

doi:103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 01. 034

枸杞抗坏血酸氧化酶基因的克隆与表达分析

乔 枫¹, 耿贵工², 谢惠春¹, 曾 阳¹, 周连玉¹, 陈 志¹

(1. 青海师范大学青藏高原资源与环境教育部重点实验室, 西宁 810008;

2. 青海省农林科学院农业部农产品质量安全风险评估实验室, 西宁 810016)

摘 要: 以枸杞为材料, 利用同源克隆技术, 克隆了枸杞抗坏血酸氧化酶(AO)的全长 cDNA 序列, 命名为 *LcAO* 基因(GenBank: KP712033), 该基因开放阅读框(ORF)大小为 1737 bp, 编码 578 个氨基酸, 与西红柿 AO 蛋白的同源性达到 90%. *LcAO* 编码的氨基酸序列包含 3 个多铜氧化酶结构域和跨膜信号序列. 采用实时荧光定量 PCR 分析显示, *LcAO* 基因在枸杞的花和果实中表达量最高, 成熟叶中表达量最少.

关键词: 枸杞; 抗坏血酸氧化酶(AO); 基因克隆; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0203-06

Molecular cloning and expression patterns of *LcAO* from *Lycium chinens*

QIAO Feng¹, GENG Gui-Gong², XIE Hui-Chun¹, ZENG Yang¹, ZHOU Lian-Yu¹, CHEN Zhi¹

(1. Educational Ministry Lab of Environment and Resource in Qinghai-Tibet Plateau,

Qinghai Normal University, Xining 810008, China;

2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products, Ministry of Agriculture, Xining 810016, China)

Abstract: A ascorbate oxidase (AO) gene from *Lycium Chinense* was cloned with homologous method. The full-length cDNA of *Lycium chinense* AO which was named *LcAO* (Genbank: KP712033) was 1737 bp, and contained a complete open reading frame (ORF) of 578 amino acid residues. Homology analysis indicated that the deduced *LcAO* protein was highly 90% to AO proteins from *Solanum lycopersicum*. The results from Real-Time PCR indicated that the expression of *LcAO* gene was the strongest in the flower and fruit, and the least in mature-leaf of *Lycium Chinense*.

Key words: *Lycium chinense*; Ascorbate oxidase(AO); Gene cloning; Quantitative real-time PCR

1 引 言

维生素 C 又叫抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA), 是植物体内合成的一类己糖内酯化合物, 在植物的生长发育中发挥重要作用, 如抗氧化和清除自由基、光合作用和光保护、细胞的生长和分裂以及参与乙烯的合成等^[1,2]. 在高等植物中, AsA 合成主要是通过 D-葡萄糖-6-磷酸→D-果糖-6-磷酸→D-甘露糖-6-磷酸→D-甘露糖-1-磷酸→GDP-D-

甘露糖→GDP-L-半乳糖→L-半乳糖-1-磷酸→L-半乳糖→L-半乳糖内酯→AsA^[3]. 在该途径中, 半乳糖内酯脱氢酶 (L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase, GLDH, EC 1. 3. 2. 3) 直接催化半乳糖内酯形成 AsA, 起着非常关键的作用. AsA 在植物细胞内的氧化分解主要由抗坏血酸氧化酶(AO)和抗坏血酸过氧化物酶(AXP)催化^[4,5], 两种酶分别在 O₂ 和 H₂O₂ 的参与下将 AsA 氧化为不稳定的单脱氢抗坏血酸 (Monodehydroascorbic acid,

收稿日期: 2014-11-18

基金项目: 青海省科技厅项目(2015-ZJ-735)

作者简介: 乔枫(1973-), 女, 内蒙古武川人, 博士, 教授, 主要从事植物生理与分子生物学研究. E-mail: qiaofnm@163.com

通信作者: 陈志. E-mail: czi58@163.com

MDHA), 再经过非酶歧化反应 (non-enzymatic disproportionation) 形成脱氢抗坏血酸 (dehydroascorbic acid, DHA), 最终 DHA 可被分解成不具活性的 2,3-二酮古洛糖酸 (2,3-diketogulonic acid). 其中, DHA 也可以通过单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 和脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 的作用被还原为 AsA 从而得以循环再生. 因此植物体内这 4 种 AsA 循环代谢酶的活性将影响 AsA 水平的高低 (图 1).

