

密级：_____

论文编号：_____

中国农业科学院 学位论文

玉米和黑麦草漆酶基因的克隆和系统发育分
析及玉米水分胁迫下基因表达研究

Cloning and Phylogenetic Analysis of Laccases in Maize and
Ryegrass and Gene Expression of Water Stress in Maize

博 士 研 究 生：路运才

指 导 教 师：王天宇 研究员

黎 裕 研究员

申 请 学 位 类 别：农学博士

专 业：作物遗传育种

研 究 方 向：植物基因组学

培 养 单 位：作物品种资源研究所

提交日期 2004 年 9 月

DOCTORAL DISSERTATION

Cloning and Phylogenetic Analysis of Laccases in Maize and Ryegrass and Gene Expression of Water Stress in Maize

Doctoral candidate: Lu Yuncai

Supervisor: Professor Wang Tianyu

Professor Li Yu

Major: Crop Genetics and Breeding

Specialty: Plant Genomics

Graduate School of CAAS

Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS

September 2004 Beijing

论文评阅人

程祝宽	研究员	中国科学院遗传与发育研究所
储成才	研究员	中国科学院遗传与发育研究所
景蕊莲	研究员	中国农业科学院品资所

答辩委员会主席： 董玉琛 院士

答辩委员会委员：

辛志勇	研究员	中国农业科学院作物所
李建生	教授	中国农业大学
程祝宽	研究员	中国科学院遗传与发育研究所
徐明良	教授	中国农业大学
王志兴	研究员	中国农业科学院生物技术所
王晓鸣	研究员	中国农业科学院品资所

答辩地点：中国农业科学院作物所 209 会议室

答辩时间：2004 年 10 月 19 号

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘要

目前，玉米已经成为超过小麦的第二大粮饲兼用作物。消化率和干旱是影响玉米饲用品质和产量的两个重要因素。常规育种在饲用品质改良和抗旱育种中发挥了重要作用，但该途径费时费力，效率不高。生物技术的迅猛发展，为在分子水平上开展玉米饲用品质改良和抗旱性分子机制研究提供了有利契机。

本研究利用基因同源序列克隆技术、cDNA-AFLP 技术和生物信息学技术，一方面，进行黑麦草和玉米漆酶基因的克隆与分析；另一方面，对水分胁迫条件下 4 个玉米自交系材料的基因表达情况进行深入研究，确定与玉米抗旱相关的功能基因，从而为遗传工程改良饲料作物的消化率和增强玉米种质的抗旱性提供重要的物质基础和理论依据。这对于我国农业种植结构调整和畜牧业的发展以及实施高效节水农业均具有一定的理论和实践意义。

本研究通过对参与木质素合成途径中一个重要酶-漆酶的系统分析与克隆以及利用 cDNA-AFLP 技术对不同抗旱性的玉米种质在水分胁迫条件下的基因表达规律进行了研究，获得了以下主要结果：

1. 以 64 个不同来源的植物漆酶为材料，对其氨基酸序列进行了比较分析，并进行了分子进化机制的探讨。发现漆酶作为蓝铜氧化酶蛋白家族的成员，具有一个或数个不等的保守区域（HWHG 和 HLHG）及 N 糖基化结合位点。系统发生关系表明，植物漆酶是一个高度趋异的多基因家族，在种子植物分化为被子植物和裸子植物的前后，均可能发生了基因复制；

2. 进一步通过对 64 个漆酶的一系列特征进行分析发现：同一物种的不同漆酶成员在序列上差异很大；在单子叶和双子叶植物中均有细胞外和细胞内漆酶蛋白；糖基化位点数目（8-23 个）和等电点的变化范围都很大（5-10）；漆酶的催化底物广泛；在不同组织中差异表达。因此，植物漆酶除了参与木质素的生物合成外，还可能具有其它功能；

3. 在 27 个水稻漆酶基因中，有 9 个位于第 9 号染色体上，6 个位于第 11 号染色体上。这就意味着超过一半的漆酶成员集中在 2 条染色体上。水稻第 1 号染色体上的漆酶基因分散在 3 个不同的区段，从 GRLC26 到 GRLC1 跨越了 21Mb。GRLC26 位于区段 1 (15371897-15374072 bp)；GRLC6 位于区段 2 (25214631-25216628 bp)。区段 3 为 GRLC5 和 GRLC1 之间 (1.3Mb)，该区域位于 C126435 和 C15960 标记之间。位于第 11 号染色体上的漆酶基因，聚集于 3 个区段。其中，GRLC8、GRLC11、GRLC12、GRLC15 位于短臂末端。我们发现 GRLC11、GRLC12 和 GRLC15 与水稻的一个 MYB 转录因子的基因克隆在染色体上的位置相近。17 个拟南芥漆酶基因只有 AtLC1 和 AtLC7 分布于第 1、4 号染色体，其余则密集分布于第 2、5 号染色体。依据已经发表的拟南芥基因组部分复制区域，我们发现在第 3 号染色体的 AtLC7 和第 5 号染色体的 AtLC8、AtLC9、AtLC10、AtLC11 和 AtLC12 之间发生了基因复制；

4. 拟南芥 16 个漆酶基因的数字 Northern 分析结果显示，多数基因在根和茎组织强烈表

达。AtLC2 和 AtLC17 在不同组织的表达模式基本相同，二者在茎组织显著表达，而且它们的序列非常相似。AtLC7 和 AtLC8 也具有相似的情况，二者在根部均强烈表达，而且其序列的同源性也很高，在分子进化关系图谱中同属于一个类群；

5. 以一个黑麦草作图群体的两个亲本 F#30 和 F#39 的基因组 DNA 为模板，利用 5 对黑麦草特异引物，进行漆酶基因克隆。最终得到 3 个黑麦草漆酶基因片段 *Lac10-1*、*Lac10-1*、*Lac11-2*。同源搜索发现，它们与已经克隆的植物漆酶具有较高的同源性，并且含有保守的铜离子结合位点 (HWH) 和 (HAH)；

6. 设计了 21 对用于玉米漆酶基因克隆的特异引物，并在此基础上利用 KWS 公司的 8 个玉米自交系材料，克隆了 168 个漆酶基因片段；以 M13 进行正、反向测序 (336 个反应)，共得到有效序列 81 个。对其中一组 cDNA 克隆的氨基酸序列进行分析，找到一个属于多铜氧化酶基因家族的 COG2132, SufI 保守域；

7. 将玉米漆酶基因 ZmP7 定位到 H21×Mo17 作图群体的第 4 号染色体短臂的 nc004 (Bin 4.03) 和 phi026 (Bin 4.05) 标记之间；

8. 利用 cDNA-AFLP 技术检测到水分胁迫条件下，差异表达条带近 500 条，回收 cDNA 带 380 条，最终得到有效序列 42 个；GeneBank 数据库中搜索发现：1 个 cDNA 没有相匹配的序列；2 个片段的同源序列为功能未知的蛋白；15 个 cDNA 的同源序列均为功能未知的玉米克隆；4 个 cDNA 的同源序列为功能未知的水稻克隆。在所剩余的 20 个功能已知的 cDNA 片段中，既有与干旱胁迫相关的重要功能蛋白（牻牛儿酰牻牛儿基还原酶、3-磷酸脱氢酶、线粒体转运蛋白、丙糖磷酸转运蛋白）、也有一些重要的转录因子（蛋白激酶 C、GTP 结合蛋白、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、锌指蛋白、MYB）等；

9. 在我们所克隆的一个玉米漆酶基因片段 ZmP7-AS30 的启动子区域有一个 MYBST1 转录因子的结合位点。同时，在土壤干旱胁迫条件下得到的 Sc106-P11 是与一个水稻昼夜摆动组成基因 OsCOC1 同源的序列，该基因参与调控水稻开花，也属于 MYB 转录因子。因此，我们推测，漆酶基因也可能与水分胁迫有关。

关键词： 玉米 漆酶 黑麦草 分子进化 基因克隆 cDNA-AFLP 水分胁迫 基因表达

Abstract

Maize is the second largest crop for food and feed in China. Forage quality and yield of maize are greatly affected by digestibility and drought stress. Conventional maize breeding has played an important role in improving forage quality and drought tolerance, but it is time-consuming and labor intensive. The rapid progress in molecular biology and genomics has provided an opportunity in accelerating forage improvement and dissecting mechanism of drought tolerance.

In the present study, the laccase genes in ryegrass and maize were cloned and compared, while the gene expression of four maize inbred lines under water stress were analyzed, based on gene homology sequence cloning, cDNA-AFLP and bioinformation techniques. This work may provide theoretical and practical guides for accelerating and facilitating breeding for good forage quality and drought tolerance in maize and thus contribute to the structural adjustment of agricultural production and sustainable agriculture in China. The main results are as follows:

1. A comprehensive phylogenetic analysis of 64 laccase genes from monocots, dicots and gymnosperm was conducted to identify putative orthologues and paralogues within the multiple-gene family. By multisequence alignments, a wide range of conserved domains and motifs were found in most members. Phylogenetic analysis indicated that plant laccase genes are a highly divergent multigene family. Duplication of laccase genes has been a continuous process occurring before and after the seed plants diverged into gymnosperms, monocots, and dicots.
2. Plant laccases from different plant species, and in some cases, even within the same species, had a relatively low level of sequence homology. Both extracellular and intracellular plant laccases were found. The range of pI values of plant laccase, substrate specificity, and numbers of N-glycosylation site varied greatly. Furthermore, plant laccase genes were confirmed to be of tissue-specific expression, inferring that this enzyme group is likely to carry out diverse functions in the plant.
3. A total of 27 and 17 laccase genes from two model plants, rice and *Arabidopsis*, respectively, were used to construct frame maps. Of the 27 laccase genes from rice, nine were located on chromosome 1 and 6 on chromosome 11, indicating that more than half of the members concentrated on two chromosomes. Laccase genes mapped on rice chromosome 1 were dispersed into three regions that spanned 21Mb estimated from GRLC26 to GRLC1. GRLC1 was located around region 1 (15371897-15374072 bp) whereas GRLC6 was located around region 2 (25214631- 25216628 bp). Region 3 ranged from GRLC5 to GRLC1 (1.3 Mb), which spanned between C126435 and C15960 according to the published data on chromosome 1. On chromosome 11, the laccase genes also were divided into three regions. Four of them were located at the distal region of short arm. Comparing with the published map of chromosome 11 based on a doubled haploid population, it was found that GRLC11, 12 and 15 were close to a gene cloned from rice, designated as a MYB transcription factor. Of the 17 *Arabidopsis* laccase genes, only AtLC1 and AtLC7 were dispersed on chromosomes 1 and 4,

respectively. As segmentally duplicated regions in the *Arabidopsis* genome have been reported previously, it was found in the present study that the duplicated segments between AtLC7 on chromosome 3 and AtLC8, 9 10, 11, 12 on chromosome 5.

4. Using the Affymetrix probesets, 16 *Arabidopsis* laccase genes (except AtLC9) in seven different tissues were compared by digital Northern analysis. Notably, most genes were strongly expressed in stem and root. Peculiarly, AtLC2 and AtLC17 exhibiting a similar expression pattern, which was strongly expressed in stem, were very similar in sequence. A similar case was the pair of AtLC7 and AtLC8, which was strongly expressed in root.

5. Three ryegrass laccases fragments were cloned using two parents derived from a ryegrass mapping population. Homology search results indicate that all of them were highly homology to the plant laccases that have been cloned and conserved

6. In total, 168 maize laccase fragments were cloned and sequenced. One putative domain was found from NCBI.

7. A laccase gene “Zmp7” was mapped on the fourth chromosome of maize, which was located between the nc004 (bin 4.03) and phi026 (bin 4.05) using H21×Mo17 mapping population.

8. By using cDNA-AFLP technique, the differential gene expression was compared in different periods under PEG stress and soil water stress. More than 380 cDNA bands were excised and finally, 42 available sequences were obtained Homology search of the 42 cDNA sequences suggested that 15 were highly homologous to maize clones whose function were unknown. For the homologous sequences, some were functional genes that are involved in stress response, while some are transcription factors, which play an important role in plant drought tolerance.

9. MYB transcription factor was found in both a maize laccase gene fragment and a transcription derived fragment induced by soil water stress. Hereby, we speculate that laccases could also be related to plant response to water stress.

Key words: Maize; Laccase; Ryegrass; Molecular evolution; Gene cloning; cDNA-AFLP;

Water stress; Gene expression

目 录

第一章 引言.....	1
1 木质素和植物漆酶的研究进展.....	1
1.1. 青贮、青饲作物的消化率.....	1
1.2. 木质素研究进展.....	2
1.3. 植物漆酶及漆酶基因的研究进展.....	6
2 植物抗旱性的研究进展.....	13
2.1 玉米抗旱性的形态学及生理生化机制研究进展.....	13
2.2 植物抗旱性的分子机制.....	16
2.3 抗旱玉米种质的鉴定与改良.....	18
3 基于基因差异表达的转录图谱研究进展.....	21
3.1 差异表达基因的直接分析.....	21
3.2 差异表达基因的间接分析.....	24
3.3 玉米基因表达谱的研究进展.....	25
4 生物信息学.....	27
4.1 生物信息学数据库.....	27
4.2 生物信息学在植物研究中的应用.....	28
5 分子系统发育的研究进展.....	30
5.1 系统发育树.....	30
5.2 系统发育树构建方法.....	30
5.3 系统发育分析软件包.....	31
5.4 系统进化树的构建.....	31
5.5 系统发育研究.....	32
6 研究目的与意义.....	33
第二章 基于生物信息学的植物漆酶的比较分析.....	34
1 材料与方法.....	34
1.1 漆酶氨基酸序列提取.....	34
1.2 序列比对和系统发育树的构建.....	34
1.3 信号肽和亚细胞位置预测.....	34
1.4 拟南芥漆酶基因的组织特异性表达.....	34
1.5 拟南芥与水稻漆酶基因在染色体上的位置.....	34
2 结果与分析.....	37
2.1 植物漆酶的结构特征.....	37
2.2 植物漆酶的系统发生关系.....	37
2.3 拟南芥与水稻漆酶基因在染色体上的位置.....	41

2.4 拟南芥漆酶基因功能注释及组织特异性表达.....	43
3 小结.....	45
第三章 多年生黑麦草漆酶基因的克隆与分析.....	46
1 材料与方法.....	46
1.1 实验材料.....	46
1.2 实验方法.....	46
1.2.1 基因组 DNA 提取.....	46
1.2.2 引物.....	47
1.2.3 基因组 PCR 扩增.....	48
1.2.4 PCR 产物的纯化和琼脂糖胶回收.....	48
1.2.5 PCR 产物的连接.....	49
1.2.6 PCR 连接产物的转化.....	50
1.2.7 菌液 PCR	50
1.2.8 质粒 DNA 的提取.....	51
1.2.9 测序 PCR 反应体系及反应程序.....	51
1.2.10 序列分析.....	53
2 结果与分析.....	53
2.1 基因组 DNA 的质量与浓度检测结果.....	53
2.2 退火温度优化.....	54
2.3 漆酶目的片段的扩增与纯化.....	55
2.4 黑麦草漆酶基因的克隆与序列分析.....	55
3 小结.....	58
第四章 玉米漆酶基因的克隆、定位及特征分析.....	60
1 材料与方法.....	60
1.1 材料.....	60
1.2 方法.....	60
1.2.1 DNA 提取.....	60
1.2.2 基因组 PCR 所用引物.....	61
1.2.3 基因组 PCR 反应及漆酶基因定位.....	62
1.2.4 PCR 产物的纯化和琼脂糖胶回收.....	63
1.2.5 PCR 产物的连接和转化.....	64
1.2.6 质粒 DNA 的提取及测序.....	64
1.2.7 序列分析与进化分析.....	64
1.2.8 漆酶基因的染色体定位.....	64
2 结果与分析.....	65
2.1 基因组 DNA 检测结果.....	65
2.2 退火温度优化.....	65

2.3 漆酶目的片段的扩增与纯化.....	66
2.4 质粒 DNA 的提取、纯化与酶切鉴定.....	66
2.5 玉米漆酶基因序列分析.....	68
2.6 植物漆酶基因同源比较及分子进化分析.....	68
2.7 玉米漆酶基因的染色体初步定位.....	77
3 小结.....	79
第五章 利用 cDNA-AFLP 技术研究玉米水分胁迫诱导基因的表达..	80
1 材料与方法.....	80
1.1 材料.....	80
1.2 方法.....	80
1.2.1 PEG 胁迫溶液的配制.....	80
1.2.2 总 RNA 的提取与检测.....	82
1.2.3 双链 cDNA 的合成.....	82
1.2.4 cDNA-AFLP 分析.....	84
1.2.5 电泳分离与银染.....	85
1.2.6 聚丙烯酰胺胶中差异片段的回收.....	85
1.2.7 PCR 产物的纯化.....	87
1.2.8 序列测定与分析.....	87
2 结果与分析.....	87
2.1 总 RNA 的浓度、纯度与质量鉴定.....	87
2.2 双链 cDNA 的合成.....	88
2.3 cDNA-AFLP 分析.....	88
3 小结.....	99
第六章 结 论.....	100
附录.....	102
参考文献.....	110
致谢.....	127
简历.....	128

第一章 引言

目前,玉米已经成为超过小麦的第二大粮饲兼用作物。随着传统农业向现代农业的过渡,饲料作物已经在种植业中占居第一位。玉米不仅是重要的粮食作物,而且成为饲料工业及生产化工的主要原料。饲料用玉米约占全国玉米总产量的 78%左右(盛良学等, 2002)。干旱是一种世界性的重大农业灾害,是制约我国玉米生产的主要因素,给玉米造成的损失大于其它非生物逆境的总和。面对 21 世纪中国十几亿人口的粮食安全的重大问题以及当前农业结构调整的严峻形势,如何提高玉米产量和品质已经成为一个十分重要的课题。

基因组学的出现与迅猛发展,标志着当今的生物学研究进入了一个新的纪元。利用生物技术手段,通过调控参与木质素生物合成基因的表达水平,来改变木质素的含量,从而达到改良饲用与青贮玉米品质的目标。同时,通过研究玉米在水分胁迫条件下相关基因表达的规律,将为抗旱分子育种提供重要的理论依据和物质基础。

1. 木质素和植物漆酶的研究进展

1.1 青贮、青饲作物的消化率

饲料作物是反刍动物的主要营养来源。虽然不同饲料作物单位干物质所含有的总能量相差不大,但是其饲用营养价值却存在很大差异,如叶用黑麦草为玉米籽粒营养值的 80%,而小麦秸秆仅为 33% (Barriere *et al.*, 2003)。这主要是由于其细胞壁含量的差异所导致。而细胞壁的消化率是影响饲料营养价值的限制因子 (Wilson and Mertens, 1995; Vogel and Jung, 2001)。反刍动物消化饲料的过程涉及动物解剖学、生理学、瘤胃微生物系统与饲料作物的形态、结构和化学成分的相互作用 (Fisher *et al.*, 1989)。反刍动物的瘤胃是厌氧发酵的场所,微生物在此环境中将细胞壁中复杂的多糖降解为可以被哺乳动物消化和吸收简单化合物。反刍动物维持自身能量需求和瘤胃容量能力限制了每天消化的饲料数量。因此,饲料消化率的微小改良将会显著地增加动物的能量摄取效率,从而使得动物日产奶量或产肉量呈现指数增长 (Vogel and Moore, 2001) (图 1-1)。

目前,素有“饲料之王”的美誉玉米,已经成为一种主要的饲料来源。其主要具有以下优点:

(1) 收获时具有很高的干物质产量和干物质含量,高于 200g/kg,因而发酵稳定;(2) 非结构性碳水化合物的含量高;(3) 与其它饲料相比,具有相对较高的纤维含量,较低的木质素含量;(4) 玉米在很长的收获时期内,营养价值保持稳定;(5) 玉米青贮饲料有相对较高的能量和良好的吸收率。我国的青贮、青饲玉米研究已经取得一些进展。在欧洲、北美等国家,人们很重视青饲青贮玉米的生产,青饲青贮玉米面积占很大比例,美国 1978 年到 1980 年,每年青饲玉米面积达 334 万 hm^2 ,较 20 世纪 60 年代增长了 70%,年产青饲料 1 亿多吨。Dijkstra and Becker (1964) 最早对青贮玉米的消化率进行了测定。Deinum 等 (1984) 也对青贮玉米的一些指标进行了测定,发现有机物质消化率 (Organic Matter Digestibility, OMD),平均为 72.8%;杂交种的中性洗涤纤维体内消化率变化范围为 47.5-57.1%,平均为 52.7%。研究发现,褐色叶中脉玉米是一类非常重要的用于青贮、青饲玉米研究的材料。这些突变体的木质素含量较低,在遗传上能改变纤维素成分,提高青贮饲料玉米营养价值,在用作青贮饲料方面具有较大的潜力。1924 年, Jorgenson 在

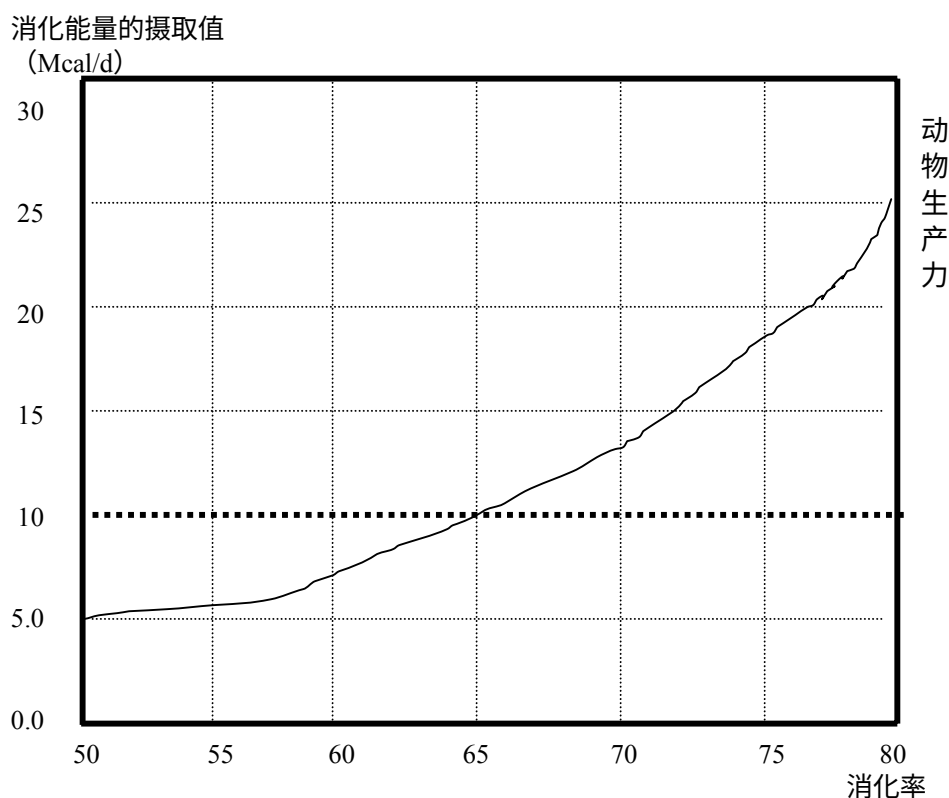


图 1-1 动物生产力与饲料消化率的关系。(引自 Vogel and Moore, 2001)

Fig 1-1 Animal productivity increase exponentially with improvements in forage digestibility.(From Vogel and Moore, 2001).

一个西北马齿型玉米自交系中, 发现了第一个褐色叶脉玉米 bm1 突变体。随后 bm2、bm3 以及 bm4 突变体相继被发现 (Burnham and Brink, 1932; Emerson, 1935; Burnham, 1947)。后来, Barnes 等 (1971) 最先证实了这些突变体的饲用价值。

提高饲料作物干物质的消化率, 特别是衰老期的消化率, 将极大地降低由于季节变化而引起的饲草品质变化。因此, 利用生物技术手段, 通过调控参与木质素生物合成基因的表达水平, 使富含木质素的胞间层更易于消化, 使富含纤维素的次级细胞壁更易于进入, 从而实现提高饲料作物品质的目标。探索木质素生物合成机制, 将为利用遗传工程改良饲料作物消化率的提供依据。

1.2 木质素研究进展

截至目前, 开展木质素生物合成途径的研究已经有一个世纪之多, 但是在过去的 10 年中经历了多次修正 (Boerjan *et al.*, 2003)。20 世纪 90 年代以后, 利用分子生物学技术研究木质素的生物合成是木质素研究最为活跃的领域, 尤其是如何调控细胞壁中木质素的含量和组成以及在木质素生物合成途径中一些关键酶的作用成为研究者极为关注的焦点 (Whetten and Sederoff, 1995; Baucher *et al.*, 1998; Boudet, 2000; Boerjan *et al.*, 2003)。近些年来, 大量的研究证实漆酶及其漆酶类氧化酶的活性与细胞壁的木质化有关 (Bao *et al.*, 1993; Davin *et al.*, 1992; Driouich *et al.*, 1992; Katayama *et al.*, 1992; Savidge and Udagama-Randenlya, 1992; Sterjiades *et al.*, 1992)。来源于苯丙氨酸的木质素前体—肉桂醇, 经过聚合成为一个复杂的酚类聚合体, 在细胞壁, 尤其是维管束组织形成基质 (Dean and Eriksson, 1992; Lewis and Yamamoto, 1990)。研究表明, 木

材中也有大量的木质素存在,给造纸工业带来了极大的麻烦,通常利用化学方法才能除去。因此,木质素的化学特性和降解也具有很大的商业意义。

到目前为止发现,木质素主要具有以下功能:细胞壁结构的完整性、防御病原菌入侵、茎组织硬度与强度、促使水分和溶质的转运等。

1.2.1 木质素的分布与组成

大量的研究证实在维管类植物(蕨类植物、被子植物和裸子植物)中均有木质素存在。根据木质素单体甲基化位置及程度的不同分为香豆醇(coumaryl alcohol)、松柏醇(coniferyl alcohol)和芥子醇(sinapyl alcohol)。微量自动放射术和紫外微量光谱测定法表明,不同木质素单体也分为三种类型:由紫丁香基丙烷结构单体聚合而成的紫丁香基木质素(Syringyllignin, S-木质素)、由愈创木基丙烷结构单体聚合而成的愈创木基木质素(Guaiacyllignin, G-木质素)和由对-羟基苯基丙烷结构单体聚合而成的对羟基苯基木质素(Hydroxy-phenyllignin, H-木质素)。裸子植物主要为愈创木基木质素(G);双子叶植物主要含愈创木基-紫丁香基木质素(G-S);单子叶植物则为愈创木基-紫丁香基-对-羟基苯基木质素(G-S-H)。从表 1-1 可以看出,木质素在不同物种中所占比例各不相同。对树木而言,木质素占木材干重的 15-36% (Baucher *et al.*, 2003)。多酚类物质也具有与木质素相似的功能。植物在发育和特殊条件下,特有的苯丙醇类代谢物在特殊的组织和细胞差异积累。

1.2.2 木质素生物合成途径

通常,木质素生物合成途径主要由三部分组成:莽草酸途径、苯丙氨酸途径和木质素专有途径(图 1-2)。即首先通过莽草酸途径形成苯丙氨酸,然后在苯丙氨酸解氨酶(PAL)的作用下形成反式肉桂酸,经过一系列反应形成木质素单体,最后木质素单体经过聚合形成木质素。到目前为止,木质素生物合成的不同步骤都已经很清楚,但是每个反应的先后次序的还尚无精确的定论。而且,尽管参与整个反应的大多数酶,在不同的发育阶段和环境条件下为差异表达 (Hu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000),其调控和准确的细胞位置尚不清楚 (Boudet *et al.*, 1995; Whetten and Sederoff, 1995; Douglas, 1996)。

依据木质素的成分分析、酶实验和转基因植物研究,黑色区域是被子植物木质素单体合成的最佳路线。灰色路线的发生则依赖于物种和相应的条件。从肉桂酸到芥子酸,再到5-羟基阿魏酰辅酶A和芥子酰辅酶A(白色部分)的路线,在木质素生物中起的作用不大(图1-2)。在木质素单体聚合而形成木质素的过程中,起决定作用的主要是两类不同类型的酶—过氧化物酶和漆酶。这两类酶已经被证实在松柏醇和 H_2O_2 或 O_2 存在的条件时,体外可以各自形成木质素 (Takahama, 1995)。但是,关于木质素合成的最后一步是否为过氧化物酶、漆酶、另一个多酚类氧化酶或者这些酶结合在一起共同调控木质素的合成,尚不清楚 (Dean and Eriksson, 1994; McDougall *et al.*, 1994)。通过遗传工程改变这些酶的表达方式,可能会解释它们在木质化过程中所起的作用。

Freudenberg 等(1958)发现真菌漆酶在体外催化木质素单体形成的二聚体与利用化学方法降解木质素所得到的产物相似,因此他们提出了漆酶可能参与高等植物木质素合成的假说。然而在随后的几十年中,由于始终没有在植物组织中发现漆酶,而使得该理论一度被抛弃。Nakamura (1967) 从日本漆树中分离到了漆酶,并证实漆酶不能氧化木质素单体。Harkin 和 Obst(1973)利

表 1-1 高等植物木质素的组成.

Table 1-1. Composition of lignin in various higher plants.

物 种 (Plant species)	H (%)	G (%)	S (%)
蕨子植物 (Pteridophyta)			
<i>Psilotum triquetrum</i> ^a	7	91	2
<i>Lycopodium clavatum</i> ^a	4	94	2
<i>Selaginella martensii</i> ^a	22	34	43
<i>Equisetum sylvaticum</i> ^a	15	75	10
<i>Dryopteris filix-mas</i> ^a	1	98	1
<i>Pteridium aquilinum</i> ^a	11	88	1
裸子植物属 (Gymnospermae)			
<i>Cycas revoluta</i> ^a	2	98	
<i>Ginkgo biloba</i> ^a	6	93	1
<i>Picea abies</i> ^b	2	98	tr
<i>Metasequoia glyptostroboides</i> ^a	5	94	1
<i>Juniperus communis</i> ^a	3	96	1
<i>Araucaria araucana</i> ^a	3	96	1
<i>Taxus baccata</i> ^a	4	95	1
<i>Pinus sylvestris</i> ^c	2	98	tr
<i>Pinus pinaster</i> ^b	2	98	tr
<i>Pinus pinaster</i> (compression wood) ^b	18	82	tr
<i>Ephedra equisetina</i> ^a	3	66	31
<i>Gnetum gnemon</i> ^a	-	49	51
<i>Podocarpus macrophyllus</i> ^a	9	88	4
双子叶植物属 (Dicotyledonae)			
<i>Medicago sativa</i> ^c	-	64	36
<i>Acer platanoides</i> ^a	-	42	58
<i>Fagus sylvatica</i> ^a	-	35	65
<i>Populus euramericana</i> ^b	-	39	61
<i>Populus trichocarpa</i> ^b	-	41	59
<i>Populus tremula</i> × <i>P. alba</i> ^d	-	32	68
<i>Populus tremula</i> × <i>P. alba</i> ^e	-	37	63
<i>Nothofagus dombey</i> ^b	-	14	86
<i>Laurelia philippiana</i> ^a	-	66	44
<i>Robinia pseudoacacia</i> ^c	-	37	63
<i>Betula verucosa</i> ^b	-	24	76
<i>Quercus robur</i> ^b	-	32	68
单子叶植物属 (Monocotyledonae)			
<i>Lilium cistatissium</i> ^a	-	80	20
<i>Juncus effusus</i> ^a	11	54	35
<i>Zea mays</i> ^b	4	35	61
<i>Oryza sativa</i> ^b	15	45	40
<i>Secalotriticum</i> ^b	3	42	55
<i>Secale cereale</i> ^b	2	44	54

Note: ^{a b c d e} indicates Data published by Gross (1980), Lapierre (1993), Monties (1994), Van Doorsselaere *et al.* (1995a), Baucher *et al.* (1996), respectively. -, not detected.

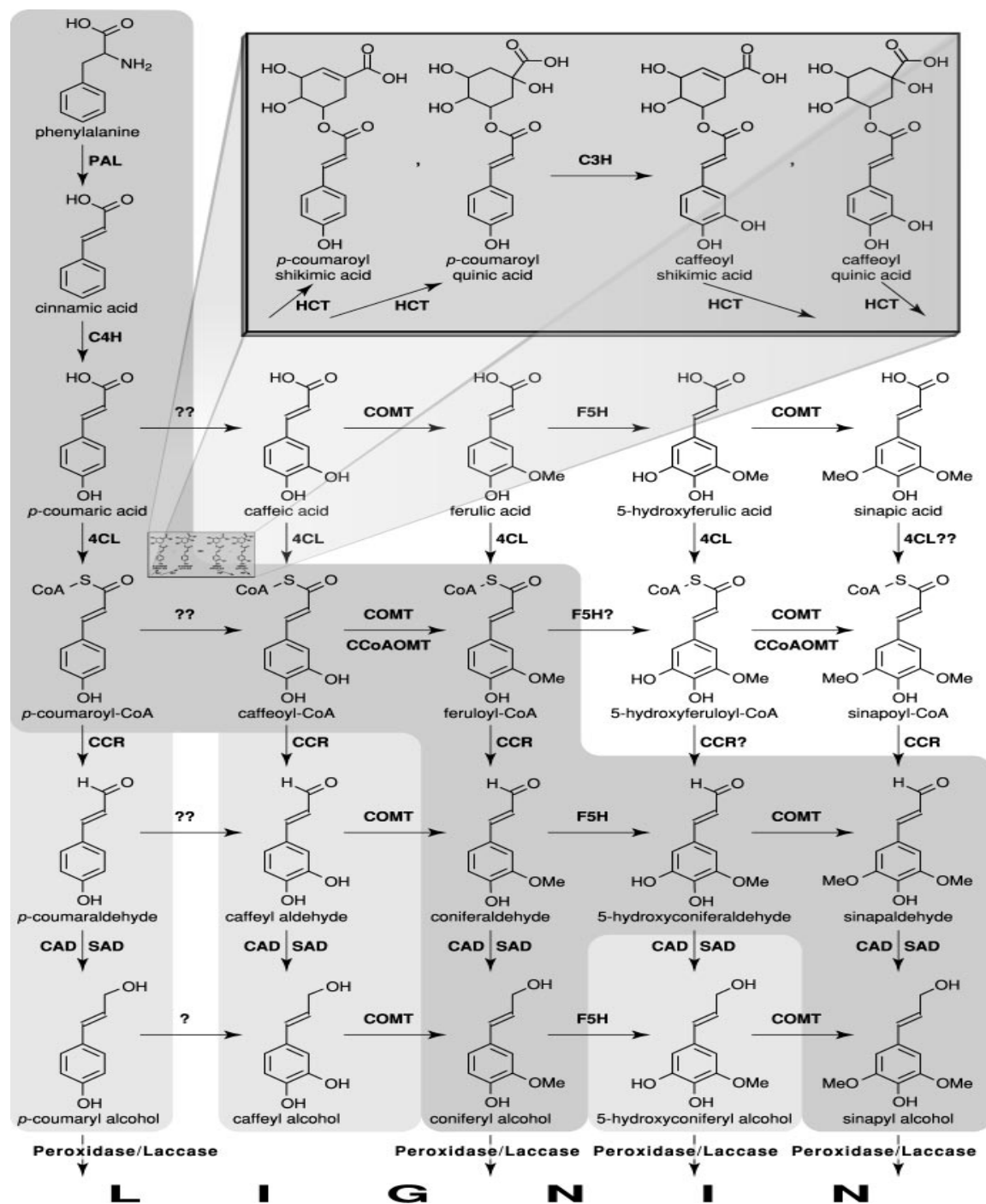


图1-2 苯丙氨酸和木质素单体生物合成途径 (引自 Boerjan *et al.*, 2003) .

CAD-桂醇脱氢酶; 4CL-4-香豆素辅酶A; C3H-对香豆素-3羟基化酶; C4H-肉桂酸-4羟基化酶; CCoAOMT-咖啡酰辅酶A邻转甲基化酶; CCR-肉桂辅酶A还原酶; COMT-咖啡酸邻甲基化转移酶; HCT-对羟基肉桂酰辅酶A转移酶; F5H-阿魏酰-5-氢化酶; PAL-苯丙氨酸裂解酶; SAD-芥子醇脱氢酶; ?-已证明的转化; ??-尚未有令人信服证据的直接转化; 4CL??-一些物种具有4CL活性; CCR?和F5H-底物未被检验;

Fig. 1-2 Phenylpropanoid and monolignol biosynthetic pathways (from Boerjan *et al.*, 2003).

CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; 4CL, 4-coumarate: CoA ligase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase; CCR, cinnamoyl-CoA reductase; COMT, caffeic acid *O*-methyltransferase; HCT, *p*-hydroxycinnamoyl-CoA: quinate shikimate *p*-hydroxycinnamoyltransferase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; SAD, sinapyl alcohol dehydrogenase. ?, conversion demonstrated; ??, direct conversion not convincingly demonstrated; 4CL??, some species have 4CL activity ; CCR? And F5H?, substrate not tested.

用组织化学的方法研究发现, 在一些裸子植物和被子植物的木质化区仅仅检测到了过氧化物酶活性, 却没有发现漆酶活性。据此, 很多研究者推断只有过氧化物酶参与木质素单体的聚合过程。其后, 过氧化物酶成为了木质素生物合成途径研究得热点。

直至 Sterjiades 等(1992)从槭树(*Acer pseudolantanus*)中分离到漆酶, 并证明其在完全缺少过氧化物酶的条件下, 可以聚合木质素单体, 漆酶参与木质素合成的可能性才再次被提出。Bao 等(1993)研究发现漆酶存在于木质部, 与细胞壁有关, 能够氧化木质素单体。一些学者认为, 漆酶是在一些辅助蛋白 (dirigent protein) 的协助下参与木质素的合成 (Davin *et al.*, 1997)。Galliano 等(1991)研究发现, 漆酶单独存在时不能降解木质素, 而漆酶和锰依赖过氧化物酶 (MnP) 同时存在的条件下, 木质素降解活性明显增强。因此, 该小组认为漆酶同时具有催化解聚和聚合木质素的作用, 只有在诸如 MnP 等酶存在, 以防止反应产物重新聚合时, 漆酶的降解作用才得以发挥。

木质素主要在细胞壁积累, 参与机械硬度或水传导。木质素在植物防御反应中也起重要作用。木质素构成了一道物理化学的屏障以防御病原菌的侵袭, 而且在受到环境胁迫, 诸如创伤、病原菌感染后, 木质素可以重新合成 (Vance *et al.*, 1980; Lewis and Yamamoto, 1990)。对木质素生物合成的理解是一个连续的、不断变化的过程。将经典的生物化学途径与以转基因植物为研究材料研究体内代谢途径以及改良木材与植物纤维的品质相结合, 大大地促进了该领域地研究。在转录组和代谢组水平上鉴定植物细胞壁的发育过程以及比较野生型和转基因植物在细胞壁生物合成过程中的变化, 则是一个新的途径。

1.3 植物漆酶及漆酶基因的研究进展

漆酶 (EC 1.10.3.2) 最早是由 Yoshida (1883) 在日本的一种植物—漆树中发现的, 属于多铜氧化酶蛋白家族。随后, 漆酶又在其它的植物, 如枫树, 松树中相继被分离和纯化 (Driouich *et al.*, 1992; Bao *et al.*, 1993; LaFayette *et al.*, 1995)。研究发现, 在真菌、植物、细菌以及昆虫中均有漆酶存在。从漆酶蛋白质晶体结构可知, 漆酶具有可结合 4 个铜离子 (Cu1、Cu2、Cu3a 和 Cu3b) 的 3 个催化位点 (T1、T2、T3), 并且该区域是高度保守的。这 4 个铜离子的电子顺磁共振 (Electric Paramagnetic Resonance, EPR) 信号存在差异。Cu3a 和 Cu3b 通常偶联在一起, 结合于 T3 位点, 其 EPR 信号为阴离子所激活。而 Cu1 和 Cu2 具有强烈的电子吸收值, 很容易检测到 EPR 信号。Cu1 是漆酶呈现蓝色的原因。这 4 个铜离子在催化位点处, 共与 8 个组氨酸形成扭曲四面体几何构型。因此, 在此保守区域最多可以有 8 个 His-X-His 基元 (motif) (Valderrama, *et al.*, 2003)。除了结合铜离子外, 还可以结合底物、水合电子和分子氧。诸多的研究表明, 漆酶具有下列生物学功能: (1) 参与木质素的生物合成; (2) 降解木质素; (3) 愈伤防御反应; (4) 参与色素合成等。另外, 由于漆酶具有底物广泛、催化活性高等特性, 因而在有机合成、生物传感器及工业上也有广泛的应用。

1.3.1 漆酶的发生与特征

越来越多的研究表明, 大多数真菌中都有漆酶存在 (Thurston, 1994; Solomon *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2002; Colao *et al.*, 2003; Suresh *et al.*, 2003)。

相对于真菌漆酶而言,有关植物漆酶的研究和报道相对较少,尤其是单子叶植物漆酶的报道更少。

1.3.1.1 来源

1.3.1.1.1 真菌漆酶

目前,在担子菌(*Basidiomycetes*)、子囊菌(*Ascomycetes*)、半知菌(*Deuteromycetes*)、曲霉菌(*Aspergillus*)等真菌中均发现了漆酶(Gianfreda *et al.*, 1999)。组成型和诱导型漆酶在许多真菌中都被报道(Mayer and Staples, 2002)。真菌漆酶一方面通过真菌的菌丝体分泌到介质中,另一方面通过木腐菌和植物病原菌参与木质素的降解(Leonowicz *et al.*, 2001)。一个真菌基因组可以表达多个因底物、pH 或氧化还原电位等存在差异的漆酶同工型(Wahleithner *et al.*, 1996; Xu, 1996; Yaver and Golightly, 1996)。漆酶通常来源于细胞质,属于细胞外糖蛋白。Driouich 等(1992)利用免疫定位技术研究枫树漆酶时发现,只在木质化的细胞壁以及表皮细胞中可以找到该蛋白。尽管所有真菌漆酶中均存在高度保守的铜离子催化位点,但是在此保守区域以外的部分却存在很大的差异。

1.3.1.1.2 植物漆酶

相对于真菌漆酶而言,有关植物漆酶的研究和报道相对较少,尤其是单子叶植物漆酶的报道更少。Sato等(2001)从松树中克隆到了8个漆酶的cDNA,它们均在分生木质部组织表达。黑麦草的3个全长漆酶cDNA也已经被克隆,而且发现它们在茎和木质部差异表达(Gavnholt *et al.*, 2002)。最近,中国科学院上海植物生理生态研究所陈晓亚实验室也从棉花中克隆了一个编码566个氨基酸的漆酶cDNA-GaLAC1。研究发现, GaLAC1与烟草漆酶(Kiefer-Meyer *et al.*, 1996)具有45%的同一性,具有含23个氨基酸残基的N末端信号肽,在根部特异表达(Wang *et al.*, 2004)。Ranocha(1999)从生物化学和分子生物学两个方面,从杨树中分离到了5个茎部特异表达的漆酶cDNA。系统发育分析表明,5个漆酶尽管都含有保守的区域,但是它们却分别位于不同的类群中,揭示了漆酶是一个高度趋异的多基因家族。截至目前,所有报道的漆酶都是糖蛋白(Mayer and Staples, 2002)。

模式植物拟南芥和水稻基因组测序工作的相继完成,为其它植物相关基因的结构和功能研究提供了坚实的基础。在拟南芥数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)搜索,共得到17个漆酶基因。其中,1个位于第1号染色体、1个位于第3号染色体、5个位于第2号染色体、其余10个均位于第5号染色体。在GRAMENE 数据库(<http://www.gramene.org/>)中搜索,去除冗余序列后共得到27个与水稻漆酶相关的基因,其中9个位于1号染色体上,6个位于11号染色体上,其余12个分散于其它7条染色体上(第4、6、8号染色体上没有该基因)。在GeneBank 中找到与玉米相关的漆酶基因片段36个,但是均为部分序列。据文献报道在黑麦草已经发现至少25个漆酶基因,但只有3个为全长序列(Gavnholt *et al.*, 2002)。由此可见,植物漆酶在被子植物和裸子植物中可能都存在一个复杂的家族。

另外关于细菌漆酶(Givaudan *et al.*, 1993; Claus and Filip, 1997; Alexandre and Zhulin, 2000; Diamantidis *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2002)和昆虫漆酶(Thomas *et al.*, 1989; Hopkins and Kramer, 1992; Sugumaran *et al.*, 1992; Kramer *et al.*, 2001)也已经有相关的报道。细菌漆酶参与孢子形成(Donovan *et al.*, 1987),而昆虫漆酶则具有使表皮硬化的功能(Sugumaran *et al.*, 1992)。

1.3.1.2 漆酶的分子与生化特性

漆酶是一种糖蛋白,肽链一般由500 个左右氨基酸组成,糖配基占整个分子的10%- 45%。主要的氨基酸有Asp、Thr、Glu、Ser、Pro、Gly、Ala、Val、Cys、Met、His、Phe、Leu 等。糖组成包括氨基己糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、岩藻糖和阿拉伯糖等。由于分子中糖基差异,漆酶的分子量存在很大差异,甚至来源相同的漆酶分子量也会不同(Yaropolov *et al.*, 1994)。

漆酶可以催化多种氧化反应,而且催化底物非常广泛。通常,任何与 p -二元酚具有相似结构特征的底物都可以被漆酶所氧化。Xu 等(1998) 研究发现,定点突变获得的一个漆酶突变体的催化活性和抑制作用均发生了明显的变化。因此,漆酶的特性随其氨基酸序列或碳水化合物的改变而变化。利用基因敲除技术(Gene Knock-out),经常可以发现一些新的漆酶(Kim *et al.*, 1995)。

糖基化位点数目是区分漆酶和抗坏血酸氧化酶的一个重要指标。植物漆酶通常具有多个糖基化位点(9-20个),而后者则很少(Esaka *et al.*, 1990; Ohkawa *et al.*, 1989)。目前,关于等电点(Isoelectric points, pI) 的报道,说法不一。LaFayette 等(1999) 克隆了4个黄杨漆酶的cDNA, 其pI 值在9.3-9.5之间。而Gavnholt 等(2002)克隆的2个黑麦草漆酶(Lac2-1、Lac5-4)的pI值却很低(分别为5.8和5.0)。

鉴于漆酶在分子量、pH值、底物专一性、糖配基的含量与组成以及等电点等方面差异很大,使得漆酶的分离与纯化程序变化不一(Fukushima and Kirk, 1995; Palmieri *et al.*, 1997; Xu, 1997)。同时,也揭示了漆酶是一个复杂的基因家族。

1.3.2 漆酶活性位点结构及反应机理

1.3.2.1 漆酶结构特征

漆酶属于蓝铜蛋白家族,含有几个保守的区域。通常是以单体的形式存在,被认为是最简单的蓝铜氧化酶。每个单体含有4个铜离子(Cu1、Cu2、Cu3a 和Cu3b),结合在3个氧化还原位点(T1、T2、T3)。这4个铜离子的电子顺磁共振(Electric Paramagnetic Resonance, EPR)信号存在差异(Valderrama *et al.*, 2003)。Cu3a 和Cu3b 通常偶联在一起,结合于T3位点,其EPR信号为阴离子所激活。而Cu1 和Cu2 具有强烈的电子吸收值,很容易检测到EPR信号。Cu1是漆酶呈现蓝色的原因。这4个铜离子在催化位点处,共与8个组氨酸形成扭曲四面体几何构型。光谱学的发展为深入研究铜蛋白的分子机制提供了强有力的技术支持(Randall *et al.*, 2001)。利用光谱学分析,可以获得漆酶蛋白的几何学和电子特征。关于枯草芽孢杆菌和灰色嗜粪菌漆酶蛋白的晶体结构都已有报道(Ducros *et al.*, 1998; 2001; Enguita *et al.* 2003),为进一步研究漆酶的结构特征提供了依据。从图1-3可以看出,His396、Cys452和His457 作为铜配体在T1中心起重要作用。

另外,轴配体位置处非连接的Leu462 也是T1中心的重要基元。据推测,轴位置处的配基强烈影响酶的还原能力(Xu *et al.*, 1999)。通常,大多数真菌漆酶在Cys下游保守的10个残基处均含有Leu 或Phe。相反,其它的一些非漆酶氧化酶在此位置多数为 Met,而且其还原能力明显降低。Xu 等(1998; 1999) 在研究 *Trametes villosa* 漆酶的一个突变体时,发现当Phe 变成 Met后,该酶的氧化还原能力明显降低。大量的研究表明,在T1铜中心,有一个含有21个残基的信号序列(G-X-[FYW]-X-[LIVMFYW]-X-[CST]-X8-G-[LM]-X3-[LI VMVYW])。T1中心的功能是长距离的分子内电子转移,按半胱氨酸-组氨酸途径,从T1中心到三核中心(图1-3b)。三核簇的氨基酸

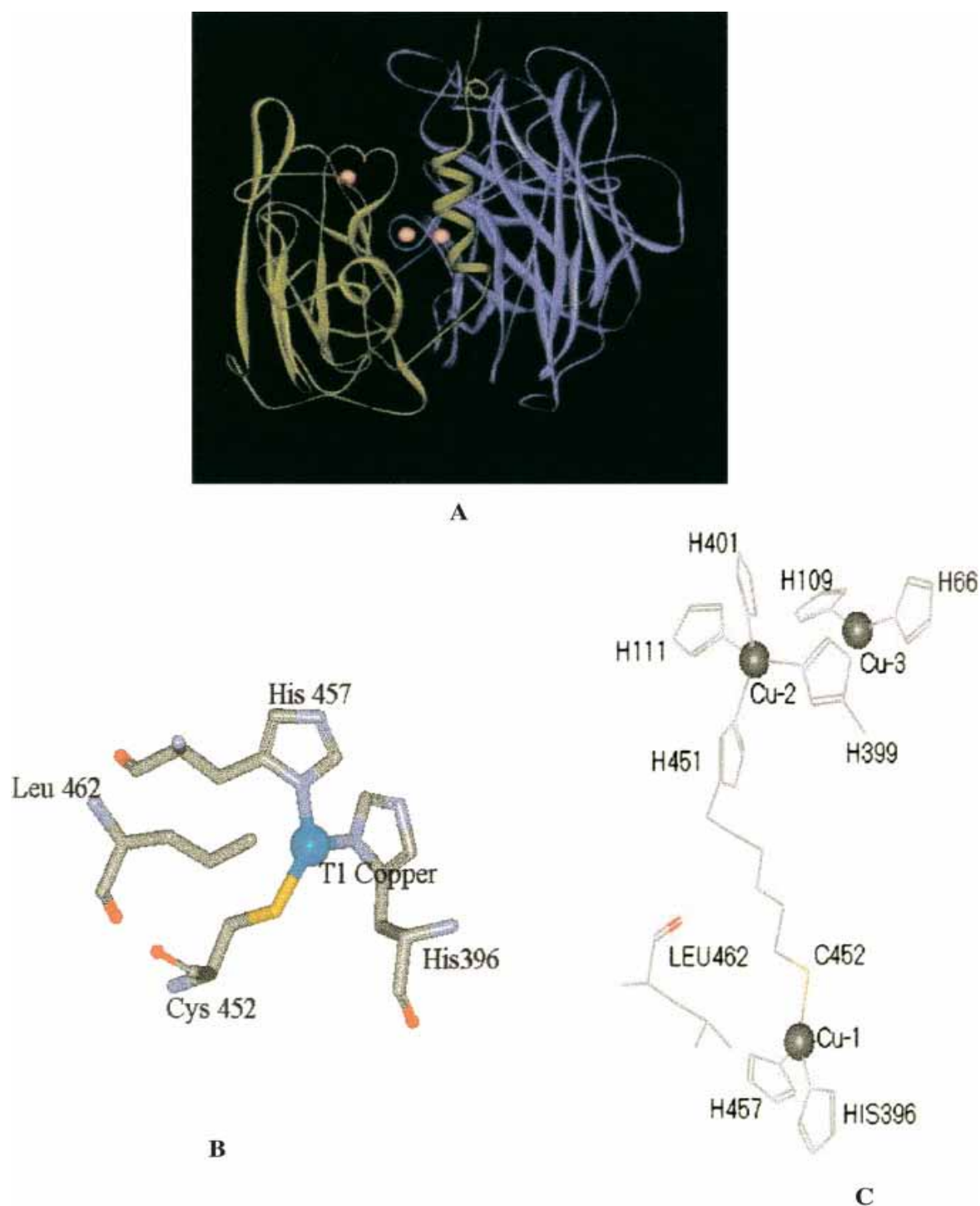


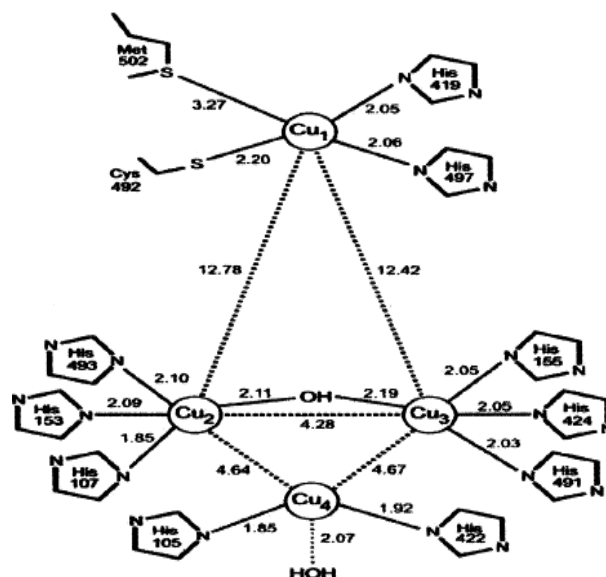
图 1-3 灰色嗜粪菌 T1 铜离子和三核铜离子中心的配体结构。(引自 Suresh Kumar *et al.*, 2003). A: 灰色嗜粪菌的三维结构; B 和 C: T1、T2 和 T3 铜中心毗邻的氨基酸配体。

Fig. 1-3. View of the ligands at T1 copper and trinuclear copper centers in *C. cinereus* laccase. (from Suresh Kumar *et al.*, 2003).

A: Three-dimensional structure of *C. cinereus* laccase showing all the copper ions at T1 and T3 copper centers. **B and C:** Amino acid ligands in the vicinity of the T1 copper center and the trinuclear copper center with T2 and T3 copper.

图 1-5. 枯草芽胞杆菌漆酶蛋白的铜活性中心 (Claus, 2004) .

Fig.1-5. Copper centers of the laccase (CotA) from *B. subtilis*. (from Claus, 2004).



配体由8个组氨酸组成,形成4个高度保守的HXH 基元 (motifs)。其中,一个motif 中的X是结合于T1铜离子的半胱氨酸。Suresh Kumar等 (2003) 对64个真菌漆酶和40植物漆酶的进行了多序列比对分析,结果在真菌和漆酶中均发现了高度保守的区域 (图1-4)。在真菌中共发现了4个无间隔的保守区域 (L1-L4)。值得注意的是,植物和真菌漆酶在靠近C-末端的L4区域含有21个保守的氨基酸序列,这与多铜氧化酶的T1中心的信号序列相吻合。结合漆酶蛋白的晶体结构可知,T1中心的3个铜连接残基与T3中心的2个铜连接残基均位于L4区域内。真菌漆酶的轴配体位置的保守氨基酸是Phe,而植物漆酶则是 Leu。21个残基的L2区域只为真菌漆酶所拥有,而L4区域,真菌和植物漆酶均存在。L1和L3与L2和L4之间蛋白质内序列同源性表明了基因复制事件的发生。

从图1-5 枯草芽胞杆菌漆酶蛋白的晶体结构可以看到,在T2和T3中心共有8个组氨酸分别与铜原子共价结合。T2 和T3 所形成的三核簇是分子氧还原和水分子释放的场所。两个T3类型 (Cu2和Cu3) 的铜原子通过羟基桥而紧密地结合在一起 (Claus, 2004)。

1.3.2.2 漆酶的催化机理

漆酶的催化底物十分广泛,按底物的结构可以分为六类: (1) 酚及其衍生物:主要是多元酚及其衍生物,约占漆酶底物的50%; (2) 芳胺及其衍生物:主要是多氨基苯及其衍生物; (3) 羧酸及其衍生物; (4) 甾体激素和生物色素; (5) 金属有机化合物; (6) 其它非酚类底物。

漆酶的催化氧化主要由底物自由基的生成和催化位点处4个铜离子的协同作用。即T1 活性位点的铜离子从还原态的底物吸收电子,底物被氧化形成自由基,进而导致各式各样的非酶促次级反应如羟化、歧化和聚合等。同时T1 活性位点的铜离子吸收的电子传递到三核中心的铜离子,分子氧在那里被还原成水。还原氧分子到水是经过了两步双电子反应,第一步形成超氧化物过渡体,第二步再生成水 (Zoppellaro *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002)。

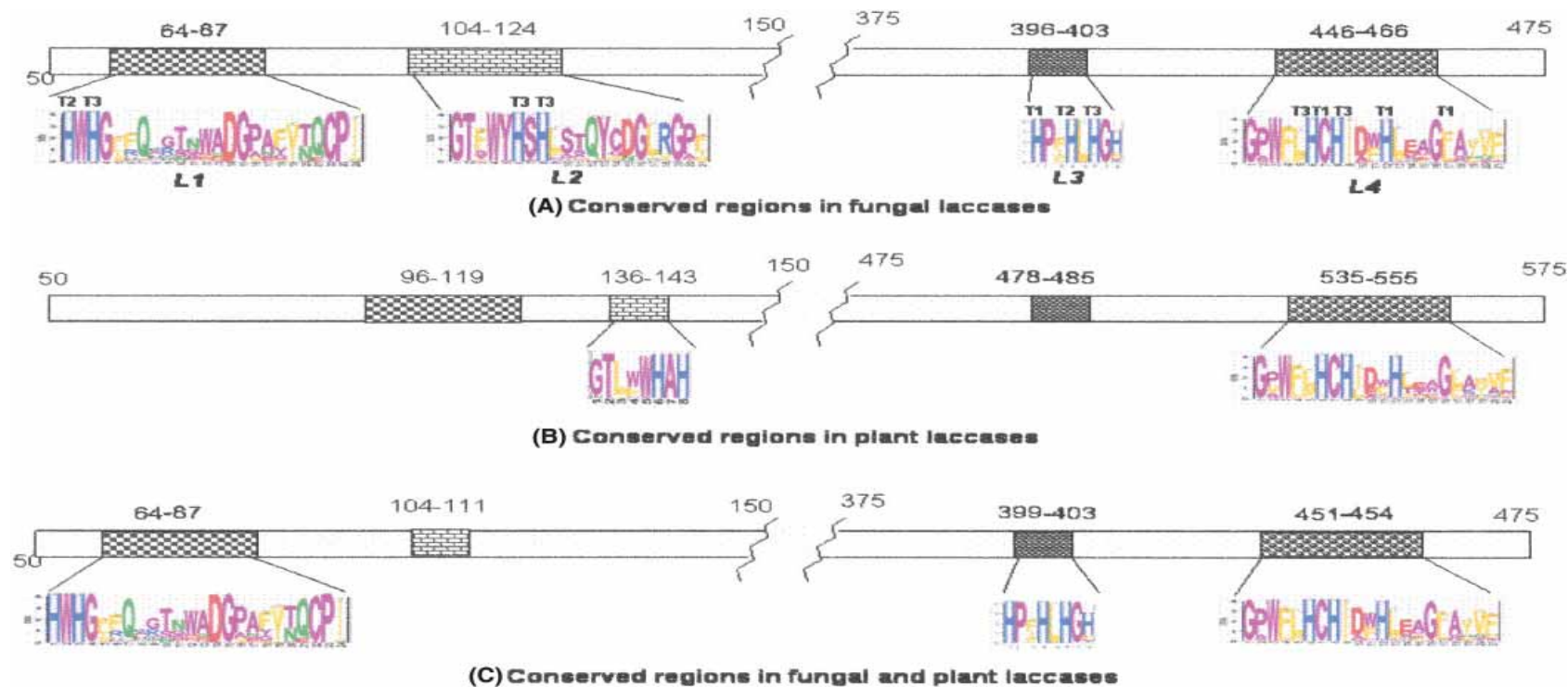


图1-4 漆酶多序列比对结果. 80%的多序列比对结果为相同序列：(A) 64个真菌漆酶序列；(B) 40个植物漆酶序列；(C) 真菌和植物漆酶的一致序列. 保守序列多于7个残基时用阴影标出. 图A和图C中开始的残基数目来源于*C. cinerius*漆酶，而图B的开始残基数则来源于*P. taeda* 漆酶。对选定的区域进行了序列标识，L1-L4代表在非缺口区域的特定位置每个氨基酸出现的频率。字母高度代表该位置的信息量。（引自Suresh Kumar *et al.*, 2003）。

Figure 3. Overview of the multiple sequence alignment for laccases. Eighty percent consensus sequence obtained after multiple sequence alignment of (A) 64 fungal laccase sequences; (B) 40 plant laccase sequences; (C) consensus sequence from (A) and (B). The conserved regions are shaded if the length of the sub-sequence is greater than 7 residues. The starting residue number for a given region is shown with reference to *C. cinerius* laccase in (A) and (C) and with reference *P. taeda* laccase in (B). Sequence logos (Schneider *et al.*, 1990b) are shown for selected regions, L1-L4, which represent the frequency of occurrence of each amino acid at a particular position in the ungapped region of the aligned protein sequences. Height of a letter in the logo represents the information content at that location. (from Suresh Kumar *et al.*, 2003)

1.3.3 漆酶的功能

大量的研究表明,植物漆酶主要参与细胞壁形成、木质素生物合成以及愈伤防御反应等(O'Malley *et al.*, 1993; Thurston, 1994; Boerjan *et al.*, 2003; Baucher *et al.*, 2003);而真菌漆酶则主要参与木质素降解(Eggert *et al.*, 1997; Heinzkill *et al.*, 1998)、色素合成(Clutterbuck, 1990)以及植物发病机制(Choi *et al.*, 1992)等。

1.3.3.1 漆酶的负调控

虽然漆酶在木质化过程中的作用还不十分清楚,但是漆酶和氧分子参与木质素单体的聚合已经有相关的证据。比如,当过氧化物酶活性被抑制时,烟草木质部的松柏醇仍然能够被氧化(McDougall *et al.*, 1994)。由于漆酶可以控制毒性 H_2O_2 的缺失,因此可能在木质化的早期起作用(Sterjiades *et al.*, 1993)。

利用功能获得或缺失的遗传学方法来研究木质素合成途径中酶的功能已经取得了一定进展。Ranocha 等(2002)利用反义RNA技术不同程度地抑制黄杨(*Populus trichocarpa*)中三个漆酶基因*lac3*、*lac90*和*lac110*的表达:其中*lac3AS*反义植株几乎检测不到内源*lac3*表达,导致转反义植株可溶性酚类含量较野生型显著提高。

目前大量的转基因植物和一些突变体在木质素含量、组成、结构等方面均发生了改变。但是这些改变对于它们在工业上的应用是否有利,还有待于进一步研究证实。

1.3.3.2 漆酶与病原菌毒力及其防御功能

诸多的研究表明,漆酶是一种重要的抵御病害的毒力因子。同时,漆酶还可以保护真菌病原菌免受寄主植保素和鞣质等化合物的影响。例如,根病原菌*Heterobasidion annosum*的侵染性和漆酶的存在紧密相关(Johansson *et al.*, 1999)。Bar-Nun等(1988)提出*B. cinerea*分泌的漆酶作为一种解毒酶,具有保护真菌免受有毒代谢物的伤害和降低寄主木质化活性的功能。

有时漆酶的表达受真菌病毒调控(既有正调控也有负调控),影响真菌病原菌。Nuss(1996)在系统研究板栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)的致病机理过程中发现,病毒双链RNA(HAV ds-RNA)侵染板栗疫病菌会造成真菌的致病力下降,低毒力菌株同时有抑制孢子产生、色素积累改变、纤维素酶活性下降等表型。Rigling等(1989)率先研究了病毒对漆酶活性的影响,随后又对LAC1基因的表达进行了详尽的描述(Rigling and Van Alfen, 1991; Rigling, 1995)。*C. parasitica*产生2个细胞外漆酶LAC1和LAC3,1个细胞内漆酶LAC2,病毒使得这些酶的活性降低(Kim *et al.*, 1995)。随后对由此产生的低毒力菌株(EP-713)研究发现:漆酶(LAC1)的活性及其mRNA水平都大大下降。漆酶活性下降与真菌毒力下降有直接关系(Choi *et al.*, 1992)。

当然,并非所有的真菌病毒都降低真菌寄主的毒力。一个双链RNA被证实是正调控高丽参根腐病真菌(Ahn and Lee, 2001)。生化分析表明,双链RNA可能通过涉及cAMP依赖型蛋白激酶和蛋白激酶C的信号传导途径调控真菌的毒力。

漆酶的一个重要作用是防御食肉动物、草食动物以及细菌和真菌的侵入。漆酶通过排泄可以在创伤表面发生氧化反应,参与伤口愈合。关于此功能目前尚无确切的证据。由于大量的植物漆酶分布在高度趋异的物种和木质化与非木质化的植物组织中,因此要弄清其功能仍需要大量深入而细致的工作。

1.3.4 漆酶的应用

漆酶分解木质素具有重要的生物学意义：首先漆酶可以促使木质素分解形成土壤腐殖质，其次，促使分解后的木质素经生态系统重新进入碳循环过程。

1.3.4.1 漆酶的去木质素作用

如何有效去除木本组织的木质素，已经有大量的研究，尤其是在纸浆和造纸业上研究得更多。毋庸置疑，漆酶在白腐真菌分解木材过程中起到了十分重要的作用。研究证明，诸多的白腐真菌中都有漆酶的存在。然而这些漆酶在分子量、pH 值以及其它方面差别很大。其稳定性主要依赖于多酚底物的存在 (Mai *et al.*, 2000)。而且，一些酚类化合物作为介质可以增强漆酶分解木质纤维素的能力 (Bourbonnais *et al.*, 1995; Eggert *et al.*, 1996)。

1.3.4.2 生物除污

环境污染是当今人类面临的最严重的问题之一，全球范围内过度使用农药尤其是含氯的芳香类化合物以及工业废水大量排放，对人类的生存环境造成极大的破坏。生物除污是目前研究领域的热点，并取得了一些可喜的进展。研究证实，真菌类酶对于降解一系列持久的环境污染物是非常有效的。由于真菌降解污染物的潜力巨大，另一方面也因为其在环境中可以保持较高的活性。一些白腐真菌，如朱红栓菌 (*Pycnoporus cinnabarinus*) 可以生产出高水平的漆酶 (Wong and Yu, 1999)。从红枪菌的一个种 (*Trametes hirsute*) 分离的漆酶可以降解偶氮、靛蓝、三苯甲烷等23种工业染料(Rodriguez *et al.*, 1999)。通过直接定点诱变而改造的漆酶基因工程的表达酵母菌株是 *Pichia pastoris* (Gelo *et al.*, 1999)。此外，漆酶在酒精生产 (Larsson *et al.*, 2001)、药物分析等领域均有重要的应用价值。

目前漆酶应用中使用比较多的电子介导剂是3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(ABTS)、1-羟基苯并三唑和2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基(TEMPO)等,在电子穿梭载体的作用下酶解效率可提高几倍到几十倍不等(Acunzo *et al.*, 2002)。

2 植物抗旱性的研究进展

随着全球性生态环境的不断恶化，干旱已经成为一种世界性的重大农业灾害。其对农作物造成的损失在所有的非生物胁迫中居首位，仅次于生物胁迫病虫害造成的损失。玉米对干旱胁迫比较敏感，我国每年玉米的种植面积在2400多万 hm^2 左右，其中有近2/3面积为旱作玉米。根据我国玉米带地区历气象资料和玉米产量的相关分析，干旱是导致我国玉米产量波动的主要原因，同时，受全球温室效应的影响，水资源短缺矛盾将愈来愈突出。国内外有关玉米干旱胁迫与抗旱性的机理及其应用研究日益受到重视，该领域的研究也有大量报道。下面就这方面的研究进展综述如下：

2.1 玉米抗旱性的形态学及生理生化机制研究进展

干旱对玉米所造成的危害涉及生长发育的各个阶段，影响生理生化代谢的多种途径。近半个世纪以来，国内外的玉米育种及植物生理学家在这方面进行了广泛而深入的研究，并取得了显著的成绩，不仅为抗旱玉米种质鉴定提供了有效的参考指标，而且对玉米抗旱改良提供了理论指导。

2.1.1 形态学研究进展

玉米的形态学指标主要包括根、茎秆、叶片、株型、开花至抽丝的时间 (Anthesis-to-Silking Interval, ASI; 穗散粉至雌穗抽丝的间隔时间)、花粉败育率等。对这些性状进行调查与鉴定是常规玉米育种的基本环节。苗期和开花期是对干旱最为敏感的两个时期,目前研究的也比较多。苗期干旱最明显的变化是叶片萎蔫,植株生长受到抑制。而开花前期、开花期干旱则会使叶片过早衰老,导致同化作用降低。使得玉米穗和籽粒减少,同时也产生很多小的籽粒,最终造成减产。干旱胁迫强烈影响玉米幼苗的水分状况。资料表明,在快速PEG胁迫下,随胁迫强度的增加和胁迫时间的延长,叶片相对含水量 (Relative Water Content, RWC) 逐步减少,以至干枯死亡;复水12小时后,叶片RWC将得到不同程度的恢复。在慢速土壤干旱胁迫3d后,叶片水势由-0.196 MPa降为-0.826 Mpa,相对含水量由胁迫前的96.7%降为74.2%。胡荣海(1986)研究发现,干旱环境下叶片生长速率与作物抗旱性有关。通过叶片萎蔫程度作为衡量作物抗旱与否的标准是不准确。因为一些作物可能通过叶片萎蔫、卷曲等方式来降低蒸腾作用,以达到适应干旱的目的。而罗淑平(1990)研究认为,叶片大小及卷曲程度可作为玉米抗旱性鉴定的重要指标。对异花授粉的玉米来说,当干旱在开花前和开花期发生,花粉自然散粉、传粉能力下降,会使抽丝延迟,从而导致ASI 雄增加 (Hall *et al.*, 1982; Bolanos and Edmeades, 1993)。干旱胁迫造成雄雌穗间隔期长、花期不遇、雌穗抽不出来等,严重时减产达50% 以上 (Westgate and Boyer, 1986)。这种现象具有很高的遗传力,在田间很容易测定 (Ribaut *et al.*, 2002)。CIMMITY对热带玉米在干旱条件下,ASI的变化连续进行了多年研究发现,干旱胁迫下ASI可由几天延长至60天左右 (Bolanos and Edmeades, 1996; Chapman and Edmeades, 1999)。

2.1.2 干旱胁迫下玉米生理生化机制的研究进展

2.1.2.1 渗透调节

渗透调节是植物适应干旱胁迫的一种重要生理对策,其主要功能在于维持正常的膨压,继而影响其它生理生化过程。在干旱胁迫下,大多数植物积累一些低分子量的生物相容性物质和特定的蛋白,亦称为渗透调节剂 (Osmoprotectant),如无机离子 (如 K^+)、糖类 (如果聚糖、海藻糖等)、多元醇 (如甘露糖醇)、氨基酸 (如脯氨酸) 和生物碱 (如甜菜碱) 等 (McCue and Hanson, 1990)。对干旱胁迫下生物相容性物质积累的生物学意义,目前主要有两种解释:一种认为溶质本身作为一类渗透剂进行调节,从而增强植物保持水分的能力,稳定体内的渗透压平衡;另一种认为积累的相容性物质可能作为一种溶剂代替水参与一系列生理生化反应 (Bohnert and Jensen, 1996)。从遗传学的角度来看,渗透调节能力是某些植物所特有的生物学特性,水分胁迫条件下渗透调节是否产生决定于受测植物的遗传潜力。在同一实验条件下,同一植物种的不同品种也表现出渗透调节能力的差异 (李德全等, 1992),这也证明了遗传因素的控制作用。另外Morgan等 (1996) 研究也发现渗透调节能力是可以遗传的,其强弱与作物及品种的抗旱性有十分密切的关系,抗旱性强的品种渗透调节能力大于抗旱性弱的品种,而且在植物生长发育的不同时期也存在差异。

2.1.2.2 激素水平调节

在干旱胁迫下,植物通过内源激素的变化如 IAA、GA 以及 ABA 等来调节某些生理过程以达到适应干旱的目的。目前研究较多的主要是脱落酸 (ABA)。它作为植物的一类内源激素,是一种

