

文章编号:1001-1498(2016)04-0471-09

杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因的克隆、表达及功能分析

王江英^{1,2}, 范正琪¹, 殷恒福¹, 李辛雷¹, 吴斌¹, 李纪元¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江省林木育种技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311400;

2. 江苏省连云港市农业科学院花卉研究中心, 江苏 连云港 222006)

摘要: [目的] 利用分子生物学技术探讨杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因的表达模式及在模式植物烟草中所起的抗寒、耐热作用, 为今后山茶花抗逆育种奠定基础。 [方法] 根据山茶花同源序列设计特异性引物, 利用同源克隆和 3', 5'-RACE 技术, 从杜鹃红山茶嫩叶组织中克隆出抗坏血酸过氧化物酶 (APX), 命名为 *CaAPX*, 基因全长 1 097 bp, 开放阅读框 753 bp, 编码 250 个氨基酸。实时荧光定量 PCR 对杜鹃红山茶 7 种组织和温度胁迫下该基因的表达模式进行分析。 [结果] 表明: *CaAPX* 基因在杜鹃红山茶 7 种组织中均得到表达, 但表达水平不一, 表达量由高到低依次为: 未成熟果实 > 嫩叶 > 花苞 > 叶芽 > 种胚 > 花瓣 > 花芽, 其中, 未成熟果实中的表达量是其它组织的 2.68 ~ 11.44 倍; 温度胁迫处理 8 h 后该基因呈上调表达, *CaAPX* 基因表达量分别是 0 h 的 3.49 和 2.67 倍。 *CaAPX* 基因转化烟草分析表明, 过量表达 *CaAPX* 基因后, APX 活性提高了 2.58 ~ 4.09 倍, 抗坏血酸 (AsA) 含量提高了 2.67 ~ 3.56 倍, 并且转基因烟草植株的抗寒、耐热能力也获得提高。 [结论] 通过过量表达 *CaAPX* 基因能够提高烟草植株的抗寒、耐热性, 为山茶花抗逆育种提供了科学依据。

关键词: 杜鹃红山茶; 基因克隆; 温度胁迫; 表达分析; 转基因烟草

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Cloning, Expression and Functional Analysis of *CaAPX* Gene from *Camellia azalea*

WANG Jiang-ying^{1,2}, FAN Zheng-qi¹, YIN Heng-fu¹, LI Xin-lei¹, WU Bin¹, LI Ji-yuan¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding of Zhejiang Province, Hangzhou 311400, Zhejiang, China; 2. Flower Research Center of Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Lianyungang 222006, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] Using molecular biology techniques to investigate the expression patterns of *CaAPX* gene in *Camellia azalea*, and to carry out the functional analysis of *CaAPX* in tobacco under temperature stress. [Method] On the basis of homologous sequences of *C. japonica*, an ascorbate peroxidase (APX) gene was isolated from the tender leaf in *C. azalea* by the 3', 5'-RACE technology named *CaAPX*. The full-length cDNA of *CaAPX* is 1 097 bp, containing a 753 bp ORF which encodes 250 amino acids. [Result] Quantitative real-time PCR analysis indicated that the *CaAPX* was expressed differently in all examined camellia tissues, and the expression levels in order were immature green fruit, tender leaf, flower, leaf bud, seed embryo, petal and flower bud. The highest expression level of *CaAPX* was in immature green fruit, approximately ranging 2.68 to 11.44 times as high as that of the other six groups. It was also found that the expression level was notably up-regulated in leaves of camellia plants subjected to abnormal temperatures. Furthermore, the APX activity in transgenic plants increased by 158% -

收稿日期: 2015-05-12

基金项目: 国家“十二·五”科技支撑计划课题(2012BAD01B0703); 浙江省花卉新品种选育重大科技专项(2012C12909-6); 浙江省与中国林业科学研究院省院合作林业科技项目(2012SY02); 国家农业科技成果转化资金项目(GB2013GB24320606); 国家林业局引进国际先进林业科学技术项目(948项目)(2014-4-16)

作者简介: 王江英(1984—), 女, 江苏泰州人, 博士研究生, 主要从事花卉分子育种研究。

* 通讯作者: 李纪元(1964—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事园林植物与观赏园艺研究。 E-mail: jiyuan_li@126.com

309%, and the AsA content increased by 167% – 256% as higher as wild type plants. In addition, the over expression of *CaAPX* enhanced cold and heat stress tolerance in transgenic plants under temperature stresses. [Conclusion] The over expression of *CaAPX* from *C. azalea* could enhance the cold and heat stress tolerance in transgenic tobacco, and which also provide a basis in molecular breeding of resistance adversity of Camellias in the future.

Keywords: *Camellia azalea*; gene clone; temperature stress; expression analysis; transgenic tobacco

山茶属 (*Camellia* Linn.) 植物作为我国亚热带常绿阔叶林固有的特征植物种类, 在稳定的群落结构中属于森林中下层小乔木或灌木, 较喜欢温暖湿润的气候, 因此, 其抗寒、耐热性较差^[1]。山茶花 (*C. japonica* Linn.) 绝大部分品种是在秋冬及春季开花, 0℃ 以下的长期低温或 35℃ 以上的长期高温会对茶花造成冻害或灼伤, 甚至导致落花落蕾或花芽无法分化^[2]。通过分子生物学技术将具有抗寒、耐热功能的外源基因导入山茶花中, 成为山茶花抗逆育种的主要发展趋势之一。