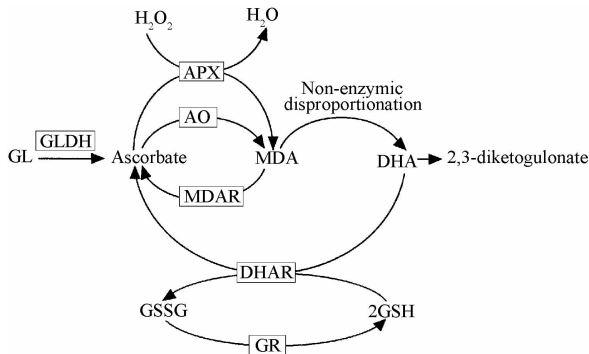


图 1 植物中抗坏血酸合成代谢途径

Fig. 1 The ascorbic acid metabolism pathway in plant

枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 为茄科植物, 属多年生灌木, 是我国的重要植物资源之一. 枸杞果实中含有较高的抗坏血酸含量, AO 是 AsA-GSH 循环的一个关键酶, 对枸杞果实 AsA 的积累和代谢具有非常重要的作用. 所以本研究拟选用枸杞为材料, 利用 RT-PCR 技术进行抗坏血酸氧化酶基因克隆, 采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析该基因在枸杞不同器官中的表达, 填补枸杞 AsA 代谢有关酶基因研究的空白.

2 材料与方法

2.1 材料

枸杞 (*Lycium chinense*) 由青海农林科学院林科所提供. 取新鲜、无病虫害的叶、茎、花、果实材料立即置于液氮中, 后置于 -80°C 保存备用, 用于 RNA 的提取.

2.2 方法

2.2.1 *LcAO* 基因的克隆 使用试剂 Trizol reagent (Invitrogen) 提取枸杞叶片总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 (GE) 检测 RNA 浓度和完整性. 基于茄科植物西红柿、烟草、马铃薯等 AO 基因的保守序列设计引物 GAO5F/GAO3R. 利用 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 进行 cDNA 第一链的合

成, -20°C 保存备用. 以上述合成的第一链 cDNA 为模板, 用引物组合 GAO5F: ATGGT (C/T) GAGCATGAT (G/T) TTCAT 和 GAO3R: TTAAGGCCTGTGGAACCTTT, 进行 PCR 扩增, 扩增体系 $50\ \mu\text{L}$, 包括: cDNA $2.0\ \mu\text{L}$, 上、下游引物 ($10\ \mu\text{mol/L}$) 各 $1.0\ \mu\text{L}$, $10\times$ PCR Buffer $5\ \mu\text{L}$, dNTP ($10\ \text{mmol/L}$) $1.0\ \mu\text{L}$, LA Taq 聚合酶 ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$, TaKaRa) $0.4\ \mu\text{L}$, ddH₂O 补足至 $50\ \mu\text{L}$. PCR 反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min; 72°C 延伸 2 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min. PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒 (北京三博远志生物公司) 纯化后连接至 pMD18-T 载体 (TaKaRa), 转化 JM109 感受态细胞 (北京三博远志生物公司). 蓝白斑筛选阳性克隆, 经酶切和 PCR 鉴定后选用 2~4 个阳性克隆送北京三博远志生物公司测序.

2.2.2 基因序列的生物信息学分析 用 DNAs-tar 软件对所克隆的基因片段进行拼接, 获得了完整的枸杞 AO 全长 cDNA, 然后在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站进行 Blast 分析; 应用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 提供的相关软件, 综合预测分析了编码蛋白的基本性质、结构特点和亚细胞定位; 利用 Predict-Protein (<http://www.predictprotein.org/>) 分析蛋白质的三级结构; 利用 Clustal X (1.83) [6] 对不同 AO 基因编码氨基酸序列进行多重序列比对, Mega4.1 [7] 软件的再使用最小进化法 (Minimum Evolution) 构建系统发育树.