小的、亲脂性植物激素。它在植物发育、种子休眠、萌发、细胞分裂和由于干旱、寒冷、盐、病原菌侵染以及紫外辐射等环境胁迫所诱发的细胞反应中起调节作用 (Ueno, 1998)。ABA 对植物的影响是多方面的 (Guan and Scandalios, 1998), 包括通过保卫细胞的离子流出量来诱导气孔的快速关闭 (Assmann and Shimazaki, 1999), 降低钙调素蛋白的转录水平, 改变其亚细胞分布 (Nicolas *et al.*, 1998), 诱导抵抗脱水胁迫应答基因表达的改变 (Ingram and Bartels, 1996; Bray, 1997; Leung and Giraudat, 1998)。

研究表明, 干旱胁迫使玉米幼苗叶片和花期叶片中的 ABA 成倍增加, 但对玉米的抗旱性并无直接作用, 而主要是通过调节细胞某些渗透调节剂的浓度来间接影响玉米的抗旱性 (霍仕平等, 1995)。利用外源 ABA 研究玉米抗旱性已经取得了一些进展。张烈等 (1998) 对孕穗期的玉米植株喷施 ABA (2mg/kg) 后, 土壤进行轻度干旱胁迫。结果发现气孔阻力增加、蒸腾速率降低、细胞膜的破损程度降低、而叶绿素总量与施用 ABA 与否, 差异不大。同时证实, 在轻度胁迫下, ABA 处理植株与对照植株叶片的含水量差异显著, 游离脯氨酸含量增加近 2 倍。

2.1.2.3 抗氧化防御系统

20 世纪 80 年代以来, 人们对于干旱胁迫下植物体内抗氧化防御系统进行了大量的研究, 发现植物受到水分胁迫后体内活性氧的积累程度与多种因子有关, 在绿色植物组织中, 光合电子传递系统是活性氧 (超氧离子 $O_2^{\cdot -}$) 的主要来源。超氧化物与 H_2O_2 反应生成一种潜在的强氧化剂—羟基, 它攻击大部分的生物大分子, 造成 DNA 损伤, 从而影响蛋白质的合成, 甚至导致细胞死亡。然而当超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 以及不同的过氧化物酶 (POD) 存在时, 会中断超氧化物与 H_2O_2 反应, 以达到对细胞的保护作用, 而活性氧的直接清除剂是什么目前尚不完全清楚。王茅雁等 (1996) 研究发现, 玉米在水分胁迫初期 SOD、CAT、POD 活性升高, 但随着水分胁迫时间的延长和强度的增加, 则有不同程度的下降, 说明适度水分胁迫能增强植物对干旱的适应性。同时还证实, 不同基因类群的 SOD、CAT、POD 活力存在差别。水分胁迫使玉米不同基因类群 3 种酶的活力明显降低, 其中以 POD 反应最为敏感, SOD 和 CAT 敏感性较小。

2.1.2.4 气孔调节

气孔调节是水分胁迫下植物适应环境、抵御干旱的机制之一。玉米通过气孔调节减少蒸腾, 从而减少或避免旱害损伤。玉米种质在水分胁迫下, 气孔阻力明显增大, 以此减少体内水分的散失, 不同品种之间其气孔阻力增加幅度不同, 抗旱性强的增加幅度较大, 而抗旱性差的增加幅度较小。

2.1.2.5 细胞膜结构的变化

质膜损伤和膜透性的增加是干旱胁迫对玉米造成的最明显且直接的伤害。玉米细胞膜透性随叶片缺水程度的增加而增加。膜透性的变化在不同的品种间存在差异。抗旱性强的种质膜透性变化小; 抗旱性弱的玉米叶片的受到的伤害则较大。研究还证实, 在玉米生长的不同时期, 干旱对膜透性的伤害也不同: 在大喇叭口期膜的稳定性最差, 受到的伤害最为严重。这也说明了玉米在生长发育的不同时期, 对缺水的敏感程度不同 (王西瑶, 1996)。大喇叭口期较为敏感, 这与玉米的需水规律相吻合。

2.2 植物抗旱性的分子机制

由于干旱反应、环境因素以及二者的相互作用的复杂性,使得传统的抗旱育种遇到了巨大挑战。基因组作图和功能基因组学的发展,为探索植物抗旱的分子机制提供了有力工具。分子标记辅助选择为抗旱遗传改良提供了有效的分子基础,从而大大加速了抗旱育种进程。

常规抗旱育种主要依赖于植物在干旱环境下的表现,如产量、开花至抽丝时间等。尽管该途径已经培育了一些优异的抗性种质,但是由于基因与环境的互作,每年的干旱情况的差异,使得该研究进展缓慢。分子作图和基因组学途径,是在分子水平上挖掘一些与干旱相关的关键基因和 QTLs。将有效的分子技术与常规育种、生理性状相结合,必将对抗旱机制的诠释和抗旱种质的选育起到极大的促进作用。

2.2.1 干旱胁迫诱导基因的表达及调控

干旱是影响植物生长发育最主要的逆境因子。植物在水分胁迫下会引起一系列分子反应和信号传递,干旱胁迫诱导基因表达一些重要的调节蛋白和功能蛋白以保护细胞不受水分胁迫的伤害。这些基因主要对干旱胁迫有两个方面的作用:一方面,通过渗透调节物质的积累来提高细胞的渗透调节能力,保证水分子的正常运输,从而有利于维持细胞膜的完整性;另一方面,干旱胁迫使得一些基因过量表达,大大促进了一些参与抗旱防御的代谢产物的合成,以此提高其抗旱能力。研究表明,干旱诱导的基因对水分胁迫反应的速度存在差异,一些基因在几秒或数分钟内即作出应答,而另一些基因则在几个小时、几天甚至几个星期才有应答。由此,我们可以推测早期应答的基因可能参与最初防御和信号放大,而晚些时候应答的基因则可能用于适应胁迫环境 (Ramanjulu and Bartels, 2002)。目前,在一些植物包括重要的农作物如豌豆、西红柿、玉米、水稻、小麦族 (Cattivell *et al.*, 2002) 和模式植物拟南芥以及极端干燥环境下的复苏植物、盐生植物中都发现了一些与抗旱胁迫相关的基因 (Bray *et al.*, 1997; Ishitani *et al.*, 1996; Ingram *et al.*, 1996)。对这些基因的表达特性及其调控机理的研究,是阐明植物对干旱胁迫的分子反应的重要内容,也是有效地通过转基因方式来改良植物性状的前提。

2.2.1.1 干旱胁迫诱导表达产物

目前,研究最多的调控蛋白主要以下几类:第一类是转录因子,如MYB、MYC、bZIP以及 EREBP等。在干旱胁迫条件下,转录因子被诱导表达,然后进一步调控相关代谢途径功能基因的表达;第二类是蛋白激酶,如MAPK激酶、核糖体蛋白激酶以及转录调控蛋白激酶。它们在胁迫信号级联放大中扮演重要角色;第三类是与第二信使相关的蛋白酶,如磷酸酯酶。 Ca^{2+} 和三磷酸肌醇是领域研究的热点。而功能蛋白则是参与不同干旱胁迫基因表达机制的终端产物。

2.2.1.2 干旱胁迫诱导基因的表达与调控

在转录水平上研究干旱诱导基因的表达调控,主要目的在于鉴定那些与水分胁迫有关的基因顺式作用序列及其反式作用因子。目前已发现的水分应答基因的表达调节至少和 4 种信号传导途径有关 (图 1-5)。其中两种为 ABA 依赖型,两种为 ABA 不依赖型。对于 ABA 诱导的基因表达,人们已经进行了广泛的研究,相关报道有数百篇 (包括 ABA 阻遏基因)。研究发现,ABA 反应元件 (ABRE) -PyACGTGGC 存在于一些物种的 ABA 诱导基因的启动子区域 (Bray, 1997; Shinozaki

and Yamaguchi-Shinozaki, 1997)。ABA 和干旱诱导的基因表达是受多重顺式作用元件顺序调控的。除 ABRE 外,还存在一些对 ABA 反应的其它顺式作用元件。受 ABA 诱导的玉米 C1 (Colourless-1) 基因启动子中含有保守元件 GGTCGTGGTCCATGCATGCAC, 这是一种不同于 ABRE 的 ABA 反应元件。玉米中干旱和 ABA 响应基因 *VP1* 与核内染色质的结合状态依赖于转录因子的磷酸化和脱磷酸化共激活。由此可知,干旱诱导的基因表达是通过信息传导对顺式作用元件和反式调节因子的激活而实现的。同时,研究也发现,有很多干旱应答基因对 ABA 胁迫没有反应,这意味着存在对干旱胁迫反应的其它途径。这些基因包括编码不同半胱氨酸蛋白酶的基因 *rd19* 和 *rd21*。Yamaguchi-Shinozaki 等 (1992) 发现在水分胁迫及 ABA 存在的条件下,拟南芥 *rd29A* 基因的转录有 2 个高峰期,胁迫后 20min 出现第一次高峰,大约 3h 后出现第 2 次高峰。而相同条件下,在拟南芥对 ABA 不敏感的突变体中 *rd29A* 的转录只有第一次高峰。这一结果表明 *rd29A* 基因的第一次高水平转录是受水分胁迫诱导的结果,而这种诱导作用不依赖于 ABA。然而,ABA 依赖的基因表达调控途径和 ABA 不依赖的基因表达调控途径之间也并非是完全独立的,COS、LOS 和 HOS 基因突变分析表明,这 2 种途径可能也相互作用,以激活干旱诱导基因的表达。Zinselmeier 等 (2002) 以先锋玉米杂交种 3732 (抗旱材料)为实验材料,利用 GeneChip 技术对穗和粒发育阶段干旱诱导的 1502 个基因进行了研究。这些基因代表了 27 个调控和代谢途径,其中有 179 个基因呈现差异表达。该研究证实,在水分胁迫下,包括脯氨酸在内的 7 个基因表现为负调控 (down-regulated);包括 *rab17*、seed imbibition、ribosome-inactivating protein、asparagine 合成酶和 zinc-metallothionein 等 10 个基因始终表现为正调控基因 (up-regulated genes)。

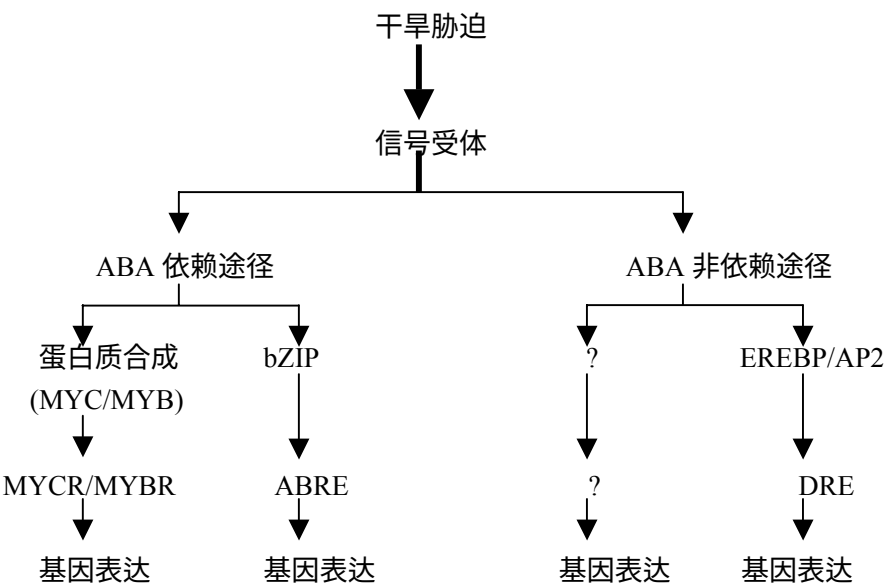


图 1-5 干旱胁迫下基因表达途径

Fig. 1-5 Gene expression pathways in drought tolerance

2.3 抗旱玉米种质的鉴定与改良

20 世纪 80 年代以来,我国主要开展了两个方面的研究工作。一方面是对现有的不同遗传背景的玉米自交系进行系统分析,以鉴定其抗旱能力;另一方面,利用从 CIMMYT、东南亚(泰国、菲律宾)、西亚(也门共和国)、非洲(尼日利亚)等低纬度地区,分别引入一批热带和亚热带玉米种质,利用“温×热(亚热)”互导,来筛选抗旱优异基因源。

2.3.1 玉米抗旱性的常规鉴定

20 世纪 70 年代后期以来,我国从 CIMMYT、东南亚、西亚以及非洲等低纬度地区,先后引入一批热带和亚热带玉米种质资源,经鉴定评价后,直接利用或将其种质导入我国玉米材料,已选育出一批含有不同比例低纬度玉米种质的优良自交系,为玉米抗旱育种起到了十分重要作用。目前,我国玉米育种水平较高,在推广的杂交种或亲本中存在频率较高的耐旱等位基因,对其进行耐旱性鉴定是实现高起点、快速度选育耐旱种质的有效途径(李新海等, 2002)。

快速有效的抗旱鉴定方法和指标是作物抗旱育种的前提。国内外一些学者对抗旱性在形态特征、生理生化特性等方面进行了大量的研究。由于干旱既可能发生在作物生长发育的全过程,也可能对植株的各个器官(组织)产生影响,最终导致产量降低。近年来,在该领域已取得一定进展(罗淑平, 1990; 黎裕, 1993; 王茅雁等, 1994)。通常,玉米抗旱鉴定主要从形态学、生理生化及籽粒产量等几个方面进行。

形态学鉴定主要包括:根、叶片、株型、开花至抽丝时间(anthesis-to-silking interval, ASI)、花粉败育率等。形态学性状的观察与测定,可能是最直接也是最简便的抗旱鉴定途径。然而,在生产实践上,不能紧紧依靠上述某一个或几个指标,必须根据多个指标进行重复测定和综合评价,以提高鉴定结果的可信度。

生理生化指标主要有水分状况指标(包括水势、相对含水量、叶片膨压等)、气孔开度和气孔扩散阻力或蒸腾速率、水分利用效率、离体叶片抗脱水能力、茎的水分输送能力、渗透调节能力、光合作用、呼吸作用、脯氨酸积累能力、ABA 积累能力、酶活力以及其它代谢物质等。李岩等(2000)通过测定干旱过程中叶片内源激素 IAA、ABA、ZR(玉米素核苷)、DHZR(二氢玉米素核苷)、IPA(异戊烯基腺苷)的含量变化及光合作用参数的变化,分析它们之间的相互关系,对激素如何影响或调控光合作用进行了初步探索。

干旱胁迫下,籽粒产量显著降低是玉米遭受伤害的最终体现。许多学者以玉米在干旱胁迫下的减产程度和产量构成性状的稳定性作为玉米抗旱性强弱的指标。籽粒产量是一个复杂的性状,取决于很多因素,如生长势、充足的水分及营养供给等。干旱对玉米产量有不同程度负面影响,减产程度取决于干旱胁迫的持续时间以及植株的发育阶段,也与种质的抗旱强弱有关。一般可使玉米减产 20%-30%(李新海等, 2002)。尽管如此,目前几乎所有的生产性育种项目仍将产量作为一个选择参数(Bruce *et al.* 2002)。籽粒产量是玉米抗旱与否的最终体现。其鉴定方法一般是通过计算干旱处理与正常灌溉穗粒重的比值来实现的。并依据此比值将玉米材料的抗旱性进行分级,旱处理穗粒数/正常灌溉穗粒数 >0.90 为一级(抗旱), $0.80 < \text{旱处理穗粒数/正常灌溉穗粒数} < 0.90$ 为二级(较抗旱), $0.70 < \text{旱处理穗粒数/正常灌溉穗粒数} < 0.80$ 为三级(较不抗旱),旱处理穗粒数/正常灌溉穗粒数 <0.70 为四级(不抗旱)。也有人依据抗旱指数(抗旱指数=(对照产量-干旱处理产量)/对照产量)来进行抗旱性判定的标准。

2.3.2 玉米抗旱性的QTL分析

干旱涉及许多形态、生理性状以及由此而发生的一系列反应,如气孔调节、渗透调节、叶片表皮厚度变化、根形态及深度、抗氧化防御反应、光合系统、细胞膜结构的变化等(Bohnert *et al.*, 1995; Bray 1997; Nguyen *et al.*, 1997)。因此,通过分子标记辅助选择途径,来分析这些复杂的数量性状遗传规律,应当是很好的选择。借助QTL图谱,进行抗旱作物遗传改良,已经取得了一定进展(Ribaut *et al.*, 1996; Crasta *et al.*, 1999)。值得一提的是,QTLs所涉及的关键遗传群体,如近等基因系、重组自交系等,对于干旱生理功能和基因发掘的研究也将起到极大的促进作用。研究表明这些复杂的反应为许多基因所控制,而且有些性状为多基因所控制(Champoux *et al.*, 1995; Lebreton *et al.*, 1995; Tuberosa *et al.*, 1998; Lilley *et al.*, 1996)。分子标记技术和已建立的遗传和物理图谱,为发掘新基因提供了重要的线索。

分子遗传学及分子生物学的迅速发展大大加速了玉米抗旱性研究的进程,并已经取得了一定进展(表1-2)。开花期和种子形成的早期是决定玉米籽粒产量高低的关键发育阶段。对于开花期间,胁迫响应的组成已经有大量的报道(Edmeades *et al.*, 1993; Bolanos and Edmeades, 1996; Zinselmeier *et al.*, 1999)。Zinselmeier等(1999)研究发现,光同化作用的稳定流动,在胚珠和种子发育中起重要作用。失水造成上述过程阻断,致使一些关键的碳代谢酶活性降低。早些时候的研究表明,水分胁迫可能影响酸转化酶活性以及降低穗发育所需的光同化流(Schussler and Westgate, 1995)。最近,Zinselmeier等(1999, 2002)证实,酸转化酶实际上在提供穗形成所必需的多糖中具有重要作用,其活性对干旱的影响很敏感。这些结果说明,增加酸转化酶活性对于子房发育十分重要。

Lebreton等(1995)利用84个RFLP位点对玉米(*Zea mays* L) P₀lj17(抗旱型)×F₂(干旱敏感型)的81个F_{2:3}家系进行了抗旱性因子(如气孔导度、ABA、叶片水势、根数、膨压以及荧光特征等)的QTL分析。结果表明,在染色体1、2、7和10上有4个控制气孔导度的QTLs;染色体3上有控制ABA含量、叶片水势和叶片膨压以及根系拉力的位点。在染色体2、3、5、6、和8上有5个与叶绿素含量有关的QTLs。Agrama and Moussa(1996)对SD34×SD35组合,用70个RFLP位点进行了抗旱性的QTL分析,在玉米染色体1、3、5、6和8上发现了影响产量的基因,通过这5个推测的QTLs可以使与产量有关的50%的表型变异得到解释。Ribaut等(1996)对与抗旱性密切相关的性状—ASI(开花至抽丝天数)进行了QTL定位,在染色体1、2、5、6、8和10上发现了6个位点。Tuberosa等(1998)对80个F_{3:4}玉米材料在干旱胁迫下叶片ABA含量进行了遗传分析,并对所得到的16个QTLs进行RFLP作图。Tuberosa等(2002)对玉米干旱胁迫下调控其形态生理、产量等性状的QTLs进行了全面而深入的分析与研究,揭示了这些相关性状复杂的遗传基础及其遗传背景和环境对QTLs效应的影响。同时,Tuberosa等(2002)研究了水培条件下,根长、根重、根直径以及籽粒产量的QTLs,证实通过该途径在玉米生长的早期,鉴定控制根部性状和籽粒产量的QTLs位点是可行的。Sanguineti等(1999)在干旱条件下两年鉴定的玉米材料中,随机选取80份F₄家系进行研究,在不同的生育期和年份,控制各个性状的QTLs的数目存在差异。Sari-Gorla等(1999)和Frova等(1999)用B73×H99组合的RIL分别对其在干旱条件下进行了分子标记研究,在几个染色体上分别发现了控制雄蕊及雌蕊开花时间、花药散粉时间的基因位点、控制株高以及产量的基因。

近几年来, CIMMYT对水分胁迫下, 玉米在开花前、开花期和开花后的耐旱情况也进行了广泛的研究。一些与产量组成和主要次级形态性状(如ASI)表达的QTLs得到了鉴定。目前, 他们对不同自交水平(杂交种、 $F_{2:3}$ 家系和RILs)的4个不同杂交群体, 在不同水分处理(正常供水、中等胁迫和重度胁迫)和不同地点的表现进行了分析。Ribaut 等(1996; 1997)利用QTL对产量组成和主要次级性状在干旱条件下的表现进行了研究, 发现这些性状是复杂的多基因性状。为了更加深入地探索水分胁迫条件下, 玉米在遗传水平上的应答机制, CIMMYT利用QTL对能够诱导抗旱表型的一些重要生理途径的差异表达进行了研究。该研究通过将Ac7643×Ac7729/TZSRW进行杂交获得 F_3 家系, 进一步选育得到RIL群体。由于RIL家系遗传稳定, 更加适合于生理测定。但该材料通常存在高度的自交衰退, 不适用于产量组成的评价。尽管大多数生理性状对于常规筛选而言没有什么用处, 因为其测定过程是非常耗时的。但是, 一旦被鉴定的DNA标记与参与一个生理性状表达的QTL紧密连锁, 那么它们将会被有效地应用到MAS(marker-assisted selection)试验中。由于涉及耐旱机制的几个生理途径(如ABA生物合成)已经很清楚, 对应于已鉴定QTL的基因的性状描述很容易做到, 从而使得候选基因途径成为一个非常具有吸引力的选择。当然, QTLs也有不足之处, 它对于耐旱机制及其相关的途径或大量基因所涉及的植物响应等方面提供的证据很少, 从而限制了该技术在作物育种上的应用。功能基因组学的发展, 帮助我们克服了上述缺点, 因为这些新的方法几乎能够同时对几千个基因的表达进行分析。将功能基因组研究和QTLs的结果有机地相结合, 为我们鉴定耐旱所涉及的一些关键的生理生化途径提供了有力的工具。与产量相关次级性状的QTLs性状描述和参与表达的关键生理参数的QTLs将在基因功能和植物表型之间架起一座桥梁。

表 1-2 玉米抗旱性的 QTL. (修改于黎裕 等, 2004)

Table 1-2 Quantitative trait loci (QTLs) for drought tolerance in maize (adapted from Li *et al.*, 2004)

性状 Trait	作图群体 Mapping Population	类型和群体大小 Type and size of population	参考文献 Reference
Roots traits and yield	Lo964 × Lo1016	171 F_3	Sanguineti <i>et al.</i> 1996
Flowering parameters under drought, ASI	Ac7643 × Ac7729/TZSRW	236 RILs	Ribaut <i>et al.</i> 1996
Plant height, ear number, yield	SD34 × SD35	120 $F_{2:3}$	Agrama & Moussa 1996
Leaf ABA concentration, yield	Os420 × ABO78	80 F_4	Sanguineti <i>et al.</i> 1999 Tuberosa <i>et al.</i> 1998
Ear length ear weight ASI	B73 × H99	142 RILs	Sari-Gorla <i>et al.</i> 1999
Leaf ABA concentration	A662 × B73	151 F_3	Tuberosa <i>et al.</i> 1998
Vacuolar invertase activity	$F_2 \times I_0$	100 RILs	Pelleschi <i>et al.</i> 1999
ABA concentration, ASI	Polj17 × F_{-2}	81 F_2	Lebreton <i>et al.</i> 1995
Parameters of root	Ac7643 × Ac7729/TZSRW	236 RILs	Ribaut <i>et al.</i> , 2002
ASI, plant height	K64 × H16	280 F_3 topcross families	Ribaut <i>et al.</i> , 2002
ASI, plant height	K64 × H16	170 F_4 families	Ribaut <i>et al.</i> , 2002
ASI, grain yield	CML444 × SC-Malawi	234 F_3 families	Ribaut <i>et al.</i> , 2002
	Jalisco × LPC21	200 BC_3F_2	Ribaut <i>et al.</i> , 2002

(*) RIL= Recombinant inbred lines; BC=Backcross.

3 基于基因差异表达的转录图谱研究进展

迄今为止,与抗旱相关的候选基因数以百计 (Skriver and Mundy, 1990; Bray, 1993; Ingram and Bartels, 1996)。如何鉴定这些与抗旱相关的基因以及如何操作那些靶基因位点的精细等位基因,以达到改良品种的目的,是当前需要解决的问题。近年来,迅猛崛起的基因表达谱技术在基因组的生理及功能注释与鉴定方面扮演十分重要的角色,使得基因的研究从某一个时间、单个基因转向对基因组整体水平上的研究 (Hughes *et al.*, 2001; Shoemaker *et al.*, 2001; Donson *et al.*, 2002)。

转录图谱的研究已经走过了近 30 年的历程 (Goldberg, 2001),在此期间产生了诸如, Northern 转移杂交、S1 核酸酶分析和原位杂交技术等。这些方法灵敏度较高,但非常费时,因而适于少数基因的深入分析。相比较而言,目前应用的高通量转录图谱技术,则更适用于对差异基因进行高通量、大规模的分析 and 鉴定。这些技术在便捷、费用、转录本数量、灵敏性、自动化操作以及数据处理等方面存在不同长度的差异。上述方法可以分为两大类:直接分析和间接分析技术 (Donson *et al.*, 2002)。

3.1 差异表达基因的直接分析

主要包括:大规模表达序列标签测序 (EST Sequencing)、基因表达序列分析 (serial analysis of gene expression, SAGE)、大规模平行信号测序 (Massively Parallel Signature Sequencing, MPSS) 技术、差异显示 (Differential Display, DD)、cDNA-AFLP 和 GeneCalling 技术等。

3.1.1 大规模表达序列标签测序 (EST Sequencing)

EST (Expressed Sequence Tag) 是指长度为 300-500bp 的部分 cDNA 片段。EST 技术是将 mRNA 反转录成 cDNA,然后克隆到质粒或噬菌体载体上,构建 cDNA 文库,随后大规模随机挑选 cDNA 克隆,进行 5' 或 3' 端进行测序。将获得的序列与基因数据库进行比较,从而获得对生物体生长、发育、代谢、衰老和死亡等一系列生理生化过程的信息 (Hatey *et al.*, 1998)。该技术对发掘新基因、构建基因转录图、绘制基因表达谱等有重要作用 (Ewing *et al.*, 1999)。EST 本身为转录基因的产物,其在 cDNA 文库中出现的频率可以直接反应出特殊组织中 mRNA 种类的多少。用 EST 取代 cDNA 全长的筛选、基因组序列的鉴定等繁琐的实验操作,提高了工作效率。因为基因组中只有 2% 的序列编码蛋白质,因此对基因的转录产物进行大规模测序,即从编码蛋白质的 mRNA 着手,构建 cDNA 文库,并对挑选克隆进行大规模测序,无疑是一条更高效的途径。Adams 等 (1991) 率先提出了 EST 的概念,标志着大规模 cDNA 测序时代的到来。EST 技术也存在不足之处:ESTs 受制于“表达倾向” (expression bias),因为产生 ESTs 的 cDNA 为 mRNA 以一定的比例反转录而成。而 mRNA 存在高丰度、中等丰度和稀有 mRNA 丰度 3 种。这使得表达水平较低的基因在 EST 数据库中无法找到,而表达量高的基因则在 EST 数据库中过量存在。所以,用常规方法构建的 cDNA 文库中的高丰度基因将被反复测序,造成人力、物力和财力的巨大浪费,同时一些稀有基因也容易遗漏。上述问题的解决依赖于均一化文库和差减文库的构建。另外,大量 EST 测序将是十分昂贵的。

3.1.2 基因表达序列分析 (serial analysis of gene expression, SAGE)

Velculescu 等 (1995) 解决了传统 EST 测序的费用昂贵的问题, 首先建立了基因表达序列分析 (Serial analysis of gene expression, SAGE) 技术, 得到了人胰腺组织的基因表达图谱。1997 年, 该小组又利用该方法, 构建了不同生长期酵母转录物染色体表达图谱。SAGE 技术主要基于两条理论: 第一, 来自转录物内特定位置的 9—10bp 短核苷酸序列 (SAGE 标签) 所含信息足以代表其相应的转录物; 第二, SAGE 标签经随机连接、扩增并集中在一个克隆中测序, 标签重复出现的次数代表该转录物的拷贝数。SAGE 的主要优点是可用于寻找那些较低丰度的转录物, 最大限度地收集基因组的基因表达信息。而且, 它首先连接和标注大量 10—14bp 的序列标签, 然后再进行克隆, 因此大大降低了费用。Caron 等 (2001) 在已知人类基因染色体定位的基础上, 用 SAGE 方法构建了特定细胞类群中表达基因及其转录水平的转录组 (Transcriptome) 图并发现了众多低丰度的表达基因和在特定染色体区域内的高表达基因簇。当然, 该法也存在一些不足之处: 如一些特定的标签序列与数据库中的大量序列匹配, 使得在这些匹配序列中确定特定组织内与 SAGE 标签相对应的正确序列十分困难; 标签长度有限, 很难深入进行新基因的发掘。该技术工作量繁重, 需要进行大量的测序及数据分析工作。

3.1.3 大规模平行信号测序 (Massively Parallel Signature Sequencing, MPSS)

大规模平行信号测序 (Massively Parallel Signature Sequencing, MPSS) 技术有效地解决了 EST 测序中存在的速度和分析的深度等问题, 它是将 microbeads 加入到 Flow cell 板中, 制作成高密度的 Beads Array。通过对 Microbeads 上的 cDNA 进行限制酶处理、特异性 Adaptor 的连接、荧光探针的杂交等处理后, 可以一次性地对 100 万条 cDNA 同时测定 5' 末端的 16—20 个碱基的 DNA 序列。依据各 DNA 序列可以确定各种遗传基因。上述 16—20 个碱基的 DNA 序列称为 Signature 序列, 它们出现的频率反映相应基因表达量的多少。若对多种样品进行 MPSS 测序, 便可以比较不同样品中的 mRNA 表达量的差异。Jongeneel 等 (2003) 分析了人类两个不同的细胞系, 发现每个细胞都表达 10,000 到 15,000 个基因, 将近 60% 的基因表达很弱, 甚至断定如果不是采用 MPSS 这种新测序方法根本不可能检测到它们的活性。MPSS 技术可以对拷贝数非常低的基因进行分析, 而 SAGE 技术对于大部分低拷贝基因的分析结果误差很大。令人遗憾的是, 由于专利等方面的原因, 目前 MPSS 技术在科研领域尚未得到广泛的应用。

3.1.4 GeneCalling 技术

该方法包括 3 个过程: 限制性酶切、接头连接和 PCR 扩增。其研究的对象是同时用 2 种不同限制酶消化的 cDNA 样品。用于扩增的引物进行荧光标记, 利用毛细管电泳分离 cDNA 片段。然后比较两个样品中分离片段的相对强度, 自动识别差异表达基因的 cDNA 片段。通过数据库查询即可获得相关信息。其检测 mRNAs 的灵敏度大于 1/100,000。该方法最大的优点在于通过竞争性 PCR 证实了片段与序列之间的相关性 (Shimkets *et al.*, 1999)。

3.1.5 差异显示 (Differential Display, DD)

1992 年, Liang 和 Pardee 以及 Welsh 等分别利用 DD (Differential Display) 和 RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR) 技术, 对 2 个或多个样品间的 mRNAs 正或负调控的基因表达进行了分析。差异显示包括 4 步: mRNA 反转录为 cDNA, 以任意引物进行 cDNA 扩增, 然后跑聚丙烯酰胺

电泳分离 cDNA 目的带。随后进行二次 PCR, 将扩增产物测序。当时, 这些方法与已经应用的差减方法相比, 费用是低廉。因而, 得到了广泛的应用。但是对于基因表达谱的绘制, 意义不大。主要因为这些方法在 PCR 扩增时应用了寡核苷酸引物、退火温度较低等, 使得扩增产物并非单独依赖于初始的 cDNA 浓度, 造成引物与模板相匹配。在此情况下, PCR 条件和样品质量将对表达谱产生较大的影响 (Matz and Lukyanov, 1998)。这个问题也因为其自身存在的缺陷, 如假阳性高、灵敏度低、重现性差等所证实 (Sompayrac et al., 1995; Martin and Pardee, 1999)。

3.1.6 cDNA-AFLP 技术

在利用选择性片段扩增的方法中, 鉴于cDNA-AFLP具有重现性好、灵敏度高以及与Northern分析高度一致等优点而成为应用最广的方法 (Bachem et al., 1998; Durrant et al., 2000)。该方法结合了RT-PCR和AFLP (Vos et al., 1995) 技术的优点, 用以分析植物mRNA表达的差异性。首先提取植物总RNA, 将模板mRNA逆转录合成cDNA, 两边同时利用 2 个分别识别 6bp和 4bp序列的限制性内切酶 (如EcoRI、HindIII、PstI、TaqI、MseI等) 进行酶切。酶切片段同适宜接头连接, 然后利用同接头互补的引物结合后进行预扩增, 再在引物 3' 末端加 1—3 个选择性碱基进行选择扩增, 最后在测序胶上跑电泳, 即可获得 100-1000bp之间重复性好、清晰的条带 (Bachem et al., 1998), 其具体流程见 (图 1-6)。

cDNA-AFLP具有以下特点: 首先, 在cDNA酶切片段两端加上统一引物作为PCR扩增的模板, 使得PCR反应的可靠性大为提高, 其重复性可达 95%以上 (Bachem et al., 1996;1998)。田曾元等 (2002) 为了验证该技术的重复性, 对酶切、连接、预扩增反应的循环数及退火温度、 Mg^{2+} 浓度均进行了优化。结果表明: 在预扩增反应的循环数 (15-20), 退火温度 (52-56°C) 及 Mg^{2+} 浓度 (2.0-2.5mmol/L) 条件下, 均能获得稳定可靠的差异显示效果。第二, 该技术可准确地反映基因在时空上表达量的差别。由于PCR反应条件的严谨性, 扩增产物水平完全依赖于单个模板的浓度, 这样就可以为基因组的表达量提供一个可靠的结果。吴敏生等 (2001) 利用cDNA-AFLP技术, 对玉米强优势组合和弱优势组合及其双亲自交系在苗期和雄穗生长锥伸长期的基因表达进行了分析。结果表明, 玉米强优势组合和弱优势组合的基因表达有明显差异, 基因表达有多种类型, 表现出质和量的差异, 不仅有增强, 也有双亲沉默。第三, 内切酶及引物的选用问题。理想的酶切组合应该是识别 6-bp的酶对每个cDNA样品切 1 次, 在其一边或两边有一个 4-bp酶切位点。所以, 从GenBank中寻找已经发表的cDNAs, 筛选满足条件的内切酶是一条行之有效的途径。Durrant 等 (2000) 利用ApoI-MseI酶切组合研究了约 30,000 个cDNA片段, 发现 290 (~1%) 个差异表达。而且在所检测的 50 个烟草mRNAs的序列时, 发现 76%为含有可以适用的ApoI-MseI片段。第四, 与寡核苷酸点阵列相比, cDNA-AFLP不需要事先了解基因序列方面的信息, 便可区分基因家族中高度同源的基因。

鉴于cDNA-AFLP的这些特点, 该技术迅速得到了广泛的应用。Jone 等 (2000) 利用64 对 EcoRI/MseI酶切的引物组合对悬钩子果实成熟过程中基因差异表达进行了研究。Qin 等 (2000) 将该技术用于cDNA测序数据和基因表达谱的研究。通过对感染线虫的未成熟马铃薯的ESTs以及利用cDNA-AFLP所获得的约4,000基因的表达谱研究, 发现了一些新的致病因子。Gao 等 (2001) 利用cDNA-AFLP比较玉米高抗 (highly disease-resistant, HDR) 品系与易感系 (susceptible, S) 感染玉米小斑病病原菌 (*Bipolaris maydis*) 的mRNA转录本的差异, 发现了5个来源于HDR的基因,

这些基因与已经鉴定的抗病基因具有一定的同源性。并且分离到了一个全长的编码含有284个氨基酸的蛋白质的HDR10 cDNA克隆。Keygene N.V.与Ceres, Inc 通过合作,利用cDNA-AFLP建立了一个全面的拟南芥数据库 (Donson *et al.*, 2002)。该数据库选取各种组织及处理的材料,以便得到的RNA群体尽可能代表大多数拟南芥转录组。通过对这些样品的cDNA-AFLP片段系统测序,便可以得到约2/3的拟南芥转录组。有了高覆盖率的数据库,基因的差异表达就可以查询通过cDNA-AFLP 图谱构建的数据库而筛选到,没有必要进一步测序。当然,基于丙烯酰胺胶的cDNA-AFLP体系的通量和自动化,可以通过利用荧光标记、多重的或毛细管电泳等手段而得到加强 (Cho *et al.*, 2001)。

