

# 苎麻抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆和表达分析

朱守晶<sup>1</sup>, 周精华<sup>1</sup>, 揭雨成<sup>1,2</sup>, 邢虎成<sup>1</sup>, 钟英丽<sup>1</sup>, 余玮<sup>1</sup>, 段卓<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>湖南农业大学苎麻研究所, 长沙 410128; <sup>2</sup>湖南省种质资源创新与资源利用重点实验室, 长沙 410128)

**摘要:** 抗坏血酸过氧化物酶(APX)在植物响应逆境胁迫中具有重要作用。根据苎麻转录组测序中的 Unigene42508 片段序列,通过 RT-PCR 结合 RACE 技术从中苎 1 号苎麻品种中克隆该基因的全长 cDNA 序列。BLAST 分析表明,该基因编码蛋白属于植物过氧化物酶超家族成员,将其命名为 *BnAPX1*。其 cDNA 全长为 1201 bp,含有一个 870 bp 的开放阅读框,编码一个含 289 个氨基酸残基,分子量为 31.4 kDa,等电点(pI)为 5.88 的假定蛋白。其氨基酸序列与棉花(EU244478)、毛白杨(AY789051)、马蹄莲(AF159254)、大豆(AB331961)、豇豆(AY466858)和麻风树(GQ337076)的相似性分别为 84%、82%、81%、79%、80% 和 82%。实时荧光定量 PCR 检测发现,*BnAPX1* 基因在苎麻根、茎中段、茎尖、茎皮和幼叶各部位均有表达,其中,在苎麻幼叶中表达量最高,且受重金属镉胁迫诱导,显示 *BnAPX1* 在植物重金属镉响应中发挥作用。苎麻 APX 基因序列的获得与表达特性研究为探寻苎麻耐镉分子机理奠定了基础。

**关键词:** 苎麻; APX; 克隆; 表达; 荧光定量 PCR

## Cloning and Expression Analysis of Homological Gene APX from Ramie (*Boehmeria nivea* L.)

ZHU Shou-jing<sup>1</sup>, ZHOU Jing-hua<sup>1</sup>, JIE Yu-cheng<sup>1,2</sup>, XING Hu-cheng<sup>1</sup>,  
ZHONG Ying-li<sup>1</sup>, SHE Wei<sup>1</sup>, DUAN Zhuo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Ramie, Hunan Agriculture University, Changsha 410128;

<sup>2</sup> Hunan Provincial Key Laboratory of Corp Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128)

**Abstract:** Ascorbate peroxidase (APX) is one of the key enzymes of the plant antioxidant system which responds to environment stresses. In this study, a novel gene (*BnAPX1*) was isolated and characterized from Zhongzhu 1 ramie based on the sequence of Unigene42508 fragment by RT-PCR and RACE methods. *BnAPX1* consists of 1201 bp nucleotides, contains an ORF of 289 amino acids which encoding a 31.4 kDa protein with a pI value of 5.88. The similarity comparison revealed that the deduced amino acid sequence shared 84%, 82%, 81%, 79%, 80%, and 82% of homology with *Gossypium hirsutum* (EU244478), *Populus tomentosa* (AY789051), *Zantedeschia aethiopica* (AF159254), *Glycine max* (AB331961), *Vigna unguiculata* (AY466858) and *Jatropha curcas* (GQ337076). Real-time quantitative PCR was used to analyze expression pattern of *BnAPX1* in different organs and under Cd stress. We found that *BnAPX1* was mainly expressed in young leaves and highly induced in roots by Cd stress. These results indicated that *BnAPX1* might be involved in response to Cd stress. The isolation and expression analysis of *BnAPX1* gene could establish the foundation for the future study in the mechanism of Cd stress.