2.2.3 *LcAO* 基因组织表达特异性检测 根据已发表的枸杞 *Actin* 基因 (GenBank No. HQ415754.1) 序列, 以此序列设计枸杞 *Actin* 基因荧光定量分析的特异引物 GACTIN YF1 和 GACTIN YR1, 预期扩增片段长度为 96 bp. 以枸杞 *Actin* 基因为内参, 枸杞 *Actin* 基因的引物序列 GACTINYF1: CCATC TACGAGGGTTACGCTTTG; GACTINYR1: AGTC AAGAGCCACATAGGCAAGC.

荧光定量 PCR 采用 SYBR Rremix Ex TaqTM 反应体系 $20\ \mu\text{L}$: $2\times$ SYBR Premix Ex TaqTM (Takara, Japan) $10\ \mu\text{L}$, cDNA template $2.0\ \mu\text{L}$, 上下游引物 ($10\ \mu\text{M}$) 各 $0.2\ \mu\text{L}$, $50\times$ ROX Reference Dye $0.4\ \mu\text{L}$, ddH₂O $7.2\ \mu\text{L}$. PCR 扩增程序为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 5 s, 62°C 31 s, 40 个循环. 根据荧光值的变化规律, 系统将

自动生成标准曲线和溶解曲线。

根据 *LcAO* 基因序列设计荧光定量分析引物 GAOYF1 和 GAOYR1, 预期扩增片段长度为 106 bp. 引物序列如下: GAOYF1: AGAG-GCAGATGGTCACTATGTGGAG,

GAOYR1: TCTCGTAGGGTCTTGATCA-GCTTTG. 采用 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒程序进行荧光定量 PCR 反应. 反应在 iQ5 (BIO-RAD) 荧光定量 PCR 仪上进行, 反应体系 (20 μ L) 为: 2 \times SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa) 10 μ L, cDNA template 2.0 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 50 \times ROX Reference Dye 0.4 μ L, ddH₂O 6.8 μ L, 每个反应做 3 个重复. PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环, 反应结束后确认 Real-Time PCR 扩增曲线和融解曲线. 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量^[8].

2.2.4 枸杞 AO 活性的测定 AO 活性参考陈利锋等的方法^[9], 取提取液 0.12 mL, 加入 2.88 mL 磷酸缓冲液 (pH7.8), 0.5 mmol/L 抗坏血酸, 在 290 nm 条件下测定.

3 结果与分析

3.1 *LcAO* 基因的克隆

以枸杞叶片总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法扩增枸杞抗坏血酸氧化酶基因的全长 cDNA. 以引物组合 GAO5F/GAO3R 进行扩增, RT-PCR 结果经测序获得 1737 bp 的片段 (图 2), 为完整的开放读码框, 编码 578 个氨基酸. 通过 Blast 比对, 根据同源性将其代表的基因命名为 *LcAO*.

3.2 *LcAO* 基因的生物信息学分析

DNASTAR 软件对预测的 *LcAO* 氨基酸序列分析表明, 该蛋白分子量为 65.47 kD, 等电点 pI 为 7.28, 其中碱性氨基酸 48 个, 酸性氨基酸 50 个, 疏水性氨基酸 188 个, 极性氨基酸 172 个. 使用频率较高的氨基酸有 Val、Thr、Pro、Asp 和分别占总氨基酸的 8.65%、7.44%、7.27%、6.92%, 频率较低的氨基酸有 Cys、Met/Try、Glu 分别占总氨基酸的 1.56、2.08%、3.63%. 经在 NCBI 网站上进行结构预测分析, *LcAO* 含有 3 个多铜氧化酶保守结构域. 疏水性分析表明枸杞 AO 蛋白是一个跨膜蛋白, 在第 1~35 个氨

基酸残基处存在跨膜区, 在第 1~12 个跨膜信号的 N 端, 跨膜螺旋存在于第 13 个与第 35 个氨基酸残基之间.