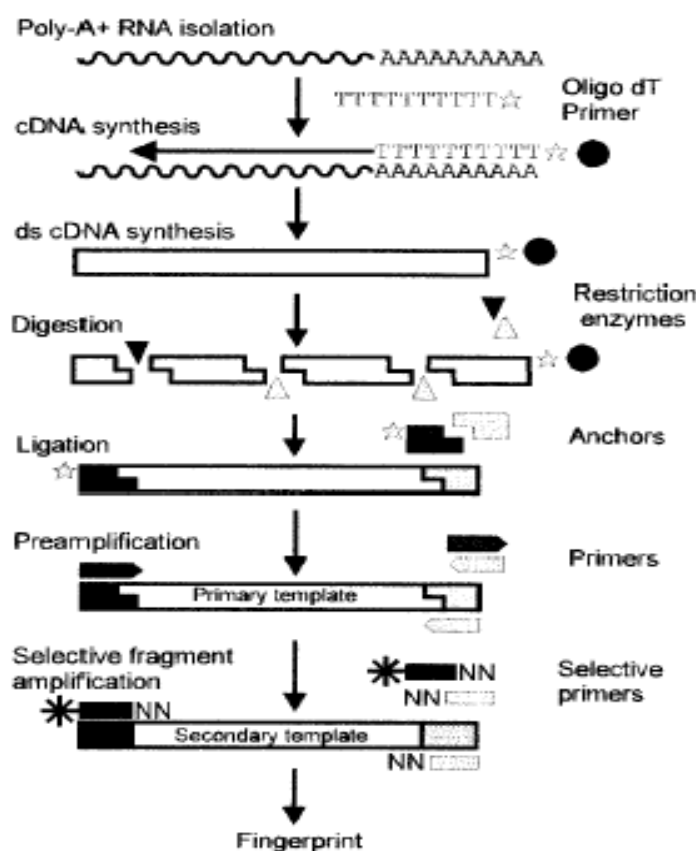


图 1-6 cDNA-AFLP 技术流程

Fig.1-6 Diagram of the cDNA-AFLP procedure

此外,其它的一些通过选择性片段扩增的方法 READS 以及 TOGA 等也相继得到应用 (Prashar and Weissman, 1996; Sutcliffe *et al.*, 2000)。

3.2 差异表达基因的间接分析

主要包括以mRNA或cDNA片段的核酸杂交为研究基础的方法,如Nothorn 转膜杂交、Southern 杂交、GeneChips 和 cDNA microarray 等。尽管 Nothorn 转膜杂交、Southern 杂交等方法的灵敏度较高,在过去的几十年得到了广泛的应用,但是由于仅能对少数基因进行鉴定,而

且周期较长。随着大量的核酸序列和克隆信息的发布,使得基于杂交的研究转向对成千上万的基因进行同时分析。cDNA microarray 和 GeneChips的出现,为开展这方面的研究提供了有力的工具 (Schena *et al.*, 1995; Lockhart *et al.*, 1996)。

3.2.1 cDNA microarrays

cDNA microarrays 的原理是应用核酸斑点杂交的方法,将 cDNA 片段、寡聚核苷酸、PCR 产物等固定在支持物上,形成高密度的点阵列,然后通过与标记样品(或探针)进行杂交,检测系统自动采集杂交信号并进行量化分析。该技术是应用机器人将 cDNA 点在涂有多聚-L-赖氨酸的玻片、硅片上,与标有不同颜色的荧光素(cy3、cy5)探针杂交,来检测不同组织或处理条件下基因表达的差异。其优点是点阵密度大(约 30,000)、灵敏度很高,mRNA 丰度在 10 万分之一也可以被检测。而且可以进行两种处理的检测,一次便可以找到基因表达的差异。其缺点是:微阵列的制作成本高、一般不能重复使用,检测分析系统昂贵。

3.2.2 GeneChips

GeneChips 是由 Affymetrix 公司首先研制的,是采用半导体光刻技术(photography),在固相支持物上原位合成寡核苷酸,并固定形成高密度点阵,然后与荧光素标记的探针杂交(Lipshutz *et al.*, 1995)。基因芯片的这种制备方法需要预先设计、制造一系列掩模,造价较高;制造过程中采用光脱保护方法,掩模孔径较小时会发生光衍射现象,制约了探针密度的进一步提高,而且光脱保护不彻底,每步产率只有 92%-94%,因此这种方法只能用来合成 30nt 左右的寡核苷酸探针。

基因芯片技术能同时将大量探针固定于支持物上,因此可以一次性对样品大量序列进行检测和分析,从而解决了传统核酸印迹杂交(Southern Blotting 和 Northern Blotting 等)技术操作繁杂、自动化程度低、操作序列数量少、检测效率低等不足。而且,通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的应用价值,如基因表达谱测定、突变检测、多态性分析、基因组文库作图及杂交测序等。人们已比较成功地对多种生物包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、酵母(*saccharomyces cerevisiae*)及人的基因组表达情况进行了研究,并用该技术一次性检测了酵母几种不同株系间数千个基因表达谱的差异。但该技术也存在着许多难以解决的问题,如技术成本昂贵、复杂、检测灵敏度较低、重复性差、分析范围较狭窄等问题。这些问题主要表现在样品的制备、探针合成与固定、分子的标记、数据的读取与分析等。

3.3 玉米基因表达谱的研究进展

大量的有关玉米基因表达调控研究表明,玉米的每一细胞、每一组织,在不同的发育、分化阶段,不同的生理条件和病理状态下,其表达的基因种类以及每一基因的表达丰度都存在不同程度的差异,而且这种差别存在严格调控的时空特异性。结构基因组研究不能告诉人们哪些基因在何时何地以何种程度表达。通过利用一些高通量、大规模的技术,同时对不同组织、不同时期的基因的差异表达进行研究,搜集这些状态下的基因表达种类和丰度信息,来绘制相关的基因表达谱,无疑是一条有效的途径。该图谱实际上是从 mRNA 水平反映了细胞或组织特异性表型和表达模式。如果收集各类组织和细胞的基因表达谱,对这些各不相同的基因表达谱作两两或多重比较,就能筛选出细胞特异性或发育阶段特异性的基因,这项工作无疑将对阐释基因表达调控机制开辟了一条新的途径。

Bruce等(2000)利用 GeneCalling 方法对雌二醇诱导的一对玉米转录因子—CRC和P在转录水平上的表达及其调控玉米类黄酮合成的表达谱进行了研究。在所研究的6个样本中,每个样本检测到约19,000个cDNA 片段。因为cDNA 片段的冗余序列,使得每个样本代表了约600—8000个基因。利用每个片段的长度和边界限制性位点来检索玉米序列数据库。由于该研究对已知的和新的基因应答反应均进行了检测,因此为转录因子的活性又提供了新的信息。而且证实了获得的表达谱结果与northern分析相吻合。2001年, Bruce 等又应用GeneCalling 技术,研究了两个玉米自交系与倒伏相关基因的表达谱。实验材料为玉米生长至第8叶和12叶期的根,每个样品检测到约13500个cDNA片段。其中,有229和325个cDNA片段分别在2份材料中变化显著。69个表达显著片段在2个取样时期均可以检测到。发现2个基因与细胞色素 P450和阻抗诱导蛋白有同源性,而二者在抗倒伏自交系表达水平很高,在易倒伏品系中的表达量很低。因此,这些结果将为玉米根发育过程中,抗倒伏基因表达的研究提供有益的线索。

McGonigle 等(2000)利用 microarray 技术研究了玉米白化苗中谷胱甘肽转移酶基因家族的表达谱,得到了 42 条 ESTs。Lee (2002)利用 DNA microarray 技术构建了玉米胚发育的整个过程的基因表达谱,用于了解胚发育过程中, mRNA 水平的基因表达变化以及这些基因在参与的代谢途径中的相互作用。该研究所用材料为玉米自交系-B73,对其不同时期进行取样。将 600 个随机得到的 cDNA 克隆用于荧光标记的 DNA 微阵列杂交。对三羧酸循环和糖酵解过程的基因表达作了深入而详细的分析。Sun 等(2000)利用 cDNA microarray 揭示了水分胁迫下玉米开花期穗组织基因的表达。他们划分了 3 个基因表达模式:(1)胁迫过程中, mRNA 水平增加;(2)在胁迫条件下, mRNA 水平降低;随后复水则表达量增加;(3)只在恢复过程中, mRNA 水平增加。上述结果说明了在脱水和恢复过程中调控基因家族的各个成员具有不同的功能。在该研究发现一些基因表达如水通道蛋白和 β -葡糖苷酶在水分胁迫下下降,恢复后则增加。该研究结果为我们深入分析通过了积极的指导作用。Zinselmeier 等(2002)利用 Amersham microarray 和 Affymetrix GeneChip 技术用于研究非生物胁迫下,玉米生殖组织基因的差异表达。其中,前者用于目的功能基因组研究,即玉米开花期对非生物胁迫的敏感性;后者用于非目的功能基因组研究,即研究干旱诱导的基因表达。研究表明,在用于 microarray 研究的 384 个基因中,236 个基因(占 61.5%)在不同的取样时间均能检测到。其中,约 13%检测到的基因在遮阴胁迫下,差异表达。但是,这些差异表达的基因在各个取样时间,无规律性。遮阴后 1 天,只有 2%检测到的基因差异表达;而遮阴 5 天取样,却有 26%的检测到基因为差异表达。同时发现参与淀粉生物合成的基因在遮阴胁迫下被同时调控,而且这些基因随着淀粉的损失,其表达也随之下降。在用于 GeneChip 研究的 1502 个基因中有 179 (占 11.9%) 个基因出现差异表达。其中,茎组织在严重干旱胁迫下的差异表达基因最多为 118 个。该研究也揭示了开花期更容易受到胁迫的影响;减产则与不正常花的发育和被损坏的穗生长有关等问题。

Fernandes等(2002)对利用玉米EST频率分析和microarray 杂交得到的RNA表达谱进行了比较。该研究利用了代表多种玉米器官和发育阶段的73,000个ESTs,鉴定到近22,000个暂定的单拷贝基因(Tentative Unique Genes, TUGs)。在构建的9个文库中,其中任何2个文库间的重叠序列为4—20%之间。高丰度ESTs仅存在与一个和少数文库中,只有26条EST contigs存在于全部9个EST文库中。该研究发现,利用不同cDNA文库中单个基因的EST出现频率来评价每个基因的表达模式存在两方面的限制:一是由于用于构建cDNA文库的生物样本的多样化(发育时期、组织类型

和生长条件等),使得“电子RNA”分析的范围受到限制;二是,对于特殊的cDNA文库,如何取样才能鉴定到低丰度的转录类型。为了进行深入研究,构建了两类微阵列:一个是含有10-14天胚乳的5534条ESTs,另一个是包括未成熟穗的4844条ESTs,分别对代表2800和2500个单拷贝基因。结果发现,EST和microarray分析均证明了表达谱中的量的差异,而microarray分析检测到了较高的不同组织间基因表达的质的重叠序列。

蛋白质组学的迅速发展也为玉米基因表达谱的研究提供了一条快捷的途径(De Vienne *et al.*,1999)。Damerval等(1998)利用双向凝胶电泳(2-D PAGE)技术分析了7个玉米近等基因系间 *opaque-2* 基因表达差异,鉴定并克隆到了一个新的转录激活因子基因。Chang等(2000)利用质谱方法对低氧环境下,玉米幼苗根尖的缺氧耐性和蛋白质合成模式进行了研究,探讨了检测到的蛋白质在适应低氧环境时可能的作用。当然,蛋白质组学还是一种新生领域,目前尚处于初期发展阶段,仍有许多困难需要克服。如双相电泳和质谱分析的灵敏度还很难将体内微量的调节蛋白质精确分析。而这种微量调控蛋白的精确表达在生命过程中起到关键性作用。另外,质谱分析仪的价格十分昂贵,约为DNA序列分析仪的十倍之多,严重影响了它的普及和被广泛应用。再者,成千上万种蛋白质间及蛋白质与其它生物大分子间的相互作用和作用方式的复杂性,同样也是蛋白质组研究所面临的问题。

4 生物信息学

生物信息学(bioinformatics)是近年来新兴的一门由生物学、数学、物理学计算机科学等相互交叉而形成的学科。其目标是揭示“基因组信息结构的复杂性及遗传语言的根本规律”。它是当今乃至下一世纪自然科学和技术科学领域中“基因组”、“信息结构”和“复杂性”这三个重大科学问题的有机结合。主要涉及三个领域:(1)建立现代生物学所需要信息系统框架的研究开发工作;(2)旨在理解基本生物学问题的基于计算所研究工作;(3)新算法和统计学方法研究。它是生物遗传密码与电脑信息相结合,通过电脑的各种程序软件将已知的大量的核酸、蛋白质等生物大分子的核苷酸序列进行分析、计算,揭示遗传信息;通过对生物信息的查询、搜索、比较、分析,从中获取基因编码、基因调控、核酸和蛋白质结构功能及其相互关系等理性知识,推断已知序列的功能;在大量信息和知识的基础上,探索生命起源、生物进化以及细胞、器官和个体的发生、发育、病变、衰亡等生命科学问题。

4.1 生物信息学数据库

核酸和蛋白质这两大类生物大分子的序列是生物数据的主要组成部分。生物大分子的结构特点、功能分析等,使得生物数据呈爆炸式增长,加速了数据库数目的剧增和更新周期。《Nucleic Acids Research》杂志连续七年在其每年的第一期中详细介绍最新版本的各种数据库。迄今为止,生物学数据库总数已达500个以上(表1-3)

4.1.1 核酸和蛋白质数据库

目前比较常用的DNA序列数据库有3个:位于英国剑桥的欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory, EMBL);位于美国国家卫生研究院的GenBank(美国国家生物技术信息中心, National Center for Biotechnology Information, NCBI);日本DNA数据库(DNA

Databank of Japan, DDBJ)。这3个大型数据库共同享有并向世界开放,故这3个数据库又被称为公共序列数据库(Public Sequence Database)。所以从理论上说,这3个数据库所拥有的DNA序列数据是完全相同的。随着一些物种基因组全序列的完成,其基因组数据库也相继建立,如拟南芥(<http://www.arabidopsis.org/>)、水稻(<http://www.staff.or.jp>)。蛋白质序列数据库主要有2个:SWISS-PORT和PIR。近年来,SWISS-PROT 的序列数量呈直线增长。PDB是国际上主要的蛋白质结构数据库,虽然它没有蛋白质序列数据库那么庞大,但其增长速度很快。PDB 贮存有由X射线和核磁共振(NMR)确定的结构数据。NRL-3D 数据库提供了贮存在PDB 库中蛋白

4.1.2 数据库的应用

在很多数据库可以进行序列查询、同源比对、文献检索等工作。以 BLAST、FASTA 等为代表工具软件和相应的新算法大量被提出和研制,极大地改善了人类管理和利用分子数据的能力。BLAST(basic local alignment search tool)是进行同源性搜索的软件包,包括 BLASTn、BLASTp、TBLASTn、TBLASTx、BLASTx 五个子软件,执行核酸到核酸、核酸到蛋白、蛋白到核酸等同源性检索的任务。

4.2 生物信息学在植物研究中的应用

4.2.1 大规模基因组测序中的信息处理

基因组测序计划的实施与持续开展,使得研究重点已逐步从数据的积累转向数据的解释。大规模测序是基因组研究的最基本任务,它的每一个环节都与信息分析息息相关。从测序仪的光密度采样与分析、碱基读出、载体标识与去除、拼接与组装、填补序列间隙、基因的功能注释的每一步都离不开基因组信息学这个平台。

4.2.2 新基因的发掘

生物信息学的发展与应用,使得新基因的快速克隆成为可能。随着人类及一些模式植物,如拟南芥、水稻的基因组测序工作的完成,基因组学研究进入了基因提取和数据分析的新阶段。利用网上的生物信息学资源进行新基因的克隆已成为一种新的手段。到目前为止,相当一部分基因是依靠理论方法预测得到的。如啤酒酵母完整基因组(约1300万bp)所包含的6千多个基因,大约有60%是通过信息分析而来的。其策略主要有2个:(1)利用EST数据库,如Unigene(<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/schuler/unigene>) Merck-Gene index(<http://genome.wustl.edu/est/esthmpg.html>)和GenExpress-index(<http://www.cshl.org>)。这些基因检索数据库为新基因的发现提供了坚实的基础。(2)从基因组DNA序列中预测开放读框(Open-Reading Frame, ORF)。用NCBI提供的ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ORF Finder)程序搜索,对目的基因的cDNA序列进行ORF识别。利用BLAST程序在NCBI提供的相关物种的基因组重叠片段群数据库中进行电子杂交。

4.2.3 比较基因组研究

生物信息学是比较基因组研究的重要组成部分。比较基因组通常的做法是先用相同的一套cDNA 探针对不同物种进行作图,然后用生物信息学方法进行分析。现在发展成为用DNA 序列来

表 1-3 生物信息学相关数据库、服务器和中心

Table 1-3 Bioinformatic databases and websites

数据库	网址
Databases	websites
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL	http://www.ebi.ac.uk
GDB	http://gdbwww.gdb.org
PDB	http://www.pdb.bnl.gov
PIR	http://www.bis.med.jhmi.edu/Dan/proteins/pir.html
ExPASy Molecular Biology	http://expasy.hcuge.ch
Genome Sequence Database (GSDB)	http://www.ncgr.org ; 80/gsdb
Nucleic Acid Database (NDB)	http://ndbserver.rutgers.edu
DNA Data Bank of Japan (DDBJ)	http://www.nig.ac.jp
Structural Classification of Proteins (SCoP)	http://www.prosci.uci.edu/scop
University of Michigan Human Genome Center	http://www.hgp.med.umich.edu/Home.html
Baylor College of Medicine Human Genome Center	http://gc.bcm.tmc.edu:8088/home.html
Cooperative Human Linkage Center (CHLC)	http://www.chlc.org
Los Alamos National Laboratory Biosciences (LANL)	http://www-ls.lanl.gov/LSwelcome.html
Resource for Molecular Cytogenetics (UCSF/LBL)	http://rmc www.lbl.gov
Stanford Human Genome Center	http://shgc.stanford.edu
The Institute for Genomic Research (TIGR)	http://www.tigr.org
Washington University Center for Genetics in Medicine	http://ibc.wustl.edu:70/1/CGM
Yale University, Albert Einstein Center	http://paella.med.yale.edu
Sanger Centre (UK)	http://www.sanger.ac.uk
Genethon (France)	http://www.genethon.fr/genethon_en.html
HGMP Resource Centre (UK)	http://www.hgmp.mrc.ac.uk
C.elegans Genome Database (ACeDB)	http://moulon.inra.fr/acedb/acedb.html
Drosophila FlyBase (Harvard)	http://morgan.harvard.edu
Mouse Genome Database (MGD)	http://www.informatics.jax.org/mgd.html
Cattle Cytogenetic Map (Japan)	http://ws4.niai.affrc.go.jp/dbsearch2/cmap/cmap.html
Arabidopsis Genome Database (AAtDB)	http://weeds.mgh.harvard.edu
Maize Genome Database	http://teosinte.agron.missouri.edu/top.html
Rice Genome Research Program (Japan)	http://www.staff.or.jp
Agricultural Genome (National Agricultural Library)	http://probe.nalusda.gov
Mycobacterium Genome Database (MycDB)	http://kiev.physchem.kth.se/MycDB.html
HIV Sequence Database (Los Alamos)	http://hiv-web.lanl.gov
BioSCAN	http://genome.cs.unc.edu
Swiss Federal Institute of Technology	http://cbrg.inf.ethz.ch
Johns Hopkins University Bioinformatics	http://www.gdb.org/hopkins.html
QUEST Protein Database Center (CSHL)	http://siva.cshl.org
Weizmann Institute Biological Computing Division	http://dapsas1.weizmann.ac.il
NCI Laboratory of Mathematical Biology	http://www-lmmb.ncifcrf.gov
Bionet News Group Archives	http://www.bio.net

比较基因组的方法,尽管这对研究大多数种总基因组间的宏观共线性(macro-synteny)不太适用,但对研究部分区段的微观共线性(microcolinearity 或microsynteny)还是有效的(黎裕等, 2000)。

4.2.4 基于完整基因组序列的生物分子进化研究

随着分子生物学的不断发展,进化论的研究已经进入了分子水平。依赖于核酸、蛋白质序列信息为基础的分子进化研究已经成为探索生命起源与进化的重要研究手段。主要包括3个方面的工作:(1) 序列同源性分析。是将目的序列与来自不同物种的序列进行多序列比对,以判定同源性的。一般借助CLUSTAL软件来完成。(2) 构建分子进化树。依据多序列比对结果,重建反应物种间进化关系的分子进化树。通用的软件为PHYLIP、MEGA等。(3) 稳定性验证。在重建系统发育树时,要随机成千上百次的重复运算,只有以大概率(70% 以上)出现的分支点才是可靠的。一般运用Bootstrap算法。

4.2.5 大规模基因功能表达谱研究

面对诸多的基因及其核酸序列,我们又遇到了一系列问题,如何注释其功能,它们是如何按照特定的时间、空间进行表达、表达的程度如何?研究表明,不同组织中基因表达的数目以及每个基因的表达量差异较大。即便是同一组织在个体生长发育的不同阶段,表达基因的数目、种类也不相同。在此形式下,基因的功能表达谱应运而生了。目前,主要分为两个层次,即在核酸水平上的DNA芯片技术和在蛋白质水平上的蛋白质谱和蛋白质组学研究。

5 分子系统发育的研究进展

分子系统发育(Molecular Phylogeny)是指从分子水平上分析研究系统发育的规律及其关系。即通过分析生物分子(包括蛋白质、DNA和RNA及其它生物分子)的结构特点与变化规律来揭示系统发育本质与系统发育关系。

5.1 系统发育树

分子进化的一个重要内容就是根据核酸或蛋白质序列或结构进行构建系统进化树(phylogenetic tree)。它是描述生物有机体发生或进化顺序的拓扑结构。依据表达形式,可分为物种(或种群)树(species or population tree)和基因树(Gene tree)两种。

物种(或种群)树是指某些物种或种群分歧的历史及在每一次分歧后趋异时间的表现形式。对于很多生物来说,想知道确切其物种(或种群)树是非常困难的。一般是通过检测这类生物所包含的一些基因的进化关系来推断物种(或种群)树。基因树是指是基于一个基因的核酸或氨基酸序列所建立的系统发生树。基因树有时与物种(或种群)树不一致,特别是在基因组中存在2个或更多个基因拷贝的情况下。

5.2 系统发育树的构建方法

5.2.1 数据类型

用于构建进化树的数据有两类:一类是特征数据(character data),它提供了基因、个体、群体或物种间的信息;另一种是距离数据(distance data)或相似性数据(similarity data),它所涉及的则是成对或多个基因、个体、群体或物种的信息。

5.2.2 系统发育树的构建方法

常用于构建系统树的方法主要有两类：距离矩阵法 (distance matrix method), 离散特征法 (discrete-character based methods)。

距离矩阵法得到的是距离树。距离树的构建需要考察数据组中所有序列的两两比对结果, 通过序列两两之间的差异决定进化树的拓扑结构和树枝长度。它根据每对物种间的距离确定物种间的关系, 它的计算方法很直接, 所生成树的质量主要取决于距离尺度的质量。距离矩阵法中最常用的非加权组平均法 (Unweight Pair-Group Method using an arithmetic Average, UPGMA) 和邻结法 (Neighbor-Joining method, NJ), 前者将种类间距离定义为两个类的成员所有成对距离的平均值, 并广泛用于距离矩阵。当所有分枝的变异率相同时, 该方法能够得到较好的结果, 反之结果将会不尽人意。NJ 法由 Saitou 和 Nei 提出, 它通过确定距离最近 (或相邻) 的成对分类单位来使系统树的总距离达到最小。NJ 法构建的进化树相对准确, 而且计算快捷。其缺点是序列上的所有位点都被同等对待, 而且, 所分析的序列的进化距离不能太大。

离散数据法通过考察每一次比对的结果, 最后优化出最适合的进化树。这种分析方法涵盖的信息较距离矩阵法要多, 由于每次比对都存在一种假设, 所以可以追踪分子中某一特定位置的进化。离散数据法主要包括最大简约法 (maximum parsimony), 最大似然法 (maximum likelihood) 和贝叶斯法 (bayesian method), 其中前两种是目前使用较多的方法。

在实际的数据分析中, 如果序列数量足够大, 序列间的差异比较小, NJ, ML 和 MP 法得到的进化树的拓扑构型非常相似。构建进化树的目的是借助历史遗留下来的线索来反映历史上发生的事件, 使我们了解生命进化的历程, 但它毕竟不是历史本身, 仅仅通过模拟得到的结果有时仍然是不可靠的, 所以有时系统发生学家们通常采用多种方法来构建进化树, 通过比较不同方法得到的结果最终得到一个较为可信的结果。

5.3 系统发育分析软件包

随着分子进化研究的不断深入和发展, 一些系统发育分析软件包也应运而生 (表 1-4)。其中有些是免费的, 研究者可从互联网络上方便地下载。

5.4 系统进化树的构建

系统进化树构建可以大致分为几步：

(1) 序列相似性比较。将待研究序列与 DNA 或蛋白质序列库进行比较, 用于确定该序列的生物属性, 也就是找出与此序列相似的已知序列是什么。完成这一工作只需要使用两两序列比较算法。常用的程序包有 BLAST、FASTA 等；

(2) 序列同源性分析。将待研究序列加入到一组与之同源, 但来自不同物种的序列中进行多序列同时比较, 以确定该序列与其它序列间的同源性大小。这是理论分析方法中最关键的一步。常用的比对软件有 CLUSTALX 和 CLUSTALW, 前者是在 Windows 下运行的程序, 而后者是在 DOS 下运行的程序。比对的结果非常重要, 它直接决定着进化分析的正确与否。比对分析时由于软件本身的原因, 常会在比对结果中掺入一些 gap, 出现错误, 所以有时还需要用手工的方法来进行校正。

(3) 构建进化树。根据序列特征选择适当的建树方法, 设置正确的参数, 构建系统发育树。

为完成这一工作已发展了多种软件包，如 PHYLIP、MEGA 等；

(4) 对进化树进行评估。根据建树方法，选择合适的评估办法对进化树的真实性进行评估，得到可信的系统发育树。为了检验构建好的进化树的可靠性，需要进行统计可靠性检验，通常构建过程要随机地进行成百上千次，只有以大概率（70%以上）出现的分支点才是可靠的。通用的方法使用 Bootstrap 算法，相应的软件已包括在构建系统进化树所用的软件包当中。

表 1-4 分子进化分析相关软件及网址

Table.1-4 Softwares and websites of molecular evolutionary analysis

软 件 Software	网 址 Web site	说 明 Specificity
PHYLIP	http://evolution.genetic.washington.edu/phylip/software.html	目前发布最广，用户最多的系统树构建软件，由美国华盛顿大学 Felsenstein 开发，可免费下载，适用于多种操作系统
PAUP	Scavotto@sinauer.com or ftp://onyx.si.edu/paup	国际上通用的系统树构建软件之一，美国 simthsonian institute 开发
Tree of life	http://phylogeny.arizona.edu/tree/program/program.html	美国 Arizona 大学开发的构树软件
MEGA	http://bioinfo.weizmann.ac.il/databases/info/mega.sof	美国宾夕法尼亚大学 Mashatoshi Nei 开发的软件。对 DNA、mRNA、氨基酸序列及遗传距离进行系统发生分析。
MOLPHY	ftp://ftpsunmh.ism.ac.jp/pub/molphy	日本国立统计数理所开发的似然法构树软件。
PAML	http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html	英国 University college London 开发的似然法构树软件
TreeView	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html	英国 Glasgow 大学开发的软件，具有很强的看图功能
PUZZLE	ftp://fx.zi.biologie.uni-muenchen.de/pub/puzzle	应用 quarter puzzling 方法（最大简约法的一种）构建系统进化树
phylogeny	http://www.ebi.ac.uk/biocat/phylogeny.html	欧洲生物信息研究所（EBI）开发的分析软件
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/	常用的多序列比对的软件
BioEdit	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html	既可用于多序列比对，又可以进行进化分析的多功能软件，该软件的最大特点是便于手工矫正比对结果，而且非常直观。

5.5 系统发育研究

当前，系统发育是功能基因组学研究中的一个热点。当前功能基因组学的一个主要任务是在基因组水平上注释每一个基因或基因产物的功能。功能注释方法有三大类：(1) 同源基因功能注

释法 ;(2) 依据保守基元 (motif) 进行功能注释 ;(3) 定向进化同源基因族 (Clusters of Orthologous Groups, COG) 注释法, 即用不同种族的基因成对相似聚类法把它们划分成各种直系同源簇, 从而可以用同一簇中的已知基因注释未知基因的功能。目前的研究结果表明同源注释法会产生不少错误。由于一些保守的模体不是功能特异的, 所以利用保守的模体(motif)进行功能注释也不绝对可靠。COG注释法虽然提高了功能预测的准确度, 但仍然难以可靠地追踪同源基因在趋异进化中的功能演变事件, 所以也可能会错定直系同源簇。如果利用进化分析方法构建直系同源簇, 从中找到各直系同源簇的功能模体, 构建特异的功能模体库, 通过查询功能模体库, 最终实现对每一个基因或基因产物功能的高效、准确注释。

6 研究目的与意义

目前, 玉米已经成为超过小麦的第二大粮饲兼用作物, 其种植面积小于水稻和小麦, 居第三位, 总产量和单位面积产量则仅次于水稻, 居第二位。

目前, 我国正处在从传统农业向现代农业过渡的关键时期, 调整现有农业的种植结构, 让“粮食作物-经济作物-饲料作物”的三元结构取代“粮食作物-经济作物”的二元结构, 因地制宜地发展饲料作物生产, 促进畜牧业结构的调整, 是当前现代农业产业结构调整的方向之一。在现代农业产业结构中, 饲料作物占第一位。其中, 人工牧草占 80%, 玉米、小麦、燕麦等占 20%。西方国家饲料作物的土地面积占耕地面积比重, 荷兰高达 70%, 其中人工牧草面积占 56%; 而法国、西德等欧洲国家种饲料作物的耕地面积都占有所有耕地总数的 60%以上。

干旱是一种世界性的重大农业灾害, 是制约我国玉米生产的主要因素, 给玉米造成的损失大于其它非生物逆境的总和。从 1950 年至今, 平均每年因干旱直接减收玉米 260 万吨, 受害面积达 458 万公顷, 严重受灾 176 万公顷 (程殿龙, 2000)。我们玉米主产区主要位于干旱和半干旱地区, 在玉米水分敏感期 (播种期、幼苗期和开花-穗分化期), 经常干旱少雨, 造成产量和品质大幅度下降。

通过常规育种手段, 进行优异饲用玉米和抗旱种质创新, 已经取得了良好的效果 (Heisey and Edmeades, 1999; 王元东 等, 2002)。然而, 由于该途径要求大量的人力、物力, 而且选育周期较长。所以, 为了实现玉米育种家培育高产优质的饲用和抗旱品种的目标, 需另辟蹊径。

基因组学与生物信息学的出现与迅猛发展, 为开展上述研究提供了有利的契机, 一些在基因水平上研究相关性状的功能代谢与机制的技术相继问世并得到应用。其中, 基于同源序列的候选基因克隆技术和 cDNA-AFLP 技术是探索饲用和抗旱性玉米改良的重要方法。本研究在对植物漆酶基因的结构与功能、细胞位置、组织差异性表达、染色体位置及其分子进化机制等方面进行比较分析的基础上, 一方面利用同源序列的候选基因法, 进行黑麦草和玉米漆酶基因的克隆与分析, 另一方面, 利用 cDNA-AFLP 技术, 对水分胁迫条件下, 4 个玉米自交系材料在 PEG 干旱模拟胁迫、土壤干旱胁迫以及复水后一系列相关基因的差异表达情况进行深入研究, 确定与玉米抗旱相关的功能基因。从而为用遗传工程改良饲料作物消化率和增强玉米的抗旱性提供重要的物质基础和理论依据。

本研究的实施, 必将对青贮、青饲玉米以及抗旱品种的选育起到促进作用, 对于我国农业种植结构调整和畜牧业的发展以及实施高效节水农业的可持续发展均具有一定理论和实践意义。

第二章 基于生物信息学的植物漆酶比较分析

尽管有关漆酶的功能研究已经取得了重要进展,但是由于漆酶是一个相当复杂的基因家族,很多漆酶成员,尤其是有关植物漆酶的研究报道不多。另一方面,原核生物和真核生物中漆酶的底物非常广泛,更增加了人们对漆酶进化机制的困惑。随着模式植物拟南芥和水稻测序的相继完成 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) 以及生物信息学的迅猛发展和大量数据库的相继建立,为植物漆酶的研究提供了有力的工具。

本章对 64 个来自不同物种的植物漆酶基因,包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、棉花 (*Gossypium arboreum*)、黑麦草 (*Lolium perenne* L.)、松树 (*Pinus taeda*)、杨树 (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa*)、黄杨 (*Liriodendron tulipifera*)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 以及枫树 (*Acer pseudoplatanus* L.) 等的结构与功能、细胞位置、组织差异性表达、染色体位置及其分子进化机制等方面进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 漆酶氨基酸序列提取

在TAIR (The Arabidopsis Information Resource) (<http://www.arabidopsis.org/>) 数据库搜索到 17 个拟南芥漆酶基因。以其中一个拟南芥漆酶 (NP_56588) 的氨基酸序列为基础,在GRAMENE (A Comparative Mapping Resource for Grains) (<http://www.gramene.org/db/searches/blast>) 中的Rice_japonica_Genemodel_Proteins 数据库进行同源性搜索 (E值设为 1×10^{-10}), 共得到 41 个与之相匹配的结果。去除冗余序列和其它家族成员后,共得到 64 个植物漆酶基因 (表 2-1)。

1.2 序列比对和系统发育树的构建

利用 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) 软件进行多序列比对分析,输出格式为 phyip 形式。比对结果直接用于系统发育分析,系统发生树的构建采用 PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 1989) 软件。

1.3 信号肽和亚细胞位置预测

利用 TargetPV1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 iPSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) 进行蛋白质信号肽分类及亚细胞位置的预测。信号肽通常分为线粒体靶信号肽 (mitochondrion targeting peptide, mTP)、叶绿体靶信号肽 (chloroplast transit peptide, cTP) 和分泌靶信号肽 (secretory pathway signal peptide, SP) 3 类 (Emanuelsson *et al.*, 2000) (表 2-2)。

1.4 拟南芥漆酶基因的组织特异性表达

利用NASCArrays (Liu *et al.*, 2003) 程序研究 17 个拟南芥漆酶基因的特异性表达情况 (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/spothistory.pl>)。

