

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201307024

林源秀, 顾欣昕, 于定群, 等. 不同低温胁迫下草莓叶片 *FaGR* 基因表达分析[J]. 广西植物, 2015, 35(1):99-104Lin YX, Gu XX, Yu DQ, et al. Expression pattern analysis of *FaGR* gene of strawberry leaves under stress of different low temperatures[J]. *Guihaia*, 2015, 35(1):99-104

不同低温胁迫下草莓叶片 *FaGR* 基因表达分析

林源秀, 顾欣昕, 于定群, 余昊唯, 陈清, 汤浩茹*

(四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 为进一步探明草莓谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 基因在低温胁迫下的表达调控模式, 以揭示其作用机理和抗逆机制, 本研究以草莓栽培品种‘丰香’植株为对象, 分别用 0、2、4、6、8、10℃ 低温胁迫以及室温 (25℃) 作为对照处理 24 h, 从处理植株的新鲜幼嫩叶片中提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 采用半定量 PCR 及荧光定量 PCR 两种定量方法, 分析 *FaGR* 基因在不同低温胁迫下的表达差异。结果表明: 半定量 PCR 方法与荧光定量 PCR 方法的结果基本一致。*FaGR* 的相对表达量受到不同低温胁迫和不同程度的诱导, 在 8℃ 和 10℃ 低温胁迫下表达量上调, 均高于对照水平, 且在 8℃ 低温胁迫下相对表达量最高; 当温度为 6℃ 时, *FaGR* 表达量急剧下降, 当温度低于 6℃ 时, *FaGR* 表达量随着温度的降低而逐渐降低, 并低于对照水平; 在 0℃ 相对表达量时降至最低水平, 约为最大表达量的一半。这说明半定量 PCR 结果准确可靠, 可广泛应用于基因表达研究, 而且 *FaGR* 表达量受到低温诱导, 但不同低温处理对 *FaGR* 的表达量诱导程度不同。*FaGR* 相对表达量在一定范围内的低温胁迫下增加, 但在此低温范围外的低温胁迫下则降低, 该研究表明 6℃ 低温为临界值。以上结果为进一步调控该基因表达提供了科学依据, 同时为提高植物抗逆能力提供了基础资料。

关键词: 草莓; 低温胁迫; 半定量 PCR; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q945.78; S663 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)01-0099-06

Expression pattern analysis of *FaGR* gene of strawberry leaves under stress of different low temperatures

LIN Yuan-Xiu, GU Xin-Xin, YU Ding-Qun, YU Hao-Wei,

CHEN Qing, TANG Hao-Ru*

(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In order to investigate the expression pattern of glutathione reductase from strawberry under low temperature stress, so as to further reveal its function in defending stresses and the molecular mechanism of cold-resistant in plants. We treated strawberry plants (*Fragaria × ananassa* ‘Toyonaka’) with different low temperatures including 0, 2, 4, 6, 8 and 10℃ in artificial chamber for 24 h respectively, and we also treated plants with 25℃ for 24 h as control. Subsequently, total RNA samples were extracted from the treated fresh young leaves, and cDNA first strand for PCR reactions was synthesized using these RNA samples. When all cDNA samples were done, we also chose two methods including semi-quantitative PCR and real-time quantitative PCR to detect the expression differences of *FaGR* between different low temperature treatments. We chose two different methods to determine the expression of

收稿日期: 2014-03-28 修回日期: 2014-08-29

基金项目: 国家级大学生创新性实验项目 (091062617)

作者简介: 林源秀 (1989-), 女, 四川宜宾人, 在读硕士研究生, 主要从事生物技术在果树上的应用研究, (E-mail) yuanxiulin1989@gmail.com。

