

文章编号: 1001-1498(2010)04-0493-07

银杏过氧化氢酶基因 *CAT1* 的克隆及表达分析

程 华¹, 李琳玲^{1,2}, 许 锋³, 王 燕³, 程水源^{1*}

(1. 黄冈师范学院生命科学与工程学院, 湖北 黄冈 438000; 2. 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001; 3. 长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 利用 RACE 技术从银杏中克隆到过氧化氢酶基因 (*GbCAT1*) 的 cDNA 全长。进化树分析结果表明: *GbCAT1* 和其他物种的 *CAT* 源自于相同的祖先。Southern 杂交显示: *GbCAT1* 属于 1 个小的多基因家族。实时定量 RT-PCR 分析表明: *GbCAT1* 在银杏的根、茎、叶和果中都有表达, 在叶中的相对表达量最高, 其次为果、茎和根。*GbCAT1* 的转录受到 ABA、渗透压、紫外、低温和高温胁迫的诱导。水杨酸处理下, *GbCAT1* 相对表达量迅速降低。*CAT1* 基因在逆境条件下的相对表达变化与环境胁迫有关。

关键词: 银杏; *CAT1* 基因; 表达分析

中图分类号: S792.95

文献标识码: A

Molecular Cloning, Characterization and Expression of Catalase1 Gene from *Ginkgo biloba*

CHENG Hua¹, LI Lin-ling^{1,2}, XU Feng³, WANG Yan³, CHENG Shui-yuan²

(1. College of Life Science and Engineering, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, Hubei, China;
2. College of Horticulture Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China;
3. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of *Ginkgo biloba* L. *Catalase1* gene was isolated from *G. biloba*. Phylogenetic tree analysis revealed that *GbCAT1* shared the same ancestor with other *CAT*. The result of Southern analysis showed that *GbCAT1* gene was encoded by a small gene family in *G. biloba*. The expression analysis by RT-PCR showed that *GbCAT1* expressed in a tissue-specific manner in *G. biloba*. *GbCAT1* was also found to be up-regulated by the four tested abiotic stress, abscisic acid, osmotic stress, low temperature, and thermal injury. The expression of *GbCAT1* was regulated to reduce by salicylic acid. These results indicate that the *CAT1* has the potential to play a role in response to environmental stresses.

Key words: *Ginkgo biloba*. ; *Catalase1* gene; expression analysis

过氧化氢酶(CATs)是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的酶,属于一种血红蛋白酶类,其生物学功能是催化过氧化氢降解为分子氧和水^[1]。在植物细胞中CATs主要分布在过氧化物酶体、乙醛酸循环体和细胞质中,少数分布在线粒体内^[2-3],现

已从多种植物中克隆纯化到CATs基因并做了相应的分析研究^[4-9]。

大量研究表明,提高植物体内抗氧化酶活性和增强抗氧化代谢的水平是提高植物抗逆性的有效途径^[10-11]。在抗性不同的物种或品种中,氧化伤害

收稿日期: 2009-07-20

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0746);湖北省教育厅重大科技项目(Z200627002)和湖北省青年杰出人才基金(2003AB014)

作者简介: 程华(1980—),男,湖北麻城人,博士,主要从事银杏抗逆性分子机理研究; E-mail: chenghua1437@126.com

* 通讯作者: (Email: s_y_cheng@sina.com)

的降低与抗氧化系统相关酶类表达量的增加有关^[12]。目前,已确定过氧化氢酶在环境变化造成的活性氧的毒害过程中起重要作用^[13-14]。在高等植物中, *CATs* 家族由多基因编码,其表达受到空间、发育和环境因素等的调控^[9],也受到外界损伤^[4]、臭氧^[15]、二氧化硫^[15]、紫外线^[16]和冷害^[17]等恶劣环境的影响。研究表明, *CATs* 在植物防御、胁迫应答、延缓衰老及控制细胞的氧化还原平衡等方面起重要作用, *CATs* 活性的高低与植物对逆境的适应呈正相关^[18]。 *CATs* 缺失的植物,对环境压力敏感^[19],而通过转基因将 *CATs* 转入其它物种,能提高植物对某些逆境的适应^[20-21]。

银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.) 历经百万年各种复杂的气候环境,不仅表现了强大的生活适应能力,而且在形态上至今很少改变。这与其对环境的适应、对各种逆境胁迫的耐受能力紧密相关^[22]。对银杏 *CAT1* 基因 (*GbCAT1*) 的克隆和表达分析研究有助于揭示银杏对环境的适应机理以及抗逆性的生理机制,并为利用基因工程技术培育优良林木提供理论依据和基因资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

银杏品种为“家佛手”,12年生嫁接树。所有诱导处理的银杏材料均采集于长江大学园艺园林学院温室1年生“家佛手”盆栽苗;2008年5月中旬从12年生嫁接树上采集根蘖苗嫩茎,5月中旬采集根和叶,7月上旬采集果。