**Key words:** Ramie; APX; clone; expression; real-time PCR

重金属环境污染已成为一个世界性问题<sup>[1]</sup>, 重金属对植物的毒害主要表现为促使植物体内活性氧

收稿日期: 2013-01-22 修回日期: 2013-02-03 网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1121.005.html>

基金项目: 湖南省科技厅重点项目(2010TP4004-1、2010FJ2013 和 2012FJ4063); 国家科技支撑计划(2012BAD20B05-04); 湖南省研究生科研创新项目(CX2011B279)

第一作者研究方向为作物抗性遗传育种。E-mail: sjing\_zhu@163.com; 周精华为并列第一作者

通信作者: 揭雨成, 主要从事麻类种质资源与抗逆分子生物学研究。E-mail: ibfeyjc@vip.sina.com

( $O_2^-$ 、 $HO^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $O_2$ ) 含量的大幅增加,引起氧化胁迫<sup>[2]</sup>。为了减轻活性氧的毒害,植物进化出了一系列复杂的保护机制,抗氧化系统是其中比较重要的一种<sup>[3-4]</sup>,该系统主要由活性氧清除酶及其代谢产物组成,能够通过清除有害自由基来保护自身免受由重金属所引的氧化胁迫的伤害<sup>[5]</sup>。抗坏血酸过氧化物酶 (EC 1.11.1.11, APX, ascorbate peroxidase) 存在于高等植物、海藻和一些蓝藻细菌当中<sup>[6]</sup>,是抗坏血酸-谷胱甘肽循环 (AsA-GSH) 系统中的关键酶,主要负责对  $H_2O_2$  的清除,以抗坏血酸 (AsA) 为专一电子供体,催化  $H_2O_2$  的还原,产物为  $H_2O$  和脱氢抗坏血酸 (DHA)<sup>[7]</sup>。

目前,已经从葡萄<sup>[8]</sup>、大麦<sup>[9]</sup>、番茄<sup>[10]</sup>、豌豆<sup>[11]</sup>和拟南芥<sup>[12]</sup>等植物中克隆到了编码 APX 的基因,许多研究表明,APX 基因与植物抗氧化胁迫有关。H. Shunsuke 等<sup>[13]</sup>研究表明,在拟南芥中过表达红藻 *sAPX* 基因可以增强其耐热性;S. Yutaka 等<sup>[14]</sup>通过在水稻孕穗期过表达 *OsAPXa* 基因发现,高活性的 APX 可以增强  $H_2O_2$  的清除能力,保护小穗免受由冷害导致的脂质过氧化伤害,增加结实率;W. H. Sun 等<sup>[15]</sup>研究表明,过表达 *TiAPX* 基因可以提高低温胁迫下烟草种子的萌发率,增强转基因烟草耐低温胁迫的能力;T. Delia 等<sup>[16]</sup>研究表明,在拟南芥中反义表达 *tAPX* 会导致由百草枯和一氧化氮引起的氧化胁迫症状的加剧。这些研究表明,APX 基因与植物抗氧化胁迫有关。

苧麻 (*Boehmeria nivea* L.) 为荨麻科苧麻属多年生宿根性草本植物,是我国特有的纤维作物,具有生长迅速、生物量大和适应性强等特点,具有很高的经济和生态价值<sup>[17-18]</sup>。相关研究表明,苧麻对重金属镉有一定的耐受能力,在最高 89.9 mg/kg 镉处理下存活率仍能达到 100%,完成正常生长周期<sup>[19]</sup>。本研究根据苧麻转录组测序结果中的 APX 基因片段设计引物,利用 RT-PCR 和 RACE 首次克隆出苧麻 APX 的全长 cDNA,对其进行生物信息学分析,并通过荧光定量 PCR 分析 *BnAPX1* 在苧麻各组织部位的表达特征及镉胁迫下根部 *BnAPX1* 的响应特征,对于挖掘苧麻耐镉基因资源,探寻苧麻耐镉分子机理,进行苧麻耐镉品种培育均具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和试剂

供试植物材料为普通苧麻品种中苧 1 号三龄麻,来自于湖南农业大学耘园基地。pBIZOL 植物总

RNA 提取试剂购自 Bio Flux 公司;First strand cDNA Synthesis kit 购自 Fermentas 公司;RLM-RACE 试剂盒购自 ABI 公司;SYBR Premix Ex *Taq*、pMD19-T 载体购自 TaKaRa;Trans-T1 感受态细胞、DNA Marker、*Taq* DNA 聚合酶购自全式金公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自大连宝生物公司。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