* 通讯作者: 汤浩茹, 博士, 教授, 主要从事果树遗传育种和生物技术研究, (E-mail) htang@sicau.edu.cn。

FaGR, on one hand to make sure the differences of expression between samples were exactly due to the different temperatures, not because of the different methods; on the other hand, it was expected to see whether semi-quantitative PCR was reliable as we thought for gene expression research. At last we combined the results came from two methods and analyzed the expression differences of *FaGR* gene between samples treated with different temperatures. The results were described as below: the result of semi-quantitative PCR was generally consistent with that of real-time quantitative PCR, both of them showed that the relative expression of *FaGR* was greatly modified in diverse grades by different low temperatures. Furthermore, the relative expression levels of *FaGR* under low temperature at 8 and 10 °C increased compared to the control which was at 25 °C, and the highest relative expression level of *FaGR* was detected at 8 °C. However, thereafter, the relative expression level at 6 °C dropped dramatically to a level which was slightly lower than the control at 25 °C. When the temperature was below 6 °C, the relative expression level of *FaGR* decreased accompanied with the decreasing of temperatures, each of the expression level at temperature below 6 °C was lower than that at 25 °C. The lowest relative expression level was detected at 0 °C, which was almost only the half amount of the maximum expression at 8 °C. These results supported that semi-quantitative PCR was exactly reliable and it could be widely used for gene expression research. Also, these results indicated that *FaGR* gene was definitely induced by chilling stress but within a certain range of temperature, and the degree of changes under different low temperatures was also different. In a certain range, *FaGR* was up-regulated by low temperature, however it was slightly suppressed by low temperature out of this range, and 6 °C was showed as the critical value in this research. What's meaningful, these results would provide a scientific basis for the further regulation of the gene expression, as well as some basic data to improve the ability of plants to resistant stresses.

Key words: strawberry; low temperature stress; semi-quantitative PCR; real-time quantitative PCR

谷胱甘肽还原酶(GR)是植物抗氧化酶系统中的一个重要酶,主要生理功能是利用 NADPH 作为电子供体,催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原生成还原型谷胱甘肽(GSH),从而对维持细胞内高 GSH/GSSG 以及 GSH 的含量有重要作用(Meister *et al.*, 1983; Alscher, 1989)。GR 通过参与植物抗坏血酸—谷胱甘肽循环(AsA-GSH Cycle),与该循环中的其他抗氧化酶类如抗坏血酸过氧化酶(APX)、以及超氧化物歧化酶(SOD)和磷酸戊糖途径的关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)相互作用(图 1),对清除植物体内活性氧(ROS)有重要作用(于定群等, 2012; Foyer *et al.*, 1976)。另外, GR 催化反应的产物 GSH, 不仅是植物体内主要的低分子量巯基化合物,对清除 ROS、外源性有害物质以及抵抗重金属胁迫有重要作用(Meister *et al.*, 1983); 而且还是哺乳动物细胞中主要的非蛋白巯基库,对维持细胞内氧化还原平衡必不可少(Lu, 1999, 2009)。在许多胁迫条件下, GSH 均能保护蛋白巯基免受氧化,防止蛋白的变性(Foyer *et al.*, 1976)。此外, GSH 还通过植物 AsA-GSH 循环为脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)提供还原力,将脱氢抗坏血酸(Dehydroascorbic Acid, DHA)还原生成抗坏血酸(AsA)。因此, GR 对植物体内另一种重要的抗氧化剂——AsA 的再生也有重要作用

(Foyer *et al.*, 1976; Yousuf *et al.*, 2012)。

GR 的表达受到逆境条件如低温(Esterbauer *et al.*, 1978)、干旱与盐胁迫(Kaminaka *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2007)、重金属(Xiang *et al.*, 1998)等的诱导。Kaminaka *et al.* (1998) 研究表明, 水稻 *GR* 表达量在 ABA 胁迫及其引起的胁迫条件下明显增加; 束德峰等(2011)研究发现, 转入 *GR* 反义链的番茄植株对低温胁迫的敏感性明显增强; 将拟南芥 *GR* 基因转入金丝桃中, 使其过量表达, 转基因植株对低温胁迫的抵抗能力明显增加(Yousuf *et al.*, 2012), 而 *GR* 表达对低温胁迫的响应可能是通过某条能被 NO 调控的信号转导途径来实现(Liu *et al.*, 2012)。但 *GR* 在不同低温胁迫下的表达情况及其作用机理仍不清楚。因此, 分析 *GR* 在不同低温胁迫下的表达差异对进一步揭示 *GR* 在低温胁迫下的作用机制有重要意义。草莓 (*Fragaria × ananassa*) 是目前水果保护地生产中种植面积最大的一个种类, 由于多种原因导致草莓在栽培过程中受到偶发性的短时低温伤害, 从而给草莓生产带来巨大损失。本研究以草莓栽培品种‘丰香’为材料, 对草莓植株进行不同低温处理, 通过半定量 PCR 以及荧光定量 PCR (qPCR) 两种定量方法对其叶片中 *GR* 在不同低温胁迫下的表达差异进行检测, 以期进一步阐明其作用机理与抗逆机制, 为将来利用该

基因增强草莓与其它园艺植物的抗逆性及遗传改良提供基础资料。

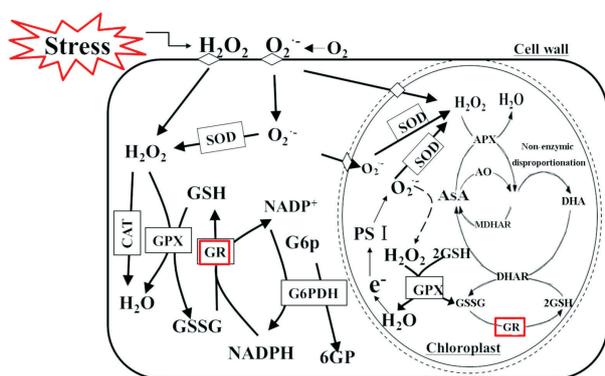


图 1 植物 GR 在植物清除 ROS 中的作用示意图
引自林源秀等 (2013), 有改动。

Fig. 1 Role of GR in scavenging reactive oxygen species in plants. Quoted from Lin Yuan-xiu *et al.* (2013), changed.