温度胁迫会引起植物细胞内活化氧 (ROS) 等有毒物质的积累, 对植物的代谢、细胞稳态以及主要的生理耦合过程产生不利影响, 严重时甚至导致细胞死亡^[3-4]。植物为了抵御这种胁迫, 自身会启动抗氧化防御机制, 抗坏血酸 (AsA) - 谷胱甘肽 (GSH) 循环对于清除 ROS 具有极其重要的作用^[5-6], 而抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 在此循环过程中是清除 H₂O₂ 的主要酶系, 能够利用 AsA 作为电子供体将 H₂O₂ 转化为 H₂O^[7-9]。目前, 已从多种植物如烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、土豆 (*Solanum tuberosum* L.) 及茶树 (*C. sinensis* (L.) O. Ktze.) 中相继克隆出 APX 基因, 并且 APX 基因过量表达有助于提高植株抵抗冷冻及高温伤害的能力^[10-12]。

杜鹃红山茶 (*C. azalea* Wei) 是山茶花的一个珍稀品种, 也是珍稀濒危植物, 最早发现于中国广东省阳春市鹅凰嶂自然保护区, 其具有抗逆性强、四季开花、花大色艳等特点, 是培育茶花新品种非常珍贵的种质资源^[13]。本研究以杜鹃红山茶为材料, 分离获得 APX 基因, 通过实时荧光定量 PCR 技术, 分析 APX 基因在杜鹃红山茶不同组织及温度胁迫下的表达模式, 以及温度胁迫下过量表达 APX 基因的模式植物烟草的抗寒、耐热能力, 为山茶花抗寒、耐热性分子育种提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

杜鹃红山茶种植于中国林科院亚热带林业研究所观赏园艺研究组苗圃, 野生型烟草 (*N. tabacum* L. cv. SR1) 为本实验室培育。采集杜鹃红山茶不同组织, 包括嫩叶、叶芽、花芽、花、花瓣、未成熟果实及种胚。杜鹃红山茶胁迫处理方法为: 将生长状态相似及状态良好的杜鹃红山茶植株置于 4℃ 或 38℃ 的光照培养箱中 1 200 Lx (16 h 光照/8 h 黑暗) 分别胁迫处理 0、2、4、8、12 h, 采集各时间段的第 4 功能叶。所有材料采集后锡箔纸包裹立即投入液氮速冻, 置于 -80℃ 冰箱保存备用。引物合成及测序由华大基因公司 (上海) 完成。

1.2 *CaAPX* 基因的克隆

按照 EASY Spin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒说明书提取总 RNA, 经反转录获得 cDNA。根据 GenBank 公布的 *CaAPX* 同源基因序列, 设计一对特异引物 F1、R1 (表 1), 进行保守区片段扩增, 再按照 TaKaRa 3'-Full RACE Kit、5'-Full RACE Kit 说明书进行目的片段 3' 和 5' 末端的扩增, 其中 3' 末端扩增所用引物为 F2、F3 (表 1), 5' 末端扩增所用引物为 R2、R3 (表 1)。序列拼接后, 设计全长引物 F4、R4 (表 1), 进行目的基因 CDS 编码区的扩增。

1.3 生物信息学分析

DNAMAN 软件序列拼接后在 NCBI 上进行 Blast 同源性比对, 选择同源性较高的 9 种植物, 运用 DNAMAN 和 MEGA5.05 软件进行氨基酸多序列比对分析和系统进化树分析。利用 ProtParam 软件 (<http://cn.expasy.org>) 分析蛋白质的理化特性, HNN 软件 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 进行蛋白二级结构分析, 采用 <http://swissmodel.expasy.org> 提供的 Swidd-model 同源建模方法预测蛋白质相应的三级结构。

表1 引物序列及用途

编号	序列(5' -3')	引物用途
F1	GCATGGCACTCTGCTGCTAC	用于保守区片段扩增
R1	CATCCGCAGCATATTTCTCAAC	
F2	GTTCCAGAGAGCTTCATGTG	3' RACE-Outer
F3	CATCCGCAGCATATTTCTCAAC	3' RACE-Inner
R2	GCATGGCACTCTGCTGCTAC	5' RACE-Outer
R3	ACTGGAGGACCTGTATGTTCC	5' RACE-Inner
F4	ATGGGGAAGTGCTATCCAACATG	<i>CaAPX</i> 基因 ORF 扩增
R4	TTAGGCTTCAGCAAACCCAG	
F5	TAGGAACAGGACCTCATTGCC	杜鹃红山茶实时荧光定量 PCR 分析;转 <i>CaAPX</i> 基因烟草植株实时荧光定量 PCR
R5	AAGGTGTCGCCTATGTTGACG AC	
F6	GCTCTAGAATGGGGAAGTGCTATC	
	<i>Xba</i> I	植物表达载体构建;转 <i>CaAPX</i> 基因烟草阳性植株鉴定
R6	GCGGATCCTTAGGCTTCAGCAAAC	
	<i>Bam</i> H I	
18S-F	GACTCAACACGGGGAACTTACC	山茶 18S RNA 内参基因片段扩增
18S-R	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	
<i>EF1a</i> -F	CGGTTAAGGATCTCAAGCGT	烟草 <i>EF1a</i> 内参基因片段扩增
<i>EF1a</i> -R	GAACTGGAGCATATCCATTGCC	

注:表中下划线代表酶切位点。

1.4 *CaAPX* 基因在不同组织及温度胁迫下的表达分析

根据引物设计要点,在靠近目的基因 cDNA 全长序列 3' 端设计一对引物 F5、R5(表1)。利用实时荧光定量 PCR 方法,检测 *CaAPX* 基因在杜鹃红山茶叶、叶芽、花芽、花、花瓣、未成熟果实及种胚中的表达情况及其在 4、38℃ 胁迫诱导不同时段后的表达情况。以山茶 18 S 为内标基因,扩增引物为 18S-F、18S-R(表1),与目的基因同机分管扩增。生物学试验重复 3 次。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法求得不同组织及温度胁迫下 *CaAPX* 基因表达量,再用 Excel 2007、SigmaPlot 11.0 软件对数据进行统计分析并绘图。

