



3 种锦鸡儿属植物过氧化物酶基因的克隆及表达分析

李宁宁¹, 齐 菲¹, 安满霞¹, 李 瑜¹, 张文波², 林晓飞^{1*}

(1 内蒙古大学 生命科学学院, 呼和浩特 010021; 2 内蒙古农业大学 林学院, 呼和浩特 010019)

摘 要: 采用同源克隆技术分离了 3 种锦鸡儿属植物柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)、小叶锦鸡儿(*C. microphylla*)和中间锦鸡儿(*C. intermedia*)的过氧化物酶(POD)基因(分别命名为 *CkPOD*、*CmPOD* 和 *CiPOD*), 并对它们在干旱胁迫条件下的表达特征进行了分析。*CkPOD*、*CiPOD*、*CmPOD* 基因的 cDNA 序列均包含有 1 074 bp 的开放阅读框(ORF), 编码的蛋白质由 357 个氨基酸构成, 分子量为 38.7 kD。系统进化分析结果显示: 3 种锦鸡儿属植物的 POD 可以和鹰嘴豆等豆科植物的 POD 聚为一类, 且 *CkPOD* 和 *CmPOD* 具有较近的亲缘关系, *CiPOD* 与 *CkPOD* 和 *CmPOD* 的亲缘关系相对较远, 这一结果与 3 种锦鸡儿属植物的进化地位一致, 显示 POD 基因较为保守, 可以为锦鸡儿属植物的系统分类提供参考。PEG 模拟干旱胁迫能够强烈诱导 *CkPOD*、*CiPOD* 和 *CmPOD* 基因的表达, 显示 POD 基因在锦鸡儿属植物抵御干旱胁迫过程中发挥着重要作用。研究结果可为解析锦鸡儿属植物的耐旱机理以及利用锦鸡儿属植物进行荒漠改良和生态修复提供理论和实验依据。

关键词: 锦鸡儿; POD; 基因克隆; 基因表达; 干旱胁迫; 系统进化分析

中图分类号: Q785; Q786 **文献标志码:** A

Isolation and Expression Feature of Peroxidase Genes from Three *Caragana* Species

LI Ningning¹, QI Fei¹, AN Manxia¹, LI Yu¹, ZHANG Wenbo², LIN Xiaofei^{1*}

(1 College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 2 College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract: Peroxidase (POD) genes were isolated from three *Caragana* species, *C. korshinskii*, *C. microphylla* and *C. intermedia* (designated as *CkPOD*, *CmPOD* and *CiPOD*, respectively) using homology-based cloning techniques, and their expression profiles under drought stress conditions were investigated. All of the cDNAs of *CkPOD*, *CiPOD* and *CmPOD* contain an open reading frame (ORF) of 1 074 bp, encoding a protein of 357 amino acids with a theoretical molecular weight of 38.7 kD. Phylogenetic analysis showed that these three *Caragana* PODs could be clustered into one clade with their isoforms from leguminosae, including *Cicer arietinum*. The PODs of *C. korshinskii* and *C. microphylla* showed a closer relationship compared to *C. intermedia* POD, corresponding to evolutionary history of the three *Caragana* plants. Real time RT-PCR revealed that the expression of the *Caragana* POD genes was strongly induced by PEG-simulated drought stress, showing that the *Caragana* POD genes play an important role in resis-

收稿日期: 2016-06-14; 修改稿收到日期: 2016-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(31260168); 内蒙古自然科学基金(2015MS0355)

作者简介: 李宁宁(1986—), 男, 在读博士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: lining86@outlook.com

* 通信作者: 林晓飞, 副教授, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: linxiaofei04@hotmail.com

ting drought-tolerance. These results may provide theoretical and experimental basis for understanding the drought-tolerance mechanism of the *Caragana* plants and for their utilization in desert improvement and vegetation restoration programs.

Key words: *Caragana*; peroxidase; gene cloning; gene expression; drought stress; phylogenetic analysis

过氧化物酶(Peroxidase, POD)是一种以血红素为辅基的氧化酶,广泛存在于动植物体中,可催化过氧化氢和有机过氧化物对各种有机物和无机物的氧化作用^[1-2]。过氧化物酶家族可分为三类,第一类是与细菌过氧化物酶相关的胞内过氧化物酶,例如抗坏血酸盐过氧化物酶或啤酒酵母的细胞色素 c 过氧化物酶等;第二类是真菌分泌的过氧化物酶,例如木质素过氧化物酶或锰过氧化物酶;第三类是具有信号肽并通过分泌途径起作用的植物过氧化物酶,该类过氧化物酶在植物中广泛存在^[3-4]。前人的研究表明,POD 参与植物的形态建成,在植物生长发育过程中发挥重要作用,例如:植物细胞壁结构蛋白交联、木质素聚合、栓化作用、激素诱导、生长素的降解和异化以及衰老等^[5-11]。另一方面,POD 作为植物保护酶系统的重要成员之一参与植物抵御逆境反应。它通过与超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)相互协调配合,清除细胞内过剩的自由基,使体内自由基维持在正常的动态平衡,以减少逆境对植物体造成的氧化损伤。植物中的过氧化物酶既有组成型表达的,也有诱导型表达的。在病原菌侵染、冷冻、干旱、重金属离子、机械损伤等生物和非生物胁迫条件下,POD 能够被诱导表达^[12-21]。特别是在干旱胁迫条件下,植物体内的 POD 活性会明显升高,显示 POD 能够在植物抵御干旱胁迫中发挥作用^[22-24]。目前,在植物抗逆品种的选育工作中,POD 活性常常被作为苗期筛选抗性材料的生化指标^[25]。