1 材料与方法

1.1 供试材料

草莓栽培品种‘丰香’ (*Fragaria × ananassa* cv. Toyonaka) 栽植于四川农业大学教学科研园区, 取新生匍匐茎移栽至盆栽中, 带回实验室备用。待存活后, 放入人工气候箱中, 分别设置温度 0、2、4、6、8、10 °C 以及室温 (25 °C) 作为对照, 每个温度处理 24 h。

反转录试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司, DNase I, PCRmix, SYBR Green 荧光染料均购自 TaKaRa 公司, 其他试剂均为进口或国产分析纯, PCR 引物和序列测定由上海生工生物公司完成。

1.2 总 RNA 的提取及反转录

选取新鲜幼嫩的叶片, 参照改良 CTAB 法 (Chen *et al.*, 2012) 提取其总 RNA, 用 DNase I 处理后放于 -80 °C 超低温冰箱备用。将总 RNA 样品调整至相同浓度后, 参照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作合成 cDNA, cDNA 合成后立即保存于 -20 °C 冰箱待用。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中已提交的 *FaGR* (JQ339738) 基因序列, 同时选择 *FaGAPDH* 作为内参, 利用 NCBI 核酸数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 已登录的 *FaGAPDH* (AB363963) 基因序列, 搜索草莓基因组数据库 (<http://www.rosaceae.org/>), 找到目标 *FaGAPDH* 序列, 利用 Primer 5.0 软件和 Beacon designer 7.0 软件设计半定量 PCR 引物 (*FaGAPDH*-F1, *FaGAPDH*-R1; *GRP3*, *GRP4*) 以及 qPCR 引物 (*FaGAPDH*-F2, *FaGAPDH*-R2; *GR*-F, *GR*-R), 引物序列见表 1。引物合成后, 进行 PCR 扩增, 以检测所得片段是否为目的序列, 扩增时采用 20 μL 体系, 其中 PCRmix 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 cDNA 1 μL, 灭菌的 ddH₂O 补足 20 μL, 扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

org/), 找到目标 *FaGAPDH* 序列, 利用 Primer 5.0 软件和 Beacon designer 7.0 软件设计半定量 PCR 引物 (*FaGAPDH*-F1, *FaGAPDH*-R1; *GRP3*, *GRP4*) 以及 qPCR 引物 (*FaGAPDH*-F2, *FaGAPDH*-R2; *GR*-F, *GR*-R), 引物序列见表 1。引物合成后, 进行 PCR 扩增, 以检测所得片段是否为目的序列, 扩增时采用 20 μL 体系, 其中 PCRmix 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 cDNA 1 μL, 灭菌的 ddH₂O 补足 20 μL, 扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 用于半定量 PCR 及 qPCR 的引物

Table 1 Primers for semi-quantitative PCR and real-time quantitative PCR reactions

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	扩增产物长度 Product length (bp)
<i>GRP3</i>	CTCAGCGACCTGGTATTCTCT	764
<i>GRP4</i>	ATCCGTCTCAGCATCAACAAC	
<i>FaGAPDH</i> -F1	ATCCATTTCATCACCACCGACTA	313
<i>FaGAPDH</i> -R1	TCATTACACCAACAACGAACA	
<i>GR</i> -F	GTG AAG GTG GAT GAG TAT	93
<i>GR</i> -R	TAGAGC AAC AGG TGT AAG	
<i>FaGAPDH</i> -F2	GAGTCT ACT GGA GTG TTC A	135
<i>FaGAPDH</i> -R2	CTT GTA TTC GTG CTC ATT CA	