大肠杆菌 TOP10 为本实验室保存, pMD18-T 购自 TAKARA。

限制性内切酶、Taq 酶、PCR 耗材、SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit 均为 TAKARA 公司产品; DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 购自 Roch; Superscript 反转录酶为 Invitrogen 公司产品; 杂交膜使用 Millipore 公司的 PVDF 膜; 胶回收试剂盒为 TIANGEN 公司离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒; 脱落酸 (ABA) 和水杨酸 (SA) 为 Sigma 公司产品; 氨基青霉素钠盐购自上海生工生物工程技术有限公司; 基因克隆引物合成和测序由上海生工生物技术有限公司完成, 引物序列见表 1, 引物扩增程序见表 2; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 DNA 提取及 Southern 杂交

用 CTAB 法提银杏幼叶 DNA, DNA 提取液的成

分与魏春红等^[23]完全相同。Southern 杂交中, 基因组分别使用 *EcoR*、*Hind* 和 *Pvu* 酶切, 探针浓度、杂交操作参考 Roch 公司试剂盒。

表 1 银杏 *CAT1* 基因克隆及分析用引物

引物名称	引物序列 (5' - 3')
GbCATS	GCTAARGGIIITYTTYGARGTIAC
GbCATA	GCRTTGACAGGIARYTGIARRTA
CAT3R1	TGCTTACCCAGAATGGCAAGGATACA
CAT3R2	CGGCAGATGAGGATAAGTTGGAT
CAT5R1	CTGTGCCTCTGTGTGTCA CCGTAT
CAT5R2	CAGCCTGCTCATCAAGTAAGAAC
CATS	AGGTTTTGGCGTTCACACTTT
CATR	CACAGCCTGCTCATCAAGTAAG
CATP*	CTTACCCAGAATGGCAAGGAT
GAPU	TAGGAATCCCGAGGAAATACC
GAPD	TTCACGCCAACAACGAACATG
GAPP*	GTGAGACTGGCGTAGAG

注: * 表示定量 PCR TagMAN 探针。

表 2 PCR 扩增程序

PCR 引物	程序	循环数 / 次
GbSP, GbAP	94 , 30 s; 52 黹 63 , 40 s; 72 , 1 min;	32
CAT5R1, UPM	98 , 10 s; 68 , 1 min;	30
CAT5R2, NUP	94 , 30 s; 56 , 40 s; 72 , 1 min;	35
CAT3R1, UPM	98 , 10 s; 68 , 1 min;	30
CAT3R2, NUP	94 , 30 s; 57 , 40 s; 72 , 1 min;	30
CATS, CATS	94 , 30 s; 58 , 30 s; 72 , 1 min;	35

注: 简并 PCR 中退火温度依次从 52 黹 63 , 共设置 12 个温度梯度。

1.3 总 RNA 提取、反转录

各银杏组织采集后放入液氮中速冻并转入 - 70 超低温冰箱保存。不同组织总 RNA 提取采用蔡荣等^[24]的 CTAB 法, 总 RNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 反转录 cDNA 合成及 RACE 参照试剂盒说明书。

1.4 诱导处理

1.4.1 激素处理 选择 ABA 和 SA, 浓度均为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 喷洒处理盆栽苗, 每种激素处理 3 盆, 处理后分别于 12、24、36、48、60 h 采取盆栽苗顶部叶片, 每株采取 3 片, 液氮中保存。清水处理为对照。

1.4.2 紫外 (UV-B) 处理 选用 50 $\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 强度紫外照射, 分别于 2、4、6、8 h 采集盆栽苗处于 50 $\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 强度处外围叶片。每株 3 片, 液氮保存, 提取 RNA 反转录, 并做 RNA 转录水平的定量分析。普通光照培养为对照。

1.4.3 渗透压处理 5.9 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 喷洒处理盆栽苗, 分别于 2、4、6、8、10 h 后采集叶片, 液氮保存。清水处理为对照。

1.4.4 温度处理 (1) 低温 4 处理: 盆栽苗放入

4 培养箱中,分别于 4、8、12、16 h 后采取叶片,液氮保存;(2) 高温处理:将盆栽苗分别放入 36、40、44 培养箱中,分别于 4、8、12、16 h 后采取叶片,液氮保存。常温 25 培养盆栽苗为对照。

以上每组不同处理及相应对照条件下取 3 株银杏苗样品,每样品 mRNA 相对转录水平重复测定 3 次,测定值用平均值加标准差表示。

1.5 表达检测

从 12 年生银杏嫁接苗的根、茎、叶和幼果上分别提取 RNA 用于 Real-time PCR 分析 *GbCAT1* 基因的组织表达特异性。分别从 ABA、SA、UV-B、NaCl、低温和高温不同处理时间叶片及相应对照叶片上提取 RNA,用于 Real-time PCR 分析 *GbCAT1* 基因响应非生物胁迫下的表达模式。银杏保守基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*) 为参照基因校正和标准化目的基因^[25]。*GbCAT1* 基因特异引物、TaqMan MGB 探针(表 1: CATS、CATR 和 CATP)和 *GAPDH* 基因特异引物、TaqMan MGB 探针(表 1: GAPU、GAPD 和 GAPP)利用 Sequence Detection System 软件设计。Real-time PCR 试验均交由大连 Takara 公司试验室完成。采用比较 C_T (C_T 指荧光 PCR 扩增过程中荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数)值来比较各基因的相对表达量,目的基因 (*GbCAT1*) 相对表达量用目的基因 mRNA 表达水平比内参基因 mRNA 表达水平的相对倍数来表示。

