

文章编号:1674-7054(2011)03-0197-07

# 巴西橡胶树抗坏血酸过氧化酶基因 *HbAPX* 的克隆及其对水杨酸的应答

罗红丽, 闫志焯

(海南大学 海南省热带作物资源可持续利用重点实验室 海南 海口 570228)

**摘要:**在对橡胶树转录组进行测序的基础上,利用模式植物中抗坏血酸过氧化物酶(*Ascorbate peroxidase*, *APX*)基因的氨基酸序列进行比对并设计引物,通过 RT-PCR 方法扩增巴西橡胶树 *APX* 基因的 cDNA 片段,命名为 *HbAPX*。该片段包含 1 个 858 核苷酸的开放阅读框,编码 285 个氨基酸的多肽。生物信息学分析结果表明,该蛋白氨基酸序列与麻风树(*Jatropha curcas*)的 *APX* 高度同源,同源性达 90%,与杨树(*Populus tomentosa*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)的 *APX* 同源性均在 80% 以上,并含有 *Ascorbate peroxidase* 保守结构域。系统发育分析结果显示, *HbAPX* 属于过氧化物酶型 *APX*。定量分析结果表明,该基因的表达受水杨酸(SA)的诱导,可能与植物的过敏反应(HR)和系统获得抗性(SAR)相关。

**关键词:**巴西橡胶树; 抗坏血酸过氧化物酶(*APX*); SA 应答

中图分类号: Q 785 文献标志码: A

植物在代谢过程中受到不同的环境胁迫(如温度、干旱、病原菌侵染等)时都能够产生大量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)<sup>[1]</sup>。植物体产生 ROS 的部位有叶绿体、过氧化物酶体、线粒体和原生质膜<sup>[2]</sup>。ROS 主要以超氧阴离子( $O_2^-$ )、羟自由基( $OH^\cdot$ )和过氧化氢( $H_2O_2$ )的形式存在<sup>[3]</sup>。ROS 一方面可作为信号分子参与植物的氧化还原反应信号传导过程<sup>[4]</sup>;另一方面,ROS 的过量积累也会形成氧化胁迫,对植物细胞的 DNA、蛋白和膜脂等组分造成伤害<sup>[5-6]</sup>。植物可以通过非酶促反应和酶促反应 2 个系统来清除细胞中过多的 ROS<sup>[7-8]</sup>,其中利用电子供体与 ROS 反应来清除 ROS 的酶促反应系统方式更为有效<sup>[6,9]</sup>。 $H_2O_2$  是植物叶绿体中光合电子传递链和某些酶学反应的天然产物,是具有毒害作用的活性氧。高浓度的  $H_2O_2$  可以抑制 Calvin 循环中的酶类。*Ascorbate peroxidase*(*APX*) 是清除  $H_2O_2$  的关键酶类<sup>[10]</sup>,它利用抗坏血酸帮助电子供体对植物细胞中的  $H_2O_2$  进行有效清除<sup>[7,11-12]</sup>。根据 *APX* 在植物细胞中的定位不同, *APX* 可分为 4 类,即叶绿体 *APX*(*chlAPX*)、过氧化物酶体 *APX*(*pAPX*)、线粒体 *APX*(*mitoAPX*) 和细胞质 *APX*(*cAPX*)<sup>[12-13]</sup>,其中线粒体 *APX*、细胞质 *APX* 和叶绿体基质 *APX* 为可溶性蛋白,过氧化物酶体 *APX* 和叶绿体类囊体 *APX* 为膜结合蛋白<sup>[14]</sup>。文献[8,15-17]表明 *APX* 基因的表达与 ROS 的产生相关,一些能够引起 ROS 产生的胁迫,如干旱、高光强、高温、高盐 and 病原菌侵染等均对 *APX* 的表达具有调控作用。

目前,已有学者分别从豌豆、拟南芥、大麦、烟草、玉米、南瓜、草莓、番茄、菠菜等多种植物中克隆到 *APX* 基因,并进行了初步的功能研究<sup>[18-20]</sup>。关于橡胶树 *APX* 的报道十分有限,仅在 NCBI 数据库中搜索到注释为橡胶树 *HbAPX2* 的基因序列,而有关该基因的功能信息则不多。笔者克隆得到 1 个与 *HbAPX2* 不同编码的 *APX* 基因,并将其命名为 *HbAPX*,与来自不同植物的 *APX* 具有高度同源性。系统发育分析还