在液氮中将苧麻不同组织、不同时间点的材料研磨成粉末,取 0.1g 粉末加入 700  $\mu$ L pBIZOL 植物总 RNA 提取试剂,振荡混匀;室温放置 5 min, 12000 r/min 离心 2 min;取上清,加入 300  $\mu$ L 氯仿,颠倒混匀;12000 r/min,离心 10 min;取上清,加入等体积异丙醇,混匀后静置 10 min;将上述溶液加入离心吸附柱,12000 r/min,离心 2 min,弃废液;75% 乙醇洗涤 2 次,用 30  $\mu$ L DEPC 处理水洗脱总 RNA,然后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性;经 DNase I 消化后按照 First stand cDNA Synthesis 试剂盒 (Fermentas) 说明书合成第 1 链 cDNA。

### 1.3 *BnAPX1* 全长基因克隆

根据苧麻转录组测序中的 APX 基因序列,分别设计 5' RACE 引物 (APX5-1: 5'-TGCTCTTACG-GCTCCCTTG-3', APX5-2: 5'-CGACAGTTTCTTGT-GCGATTC-3') 和 3' RACE 引物 (APX3-1: 5'-GGGAGC-CGTAAAGAGCAGTG-3', APX3-2: 5'-TGAAGCCCAT-AGAAAAGCCAAG-3')。采用 pBIZOL 试剂提取中苧 1 号叶片总 RNA,按照 RLM-RACE kit 说明分别反转录合成 5' RACE 和 3' RACE 的 cDNA 第 1 链。结合 RLM-RACE kit 试剂盒中配置的 outer primer 和 inner primer 引物对 *BnAPX1* cDNA 的 5' 和 3' 末端进行槽式 PCR 扩增。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带进行纯化回收,纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上进行克隆并转化至 Trans-T1 感受态细胞,经 M13 引物和槽式引物验证阳性克隆,送华大基因测序。测序结果通过 Editseq 软件整合后,获得 APX 基因全长 cDNA 序列。

### 1.4 *BnAPX1* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 上的 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 *BnAPX1* 基因的开放读码框;利用 NCBI 上的 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对 *BnAPX1* 基因的核苷酸序列进行 Blastn 比对,对其推测的氨基酸序列进行 Blastp 比对和保守性功能域预测;利用 Compute pI/Mw tool ([http://web.expasy.org/compute\\_](http://web.expasy.org/compute_)

pi/) 分析 *BnAPX1* 编码的蛋白质的等电点和分子量; 采用 DNASTAR 中的 MegAlign 软件进行系统进化树的构建, 分析该基因的进化关系。

### 1.5 荧光定量 PCR 分析 *BnAPX1* 在苎麻不同部位的表达

根据克隆得到的苎麻 *APX* 序列和内参基因 (*Actin*) 设计荧光定量 PCR 引物:

APX-F: 5'-GTCTTCCAGATGCTAAACAAGGTG-3';

APX-R: 5'-GATGTGCCCTCCCAATG-3'.

Actin-F: 5'-GCTCCGTTGAACCCTAAG-3';

Actin-R: 5'-GCTCCGATTGTGATGATTT-3'.

提取中苎 1 号 3 龄麻旺长期的根、茎中段、茎皮、茎尖和幼叶的总 RNA, 反转录成 cDNA 为模板, 利用荧光定量 PCR 对 *BnAPX1* 在苎麻不同部位的表达进行分析。在 ABI 7300 实时定量 PCR 仪上进行, 反应体系为 SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu$ L、上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L、ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8.6  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 40 个循环  $\times$  (95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 31 s), 添加溶解曲线。每个样品做 3 孔平行 PCR, 试验重复 3 次, 取其中的 1 次结果做统计分析, 利用  $2^{-\Delta\Delta T}$  法计算 *BnAPX1* 基因的相对表达量。

### 1.6 苎麻 *BnAPX1* 对镉胁迫的响应

在旺长期从田间选取长势一致的中苎 1 号 3 龄麻, 剪取嫩梢 (长约 10 cm), 在组培室中用蒸馏水培养, 组培室温度为 25  $^{\circ}$ C, 待长出须根后再用 1/4 Hoagland 营养液培养 7 d, 然后进行镉胁迫。参照余玮<sup>[20]</sup> 试验结果, 23 mg/L 镉溶液胁迫 6 h 的中苎 1 号水培苗根部 POD 活性最高。根据试验结果, 用镉浓度为 23 mg/L 的 1/4 Hoagland 营养液进行培养, 分别于处理 0、2、4、6、12 和 24 h 取根部样品, 每次取 3 个生物学重复样品, 用于分析 *BnAPX1* 表达。荧光定量 PCR 和表达分析方法同 1.4。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BnAPX1* 基因全长的克隆