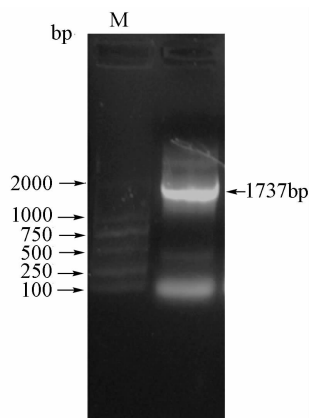


图 2 枸杞叶片 *LcAO* 的 cDNA 序列的克隆 M: DL2000 Marker

Fig. 2 Cloning of *LrAO* cDNA from *Lycium Chinense* M: DL2000 Marker

PredictProtein 预测结果表明 *LcAO* 蛋白中 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲所占百分比分别为 5.71%、27.51% 和 66.78%, 其中二级结构共包含 3 个可能的 α 螺旋和 26 个可能的 β -折叠: α 1 (10~26)、 α 2 (182~189)、 α 3 (535~545)、 β 1 (35~47)、 β 2 (53~59)、 β 3 (67~71).

3.3 *LcAO* 编码蛋白与其它植物同源性比较

枸杞 *LcAO* 基因推导氨基酸序列与其它植物 AO 编码的氨基酸序列多重比对分析发现, 它们之间有较高的同源性, 西红柿 (*Solanum lycopersicum*) AO 蛋白的同源性达到了 90%、与三角叶杨 (*Populus trichocarpa*)、大豆 (*Glycine max*) 同源性达到了 74%. 这进一步证实克隆获得的是枸杞的 AO 基因. 表明不同植物 AO 蛋白序列存在高度保守序列, 但也有较明显的长度和组成上的变异性.

为了研究枸杞 (*Lycium chinense*) AO 与其它植物 AO 的进化关系, 用 Clustal x 1.83 软件对氨基酸序列比对后, 通过邻位相连方法 (NJ) 法构建氨基酸序列的进化树, 结果图 3 显示, 枸杞 (*Lycium chinense*) 与西红柿 (*Solanum lycopersicum*)、大豆 (*Glycine max*) AO 氨基酸亲缘关系较近. 从进化树上看, 葫芦科 (Cucurbitaceae)、十字花科 (Brassicaceae) 的植物聚为一类, 但是豆科 (Leguminosae)、茄科 (Solanaceae) 不同植物间 AO 进化关系有差异, 如

大豆 (*Glycine max*) 与百脉根 (*Lotus japonicus*)、豌豆 (*Pisum sativum*) 没有聚为一个分支, 西红柿 (*Solanum lycopersicum*) 与烟草 (*Nicotiana tabacum*) 没有聚在一起, 这也可能推测 AO 在进化过程中是有较大变化, 也有可能 AO 的基因家族间有较大差异。

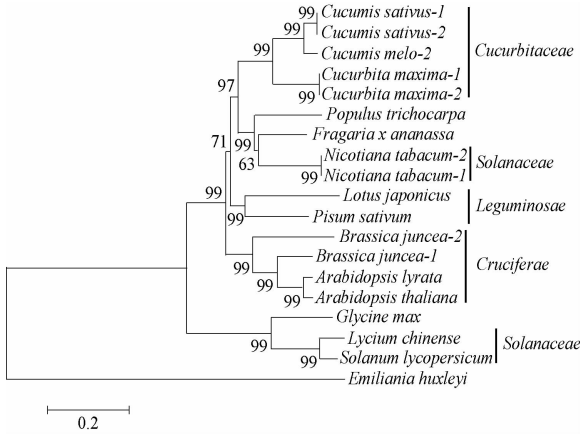


图 3 LcAO 与其他植物 AO 蛋白系统图进化树
图中标记各节点处数值表示 Bootstrap 值 (重复 1000 次), 比例尺表示碱基替代率。

Fig. 3 Phylogenetic tree of LcAO and membership of AO proteins in other plants

The numbers next to the nodes give bootstrap values of 1000 replicates. The scale bar indicates the site substitutions.