锦鸡儿属(*Caragana* Fabr.)植物是豆科多年生落叶灌木,广泛分布于中国西北地区的荒漠地带,具有较强的抗旱能力,是干旱、半干旱地区常见的防风固沙及沙地牧场改良的优良树种。在过去的 100 年里,由于人类的过度干预,中国西北地区黄土高原地带自然植被被大量破坏。在 20 世纪中叶,该地区实施了大规模的植被修复工程^[26]。由于柠条锦鸡儿(*C. korshinskii*)、中间锦鸡儿(*C. intermedia*)和小叶锦鸡儿(*C. microphylla*)具有强大的根系和广泛的适应性,故而作为理想的植物材料被广泛用于生态修复工程。因此,比较研究这 3 种锦鸡儿属植物的耐旱机制,可为它们在生态修复工程中的合理

利用提供依据。在前期研究中调查了干旱胁迫条件下这 3 种锦鸡儿属植物 SOD 基因的表达特征^[27],本工作克隆了该 3 种植物的 POD 基因,并比较分析了它们在干旱胁迫下的表达特性,以期与研究锦鸡儿属植物的抗旱分子机理及利用锦鸡儿属植物进行荒漠改良和生态修复提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究的初始材料为柠条锦鸡儿、中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿的种子。柠条锦鸡儿种子采自巴彦淖尔狼山前冲积扇锦鸡儿灌丛,中间锦鸡儿种子采自准格尔黄上丘陵沟壑区中间锦鸡儿灌丛,小叶锦鸡儿采自锡林格勒锡林河流域小叶锦鸡儿灌丛。挑选饱满、均一无虫蛀的种子,经 75%乙醇和 0.1%升汞消毒后,置于铺有 3 层湿滤纸的培养皿内萌发。取长势一致的幼苗移栽于盛有石英砂的容器中,置于 25℃、14 h/d 光周期、光照强度 36~40 μmol·m⁻²·s⁻¹的光照培养箱中培养,并定时定量浇灌 1/2 Hoagland 营养液。生长 7 周左右的幼苗用于提取 RNA。

主要试剂: TaKaRa RNA Extraction Kit (TaKaRa)、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0、克隆载体 pMD-19T (TaKaRa)、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)、DNA Gel Extraction Kit (AXYGEN)、Takara RT-PCR Kit (TaKaRa)、大肠杆菌感受态(*Escherichia coli*) DH5a (TaKaRa)、TransScript All-in-One First-Strand cDNA synthesis SuperMix (TransGen) 和 TransStart Tip Green qPCR SuperMix (TransGen) 等。其他生化及分子生物学试剂均为国产分析纯。本研究所有引物合成及测序工作均由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 3 种锦鸡儿属植物 POD 基因的克隆 利用 ClustalW 软件对 GenBank 已登录的亚麻(*Linum usitatissimum*, AAB47602.1)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*, AAB41811.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AAA32842.1)、野生萝卜(*Armoracia rusticana*

na, CAA40796.1) 和大豆 (*Glycine max*, AAL40127.1) 过氧化物酶的氨基酸序列进行多重同源比对, 在保守区域设计 1 对兼并引物 Deg-POD-F (5'-CAYTTY-CAYGAYTGYTTYGT-3') 和 Deg-POD-R (5'-GTRTT-NARNGTNGGRTCNGG-3')。

利用 TaKaRa RNA Extraction Kit 提取 3 种锦鸡儿属植物的总 RNA, 并采用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 反转录合成 cDNA 第一链。以柠条锦鸡儿 cDNA 为模版, 利用 Deg-POD-F 和 Deg-POD-R 兼并引物, 经 PCR 扩增 *CkPOD* 基因片段。PCR 反应体系为: 10×PCR buffer 2.5 μL、dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2.0 μL、Deg-POD-F (50 μmol/L) 1.0 μL、Deg-POD-R (50 μmol/L) 1.0 μL、Takara *rTaq* (5 U/μL) 0.2 μL, 加去离子水至 25 μL。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 47.5℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。

根据已获得的 *CkPOD* 基因序列设计该基因的特异性引物 POD-GSP-R (5'-GAGCAGCAAGGGCAA-GAATATCAGC-3'); POD-GSP-F (5'-CTGCTCTTTAT-TCGTGGACCG-3'), 用于末端克隆。利用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒合成 cDNA 第一链, 利用 POD-GSP-R 和试剂盒提供的 UPM 引物扩增 *CkPOD* 的 5' 末端序列。PCR 反应体系为: 10×*Ex* PCR buffer 2.5 μL、dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2.0 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μL、POD-GSP-R (10 μmol/L) 1.0 μL、UPM (10×) 2.5 μL、Takara *Ex Taq* HS (5 U/μL) 0.2 μL, 加去离子水至 25 μL。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 7 min。利用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 试剂盒提供的 Oligo(dT) 引物, 以柠条锦鸡儿总 RNA 为模版合成 cDNA 第一链, 使用 POD-GSP-F 和 M13M4 引物扩增 *CkPOD* 3' 末端序列。PCR 反应体系为: 10×*Ex* PCR buffer 2.5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 各 2.0 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μL、POD-GSP-F (10 μmol/L) 1.0 μL、M13M4 (10 μmol/L) 1.0 μL、Takara *Ex Taq* HS (5 U/μL) 0.2 μL, 加去离子水至 25 μL。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 7 min。