收稿日期: 2011-06-25

基金项目: 海南大学“211工程”热带作物遗传育种与生态保育创新人才培养基金青年教师项目(QNJS-2011-08)、海南省自然科学基金项目(311030)、海南大学“211工程”专项资金(研究生教育教学改革研究项目)资助

作者简介: 罗红丽(1973-),女,河南南阳人,海南大学农学院副教授. E-mail: hlluo@live.com

表明 *HbAPX* 属于过氧化物酶体型 *APX*。*HbAPX* 能够被 SA 诱导表达,这暗示其可能参与植物抗病反应。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 植物材料为巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 热研7-33-97品系的叶片。大肠杆菌菌株为 TOP10; cDNA 第1链合成试剂盒购自 Thermo 公司;用于 PCR 反应的试剂、凝胶回收试剂盒、T 载体等均购自博麦德科技有限公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司;引物合成及序列测定由北京鼎国昌盛生物有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 橡胶树叶片总 RNA 的提取 采用改良的 LiCl 沉淀法对橡胶树叶片 RNA 进行提取。步骤为:先将适量的橡胶树叶片用液氮研磨充分后,放入含有提取缓冲液和水饱和酚的混合液中,充分涡旋后加入氯仿混匀。4℃ 6 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min 后,转移上清至另一离心管,加入 1/10 体积的 3 mol·L<sup>-1</sup> NaAC (pH5.3) 和两倍体积的无水乙醇,混匀后于 -20℃ 下静置 30 min,经 4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min 后,将沉淀溶解于 1.5 mL DEPC 处理过的水中,再加入 4 mL 的 8 mol·L<sup>-1</sup> LiCl,于 -20℃ 过夜。经 4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min 后,将沉淀用  $\varphi=80\%$  的酒精洗涤 1 次,晾干,溶于适量的 DEPC 水中。经紫外分光光度计定量后,用  $\varphi=1.2\%$  的甲醛变性胶电泳检测样品的质量。

1.2.2 反转录及 PCR 扩增 按照 Thermo 提供的 cDNA 第1链合成操作说明,以经检测合格的总 RNA 样品为模板进行反转录反应。以反转录产物为模板,利用 *HbAPX* 的特异性正反向引物进行 PCR,反应体系为:10× *Taq* buffer 2.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 1.2  $\mu$ L, 基因特异性正向、反向引物各 1  $\mu$ L, dNTP mix (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, 反转录产物 1  $\mu$ L, *Taq* 酶 (2.5 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, 水 16.3  $\mu$ L。PCR 反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 34 个循环后, 72℃ 5 min。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测。将目标片段割胶回收并克隆进 T 载体,送样到北京鼎国昌盛生物有限公司进行序列测定。

1.2.3 生物信息学分析 根据序列测定结果,获得 *HbAPX* 的全长 cDNA 序列,并利用 DNASTAR 软件分析基因的氨基酸序列和基本特性。在进行 *HbAPX* 蛋白与不同植物来源的 *APX* 蛋白氨基酸序列的同源性比较中,首先利用 *HbAPX* 的氨基酸序列与 Genebank 中已经发表的氨基酸序列进行 BLAST 比对,获得不同来源的 *APX* 蛋白的氨基酸序列,然后利用 DNAMAN 软件对其进行同源性比较分析。利用 MEGA 软件分析来自不同植物不同类型的 *APX* 进行系统发育关系。

1.2.4 *HbAPX* 基因对 SA 的应答分析 配制浓度为 5 mmol·L<sup>-1</sup> pH5.7 的 SA 溶液,喷雾处理橡胶树幼叶,于不同的时间点收集样品。根据 NCBI 数据库中找到一个注释为 *HbAPX2* 的基因序列设计引物,检测 *HbAPX* 和 *HbAPX2* 对 SA 的应答情况。按前面所述方法进行 RT-PCR 反应,通过琼脂糖电泳检测结果。