2 结果与分析

2.1 *GbCAT1* cDNA 的克隆及其序列分析

以反转录 cDNA 为模板,用引物 GbCATS 和 Gb-CATA(表 1)做简并 PCR 扩增,得到 1 条 890 bp 的扩增片段,扩增结果经 NCBI 比对分析为 *GbCATs* 序列片段。根据测序结果分别设计 5' 和 3' RACE 引物: CAT5R1、CAT5R2、CAT3R1 和 CAT3R2(表 1)。扩增结果测序拼接得到 1 841 bp *GbCAT1* 全长序列(Genbank 登录号: FJ55022),包含 1 个 1 479 bp 最大读码框(ORF)。分析显示: *GbCAT1* ORF 含有一段植物基因翻译起始保守序列 CAGAATGG。*GbCAT1* ORF 序列编码 1 条 492 Aa 氨基酸残基的多肽序列,预测分子量为 56.95 kDa,等电点(pI)为 7.42。

用近邻相接法对不同植物 GbCAT1 氨基酸序列作进化树分析(图 1),图 1 中数字代表 bootstrap 值,重复检测 1 000 次,进化树下方为相对进化距离。在选取物种中, CATs 被分为三大类(图 1),在被子

植物中,双子叶植物百脉根 (*Lotus corniculatus* Linn)、萝卜 (*Raphanus sativus* Linn)、大豆 (*Glycine max*(Linn.) Merr.) 等为一组,其与单子叶植物分化时间最迟,集中在 0.09 左右;银杏、长白松 (*Pinus sylvestris* var. *syvestrifomis* Cheng et C. D. Chu) 等裸子植物为一组,与被子植物的进化分歧时间较早,在 0.13 到 0.14;雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* Flotow.) 和莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii* Dangerard) 较原始的藻类单独为一组,与其他分析物种进化分歧时间大于 0.15。

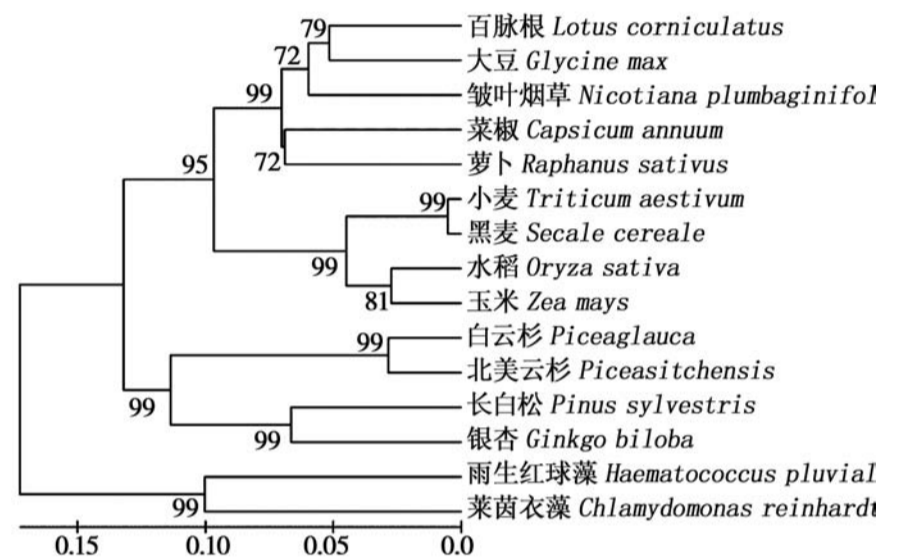


图 1 植物线粒体 CATs 系统发生树

2.2 *GbCAT1* Southern 印迹分析

为了确定 *GbCAT1* 基因在基因组中的拷贝数,设计了一对引物用以扩增 cDNA 的一段插入序列作为杂交探针。选择一段不含 *EcoR*、*Hind* 和 *Pvu* 酶切位点的 *GbCAT1* 基因组外显子序列作为杂交探针,结果显示:每个基因组酶切产物在 0.5 到 21 kb 有 3 到 4 个杂交条带(图 2)。

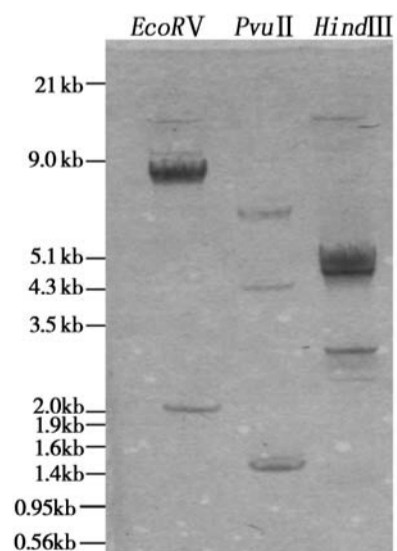


图 2 *GbCAT1* southern 杂交分析

2.3 *GbCAT1* 不同组织表达分析

定量分析显示: *GbCAT1* 基因在银杏的根、茎、叶和果中都有表达,但相对表达量存在较大差异。*GbCAT1* 在银杏叶组织中表达量最高,果和茎次之,根部的表达量最低(图 3)。