RACE 扩增片段的测序结果表明: 所得 5' 末端 cDNA 片段长度约为 800 bp (图 1), 3' 末端片段长度约为 320 bp (图 2)。将测序结果与已知序列比对分析, 该 5' 和 3' 末端 cDNA 片段序列分别为苎麻 *APX* 基因的 5' 和 3' 端, 利用 Editseq 软件拼接获得了该基因的全长 cDNA 序列。经序列分析鉴定表明, 克隆获得的序列为苎麻的 *APX* 基因, 命名为 *BnAPX1*。

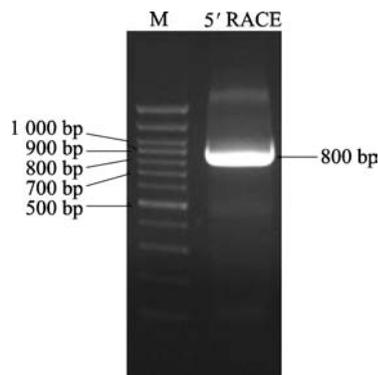


图 1 5'RACE 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of 5'RACE amplification

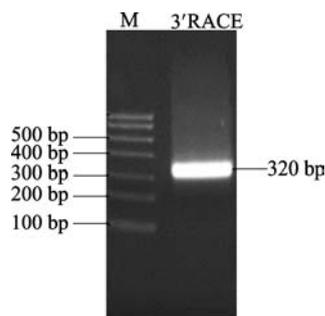


图 2 3'RACE 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of 3'RACE amplification

### 2.2 *BnAPX1* 基因的生物信息学分析

通过拼接比对, 苎麻 *BnAPX1* cDNA 全长为 1201 bp, 包含 1 个长度为 84 bp 的 5'-非翻译区 (5'-UTR) 和 247 bp 的 3'-非翻译区 (3'-UTR), 开放阅读框 (ORF) 为 870 bp, 推测其编码 1 个含 289 个氨基酸序列的多肽, 分子量和等电点分别为 31.4 kD 和 5.88。将该基因及其编码的蛋白进行 Blast 比对分析发现, 其与棉花 (EU244478)、毛白杨 (AY789051)、马蹄莲 (AF159254)、大豆 (AB331961)、豇豆 (AY466858) 和麻风树 (GQ337076) *APX* 基因的核苷酸序列的相似性分别为 78%、76%、77%、76%、76% 和 76%, 氨基酸序列的相似性分别为 84%、82%、81%、79%、80% 和 82%。

采用 DNASTAR 软件的 ClustalW 方法进行多重序列比对, 也证实苎麻的 *BnAPX1* 基因与其他物种的 *APX* 基因具有很高的保守性 (图 3)。通过 DNASTAR 中的 MegAlign 软件构建 *APX* 系统进化树, 可见苎麻 *APX* 蛋白与油棕 (ACF06512)、马蹄莲 (AAD43334) 最先聚成一类, 进化亲缘关系最近, 与豇豆亲缘关系最远 (图 4)。