1.5 拟南芥与水稻漆酶基因在染色体上的位置

依据在 GeneBank 得到的信息,将全部 17 个拟南芥和 27 个水稻漆酶基因分别定位于不同的染色体上。

表 2-1 本研究使用的植物漆酶

Table 2-1 Proteins of the LC gene family analyzed in this study

Name	Accession No.	Gene ID	Chromosome/ Location (Mb)	Name	Accession No.	Gene ID	Chromosome/ Location (Mb)
Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)				<i>Arabidopsis Thaliana</i>			
GRLC1	-	GRMP00000160993	1/36.4	AtLC1	NP_173252	At1g18140	1/6.2
GRLC2	-	GRMP00000160992	1/36.3	AtLC2	NP_180477	At2g29130	2/12.5
GRLC3	-	GRMP00000084962	12/8.8	AtLC3	NP_180580	At2g30210	2/12.9
GRLC4	-	GRMP00000160994	1/36.4	AtLC4	NP_565881	At2g38080	2/15.9
GRLC5	-	GRMP00000156089	1/35.1	AtLC5	NP_181568	At2g40370	2/16.9
GRLC6	-	GRMP00000159289	11/25.2	AtLC6	NP_182180	At2g46570	2/19.1
GRLC7	-	GRMP00000150816	3/10.4	AtLC7	NP_187533	At3g09220	3/2.8
GRLC8	-	GRMP00000090356	11/24.8	AtLC8	NP_195724	At5g01040	5/0.015
GRLC9	-	GRMP00000057784	9/10.7	AtLC9	NP_195725	At5g01050	5/0.02
GRLC10	-	GRMP00000110554	11/8.0	AtLC10	NP_195739	At5g01190	5/0.07
GRLC11	-	GRMP00000074187	11/21.4	AtLC11	NP_195946	At5g03260	5/0.8
GRLC12	-	GRMP00000074185	11/21.4	AtLC12	NP_196158	At5g05390	5/1.6
GRLC13	-	GRMP00000037843	2/31.1	AtLC13	NP_196330	At5g07130	5/2.2
GRLC14	-	GRMP00000155325	1/36	AtLC14	NP_196498	At5g09360	5/2.9
GRLC15	-	GRMP00000071872	11/24.4	AtLC15	NP_199621	At5g48100	5/19.5
GRLC16	-	GRMP00000066958	12/9.0	AtLC16	NP_200699	At5g58910	5/23.8
GRLC17	-	GRMP00000101560	11/0.39	AtLC17	NP_200810	At5g60020	5/24.2
GRLC18	-	GRMP00000101437	12/0.436	Loblolly pine (<i>Pinus taeda</i>)			
GRLC19	-	GRMP00000135543	7/0.06	AAK1	AAK37823	Lac1	-
GRLC20	-	GRMP00000155293	11/35.9	AAK2	AAK37824	Lac2	-
GRLC21	-	GRMP00000141832	5/21.3	AAK3	AAK37825	Lac3	-
GRLC22	-	GRMP00000155292	1/35.9	AAK4	AAK37826	Lac4	-
GRLC23	-	GRMP00000023807	10/14.9	AAK5	AAK37827	Lac5	-
GRLC24	-	GRMP00000151479	3/9.1	AAK6	AAK37828	Lac6	-
GRLC25	-	GRMP00000141826	5/21.3	AAK7	AAK37829	Lac7	-
GRLC26	-	GRMP00000155334	1/15.4	AAK8	AAK37830	Lac8	-
GRLC27	-	GRMP00000038242	10/9.8	Poplar (<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>Trichocarpa</i>)			
Cotton (<i>Gossypium arboreum</i>)				CAA1	CAA74104	Lac90	-
AAR1	AAR83118	GaLAC1	-	CAA2	CAA74105	Lac110	-
Yellow-poplar (<i>Liriodendron tulipifera</i>)				Tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)			
AAB1	AAB17191	Ltlac2.1	-	JCLC1	JC5229	JC5229	-
AAB2	AAB17192	Ltlac2.2	-	Ryegrass (<i>Lolium perenne</i> L.)			
AAB3	AAB17193	Ltlac2.3	-	AAL1	AAL73968	LAC5-6	-
AAB4	AAB17194	Ltlac2.4	-	AAL2	AAL73969	LAC2-1	-
Sycamore maple (<i>Acer pseudoplatanus</i> L.)				AAL3	AAL73970	LAC5-4	-
AAB5	AAB09228	-	-				

表 2-2 植物漆酶翻译多肽的相关特征

Table 2-2 Characteristics of translated polypeptides from plant laccase cDNAs

Laccase	Amino acids	N-glycosyl sites	MW (kDa)	Mature pI	TargetP	Ipsort	Laccase	Amino acids	N-glycosyl sites	MW (kDa)	Mature pI	TargetP	Ipsort
AAL1	579	13	61	9	S	S	GRLC13	579	?	64	6.4	S	S
AAL2	578	9	62	5.8	S	S	GRLC14	547	?	60	9.1	M	M
AAL3	610	14	59	5	-	CP	GRLC15	583	?	65	6.9	S	S
AAB1	570	18	61	9.3	S	CP	GRLC16	658	?	73	8.8	-	-
AAB2	585	19	61	9.3	S	S	GRLC17	567	?	62	6.4	S	S
AAB3	586	18	61	9.3	S	S	GRLC18	567	?	62	6.6	S	S
AAB4	585	17	61	9.5	S	S	GRLC19	583	?	63	9.5	S	S
AAB5	565	16	63	?	S	S	GRLC20	577	?	63	7.9	S	S
JCLC1	557	12	62	10	S	S	GRLC21	549	?	59	6.9	S	S
AAR1	566	23	?	?	S	S	GRLC22	577	?	63	7.6	S	S
AAK1	586	21	65	9.7	S	S	GRLC23	467	?	52	5.4	M	S
AAK2	576	9	60	8.5	S	CP	GRLC24	580	?	63	8.2	S	S
AAK3	574	17	60	9.6	S	M	GRLC25	513	?	56	9.5	-	M
AAK4	570	8	60	7.3	S	S	GRLC26	530	?	59	6.8	S	S
AAK5	591	21	61	9.5	M	S	GRLC27	531	?	58	6.9	S	S
AAK6	578	20	61	9.9	S	S	AtLC1	581	?	65	9.3	-	-
AAK7	555	12	59	8.9	S	S	AtLC2	573	?	64	9.9	S	S
AAK8	577	10	60	7.7	S	CP	AtLC3	570	?	64	9.9	S	S
CAA1	574	?	90	9.2	S	S	AtLC4	558	?	62	9.6	S	S
CAA2	580	?	110	9.5	S	S	AtLC5	580	?	64	9	S	S
GRLC1	692	?	72	9.7	-	-	AtLC6	569	?	64	9	S	S
GRLC2	580	?	63	6.1	S	S	AtLC7	567	?	62	9.2	S	S
GRLC3	537	?	59	6.1	S	S	AtLC8	584	?	65	8.1	S	S
GRLC4	551	?	60	6.4	S	S	AtLC9	586	?	66	7.6	S	S
GRLC5	599	?	66	6.5	S	S	AtLC10	553	?	61	9.9	S	S
GRLC6	562	?	61	7.5	S	S	AtLC11	557	?	62	9.1	S	S
GRLC7	681	?	73	8.3	S	S	AtLC12	565	?	63	9.6	S	S
GRLC8	564	?	62	9	S	S	AtLC13	484	?	53	7	S	S
GRLC9	577	?	63	7.7	S	S	AtLC14	569	?	65	10	S	S
GRLC10	595	?	66	6.7	S	S	AtLC15	565	?	64	7.5	S	CP
GRLC11	590	?	66	7	S	S	AtLC16	523	?	57	8.8	-	M
GRLC12	580	?	65	6.8	S	S	AtLC17	577	?	64	9.6	S	S

注：M：线粒体靶信号肽；CP：叶绿体靶信号肽；S：分泌靶信号肽

Note: M: mitochondrion targeting peptide; CP: chloroplast transit peptide; S: secretory pathway signal peptide

2 结果与分析

2.1 植物漆酶的结构特征

植物漆酶是蓝铜结合蛋白家族成员,通常含有一个至几个不等的保守区域。漆酶分子通常是典型的二聚体或四聚体糖蛋白。每个漆酶单体在其3个氧化还原位点(T1、T2、T3)位置含有4个铜原子(Cu1、Cu2、Cu3a和Cu3b)。研究证实这4个铜离子的电子顺磁共振(EPR)信号存在差异(Valderrama *et al.*, 2003)。Cu3a和Cu3b通常偶联在一起,结合于T3位点,其EPR信号为阴离子所激活。而Cu1和Cu2具有强烈的电子吸收值,很容易检测到EPR信号。Cu1是漆酶呈现蓝色的原因,T2和T3位点是氧分子还原生成水的场所(Clause, 2004)。这4个铜离子在催化位点处,共与8个组氨酸形成扭曲四面体几何构型。因此,在此保守区域最多可以有8个His-X-His基元(motif)。近几年来,枯草芽孢杆菌和灰色嗜粪菌漆酶蛋白的晶体结构都已报道(Ducros *et al.*, 1998; 2001; Enguita *et al.*, 2003)为进一步研究漆酶的结构特征提供重要线索。

为了分析植物漆酶的序列特征,将64个不同物种的漆酶的氨基酸序列进行比对,提取其中的一部分进行比较分析,可以发现几乎所有的材料中均有T1、T2、T3铜离子结合位点和N-末端糖基化位点分别存在于S1-S4区域中(图2-1)。几乎在所有供试材料中均发现两个保守的基元(motif)序列结构-HWHG和HLHG分别位于S1和S3区域。一些文献(Mann *et al.*, 1988; Messerschmidt and Huber, 1990; Ouzounis and Sander, 1991; Askwith *et al.*, 1994)报道多铜氧化酶的T1铜离子中心有一段21个残基的信号序列G-X-[FYW]-X-[LIVMFYW]-X-[CST]-X8-G-[LM]-X3-[LIVMVYW]。Suresh等(2003)对64个真菌漆酶和40个植物漆酶家族进行序列和结构分析时也发现,在所有植物漆酶的C末端均存在一段21个残基的信号序列-G-V-W-(FLI)-(FML)-H-C-H-(FMLI)-(DE)-X-H-X2-W-G-L-X-M-X-(WF)。本研究的结果与其相吻合,在S4区域的T1铜离子结合中心也发现了这样一段21个残基的信号序列-GVWFMHCHLE--H--WGL-M-F。鉴于这些序列上得高度保守和相似性,人们推断漆酶基因家族的功能蛋白可能发生了复制。尤其是,在铜离子活性结合位点,T1、T2、T3的高度保守性,从进化的观点来看,漆酶是一个非常古老的酶,酶活性紧密连锁于3个铜离子结合位点,也说明该特性可能是长期生物学演化的结果(Messerschmidt and Huber, 1990; Mayer and Staples, 2002)。

2.2 植物漆酶的系统发生关系

从所构建的系统发生树可以看出,所有供试材料分为两个大的进化枝和两个小类群(图2-2)。

进化枝I包括3个水稻漆酶(GRLC20、GRLC21、GRLC22)和一个黑麦草漆酶(AAL1)。它们均属于单子叶植物,且含有分泌蛋白的N末端信号肽特征。

进化枝IIa由3个类群组成,包括12个水稻漆酶和2个黑麦草漆酶,属于单子叶植物。由此,我们推断它们可能起源于同一个祖先。TargetP和iPORT分析表明,关系密切的AAL3和GRLC1均不含N末端信号肽序列。通常说来,大多数植物漆酶为细胞外蛋白,参与分泌途径和木质素的生物合成(LaFayette *et al.*, 1999)。然而,最新的研究发现,有些漆酶并非属于此类蛋白,比如从黑麦草茎克隆的漆酶AAL3,却具有了细胞内分泌蛋白的特征。所以,我们推测植物漆酶不只是参与细胞壁木质化,可能还具有其它功能。

	S1 103	S2 263	S3 504	CHO S4 542
AAB2	NITLHWHGVRQLRSGW	FSIANHTLTIVDVAIVYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	SWVAIRFQADNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
AAB4	NITLHWHGVRQLRSGW	FSIANHTLTIVDVAIVYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	GWVAIRFQTDNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
AAB3	NVTLHWHGVRQLRSGW	FSIANHTLTIVDVAIVYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	GWVAIRFQADNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
AAB1	NVTVHWHGIRQLQNGW	FGIASHTITVVEVDATYK	HLLHLHGFNFVVGQGFN	GWAAIRFRADNPGVWFMHCHFD-VHWSWGLKMAW
AtLC17	NISLHWHGIRQLRSGW	FSIANHTVTVEADAIYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	GWAAIRFLADNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
CAA2	NITIHHWGVRLTTGW	FSIANHTLTVEADAVYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	GWIAIRFLADNPGVWFMHCHLD-VHWSWGLKMAW
AtLC2	NISLHWHGIRQLRSGW	FTIANHTLTVEADACYK	HPILHLHGFNFVVGQGFN	GWVAIRFLADNPGVWLMHCHIE-IHLSWGLTMAW
GRLC24	NITIHHWGVRLMRTGW	FSVANHTLTVDVDASYK	HPLHLHGFDFVVGQGTGN	GWVAIRFFADNPGVWFMHCHLE-VHTTWGLKMAW
GRLC20	NMSLHWHGIRQLRSGW	FSIAGHTLTVDVDASYK	HPFHLHGFNFVVGQGFN	GWVAIRFLVDNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
GRLC21	NMSLHWHGIRQLLSGW	FSIANHTLTVDVDALYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	GWVAIRFHADNPGMYSEPHRF-CDSTFAPT---
GRLC22	NISLHWHGVRQVRTGW	FAVANHTLTVEVDAYYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	GWVAIRFLADNPGVWFMHCHLE-AHTTWGLRMAW
AAL1	NMSLHWHGIRQLTTGW	FSVANHTLTVEVDAYYK	HPLHLHGFNFVVGQGFN	GWVAIRFLADNPGVWFMHCHLE-VHTTWGLRMAW
GRLC14	NVSFHHWGLQLLRNGW	FGIANHTLTVEADANYK	HPLHMHGFNFVVGQGFN	GWVAVRFLADNPGVWLMHCHFD-VHLSWGLSMAW
GRLC25	NVTFHHWGIQVRSGW	FGVANHTLMVVDASYK	HPLHLHGFNFVVGTFGN	GWVAIRFVADNPG-WLPALYLY-LHLKR---EF
AAK5	NVTIHHWGIQRLRSGW	LAIANHSMTVVEVDAYYK	HPVHLHGFNFVVGQGVN	GWAAIRFRADNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
AAK6	NVTIHHWGVRLRSGW	LAIANHSLTVVEVDAYYK	HPFHLHGFNFVVGQGVN	GWMAIRFRADNPGVWFMHCHLE-IHKSGLKMAW
AAK1	NVSIHHWGIQRLRSGW	IAIANHTMTVVEIDALYK	HPVHLHGFNFVVGQGFN	GWVALRFRADNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
AAK3	NVTIHHWGIQIRSAW	FAIANHTVTVEIDALYK	HPLHLHGYDFVVGQGTGN	GWVAIRFLADNPGVWFMHCHLE-VHWSWGLKMAW
AtLC4	NVSIHHWGVRLRSGW	FKVAGHIFTVVEVDAYYK	HPVHLHGFNFVEVGRGLN	GWVIRFRADNPGVWFMHCHLE-VHTTWGLKMAF
JCLC1	NLSLHWHGIRQLRTGW	FKIAGHKMTVVEVDATYK	HPILHLHGFNFVVGKIGN	GWVAIRFRADNPGVWFMHCHLE-IHTTWGLKMAW
AtLC10	NVSIH-HGIRQLRTGW	FKIAGHRFTVVEVDAYYK	HPILHLHGFNFVVGKIGN	GWAAIRFRADNPGVWFMHCHLE-VHTTWGLKMAF
AtLC16	NVSIH-----WTGW	FKIAGHVLTVVEVDAYYK	HPFHLHGFNFVEVGRGLN	GWTAIRFADNPGVWFMHCHLE-LHTTWGLKMAF
GRLC8	NVTIHHWGVRLRTGW	FKVAGHELTVEVDAYYK	HPILHLHGFNFVVGKGVN	GWTAIRFRSDNPGVWFMHCHFE-VHWSWGLKMAF
AAK7	NVSIHHWGIQRLRTGW	FGVANHHLTVVEVDAYYK	HPVHLHGFNFVVGKGVN	GWTVIRFRADNPGVWFMHCHLE-VHTTWGLKMAF
AAK8	NVSIHHWGIQRLRTGW	FEVANHLTVVEVDAYYK	HPMHLHGFNFVVGSGFNG	GWTVIRFRADNPGVWFMHCHLE-VHTTWGLKMAF
AtLC11	NMSLHWHGLKQYRNGW	FGIAGHNMTVVEIDAYYK	HPFHLHGFNFVVGTVGN	GWAAIRFRADNPGVWFMHCHLE-VHTMWGLKMAF
GRLC6	NMTIHHWGLKQRRNGW	FSIAGHNMTVVEIDATYK	HPFHLHGFNFVVGKGVN	GWTAIRFRADNPGVWFLHCHLE-VHWSWGLKMAF
AtLC1	NTTIHHWGLRQYRTGW	VAVANHTLTVEVDAYYK	HPLHVGHNFFVVGKGVN	GWAAIRINADNPGVWFHCHLE-QHTSWGLAMGF
AtLC3	NISLHWHGIRQLRNGW	FSVANHQFTVVEVDATYK	HPMHLHGFNFVVGSGFNG	GWVAIRFVADNPGVWFMHCHID-SHLGWGLAMVF
AtLC13	NISLHWG-IQRRNPW	FGVANHKLTVVADASYK	<i>HPMHLHGYEFYVVGTVGN</i>	GWVAIRFVANNPGAWLMHCHID-SHIFWGLAMVF
AtLC5	NITIHHWGVRLMRTGW	FTVANHKLTVVADASYL	HPILHLHGYDFYIAEGFGN	GWAVIRFADNPGVWIMHCHLD-AHISWGLAMAF
AtLC12	NITIHHWGVRLRTGW	FTVANHKLTVVADASYL	HPILHLHGYDFYIVGEGFGN	GWAVIRFVADNPGVWLMHCHLD-VHISWGLAMAF
CAA1	NVTIHHWGIQRLMRTGW	FTIANHKTTVVADASYK	HPILHLHGFNFYIVGEGFGN	GWAVIRFVADNPGVWLMHCHLD-VHISWGLAMAF
GRLC17	NMTLHWHGVRLMRTGW	VSLAGHNMTVVAADASYK	HPILHLHGYDFYIAEGLGN	GWAVIRFVADNPGVWLMHCHLD-VHISWGLAMAF
GRLC18	NVTLHWHGVRLMRTGW	VSLAGHNMTVVAADASYK	HPILHLHGYDFYIAEGLGN	GWAVIRFVADNPGVWLMHCHLD-VHISWGLAMAF
GRLC5	NVTIHHWGIQRFRTGW	VSLAGHKMTVVAADASYK	HPILHLHGYDFYIAEGLGN	GWAVIRFVADNPGVWLMHCHLD-VHISWGLAMAF
GRLC7	NVTLHWHGVRLRNGW	VSLAGHKMTVVAADASYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	GWAVIRFVADNPGVWLMHCHLD-VHISWGLAMAF
AAK2	NATIHHWGVRLRRTGW	FSISGHTMTVVAADALYK	HPILHLHGYDFYIVGAGFGN	GWAAIRFVADNPGAWVMHCHLD-VHISWGLAMVF
AAK4	NATIHHWGVRLRRTGW	FTVGGHTMTVVAADALYK	HPILHLHGYDFYIVGSGFGN	GWAAIRFVADNPGAWVMHCHLD-VHISWGLAMVF
AtLC6	NTTIHHWGIQKRCSCW	FTIANHRLTIVEVDGEYK	HPILHLHGHSFYVIGYGTGN	GWAAIRFVANNPGLWLLHCHFD-IHOTWGMSTMF
AtLC14	NITLHWHGARQIRNPW	FAIANHTLTVAADASYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	GWTAVRFLADNPGVWLMHCHID-AHATWGMNTVF
AtLC15	NITMHHWGE-QPRNPW	FAIANHSLTVVSADGHYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	GWIAIRFVADNPGVWFMHCHLD-RHOTWGMNVVF
GRLC13	NITIHHWGVLDQPRNPW	FAIAGHRLTVVGIDARYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	GWAAIRFRADNPGVWFMHCHFD-RHVWVGMNTVF
GRLC26	NITIHHWGVLDQPRNPW	FAIAGHRLTVVGIDARYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	SWAAIRFRADNPGVWFMHCHFD-RHVWVGMNTVF
GRLC23	ILLHWHGVLDQPRNPW	FAVAGHCLTVSIVDARYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	SWAAIRFRADNPGVWFMHCHFD-RHVWVGMNTVF
GRLC15	NITIHHWGVLDQPRNPW	FAVSGHRLTVVGIDARYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	GWAAIRFRADNPGVWFMHCHFD-RHMVWGMNTVF
AAR1	GFTIHHWGVKQPRNPW	FTIANHTLTVAADASYR	HPILHLHGSFVVGTVGFGN	RWVAIRFFATNPGVWFMHCHLE-RHSSWGMNTVF
AAB5	GITIHHWGVKMPRNPW	FGIAQHNLRVVGTGDFYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	GWAAIRFVADNPGVWFLHCHFE-RHTTWGMMAVAI
GRLC9	NVAIHHWGIQRLGTPW	FEIEGHEMTVVEADGYK	HPMHLHGFNFVVLATGFGN	GWTALRFRADNPGVWFAFHCHIE-AHFFMGMGIVF
AtLC8	NVTIHHWGVFQLKSVW	FKIANHNTTVVAVDAVYST	<i>HPMHLHGFNFVVLGYGFGN</i>	GWVLRIRFANNPGVWFLHCHMD-AHLPGYIMSAF
AtLC9	NVTIHHWGVFQLKSVW	FKIANHNTTVVAVDAVYT	HPMHLHGFNFVVLGYGFGN	GWVLRIRFANNPGVWFLHCHMD-AHLPLGIMMAF
AtLC7	NITIHHWGIQFHLTVW	FKIANHRLTVVAVDAVYTA	HPMHLHGFNFVFLAQGFN	GWAVIRFTANNPGAWIFHCHID-VHLPFGLGMIF
GRLC1	NLTIHWHY-----VTNCP	FKVAGHAFTVVAADACYTA	HPILHLHGFNFVFLAQGLN	GWAVIRFVANNPGGNAPREAGD-ARAATVSTQR
AAL3	NLTIIHHWGIQMLRTPW	FKVAGHNTTVVAVDACYTA	HPILHLHGFNFVFLAQGLT	GWVIRFLANNPGYWFHCHLD-AHVPMLGLGMVF
GRLC4	PLSLHWHGVYQLRSGW	FKVAGHTFTVVAADASYK	HPILHLHGFDFYLLAQGLGR	GWAVIRFMANNPG-----EPAALNLFPLPY
GRLC3	NMTIHHWGIQFQRTGW	FKVANHSFNVAADACYK	HPMHLHGFNFVFLAQGFN	GWAVIRFVADNPD-----
GRLC16	SMTLHWHGVQLQRTGW	FKVAKHRLTVVADACYK	HPMHLHGFNFVFLAQGFN	GWAVIRFVADNPGMWMHCHFD-AHISLGLAMVL
GRLC2	NVTVHWHGVFQRTGW	FKVAGHTFTVVAADASYTE	HPMHLHGFNFVFLAQGFN	GWAVIRFVADNPGMWMHCHID-SHFAIGLAMVF
GRLC19	NITIHHWGVQLQLSAW	FKVAAHNFTVVAADACYTD	HPLHLHGFNFVFLAQGTGN	GWAVIRFTADNPGVWLMHCHLE-AHLPLGLAMAF
GRLC11	GLTIHHWGVRLMRSCW	FRVAGHTFTVVGADGNYLT	NPMHLHGYDVFLAQGLGN	GWAAIRFVTDNPGMWWYLHCHFE-FHIMGMATAF
GRLC12	GLTIHHWGVRLMRSCW	FKVAGHTFTVVGADGNYLT	NPMHLHGYDVFLAQGLGS	GWAARFIRTDNPGMWWYLHCHFE-FHIMGMATAF
GRLC10	GLTIHHWGVRLMRSCW	FKVAGHTFTVVGADGNYLT	NPMHLHGYDVFLAQGLGN	GWAARFIRTDNPGMWWYLHCHFE-FHIMGMATAF
GRLC27	NLTIIHHWGVYQLLNCW	LKIAGHRFTVVASDANYLT	NPMHLHGHDFVFLAQGIGN	GWAARFIRFADNPGAYRS-----IGFSCAH
AAL2	GVTIHHWGVKQRLTCW	FKVAGHRLTVVGSADANYLR	NPMHLHGHDFVFLAQGIGN	GWAARFIRFADNPGWFLHCHYE-FHMGGMATVF
Consensus	N-TIHHWGV-QR---W 2 3	F-VA-H-TVV--DA-Y-K 1	HP-HLHGF-FF-L-QG-GN 1 2 3	GW-AIRF-ADNPGVWFMHCHLE-H--WGL-M-F 313 1

图2-1 64个植物漆酶基因的氨基酸序列比对结果。

黑色阴影为保守序列区域；CHO为糖基化位点。1、2、3为铜离子结合类型。

Fig. 2-1 Four selected sections (S1-S4) from the multiple sequence alignments of 64 plant laccases. The highly conserved copper-binding sites to which each of the ligand residues is bound are highlighted in dark gray background and conserved potential N-linked glycosylation sites are designated by CHO. The numbers 1, 2, and 3 mark the amino acid residues that are involved in type 1, 2, and 3 copper coordinations, respectively.

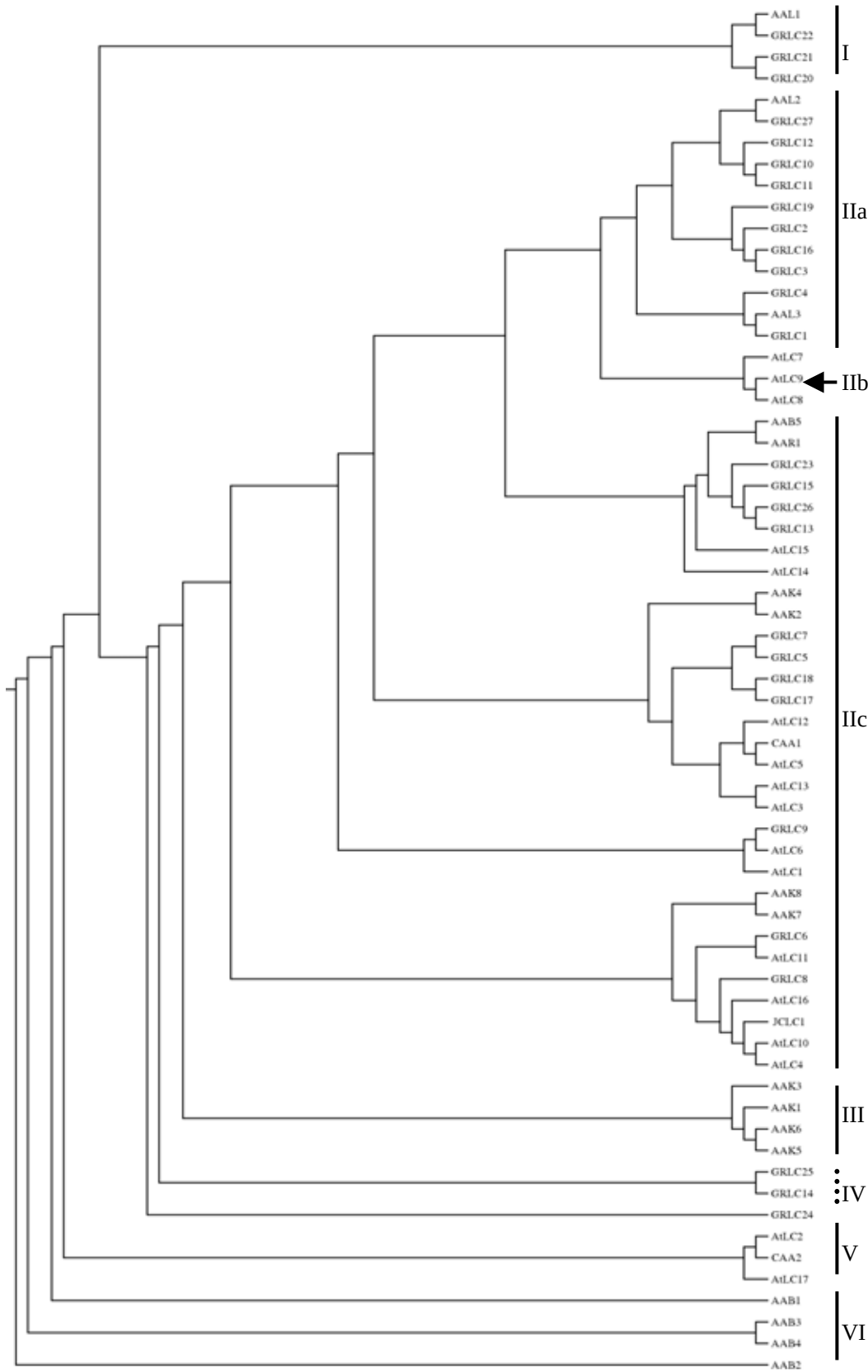


图 2-2 植物漆酶的系统发生关系.

Fig. 2-2 Phylogenetic relationships between LCs from plants.The tree was constructed using Phylip 3.6.

进化枝IIb 由3个拟南芥漆酶 (AtLC7、AtLC8 和 AtLC9) 组成。进化关系密切的AtLC8 和 AtLC9 均位于拟南芥第5条染色体长臂的始端, 而且它们的 pI 值比较接近, 低于AtLC7。从 NASCArrays ([Nottingham Arabidopsis Stock Centre's](#) microarray database) 所提供的实验数据可以看出, AtLC7 和 AtLC8 在幼苗和根部均大量表达。而AtLC9 的表达情况该数据库没有给出。

进化枝IIc 由31个不同来源的植物漆酶组成, 包括拟南芥、水稻、松树、杨树、枫树棉花和烟草。在此分支中, 水稻漆酶GRLC23、GRLC15、GRLC26、GRLC13 和 GRLC5、GRLC7、GRLC17、GRLC18分别归属于两个不同的类群; 松树漆酶 AAK2、AAK4 和AAK7 和 AAK8 也分别归属于两个不同的类群。其中松树的分类结果与 Sato 等 (2001) 的研究结果相一致。而其余成员则分散在不同的类群中。因此, 我们也可以看出植物漆酶是一个高度趋异的基因家族, 不同物种之间, 乃至同一物种之间的遗传关系差异也很大, 这与以前的研究相符合 (Ranocha *et al.*, 1999; Gavnholt *et al.*, 2002)。

进化枝III 由4个属于裸子植物的松树漆酶 (AAK1、AAK3、AAK5 和 AAK6) 组成。其 pI 值 (等电点) 非常相近均在9.60左右; 糖基化位点分别为 21、17、21和20个, 远远大于本研究的其余4个松树漆酶 (AAK2、AAK4、AAK7、AAK8 的糖基化位点分别为9、8、12、10), 而这。所有的松树漆酶均有一段N末端的信号肽序列。TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) 预测显示除 AAK5为线粒体途径外, 其余7个松树漆酶均直接通过分泌途径被释放出来。此结果也从一个侧面反应了漆酶可能位于细胞壁, 参与木质素的生物合成 (Sato *et al.*, 2001)。这8个松树漆酶的糖基化位点数目的巨大差异也揭示了漆酶可能具有不同的功能。糖基化位点数目相近的成员聚在了一起。Northern 分析发现, 它们在未成熟的次级木质部中显著表达。由此推测, 它们在木质部形成过程中起作用, 可能参与木质素的生物合成, 这与已经开展的关于杨树和黄杨漆酶的研究结果相一致 (Ranocha *et al.*, 1999; LaFayette *et al.*, 1999)。

进化枝IV 由3个水稻漆酶 (GRLC14、GRLC24、GRLC25) 组成。关系较为密切的GRLC14 和GRLC25 均位于线粒体细胞器中, 通过线粒体途径分泌。而GRLC24 则直接分泌到细胞外。

进化枝V 由两个拟南芥漆酶 (AtLC2 和 AtLC17) 及一个杨树漆酶 (CAA2) 组成。值得注意的是, 从NASCArrays ([Nottingham Arabidopsis Stock Centre's](#) microarray database) 数据库的结果可以看出, AtLC2 和 AtLC17 均在拟南芥的茎部大量表达, 而且实验已经证明CAA2 也在杨树的茎部专一性大量表达 (Ranocha *et al.*, 1999)。

进化枝VI包括4个黄杨漆酶 (AAB1、AAB2、AAB3、AAB4)。这4个成员在氨基酸水平上具有高度的同源性 (79-91%), 与其它蓝铜氧化酶也具有显著的相似性。漆酶蛋白均具有N末端信号序列, 并含有17-19个数目不等的N结合糖基化位点。其等电点值 (pI) 在9.3-9.5之间。它们在木质部差异表达。PSORT分析表明, AAB2和 AAB4具有不可切割的信号序列 (LaFayette *et al.*, 1999)。

植物在长期进化过程中, 基因的复制必然会导致基因家族的增殖和多样化。本研究中, 不同物种间漆酶基因的数目差异较大。这可能与相应物种的基因组大小有关。到目前为止, 我们得到 17 个拟南芥漆酶基因、27 个水稻漆酶基因以及 36 个玉米漆酶 (部分序列)。Gavnholt 等 (2002) 研究发现在黑麦草中至少有 25 个漆酶基因。我们知道拟南芥、水稻、玉米以及黑麦草的基因组大小分别为 125Mb、430Mb、2500Mb 和 4000Mb。因此, 我们推断植物漆酶基因家族中成员的多少是否与其基因组大小有一定的联系 (图 1-3)。当然, 来自玉米的 36 漆酶基因均为漆酶基因片段, 而且由于该研究项目是与公司合作, 所以有关其功能一直没有公布(私人通讯)。来自水稻的大多

数漆酶候选基因的功能也不得而知。黑麦草的 25 个漆酶基因中，只有 3 个是全长序列。

由分子进化树和氨基酸多序列比对结果也可以看出，植物漆酶是一个高度趋异的多基因家族。尽管几乎所有的植物漆酶中均含有高度保守的铜离子结合区域，但是不同物种乃至同一物种之间，在氨基酸序列水平上的同源性却较低。如黑麦草漆酶，AAL1、AAL2 和 AAL3 以及枫树漆酶 CAA1 和 CAA2 均分散到不同的类群中。

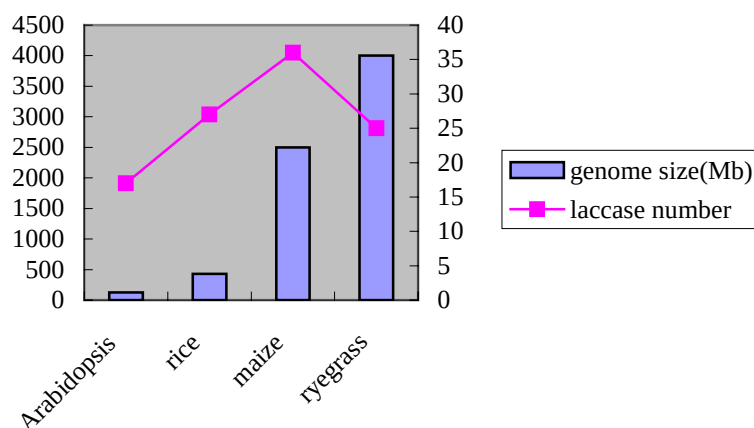


图 2-3 植物漆酶基因家族成员数目与基因组大小的相关性。

Fig. 2-3 Correlation between plant genome size and laccase numbers

2.3 拟南芥与水稻漆酶基因在染色体上的位置

植物和真菌漆酶基因家族大小的差异，使得我们不得不提出疑问：漆酶基因家族是究竟是如何在植物世系中增殖的？为了解决这个疑问，我们利用 27 个水稻漆酶基因和 17 个拟南芥漆酶基因，分别构建两个模式植物的染色体图谱 (图 2-4、图 2-5)。

27 个水稻漆酶中，有 9 个位于第 1 号染色体上，6 个位于第 11 号染色体上。这就意味了超过一半的漆酶成员集中在 2 条染色体上。水稻第 1 号染色体上的漆酶基因分散在 3 个不同的区段，从 GRCL26 到 GRCL1 跨越了 21Mb。GRCL26 位于区段 1 (15371897-15374072 bp)；GRCL6 位于区段 2 (25214631-25216628 bp)。区段 3 为 GRCL5 和 GRCL1 之间 (1.3Mb)，该区域位于 C126435 和 C15960 标记之间 (Sasaki *et al.*, 2002)。核苷酸序列分析表明，位于第 1 号染色体上的漆酶基因 G+C 含量很高，这与 Sasaki 等 (2002) 的研究相吻合。位于第 11 号染色体上的漆酶基因，聚集于 3 个区段。其中，GRCL8、GRCL11、GRCL12、GRCL15 位于短臂末端。与已经发表的水稻双二倍体的第 11 号染色体图谱相比较，我们发现 GRCL11、GRCL12 和 GRCL15 与水稻的一个 MYB 转录因子的克隆在染色体上的位置相近 (Lee *et al.*, 2001)。Gavnholt & Larsen (2002) 研究发现，黑麦草漆酶基因 *LpLAC5-4* 也含有 6 个调控漆酶基因功能的 MYB 调控转录因子的结合位点。该研究小组也发现，MYB 基因在木质部组织高度差异表达，其过量表达能够抑制酚酸类化合物代谢和木质化途径。

17 个拟南芥漆酶基因只有 AtLC1 和 AtLC7 分布于第 1、4 号染色体，其余则密集分布于第 2、5 号染色体。依据已经发表的拟南芥基因组部分复制区域，我们发现在第 3 号染色体的 AtLC7 和第 5 号染色体的 AtLC8、AtLC9、AtLC10、AtLC11 和 AtLC12 之间发生了基因复制。