Cucumis sativus-1 (CBY84386.1); *Cucumis sativus*-2 (AAA33119.1); *Cucumis melo* (AAF35910.1); *Cucurbita maxima*-1 (BAA09528.1); *Cucurbita maxima*-2 (CAA39300.1); *Populus trichocarpa* (EEE84587.2); *Fragaria x ananassa* (AGN89526.1); *Nicotiana tabacum*-1 (BAA07734.1); *Nicotiana tabacum*-2 (Q40588.1); *Lotus japonicus* (AFP65861.1); *Pisum sativum* (BAH28261.1); *Brassica juncea*-2 (AAF20931.1); *Brassica juncea*-1 (AAF20933.1); *Arabidopsis lyrata* (EFH48226.1); *Arabidopsis thaliana* (BAA20519.1); *Glycine max* (XP_003524331.1); *Lycium chinense*; *Solanum lycopersicum* (AAY47050.1); *Emiliana huxleyi* (EOD22930.1)

3.4 LcAO 基因的组织特异性表达

以枸杞 *Actin* 基因为参照, 运用 Real-Time PCR, 分析枸杞的嫩叶、嫩茎、成熟叶、成熟茎、花、绿果 (不成熟果实)、红果 (成熟果实) 不同组织中 AO 基因的相对表达量。结果 (图 4) 显示枸杞 AO 基因在花中相对表达量最高, 其次在果实中, 在成熟叶中相对表达量最低。花、绿果、红果 AO 表达量分别是嫩叶的 1.77 倍、1.23 倍、1.05 倍。以上结果表明, LcAO 在各组织中均有表达, 但不具有明显的组织特异性, LcAO 主要在枸杞的花和果实中行使一定的调控功能。

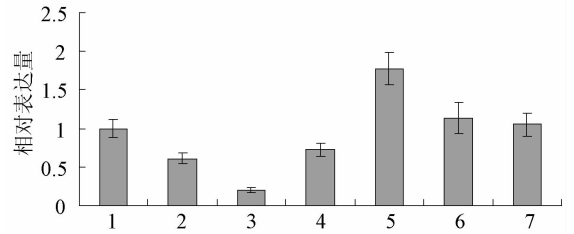


图 4 LcAO 在枸杞不同组织中的表达

1: 嫩叶; 2: 嫩茎; 3: 成熟叶; 4: 成熟茎; 5: 花; 6: 绿果; 7: 红果

Fig. 4 The expression of LcAO in tissues of *Lycium chinense*

1: Young-leaf; 2: Young-stem; 3: Mature-leaf; 4: Mature-stem; 5: Flower; 6: Green-fruit; 7: Red-fruit

3.5 枸杞 AO 活性

枸杞不同器官中 AO 活性变化见图 5, AO 活性在花、绿果、红果中表达较高, 在成熟叶表达较低。花、绿果、红果 AO 表达量分别是嫩叶的 1.71 倍、1.39 倍、1.27 倍。AO 活性的变化趋势与 AO 基因表达量变化趋势呈高度正相关, 相关系数为 0.9387。

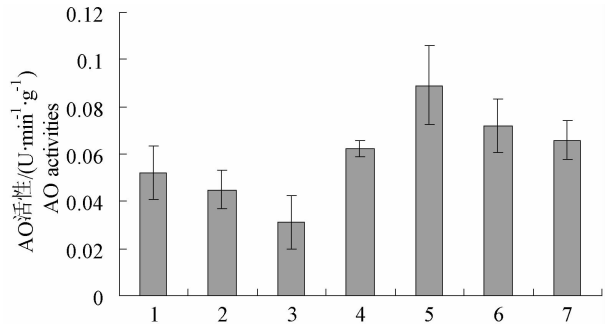


图 5 在枸杞不同组织中的 AO 活性

1: 嫩叶; 2: 嫩茎; 3: 成熟叶; 4: 成熟茎; 5: 花; 6: 绿果; 7: 红果

Fig. 5 The AO activities in tissues of *Lycium chinense*

1: Young-leaf; 2: Young-stem; 3: Mature-leaf; 4: Mature-stem; 5: Flower; 6: Green-fruit; 7: Red-fruit

4 讨论

目前已从烟草、甜瓜、棉花、白菜中克隆 AO 基因 [10-12]。本研究以枸杞 (*Lycium chinense*) 叶为材料, 采用 RT-PCR 方法克隆了枸杞 AO 基因的全长 cDNA [13]。LcAO 基因全长 1737 bp, 编码 578 个氨基酸。经 BLAST 比对表明: 该蛋白序列与西红柿 (*Solanum lycopersicum*) AO 蛋白的同源性达到了 90%、与三角叶杨 (*Populus trichocarpa*)、大豆 (*Glycine max*) 同源性达到了 74%。LcAO 编码的氨基酸序列包含 3 个多铜氧化酶结构域和跨

膜信号序列. 基于氨基酸序列的 AO 系统进化树表明, *LcAO* 编码的氨基酸序列与西红柿的 AO 聚为一支, 说明两者的亲缘关系较近, 二者属于茄科. 本研究克隆得到的 *LcAO* 编码的氨基酸序列与番茄该基因编码的氨基酸序列一致性较高, 枸杞首先和番茄聚为一类, 说明二者在进化上亲缘关系较近, 但是与烟草亲缘关系较远.