1.4 半定量表达分析

半定量 PCR 扩增采用 20 μL 反应体系, 其中 PCRmix 10 μL, cDNA 1 μL, 上游和下游引物 (2 μmol · L⁻¹) 各 1 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 50 s, 57 °C 20 s, 72 °C 1 min, 共 29 个循环, 72 °C 10 min, 12 °C 保存。扩增内参基因片段, 调整所用各 cDNA 浓度及用量使扩增所得的片段条带亮度相同 (图 2:A), 并按照梯度循环数为 29、32、35、38、41、44、47, 分别扩增 *FaGR* 基因片段和内参基因片段 (图 2:B), 采用 Quantity one 软件对各循环数下扩增条带的光密度值进行分析, 做出循环数与光密度的曲线图 (图 3), 选取处于对数扩增期的循环数用于表达研究, 本研究最终确定为 37 个循环。

扩增产物统一取 5 μL, 1.5% 琼脂糖凝胶, 在 1 × TAE 电泳缓冲液中, 100 V 恒压电泳进行检测。电泳完后, EB 染色 15 min, 紫外灯下用 G-BOX 公司凝胶成像系统 Gene Snap 成像。用 Quantity one 软件对扩增条带光密度值进行分析, Sigmaplot 12.0 软件计算相对表达量并做柱状图。各个低温下的相

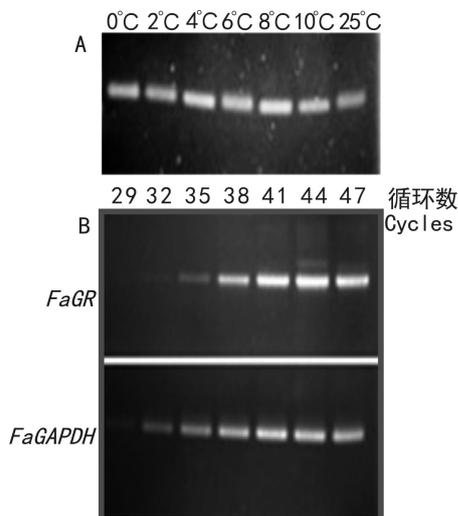


图2 半定量 PCR 中亮度调整及循环数筛选 A. 调整 cDNA 浓度及用量使内参扩增条带亮度一致; B. *FaGR* 以及内参在不同循环数下扩增电泳图。

Fig. 2 Intensity control and cycle number screened in semi-quantitative PCR A. Adjusting the dosage and concentration of template cDNA to make the band of each PCR production sample equal intensity, the PCR primers were housekeeping gene specific primers; *FaGAPDH*-F1 and *FaGAPDH*-R1; B. Using the appropriate cDNA dosage as the template for the *FaGR* and housekeeping gene PCR amplification of 29, 32, 35, 41, 44, 47 cycles in order to find the suitable cycle number.

对表达量用相应低温下 *FaGR* 与 *FaGAPDH* 基因扩增条带的光密度值的比值表示。

1.5 qPCR 表达分析

采用 CFX96 (Bio-Rad, 美国) 进行 qPCR 检测, 用 20 μL 体系: SYBR Green 10 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.6 μL , cDNA 2 μL , 用已灭菌的 ddH₂O 补足 20 μL 。以不加模板 cDNA 为对照, 每个样品三孔重复。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 20 s), 每个循环结束后采集荧光信号。反应结束后, 插入熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 s, 降温到 60 $^{\circ}\text{C}$ 维持 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 开始以 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 每步升温, 并维持 5 s 采集荧光信号至 95 $^{\circ}\text{C}$ 结束反应。采用 2^{- ΔCt} 法处理数据, 以确定基因的相对表达量, Sigma-plot 12.0 做柱形图。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

所提取的总 RNA 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图 4), 28 S 和 18 S 条带清晰完整, 经核酸蛋

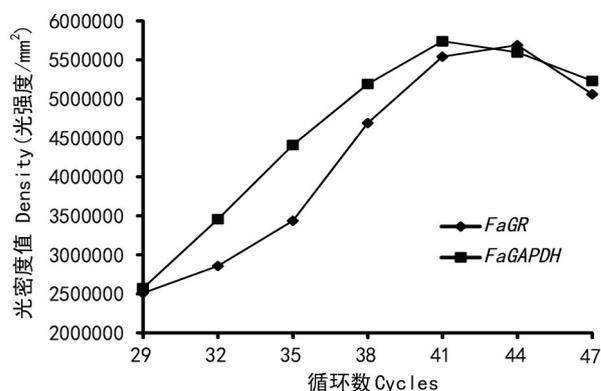


图3 循环数与条带光密度的曲线图

Fig. 3 Cycle-IOD graph constructed by the quantity one software to make sure that the cycle we chose (37) for amplification was under linear phase