1.5 植物表达载体的构建

设计一对引物 F6、R6 进行载体构建。对含有目的基因 *CaAPX* 的 pGEM-T₄ 重组质粒以及植物表达载体 pBI121 质粒用 *Xba* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶进行双酶切,将酶切回收纯化后的 *CaAPX* 基因片段分别和载体用 T₄ 连接酶 16℃ 过夜连接,转化大肠杆菌感受态 DH5 α 。

1.6 农杆菌介导转化烟草及 RT-PCR 检测

采用农杆菌介导的‘叶盘法’^[14]进行烟草转化。提取待转基因烟草总 RNA,反转录获得 cDNA,利用引物 F6、R6(表1)进行 PCR 检测。

1.7 转基因烟草不同株系间荧光定量 RT-PCR 分析

分别采集 *CaAPX* 基因转化烟草阳性株系 AL1、

AL2、AL3 的第 4 功能叶,提取总 RNA。利用引物 F5、R5 进行实时荧光定量 PCR,检测 *CaAPX* 基因在转基因烟草叶片中的表达情况,以烟草 *EF1a* 基因作为内标基因,扩增引物为 *EF1a*-F、*EF1a*-R(表1)。野生型烟草作对照,生物学试验重复 3 次。具体实验步骤同 1.4。

1.8 转基因烟草 APX 活性及 AsA 含量测定

以 *CaAPX* 转化烟草阳性株系 AL1、AL2、AL3 为材料,采集第 4 功能叶,参照 Nakano 等^[15]的方法测定 APX 酶活性,参照 Kampfenkel 等^[16]的方法测定 AsA 含量。野生型烟草作对照,生物学试验重复 3 次。

1.9 转基因植株抗寒、耐热性检测

将转 *CaAPX* 基因烟草阳性株系 AL1、AL2、AL3 以及野生型植株各 3 株置于 4℃ 或 38℃ 光照培养箱中 1 200 Lx(16 h 光照/8 h 黑暗)胁迫处理,期间每隔 15 min 观察 1 次植株状态及叶片萎焉情况。另外,测定 4℃ 或 38℃ 处理 8 h 后 AL1、AL2、AL3 和野生型植株中的 H₂O₂ 含量,方法参照 Sairam 等^[17]所用的 KI 法。生物学试验重复 3 次。

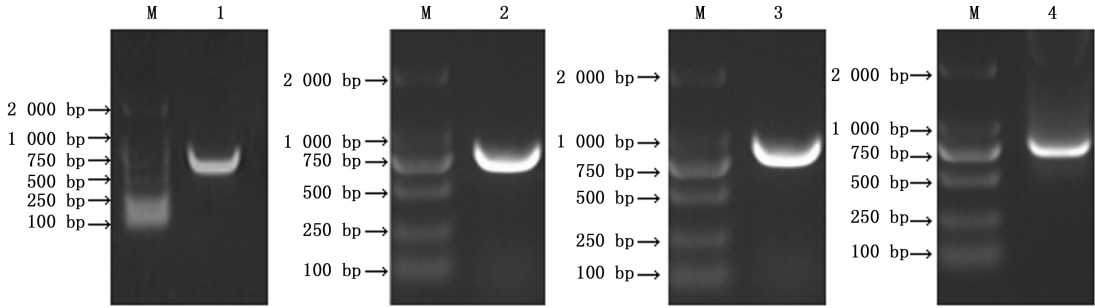
2 结果与分析

2.1 杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因全长 cDNA 序列克隆

以杜鹃红山茶嫩叶 RNA 反转录的 cDNA 为模板,保守区片段扩增,经测序获得长为 566 bp 的序列(图 1A),NCBI Blast 同源序列比对显示:与茶树

碱基同源性高达 95%，确认此序列为杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因一段序列。利用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术，从杜鹃红山茶嫩叶的总 RNA 中分别获得 *CaAPX* 基因 cDNA 的 5' 和 3' 端的序列。测序结果

表明:5'-RACE 产物长度为 765 bp (图 1B), 3'-RACE 产物长度为 797 bp (图 1C)。利用 ORF Finder 分析 *CaAPX* 基因的 CDS 区为 753 bp (图 1D)。



M: DL2000 DNA Marker; 1: 保守片段; 2: 5'-RACE 产物; 3: 3'-RACE 产物; 4: CDS 产物

图 1 杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因克隆

2.2 杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因生物信息学分析

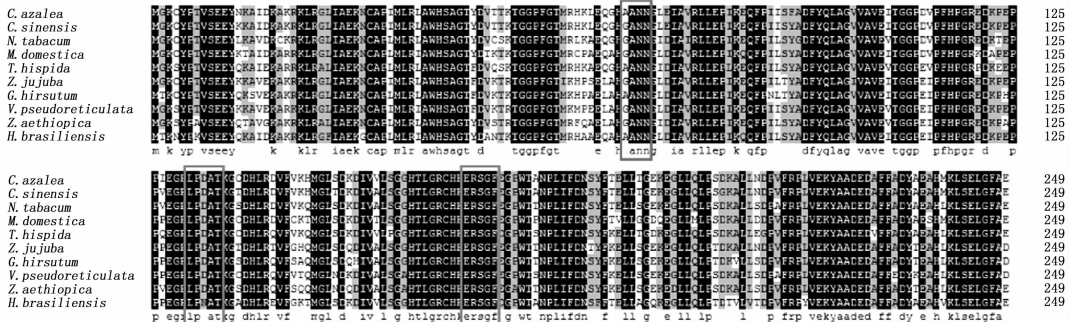
2.2.1 *CaAPX* 编码的氨基酸序列与其它物种的同源性分析

利用 DNAMAN 软件对杜鹃红山茶及同源性较高的 9 个物种(如茶树、烟草等)的 APX 氨基酸序列进行多序列比对,结果表明:10 种植物的氨基酸数均在 250 个左右,且具有很高的同源性,大部分区域均比较保守,与茶树的同源性高达 96.80%,与其它物种的同源性也都超过 90% (图 2)。系统发育树分析也表明:杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因所编码的蛋白序列与茶树亲缘关系十分紧密 (图 3)。