根据 RACE-PCR 获得的 *CkPOD* 末端序列, 在其上下游分别设计引物 Full-POD-F (5'-AT-GAAGTACTCCCTTCGTCTC-3') 和 Full-POD-R (5'-TGTCATGGATGTGCC-3')。分别以 3 种锦鸡儿属植物的 cDNA 为模版, 利用 Full-POD-F 和 Full-

POD-R 引物, 扩增柠条锦鸡儿、中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿 POD cDNA 全长序列。PCR 反应体系为: 10×*Ex* PCR buffer 2.5 μL、dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2.0 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μL、Full-POD-F (10 μmol/L) 1.0 μL、Full-POD-R (10 μmol/L) 1.0 μL、Takara *Ex Taq* HS (5 U/μL) 0.2 μL, 加去离子水至 25 μL。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 49℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 DNA Gel Extraction Kit 回收目的片段, 与克隆载体 pMD-19T 连接并转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 将 PCR 检测为阳性的重组菌进行扩大培养后送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.2 3 种锦鸡儿 POD 基因的生物信息学分析

将所克隆的 3 种锦鸡儿属植物 POD cDNA 序列进行 BlastX 同源性比对; 利用 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 识别 ORF, 并将其翻译成相应氨基酸序列; 利用 ExPASy 数据库的 PortParam 软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 对编码的氨基酸序列的基本性质进行预测。在 GenBank 中搜索不同植物 POD 基因的氨基酸序列, 与 3 种锦鸡儿属植物的 POD 氨基酸序列进行 Clustal W 多重比对, 并利用 MEGA5.0 软件的邻接法 (neighbor-joining, N-J 法) 构建系统进化树。

1.2.3 3 种锦鸡儿属植物 POD 基因在干旱胁迫下的表达检测 为了比较分析这 3 种锦鸡儿属植物 POD 基因在干旱胁迫下的表达特性, 将生长 7 周左右的幼苗分别进行 5%、15% 和 25% PEG 模拟干旱胁迫, 并分别在第 1 天、第 3 天、第 5 天和第 7 天提取胁迫处理的 3 种锦鸡儿属植物的总 RNA, 利用 Roche LightCycler480 II 系统进行实时荧光定量 PCR 对其表达量进行检测。根据已获得的 3 种锦鸡儿属植物 POD 基因序列设计特异性引物 POD-RT-F (5'-TGATATTCTTGCCCTTGC-3') 和 POD-RT-R (5'-GGCTTTGGTTGGCTGTTA-3'), 利用柠条锦鸡儿的肌动蛋白基因 (*CkActin*, FJ485727.1 Ck-ACT-RT-F: 5'-CAACCCTAAGGCTAATCG-3', Ck-ACT-RT-R: 5'-GCATAAAGGGAAAGGACA-3') 作为内参, 使用 TransScript All-in-One First-Strand cDNA synthesis SuperMix 试剂盒合成 cDNA; 并使用 TransStart Tip Green qPCR SuperMix (TransGen) 试剂盒进行实时荧光定量 PCR。反应体系为: 2×TS Tip Super Mix 10 μL、Primer-F

(POD-RT-F 和 Ck-ACT-RT-F, 10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL 、Primer-R (POD-RT-R 和 Ck-ACT-RT-R, 10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL 、cDNA 1.0 μL , 加去离子水至 20 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 48 个循环; 溶解曲线从 65~97 $^{\circ}\text{C}$ 。所有实验均进行 3 次重复, 实验数据经 SPSS 19.0 软件进行统计分析并绘图。

2 结果与分析

2.1 3 种锦鸡儿属植物 POD 基因的克隆

2.1.1 柠条锦鸡儿 POD 基因片段及末端序列的克隆 以柠条锦鸡儿总 RNA 反转录所合成的 cDNA 第一链为模板, 利用在 POD 保守区域设计的兼并引物 Deg-POD-F 和 Deg-POD-R, 通过 RT-PCR 扩增获得了 500 bp 的基因片段(图 1, A)。Blast X 分析显示, 所获得的序列与其他高等植物 POD 基因序列具有高度同源性, 可初步确定其为柠条锦鸡儿的 POD 基因片段, 并将其命名为 *CkPOD*。根据已获得的 500 bp 的 *CkPOD* 基因序列设计特异性引物 POD-GSP-F 和 POD-GSP-R, 采用 RACE 技术分离了 *CkPOD* 的 3' 末端序列 570 bp(图 1, B)和 5' 末端序列 500 bp(图 1, C)。