## 2 结果与分析

2.1 橡胶树 *HbAPX* 基因 cDNA 的克隆 课题组在前期研究中,通过 RNA-Seq 的方法对橡胶树转录组进行了测序,获得了 48 768 个单一基因,其中 37 373 个单一基因与数据库中的蛋白匹配(待发表数据)。利用模式植物中 *APX* 基因的氨基酸序列信息,以橡胶树转录组中的 48 768 个单一基因为基础,获得了 *HbAPX* 的核苷酸序列信息并设计 *HbAPX* 基因特异性引物进行 RT-PCR 扩增。琼脂糖电泳检测结果(见图 1)表明,在约 850 bp 位置得到 1 条高度特异性的条带。回收此条带进行 TA 克隆,将含有目标片段的载体送样北京鼎国昌盛生物有限公司测序。测序结果表明,该片段长度为 858 bp,是 1 个完整的开放阅读框,编码 1 个长 285 个氨基酸的多肽,相对分子质量为  $31.65 \times 10^3$ (见图 2)。

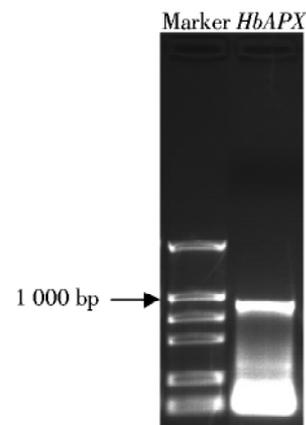


图 1 橡胶树 *HbAPX* 基因 cDNA 序列的克隆

```

1 ATGGCGTTACCGGTGGTTGATACAGAGTACCTGAAAGAGATCGACAAGGCTCGTCGCGATCTCCGTGCTCTC 72
1 M A L P V V D T E Y L K E I D K A R R D L R A L 24
73 ATTGCCTGCAAAAAGTGCCTCCTATCATGCTCCGCTTAGCGTGGCAGCAGCGAGGGACTTACGATAAGAAC 144
24 I A C K N C A P I M L R L A W H D A G T Y D K N 48
145 ATAAAAACTGGTGGACCTAATGGCTCCATAAGGAATGAAGAGGAATATACTCATGGCTCCAATAATGGCTTG 213
49 I K T G G P N G S I R N E E E Y T H G S N N G L 72
214 AAGATTGCTATTGATTTTTGTGAAGAAGTAAAGCTAAACATCCCAAGATTACTTATGCAGACCTATACCAG 288
73 K I A I D F C E E V K A K H P K I T Y A D L Y Q 96
289 CTGCGGGTGTGTGTCAGTCGAGGTCAGGTCAGGAGGCCATCCATTGACTTGTTCCTGGTAGAAAGGATTCA 360
97 L A G V V A V E V T G G P S I D F V P G R K D S 120
361 AAAGTTTCTCCTGAGGAAGGGCGACTTCCAGATGCTAAAAAGGTCACGACATTTAAGAGATATCTTTTAT 432
121 K V S P E E G R L P D A K K G P R H L R D I F Y 144
433 CGGATGGCCTGTCTGACAAGGATATGTGGCACTCTCCGGGGTCATACTGGGAAGGGCACATCCAGAG 504
145 R M G L S D K D I V A L S G G H T L G R A H P E 168
505 AGATCAGGTTTGTATGGCCCTTGACCAAGGAGCCTCTGAAGTTGATAACTCATACTCGTGGAACTGCTG 576
169 R S G F D G P W T K E P L K F D N S Y F V E L L 192
577 AAAGGGGAGACAGGGACTGTTGAAACTCCCAACTGACATTGCTCTGTTGCATGACCTGGGTCCGTCCT 648
193 K G E T E G L L K L P T D I A L L H D P G F R P 216
649 TATGTTGAGCTGTATGCAAAGGATGAGGAGGCATCTTTAGAGATTATGCAGTGTACATAAGAACTTTCA 720
217 Y V E L Y A K D E E A F F R D Y A V S H K K L S 240
721 GAACTAGGGTTACTCCAAGTCCAAGTAATTGCTAAGGAAAGCACCGTACTGGCACAAAGTGCAGTTGGA 792
241 E L G F T P R S K V I A K E S T V L A Q S A V G 264
793 GTGTAGTTGCTGCTGTGGTGATAGTTAGCTATTTGTATGAGGTTTCGAAAAGAATGAAGTAG 858
254 V V V A A A V V I V S Y L Y E V R K R M K . 286
    
```