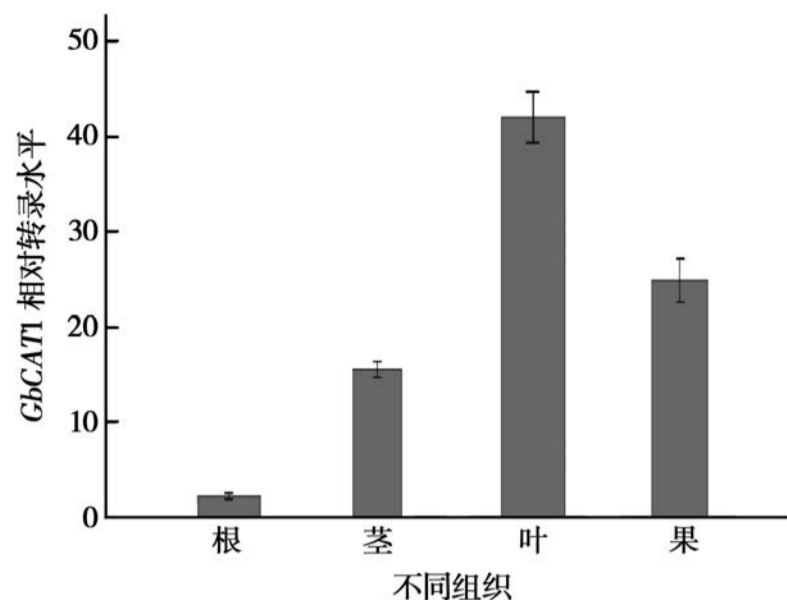


图 3 银杏不同组织 *GbCAT1* 基因 RT-PCR 表达

2.4 *GbCAT1* 诱导表达分析

植物激素的诱导试验结果显示: ABA 能够迅速提高 *GbCAT1* 表达量, 相对表达量随时间增加而积累(图 4), 而 SA 则明显抑制 *GbCAT1* 基因的表达, 随着处理时间的延长而逐渐降低(图 4)。在 ABA 的处理中, *GbCAT1* 表达量在 24 h 至 36 h 增加最明显, 到 48 h 表达量已达最大值, 60 h 持续稳定表达。SA 喷洒处理 12 h 后, *GbCAT1* 表达量开始下降, 而处理 48 h 后表达量降到最低, 只有对照的 1/3, 60 h 表达量又有微弱上升。