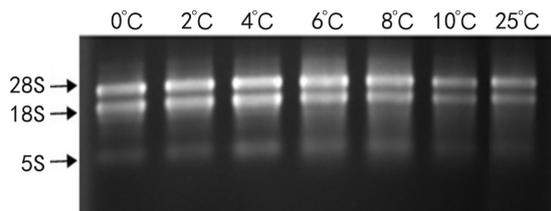


图4 不同温度下所提取的草莓叶片总 RNA 电泳图

Fig. 4 Total RNA from strawberry leaves under different temperatures

白分析仪测定 $\text{OD}_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ 均为 1.8~2.1 之间, 表明所提的草莓叶片各总 RNA 样品的完整性和纯度均较高。

2.2 目标基因的扩增

分别用 *FaGR* 和 *FaGAPDH* 引物进行目的基因及内参基因 PCR 扩增, 结果均得到预期大小的条带 (图 5), 并经测序确认为目标序列。

2.3 半定量表达差异检测

调整总 RNA 及 cDNA 浓度基本一致后, 利用半定量 PCR 检测 *FaGR* 在不同低温下的表达差异, 目标基因 (*FaGR*) 与内参基因 (*FaGAPDH*) 扩增条带的光密度比值表示 *FaGR* 的相对表达量。结果 (图 6, 图 7) 表明: *FaGR* 在不同低温胁迫下表达差异较大, 室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 的时候有较高的表达量; 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫下, *FaGR* 相对表达量增加至略高于对照; 在 8 $^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫时达到最大; 而当处于 6 $^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫下时, 相对表达量急剧下降至较对照略低的状态, 并且相对表达量随着温度的逐渐降低而降低; 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 的低温胁迫下降至最低, 且最低表达量仅为最高表达量的一半。说明在一定温度范围内,

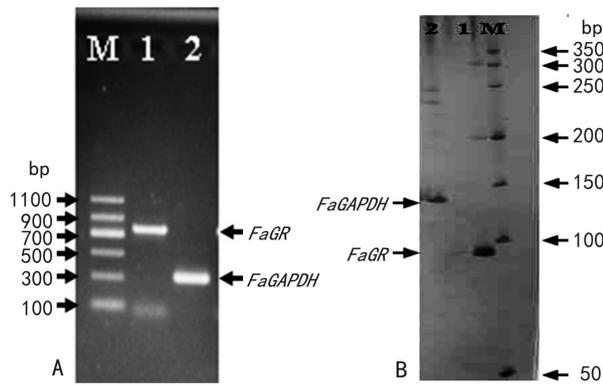


图 5 半定量 PCR 及 qPCR 引物扩增结果 A. 用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测的半定量 PCR 引物扩增结果；B. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的 qPCR 引物扩增结果；M. 分子量标准；1. *FaGR* 扩增结果；2. *FaGAPDH* 扩增结果。

Fig. 5 Results of PCR amplifications using semi-quantitative primers and real-time quantitative PCR primers

A. Result of semi-quantitative PCR amplification detected by 2.5% agarose gel electrophoresis; B. Result of real-time quantitative PCR amplification detected by polyacrylamide gel electrophoresis; M. Molecular standard; Lane 1. Result of *FaGR* amplification; Lane 2. Result of *FaGAPDH* amplification.

低温胁迫促进 *FaGR* 的相对表达量增加,当超出这个温度范围后,*FaGR* 的相对表达量较对照降低。推测是由于在低温应急阶段,低温会促使植物体内受低温诱导基因(*FaGR*)的表达,而在增强耐受阶段,过度的低温胁迫引起植物体内一系列生理生化变化造成 *FaGR* 表达受到一定的抑制,而此时植物可能通过其他各种逆境响应途径使自身的抗性增强而不至受到低温伤害。

2.4 定量表达分析

qPCR 表达结果总体变化趋势与半定量表达结果基本一致(图 8):*FaGR* 基因在室温(25 °C)的时候有一定的表达量,在低温胁迫下,相对表达量迅速上升。在 10 °C 低温下,*FaGR* 相对表达上升至明显高于对照水平,在 8 °C 低温时达到最大,而后随着温度降低至 6 °C,相对表达量急剧下降至较对照略低的水平,而在 4 °C 低温下,相对表达量有所回升,但仍略低于对照水平,随后表达量又逐渐降低,在 0 °C 的低温下降至最低。从相对表达量来看,*FaGR* 基因在不同低温胁迫下的表达水平存在较大差异,0 °C 下的最低表达量仅为 8 °C 最高时的一半。