图 2 橡胶树 *HbAPX* 蛋白基因的 cDNA 全长核苷酸序列和推测氨基酸序列

2.2 *HbAPX* 蛋白与其他植物 *APX* 蛋白之间的氨基酸同源性比较和保守结构域分析 利用克隆得到的 *HbAPX* 蛋白氨基酸序列在 Genebank 中与已经发表的氨基酸序列进行 BLAST 比对,结果显示,该蛋白氨基酸序列与麻风树(*Jatropha curcas*)的 *APX* 具有高度同源性,同源性达 90%;与杨树(*Populus tomentosa*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)等的同源性也很高,都在 80% 以上,这暗示该蛋白为橡胶树中 *APX* 同源蛋白。同时,利用 *HbAPX* 的氨基酸序列在 NCBI 的 CCD 数据库中进行比对,发现该蛋白中包含 3 个结合位点{亚铁血红素结合位点(Heme binding site)、底物结合位点(Substrate binding site)、阳离子结合位点[Cation( $K^+$ ) binding site]}和 1 个由第 4 位到第 247 位共 244 个氨基酸组成的保守 Ascorbate peroxidase 结构域,如图 3。



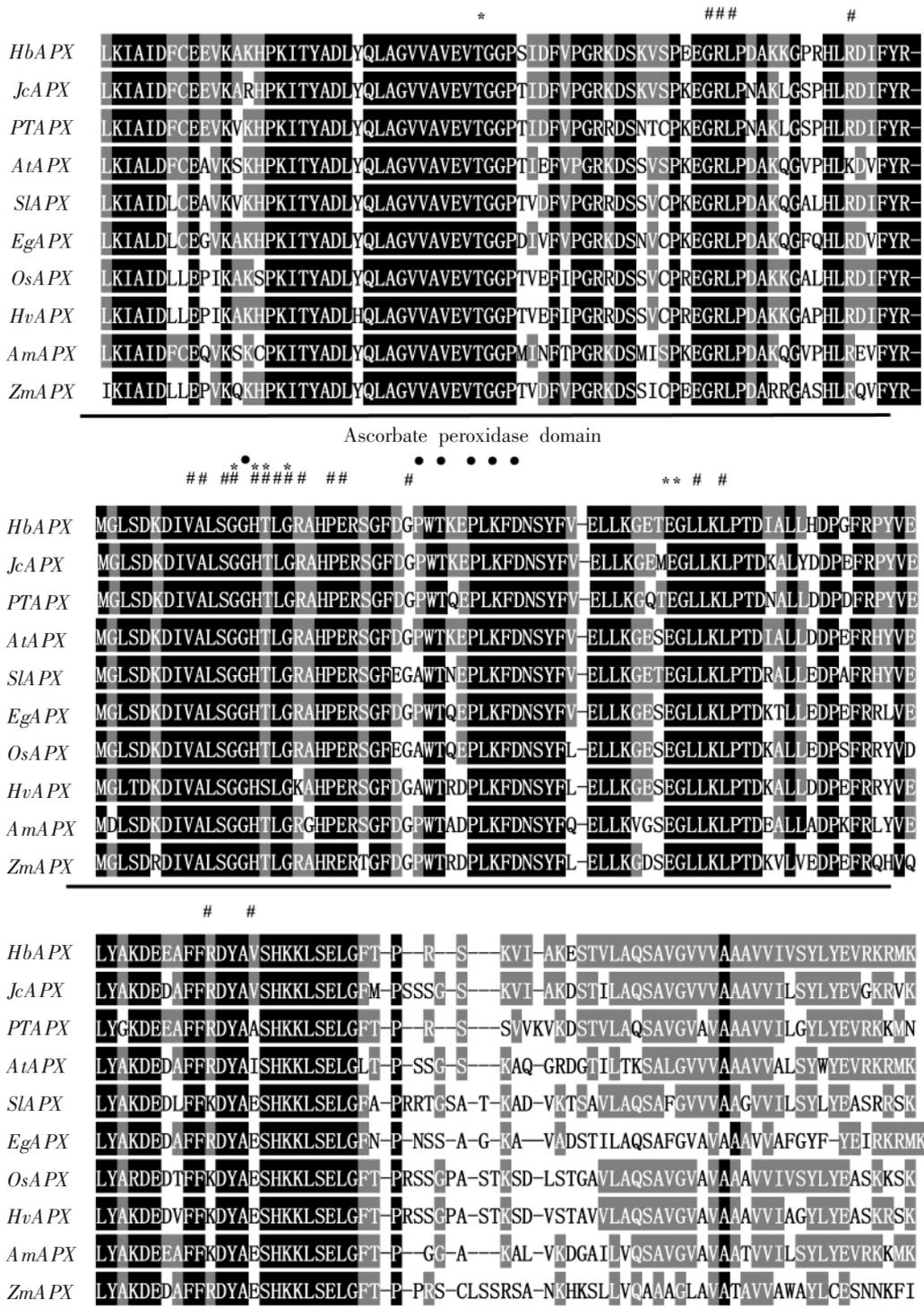