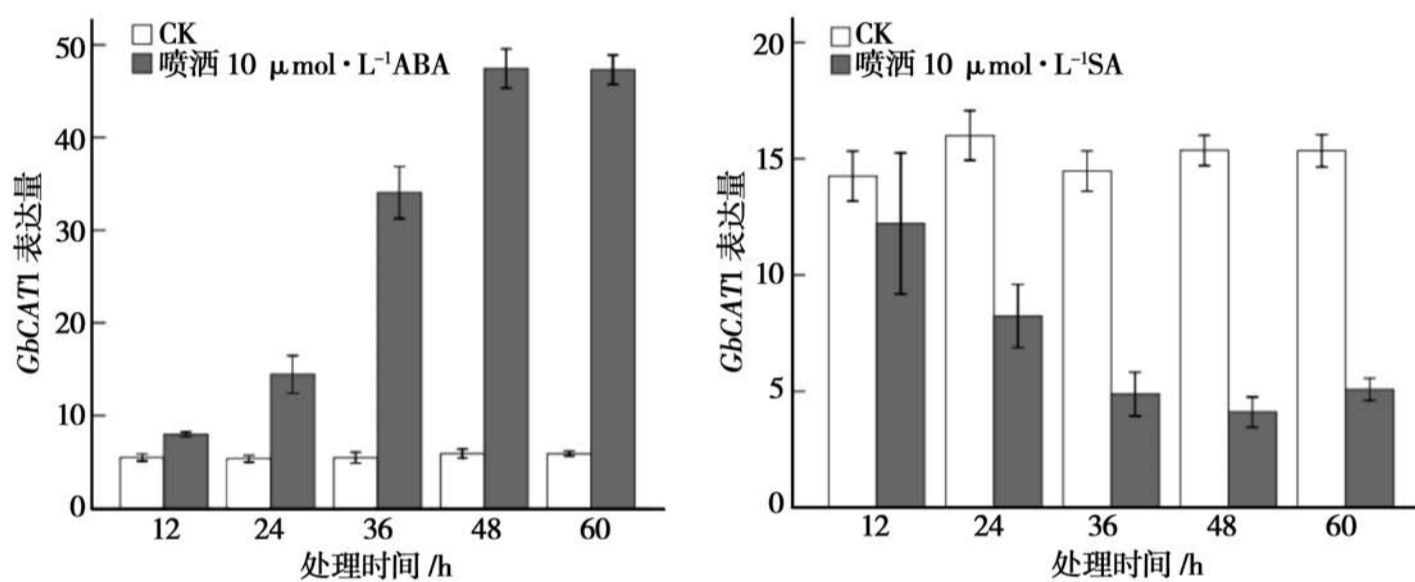


图 4 不同激素处理 1 年生银杏 *GbCAT1* 基因 RT-PCR 表达分析

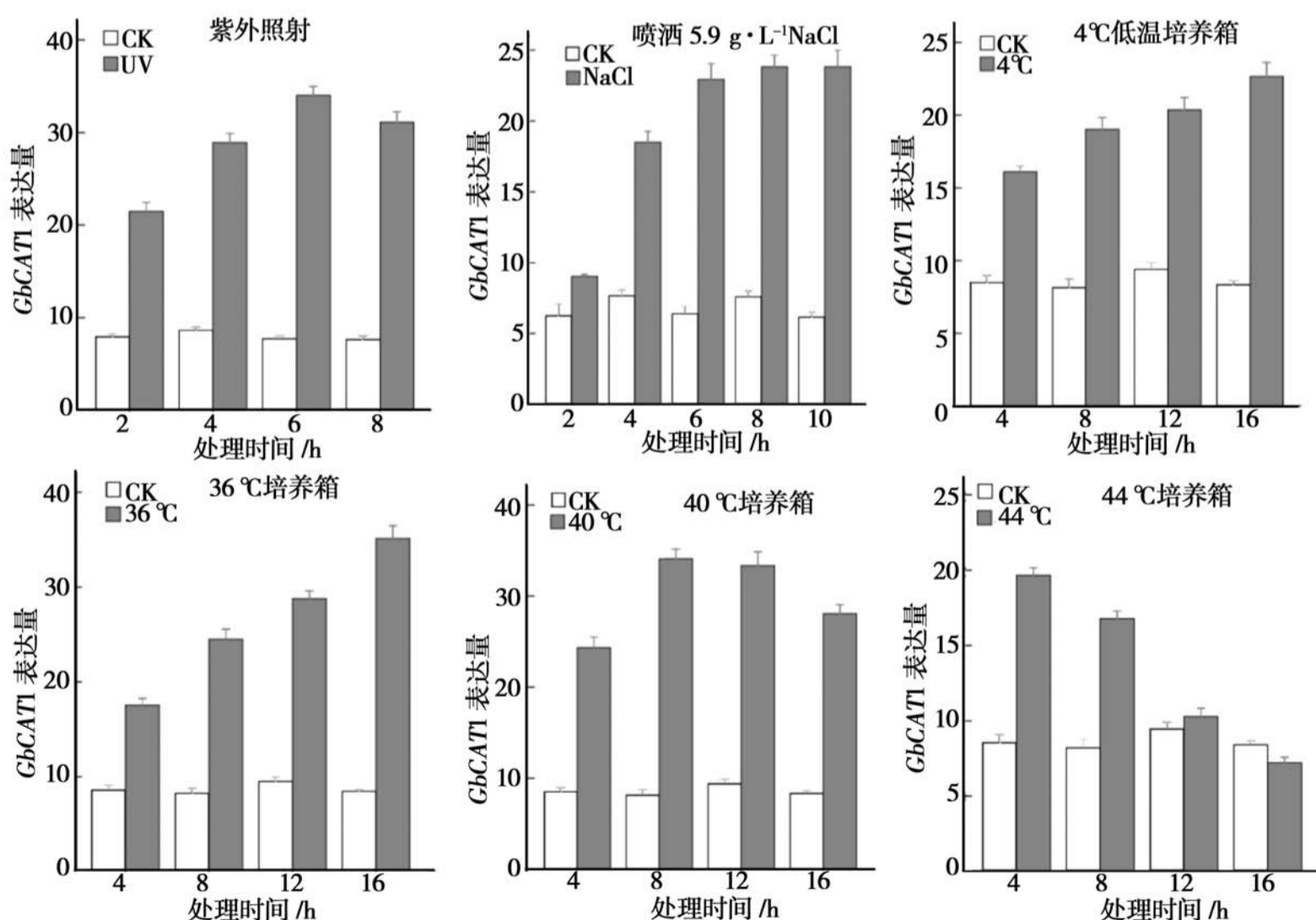


图 5 不同逆境条件处理 1 年生银杏 *GbCAT1* 基因 RT-PCR 表达分析

紫外照射能够显著提高银杏 *CAT1* 基因的相对表达水平(图5)。紫外处理 2 h 后, *CAT1* 表达量为对照组的 2.7 倍(图5);处理 4 h 后 *CAT1* 表达量为对照组的 3.3 倍,处理 6 h 后 *CAT1* 表达量小幅上升,处理 8 h 后 *CAT1* 表达量转为下降。