3 讨论

低温胁迫下,植物体内不仅活性氧水平急剧增

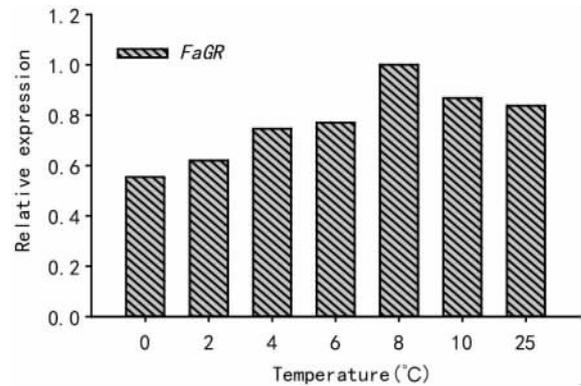


图 6 用 Sigmaplot 12.0 软件计算的 *FaGR* 相对表达量柱形图

Fig. 6 Histogram of relative expression of *FaGR* under different low temperature stresses calculated by Sigmaplot 12.0 software

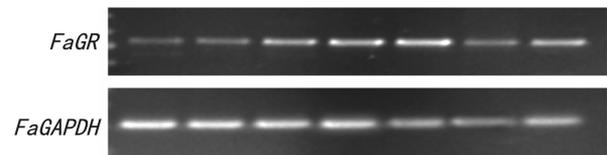


图 7 *FaGR* 与内参基因表达差异电泳图

Fig. 7 Electrophotogram of expression difference between *FaGR* and *FaGAPDH*

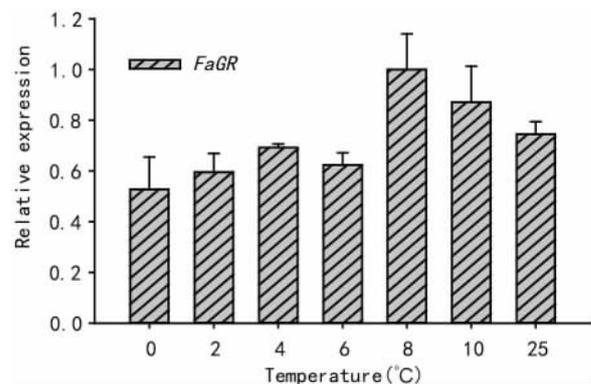


图 8 qPCR 表达结果 每个柱子表示 *FaGR* 在不同温度下的相对表达量。实验 3 孔重复,标准误差在图中标出。

Fig. 8 Results of real-time quantitative PCR reactions Columnar diagram represents the relative expression levels of *FaGR* in different temperatures. Each experiment was repeated three times and standard errors of the analysis are indicated by the vertical bars.

加,而且植物自身的抗氧化系统也会被诱发启动,从而保护植物不受伤害。GR 是植物抗氧化酶系统中的关键酶,其基因表达水平受多种逆境因子如低温、干旱、高盐、重金属等诱导。Baek *et al.*(2003)的研

究表明,在低温驯化的小麦植株中,*GR* 转录水平显著增加;丁顺华等(2012)利用 RNAi 技术干扰烟草植株的 *GR* 基因表达,发现被干扰植株叶绿体内 H_2O_2 大量积累,对低温敏感性大大增强。说明 *GR* 对低温胁迫的响应与植物抗逆性密切相关。本研究结果表明,在 8 °C 和 10 °C 低温胁迫下,*FaGR* 表达量增加,在 8 °C 低温条件下表达量最高,这与 Kamina et al.(1998)和 Romero-Puertas et al.(2006)的研究结果一致。说明 *FaGR* 的表达水平受到低温胁迫诱导,且其表达水平在不同低温胁迫下存在较大差异。在一定温度范围内,低温诱导会使 *FaGR* 基因的相对表达量增加,当超出这个温度范围后,由于低温引起植物体内一系列生理生化变化造成 *FaGR* 表达有所下降,此时植物通过其他各种逆境响应途径使自身的抗性增强而不受到低温伤害。

植物对低温胁迫的响应可分为低温应急阶段及增强耐受阶段,在适度的低温胁迫下,植物自身抗氧化系统被激发,通过增加抗氧化酶如 *GR* 的酶活力水平及其受低温诱导的基因的表达水平增加植物对逆境的抵抗能力。本研究结果中 *FaGR* 在 8 °C 和 10 °C 低温胁迫下表达量上升,而当温度低于 6 °C 时,*FaGR* 表达量急剧下降至低于对照水平。说明在植物的低温应急阶段,*FaGR* 的表达受到低温的诱导而增加;随着低温胁迫的加重,植物体内活性氧水平持续增加,从而导致植物体自身发生一系列生理生化变化在一定程度上抑制了 *FaGR* 的表达水平,使其表达量低于对照,且 6 °C 为临界值。