图3 不同植物来源的APX蛋白与HbAPX蛋白氨基酸序列的同源性比较

(黑色标注的氨基酸残基在所有的蛋白中都相同;而灰色标注的氨基酸残基代表仅与HbP1蛋白相同;下划线标注部分为保守结构域;#代表亚铁血红素结合位点的氨基酸残基;\*代表底物结合位点的氨基酸残基;.代表阳离子结合位点的氨基酸残基)

2.3 HbAPX蛋白的系统发育分析 由于植物细胞中APX作用部位不同,有胞质型APX(c-型)、氧化酶体型APX(p-型)和叶绿体型APX(ch1-型)之分。从相关文献和Genebank中找到一些具有代表性的来自不同植物的不同类型APX蛋白氨基酸序列,利用MEGA软件对这些APX蛋白之间的关系进行系统发育分析。从分析结果(如图4)可见,HbAPX与黑大豆p-GmAPX(BAG09367)、豇豆p-VuAPX(AAS46016)、棕榈p-EgmAPX(ACF06512)、玉米p-ZmAPX(NP-001148710)的亲缘关系较近,而这些蛋白均为已知的过

氧化酶体型 *APX*; 橡胶树上另一个未知类型的橡胶树 *HbAPX2* (AF457210) 蛋白与所有已知的胞质型 *APX* 的亲缘关系较近, 这可能属于胞质型 *APX*。以上结果暗示, 笔者克隆到的 *HbAPX* 蛋白可能属于过氧化物酶体型 *APX*, 与已知的 *HbAPX2* (AF457210) 不同。