2.2.2 *CaAPX* 预测编码蛋白的理化特性及结构功能分析

利用 ProtParam 在线分析蛋白质理化特性,发现杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因编码 250 个氨基酸,等电点 pI 为 5.62,不稳定系数为 38.93,属于稳定性蛋白。

利用 HNN 软件对杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因编码的蛋白质二级结构分析发现, α -螺旋占 40.80%, β -转角占 10.00%,无规则卷曲占 37.20%,延伸链占 12.00%;与茶树等同源性较高的植物相比发现,蛋白二级结构都以 α -螺旋为主,其次为无规则卷曲,延伸链及 β -转角等区域所占比例较少。

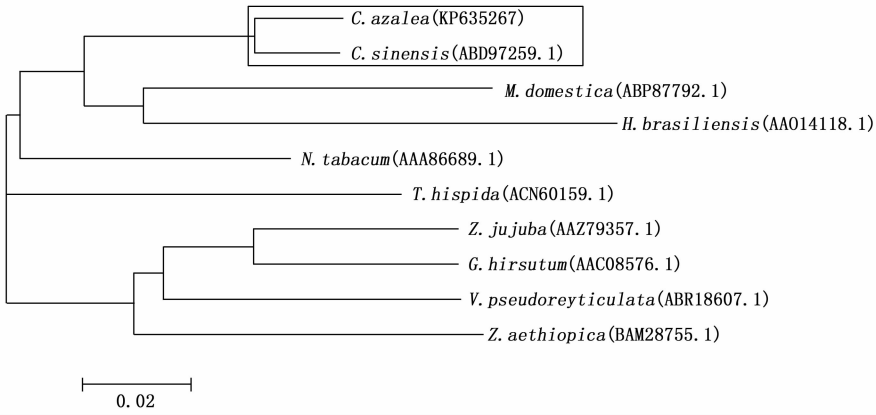


C. azalea: 杜鹃红山茶 (KP635267); *C. sinensis*: 茶树 (ABD97259.1); *N. tabacum*: 烟草 (AAA86689.1); *Malus domestica*: 苹果 (ABP87792.1); *Tamarix hispidia*: 刚毛怪柳 (ACN60159.1); *Ziziphus jujuba*: 金丝小枣 (AAZ79357.1); *Gossypium hirsutum*: 棉花 (AAC08576.1); *Vitis pseudoreticulata*: 华东葡萄 (ABR18607.1); *Zantedeschia aethiopic*: 马蹄莲 (BAM28755.1); *Hevea brasiliensis*: 橡胶树 (AAO14118.1)。图 3 同。

图 2 杜鹃红山茶 *CaAPX* 与其它植物 APX 氨基酸序列的多系列比对

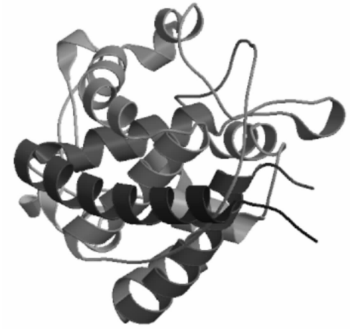
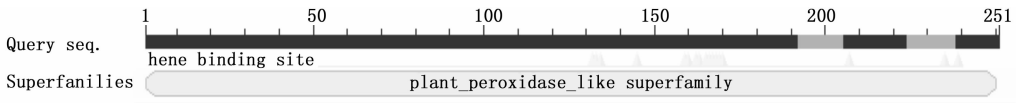
Swidd-model 同源建模预测杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因编码的蛋白三级结构 (图 4) 与其它植物比较发现:蛋白三级结构均以 α -螺旋和无规则卷曲作为主要骨架,这与预测的二级结构分析结果基本一致。利用 NCBI Conserved Domain Search 进行保守域在

线分析,结合其它物种中同源 APX 基因分析结果,发现 *CaAPX* 基因编码的蛋白存在植物 POD 结构域 (图 5),并且包括 XANX、LPDAX 及 (E) RSGF/W 等保守片段 (图 2 中方框区域),这些片段是与底物 AsA 反应的关键。