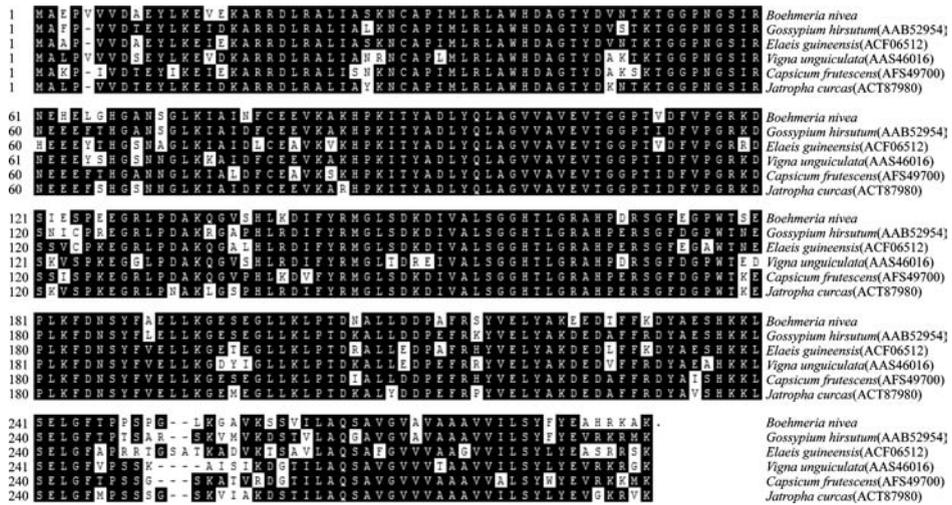


图3 苕麻 BnAPX1 氨基酸序列与其他物种同源氨基酸序列多重比较  
 Fig.3 Alignment of the deduced BnAPX1 amino acid sequence and its homologous amino acid sequences from other species

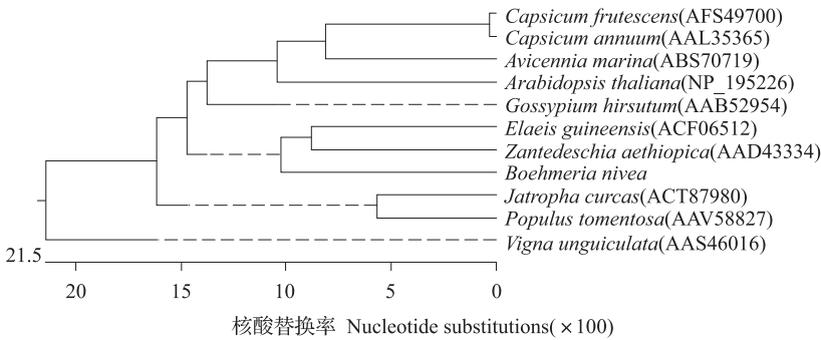


图4 苕麻 BnAPX1 氨基酸序列与其他物种同源序列的进化树分析  
 Fig.4 Phylogenetic analysis of ramie and other species putative BnAPX1

利用 NCBI 数据库的 CDD 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 对苕麻 APX 蛋白的结合位点和结构域分析表明 (图 5), 苕麻 APX 蛋白属于植物来源的过氧化物酶超家族, 具有血红素结合位点、底物结合位点和 K<sup>+</sup> 结合位点。其中 P<sup>33</sup> I<sup>34</sup> R<sup>37</sup> W<sup>40</sup>

P<sup>131</sup> D<sup>132</sup> A<sup>133</sup> F<sup>144</sup> L<sup>157</sup> S<sup>158</sup> G<sup>160</sup> H<sup>161</sup> L<sup>163</sup> G<sup>164</sup> R<sup>165</sup> A<sup>166</sup> H<sup>167</sup> R<sup>170</sup> S<sup>171</sup> W<sup>177</sup> L<sup>203</sup> T<sup>205</sup> Y<sup>233</sup> H<sup>237</sup> 为血红素结合区保守的氨基酸残基; P<sup>110</sup> H<sup>161</sup> L<sup>163</sup> G<sup>164</sup> A<sup>166</sup> L<sup>200</sup> L<sup>201</sup> 为底物结合区保守的氨基酸残基; T<sup>162</sup> T<sup>178</sup> E<sup>180</sup> K<sup>183</sup> D<sup>185</sup> S<sup>187</sup> 为 K<sup>+</sup> 结合区保守的氨基酸残基。

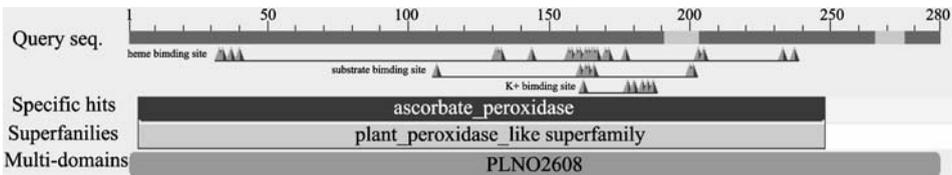


图5 BnAPX1 编码氨基酸的保守区域分析结构图  
 Fig.5 Conserved domains analysis of the deduced BnAPX1 amino acid