渗透压也能明显诱导 *CAT1* 的表达(图5):渗透压处理 2 h *CAT1* 表达量较对照有微量上升,处理 4 h 后 *CAT1* 表达量迅速上升到对照的 2.1 倍,处理 6 h 后 *CAT1* 表达量微弱增加到对照的 3.0 倍,处理 8、10 h 后 *CAT1* 表达量基本达最大值,保持不变。

4 低温对 *GbCAT1* 的表达的影响缓慢,低温处理 4 h 后 *CAT1* 相对表达量明显升高,随着处理时间的延长,表达量缓慢增加,16 h 左右 *CAT1* 相对表达量达最大值(图5)。

高温处理显示: *CAT1* 对高温响应较快。36 处理 4 h, *CAT1* 相对表达量升高为对照的 2.0 倍,处理 8 h 后, *CAT1* 相对表达量继续稳定上升,约为对照的 3.0 倍,12 h 达 3.1 倍,16 h 约为对照的 4.2 倍(图5);40 高温处理比 36 响应更为迅速,处理 4 h 后, *CAT1* 相对表达量为对照的 2.9 倍,处理 8 h 后, *CAT1* 相对表达量为对照组的 3.6 倍,而处理 16 h 后, *CAT1* 相对表达量则明显下降,约为对照的 3.2 倍(图5);44 高温处理与 40 表达模式相似, *CAT1* 表达量先升后迅速降低,4 h 表达量约为对照组的 2.3 倍,8 h 后为对照组的 1.9 倍,处理 12 h *CAT1* 相对表达量与对照基本持平,而处理 16 h 后 *CAT1* 相对表达量已比对照低(图5)。

3 讨论

目前,虽已从多种植物中克隆出 *CATs* 基因,但裸子植物 *CATs* 基因研究报道较少。本研究从银杏叶片中克隆到了过氧化氢酶基因的 cDNA 序列,氨基酸序列分析发现银杏 *CAT1* 与其它植物的 *CAT* 序列同源性较高。在高等植物中, *CAT* 亚基由一个小的多基因家族编码。在玉米种子发育时期有三种 *CATs* 基因编码三种不同的同功酶^[3, 26];在棉花 (*Gossypium hirsutum* Linn.) 种子中, *CATs* 多基因家族编码两种不同的 *CATs* 亚基,而且其时空表达受转录后水平而不是转录水平调控^[27];在银杏中, *CAT* 基因是一个小的多基因家族,这可能与 *GbCAT1* 不同组织和不同亚细胞结构分布有关。

银杏 *CAT1* 的表达具有组织特异性。在烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 中克隆鉴定了 3 个 *CATs*

基因,其中, *CAT1* 在叶内表达丰富,主要清除光呼吸产生的 H_2O_2 , *CAT3* 主要在种子内表达,清除脂肪酸氧化代谢产生的 H_2O_2 , *CAT2* 的表达受紫外、臭氧及病原诱导,在植物抗逆中有重要作用^[16, 28]。南瓜 (*Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poiret) *CATs* 基因的表达也出现器官特异性, *CAT1* 在种子和幼苗发育早期表达,与衰老有关; *CAT2* 在上胚轴和成熟叶内表达,而 *CAT3* 在下胚轴和根中表达^[9]。因此,银杏 *CAT1* 基因在叶中的大量表达与叶片光呼吸产生的 H_2O_2 清除有关,而在根中的 H_2O_2 的清除可能与其他同源基因的表达有关。

干旱、水渍、低温和高温等胁迫条件下,植物体内的脱落酸含量会增加。给银杏盆栽苗喷洒 ABA,提高了银杏 *CAT1* 基因的表达量。玉米幼苗在遭受干旱胁迫或被 ABA 处理时,其超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 的含量会发生显著变化,当用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理 12 h 后, *CAT* 的表达量增加了 37%。研究表明,外源 ABA 诱导的玉米 *CAT1* 的表达是通过 *CAT1* 启动子上的 ABRE2 和 CBF1 元件相互作用调节的^[29]。Zhang 等^[30] 研究认为, ABA 诱导 H_2O_2 产生并作为胞内信号因子,激活分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的信号级联反应,激活的 MAPK 能够刺激更多的 H_2O_2 产生,使外界刺激信号逐级放大,调控一些抗性相关基因的表达。CAT 在水杨酸诱导的植物系统性防卫反应 (SAR) 中起到了至关重要的作用^[31-32]。SA 喷洒处理银杏, *CAT* 表达量出现先降后升的现象,这与其他植物的处理结果类似。在芥菜 (*Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss.) 幼苗炼苗时期, SA 处理 2 h 后 3 h, H_2O_2 的含量和 *CAT* 活性明显降低到对照水平以下^[33]。SA 处理 1 d 左右的玉米悬浮培养组织, *CAT* 活性出现下降,但却提高了其抗冷害能力^[34]。研究表明, SA 通过与 *CAT* 等抗氧化酶的协同作用实现信号转导,从而在转录水平上启动和调控一些特殊防卫基因的表达,或者通过破坏亚细胞结构成分而导致细胞功能的丧失,进而产生超敏反应^[35]。因此,银杏 *CAT1* 在 SA 作用下的表达变化,可能会引起植物体超敏反应或者协同信号转导调节防卫基因的表达。