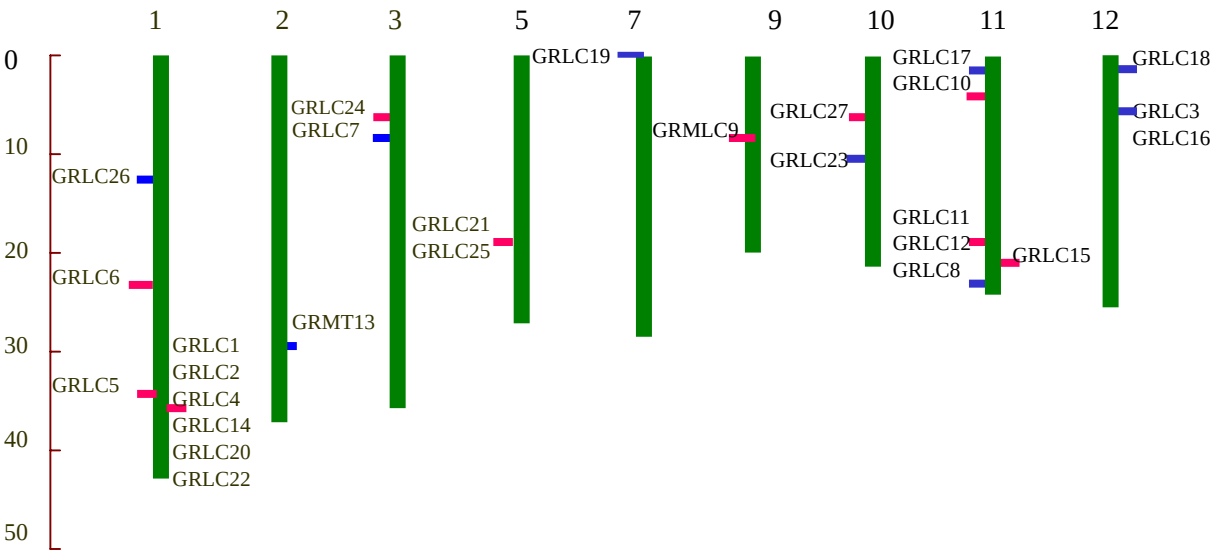


图 2-4 水稻漆酶在染色体上的分布

Fig. 2-4 Distribution of rice laccase genes on chromosomes

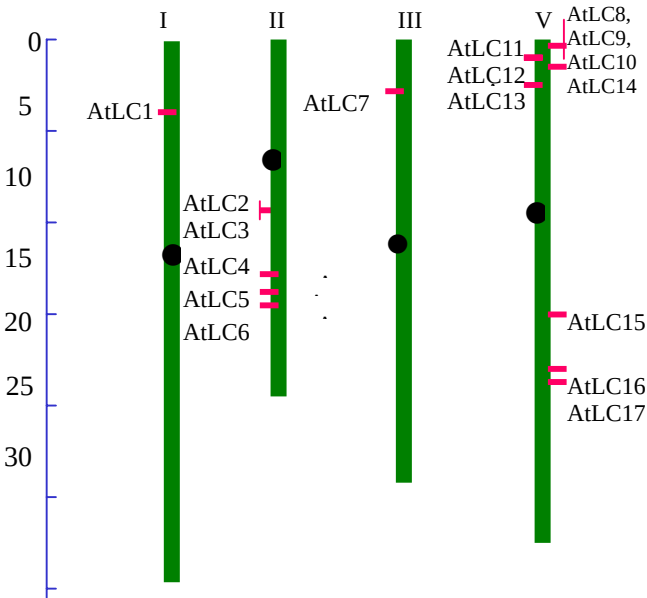


图2-5 拟南芥漆酶在染色体上的分布

Fig.2-5 Distributions of *Arabidopsis* laccase genes on chromosomes

2.4 拟南芥漆酶基因功能注释及组织特异性表达

从表2-3可以看出，大多数拟南芥漆酶属于二元酚氧化酶家族蛋白，具有铜离子结合、内膜系统和漆酶活性的特征，并参与木质素的生物合成。通过Genechip Spot Histories程序，利用Affymetrix probesets 对16 个拟南芥漆酶基因 (AtLC9 没有找到相关的研究结果) 在7个不同组织中的表达情况进行数字化 Northern 分析比较 (表2-4)。结果显示，多数基因在根和茎组织强烈表达。AtLC2 和 AtLC17在不同组织的表达模式基本相同，二者在茎组织显著表达，而且它们的序列非常相似。AtLC7 和 AtLC8 也具有相似的情况，二者在根部均强烈表达，而且其序列的同源性也很高，在分子进化关系图谱中同属于一个类群。植物漆酶基因的差异表达在其它物种，如黑麦草、杨树和松树等中也有报道 (Gavnholt *et al.*, 2002; LaFayette *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2001)。利用转基因植株研究漆酶的负调时，分析转化子的木质素含量和组成没有明显的变化 (Ranocha *et al.*, 2002)。将大量的植物漆酶基因组织特异性表达数据与先进的分子和遗传学工具相结合，是深入探讨植物漆酶功能的有效途径。

经过以上多个方面的比较分析，我们也可以看出，植物漆酶除了参与木质素的生物合成外，还可能具有其它功能。这主要是因为：同一物种的不同漆酶成员在序列上差异很大；在单子叶和双子叶植物中均有细胞外和细胞内漆酶蛋白；糖基化位点数目和等电点值的变化范围都很大 (8-23 和 5-10)；漆酶的催化底物广泛；在不同组织中差异表达。

单子叶植物漆酶基因的不足，给漆酶在木质素单体生物合成中的作用带来了一定难度。另一方面，目前所鉴定的植物漆酶大多是通过生物化学或分子生物学途径，同时在这2个方面开展研究工作的报道很少。这也使得我们对植物漆酶的生化特征及分子特征的理解增添了障碍。

表2-4 拟南芥漆酶基因的组织特异性表达

Table2-4 Laccases Gene Expression in Tissue-specific of *Arabidopsis*

组 织	整个植株	幼 苗	细胞悬液	叶	根	茎	芽
Tissue	Whole plant	Seedlings	Cell suspension	Leaf	Root	Stem	Bud
AtLC1	+	+	+	+	++	+	+
AtLC2	+	+	+	+	+	+++++	+
AtLC3	++	++	+	+	+++++	+	+
AtLC4	+	+	++	+++	++	+++++	+++
AtLC5	++	+	+++++	+	++	++	+
AtLC6	+	+	+	+	+	+	+
AtLC7	++	+++++	+	+	+++++	+	+
AtLC8	+++	++++	+++	+	+++++	+	+
AtLC10	+	+	+	+	+	+	+
AtLC11	++	+	+	+	++	++	+
AtLC12	+	+	+	++	+	++++	+
AtLC13	+	+	+	+	++	+	+
AtLC14	+	+	+	+	+	+	+
AtLC15	+	+	+	+	+	+	+
AtLC16	+	+	+	+	+	+	+
AtLC17	+	+	+	+	++	++++	++

Spot signal value + = 0-200; ++ = 201-400; +++ = 401-600; ++++ = 601-800; +++++ = 801-1000; ++++++ = >1001

表2-3 拟南芥漆酶基因的功能注释

Table 2-3 Function annotations of *Arabidopsis* laccase genes

功 能 Putative functions	基因 Gene	特性描述 Descriptions of laccase characters	证据描述/参考文献 Evidence Code/Evidence Description
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT2G46570.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/ none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G03260.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Kiefer-Meyer, et al. (1996)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT3G09220.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G01190.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Kiefer-Meyer, et al. (1996)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G01040.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G01050.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G05390.1	laccase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis	AT5G58910.1	laccase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity/none Kiefer-Meyer, et al. (1996)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G48100.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G60020.1	laccase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity-none LaFayette, et al. (1999)
membrane, copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G07130.1	laccase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT2G40370.1	laccase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity/none: Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT5G09360.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT2G29130.1	laccase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity/none LaFayette, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT2G38080.1	laccase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity/none: Kiefer-Meyer, et al. (1996)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis	AT1G18140.1	laccase family protein / diphenol oxidase family protein	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)
copper ion binding, laccase activity, lignin biosynthesis, endomembrane system	AT2G30210.1	accase, putative / diphenol oxidase, putative,	inferred from sequence or structural similarity/none Ranocha, et al. (1999)

3 小 结

通过对64个植物漆酶的氨基酸序列比对发现，几乎在所有的材料中均存在两个保守的motifs（HWHG和 HLHG），这为我们利用基于同源序列的候选基因法进行黑麦草和玉米漆酶基因的克隆研究提供了重要依据。

一方面，由于拟南芥至少有17个漆酶基因、水稻至少有25个漆酶基因。、水稻、玉米和黑麦草基因组的大小分别为：125 Mb, 430 Mb, 2500 Mb 和4000 Mb。由此我们推测，玉米和黑麦草中应该有更多的漆酶基因成员。另一方面，由于植物漆酶在糖基化位点数目、等电点值、催化底物、组织表达以及染色体上发布等方面差异较大，使得我们推测，植物漆酶除了参与木质素的生物合成外，还可能具有其它功能。所以，进行玉米和黑麦草漆酶基因的克隆是可行而必要的。

第三章 多年生黑麦草漆酶基因的克隆与分析

黑麦草作为一种重要的饲用牧草,属于禾本科黑麦草属植物,通常包括多年生黑麦草和一年生黑麦草。黑麦草在欧洲、澳大利亚、新西兰等国家以及我国的江浙、湖南、山东等地引种良好,成为牧草生产组合冬春季牧草供应的当家品种,是牛羊兔猪鱼冬春青绿饲料供应的重要牧草。多年生黑麦草具有生长快、分蘖力强、繁殖力好、营养价值高的特点,是畜禽和鱼用的好饲料。

木质素是一类复杂的酚类聚合物,其代谢途径与植物其它次生代谢途径相互交叉。因此,木质素代谢与植物的抗病、抗虫、抗旱以及抗寒等抗逆生理途径有一定相关(李伟等2003)。但木质素的存在,有时会影响植物在工农业生产上的应用,如造纸业中的木质素是环境污染的主要物质;饲料作物中的木质素,是造成消化率和营养价值降低的主要原因。提高饲料作物干物质的消化率,特别是衰老期的消化率,将极大地降低由于季节变化而引起的饲草品质变化。因此,利用生物技术手段,通过调控参与木质素生物合成基因的表达水平,来改变木质素的含量,从而实现提高饲草品质的目标。

研究发现,漆酶参与木质素单体的生物合成。本研究以VRNA 作图群体的两个亲本为材料,进行黑麦草漆酶基因的克隆,期望为牧草的饲用品质改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

一个黑麦草作图群体的2个亲本材料(F#30 和F#39),由丹麦农业科学院植物生物系提供。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

依据丹麦农业科学院植物生物系建立的禾谷类作物基因组 DNA 提取方法:

- 1) 量 1.0-2.0 g 的黑麦草叶片,用剪刀剪成 1-2 cm 左右的碎片,放入 50ml 的塑料管中。然后加入 9 个钢珠。加入液氮使叶片和钢珠冷冻。待液氮挥发后,拧紧盖子。在高速涡旋仪上,高速运行 60s 后,取出钢珠;
- 2) 加入 4ml DNA 提取缓冲液,混合 10-20s;
- 3) 加入 4ml 酚/氯仿/异戊醇 混合物 (25:24:1),拧紧盖子,混匀。然后将匀浆液转移到一个 12ml 的离心管中,用塑料盖盖紧,然后放置在一个可旋转的转子上于 4°C 混和 15-30min;
- 4) 以 6250 ×g 的转速,4°C条件下离心 10mins。小心将上清转移到一个含有介质的离心管中,加入 4ml 酚/氯仿/异戊醇 混合物 (25:24:1)。用橡皮塞塞紧,继续在可旋转的转子上于 4°C 混和 15-30min。然后,以 2000×g 的转速,4°C条件下离心 10mins;
- 5) 小心吸取上清到一个 12ml 的离心管中,加入 400 μl 3M 的醋酸钠 (pH 4.8) 和 4ml 异丙醇。轻轻翻转摇匀,即可看到白色絮状沉淀;
- 6) 勾出 DNA,转移到一个盛有 70% 酒精的 2ml 微量离心管。室温洗涤 DNA 2 min。10000rpm 离心 2 min,仔细地移去酒精;
- 7) 加入 250 μl 的 R40。在混合器上室温悬浮 DNA 2hrs 或者 4°C 过夜培养;

8) 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和相对纯度；用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

注：提取缓冲液配方：

DNA extraction buffer	For 1 litre
1% sarkosyl	10 g sarkosyl
100 mM Tris-HCl	12.1 g Trizma base
100 mM NaCl	5.8 g NaCl
10 mM EDTA	3.2 g Na ₂ EDTA
2% PVPP	20g PVPP
(Polyvinyl-pyrrolidone, insoluble)	

R40：

40 µg/ml RNase A in TE buffer

3M Sodium acetate pH 4.8

100 ml: 将 40.8 g 三水合醋酸钠溶于 80 ml 无菌水中。用冰醋酸调整 pH 值为 4.8。定容 100 ml, 高压灭菌。

1 x TE buffer (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

0.5 M EDTA (pH 8.0)

186.1 g Na₂EDTA·2H₂O

800 ml H₂O

Adjust pH to 8.0 with NaOH.

1.2.2 引物

用于黑麦草漆酶基因克隆的 9 对特异引物分别来自 Knud Larsen 博士和 GenBank 数据库，由丹麦 TAS 公司合成 (表 3-1)。

表3-1 本研究使用的引物

Table 3-1. Gene-specific primers for ryegrass used in this study.

引物名称 Primers	引物序列 (5'→3') primer sequences
LpLac6-2F	CACGCGACGCCGTCCCTTAC
LpLac6-2R	CGACGGCCGAGGGGAGC
LpLac6-8F	CCGACCCCTACACCACTGATG
LpLac6-8R	GGTTCTCCGTGCCAACTTTGC
LpLac8F	CTAGCTCTTGCTCCTCGCAC
LpLac8R	ACCAGGGAGACGTTGTTGACG
LpLac10F	CCTCGCCTTCCTCCTCGC
LpLac10R	CAGGGAAGCCGTTGAAGGTGT
LpLac11F	ATCAGCTAGCTTCGGACATCG
LpLac11R	TCGCCTGCCTGACCAAC

1.2.3 基因组 PCR 扩增

将基因组 DNA 稀释至 100ng/μl, 引物稀释为 10pmol/μl。计算引物的 T_m 值 (G and C=4°C ; A and T= 2°C)。首先进行梯度 PCR, 筛选最佳的退火温度 (BIOMETRA 公司梯度 PCR 仪)。PCR 所用的试剂均来自立陶宛 Fermentas 公司。PCR 仪为 PTC-200 (MJ Research, Inc.)。

PCR 反应中使用的有关试剂: 25mM MgCl₂、dNTPs、以及 Taq polymerase (5U/μl) 均由立陶宛 Fermentas 公司提供。

PCR 反应体系:

基因组DNA (100ng/μl)	1.0 μl
10 × PCR buffer	5.0 μl
25 mM MgCl ₂	5.0 μl
Forward primer (10pmol/μl)	1.0 μl
Reverse primer (10pmol/ μl)	1.0 μl
dNTPs (10mM)	1.0 μl
Taq polymerase (5U/ μl)	1.0 μl
ddH ₂ O	35μl
Total volume	50μl

PCR 扩增程序:

Step 1	95°C	5 min
Step 2	95°C	1 min
Step 3	X°C	1 min
Step 4	72°C	1 min
Step 5	Go to step2 34 times	
Step 6	4°C	hold
Step 7		End

注: X°C 代表最佳的退火温度。

1.2.4 PCR 产物的纯化和琼脂糖胶回收

选用德国 QIAGEN 公司 PCR 产物纯化试剂盒 QIAquick PCR Purification Kit 及琼脂糖胶回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction kit 进行。

PCR 产物纯化程序:

- 1) 加5倍体积的Buffer PB 于1倍体积的PCR 产物中, 上下颠倒混匀;
- 2) 将QIAquick 纯化柱置入一个2ml 的离心管中;
- 3) 将混合液加入纯化柱中, 13000rpm 离心1min;
- 4) 弃去过滤液, 将纯化柱放回2ml 离心管上;
- 5) 加入750μl PE Buffer, 离心1min;

- 6) 丢弃滤过液, 13000rpm离心1min;
- 7) 将纯化柱转移至一个新的1.5ml 离心管上, 加入50 μ l ddH₂O, 室温静置1min;
- 8) 13000rpm 离心30sec, 弃纯化柱, 离心管内即为高度纯化的PCR产物。

QIAquick Gel Extraction 程序:

- 1) 取一洁净的小刀从琼脂糖胶中挖取目的DNA片段, 放入1.5ml 离心管中;
- 2) 称重后, 加入3倍体积的QG Buffer (100mg~100 μ l);
- 3) 50°C 温育10 min, 每隔2-3 min, 涡旋混匀一次;
- 4) 将QIAquick 纯化柱放入一个2ml的收集管上;
- 5) 将混合物移入纯化柱, 13000rpm 离心1min;
- 6) 丢弃滤过液, 将纯化柱再次放在2ml 收集管上;
- 7) 加入750 μ l PE Buffer, 离心1min;
- 8) 丢弃滤过液, 13000rpm离心1min;
- 9) 将纯化柱转移至一个新的1.5ml 离心管上, 加入50 μ l ddH₂O, 室温静置1min;
- 10) 13000rpm 离心30sec, 弃纯化柱, 离心管内即为高度纯化的胶回收产物。

1.2.5 目的片段的克隆

载体选用Invitrogen 公司的pCR®2.1-TOPO® vector (图3-1)。

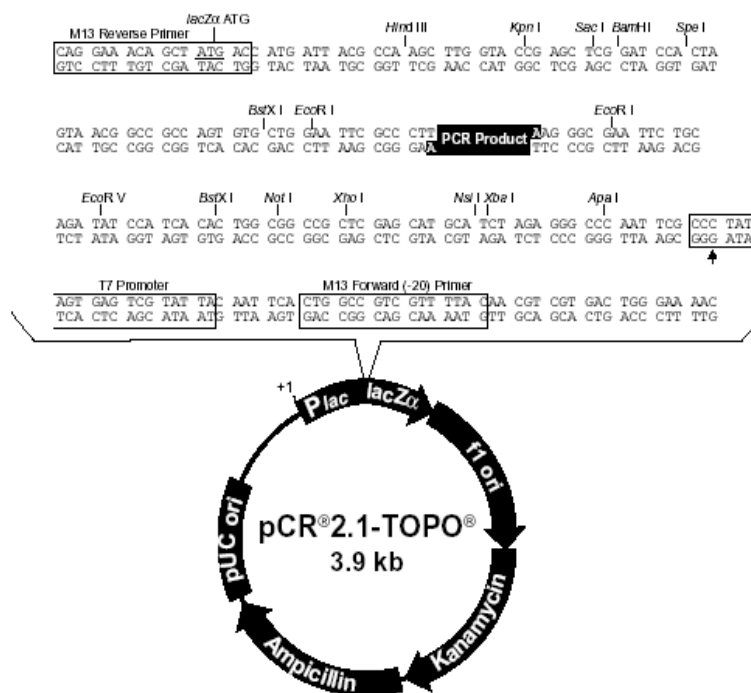


图3-1 克隆载体pCR®2.1-TOPO® vector

Fig. 3-1 Map of pCR®2.1-TOPO® vector

预备实验: 在微波炉中熔化500 ml LB agar, 冷却到50°C左右, 加入500 μ l 100 mg/ml ampicillin 和250 μ l 50 mg/ml 的X-gal。然后, 将LB agar 分别导入20个左右的平板中。

- 1) 连接体系为:

PCR products	4.0 μ l
Salt solution	1.0 μ l
pCR®2.1-TOPO® vector	1.0 μ l
ddH ₂ O	1.0 μ l
Total volume	7.0 μ l

2) 轻弹管壁，短暂离心，室温连接10 min，置于冰上。

1.2.6 PCR 连接产物的转化

1) LB 固体选择培养基的配制

LB	1000 ml
Ampicillin (50mg/ml)	1000 μ l
X-gal (50mg/ml)	500 μ l

2) SOC 培养基需现用现配：

SOB	1 ml
MgSO ₄ /MgCl ₂	10 μ l (2M stock)
Glucose	10 μ l (2M stock)

2M MgCl₂ stock 及2M Glucose stock 均需滤膜过滤。

3) 利用恒温水浴进行转化

- 设定水浴温度为 42°C，将SOC 培养基加热至室温
- 在冰上解冻每个含有化学充分的*E.coli* 细胞的小管；
- 加入2 μ l 的连接混合物，轻弹管壁，-20°C 保存剩余连接混合物；
- 在冰上培养30min；
- 42°C 热击转化细胞 30sec，迅速转移到冰上，培养2min；
- 加入250 μ l 处于室温的SOC培养基；
- 37°C 200rpm 水平摇匀培养1hr；
- 每个转化反应准备2个细胞培养板，将50 μ l 转化液涂于其中一个，剩余转化液涂于另一个培养板上；
- 37°C 倒置培养16-18hrs；
- 用牙签挑取白色菌落于3ml LB液体培养基中，37°C 200rpm 条件下培养14-16hrs。该菌液即可用于菌液PCR检测及质粒提取。

注：LB液体培养基及固体培养基的配制方法见附录。

1.2.7 菌液 PCR

1) 模板制备

取95 μ l ddH₂O 加入5 μ l 菌液，100°C煮沸10 min，短暂离心；

2) 菌液 PCR检测的反应体系

模板DNA	1.0 μ l
-------	-------------

10 × PCR buffer	1.5μl
MgCl ₂ (25mM)	1.1μl
M13 Forward primer (10pmol/μl)	1.5μl
M13 Reverse primer (10pmol/μl)	1.5μl
dNTPs (10mM)	0.38μl
Taq polymerase (5U/μl)	1.0μl
ddH ₂ O	7.1μl
Total volume	15μl

3) 菌液PCR 反应程序

Step1	94°C	1min
Step2	50°C	1min
Step3	72°C	1min
Step4	Go to step1 34 times	
Step5	72°C	5min
Step6	4°C	hold
Step7		end

1.2.8 质粒DNA的提取

采用Promega 公司的Wizad Plus System 试剂盒进行, 程序如下:

- 1) 用2ml 离心管收集菌液, 10000×g 离心2min, 弃上清;
- 2) 加入200 μl 的细胞悬浮液, 颠倒摇匀4次;
- 3) 加入200 μl 的细胞裂解液, 颠倒摇匀4次;
- 4) 加入200 μl 的细胞中和液, 颠倒摇匀4次;
- 5) 10000×g 离心5min;
- 6) 向安装于真空装置上的纯化柱中加入1ml 树脂, 然后将第5步的上清转入纯化柱中;
- 7) 打开真空阀, 使所有液体通过纯化柱;
- 8) 加入2ml 柱洗脱液, 真空条件下使其全部通过后, 继续30sec;
- 9) 将纯化柱转入一个1.5ml 的离心管中, 10000×g 离心2min;
- 10) 将纯化柱转移到一个新的1.5ml离心管中, 加入30 μl ddH₂O, 静置1min;
- 11) 10000×g 离心20sec, 离心管管内即为高纯度的质粒DNA。

1.2.9 测序PCR 反应体系及反应程序

测序反应在Megabace 1000 测序仪上, 采用 DYEnamic ET Terminator Kits (英国 Amersham Biosciences 公司) 以及M13 引物进行双向序列测定。

- 1) 测序所用的引物

M13 Forward primer	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
M13 Reverse primer	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

2) 质粒纯化 PCR 反应体系

Plasmid DNA	1μl
10 × PCR buffer	2μl
M13 Forward primer	2μl
M13 Reverse primer	2μl
MgCl ₂ (25mM)	1.5μl
dNTPs (2 mM)	3μl
Taq polymerase (5U/μl)	0.1μl
ddH ₂ O	8.4μl
Total volume	20μl

3) 质粒纯化 PCR 反应条件

Cycles	Temperature	Time
1	96°C	3min
30	96°C	30sec
	50°C	30sec
	72°C	2min
1	72°C	5min
	4°C	

4) PCR 产物的纯化

用核酸外切酶I (Exonuclease I, ExoI) 和去碱性磷酸酶 (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) 纯化测序PCR产物, 以除去引物和过量的核酸, 反应体系如下:

Exo I (20U/μl)	0.05μl
SAP	1.0 μl
ddH ₂ O	3.45μl
PCR products	5.0 μl
Total volume	9.5 μl

37°C培养15 min, 然后在80°C培养15min 以破坏过量的酶。

5) 测序反应体系

Purified PCR products	2μl
M13 (10mM)	0.5μl
DYEnamic ET terminator reagent mix	8μl
ddH ₂ O	9.5μl
Total volume	20μl

6) 测序PCR 反应条件

Step 1	95°C	30sec
Step 2	50°C	15sec
Step3	60°C	3min
Step 4	Go to step 1 39times	
Step 5	4°C	hold
Step 6		end

7) 依据 Amersham 测序程序, 用醋酸铵和乙醇在1.5 ml 的Eppendorf 管中沉淀高纯度质粒;

8) 质粒测序在MegBACE 1000测序仪上进行。

1.2.10 序列分析

利用DNASTAR、DNAMAN 软件包对测序结果进行序列分析:

- 1) 去除载体序列;
- 2) 查找引物序列, 由于PCR 产物插入时没有方向性, 有时需对所测序列进行逆序和互补操作;
- 3) 对利用M13 正反向测序结果, 进行比对, 然后进行拼接;
- 4) 利用DNAMAN 推导出相应的氨基酸序列。

2. 结果与分析

2.1 基因组DNA的质量与浓度检测结果

剪取于温室培养的黑麦草叶片, 提取DNA。用荧光 DNA分析仪测定DNA浓度、鉴定纯度, 结果如下(表3-2):

表3-2 F #30 和F #39 的基因组DNA 测定结果

Table 3-2 Measurement results of genomic DNA

	F #30	F #39
A260	0.456	0.455
A280	0.238	0.242
A260/ A280	1.92	1.88
浓度 (ng/μl)	355	381

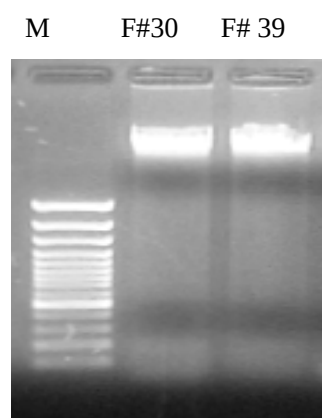


图 3-2 黑麦草基因组 DNA 琼脂糖胶检测结果

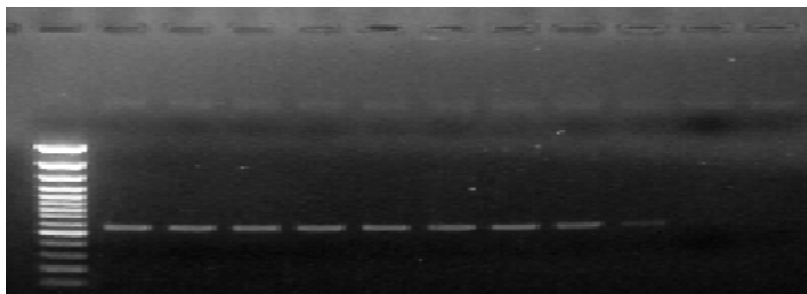
Fig.3-2 Detection of genomic DNA of F#30, F#39 by 1% agarose gel

测定结果表明纯度较好, 含量较高; 1% TAE 琼脂糖胶检测, 表明完整性较好(图3-2)。

2.2 退火温度优化

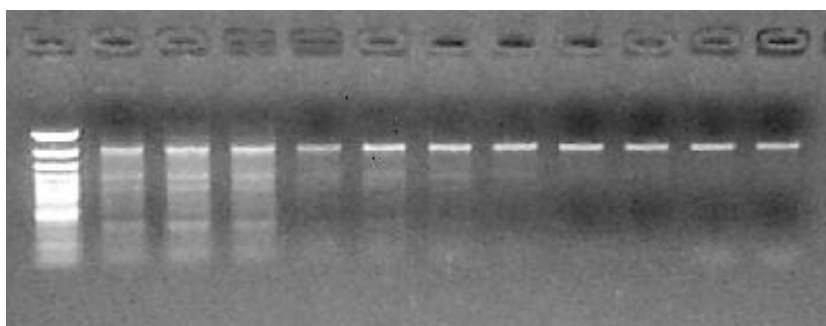
首先对不同的引物组合进行梯度PCR反应, 优化最佳的退火温度(图3-3)。

M 59 59.2 59.9 61 62.2 63.4 64.6 65.8 67 68.1 68.8



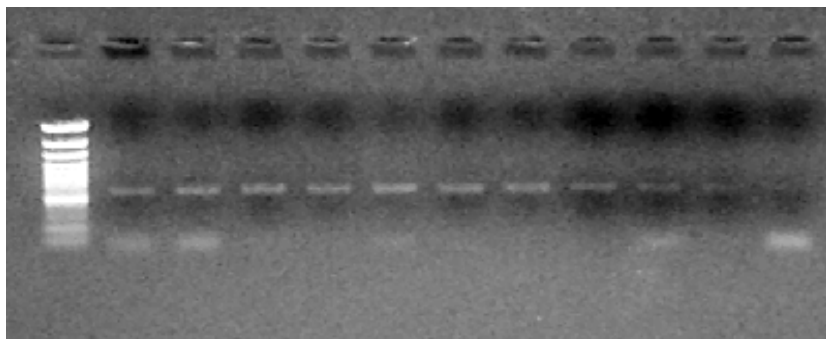
M=100bp LpLac10 F#39 Tm=64°C

M 59 59.2 59.9 61 62.2 63.4 64.6 65.8 67 68.1 68.8



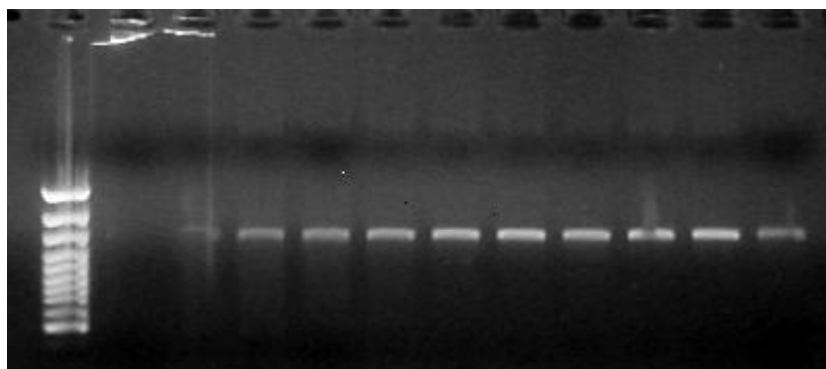
M=100bp LpLac6-2 F#39 Tm=64°C

M 59 59.2 59.9 61 62.2 63.4 64.6 65.8 67 68.1 68.8



M=100bp LpLac6-8 F#30 Tm=64°C

M 55 55.2 55.9 57.5 58.2 59.4 60.6 61.8 63 64.1 64.8



M=100bp LpLac8 F#30 Tm=60°C

图 3-3 黑麦草梯度 PCR 结果

Fig.3-3 Gradient PCR products amplified by gene-specific primers for ryegrass laccase.