在 iPSORT Prediction (<http://ipsort.hgc.jp/predict.cgi>) 上对苕麻 APX 蛋白进行预测, 结果表明, 该蛋白不具有信号肽。通过 TMPRED ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 对苕麻 APX 蛋白的氨基酸序列进行跨膜区预测, 大于

500 分存在有意义的跨膜螺旋。根据 TMPRED 模型分析, 该蛋白 C 末端位于膜外, 在 262 ~ 282 位形成 1 个可能的跨膜螺旋 (LAQSAVGVAVAAAVVILSYFY), 分数达 2402 分, 表明跨膜预测真实有效, 推测该蛋白为跨膜蛋白, 属于过氧化物酶体 APX (图 6)。

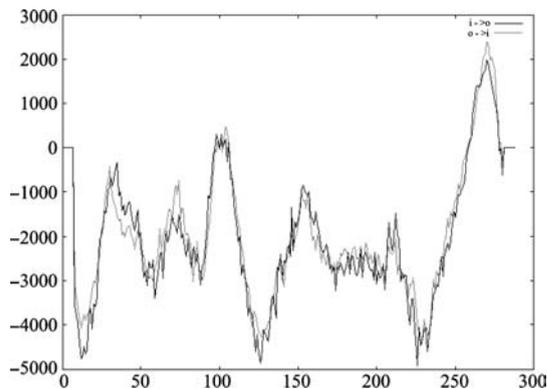


图6 BnAPX1 蛋白跨膜区域预测图

Fig. 6 Transmembrane domain prediction graphics of the deduced BnAPX1 amino acid

### 2.3 BnAPX1 在苕麻各个器官的表达

以根的表达量为参照基准, 荧光定量 PCR 结果表明, 在苕麻的根、茎中段、茎皮、茎尖和幼叶都可以检测到 *BnAPX1* 基因的表达, 其中在幼叶中的表达量较高, 茎中段的表达量最低 (图 7)。

### 2.4 BnAPX1 对镉胁迫的响应

利用荧光定量 PCR 技术分析在镉胁迫下苕麻根部 *BnAPX1* 的表达, 以 0 h 根部表达量为基准, 结果表明, 镉处理 0、2 和 4 h 表达量较低, 在 6 h 显著上升, 到 12 h 表达量最高, 24 h 显著下降, 表明 *BnAPX1* 对镉胁迫反应灵敏 (图 8)。

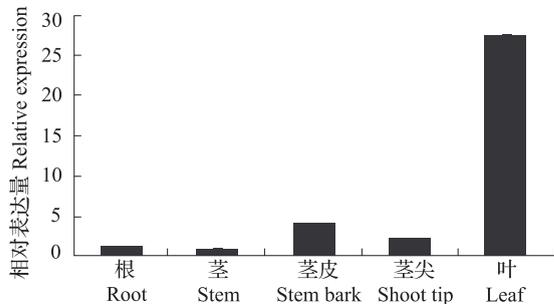


图7 BnAPX1 基因在苕麻不同部位的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *BnAPX1* gene in various organs of ramie

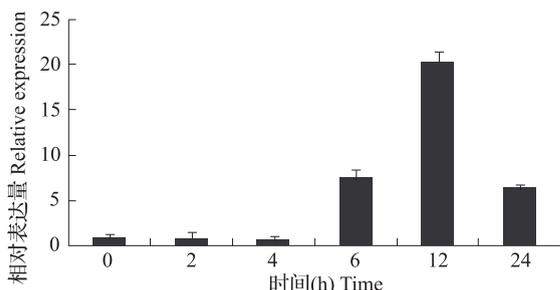


图8 BnAPX1 在镉胁迫条件下表达特征分析

Fig. 8 Expression analysis of *BnAPX1* gene under Cd treatment

## 3 讨论

APX 能够增强植物的抗氧化胁迫能力, 进而提高植物的抗逆性, 但在苕麻中尚未见克隆。本研究利用 RACE 方法结合 RT-PCR 技术, 首次从苕麻中克隆到了 *BnAPX1* 基因的全长 cDNA。通过序列比对分析表明, 该基因的核苷酸及氨基酸序列与其他物种的同源性很高, 具有血红素结合位点、底物结合位点和  $K^+$  结合位点, 是典型的植物过氧化物酶超家族成员。