半定量 PCR 是一种研究基因转录水平的有效手段,因其具有成本低、灵敏度高特点被广泛运用于基因表达研究。本研究在利用半定量 PCR 方法进行表达研究时,首先调整 cDNA 浓度及用量使内参基因扩增的条带亮度一致,并且设置了不同的循环梯度,保证了起始模板量相同及在线性扩增期进行表达分析,结果更为准确可靠。而结果表明,半定量 PCR 与 qPCR 两种定量方法的结果基本一致,均显示 *FaGR* 表达量在 8 °C 以及 10 °C 低温胁迫下增加,而在低于 6 °C 低温胁迫时,*FaGR* 表达量下降,0 °C 时表达量最低。再次证实了半定量 PCR 方法结果与 qPCR 结果差异不明显,其结果准确可靠。

本研究仅对 *GR* 基因在低温胁迫下的表达模式进行了初步研究,但高温也会诱导 *GR* 基因表达水平以及 *GR* 酶活性水平发生变化(Pang et al.,

2010)。Lu et al.(2008)研究发现,在对低温敏感型的飞机草进行热处理后,*GR* 酶活性明显增加但是在低温胁迫下并没有增加;并且有研究表明,叶绿体 *GR* 基因会被高温所抑制(Romero-Puertas et al., 2006)。这些结果说明,*GR* 对逆境胁迫的响应与物种、逆境种类以及 *GR* 类型等有关,而对于 *GR* 基因在高温及其他胁迫下的表达模式及 *GR* 酶在逆境下的作用机制,不同类型的 *GR* 是否存在对逆境胁迫的专一性等问题,有待进一步研究。

参考文献:

- Alscher RG. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants[J]. *Physiol Plant*, **77**(3):457-464
- Baek KH, Skinner DZ. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines [J]. *Plant Sci*, **165**(6):1 221-1 227
- Chen Q, Yu HW, Wang XR, et al. 2012. An alternative cetyltrimethylammonium bromide-based protocol for RNA isolation from blackberry(*Rubus L.*) [J]. *Gen Mol Res*, **11**(2):1 773-1 782
- Ding SH, Lei M, Lu Q, et al. 2012. Enhanced sensitivity and characterization of photosystem II in transgenic tobacco plants with decreased chloroplast glutathione reductase under chilling stress [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1 817**(11):1 979-1 991
- Esterbauer H, Grill D. 1978. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies* [J]. *Plant Physiol*, **61**(1):119-121
- Foyer CH, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts; a proposed role in ascorbic acid metabolism [J]. *Planta*, **133**(1):21-25
- Kaminaka H, Morita S, Nakajima M, et al. 1998. Gene cloning and expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa L.*) [J]. *Plant Cell Physiol*, **39**(12):1 269-1 280
- Kim D, Shibato J, Agrawal GK, et al. 2007. Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa L.*) [J]. *Mol Cells*, **24**(1):45-59
- Lin YX(林源秀), Gu XX(顾欣昕), Tang HR(汤浩茹). 2013. Characteristics and biological functions of glutathione reductase in plants(植物谷胱甘肽还原酶的生物学特性及功能) [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), **29**(5):37-45
- Liu WX, Zhang XL, Zhang Y, et al. 2012. Cloning and expression analysis of glutathione reductase gene from cucumber (*Cucumis sativus L.*) treated by exogenous nitric oxide under low temperature stress [J]. *Afric J Biotech*, **11**(31):7 819-7 835
- Lu P, Sang WG, Ma KP. 2008. Differential responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive *Eupatorium* species in China [J]. *J Integr Plant Biol*, **50**(4):393-401
- Lu SC. 2009. Regulation of glutathione synthesis [J]. *Mol Aspects Med*, **30**(1-2):42-59
- Lu SC. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies [J]. *FASEB J*, **13**(10):1 169-1 183

(下转第 35 页 Continue on page 35)

分蒸腾的重要结构,与光合作用和蒸腾作用直接相关。本研究对厚壁毛竹与毛竹叶的气孔密度及其轴向长度进行观察,发现厚壁毛竹的气孔轴向长度略大于毛竹,但气孔密度显著低于毛竹。气孔大小对于叶片光合作用及蒸腾作用的影响在一定程度上大于气孔的密度。竹类植物叶解剖结构变化对竿壁物质形成积累的影响值得深入研究,为此才能为揭示厚壁形成的机理提供理论依据。

参考文献:

- Chen XY(陈晓亚), Hu CH(胡成华), Yu FG(喻富根), et al. 1993. Micromorphology of leaf epidermis of *Chimonobambusa* (Bambusoideae)(方竹属(竹亚科)叶片表皮微形态特征)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), **31**(3):227-235
- Clark LG. 1990. *Chusquea* sect. *Longiprophyllae* (Poaceae; Bambusoideae): A new Andean section and new species[J]. *Syst Bot*, **15**:617-634
- Clark LG, Londoño X. 1991. A new species and new sections of *Rhipidocladum* (Poaceae; Bambusoideae)[J]. *Am J Bot*, **78**: 1 260-1 279
- Du TZ(杜天真), Yang GY(杨光耀), Guo QR(郭起荣), et al. 1997. Nutrient components of *Phyllostachys edulis* 'Pachyloen' shoot(厚皮毛竹春笋营养成分研究)[J]. *Jiangxi For Sci Technol*(江西林业科技), **6**:1-2
- Guo QR(郭起荣). 2003. A new rare variety of Moso bamboo-*Phyllostachys edulis* 'Pachyloen'(珍惜毛竹新品种—厚壁毛竹)[J]. *World Bamb Ratt*(世界竹藤通讯), **3**(1):40
- Guo QR(郭起荣), Yang GY(杨光耀), Du TZ(杜天真), et al. 2003. Studies on phenotype hereditary genetics of thick culm wall of *Phyllostachys edulis* 'Pachyloen'(厚皮毛竹厚壁性状的表形遗传分析)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), **25**(6):811-814
- Lu YH(卢艳花). 1995. Micromorphology of leaf epidermis of 23 bamboo species(23种竹子叶表皮微形态的观察)[J]. *Bamboo Res*(竹类研究), **2**:42-48
- Shi JM(施建敏), Yang GY(杨光耀), Guo QR(郭起荣). 2008. Study on the transpiration dynamic variation of *Phyllostachys edulis* 'Pachyloen'(厚壁毛竹蒸腾动态研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **26**(4):397-401
- Shi JM(施建敏), Yang GY(杨光耀), Yang QP(杨清培), et al. 2009. Seasonal photosynthetic variance of *Phyllostachys edulis* 'Pachyloen' response to environmental factors(厚壁毛竹光合作用对环境因子响应的季节变化)[J]. *For Res*(林业科学研究), **22**(6):872-877
- Shi JM(施建敏), Yang GY(杨光耀), Yang QP(杨清培), et al. 2010. Photosynthetic responses of *Phyllostachys edulis* 'Pachyloen' to doubled CO₂ concentration(厚壁毛竹光合作用对 CO₂ 浓度倍增的短期响应)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(5):636-640
- Soderstrom TR, Ellis RP. 1987. The Position of Bamboo Genera and Allies in A System of Grass Classification[M]//Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS(eds). *Grass Systematics and Evolution*. Washington: Smithsonian Institution Press
- Wang HQ(王海清), Xu Z(徐柱), Qi J(祁娟). 2009. Prospect and progress of leaf blade comparative anatomy of Poaceae in China(禾本科植物叶片比较解剖的研究进展)[J]. *Grassl Turf*(草原与草坪), **2**:93-97
- Yang GY(杨光耀), Li ZY(黎祖尧), Du TZ(杜天真), et al. 1997. A new cultivated variety of Moso bamboo(毛竹新栽培变种—厚皮毛竹)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), **19**(4):97-98
- Yang HQ(杨汉奇), Wang H(王红), Li DZ(李德珠). 2006. Micromorphological study on leaf epidermis of *Schizostachyum* and its allies (Poaceae; Bambusoideae)(思筲竹属及其近缘属叶表皮微形态特征)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物学研究), **28**(3):261-267
- Meister, A, Anderson ME. 1983. Glutathione [J]. *Ann Rev Biochem*, **52**(1):711-760
- Pang CH, Wang BS. 2010. Role of Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase in Ascorbate-glutathione Cycle and Stress Tolerance in Plants[M]. Netherland: Springer-Verlag:91-113
- Romero-Puertas, MC, Corpas FJ, Sandalio LM, et al. 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme[J]. *New Phytol*, **170**(1):43-52
- Shu DF, Wang LY, Duan M, et al. 2011. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast glutathione reductase enhances susceptibility to chilling stress[J]. *Plant Physiol Biochem*, **49**(10): 1 228-1 237
- Xiang CB, Oliver DJ. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis[J]. *Plant Cell*, **10**(9):1 539-1 550
- Yousuf PY, Hakeem KUR, Chandna R, et al. 2012. Role of Glutathione Reductase in Plant Abiotic Stress[M]. In *Abiotic Stress Responses in Plants*. New York: Springer-Verlag New York Inc.:149-158
- Yu DQ(于定群), Tang HR(汤浩茹), Zhang Y(张勇), et al. 2012. Research progress in glucose-6-phosphate hydrogenase in higher plant(高等植物葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的研究进展)[J]. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), **28**(7):800-812

(上接第 104 页 Continue from page 104)