2.3 漆酶目的片段的扩增与纯化

以优化的退火温度进行PCR扩增得到目的片段（图3-4），然后进行琼脂糖胶回收，并1%琼脂糖胶检测（图3-5）。

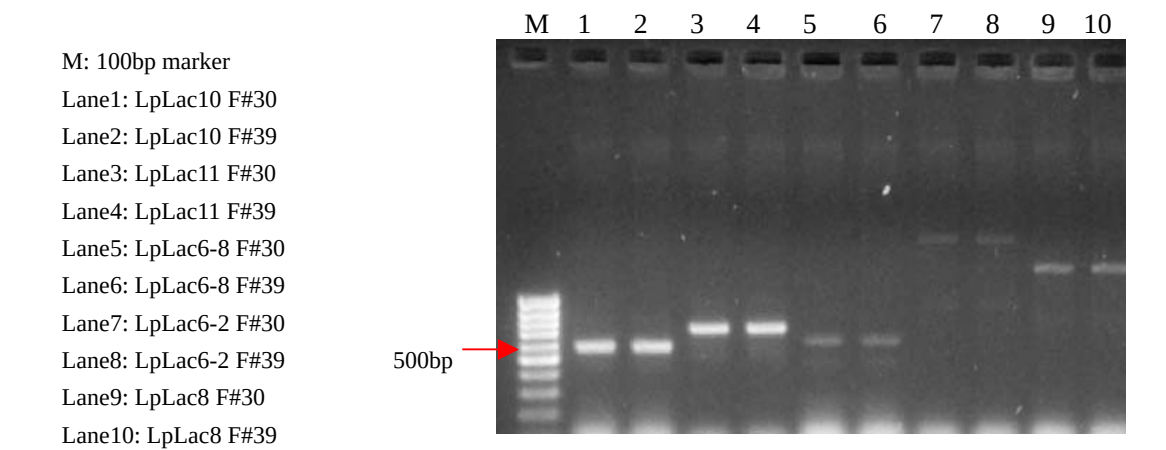


图 3-4 漆酶基因片段扩增结果
Fig. 3-4 PCR amplification of ryegrass laccases

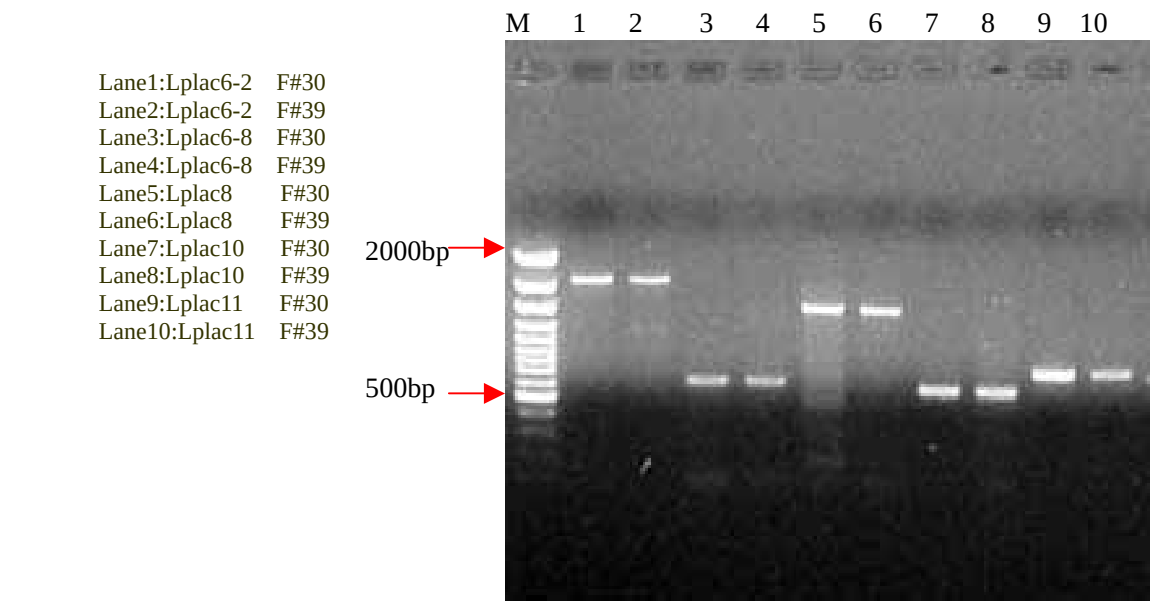


图 3-5 琼脂糖胶回收 PCR 产物
Fig.3-5 Gel extraction of PCR products

2.4 黑麦草漆酶基因的克隆与序列分析

以LpLac10 为引物，F#30 作为模板，扩增得到一个500bp 的片段（*Lac10-1*），经回收、纯化、克隆，用MegBACE 1000进行测序，将测序结果送交GenBank 进行BLASTx 比较，得分在200 分以上的结果列于下表（3-3）。通过比较可以看出，*Lac10-1*含有两个保守的蓝铜氧化酶结合区域

(HWH 和 HAH)和3个可能的N-末端糖基化位点，其编码的蛋白与鹅掌楸漆酶蛋白的同源性为69%（图3-6）。

以LpLAC11引物，F#30基因组DNA为模板，扩增得到一个600bp的片段（*Lac11-2*），将测序结果送交GenBank 进行BLASTx 比较，得分在30分以上的结果列于下表（3-4）。通过比较可以看出，所测序列含有两个可能的开放读框，其编码的蛋白与黑麦草LpLAC11的同源性分别为41% 和37%。在第二开放读框中含有一个蓝铜氧化酶结合区（图3-7）。

以LpLac8 为引物，F#39 作模板，扩增得到一个1500bp 的片段（*Lac8-5*），将测序结果送交GenBank 进行BLASTx 比较，得分在130分以上的结果列于下表（3-5）。通过比较可以看出，所测序列与已经发表一个黑麦草全长漆酶基因LpLAC5-6的第285氨基酸至405氨基酸具有78%的同源性。在该区域含有4个可能的N-末端糖基化位点（图3-8）。

表 3-3 *Lac10-1* 与 GeneBank 已知基因同源比较 (BLASTx) 结果
Table 3-3The similarity of *Lac10-1* (BLASTx) to the function identified genes in GeneBank

配准基因 Putative gene products by category	生物种 Organism	配准长度比 Percentage ID	得分 Score
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	95/136 (69%)	215
		94/136 (69%)	212
Putative laccase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	91/136 (66%)	212
Putative laccase	<i>Oryza sativa</i>	93/137 (67%)	212
Putative laccase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	87/136 (63%)	212
Putative laccase	<i>Oryza sativa</i>	89/117 (76%)	211
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	93/136 (68%)	211
putative high-pI laccase	<i>Oryza sativa</i>	90/136 (66%)	209
Putative laccase	<i>Oryza sativa</i>	91/136 (66%)	208
Laccase	<i>Pinus taeda</i>	90/136 (66%)	206
Laccase	<i>Pinus taed</i>	87/136 (63%)	203
Laccase	<i>Populus balsamifera subsp. trichocarpa</i>	87/136 (63%)	202
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	87/136 (63%)	201

表 3-4 *Lac11-2* 与 GeneBank 已知基因同源比较 (BLASTx) 结果
Table 3-4 The similarity of *Lac11-2* (BLASTx) to the function identified genes in GeneBank

配准基因 Putative gene products by category	生物种 Organism	配准长度比 Percentage ID	得分 Score
Laccase	<i>Pinus taeda</i>	38/97 (39%)	48.1
laccase LAC11	<i>Lolium perenne</i>	39/95 (41%)	48.1
		24/64 (37%)	32
Laccase	<i>Oryza sativa</i>	39/95 (41%)	44.7
		17/40 (42%)	31.2
Putative high-pI laccase	<i>Oryza sativa</i>	39/95 (41%)	44.7
		17/40 (42%)	31.2
Putative laccase	<i>Oryza sativa</i>	39/95 (41%)	44.3
		19/44 (43%)	33.1

表 3-5 Lac8-5 与 GeneBank 已知基因同源比较 (BLASTx) 结果

Table 3-5 The similarity of Lac8-5 (BLASTx) to the function identified genes in GeneBank

配准基因	生物种	配准长度比	得分
Putative gene products by category	Organism	Percentage ID	Score
Laccase	<i>Oryza sativa</i>	96/122 (78%),	198
Putative high-pI laccase	<i>Oryza sativa</i>	96/122 (78%),	198
Laccase LAC5-6	<i>Lolium perenne</i>	96/123 (78%)	190
Putative laccase	<i>Oryza sativa</i>	82/122 (67%)	166
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	82/123 (66%)	157
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	79/123 (64%)	152
Putative laccase	<i>Oryza sativa</i>	76/122 (62%)	149
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	74/123 (60%)	146
Laccase	<i>Populus balsamifera subsp. trichocarpa</i>	72/122 (59%)	142
Putative laccase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	75/127 (59%)	137
Laccase	<i>Pinus taeda</i>	74/122 (60%)	136
Putative laccase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69/122 (56%)	135
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	66/122 (54%)	131

cDNA 克隆 1 Query: 9 EGDRLXXXXXXXXXXXXF**HWHGV**QQRSAWADGPAYITQCPMRPGQSYVYRFTIVGQRG 188
同源序列 2 Sbjct: 74 EGDRVVKVNVHANNVT**HWHGV**RQLRSGWADGPAYVTQCPITQGQSFVYNFTIVGQRG 133
CHO
1 Query: 189 TLW**WHAH**FSWLRATLYGP I V I L P P R G V A Y P F K P Y R E V P V M L G E W F NADPEAVIKQALQT 368
2 Sbjct: 134 TLF**WHAH**ISWLRSTLYGP I V I L P K R G V P Y P F A K P Y K S V P I I F G E W F NVDPEAIITQALQT 193
CHO CHO
1 Query: 369 GGGPNVSDAYTFNGFP 416
2 Sbjct: 194 GAGPNVSDAFTINGLP 209

图3-6 Lac10-1 与 鹅掌楸漆酶蛋白保守区域的比较分析.方框内为保守的蓝铜氧化酶信号序列；N末端糖基化结合位点用下划线标出

Fig. 3-6 Alignment of the conserved region of *Liriodendron tulipifera* laccase
Conserved blue copper oxidase signatures are red color within boxes; Potential N-glycosylation sites are underlined in red color and designated by CHO. 1-Lac10-1; 2- *Liriodendron tulipifera* laccase amino acid sequence.

cDNA 克隆 1Query: 18 RQLRSGGPIGSGVTITQCPMTGQSYLYKLLPSAGLARLRLVARATSHGCAAQRVSAPSW 197
同源序列 2 Sbjct: 92 RQLRSGWADGPAY-ITQCPMTGQSYLYNFTITGQRGTLWWHAHIS--WLRTVYGAI 147
Query: 198 SSPSGGRALPVRAGYKEVPQ*SCGEWWKADTDEV 302
Sbjct: 148 VLPKHGVPYPF-TAPHKEVPM-IFGEWWRADTEKL 180
Query: 121 G*RGY**WHAH**LHLMAARRSAFRRHHGPPQAAGVPYPFAGPATRRCPSDLAASGGRQTRTK 300
Sbjct: 124 GQRGT**WHAH**-HISWLRATVYGAI VLPKH-GVPYPFTAP-HKEVPM-IFGEWWRADTEK 179
Query: 301 LVRQ 312
Sbjct: 180 LVRQ 183

图 3-7 Lac11-2 与黑麦草漆酶 LpLAC11 氨基酸序列的比较分析.方框内为保守的蓝铜氧化酶信号序列
Fig3-7 Alignment of LpLAC11 from *Lolium perenne*. Conserved blue copper oxidase signatures are red color within boxes.

```

                                CHO                                CHO
1 Query: 40  ANFYMSAAPYSVIRPGTFDNTTVAGILEYQKPGGAPSVSSFDKYLPLFKPTLPRFNDTGF 219
2 Sbjct: 285  ANFYMAAAPYSVIRPGTYDNTTVAGILEYHKPG-SPSTPGLDKTLPLFKPTLPFFNDTKF 343
                                CHO                                CHO
1 Query: 220  IANFTSKLRSLATPQYPAAVPQSVDKRFFFTVGLGTLPCPVNATCQGPTNTTQFAAAVNN 399
2 Sbjct: 344  VTSFTTKLLSLASKQYPAAVAQSVDRRFFFTIGLGTLPSPKNMTCQGP-NGTQFAAAVNN 402

1 Query: 400  VSL 408
2 Sbjct: 403  VSL 405

```

图3-8 *Lac8-5* 与黑麦草LpLAC5-6 漆酶蛋白的比较分析. N-末端糖基化结合位点用下划线标出

Fig. 3-8 Alignment of LpLAC5-6 from *Lolium perenne*. Potential N-glycosylation sites are underlined in red color and designated by CHO. 1-Lac8-5; 2- *Lolium perenne* laccase; LpLAC5-6 amino acid sequence.

O' Malley等(1993)对于漆酶在植物木质化中所起的作用做了详细报道。而且关于双子叶植物漆酶,如枫树 (LaFayette *et al.*, 1995)、烟草 (Kiefer-Meyer *et al.*, 1996)、杨树 (Ranocha *et al.*, 1999) 以及黄杨 (LaFayette *et al.*, 1999) 等参与木质化作用的研究也有了很大进展。而关于单子叶植物漆酶作用的报道则很少。本研究所克隆到的3个黑麦草漆酶片段与已经发表的黑麦草漆酶基因有不同程度的同源性,其中*Lac11-2*与LpLAC11为85% (258/301)、而*Lac10-1*和*Lac8-5* 则均与LpLAC5-6有82%的同源度。然而, LpLAC11为部分序列,且详细的信息尚不清楚。LpLAC5-6则为一个编码579个氨基酸的cDNA,含有13个可能的N-糖基化位点,在茎部特异表达 (Gavnholt *et al.*, 2002)。另外, Gavnholt 等(2002)推测,在黑麦草中至少有25个漆酶成员,但是只拿到了3个全长序列,而且在分子进化分析发现它们位于不同的类群中。在我们使用的5对引物中,最后也仅得到3个有效序列,这很可能与黑麦草基因组庞大,遗传背景复杂有关系。

下一步工作,我们希望克隆更多的黑麦草漆酶基因,依据测序结果设计markers,利用已有的黑麦草作图群体,开展黑麦草漆酶基因染色体定位研究。

3 小 结

漆酶基因的保守性使同源基因克隆成为可能,即利用序列同源性设计引物,扩增与漆酶基因同源的片段,通过染色体定位提供可能漆酶基因位点,或明确它们与已知相关基因的连锁关系,从而实现最终克隆漆酶基因的目标。

基于同源序列的候选基因克隆的关键环节是PCR 扩增的准确度与精确性。因此,应采取以下改进措施:

1) 最佳退火温度的选择

梯度PCR (Gradient PCR)技术是获得最适退火温度的简便而有效的方法。首先根据 $T_m = 4^{\circ}\text{C} \times (G+C) + 2^{\circ}\text{C} \times (A+T)$ 计算引物的退火温度,将该值减去4 $^{\circ}\text{C}$ 。以此温度进行梯度PCR,梯度范围选择在10 $^{\circ}\text{C}$,一般一次PCR即可获得最适的退火温度。如果在此范围内没有发现最适退火温度,则应根据Smear 带或者多个带的情况,一次增加或者减少5 $^{\circ}\text{C}$,再次进行梯度PCR反应。

2) PCR反应增效剂

在PCR反应体系中加入5% 的二甲基亚砷 (DMSO), 有助于提高 GC 富集区的扩增效率。

3) Advantage 2 PCR

DNA聚合酶的选用对PCR反应至关重要, 尤其对于超过1.5kb片段的扩增。我们在使用Taq Polymerase (立陶宛feremenats 公司产品)进行大片段产物扩增时, 经常得不到 PCR 产物, 而利用Advantage2 聚合酶 (BD Biosciences) 则可以得到目的片段。

本研究所克隆的3个黑麦草漆酶基因片段均与已经发表的植物漆酶有较高的同源性, 可用于进一步的研究。

第四章 玉米漆酶基因的克隆、定位及特征分析

大量的研究表明,漆酶是木质素生物合成途径的关键酶 (Driouich *et al.*, 1992; Bao *et al.*, 1993; Ranocha *et al.*, 1999; Boerjan *et al.*, 2003)。木质素代谢与植物其它次生物质代谢途径相互交叉,涉及一系列酶、中间产物以及木质素含量及组成的变化,对于植物的生长分化、生物胁迫和非生物胁迫条件下的一系列生理活动都将产生重要的影响,与植物的抗病、抗虫、抗涝等抗逆生理均有一定的相关性。然而,木质素是造纸业的主要污染物;饲料植物中木质素的含量对于饲料的消化率和营养价值也产生很大的负效应。

本研究依据漆酶基因同源序列的保守性设计玉米漆酶基因特异引物,从玉米自交系基因组DNA中扩增得到漆酶基因同源序列,并对分离的片段与其它植物漆酶基因的同源性及其分子进化机制进行了分析,利用我们实验室构建的一个玉米作图群体H21×Mo17,进行了染色体初步定位。

1 材料与方法

1.1 材料

1 份玉米自交系 10940 和 8 份AS系列玉米自交系 (AS06、AS07、AS08、AS09、AS11、AS17、AS29 和AS30) 由德国KWS公司提供。一个包含 120 个F_{2:3}家系的H21×Mo17 玉米作图群体。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

采用改进的 CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) 提取 DNA:

- 1) 将-76℃冰箱保存的玉米材料在液氮条件下迅速研磨成粉末;
- 2) 将粉末放入到 15ml 的离心管中, 然后加入缓冲液约 7ml, 充分混匀;
- 3) 将离心管置于 65℃ 水浴中 1.5-2h, 水浴过程中轻轻混匀几次;
- 4) 取出离心管, 每管加入等体积的氯仿-异戊醇 (V:V=24:1) 溶液, 轻轻地混匀 30min 后离心, 8000rpm, 20min;
- 5) 用塑料吸管小心吸出上清液移入另一离心管中, 加入等体积氯仿-异戊醇 (V:V=24:1), 混匀后离心 8000rpm, 20min;
- 6) 将上清液移入另一离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 轻轻混匀, 静止一段时间, 然后用玻璃钩勾出 DNA, 并用 70%的乙醇冲洗 2-3 次;
- 7) 勾出 DNA, 室温短时间干燥至无乙醇味, 将其溶于含 1×TE 500μl 的 1.5ml 离心管, 加入 6μl RNase 溶液在 37℃恒温箱中保温 1h;
- 8) 每管加入等体积的氯仿-异戊醇 (V:V=24:1), 轻轻混匀, 8000 rpm, 离心 20min;
- 9) 取上清液, 加入等体积氯仿-异戊醇 (V:V=24:1), 轻轻混匀后, 8000 rpm, 离心 20min;
- 10) 取上清液, 加入 1/10 体积的 3M 醋酸钠, 混匀后, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇 (或 95%乙醇);
- 11) 轻轻混匀静止一会儿 (或放置于-20℃), 用移液器吸头勾出 DNA, 用 70%乙醇冲洗 2-3 次后, 空气中干燥过夜;

12) 根据提 DNA 量加入适量的 $1\times$ TE 溶解 DNA;

13) 用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 取少量样品在 1.0% Agarose 胶测定 DNA 的质量;

1.2.2 基因组 PCR 所用引物

利用GeneBank 数据库中已有的 7 个黑麦草(单子叶植物)漆酶的序列, 在玉米数据库分别进行同源搜索, 再利用<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> 网上工具对得到的所有序列进行多序列比对分析, 选取有代表性的序列, 应用DNAsar 软件设计引物。本研究所使用的引物由丹麦TAS公司和上海博亚生物技术公司合成 (表 4-1)。

表 4-1 本研究使用的引物

Table 4-1. Gene-specific primers for maize used in this study.

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物名称	引物序列 (5'→3')
Primers	Sequences (from 5' to 3')	Primers	Sequences (from 5' to 3')
ZmP1F	CTCCCCGCGCTCAACGACAC	ZmP12F	CACGTGTTACGGTGGTCGCC
ZmP1R	GAAGCCTTGCCGACGACGAA	ZmP12R	GAACACGTGGCCGGCGATCCT
ZmP2F	CGTTCAACTACACGGGGACGC	ZmP14F	CACTGCTGCTGTCTTCGTTCCT
ZmP2R	AGGAAGAGTCTAATCAACATT	ZmP14R	GAGTCGTCGTCGGCGCGTCGT
ZmP3F	GAAGCTGGTCGTGCGGGAAGG	ZmP15F	GCACAGCACAGCAGAGCACGG
ZmP3R	TGAAGGTGTAGGCATCGGAGA	ZmP15R	ATTCTGACGCTAAGCCACTAC
ZmP4F	GAAGCTGGTCGTGCGGGAAGG	ZmP17F	TACAGGCATGGCGTAAAGCAG
ZmP4R	ATTGTCTCTGGATCCGCGTTG	ZmP17R	CATGGCCGGAAAATGTTGG
ZmP5F	TTCAAAGCGCAAACACACAAG	ZmP18F	GCGCCAGGAGCGACAGCGACG
ZmP5R	GTGCCGCGCTGCCCCGTGACG	ZmP18R	CTGAGCGTGACGAGCATGTGG
ZmP6F	TTGCCTGATCGGTGCGGTGTGT	ZmP19F	ATCAACTGCTCCTCCAACAAC
ZmP6R	CTCTGCGCCTCCCGGATGACG	ZmP19R	AGTTGAGCGACGCCTTGATCC
ZmP7F	TCATCAACAACCTCGCCCTACA	ZmP20F	TCCGTCGCCAACCCTCGCTC
ZmP7R	GATGATCCGAGCAGGTACGTC	ZmP20R	AAGTTGCCGACGAAGCTGGTG
ZmP8F	TCATCGTCGATCACTTTTGGT	ZmP22F	CCGTCCAAGTTCAACCTCGTC
ZmP8R	GCCAGCTTGAAGAAGAGGTG	ZmP22R	GGTCAGCTAGGAACGGAACGG
ZmP9F	GCTTGCAATCAGGCGAGTGGT	ZmP23F	GGTCATCAACGCCGCGCTCAA
ZmP9R	AAGGAGGCGTTGTTCATGCTG	ZmP23R	GCTCCTGATCCCGGCGGCGAA
ZmP10F	GAAGCAGTACAACCTCGTCAA	ZmP24F	CTACCCATTGCGCAAGCCCTC
ZmP10R	AGAGCACATAGTCTAAACCA	ZmP24R	GAGGTGGTGAAGGGCTTGGTG
ZmP11F	ATTGATACAAAGTAATATCAT		
ZmP11R	GAATACAGAGAGCCAATAAAC		

1.2.3 基因组 PCR 反应及漆酶基因的染色体初步定位

新合成的引物为粉末状,按照每 1OD加入 33 μ g ddH₂O的方法,加入ddH₂O溶解。振荡 3-4min,短暂离心后,放在-20℃冰箱长期保存。然后根据需要取适量稀释至 10 μ M放在-20℃备用。

用所设计的引物对德国 KWS 公司提供的 8 份自交系材料进行漆酶基因的克隆(该部分工作在丹麦农科院植物生物系完成)。首先进行梯度 PCR,筛选最佳的退火温度(BIOMETRA 公司梯度 PCR 仪)。PCR 所用的试剂均来自立陶宛 Fermentas 公司。PCR 仪为 PTC-200 (MJ Research,Inc.)。

用作图群体的两个亲本对所有引物进行筛选,使用在亲本间有差异的引物,对所有 F_{2:3}家系进行PCR扩增和电泳检测。PCR所用的试剂均来自北京鼎国生物技术公司。PCR扩增使用PTC-100热循环仪 (MJ Research,Inc.)。

PCR 反应体系:

基因组DNA (100ng/ μ l)	1.0 μ l
10 $\times$ PCR buffer (Fermentas)	5.0 μ l
25 mM MgCl ₂ (Fermentas)	5.0 μ l
Forward primer (10pmol/ μ l)	1.0 μ l
Reverse primer (10pmol/ μ l)	1.0 μ l
dNTPs (10mM) (Fermentas)	1.0 μ l
Taq polymerase (5U/ μ l) (Fermentas)	1.0 μ l
ddH ₂ O	35 μ l
Total volume	50 μ l

用于基因位点检测的PCR反应体系:

基因组DNA (10ng/ μ l)	5.0 μ l
10 $\times$ PCR buffer (鼎国公司)	5.0 μ l
25 mM MgCl ₂ (鼎国公司)	5.0 μ l
Forward primer (10pmol/ μ l)	1.0 μ l
Reverse primer (10pmol/ μ l)	1.0 μ l
dNTPs (10mM) (鼎国公司)	1.0 μ l
Taq polymerase (2.5U/ μ l) (鼎国公司)	2.0 μ l
ddH ₂ O	30 μ l
加一滴矿物油	
Total volume	50 μ l

PCR 扩增程序:

Step 1	95℃	5 min
Step 2	95℃	1 min

Step 3	X°C	1 min
Step 4	72°C	1 min
Step 5	Go to step2 34 times	
Step 6	4°C	Hold
Step 7		End

注：X°C 代表最佳的退火温度。

电泳采用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，银染法检测。

电泳程序：

- 1) 玻璃板的清洗：用水沾上洗涤灵把玻璃板反复清洗干净，用酒精擦干、干燥。其中一块玻璃板涂上 2%的 Repel Silane，另一块（平板）涂上 0.5%的 Binding Silane。操作过程中，防止两块玻璃板互相污染，彻底干燥后进行玻璃板组装；
- 2) 灌胶：往胶瓶中倒入 50ml 6%PA 胶，然后加入 120 μ l 10%过硫酸铵和 60 μ lTEMED。摇匀后，小心灌入胶板中，防止出现气泡。待胶流动到底部，轻轻插入梳子，静置至胶凝；
- 3) 拔掉梳子，将板固定在电泳槽上，取 1 $\times$ TBE 1000ml 加入到电泳槽中；
- 4) 预电泳：恒功率下（80~100W）电泳 20min；
- 5) 变性：扩增样品中加入 8 μ l loading buffer，混合，95°C下变性 5min 后立即转至冰浴中冷却待用；
- 6) 除去气泡后，小心插好梳子，加入 6 μ l 样品，恒功率下（80~100W）电泳 40~50 min（视 DNA 片段大小及差异带型的可辨程度调整电泳时间）；
- 7) 电泳结束后，小心分开两块玻璃板，胶会紧贴于涂了 Binding Silane 的玻璃板上。

银染程序：

- 1) 脱色：取一塑料盒，倒入 1 升新配制的 10%冰醋酸，轻轻摇动 20min 至胶全部脱色；
- 2) 冲洗：用蒸馏水冲洗胶板 2 次，每次 8min；
- 3) 染色：放入银染液中（1LH₂O 加 1.5ml 37%甲醛和 1g AgNO₃），轻轻摇动染色 30min；
- 4) 冲洗：用蒸馏水冲洗胶板不超过 5s；
- 5) 显影：立即放入预冷的显影液（事先将 30g 无水碳酸钠溶于 1L 水中置于 4°C，用时加 1.5ml 甲醛和 200 μ l 硫代硫酸钠（10mg/ml））中，至 DNA 条带显出；
- 6) 定影：将胶板拿出，放入 10%冰醋酸中，轻摇 3min；
- 7) 冲洗：用蒸馏水冲洗胶板 2min；
- 8) 胶板室温下自然干燥。

实验数据记录：

带型与 H21 相同的记为 1，与 Mo17 相同记为 2，杂合的记为 3。

1.2.4 PCR 产物的纯化和琼脂糖胶回收

参见第三章（1.2.4）。

1.2.5 PCR 产物的连接和转化

参见第三章（1.2.5 和 1.2.6）。

1.2.6 质粒 DNA 的提取及测序

采用DirectPrep 96 Miniprep Kit (德国 QIAGEN 公司) 进行:

- 1) 挑取阳性克隆, 在一盛有 1.25ml LB 液体培养基的 96 孔细胞培养板中, 37℃, 220rpm 培养 16-24hrs;
- 2) 1500 x g 离心 5min, 弃上清;
- 3) 安装真空抽提装置; 向DirectPrep 96 孔板的每个孔中加入100 μ lDPA Buffer 不用的孔要密封, 然后开启真空, 使buffer 通过;
- 4) 用150 μ l buffer P1悬浮沉淀;
- 5) 加入150 μ l 的buffer P2, 密封, 轻轻翻转6次, 室温培养3min;
- 6) 加入150 μ l 的buffer DP3, 用力摇匀, 翻转6次;
- 7) 加入300 μ l的异丙醇, 翻转混匀2次;
- 8) 将混合物转入DirectPrep 96孔板中, 真空抽提;
- 9) 加入750 μ l 的buffer PE,真空抽提;
- 10) 重复step 9 一次
- 11) Buffer PE 全部通过后, 再以最大压力继续真空抽提10min;
- 12) 每个孔加入75 μ l的Buffer EB, 溶解DNA;

测序反应在Megabace 1000 测序仪上, 采用 DYEnamic ET Terminator Kits (英国 Amersham Biosciences 公司) 以及M13 引物进行双向序列测定。

1.2.7 序列分析与进化分析

利用DNAMAN、ClustalW 以及PHYLIP 3.6 软件包对测序结果进行序列分析与多序列比对。

- 1) 去除载体序列;
- 2) 查找引物序列, 由于PCR 产物插入时没有方向性, 有时需对所测序列进行逆序和互补操作;
- 3) 对利用M13 正反向测序结果, 进行比对, 然后进行拼接;
- 4) 利用DNAMAN 推导出相应的氨基酸序列;
- 5) 利用Clustal W 进行多序列比较分析;

将多序列比对结果, 直接应用 PHYLIP 3.6 软件包构建系统发育树。

1.2.8 漆酶基因的染色体定位

应用 MAPMAKER/EXP Version 3.0 (Lander *et al.* 1987; Khairallah *et al.*,1998) 软件构建遗传连锁图谱, 先用 GROUP 命令推测可能的连锁群, 然后用 COMPARE 和 TRY 命令对标记排序, 利用 (Kosambi) 函数将重组率转换成图距单位 (cM)。根据标记间的距离和标记顺序, 用中国科学院遗传研究所开发的 Genemap 软件绘制图谱。

2 结果与分析

2.1 基因组DNA检测结果

用 1.0% 的琼脂糖胶检测所提取的 DNA 质量 (图 4-1)。检测结果表明, DNA 完整性较好。

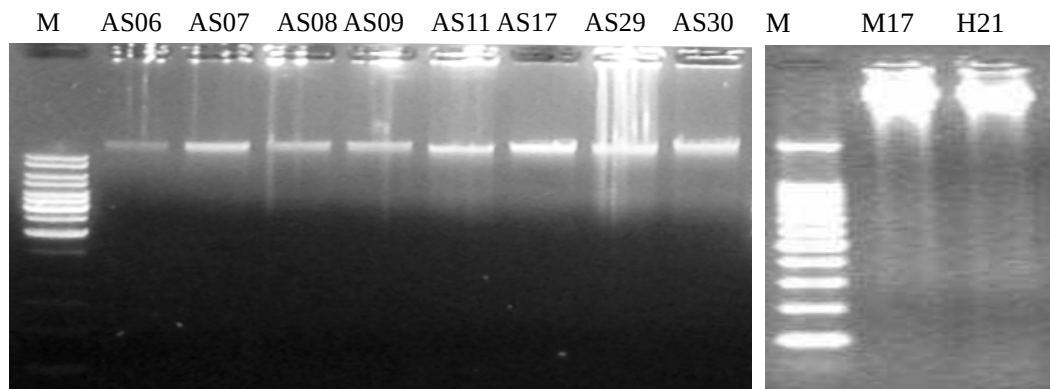
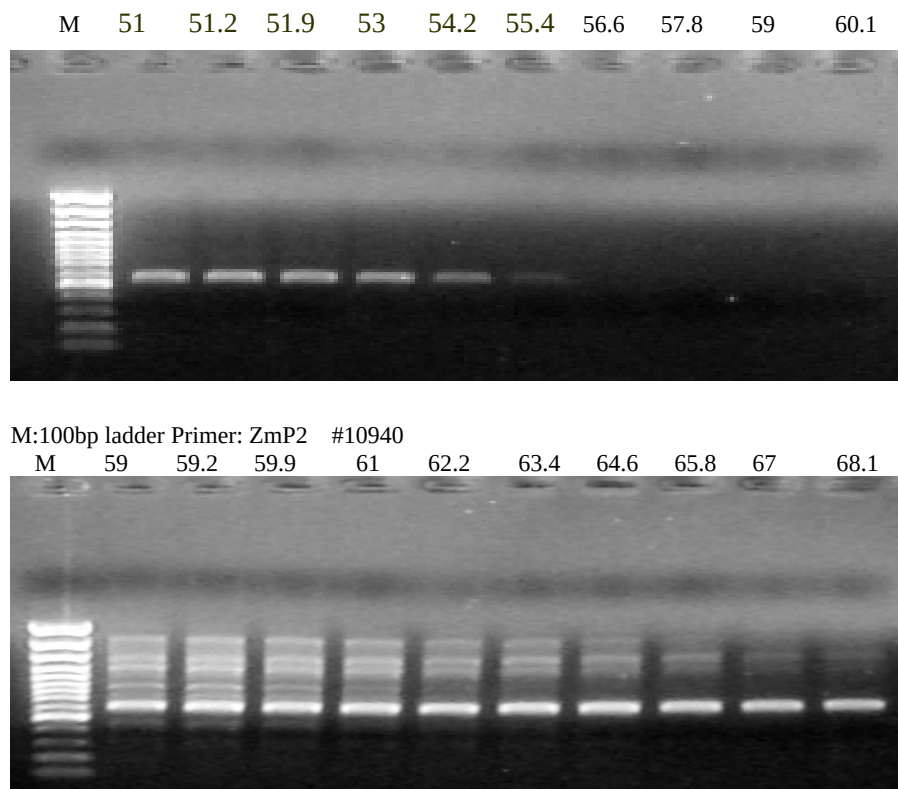


图 4-1 基因组 DNA 琼脂糖胶检测结果 M: 1Kb ladder

Fig.4-1 Detection results of genomic DNA using 1.0% agrose gel

2.2 退火温度优化

首先以一个玉米自交系材料 10940 为模板, 根据 $T_m = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T})$ 计算引物的退火温度, 将该值减去 4°C 。以此温度进行梯度 PCR, 梯度范围选择在 10°C , 对不同的引物组合进行梯度 PCR 反应, 优化最佳的退火温度 (图 4-2)。



M:100bp ladder Primer: ZmP2 #10940

M 59 59.2 59.9 61 62.2 63.4 64.6 65.8 67 68.1

M:100bp ladder Primer: ZmP3 #10940

图 4-2 玉米基因组梯度 PCR 结果

Fig.4-2 Gradient PCR products amplified by gene-specific primer of maize laccase.

2.3 漆酶目的片段的扩增与纯化

以优化的退火温度进行目的片段扩增, 然后进行琼脂糖胶回收, 并 1%琼脂糖胶检测(图 4-3)。

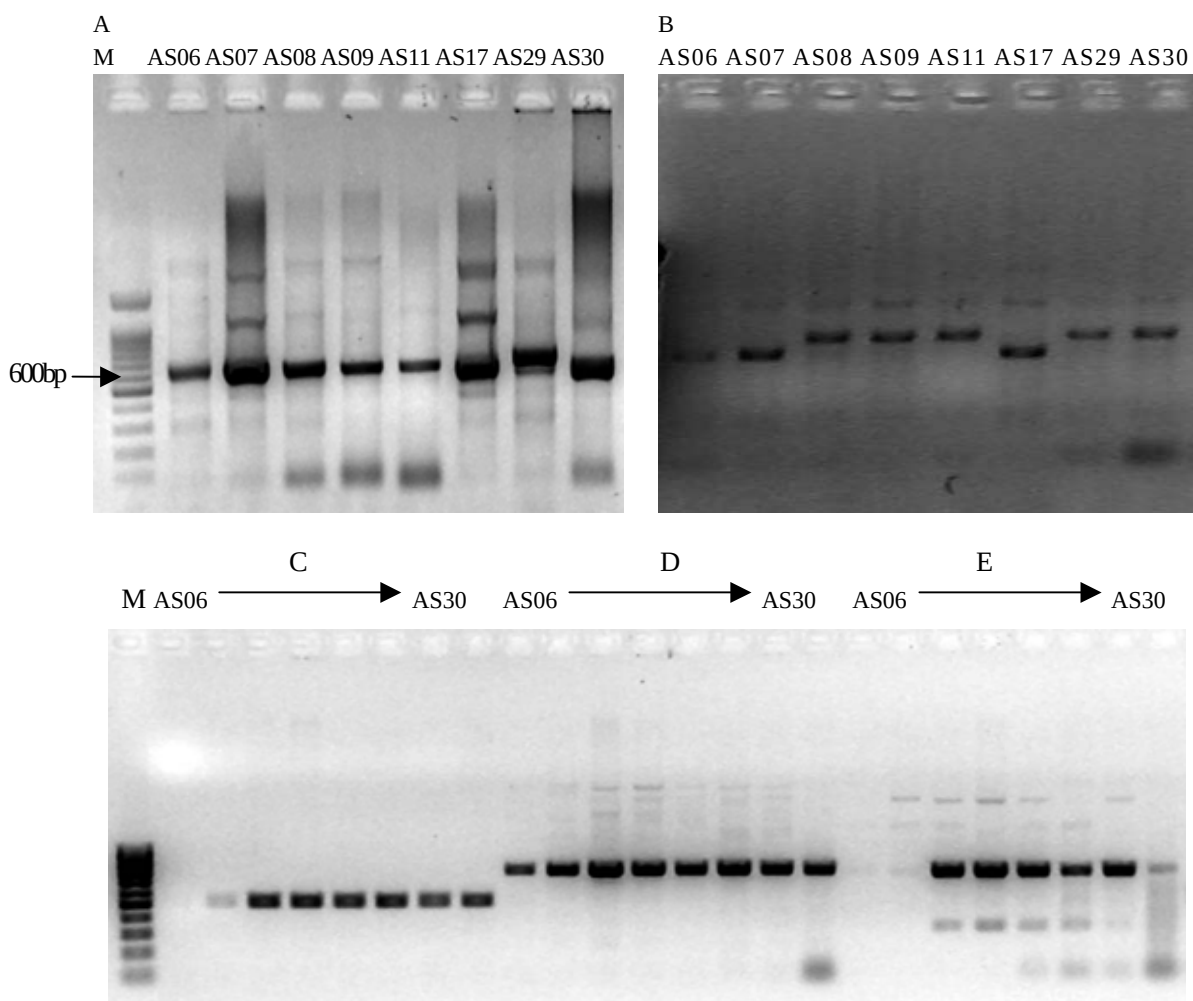


图 4-3 利用特异引物对 AS 系列玉米自交系在最适条件下的进行 PCR 扩增结果。

图 A、B、C、D、E 分别是利用 Zmp3、Zmp7、Zmp1、Zmp6 和 Zmp15 引物进行 PCR 的扩增结果; M: 100bp ladder。

Fig.4-3. Amplification results of genomic DNAs from eight AS set maize inbreds under optimized PCR condition. Fig A, B, C, D and E are PCR amplifications by Zmp3、Zmp7、Zmp1、Zmp6 和 Zmp15 primers, respectively. M: 100 bp ladder.

2.4 质粒 DNA 的提取、纯化与酶切鉴定

利用利用QIAGEN 公司的DirectPrep 96 Miniprep Kit提取质粒DNA, *EcoRI* 酶切鉴定, 表明重组子中含有目的片段 (图 4-4A、B)。

图 4-4A ZmP3 质粒纯化结果

M 为 1kb ladder

第 I 排:

1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 为 AS06;

2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 为 AS07;

第 II 排:

1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 为 AS08

2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 为 AS09

第 III 排:

1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 为 AS11

2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 为 AS17

第 IV 排:

1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 为 AS29

2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 为 AS30

Fig.4-4 Miniprep plasmid DNA of Zmp3.

No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 of each row from top to the bottom are the results of Miniprep of AS06, AS08, AS11 and AS29 plasmid DNA, respectively, while no. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 are the results of digestion of AS07, AS09, AS17 and AS30 plasmid DNA, respectively..