图3 杜鹃红山茶 *CaAPX* 与其它植物 APX 系统发育树分析

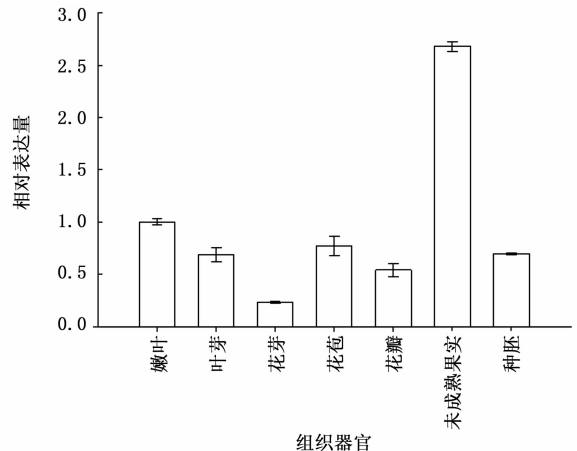
2.3 *CaAPX* 基因在杜鹃红山茶不同组织器官中的表达分析

CaAPX 基因在杜鹃红山茶 7 种不同组织器官中的表达情况见图 6, *CaAPX* 基因在 7 个组织器官中均有转录表达,但所表达的 RNA 水平不同,表达量由高到低依次为:未成熟果实 > 嫩叶 > 花苞 > 叶芽 > 种胚 > 花瓣 > 花芽。差异显著性分析发现,未成熟果实中的表达量是其它组织的 2.68 ~ 11.44 倍,其中,约为嫩叶的 2.68 倍,花瓣的 4.96 倍,花芽的 11.44 倍 ($P < 0.05$)。

图4 杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因推导的蛋白三级结构图5 杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因推导的蛋白保守域

2.4 *CaAPX* 基因在低温、高温处理下的表达分析

生长状态良好及相似的杜鹃红山茶在 4℃ 低温胁迫 2、4、8 h 后, *CaAPX* 基因基本呈上调表达,与 0 h 的表达量差异显著 ($P < 0.05$),并且相互之间也差异显著 ($P < 0.05$),表达量分别为 0 h 的 3.13、2.80、3.49 倍,但当 4℃ 低温胁迫达 12 h,表达量又下降至 0 h 表达量水平(图 7A)。38℃ 高温胁迫下, *CaAPX* 的表达趋势与 4℃ 下的表达趋势基本相似,差异显著性分析发现 0、2、4、8、12 h 的表达量相互之间也均差异显著 ($P < 0.05$);在胁迫 2、4、8 h 后,表达量不断上升, *CaAPX* 基因表达量分别约为 0 h 表达量的 1.73、2.05、2.67 倍,之后表达量迅速下降,到 12 h 时,表达量只有 0 h 表达量的 1.46 倍(图 7B)。由此推测, *CaAPX* 基因在 4℃ 低温及 38℃ 高温胁迫下都达到较高的表达水平,说明

图6 *CaAPX* 基因组织特异性表达分析

CaAPX 基因能够被极端温度所诱导,以保护植株不受伤害,但 8 h 之后,表达量急速下降,有可能与植物组织细胞不断受到损伤有关。

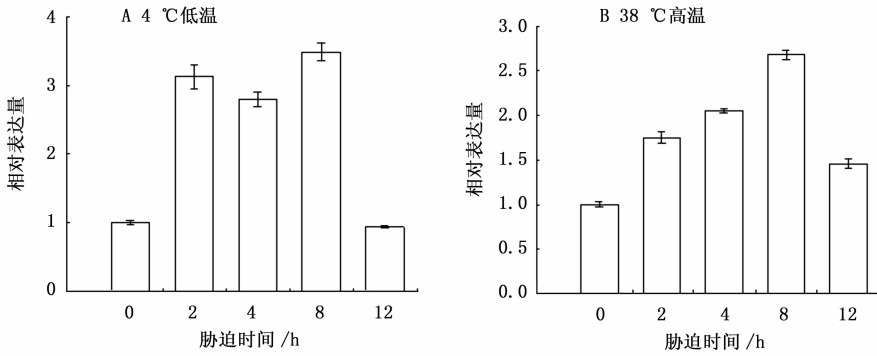


图7 杜鹃红山茶 *CaAPX* 基因在不同温度处理下的表达分析

2.5 植物表达载体构建

pBI121-CaAPX 的重组区域见图8,用 *Xba* I 和 *Bam*H I 分别双酶切 *pBI121* 和 *pGEM-T-CaAPX*,回收 *pBI121* 载体大片段和 *pGEM-T-CaAPX* 目的小片

段(图9A),*T*₄ DNA 连接酶 16℃ 过夜连接大小片段。*Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定(图9B),*CaAPX* 成功插入表达载体 *pBI121*, 将重组质粒分别命名为 *pBI121-CaAPX*。

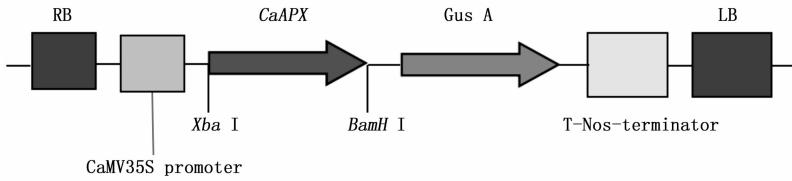
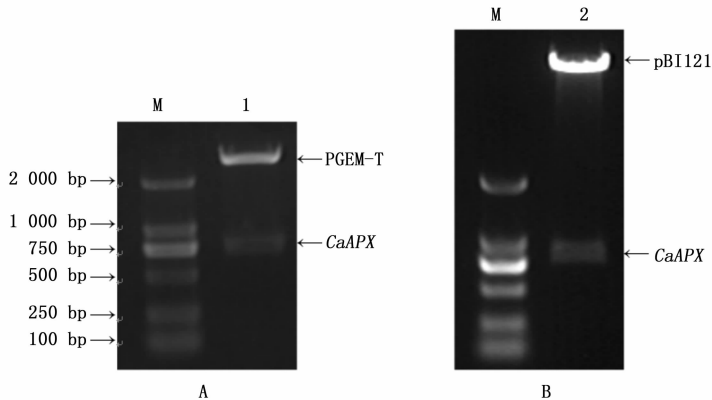