2.1.2 3 种锦鸡儿属植物 POD 基因全长序列的克隆 由于柠条锦鸡儿、中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿的亲缘关系较近, 故而利用同源克隆的方法进行该 3 种植物 POD 基因序列的分离。在 *CkPOD* 的 5' 末端设计引物 Full-POD-F、3' 末端设计引物 Full-POD-R, 分别以 3 种锦鸡儿属植物总 RNA 反转录得到的 cDNA 第一链为模版, 经 PCR 扩增获得了 1 074 bp 的基因序列(图 2)。通过测序和分析后证

实它们是柠条锦鸡儿、中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿 POD 基因的 cDNA 序列。

2.2 3 种锦鸡儿属植物 POD 基因序列分析 *CkPOD*、*CiPOD* 和 *CmPOD* 基因 cDNA 均包含 1 074 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 357 个氨基酸。利用 ExPASy 数据库中的 PortParam 软件在线分析结果显示, *CkPOD*、*CiPOD* 和 *CmPOD* 的蛋白分子量均为 38.7 kD, 理论等电点分别为 6.98、6.09 和 6.59。利用在线软件 TargetP 进行分析结果显示, 3 种植物的 POD 均为分泌途径中的蛋白, 且均具有 28 个氨基酸的信号肽(图 3)。跨膜结构域预测显示, 3 种植物的 POD 蛋白均具有 3 个跨膜结构域(7~26 aa, 119~144 aa, 182~201 aa, 图 3)。绝大多数植物 III 型 POD 保守的 8 个半胱氨酸残基也被发现在所克隆的 3 个基因序列中(40~120、73~78、126~328 和 205~237 位), 它们分别形成 4 个紧密相连的二硫键桥以维持酶结构的稳定性。另外, 以 Asp-72、Asp-79、Ser-81、Val-75 和 Gly-77 为中心的 Ca^{2+} 结合位点构成远端的氧供体结构域, 而以 Thr-199、Asp-250、Thr-253、Asp-258 和 Val-256 为中心的 Ca^{2+} 结合位点则构成了近端氧供体结构域。位于 2 个结构域中间的血红素则由 Fe^{2+} 与 His-71 和 His-198 形成共价键, 构成活性中心; His-198 与 Asp-275 通过氢键形成咪唑环以协助维持血红素活性中心的稳定(图 3)。

利用 Clustal W 软件对 *CkPOD*、*CiPOD* 和 *CmPOD* cDNA 进行多重比对发现(图 3), 3 条序列中有 23 个核苷酸不同, 其中 *CkPOD* 和 *CmPOD* 间有 11 个核苷酸不同, *CiPOD* 和 *CmPOD* 间有 16 个核苷酸不同, 而 *CkPOD* 和 *CiPOD* 间则有 19 个核苷

