 在 3'UTR 区明显不同于 *TaDHAR1*, 比较两个 cDNA 推导的氨基酸序列后发现两个氨基酸差异。体外生化检测的结果表明在 pH 为 7.5 的条件下这两个氨基酸的差异对酶活性的影响不显著(图 5)。但在其他条件下(如 pH 6.0), 两个 cDNA 的蛋白产物的生化活性却表现出了显著的不同,表明这两个氨基酸的差异可能会影响 TaDHAR 蛋白在不同 pH 环境下酶学功能的发挥。在本实验中,初步确定了两种 TaDHAR 的酶学反应的最适 pH 值以及温度。前人在研究 DHAR 酶的活性时,采用的反应条件为室温下 pH 6.5、7.8 等条件^[3,9]。为了明确小麦中 DHAR 酶的特性,本实验采用两种温度(25°C 和 37°C)和 4 种不同的 pH(6.0、7.0、7.5 和 8.0)条件比较了两个重组 TaDHAR 酶的活性。结果发现两种 TaDHAR 最适 pH 在 7.5 附近,且在 37°C 的活性比 25°C 时活性要高。Kiralý 等^[16]在研究烟草花叶病毒超敏感反应时发现,无论接种病毒与否,烟草 DHAR 的活性在 30°C 时比 20°C 要高。Urano 等^[9]发现水稻 *DHAR* 基因的 mRNA 和蛋白水平受到高温(40°C)诱导。综合前人与本研究的结果,推测 *DHAR* 基因可能在植物对高温的适应性方面发挥正向作用,而且这种作用很可能与 DHAR 酶在温度相对较高条件下(37°C)表现较高活性有关,正在设计相关实验来验证上述推论。

REFERENCES

- [1] Yu CM, Li B, Li SM, *et al.* Recent advances in the research on vitamin C biosynthesis and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and crops species. *Chin Bull Bot*, 2009, **44**: 633-640.
余春梅, 李斌, 李世民, 等. 模式植物和农作物中维生素 C 生物合成与代谢研究进展. *植物学报*, 2009, **44**:

- 633–640.
- [2] Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, **52**: 437–467
- [3] Chen Z, Young TE, Ling J, *et al.* Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (6): 3525–3530.
- [4] Chen Z, Gallie DR. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, 2004, **16**(5): 1143–1162.
- [5] Chen Z, Gallie DR. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol*, 2006, **142**(2): 775–787.
- [6] Chen Z, Gallie DR. Dehydroascorbate reductase affects non-photochemical quenching and photosynthetic performance. *J Biol Chem*, 2008, **283**(31): 21347–21361.
- [7] Dixon DP, Davis BG, Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2002, **277**(34): 30859–30869.
- [8] Yoshida S, Tamaoki M, Shikano T, *et al.* Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2006, **47**(2): 304–308.
- [9] Urano J, Nakagawa T, Maki Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Lett*, 2000, **466**(1): 107–111.
- [10] Ushimaru T, Nakagawa T, Fujioka Y, *et al.* Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J Plant Physiol*, 2006, **163**(11): 1179–1184.
- [11] Liu XP, Liu XY, Zhang J, *et al.* Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Res*, 2006, **16**(3): 287–296.
- [12] Yoo SD, Cho YH, Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2007, **2**(7): 1565–1572.
- [13] Lazo GR, Chao S, Hummel DD, *et al.* Development of an expressed sequence tag (EST) resource for wheat (*Triticum aestivum* L.): EST generation, unigene analysis, probe selection and bioinformatics for a 16,000-locus bin-delineated map. *Genetics*, 2004, **168**(2): 585–593.
- [14] Chantret N, Salse J, Sabot F, *et al.* Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell*, 2005, **17**(4): 1033–1045.
- [15] Shitsukawa N, Tahira C, Kassai K, *et al.* Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat. *Plant Cell*, 2007, **19**(6): 1723–1737.
- [16] Király L, Hafez YM, Fodor J, *et al.* Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *J Gen Virol*, 2008, **89**(Pt3): 799–808.

© 2009-2010 Journals.im.ac.cn

快 讯

研究揭示木质素合成与小麦抗倒伏之间的关系

中国科学院植物研究所的研究人员通过对木质素代谢与基因表达分析,揭示了木质素合成与小麦抗倒伏之间的关系,并定位了与抗倒伏相关的木质素基因。这一成果发表在 *Journal of Experimental Botany* (2009, **60**: 2763–2771) 杂志上。

领导这一研究的是植物研究所的马庆虎博士,其早年毕业于河北大学生物系,主要研究方向为木质素及逆境代谢的分子调控,植物激素与生长发育的调控及基因工程。植物生长发育的调控与植物逆境反应适应性的关系,包括木质素代谢和其他次生物质与植物逆境的适应性,相关基因的分离和功能分析等,目前任植物研究所教授、“逆境代谢基因工程”创新研究组首席研究员。

小麦的倒伏是影响其稳产高产的一个重要因素。倒伏是一个由生理、遗传、栽培和环境等多因素调控的数量性状,对其分子水平的调控机理尚需要深入的研究。在农业生产上,通过矮化基因的开发和育种曾经有效地缓解了小麦倒伏危害的发生,但是随着株高的降低会影响小麦生物产量的潜力,因此通过增强茎秆强度,在不降低株高的情况下提高小麦的抗倒伏特性对开发高产小麦具有重要意义。木质素是植物细胞壁中起机械支持的重要高分子物质。马庆虎研究组分离了在小麦茎秆中高度表达的木质素合成关键酶基因——咖啡酸甲基转移酶基因(COMT),通过生化和转基因分析证明 COMT 在控制松柏醇型木质素上发挥着重要作用,COMT 基因的表达在抗倒伏小麦生长发育后期明显高于易倒伏品种,这种基因的高表达进一步促进了 COMT 酶蛋白和酶活力的提高,并增强了木质素的合成。小麦的 COMT 基因定位在 3B 染色体上。

该研究成果对阐明木质素代谢与倒伏关系,并通过调控木质素代谢培育抗倒伏的高产超级小麦具有重要意义。

来源: 中国科学院植物研究所