紫外处理能显著提高银杏 *CAT1* 的表达水平。在胡萝卜幼苗中 3 种 *CATs* 基因的表达受到紫外的不同影响,其中 *CAT1* 基因在紫外处理 1 h 后被诱导表达,而 *CAT2*、*CAT3* 则在处理 6 h 后才被诱导表

达^[5]。在烟草中也有类似的研究结果, $55 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 强度的紫外线能够诱导烟草 *CAT2* 和 *CAT3* 基因的表达, 但却抑制 *CAT1* 基因的表达^[16]。因此, 在遭遇紫外辐射时, 银杏 *CAT1* 应该和烟草 *CAT2* 或 *CAT3* 具有同样的作用。

在银杏中, *CAT1* 的表达和盐胁迫有关。在耐盐小麦品种中, 盐渍引起 CAT 活力上升, 从而可以清除活性氧造成的损害^[36]。高羊茅 (*Festuca arundinacea* Schreb.) 的 *CAT1* 能够清除渗透胁迫下产生的 H_2O_2 , 在高盐处理 4 h 后, *CAT1* 的表达量增加到最大^[37]。因此, *GbCAT1* 基因参与了银杏对盐胁迫的适应。

高温和低温都能引起银杏 *CAT1* 表达量的变化。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 叶绿体中, 随着冷驯化时间的延长, 基质中 *CAT2* 的含量都有不同程度地增加^[38], 线粒体中富含甘氨酸结合蛋白通过调节 CAT 等酶的活性而提高了拟南芥对冷害和冻害胁迫忍耐能力^[39]。玉米在 14 ℃ 冷锻炼时 *CAT3* 表达增强、酶活力提高, 并可以提高在 5 ℃ 低温冷处理时对氧化胁迫的抗性^[40]。4 ℃ 低温胁迫处理能提高银杏 *CAT1* 的表达量, 说明 *GbCAT1* 参与了银杏对低温胁迫的调节, 因此, 通过增强 CAT 活性能显著提高植物对低温的胁迫耐受性。高温胁迫对不同 CATs 异构酶的表达有不同诱导作用。Rainwater 等^[41] 发现, 热胁迫导致番茄 (*Solanum lycopersicum* Linn.) 产量降低, 但耐热品种比热敏感品种降低少, 在所有耐热品种中 CATs 活性都明显增加。在黑麦幼苗热胁迫处理中, 40 ℃ 高温处理 4 h 导致光合作用的光失活和 *CAT* 基因的光抑制^[42]。银杏在 36 ℃ 高温处理中, *CAT1* 的活性明显呈线性升高, 说明银杏 *CAT1* 基因可能在应对夏季高温天气中发挥了重要作用; 而在持续的 40 ℃ 及以上高温, 则可能会引起银杏叶片光合作用的光失活及 *CAT1* 基因的光抑制。

本研究从银杏中克隆了 *CAT1* 基因, 并定量分析了其不同组织表达及不同胁迫处理表达特性。*GbCAT1* 在抗逆激素 ABA 和 SA 处理下, 表达量发生显著变化, 暗示 *GbCAT1* 协同信号转导, 参与调节抗逆性基因的表达。各种逆境处理结果显示: *CAT1* 基因使银杏适应不同逆境胁迫, 包括紫外、渗透压、低温和高温因子等。

参考文献:

[1] Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduc-

- tion of signals triggering antioxidant gene defenses [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, 38 (7): 995 - 1014
- [2] Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, et al. Catalases in plants [J]. *Molecular Breeding*, 1995, 1(3): 207 - 228
- [3] Redinbaugh M G, Sabre M, Scandalios J G. The distribution of catalase activity, isozyme protein, and transcript in the tissues of the developing maize seedling [J]. *Plant Physiology*, 1990, 92(2): 375 - 380
- [4] Lee S H, An C S. Differential expression of three catalase genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Molecules and cells*, 2005, 20(2): 247 - 255
- [5] Kwon S I, Lee H, An C S. Differential expression of three catalase genes in the small radish (*Rhaphanus sativus* L. var. *sativus*) [J]. *Molecules and cells*, 2007, 24(1): 37 - 44
- [6] Boldt R, Scandalios J G. Influence of UV-light on the expression of the *Cat2* and *Cat3* catalase genes in maize [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 23(3): 505 - 514
- [7] Chen Z, Iyer S, Caplan A, et al. Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues [J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(1): 193 - 201
- [8] Eising R, Gerhardt B. Catalase synthesis and turnover during peroxisome transition in the cotyledons of *Helianthus annuus* L. [J]. *Plant Physiology*, 1989, 89(3): 1000 - 1005
- [9] Esaka M, Yamada N, Kitabayashi M, et al. cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin [J]. *Plant molecular biology*, 1997, 33(1): 141 - 155
- [10] Mittler R, Zilinskas B A. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase [J]. *Plant Physiology*, 1991, 97(3): 962 - 968
- [11] Mittler R, Zilinskas B A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought [J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(3): 397 - 405
- [12] Pinhero R G, Rao M V, Paliyath G, et al. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings [J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(2): 695 - 704
- [13] Esaka M, Maeshima M, Asahi T. Mechanism of the increase in catalase activity through microbody development in wounded sweet potato root tissue [J]. *Plant and cell physiology*, 1983, 24(4): 615 - 623
- [14] Sakajo S, Nakamura K, Asahi T. Increase in catalase mRNA in wounded sweet potato tuberous root tissue [J]. *Plant and cell physiology*, 1987, 28(5): 919 - 924
- [15] Badiani M, Schenone G, Paolacci A R, et al. Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants [J]. *Plant and cell physiology*, 1993, 34(2): 271 - 279
- [16] Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, et al. Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L [J]. *Plant*