抗坏血酸调节质体外环境氧化/还原状态的主要分子与拥有多种抗氧化分子的胞内环境相比^[14], 仅具有抗坏血酸的质体外环境的氧化还原缓冲能力明显要低. 因此, 当 AO 活性升高时, 质体外抗坏血酸库的氧化/还原比升高, 在质膜两侧产生明显的氧化还原梯度. 这种梯度能够影响植物的多种生理活动, 包括调节生长发育等、气孔开闭、胁迫响应、基因表达、激素反应、花期调控、防治昆虫、抵抗逆境等^[15-21]. 近年来的研究表明, AO 对植物的逆境响应、基因表达、生长发育和成花诱导都可起调控作用^[22,23], 这些调控机制均与质体外抗坏血酸库的氧化还原状态有关. 表明 AO 在植物的逆境应答和生长发育调控中起作用. 本研究中组织特异性表达的荧光定量分析^[24,25]表明 *LcAO* 在枸杞不同组织中的表达有差异, 可能行使不同的功能. 本研究中 AO 活性在枸杞花、绿果、红果中表达较高, 在成熟叶表达较低, 花、绿果、红果 AO 表达量分别是嫩叶的 1.71 倍、1.39 倍、1.27 倍. *LcAO* 表达量变化趋势与 AO 活性的变化趋势与呈高度正相关, 相关系数为 0.9388, 二者在花中表达量或活性最高, 说明该基因对花诱导起调节作用^[22,23], 促进植物开花发育. 如正义表达 AO 基因导致烟草的开花期提前, 花芽数减少, 结实率降低; 而反义表达 AO 基因造成的现象则相反, 研究表明 AO 参与植物生长发育的调控, 并与成花诱导有关^[26], 这与本研究结果花中 AO 基因表达或 AO 活性最高相一致. 其次 *LcAO* 表达量变化趋势与 AO 活性在果实发育时期, AO 表达量和活性也较高, 在果实发育中起重要调节作用, 有利于果实成熟.

抗坏血酸氧化酶在植物生理中具有重要的意义. 在植物中抗坏血酸氧化酶属于多铜氧化酶家族, 定位于植物细胞壁^[27]. 它能将抗坏血酸氧化为单脱氢抗坏血酸, 从而调控植物质体外抗坏血酸库的氧化还原状态. 在植物生理生化代谢中, AO 不但与植物的发芽、生长发育、逆境和抗衰老有关, 而且与植物果实的形成和储藏有关, 不耐储藏的果实酶活性高^[28]. 可以通过抑制抗坏血酸氧化酶的活

性提高抗坏血酸含量, 可延长储藏时间. 迄今人们对 AO 的分子结构、催化机制、表达调控和参与的生理现象进行了较为广泛的探究, 但对 AO 功能和不同的信号途径之间的关系还不清楚. 本研究克隆了枸杞 AO 基因为进一步研究基因功能奠定了基础, 同时为揭开其具体作用机制提供理论依据; 也为进一步利用该基因改良枸杞及其他植物增强抗坏血酸含量打下基础, 具有一定的应用价值积现实意义.