根据在细胞中分布位置的不同, 高等植物中的 APX 可分为 4 种同工酶: 叶绿体中的基质 APX (sAPX) 及类囊体膜 APX (tAPX)、微体 (乙醛酸体、过氧化物酶体) APX (mAPX)、线粒体膜 APX (mitAPX) 和胞质 APX (cAPX)<sup>[21]</sup>。其中, 类囊体膜 APX (tAPX) 和过氧化物酶体 (pAPX) 同工酶的 C 端存在跨膜结构域<sup>[22]</sup>。本研究对苕麻 *BnAPX1* 基因编码的蛋白质进行亚细胞定位预测, 发现其不具有信号肽, 未位于线粒体或叶绿体上, 在 C 端存在一个跨膜结构域; Compute pI/Mw tool 预测蛋白分子量为 31.4 kD, 与拟南芥的 pAPX 分子量 (31 kD) 相似<sup>[23]</sup>; Blastp 也表明其与油棕、豇豆等物种的 pAPX 的相似性较高, 分别为 83% 和 80%, 且 C 端跨膜区氨基酸序列较保守, 因此推测该基因编码 pAPX。

通过荧光定量 PCR 对苕麻 *BnAPX1* 的组织表达特异性进行分析, 发现该基因在苕麻的根、茎中段、茎尖、茎皮和幼叶都有表达, 且幼叶中的表达高于其他部位, 这与甘薯和西红柿的结果一致<sup>[24-25]</sup>, 表明 *BnAPX1* 在苕麻幼叶中与在根、茎中段、茎尖和茎皮中的表达可能受不同机制的调控。提高 APX 活性增强植物非生物抗逆性的报道已有很多<sup>[13-15]</sup>, 本研究中 *BnAPX1* 在镉胁迫下表达量增加, 在 6 h 表达量大幅上升, 12 h 达到最高, 表明该基因受到重金属镉的诱导, 推测苕麻 *BnAPX1* 可能在保护苕麻免受重金属镉毒害的过程中起到一定作用。

本研究克隆了苕麻 *BnAPX1* 基因的全长 cDNA, 对其组织表达和根部镉胁迫响应特征进行了分析, 但其他重金属胁迫下该基因在苕麻各个部位的响应特征还需进行全面分析, 同时有必要利用转基因技术对该基因的功能进行进一步研究。

### 参考文献

- [1] Davis R D. Cadmium-a complex environmental problem; cadmium in sludge used as fertilizer[J]. *Experientia*, 1984, 40: 117-126
- [2] Schüttendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal - induced oxidative stress and protection by micorhi-