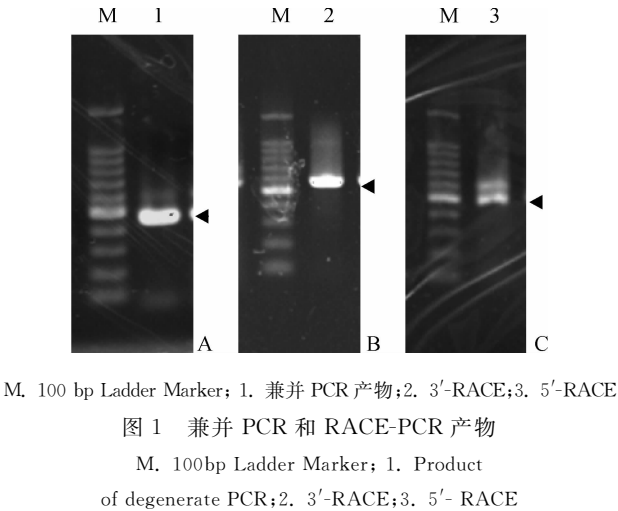


Fig. 1 Products of degenerate PCR and RACE-PCR

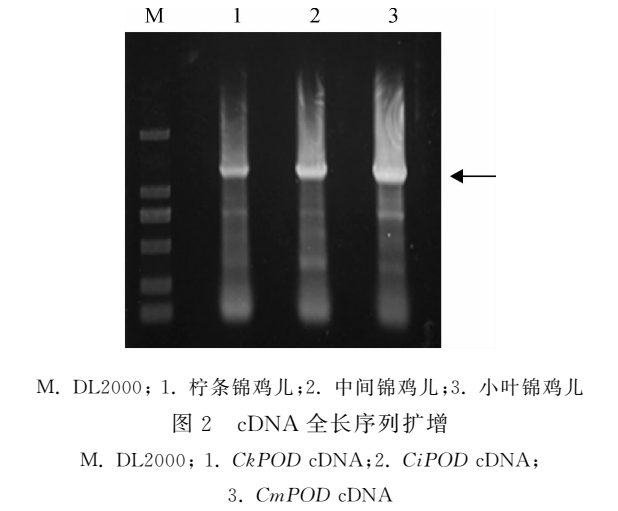
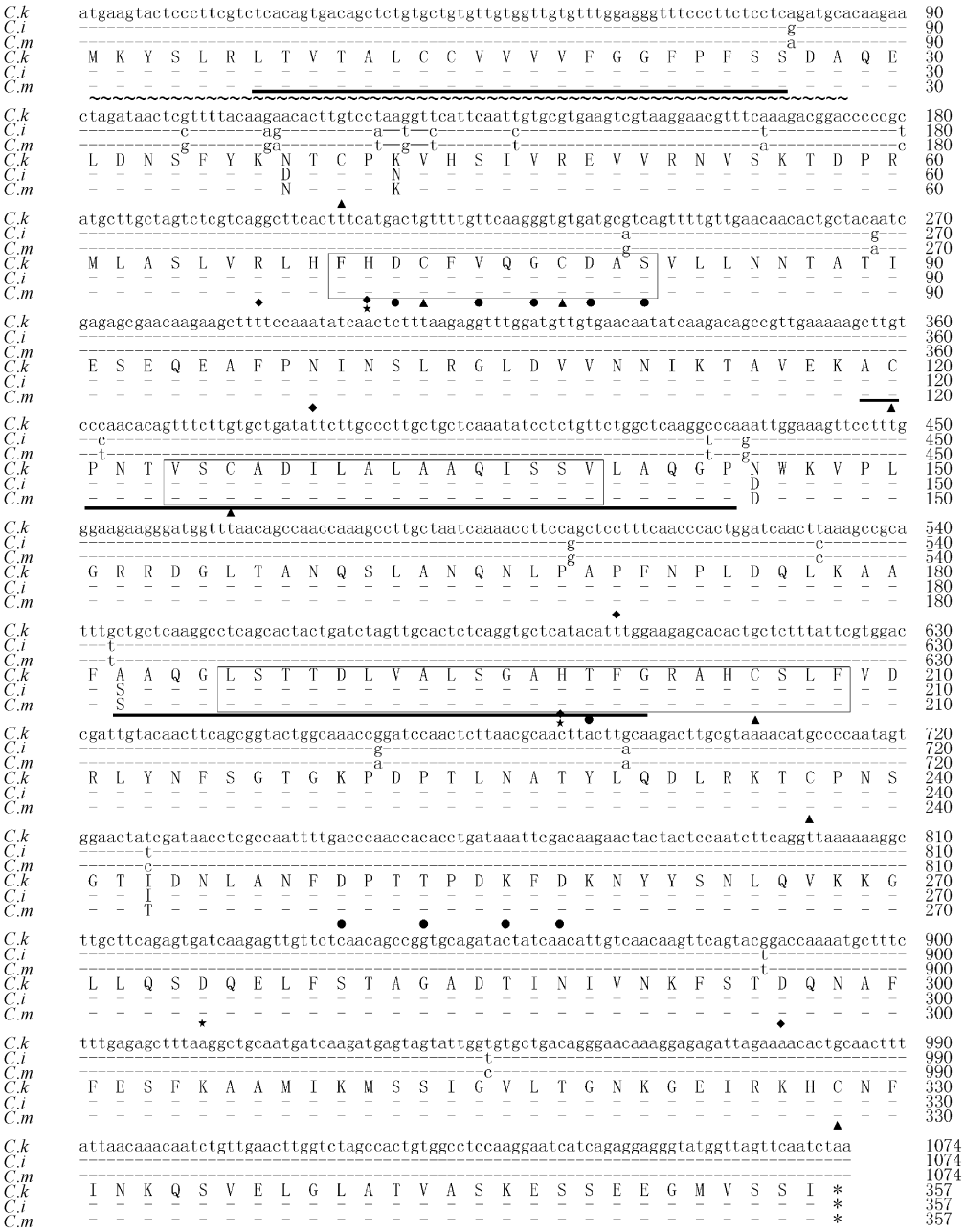


Fig. 2 Amplification of full-length cDNA



C. k. 柠条锦鸡儿; *C. i.* 中间锦鸡儿; *C. m.* 小叶锦鸡儿; 波浪线为信号肽序列, 下划线为跨膜结构域, 方框为活性中心构成序列, ●表示与 Ca^{2+} 结合的氨基酸残基; ▲表示形成二硫键的半胱氨酸残基, ◆表示活性作用位点的氨基酸残基序列, ★表示与血红素结合相关的氨基酸残基

图3 *CkPOD*、*CiPOD* 和 *CmPOD* 的 cDNA 及氨基酸序列比对

C. k. *C. korshinskii*; *C. i.* *C. intermedia*; *C. m.* *C. microphylla*; Wavy lines indicated the putative signal peptide, underline indicated the transmembrane domains, the boxes represent the putative catalytic domain, ● indicated the Ca^{2+} site hydrogen bonded to the residues, ▲ indicated the cysteine residues involved in disulfide bridges, ◆ indicated the active site residues and ★ indicated the residues bonding to heme iron atom

Fig. 3 Alignment of cDNAs and amino acids of *CkPOD*, *CiPOD* and *CmPOD*

酸不同。对 *CkPOD*、*CiPOD* 和 *CmPOD* 的氨基酸序列进行比对结果显示, 3 种 POD 之间只有 5 个氨基酸不同, 其中 *CkPOD* 和 *CmPOD* 有 3 个不同的氨基酸(145、182 和 243 aa), *CiPOD* 和 *CmPOD* 也有 3 个不同的氨基酸(38、42 和 243 aa), 而 *CkPOD*