参考文献:

- [1] Jaroslaw T, Piotr J, Andrzej T. The effects of ascorbate on root regeneration in seedling cuttings of tomato [J]. *Plant Growth Regulation*, 2006, 48: 157.
- [2] Shen C H, Ye K W. The signal network of ascorbate homeostasis [J]. *Plant Signaling Behavior*, 2010, 5: 570.
- [3] Oreste A. Ascorbate System in Plant Development [J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1994, 26: 407.
- [4] Sereikaite J D, Iljasevicene G, Dienys H M, *et al.* Ascorbate Oxidase Specificity and Analytical Application [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993, 43: 153.
- [5] Stasoll A C, Yeung C. Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination [J]. *Physiol Plant*, 2001, 111: 196.
- [6] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface; flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4876.
- [7] Kumar S, Tamura K, Ne M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150.
- [8] Kenneth J K, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402.
- [9] 陈利锋, 叶茂炳, 陈永幸, 等. 抗坏血酸与小麦抗赤霉病性的关系 [J]. *植物病理学报*, 1997, 27: 113.
- [10] Naohiro K, Muneharu E P. Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild type proto-

- plasts [J]. *Planta*, 2000, 210: 1018.
- [11] Ran M F, He Y, Qian W J, *et al.* Cloning, Functional, Sequence, and Analysis prokaryotic expression of Cotton GhAO3 Cdna[J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2013, 08: 51.
- [12] Ren J H, Gao J, Zhou X, *et al.* Molecular cloning and characterization of ascorbate oxidase gene in non-heading Chinese cabbage [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2013, 60: 756.
- [13] 雍斌, 何兵, 徐攀, 等. 甘薯 HXK 基因的克隆、组织表达及生物信息分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51: 378.
- [14] Shi Y C, Liu W Q. Progress of Ascorbic Acid Oxidase in Plant Science [J]. *Plant Physiology Communications*, 2008, 44: 151.
- [15] Maite S, Pavlina D, Drogoudi T, *et al.* Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone [J]. *Planta*, 2003, 216: 918.
- [16] Barbehenn R V, Jaros A, Yip L, *et al.* Evaluating ascorbate oxidase as a plant defense against leaf-chewing insects using transgenic poplar [J]. *J Chem Ecol*, 2008, 34: 1331.
- [17] Veronika Z, Halušková I, Mistrik L T, *et al.* Abiotic stress-induced inhibition of root growth and ascorbic acid oxidase activity in barley root tip is associated with enhanced generation of hydrogen peroxide [J]. *Plant Soil*, 2011, 349: 281.
- [18] Tullio M C, Liso D E R, Arrigoni O. Ascorbic acid oxidase: an enzyme in search of a role [J]. *Biologia Plantarum*, 2004, 48: 161.
- [19] Zhang Y Y, Li H X, Shu W B, *et al.* Suppressed Expression of Ascorbate Oxidase Gene Promotes Ascorbic Acid Accumulation in Tomato Fruit [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29: 638.
- [20] Raymond V, Barbehenn A J, Lynn Y L, *et al.* Peter Constabel. Evaluating Ascorbate Oxidase as a Plant Defense Against Leaf-Chewing Insects Using Transgenic Poplar [J]. *J Chem Ecol*, 2008, 34: 1331.
- [21] Fotopoulos V, Kanellis A K. Altered apoplastic ascorbate redox state in tobacco plants via ascorbate oxidase overexpression results in delayed dark induced senescence in detached leaves [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 23: 154.
- [22] Sanmartin M, Pateraki I, Chatzopoulou F, *et al.* Differential expression of the ascorbate oxidase multigene family during fruit development and in response to stress [J]. *Planta*, 2007, 225: 873.
- [23] Fotopoulos V, Sanmartin M, Kanellis A K. Effect of ascorbate oxidase overexpression on ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress [J]. *J Exp Bot*, 2006, 7: 3933.
- [24] 刘彩霞, 程文财, 王茂林. 甘蓝型油菜 BnBRI1 基因的克隆及表达分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51: 391.
- [25] 罗梦雪, 高继海, 时小东, 等. 麻疯树耐冷基因 Jc-CBF2 的克隆及表达模式分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51: 1312.
- [26] Yamamoto A, Bhuiyan M N H, Waditee R, *et al.* Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 1785.
- [27] Sanmartin M, Pateraki I, Chatzopoulou F, *et al.* Differential expression of the ascorbate oxidase multigene family during fruit development and in response to stress [J]. *Planta*, 2007, 225: 873.
- [28] Guo Y, Zbu J, Xu Z C, *et al.* Progress of Ascorbic Acid Oxidase in Plant Science [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24: 196.