图8 *pBI121-CaAPX* 重组区域结构示意图



M: DL2000 DNA Marker; 1: *pGEM-T-CaAPX* 双酶切产物; 2: *pBI121-CaAPX* 双酶切产物

图9 植物表达载体 *pBI121-CaAPX* 的酶切验证

2.6 转基因烟草阳性株系的鉴定

CaAPX 基因转化烟草 RT-PCR 检测结果显示:转基因阳性植株 AL1、AL2、AL3 能够扩增出与目的基因大小一致的条带,对照则没有此条带(图10A)。在转基因烟草 RT-PCR 检测为阳性植株的基础上,再次对相应的阳性植株进行了 Southern 杂交鉴定,结果见图10-B。转 *CaAPX* 基因 PCR 已鉴定为阳性株系 AL1、AL2、AL3,经 Southern 杂交后都显示单一条带,而非转基因植株杂交后无条带出现,结果证明 *CaAPX* 基因成功转入烟草基因组中。

2.7 转基因烟草植株 APX 活性及 AsA 含量的测定

由图11A 可看出:过量表达 *CaAPX* 的转基因烟草植株叶片中的 APX 活性较野生型植株显著提高 ($P < 0.05$),其中,AL2 的 APX 活性提高最多,约为野生型植株的 4.09 倍,AL1 和 AL3 分别约为野生型植株的 3.05、2.58 倍,因此,过量表达 *CaAPX* 可以提高 APX 活性。

由图11B 可看出:过量表达 *CaAPX* 的转基因烟草植株在提高 APX 活性的同时,体内 AsA 含量也显

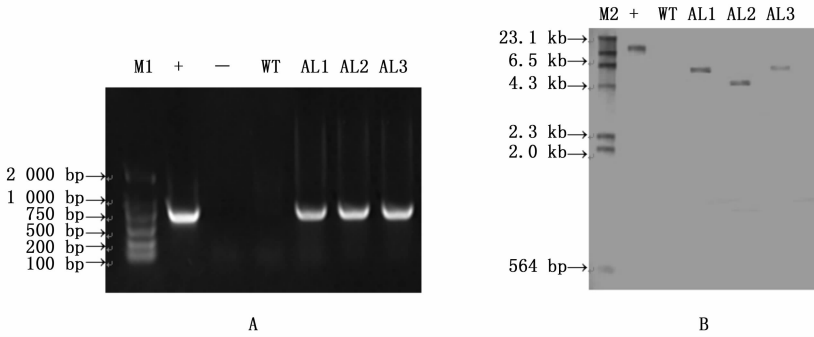


图10 转 *CaAPX* 基因烟草植株 RT-PCR 及 Southern 检测
M1: DL2000 DNA Marker; M2: λ -Hind III 分子量标准; +: pBII21-*CaAPX* 质粒; -: 双蒸水。
AL1、AL2、AL3: 3 个转 *CaAPX* 基因阳性株系; WT: 野生型植株。下同

图 10 转 *CaAPX* 基因烟草植株 RT-PCR 及 Southern 检测

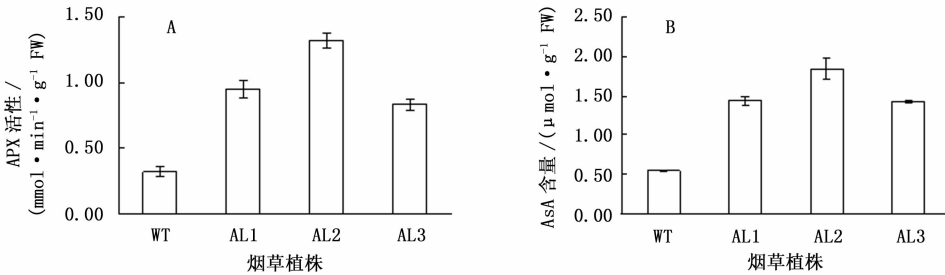


图 11 野生型 (WT) 和转 *CaAPX* 基因烟草植株 APX 活性和 AsA 含量

著增加 ($P < 0.05$), 转基因植株叶片中 AsA 含量约为野生型植株的 2.67 ~ 3.56 倍, 其中, AL2 的 AsA 含量提高最多, 达 3.56 倍。

2.8 过量表达 *CaAPX* 基因提高烟草植株的抗寒和耐热性

4℃ 低温胁迫处理 8 h 后, 野生型植株开始出现萎焉, 而转基因烟草植株基本生长良好, 只有近地几片叶子出现轻度萎焉状态 (图 12A)。H₂O₂ 含量测定结果 (图 13A) 显示: 4℃ 低温胁迫处理 8 h 后, 转基因植株 AL1、AL2、AL3 中的 H₂O₂ 含量显著低于野生型植株 ($P < 0.05$), 约为其 0.51 ~ 0.62 倍, 平

均 0.57 倍。

38℃ 高温胁迫处理 8 h 后, 野生型植株出现严重萎焉状态, 转基因烟草植株状态良好, 叶片几乎无萎焉 (图 12B)。H₂O₂ 含量测定结果 (图 13B) 显示: 38℃ 高温胁迫处理 8 h 后, 转基因植株 AL1、AL2、AL3 中的 H₂O₂ 含量也显著低于野生型植株 ($P < 0.05$), 约为其 0.35 ~ 0.41 倍, 平均 0.38 倍。