和 *CiPOD* 有 4 个不同的氨基酸(38、42、145 和 182 aa, 图 3)。基于 21 种植物 POD 蛋白的氨基酸序列构建的系统进化树显示, 3 种锦鸡儿属植物的 POD 与鹰嘴豆等豆科植物 POD 蛋白聚为一类。柠条锦鸡儿和小叶锦鸡儿的 POD 具有较近的亲缘关系, 而

与 Ca^{2+} 结合的保守氨基酸残基,形成二硫键桥的 8 个半胱氨酸残基以及与血红素结合相关的天冬氨酸和组氨酸残基^[31],可进一步说明 *CkPOD*、*CiPOD* 和 *CmPOD* 基因编码的蛋白具有过氧化物酶活性。另外,所克隆的 3 种锦鸡儿属植物 POD 蛋白均含有信号肽序列,显示它们可能为第三类过氧化物酶基因^[32]。

目前国内外学者对同属小叶系的小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的种间亲缘关系,特别是对于中间锦鸡儿是否是一个独立的物种存有较大的争议。Sanczir^[33]、富象乾^[34]、刘嫫心^[35] 和赵一之^[36] 等认为中间锦鸡儿是一个独立的物种;Yakovlev^[37] 认为中间锦鸡儿与柠条锦鸡儿为同一物种;张明理等^[38] 认为中间锦鸡儿是柠条锦鸡儿的一个变种;而徐朗然和郝秀英^[39] 则认为中间锦鸡儿是小叶锦鸡儿的一个变种。侯鑫等通过分析该 3 种植物 ITS 和叶绿体 trnL-F 基因序列否定了中间锦鸡儿的杂交起源假说,认为小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿是一个连续的地理渐变群^[40]。本研究利用 *POD* 基因序列进行系统进化分析结果显示,柠条锦鸡儿和小叶锦鸡儿的 *POD* 具有较近的亲缘关系,而中间锦鸡儿则与柠条锦鸡儿和小叶锦鸡儿 *POD* 的亲缘关系相对较远;这一结果支持侯鑫等关于该 3 种植物进化关系的推论。该结果也在一定程度上说明 *POD* 基因的起源非常古老且较为保守,可作为分子标记为植物的分类提供参考。

POD 作为植物保护酶系统的成员之一,与 *SOD* 和 *CAT* 协同作用参与植物抵御生物和非生物胁迫。在胁迫条件下植物体内的 *POD* 活性升高,以清除植物体内过剩的自由基^[41-45],避免氧化损伤。在 PEG 模拟干旱胁迫条件下 *CkPOD*、*CiPOD* 和 *Cm-*

参考文献:

[1] JOSHI D K, GOLD M H. Oxidation of dimethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, **237**(1):45-57.

[2] SHANNON L M, KAY E, LEW J Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, **241**(9):2 166-2 172.

[3] DELANNOY E, LA J, ASSIGBETSE K, *et al.* Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*; MPMI, 2003, **16** (11):1 030-1 038.

POD 表达量均明显升高,显示该基因在锦鸡儿属植物抵御干旱胁迫中发挥重要作用。该结果亦与拟南芥 (*A. thaliana*)^[41]、杨树 (*Populus peroxisoma*)^[42]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[43]、三叶胶 (*Grimmia piliifera*)^[44] 和甘蔗 (*Saccharum officinarum*)^[45] 等植物 *POD* 表达特性的报道一致。柠条锦鸡儿、中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿在地理分布上是随着水分梯度自西向东呈替代分布^[40],其中柠条锦鸡儿的抗旱性最强,小叶锦鸡儿的抗旱性最弱^[46]。李凤玲等^[47] 的研究表明,在干旱胁迫条件下该 3 种锦鸡儿属植物的 *POD* 活性明显提高,其中柠条锦鸡儿 *POD* 的活性明显高于中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿,该结果与本研究 3 种锦鸡儿属植物 *POD* 基因表达量的分析结果有所差异。在胁迫初期小叶锦鸡儿的 *CmPOD* 表达量最高,其次是柠条锦鸡儿 *CkPOD*,而中间锦鸡儿 *CiPOD* 的表达量最低。植物的 *POD* 是一个庞大的基因家族,其成员数量众多,每一个成员可能有不同的表达模式,对总 *POD* 活性的贡献也有所不同。另一方面,转录水平上基因表达量的微弱差异并不能够反映其在翻译水平上表达量的差异。因此,分离该 3 种锦鸡儿属植物其它 *POD* 成员并比较分析它们的表达模式对于深入研究其耐旱机理是非常必要的。

干旱作为一个重要的非生物胁迫因子严重制约农作物及牧草的生产,因此,研究植物的抗旱分子机理、采用分子生物学技术手段进行作物的抗旱性遗传改良、或者筛选具有应用价值的抗旱作物品种非常必要。本研究为深入研究锦鸡儿属植物的抗旱分子机理及利用锦鸡儿属植物进行荒漠改良和生态修复提供了一定的理论和实验依据。

[4] HIRAGA S, SASAKI K, ITO H, *et al.* A large family of class III plant peroxidases [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2001, **42**(5):462-468.

[5] MORGENS P H, CALLAHAN A M, DUNN L J, *et al.* Isolation and sequencing of cDNA clones encoding ethylene-induced putative peroxidases from cucumber cotyledons [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, **14**(5):715-25.