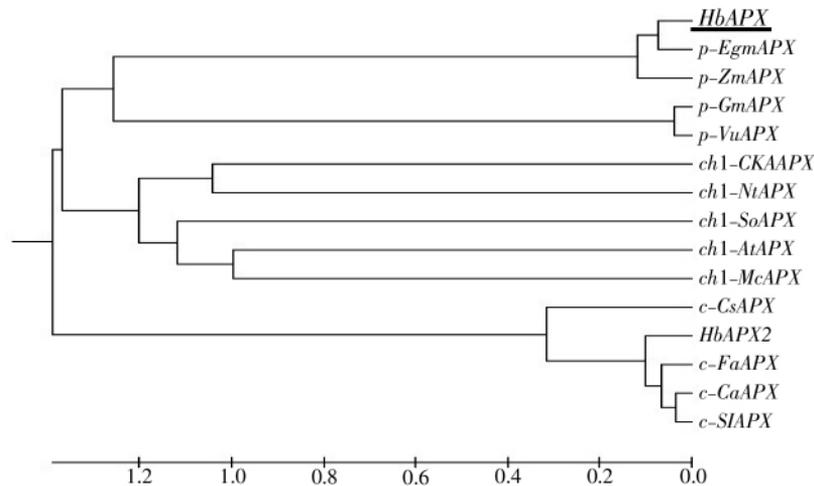


图4 *HbAPX* 蛋白的系统发育分析

橡胶树 *HbAPX2* (AF457210), 拟南芥 *ch1-AtAPX* (X98925), 南瓜 *ch1-CKAAPX* (D88420), 日中花 *ch1-McAPX* (AF069315), 烟草 *ch1-NtAPX* (AB022273), 菠菜 *ch1-SoAPX* (D77997), 草莓 *c-FaAPX* (AF159629), 甜椒 *c-CaAPX* (AAY21068), 番茄 *c-SlAPX* (AAZ77770), 小黄瓜 *c-CsAPX* (BAA13671), 黑大豆 *p-GmAPX* (BAG09367), 豇豆 *p-VuAPX* (AAS46016), 棕榈 *p-EgmAPX* (ACF06512), 玉米 *p-ZmAPX* (NP-001148710)

2.4 水杨酸 (SA) 诱导橡胶树 *HbAPX* 基因的表达 *APX* 是植物体内清除  $H_2O_2$  的主要酶类。有研究表明 SA 通过调节 *APX* 等相关酶类来提高植物中  $H_2O_2$  的水平, 从而诱导植物产生 HR 和 SAR 反应<sup>[21]</sup>。为了说明橡胶树中 *APX* 与 SA 之间的关系, 采用半定量的 RT-PCR 方法, 分析了橡胶树 *APX* 对外源 SA 的应答情况, 结果见图 5。在内参 18S rRNA 表达相同条件下, *HbAPX* 基因在 6 h 开始诱导表达, 12 h 时表达增强显著, 而 *HbAPX2* 基因在 0 h 高组成性表达, 对 SA 在 12 h 内没有任何应答。这些结果暗示橡胶树中的 *HbAPX* 基因很可能与橡胶树的抗病反应有关。

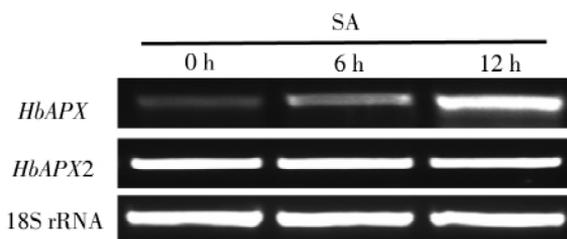


图5 外源 SA 对橡胶树中 *HbAPX* 和 *HbAPX2* 基因表达的影响

### 3 讨论

目前不仅证实 *APX* 以不同的异构体存在于不同的亚细胞位置<sup>[22-24]</sup>, 目前还分离得到了不同类型的编码 *APX* 基因, 并对其功能进行了研究。研究人员在拟南芥中发现了胞质型 *APX* 在植物细胞的抗氧化剂代谢中起作用, 如植物缺失 *APX1* 则表现为光合能力降低, 生长缓慢和迟花<sup>[25]</sup>, *APX1* 还可帮助叶绿体清除强光下产生的过多  $H_2O_2$ <sup>[26]</sup>, 从而对叶绿体起到保护作用。此外还发现拟南芥胞质型 *APX1* 和 *APX2* 在拟南芥遭受到干旱和热激的双重胁迫下可起关键的调控作用<sup>[27]</sup>。研究人员还发现, 叶绿体型 *APXs* 与胁迫条件下的光合作用相关<sup>[7]</sup>; 在拟南芥中过量表达 *tAPX* 可以明显增强植物对氧化胁迫、冷害和高光强的忍耐性<sup>[28]</sup>; 拟南芥 *APX3* 定位于过氧化物酶体上似乎非植物正常生长发育所必需<sup>[29]</sup>。

目前, 关于橡胶树 *APX* 的研究很有限, 仅发现 *HbAPX2* 编码的过氧化物酶的活性在橡胶树受到冷害胁迫后 96 h 内出现间歇性的增强和猜测 *HbAPX2* 可能属于胞质型<sup>[30]</sup>, 而有关该蛋白的生物生化功能研究