由此说明, 过量表达 *CaAPX* 基因降低烟草植株在温度胁迫下体内的 H₂O₂ 的含量, 因此, 在一定程度上提高了植株的抗寒、耐热能力。

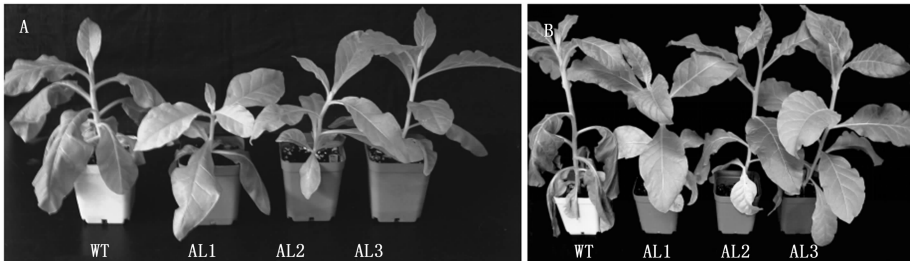


图 12 野生型 (WT) 和转 *CaAPX* 基因烟草植株胁迫处理

3 讨论

杜鹃红山茶不同组织中 *CaAPX* 基因表达量差异较大, 表达量由高到低依次为: 未成熟果实 > 嫩叶

> 花苞 > 叶芽 > 种胚 > 花瓣 > 花芽, 表现出与不同组织材料具有相关性。韩立敏^[18] 利用实时荧光定量 PCR 分析显示: *SmAPX* 基因在丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 根、茎、叶中均有表达, 但根中的表达量

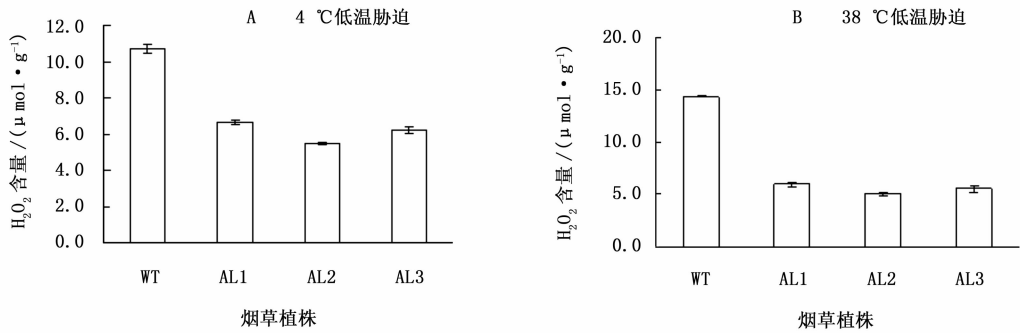


图13 野生型(WT)和转 *CaAPX* 基因烟草植株温度胁迫后 H₂O₂ 含量

最低,茎次之,叶中的表达量则最高,为根中的21倍。孙云等^[19]对山茶属6个茶树品种中的*APX*基因的表达量分析发现,6个茶树品种中均有*APX*基因的表达,但基因的表达量大小不一致。由此推测,*APX*基因的表达模式随着物种及组织的不同而存在差异。*CaAPX*基因胁迫表达分析发现,4°C低温及38°C高温胁迫8h后,*CaAPX*基因均呈上调表达。邵巍等^[20]对龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)胚性愈伤组织进行温度胁迫也发现温度胁迫可以诱导胞质型*APX*基因表达量的增加。许传俊等^[21]成功分离蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite* Rehb. F.)*APX*基因,胁迫处理可以诱导*APX*基因表达上调,表明*APX*基因在蝴蝶兰胁迫防御中起作用。刘慧春等^[22]也成功分离出红掌(*Anthurium andraeanum* Linden ex André)*APX*基因,低温胁迫也可以诱导*APX*基因上调表达。由此表明,*APX*基因会随着温度胁迫而呈上调表达。

抗坏血酸-谷胱甘肽合成途径,是一个存在于叶绿体和细胞液中的抗氧化防御系统,其中,AsA能清除细胞内由不同环境胁迫所生成的H₂O₂,而*APX*是AsA合成途径中的关键酶之一^[5-6]。*APX*以AsA为电子受体将H₂O₂转化为H₂O,从而导致MDA的积累。同时,MDA较不稳定,易被重新还原成不均等的2种物质AsA和DHA,而MDA和DHA又可通过还原酶还原成AsA^[7-9]。因此,在*APX*活性提高的同时,作为反应底物及产物的AsA含量也需要同时增加,这样整个催化反应才得以继续,以完成清除H₂O₂的任务。本研究中,过量表达*CaAPX*的转基因烟草植株中*APX*活性和AsA含量均显著提高,分别为野生型烟草的2.58~4.09倍和2.67~3.56倍。陈莉等^[23]在拟南芥中过量表达百合(*Lilium longiflorum* Thunb.)*LLAPX*基因后,相对于野生型拟南芥,转基因植株中*APX*活性及AsA含量也获得了提高,这一结果与本试验相符合。Kornyejev等^[24]

将*tAPX*基因转化棉花(*Gossypium* spp.),获得的转基因棉花叶片中的*APX*活性高达野生型的6倍。由此看出,过量表达*APX*基因可以提高植株的*APX*活性及AsA含量,从而提高清除H₂O₂的能力。