- zation[J]. J Exp Bot, 2002, 53: 1351-1365
- [3] Metwally A, Safronova V I, Belimov A A, et al. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. [J]. J Exp Bot, 2005, 56: 167-178
- [4] Pandey V, Dixit V, Shyam R. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jai Kisan) plants exposed to hexavalent chromium[J]. Chemosphere, 2005, 61: 40-47
- [5] Somashekaraiah B V, Padmaja K, Prasad A K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*), involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation[J]. Physiol Plantarum, 1992, 85: 85-89
- [6] Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S. Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbate peroxidase[J]. Biochem J, 1980, 186:377-380
- [7] Lin K H, Lo H F, Lin C H, et al. Cloning and expression analysis of ascorbate peroxidase gene from eggplant under flooding stress[J]. Bot Stud, 2007, 48:25-34
- [8] Lin L, Wang X P, Wang Y J. cDNA clone, fusion expression and purification of the novel gene related to ascorbate peroxidase from Chinese wild vitis pseudoreticulata in *E. coli*[J]. Mol Biol Rep, 2006, 33:197-206
- [9] Shi W M, Muramoto Y, Ueda A, et al. Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*[J]. Gene, 2001, 273: 23-27
- [10] Gadea J, Conejero V, Vera P. Developmental regulation of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plants[J]. Mol Gen Genet, 1999, 262:212-219
- [11] Mittler R, Zilinskas B A. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase[J]. J Biol Chem, 1992, 5:21802-21807
- [12] Kubo A, Saji H, Tanaka K, et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 1992, 18: 691-701
- [13] Shunsuke H, Osami M, Masaki Y, et al. Expression of the Cyanidioschyzon merolae stromal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis thaliana* enhances thermotolerance[J]. Plant Cell Rep, 2009, 28:1881-1893
- [14] Yutaka S, Yukari M, Koji S, et al. Enhanced chilling tolerance at the booting stage in rice by transgenic overexpression of the ascorbate peroxidase gene, *OsAPXa*[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30: 399-406
- [15] Sun W H, Duan M, Li F, et al. Overexpression of tomato *tAPX* gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress[J]. Biol Plantarum, 2010, 54 (4): 614-620
- [16] Delia T, Candida V, Marcella B, et al. Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* enhances Paraquat-induced photooxidative stress and Nitric Oxide-induced cell death [J]. Planta, 2005, 221: 757-765
- [17] 揭雨成, 罗中钦, 余玮. 苎麻抗重金属污染研究现状与应用前景[J]. 作物研究, 2009, 23(4): 283-286
- [18] 蒋杰, 揭雨成, 周清明, 等. 苎麻纤维素合酶基因 *BnCesA1* 全长 cDNA 的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 851-857
- [19] 余玮, 揭雨成, 邢虎成, 等. 苎麻耐铝品种差异及其筛选指标分析[J]. 作物学报, 2011, 37(2): 348-354
- [20] 余玮. 苎麻对重金属吸收和积累特征及镉胁迫响应基因表达研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010
- [21] Kawakami S, Matsumoto Y, Matsunaga A, et al. Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature[J]. Plant Sci, 2002, 163: 829-836
- [22] Mullen R T, Trelease R N. The sorting signals for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase are within its C-terminal tail[J]. J Biol Chem, 2000, 275(21): 16337-16344
- [23] Narendra S, Venkataramani S, Shen G. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membranebound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development [J]. J Exp Bot, 2006(57): 3033-3042
- [24] Park S Y, Ryu S H, Jang I C, et al. Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress[J]. Mol Genet Genomics, 2004, 271: 339-346
- [25] Naim N, Tibor J, Waseim B, et al. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization[J]. Mol Genet Genomics, 2008, 279: 171-182

## 欢迎订阅 2014 年《花生学报》

《花生学报》是由山东省花生研究所主办的我国花生学科唯一的专业学术刊物,为全国农业核心期刊。国内外公开发行人,季刊,国内统一刊号:CN 37-1366/S,国际标准刊号:ISSN 1002-4093,现已通过 Internet 向全球传播农业科技信息。主要刊登花生遗传育种、栽培生理、土壤肥料、植物保护、贮藏加工、综合利用及分析测试等方面的试验研究报告、技术与方法、专题综述及研究简报等。读者主要是科研、教学、生产推广部门的各级领导干部、科技人员、院校师生以及花生产区的种植者等。

本刊为全国中文核心期刊,并作为第一批全国农业核心期刊入编国家电子出版物《中国学术期刊(光盘版)》和“万方数据——数字化期刊群”。本刊是中国学术期刊综合评价数据库期刊,也是中国科技论文统计源期刊;同时被中国科技文献数据库和中文科技期刊篇名数据库列为文献信息源。

季刊,大 16 开本,共 68 页,每期定价 15.00 元,全年定价 60.00 元。由本刊编辑部自办征订和发行。另外,本刊参加了全国非邮发报刊联合征订,请读者向天津市大寺泉集北里别墅 17 号(邮编 300381)全国非邮发报刊联合征订服务部直接汇款订阅,不必先索取定单,本刊负责将刊物寄给订户。也可直接向本刊订阅。

开户行:青岛建行李沧区支行书院路分理处

收款单位:山东省花生研究所

帐号:37101986510050226131

地址:青岛市李沧区万年泉路 126 号《花生学报》编辑部 邮编:266100

电话:0532-87632131 传真:0532-87626832 编辑部收

E-mail:hsxb@163169.net;hsxbsd@163.com