也很欠缺。本研究通过 RT-PCR 的方法克隆得到橡胶树中 1 个新的编码 *APX* 的基因,命名为 *HbAPX*。其相关的系统发育分析结果表明,该基因编码的 *APX* 属于过氧化物酶体类 *APX*。文献[18]表明,不同类型的 *APX* 在进化上表现出高度保守性,可能与其功能有关。因此,有必要进一步明确 *HbAPX* 的亚细胞功能定位,对验证系统发育分析结果的可靠性和阐明该基因的功能具有重要参考意义。

过氧化物酶体普遍存在于各类真核细胞中,是由单层膜包裹的囊泡,也是在细胞内产生  $H_2O_2$  的主要细胞器<sup>[31]</sup>。目前,已有学者在拟南芥、大麦、南瓜、菠菜、棉花等多种植物中,发现并鉴定了一些过氧化物酶体型的 *APX*,并认为过氧化物酶体型的 *APX* 通过其面向细胞质一面的 N 端激活位点区域,以单通道膜蛋白发挥作用,清除从过氧化物酶体游离出来的  $H_2O_2$  或由胞液产生的  $H_2O_2$ <sup>[32]</sup>。笔者所得到的 *HbAPX* 是否具有  $H_2O_2$  清除功能及如何清除和其相关的生物功能等问题都还需要做进一步的探索。

目前普遍认为,水杨酸(SA)主要是通过调节活性氧、抗氧化酶(剂)激活植物的过敏反应(Hypersensitive response, HR)和系统获得抗性(Systemacquired reaction, SAR)反应,从而提高植物的抗病反应<sup>[33]</sup>。在本研究中,笔者检测了 *HbAPX* 对 SA 的应答情况,并发现在转录水平上 *HbAPX* 能够被 SA 快速诱导,这个结果与前人研究的结果“SA 可以同时通过提高超氧化物歧化酶(SOD)等产生  $H_2O_2$  酶类的活性和抑制过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸氧化酶(APX)等降解酶类的活性,最终积累  $H_2O_2$  来提高植物的抗病性”<sup>[21]</sup>不一致。同时,笔者也检测了 *HbAPX2* 对 SA 的应答,发现 *HbAPX2* 经 SA 处理后 12 h 内的表达没有变化,这些数据暗示 SA 诱导的活性氧爆发与 *APX* 之间存在着复杂的关系,也许不同类型的 *APX* 在其中所起的作用不同,这有待做进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 郭泽建,李德葆. 活性氧与植物抗病性[J]. 植物学报, 2000, 42(9): 881-891.
- [2] 蔡以滢,陈珈. 植物防御反应中活性氧的产生和作用[J]. 植物学通报, 1999, 16(2): 107-112.
- [3] 邱金龙,金巧铃,王钧. 活性氧与植物抗病反应[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 56-61.
- [4] FOYER C H, NOCTOR G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses[J]. The Plant Cell, 2005(17): 1866-1875.
- [5] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002(7): 405-410.
- [6] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004(55): 373-399.
- [7] ASADA K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999(50): 601-640.
- [8] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends in Plant Science, 2004(9): 490-498.
- [9] NOCTOR G, FOYER C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998(49): 249-279.
- [10] MITTLER R, POULOS T L. Ascorbate peroxidase[M]//Smirnoff N. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Oxford: Blackwell Publishing; 2005: 87-100.
- [11] ASADA K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxidescavenging enzyme in plants[J]. Physiologia Plantarum, 1992(85): 235-241.
- [12] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes[J]. Journal of Experimental Botany, 2002(53): 1305-1319.
- [13] TEIXEIRA F K, MENEZES-BENAVENTE L, MARGIS R, et al. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome[J]. J Mol Evol, 2004(59): 761-770.
- [14] TEIXEIRA F K, MENEZES-BENAVENTE L, GALVAO V C, Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments[J]. Planta, 2006, 224(2): 300-314.
- [15] MOLLER I M, JENSEN P E, HANSSON A. Oxidative modifications to cellular components in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2007(58): 459-481.
- [16] MILLER G, SUZUKI N, CIFTCI-YILMAZ S, et al. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses[J]. Plant, Cell & Environment, 2010(33): 453-467.
- [17] ROSA S B, CAVERZAN A, TEIXEIRA F K, et al. Cytosolic *APX* knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice[J]. Phytochemistry, 2010(71): 548-558.
- [18] 庞彩红,冯兰东,王宝山. 植物中编码 *APX* 的基因特点及其与逆境响应的关系[J]. 山东师范大学学报: 自然科学