[6] KIM K Y, KWON H K, KWON S Y, *et al.* Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon [J]. *Phytochemistry*, 2000, **54**(1): 19-22.

[7] WHETTEN R W, MACKAY J J, SEDEROFF R R. Recent

- advances in understanding lignin biosynthesis[J]. *Annual review of Plant Biology*, 1998, **49**(1): 585-609.
- [8] LEE T T. Role of phenolic inhibitors in peroxidase-mediated degradation of indole-3-acetic acid [J]. *Plant Physiology*, 1977, **59**(3):372-375.
- [9] 朱晓红, 曹显祖. 花药中生长素的积累与过氧化物酶活性的关系[J]. 植物生理学报, 1996, (4):254-257.
- ZHU X H, CAO X Z. Relationship between the accumulation of IAA and the peroxidase activity in anthers[J]. *Plant Physiology Communication*, 1996, (4):254-257.
- [10] HIRAGA S, YAMAMOTO K, ITO H, *et al.* Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes[J]. *Febs Letters*, 2000, **471**(2/3):245-250.
- [11] PASSARDI F, COSIO C, PENEL C, *et al.* Peroxidases have more functions than a Swiss army knife[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, **24**(5):255-265.
- [12] REBMANN G, HERTIG C, BULL J, *et al.* Cloning and sequencing of cDNAs encoding a pathogen-induced putative peroxidase of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, **16**(2):329-331.
- [13] MOHAN R, BAJAR A M, KOLATTUKUDY P E. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (*tap1*) by wounding in transgenic tobacco and activation of *tap1*/GUS and *tap2*/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack[J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, **21**(2):341-354.
- [14] VALERIO L, MEYER M D, PENEL C, *et al.* Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family[J]. *Phytochemistry*, 2004, **65**(10):1 331-1 342.
- [15] BAE E K, LEE H, LEE J S, *et al.* Molecular cloning of a peroxidase gene from poplar and its expression in response to stress[J]. *Tree Physiology*, 2006, **26**(11):1 405-1 412.
- [16] MITTLER R, ZILINSKAS B A. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**(30): 21 802-21 807.
- [17] ASADA K, FOYER C H, MULLINEAUX P M. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues [J]. *Pure & Applied Chemistry*, 1994, **79**(12): 2 217-2 227.
- [18] 刘世鹏, 刘济明, 陈宗礼, 等. 模拟干旱胁迫对枣树幼苗的抗氧化系统和渗透调节的影响[J]. 西北植物学报, 2006, **26**(9):1 781-1 787.
- LIU S P, LIU J M, CHEN Z L, *et al.* Effects of simulated drought on antioxidative enzymes and osmotic regulation in *Zizyphus jujuba* seedlings[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, **26**(9):1 781-1 787.
- [19] 朱维琴, 吴良欢, 陶勤南. 干旱逆境对不同品种水稻生长、渗透调节物质含量及保护酶活性的影响[J]. 科技通报, 2006, **22**(2):176-181.
- ZHU W Q, WU L H, TAO Q N. Growth and physiological adaptation of different rice (*Oryza sativa* L.) varieties in response to drought stress[J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2006, **22**(2):176-181.
- [20] 肖 强, 高建明, 罗立廷. 干旱胁迫对空心莲子草抗氧化酶活性和组织学的影响[J]. 生物技术通讯, 2006, **17**(4): 556-559.
- XIAO Q, GAO J M, LUO L T. Effects of drought stress on the activities of anti-oxidant enzymes and histology in *Alternanthera philoxeroides*[J]. *Letters in Biotechnology*, 2006, **17**(4):556-559.
- [21] 张中华, 杨建平, 陈圣栋. 低温胁迫对非莱膜透性及保护酶活性的影响[J]. 西北农业学报, 2006, **15**(2):124-127.
- ZHANG Z H, YANG J P, CHEN S D, *et al.* Effect of low temperature stress on protective enzyme activity and membrane permeability in Chinese Chives[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2006, **15**(2):124-127.
- [22] 刘灵娣, 李存东, 孙红春, 等. 干旱对不同铃重基因型棉花叶片细胞膜伤害、保护酶活性及产量的影响[J]. 棉花学报, 2009, **21**(4):296-301.
- LIU Y D, LI C D, SUN H C, *et al.* Effects of drought on cell membrane damage, activities of protective enzymes and yield of different boll-weight genotypes in cotton[J]. *Cotton Science*, 2009, **21**(4):296-301.
- [23] 吴丽云, 曹帮华, 邵 伟, 等. PEG 胁迫对八棱海棠种子萌发及幼苗生理的影响[J]. 山东科学, 2011, **24**(1):36-39.
- WU L Y, CAO B H, SHAO W, *et al.* Effects of PEG stress on seed germination and seedling physiology of *Malus robusta* [J]. *Shandong Science*, 2011, **24**(1):36-39.
- [24] 熊正英, 张志勤, 王致远, 等. POD 活性与水稻抗旱性的关系[J]. 陕西师范大学报, 1995, **12**(23):63-69.
- XIONG Z Y, ZHANG Z Q, WANG Z Y, *et al.* Relationship of peroxidase activity with drought resistance of rice [J]. *Journal of Shanxi Normal University*, 1995, **12**(23):63-69.
- [25] 曹锡清. 脂质过氧化对细胞与机体的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, **2**:17-23.
- CAO X Q. The function of lipid peroxidation for cell and organism[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1986, **2**:17-23.
- [26] LIU Y, LEI H, AN L, *et al.* Arbuscular mycorrhizal dynamics in a chronosequence of *Caragana korshinskii* plantations[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2009, **67**(1):81-92.
- [27] ZHANG W B, LI N N, QI F, *et al.* Isolation and expression analysis of Cu/Zn superoxide dismutase genes from three *Caragana* species[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2014, **61**(5):656-663.
- [28] DUROUX L, WELINDER K G. The peroxidase gene family in plants: A phylogenetic overview[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, **57**(4):397-407.
- [29] PASSARDI F, LONGET D, PENEL C, *et al.* The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants[J]. *Phytochemistry*, 2004, **65**(13):1 879-1 893.
- [30] WU W, LU J, WEI Y, *et al.* Isolation and characterization of the first putative peroxidase gene from oilseed rape (*Bras-*