野生型烟草在4°C低温或38°C高温胁迫8h后,叶片出现严重萎焉,而过量表达*CaAPX*基因的烟草生长状态良好,只有少数几片叶子出现轻微萎焉现象。将*CaAPX*整合到烟草基因组中,在CaMV35S启动子的作用下能够高效表达^[25]。因此,过量表达后,*APX*活性提高,植物体内AsA的含量也随之增加;另外,温度胁迫下,转基因烟草体内H₂O₂的含量也显著低于野生型植株。由此可见,*CaAPX*基因具有增加烟草植株抗寒、耐热性的重要功能。研究发现,过量表达*APX*基因有助于水稻秧苗抵抗冷冻伤害^[10],且提高*APX*转基因甜土豆的抗冻能力^[26];王雨水等^[27]低温胁迫油茶(*C. oleifera* Abel.)幼苗,检测发现体内的*APX*活性明显高于未经低温诱导的油茶幼苗,说明*APX*等保护酶活性的增强在提高油茶幼苗的抗寒性上发挥着重要作用。安辽原等^[28]在水稻中过量表达*APX*基因后,在热激胁迫后,转基因植株生长状态较好,而野生型植株叶片则几乎死亡,表明*APX*基因在水稻耐热方面发挥的作用较为明显;马箐等^[29]将过量表达毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)*APX*基因的烟草与野生型相比,AsA含量也得到提高,H₂O₂积累量则较低;过量表达*APX*同样可以显著提高土豆植株的耐高温能力^[11-12]。本研究中,转*CaAPX*基因的烟草植株具有较高的抗寒、耐热性,为山茶花的抗逆育种提供了有力依据。

4 结论

本研究中,从杜鹃红山茶嫩叶中首次分离获得*CaAPX*基因,组织特异性及胁迫表达分析表明:*CaAPX*基因在杜鹃红山茶7种不同组织器官中均有

表达,但表达模式不一;在温度胁迫下能够诱导表达,且表达量显著提高,因此 *CaAPX* 基因与低温、高温胁迫具有一定相关性。另外,烟草中过量表达 *CaAPX* 基因后,植株体内的 APX 活性及 AsA 含量显著高于野生型烟草植株,低温及高温处理下植株表型良好,体内 H_2O_2 含量也明显低于野生型植株。由此说明,*CaAPX* 基因的编码蛋白在转基因烟草植株遭遇温度胁迫时具有重要的防御作用,也为山茶花抗逆育种提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 闵天禄. 世界山茶属的研究[M]. 昆明:云南科学技术出版社, 2000: 35-44.
- [2] 庄瑞林. 中国山茶[M]. 海口:海南人民出版社, 1989.
- [3] Sofo A, Tuzio A C, Dichio B, *et al.* Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids [J]. *Plant Science*, 2005, 169(2): 403-412.
- [4] Suzuki N, Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stress: A delicate balance between signaling and destruction [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 126(1): 45-51.
- [5] Lu Z, Liu D, Liu S. Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(10): 1909-1917.
- [6] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiol Biochemistry*, 2010, 48(12): 909-930.
- [7] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism [J]. *Planta*, 1976, 133(1): 21-25.
- [8] Jablonski P P, Anderson J W. Light dependent reduction of hydrogen peroxide by ruptured pea chloroplasts [J]. *Plant Physiology*, 1981, 67(6): 1239-1244.
- [9] Hossain M A, Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1984, 25(1): 85-92.
- [10] Yutaka S, Toyotaka M, Hideyuki F, *et al.* Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(354): 145-151.
- [11] Tang L, Kwon S Y, Kim S H, *et al.* Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(12): 1380-1386.
- [12] Kim M D, Kim Y H, Kwon S Y, *et al.* Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the *CuZnSOD*, *APX* and *NDPK2* genes [J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 140(2): 153-162.
- [13] 朱高浦, 李纪元. 珍稀濒危植物张氏红山茶研究进展(综述) [J]. *亚热带植物科学*, 2009, 38(3): 83-89.
- [14] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, *et al.* A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227(4691): 1229-1231.
- [15] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1981, 22(5): 867-880.
- [16] Kampfenkel K, van Montagu M, Inze D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue [J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 225(1): 165-167.
- [17] Sairam R K, Srivastava G C. Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress [J]. *Plant Science*, 2002, 162(6): 897-904.
- [18] 韩立敏. 丹参 *APX* 和 *GPX* 基因克隆及其表达分析[D]. 西安: 陕西师范大学, 2007: 22-44.
- [19] 孙云, 林玉玲, 赖钟雄, 等. 茶树品种及萎凋过程中叶片 *APX* 基因表达的 qPCR 分析[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2012, 41(4): 476-481.
- [20] 邵巍. 龙眼胚性培养物胞质型 *apx* 基因克隆及其表达研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008: 84-95.
- [21] 许传俊, 孙叙卓, 李玲, 等. 蝴蝶兰抗坏血酸过氧化物酶基因克隆及其表达研究[J]. *园艺学报*, 2012, 39(4): 769-776.
- [22] 刘慧春. 红掌‘阿技巴马’低温相关基因 *AOX*、*CAT* 和 *APX* 的表达分析、功能验证及遗传转化体系的构建[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 100-129.
- [23] 陈莉, 辛海波, 孙向荣, 等. 百合 *APX* 基因的克隆及转 *LLAPX* 提高拟南芥耐盐性[J]. *园艺学报*, 2010, 37(12): 1983-1990.
- [24] Komyeyev D, Dmytro K, Barry A, *et al.* Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpression genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes [J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 133(1): 323-331.
- [25] Battraw M J, Hall T C. Histochemical analysis of CaMV35S Promoter β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15(4): 527-538.
- [26] Lim S, Kim Y H, Kim S H, *et al.* Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress [J]. *Molecular Breeding*, 2007, 19(3): 227-239.
- [27] 王雨水. 低温锻炼对冷胁迫下油茶幼苗光合速率与抗氧化酶活性的影响[J]. *福建林业科技*, 2011, 38(1): 41-46.
- [28] 安辽原, 牛向丽, 黄龙翔, 等. 过量表达 *OsAPX1* 基因增强水稻的抗热和抗氧化能力[J]. *中国农业科技导报*, 2012, 14(5): 28-32.
- [29] 马箐. 过量表达毛白杨 *APX* 基因增强植物对非生物胁迫的抗性[D]. 济南: 山东师范大学, 2012: 37-59.

(责任编辑:金立新)