版 2007 22(4): 114–116.

- [19] YOSHIMURA K, ISHIKAWA T, TAMOI M, et al. Alternatively spliced mRNA variants of chloroplast Ascorbate Peroxidase isoenzymes in spinach leaves [J]. *Biochemical journal*, 1999, 338: 41–48.
- [20] 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(1): 23–27.
- [21] VLOT A C, DEMPSEY D A, KLESSIG D F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease [J]. *Annu Rev Phytopathol* 2009, 47: 177–206.
- [22] PANCHUK II, VOLKOV R A, SCHOFFL F. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of *ascorbate peroxidase* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002(129): 838–853.
- [23] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [J]. *Journal of Experimental Botany* 2002(53): 1305–1319.
- [24] CHEW O, WHELAN J, MILLAR A H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2003(278): 46869–46877.
- [25] PNUELI L, LIANG H, ROZENBERG M, et al. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*APX1*) deficient *Arabidopsis* plants [J]. *The Plant Journal*, 2003(34): 187–203.
- [26] DAVLETOVA S, RIZHISKY L, LIANG H, et al. Cytosolic *ascorbate peroxidase 1* is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2005(17): 268–281.
- [27] SHAI Koussevitzky, NOBUHIRO Suzuki, SERENA Huntington, et al. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *arabidopsis thaliana* to stress combination [J]. *the Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(49): 34197–34203.
- [28] YABUTA Y, MOTOKI T, YOSHIMURA K, et al. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photooxidative stress [J]. *The Plant Journal*, 2002(32): 915–925.
- [29] SAVITHA Narendra, SUJATHA Venkataramani, GUOXIN Shen, et al. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(12): 3033–3042.
- [30] JING Mai, STÉPHANE Herbet, MARC Vandame, et al. Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell [J]. *Arg Biomedical and Life Sciences*, 2009(23): 863–874.
- [31] DELRIO L A, SANDALIO L M, CORPAS F J, et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production scavenging and role in cell signaling [J]. *Plant Physiology*, 2006(141): 330–333.
- [32] LISEN BEE S C, HEINZE M, TRELEASE N R. Peroxisomal ascorbate peroxidase resides within a subdomain of rough endoplasmic reticulum in wildtype *arabidopsis ceus* [J]. *Plant Physiology*, 2003(13): 870–882.
- [33] 王利军, 战吉成, 黄卫东. 水杨酸与植物抗逆性 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(6): 619–624.

## Cloning of Ascorbate Peroxidase Gene *HbAPX* in *Hevea brasiliensis* and Its Response to Salicylic Acid

LUO Hong-li, YAN Zhi-ye

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** Based on the sequencing results of RNA-Seq analysis of *Hevea brasiliensis* and the amino acid sequence of *APX1* in *Arabidopsis thaliana*, the specific primers were designed and RT-PCR were performed to amplify the *APX* cDNA of *Hevea brasiliensis* (*HbAPX*). The results showed that the open reading frame of *HbAPX* is 858bp encoding 285 amino acids with a conserved ascorbate peroxidase domain; the amino acid sequence of the *HbAPX* has 90% homology with *APX* from *Jatropha curcas*, and the homology is more than 80% with *APX* from *Populus tomentosa*, *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*; the phylogenetic analysis data indicated that *HbAPX* belong to peroxisome type *APX*; the quantitative analysis data suggested that the expression of *HbAPX* was induced by SA, which is probably involved in system acquired resistance and hypersensitivity reaction in rubber.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*; Ascorbate peroxidase (*APX*); SA response