- Physiology, 1994, 106(3): 1007 - 1014
- [17] Prasad T K, Anderson M D, Martin B A, *et al.* Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide [J]. *The Plant Cell Online*, 1994, 6(1): 65 - 74
- [18] Mandhania S, Madan S, Sawhney V. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings [J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(2): 227 - 231
- [19] Dat J F, Pellinen R, Beeckman T, *et al.* Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco [J]. *Plant Journal*, 2003, 33(4): 621 - 632
- [20] Polidoros A N, Mylona P V, Scandalios J G. Transgenic tobacco plants expressing the maize *Cat2* gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress [J]. *Transgenic Research*, 2001, 10(6): 555 - 569
- [21] Mohamed E A, Iwaki T, Munir I, *et al.* Overexpression of bacterial catalase in tomato leaf chloroplasts enhances photo-oxidative stress tolerance [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26(2): 2037 - 2046
- [22] Deng Z, Wang Y, Jiang K, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel dehydrin gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Bioscience Reports*, 2006, 26(3): 203 - 215
- [23] 魏春红, 李 毅. 现代分子生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 135 - 137
- [24] 蔡 荣, 许 锋, 陈柳吉, 等. 银杏不同组织的总 RNA 提取方法的改进 [J]. *生物技术*, 2007, 17(4): 38 - 40
- [25] Jansson S, Meyer-Gauen G, Cerff R, *et al.* Nucleotide distribution in gymnosperm nuclear sequences suggests a model for GC-content change in land-plant nuclear genomes [J]. *Journal of molecular evolution*, 1994, 39(1): 34 - 46
- [26] Redinbaugh M G, Wadsworth G J, Scandalios J G. Characterization of catalase transcripts and their differential expression in maize [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1988, 951(1): 104
- [27] Kunce C M, Trelease R N. Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds 1 [J]. *Plant Physiology*, 1986, 81(4): 1134 - 1139
- [28] Willekens H, Langebartels C, Tire C. Differential expression of catalase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* [J]. *PNAS*, 1994, 91(22): 10450 - 10454
- [29] Guan L, Zhao J, Scandalios J G. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H_2O_2 is likely intermediary signaling molecule for the response [J]. *Plant Journal*, 2000, 22(2): 87 - 95
- [30] Zhang A, Jiang M, Zhang J, *et al.* Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 475
- [31] Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, *et al.* Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance [J]. *Science*, 1993, 261(5122): 754 - 756
- [32] Grolach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, *et al.* Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat [J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(4): 629 - 643
- [33] Dat J F, Lopez-Delgado H, Foyer C H, *et al.* Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings [J]. *Plant Physiology*, 1998, 116(4): 1351 - 1357
- [34] Janda T, Szalai G, Tari I, *et al.* Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants [J]. *Planta*, 1999, 208(2): 175 - 180
- [35] Chen Z, Silva H, Klessig D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid [J]. *Science*, 1993, 262(5141): 1883 - 1886
- [36] 王晓娟, 倪建福. 盐胁迫下小麦新品系 89122 的抗氧化酶类活性变化的研究 [J]. *兰州大学学报*, 1999, 35(1): 140 - 144
- [37] Yang W L, Liu J M, Chen F, *et al.* Identification of *Festuca arundinacea* schreb *Cat1* catalase gene and analysis of its expression under abiotic stresses [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48(3): 334 - 340
- [38] Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, *et al.* The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(5): 720 - 734
- [39] Kim J Y, Park S J, Jang B, *et al.* Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions [J]. *Plant Journal*, 2007, 50(3): 439
- [40] 刘汉梅, 张怀渝, 谭振波, 等. 玉米 *Catalase-3* 基因克隆及低温表达研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2006, 24(3): 272 - 275
- [41] Rainwater D T, Gossett D R, Millhollon E P, *et al.* The relationship between yield and the antioxidant defense system in tomatoes grown under heat stress [J]. *Free Radical Research*, 1996, 25(5): 421 - 435
- [42] Feierabend J, Schaan C, Hertwig B. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II [J]. *Plant Physiology*, 1992, 100(3): 1554 - 1561