- sica napus*) which is highly homologous to HRPC[J]. *Bioscience Reports*, 2006, **26**(3):263-280.
- [31] SHULAEV V, OLIVER D J. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. new tools for reactive oxygen species research [J]. *Plant Physiology*, 2006, **141** (2): 367-372.
- [32] 程 华, 李琳玲, 王 燕, 等. 银杏过氧化物酶基因 POD1 的克隆及表达分析[J]. 华北农学报, 2011, **25**(6):44-51.
CHENG H, LI L L, WANG Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of POD1 gene from ginkgo biloba L. [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, **25**(6): 44-51.
- [33] SANCZIR Cz.. A new species of *Caragana* [J]. *Botanicheskii Zhurnal*, 1974, **59**: 233.
- [34] 富象乾. 内蒙古植物志(第 3 卷,第 1 版)[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1977: 163-179.
- [35] LIOU Y X. Some new species of *Caragana* and *Chesneya* from China[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1984, **22**(3): 209-216.
- [36] 赵一之. 中国锦鸡儿属的分类学研究[J]. 内蒙古大学学报: (自然科学版), 1993, **24**(6):631-653.
ZHAO Y Z. A taxonomic study on *Caragana* in China[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nei Mongol*, 1993, **24**(6): 631-653.
- [37] YAKOVLEV G P. *Plantae Asiae Centralis*[M]. *Leningrad: Nauka*, 1988, **8**: 24-44.
- [38] 张明理, 朱光华. 锦鸡儿属(豆科)一新组合[J]. 植物研究, 2004, **24**(1):5-6.
ZHANG M L, ZHU G H. A new combination of *Caragana* (Fabaceae) from China[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2004, **24**(1):5-6.
- [39] 徐朗然, 郝秀英. 黄土高原和秦岭山地锦鸡儿属植物的分类和地理分布的研究[J]. 西北植物学报, 1989, **9**(2):92-101.
XU L R, HAO X Y. A study on classification and distribution of *Caragana* on LoessTableland and Mount Qin[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1989, **9**(2):92-101.
- [40] 侯 鑫, 刘俊娥, 赵一之, 等. 基于 ITS 序列和 trnL-F 序列探讨小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的种间关系[J]. 植物分类学报, 2006, **44**(2):126-134.
HOU X, LIU J E, ZHAO Y Z, *et al.* Interspecific relationships of *Caragana microphylla*, *C. davazamcii* and *C. korshinskii* (Leguminosae) based on ITS and trnL-F data sets [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2006, **44**(2):126-134.
- [41] ZHANG H, WANG J, NICKEL U, *et al.* Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, **34**(6):967-971.
- [42] LI Y J, HAI R L, DU X H, *et al.* Over-expression of a *Populus peroxisomal* ascorbate peroxidase (*PpAPX*) gene in tobacco plants enhances stress tolerance[J]. *Plant Breeding*, 2009, **128**(4):404-410.
- [43] SUN W H, MING D, SHU D F, *et al.* Over-expression of *StAPX* in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, **29**(8):917-926.
- [44] LUKE L P, SATHIK M B M, THOMAS M, *et al.* Quantitative expression analysis of drought responsive genes in clones of *Hevea* with varying levels of drought tolerance[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2015, **21**(2): 179-186.
- [45] WANG S, ZHANG K K, HUANG X, *et al.* Cloning and Functional analysis of thylakoidal ascorbate peroxidase (*TAPX*) gene in Sugarcane[J]. *Sugar Tech*, 2015, **17**(4):1-11.
- [46] 杨明博, 杨 劼, 杨九艳. 鄂尔多斯高原不同生境下中间锦鸡儿(*Caragana davazameii*)叶片的游离脯氨酸、丙二醛含量以及 POD 活性的变化[J]. 内蒙古大学学报, 2005, **36**(2): 192-196.
YANG M B, YANG J, YANG J Y. The changes of free proline and MDA contents and POD activity of *Caragana davazameii* in different habitats in Erdos Plateau[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol*, 2005, **36** (2):192-196.
- [47] 李凤玲. 锦鸡儿属(*Caragana* Fabr)三种植物实生苗水分关系与抗旱性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009.

(编辑:宋亚珍)