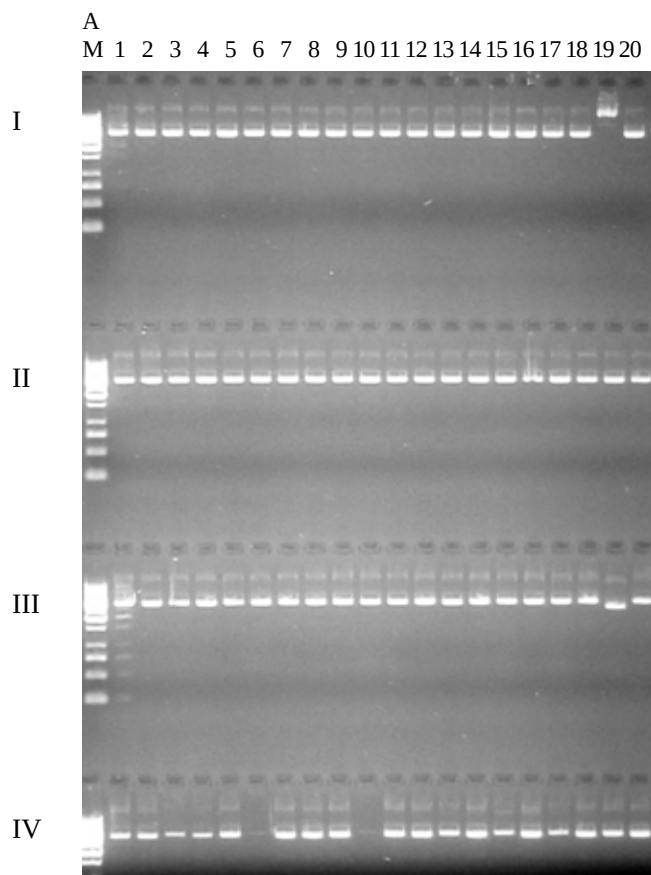
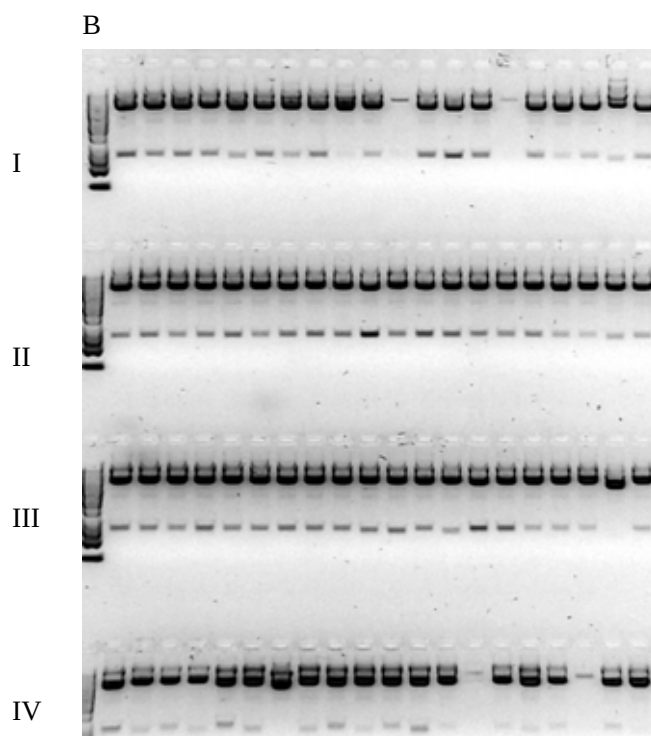
图 4-4B 质粒的 *Eco*RI 酶切鉴定结果

Fig.4-4 B Digestion of plasmid DNA using *Eco*RI.

M: 1 kb ladder.

No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 of each row from top to the bottom are the results of digestion of AS06, AS08, AS11 and AS29 plasmid DNA, respectively, while no.

2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 are the results of digestion of AS07, AS09, AS17 and AS30 plasmid DNA, respectively.



2.5 玉米漆酶基因序列分析

将所克隆的 168 个玉米漆酶质粒 DNA 集中于两个浅孔板中 (Core plate), 测序反应在 Megabace 1000 测序仪上, 采用 DYEnamic ET Terminator Kits (英国 Amersham Biosciences 公司) 以及 M13 引物进行双向序列测定。将测序结果与 GeneBank 数据库进行比较分析, 发现

在所测定的 336 个序列中, 有 81 个与已知漆酶基因具有同源性, 占总测序数的 24%。将以一对 ZmP3 引物的测序结果去除载体序列后, 对正、反向序列进行比对和拼接 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>), 获得 8 个 600bp 左右的 AS 系列玉米漆酶基因片段 (AS06 为 608bp; AS07 为 627bp; AS08 为 605bp; AS09 为 607bp; AS11 为 603bp; AS17 为 607bp; AS29 为 614bp; AS30 为 610bp)。与 GeneBank 数据库进行 BLASTx 比较, 得分在 100 分以上的结果列于下表 (4-2)。通过比较发现 AS08 核苷酸序列含有 3 个可能的开放读框 (ORF), 其编码的蛋白与水稻漆酶蛋白 (NP_915458) 同源性分别为 76%、96% 和 96% (图 4-5A)。

对以一对 ZmP7 引物测序的结果, 进行拼接获得 3 个长度分别为 623bp (ZmP7-AS07)、623bp (ZmP7-AS29)、616bp (ZmP7-AS30), 经与 GeneBank 数据库比较, 发现 ZmP7-AS07 核苷酸序列与玉米漆酶 Wis94-443 laccase 1 具有 90% 的同源性 (图 4-5B)。ZmP7-AS30 核苷酸序列与黑麦草漆酶 *LpLAC5-6* 的同源性分别为 88%、91% 和 88% (图 4-5C)。在启动子区域有一个 MYBST1 转录因子的结合位点和 2 个 CAAT 特征序列。进一步对该序列进行蛋白质一级结构分析, 发现, 该序列含有可能的 3 个开放读框 (ORF), 在该区域发现了 2 个蓝铜氧化酶信号序列以及 3 个 N-末端糖基化结合位点 (图 4-5D)。

将利用 DNAMAN 软件推导出的 8 个漆酶基因片段的氨基酸序列在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 中进行同源性搜索, 除了 AS06 和 AS07 外, 其余 6 个漆酶基因均在 [NCBI Conserved Domain Search](#) 中找到一个保守域 (图 4-6)。该保守区域为 COG2132, SufI, 属于多铜氧化酶基因家族, 主要参与次级代谢的生物合成、转运以及分解代谢途径。根据已经报道的漆酶蛋白质晶体结构, 可知漆酶具有 3 个可结合 4 个铜离子 (Cu1、Cu2、Cu3a 和 Cu3b) 的催化位点 (T1、T2、T3), 该区域是高度保守的。这 4 个铜离子的电子顺磁共振 (Electric Paramagnetic Resonance, EPR) 信号存在差异。Cu3a 和 Cu3b 通常偶联在一起, 结合于 T3 位点, 其 EPR 信号为阴离子所激活。而 Cu1 和 Cu2 具有强烈的电子吸收值, 很容易检测到 EPR 信号。Cu1 是漆酶呈现蓝色的原因。这 4 个铜离子在催化位点处, 共与 8 个组氨酸形成扭曲四面体几何构型。因此, 在此保守区域最多可以有 8 个 His-X-His 基元 (motif)。本研究利用 ClustalW 软件对推导的氨基酸序列进行序列比对, 发现了保守的 H-A-H 基元和 N 末端糖基化位点 (图 4-7), 这与以前的报道相吻合 (Mayer and Staples, 2002; Suresh kumar *et al.*, 2003)。

2.6 植物漆酶基因同源比较及分子进化分析

在拟南芥数据库 (<http://www.arabidopsis.org/servlets/Search>) 中进行同源搜索, 得到 17 个漆酶基因, 1 个位于第 1 号染色体、1 个位于第 3 号染色体、5 个位于第 2 号染色体、其余 10 个均位于第 5 号染色体。在 GRAMENE 数据库 (<http://www.gramene.org/>) 中进行搜索, 去除冗余序列后共得到 27 个与漆酶相关的基因, 其中 9 个位于 1 号染色体上, 6 个位于 11 号染色体上, 其余 12 个分散于其它 7 条染色体上 (第 4、6、8 号染色体上没有该基因)。在 GeneBank 中找到与玉米相关的漆酶基因片段 36 个, 但是均为部分序列。据文献报道在黑麦草已经发现至少 25 个漆

表 4-2 与 GeneBank 已知基因同源比较 (BLASTx) 结果

Table 4-2 The similarity results from comparing with the function identified genes in GeneBank

配准基因 Putative gene products by category	生物种 Organism	配准长度比 Percentage ID	得分 Score
Putative laccase (NP_915458)	<i>Oryza sativa</i>	79/103 (76%)	173
		28/29 (96%)	63.5
		25/26 (96%)	58.5
Putative laccase (AAC33238)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	62/82 (75%)	153
		24/34 (70%)	70
		13/26 (50%)	37
Laccase (BAB08370)	<i>Oryza sativa</i>	61/82 (74%)	142
		26/35 (74%)	59.7
		13/26 (50%)	36.6
Laccase (CAA74105)	<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>	60/82 (73%)	146
		26/35 (74%)	58.5
		14/26 (53%)	38.1
Laccase (AAK37823)	<i>Pinus taeda</i>	58/82 (70%)	141
		22/35 (62%)	53.1
		17/26 (65%)	45.4
Putative laccase (NP_915445)	<i>Oryza sativa</i>	62/82 (75%)	148
		24/35 (68%)	53.9
		13/22 (59%)	34.7
Laccase (AAK37827)	<i>Pinus taeda</i>	57/82 (69%)	142
		26/35 (74%)	58.5
		10/25 (40%)	33.1
Laccase LAC11 (AAN59949)	<i>Lolium perenne</i>	62/106 (58%)	146
		18/35 (51%)	47.8
		12/25 (48%)	34.7
laccase (EC 1.10.3.2) precursor	<i>Common tobacco</i>	54/80 (67%)	128
		18/29 (62%)	45.8
		14/25 (56%)	38.5
Laccase(AAK37825)	<i>Pinus taeda</i>	56/82 (68%)	142
		22/30 (73%)	53.1
		13/25 (52%)	37.7
Laccase (AAK37830)	<i>Pinus taeda</i>	59/83 (71%)	134
		24/35 (68%)	57.4
		15/22 (68%)	40.4
Laccase	<i>Liriodendron tulipifera</i>	65/106 (61%)	150
		25/35 (71%)	57.8
		16/26 (61%)	41.2

酶基因, 但只有 3 个为全长序列 (Gavnholt *et al.*, 2002)。我们对来自单子叶植物、双子叶植物以及裸子植物的 29 个漆酶基因进行多序列比对, 并构建分子进化树 (表 4-3、图 4-8)。多序列比对结果表明, 植物漆酶都具有保守的铜离子结合位点, 因此这些蛋白可能来源于同一祖先。从系统发育树可以看出, 本研究克隆的 8 个漆酶基因片段聚在了一起。隶属于裸子植物的 6 个松树漆酶基因也聚在了 2 个类群中。来源于杨树的 CAA74104 和 CAA74105 以及同属于黑麦草的 AAL73968、AAL73969 和 AAL73970 则分散于不同的类群中。Ranocha 等 (1999) 研究发现, CAA74104 和 CAA74105 的序列同源性仅为 50%, 系统发育分析结果也显示它们分别位于不同的类群。Gavnholt 等 (2002) 报道, 3 个全长的黑麦草漆酶基因—AAL73968、AAL73969 和 AAL73970 的等电点 (依次为 9.0、5.8 和 5.0) 和 N 末端糖基化位点数 (依次为 13、9 和 14) 差别很大。而等电点 (Isoelectric points, pI) 相近的 AAL73969 和 AAL73970 的同一性则远大于 AAL73968。因此, 推测 pI 值也可能是判定漆酶功能的指标之一。而对 pI 值相近, N 末端位点数目差异较大的 AAK37823、AAK37825、AAK37827、AKK37828、AKK37829 和 AKK37830 (分别为 21、17、21、20、12 和 10), 则出现了 N 末端位点数目相似者, 即前 4 个和后 2 个分别属于 2 个不同的类群中。这与 Sato 等 (2001) 的报道完全一致。位于拟南芥第 5 号染色体上的 4 个漆酶基因也没有聚在一起。同时, 我们也可以清楚的看出, 在聚类图中, 被子植物和裸子植物漆酶没有形成明显的两个类群, 而呈互相交叉的分布。由此推断, 漆酶基因的复制是一个连续的过程, 即在种子植物分化成双子叶植物、单子叶植物以及裸子植物的前后, 均可能发生了基因复制。

A

克隆片段: *Zmp3-AS08*

同源序列 (Sbjct): NP_915458

Query: 144 GRRLITRVIQYR-----HGVRLRNGWADGPSYITQCPIQGGQSYVYDFTVTGQRGT 299
Sbjct: 75 GDRLVVKVHNMNYSFHWHGILQLRNGWADGPSYITQCPIQGGQSYVYDFTVTGQRGT 134

Query: 300 LWWHAHFSWLRVHLYGPLVILPKRGEYFPFPRPYKEV-PVLFG 425
Sbjct: 135 LWWHAHFSWLRVHLYGPLVILPKRGEYFPFPRPYKELPPIMFG 177

Query: 514 GEWFNADTEAVINQALQTGAGPNVSDAYT 600
Sbjct: 177 GEWFNADTEAVINQALQTGAGPNISDAYT 205

Query: 2 KLVVREGDRLVVKVHNHINYNVSFW 79
Sbjct: 69 KLVVREGDRLVVKVHNHINYNVSFW 94

B

克隆片段: *ZmP7-AS07*

同源序列 (Sbjct): gi|39547185|gb|AY464051.1| Zea mays genotype Wis94-443 laccase 1 (Lac1) gene, partial cds Length = 812 Identities = 138/153 (90%)

Query: 179 caggcacggcggtccggcagctgcgcaacgggtggcgacggcgccgtcgtacatcacgca 238
|||||
Sbjct: 594 caggcacggcggtccggcagctgcgcaacgggtggcgacggcgccgtcgtacatcacgca 653

Query: 298 c a c g c t g t g g t g g c a c g c g c a c t t c t c t g g c t 330
 ||||| |||||
 Subject: 714 c a c g c t c t g g t g g c a c g c g c a c t t c t c t g g c t 746

Sbjct: 488 FVIGQGFGNYDAVNDPAKFNLVDP--VERNTVGVPAAGWVAIRFLADNPG 535

Identities = 34/104 (32%), Positives = 37/104 (35%)

Query: 41 FNYTGTPAQQHQRGQRGXXXXXXXXXXXXXXXXXXIAGHQHSSDGVESHPLHLHGFNFIXXX 220

Sbjct: 436 FNYTGTTPNN----TNVKTGTLKLLVLRNTSVELVMQDTSILGIESHPLHLHGFNF--VI 490

图 4-5 部分漆酶克隆片段序列的同源性比较

Fig 4-5 Homology search results for some maize laccase fragments

Zmp3-AS set08



[gnl|CDD|11840](#), COG2132, SufI, Putative multicopper oxidases [Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism]

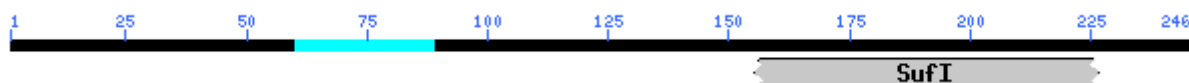
Query: 32 GWADGPSYITQCP IQGGQSYVYDFTVTGQRGTLWWHAH-FSWLRVHLYGPLVILPKRGEG 90

Sbjct: 97 GEMDGVPPLTQIPPGGETPTYTFTQD-VPGTYWYHPHTHGQVYDGLAGALIEDEN--- 152

Query: 91 YPFPRPYKEVPVLF 104

Sbjct: 153 -SEPLGVDEPVIIL 165

Zmp3-AS Set09



[gnl|CDD|11840](#), COG2132, SufI, Putative multicopper oxidases [Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism]

Query: 155 GWADGPSYITQCP IQGGQSYVYDFTVTGQRGTLWWHAH-FSWLRVHLYGPLVILPKRGEG 213

Sbjct: 97 GEMDGVPPLTQIPPGGETPTYTFTQD-VPGTYWYHPHTHGQVYDGLAGALIEDEN--- 152

Query: 214 YPFPRPYKEVPILF 227

Sbjct: 153 -SEPLGVDEPVIIL 165

Zmp3-AS Set 11



[gnl|CDD|11840](#), COG2132, SufI, Putative multicopper oxidases [Secondary metabolites biosynthesis,

transport, and catabolism]

Query: 51 AVPDPGGQSYVDFTVTGQRGTLWWHAH-FSWLRVHLYGPLVILPKRSEGYPFPRPYKEV 109
Sbjct: 107 QIPPGPGETPTYTFTQD-VPGTYWYHPHTHGQVYDGLAGALIIEENSE----PLGVDE 161

Query: 110 PILF 113

Sbjct: 162 PVIL 165

Zmp3-AS set17



[gnl|CDD|11840](#), COG2132, SufI, Putative multicopper oxidases [Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism]

Query: 32 GWADGPSYITQCP IQGGQSYVDFTVTGQRGTLWWHAH 69
Sbjct: 97 GEMDGVPPLTQIPPGPGETPTYTFTQD-VPGTYWYHPH 133

Zmp3-AS set 29



[gnl|CDD|11840](#), COG2132, SufI, Putative multicopper oxidases [Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism]

Query: 88 GWADGPSYITQCP IQGGQSYVDFTVTGQRGTLWWHAH 125
Sbjct: 97 GEMDGVPPLTQIPPGPGETPTYTFTQD-VPGTYWYHPH 133

Zmp3-AS set 30



[gnl|CDD|11840](#), COG2132, SufI, Putative multicopper oxidases [Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism]

Query: 32 GWADGPSYITQCP IQGGQSYVDFTVTGQRGTLWWHAH-FSWLRVHLYGPLVILPKRGE 90
Sbjct: 97 GEMDGVPPLTQIPPGPGETPTYTFTQD-VPGTYWYHPHTHGQVYDGLAGALIIEEN--- 152

Query: 91 YPFPRPYKEVPILF 104

Sbjct: 153 -SEPLGVDEPVIL 165

图 4-6 NCBI 中找到一个可能的保守结构域

Fig. 4-6 One putative domain found from NCBI

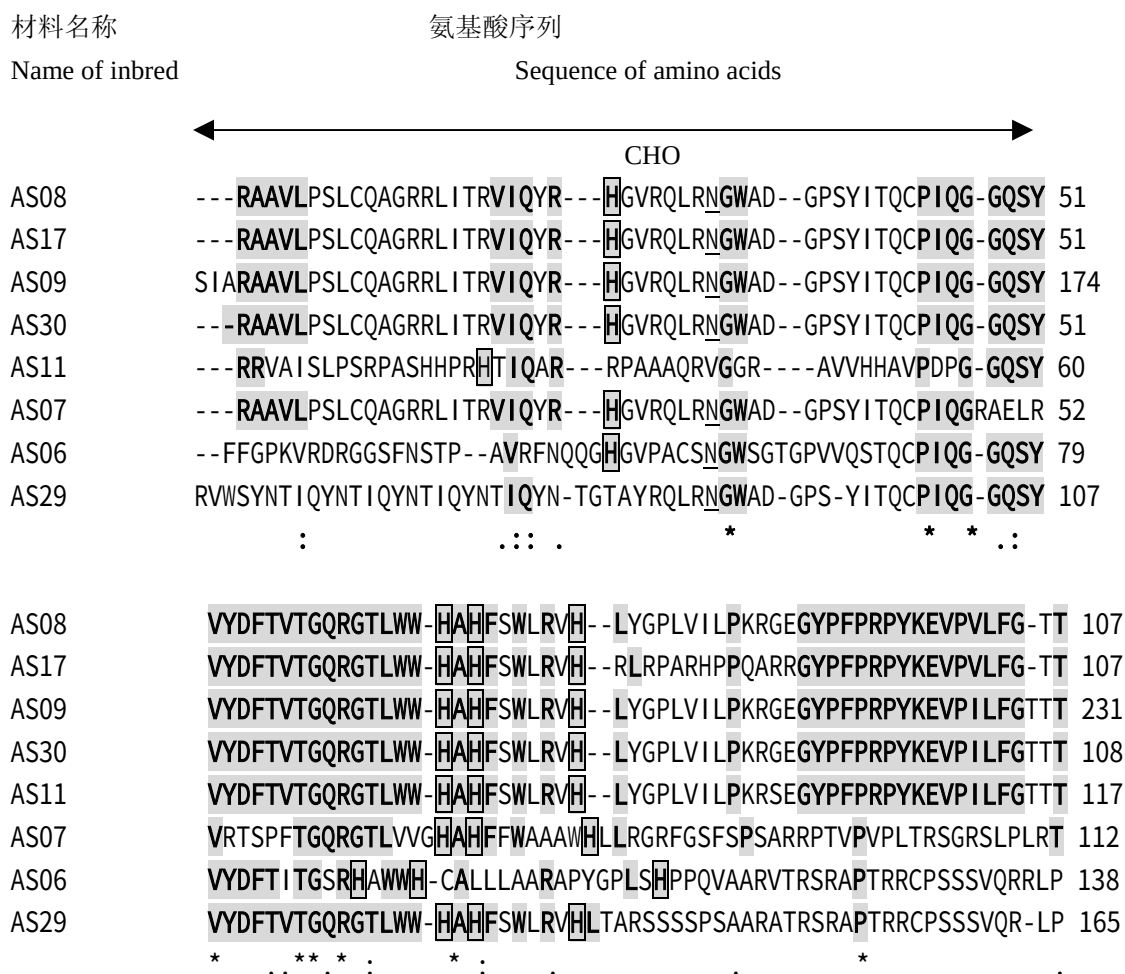


图4-7. 玉米漆酶基因片段（ZmP3-AS Set 系列）保守区氨基酸序列的比对分析

方框中是高度保守的铜离子结合位点，下划线为N末端糖基化位点，并命名为CHO。星号表示完全保守的残基，冒号表示高度保守的残基，点号表示微弱的保守区，短线表示最佳序列比对的空缺残基。

Fig. 4-7 ClustalW alignment of laccase fragments from maize

The highly conserved copper-binding sites for each of the ligand residues is bound are highlighted within boxes. Conserved potential N-linked glycosylation sites are designated by CHO. “*” indicates positions which have a single, fully conserved residue; “:” indicates positions which have a strongly conserved residue; “.” indicates positions which belong to a weaker conserved group; dashes within a sequence indicate gaps inserted to optimize alignment.

表 4-3 植物漆酶保守区氨基酸序列的比对分析

方框中残基是高度保守的铜离子结合位点

Table 4-3 ClustalW alignment of plant laccases.

The highly conserved copper-binding sites to which each of the ligand residues is bound are highlighted within boxes.

物 种	序列号或来源	氨基酸序列
Plant species	Accession no. or origin	Sequence of amino acids
<i>Liriodendron tulipifera</i>	AAB17192	FTII-GQTGLFW- HAHISWLRST 146
<i>L. tulipifera</i>	AAB17194	FRII-SQRGLFW- HAHISWLRAT 146
<i>L. tulipifera</i>	AAB17193	FTIV-GQRGLFW- HAHISWLRST 147
<i>L. tulipifera</i>	AAB17191	FTIV-GQRGLFW- HAHFSWLRAT 136
<i>P. trichocarpa</i>	CAA74105	FTIT-GQRGTLLW- HAHISWLRSS 145
<i>Oryza sativa</i>	BAB86452	YTIT-GQRGLWW- HAHISWLRAT 139
<i>O.sativa</i>	AAL73968	FTVT-GQRGLWW- HAHISWFRAT 140
<i>Pinus taeda</i>	NP_915458	FTVT-GQRGLWW- HAHFSWLRVH 147
<i>P. taeda</i>	AAK37827	FTIT-GQRGLWW- HAHISWLRAS 154
<i>P. taeda</i>	AAK37828	FTIT-GQRGLWW- HAHISWLRVS 144
<i>P. taeda</i>	AAK37823	FTVT-GQRGLWW- HAHISWLRAS 143
<i>P. taeda</i>	AAK37825	FTIT-GQRGLWW- HAHISWLRAT 140
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK37829	FTIT-GQRGLFW- HAHILWLRAT 135
<i>A. thaliana</i>	AAK37830	FTVT-GQRGLWW- HAHILWLRAT 151
<i>Populus balsamifera</i>	At5g09360	IDLK-VEEGTIWW- HAHSQWARAT 145
<i>A. thaliana</i>	At5g48100	VIFS-IEDTTVWW- HAHSSWTRAT 130
<i>L. perenne</i>	CAA74104	FTIEGTRRNTLGW- HAHSSWLRAT 143
<i>L. perenne</i>	At5g01040	FDIT-GQEGTLLW- HAHVVNLRAT 147
<i>Zea mays</i>	At5g01050	FDIT-GQEGTLLW- HAHVVNLRAT 147
<i>Z. mays</i>	AAL73969	FDVV-GQEGTLWW- HAHISTLRAT 133
<i>Z. mays</i>	AAL73970	FNVT-GQEGTLWW- HAHSSFLRAT 149
<i>Z. mays</i>	AS11	FTVT-GQRGLWW- HAHFSWLRVH 85
<i>Z. mays</i>	AS08	FTVT-GQRGLWW- HAHFSWLRVH 76
<i>Z. mays</i>	AS17	FTVT-GQRGLWW- HAHFSWLRVH 76
<i>Z. mays</i>	AS09	FTVT-GQRGLWW- HAHFSWLRVH 199
<i>Z. mays</i>	AS30	FTVT-GQRGLWW- HAHFSWLRVH 76
<i>Z. mays</i>	AS07	SPFT-GQRGLVVG- HAHFFWAAAH 78
<i>Z. mays</i>	AS06	FTIT-GSR- HAWWH -CALLLAARAP 104
<i>Z. mays</i>	AS29	FTVT-GQRGLWW- HAHFSWLRVH 132
		. : *

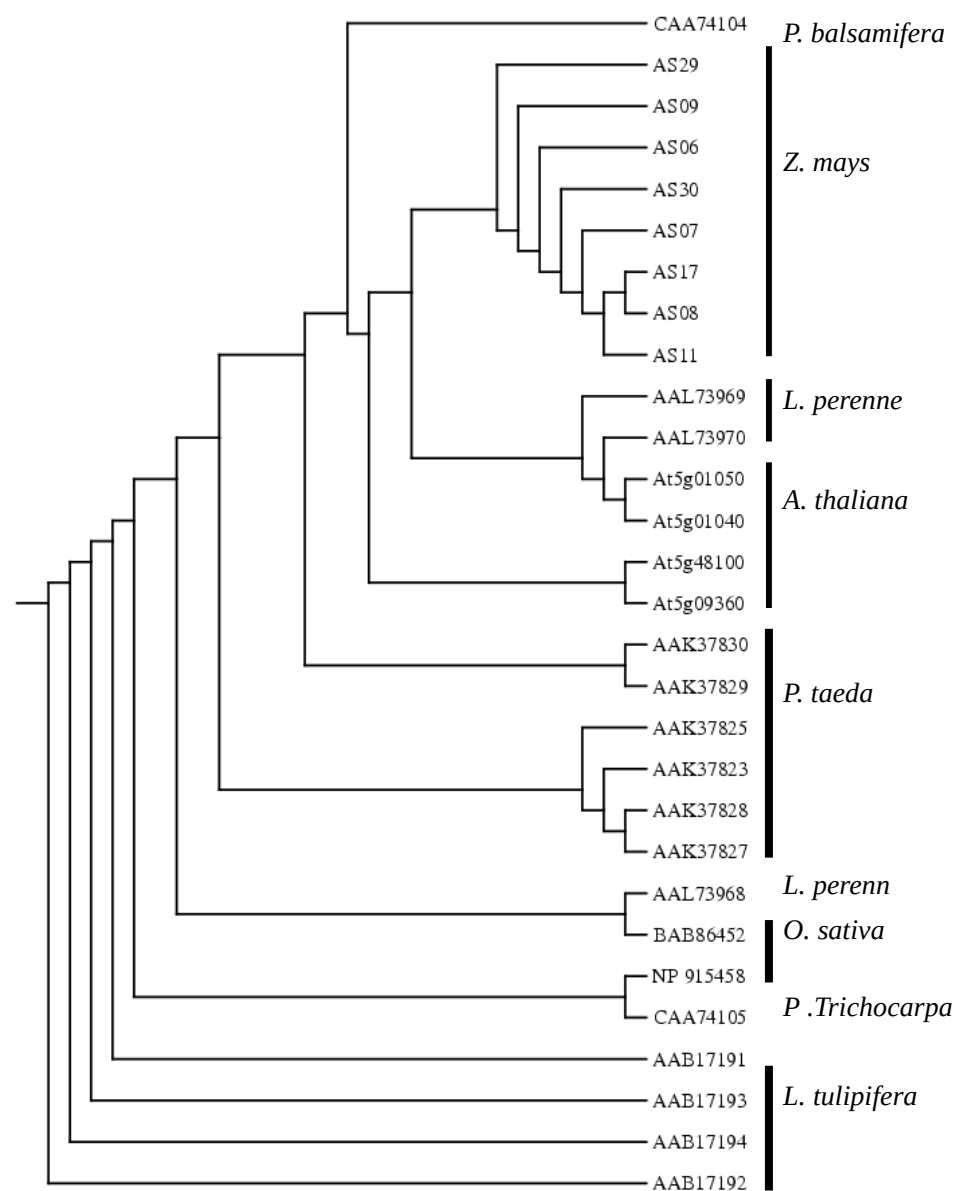


图 4-8 植物漆酶的系统发生分析

Fig. 4-8 Phylogenetic relationships among laccases from different plant species.

2.7 玉米漆酶基因的染色体初步定位

目的基因的初步定位是图位克隆的先决条件，它是利用分子标记技术在一个目标性状的分离群体中把目的基因定位于染色体的一定区域内。目标性状基因的方法目前主要有两个：一是利用 Micheltore 等(1991) 提出的分离群体分组分析法(bulked segregant analysis, 简称BSA)。该方法是将F₂ 分离群体中研究的目标性状根据其表型(如抗病、感病)分成两组，将两组单株的DNA 混合提取，并用作模板进行RAPD 分析。二是根据已有的连锁图进行标记。一旦发现目标基因被定位在某一染色体上，就可选择分散在染色体上不同位点的标记，逐渐逼近，这样很快便可找到该基因的分子标记。近年来，各主要农作物上均有许多重要的质量性状基因被标记。如水稻上的抗稻瘟病基因、矮秆基因、小麦上的抗白粉病基因等。

利用H21×Mo17作图群体，ZmP7引物对进行染色体定位的初步定位分析(图4-9)。结果发现该片段被定位于第4号染色体短臂的nc004(Bin 4.03)和phi026(Bin 4.05)标记之间(图4-10)。

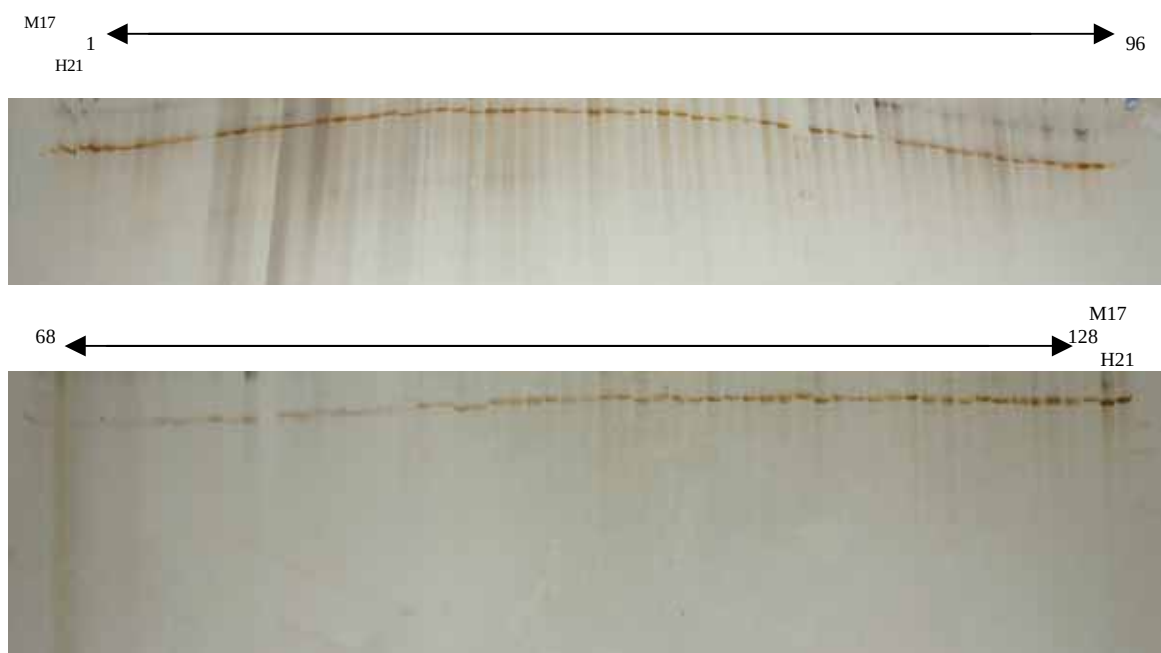


图 4-9 一对 ZmP7 引物扩增的玉米漆酶基因染色体定位

Fig.4-9 Chromosome mapping of maize laccase using H21×Mo17 mapping population and ZmP7 primers

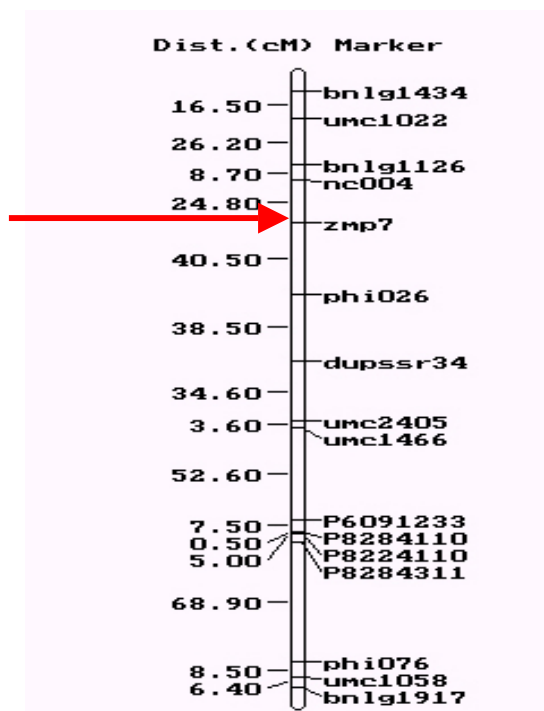


图 4-10 玉米漆酶基因所在的染色体区域

Fig 4-10 Chromosome location of maize laccase

本研究应用基于同源序列的候选基因方法，通过GeneBank 中已有的黑麦草漆酶基因序列，进行设计用于克隆玉米漆酶基因的特异引物，扩增到与植物漆酶同源的片段，然后通过染色体定位，提供了可能的玉米漆酶基因位点。克隆获得的片段中发现了保守的蓝铜氧化酶信号序列以及可能的N-末端糖基化结合位点；该特征序列与Ranocha等 (1999) 的结果相吻合。由ZmP3 引物所扩增得到的 6 个漆酶基因均在 [NCBI Conserved Domain Search](#)中找到一个保守域，该保守区域为 COG2132, SufI, 属于多铜氧化酶基因家族，主要参与次级代谢的生物合成、转运以及分解代谢途径。值得一提的是，在ZmP7-AS30 的启动子区域有一个MYBST1 转录因子的结合位点和 2 个 CAAT特征序列。MYB是一个DNA结合蛋白，在信号传递和基因调控中起关键作用的转录因子，具有多种功能和不同的结构域 (刘强 等, 2000b; Jin and Cathie, 1999)。植物MYB蛋白与一系列的细胞过程有关，如苯丙氨酸 (PAL) 或色氨酸生物合成途径、细胞命运和细胞周期调控、细胞生理节奏的周期性表达调控以及磷酸饥饿应答等(Meissner *et al.*, 1999; Petroni *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2001; Stracke *et al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2001; Zimmermann *et al.*, 2004)。本论文第一章提到，PAL是木质素生物合成途径中一个重要的代谢途径。而且，Gavnholt & Larsen (2002) 克隆的黑麦草漆酶基因 *LpLAC5-4* 也含有 6 个调控漆酶基因功能的 MYB 调控转录因子的结合位点。该研究小组还证实，MYB基因在木质部组织高度差异表达，其过量表达能够抑制酚酸类化合物代谢和木质化途径。

然而，大量的研究表明，漆酶基因在基因组中为多成员成簇存在，而且它们的功能也不尽相同，有的成员还没有功能。从基因组 DNA 扩增的漆酶基因同源序列的定位结果也只能提供可能

的漆酶基因位点，而不能提供其功能证据。另外，根据保守序列设计的引物，在所供试的 4 个作图群中进行带型差异的鉴定特别困难。一方面可能是因为由于供试亲本及其群体中与相应的序列差异很小，或许很可能是单碱基的差异，这种差异用普通的变性聚丙烯酰胺胶电泳检测起来十分困难；另一方面，可能是由于所用的引物本身是根据保守序列区域设计，两个保守区域内的碱基在不同材料中如有变化，也多为碱基类型的差异，而碱基数目则没有改变。解决这一难题的途径是：（1）采用单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）技术；（2）采用 RT-PCR 技术，直接从表达序列着手，摒弃繁冗的重复序列。

3 小 结

利用基因同源序列方法，克隆到了一批玉米漆酶片段，其序列与已经发表的植物漆酶基因有不同程度的同源性，而且具有植物漆酶基因的保守序列特征。有几个克隆片段含有重要的转录因子，如 MYB，结合位点，是下一步深入研究的重点。

分子进化分析表明，植物漆酶在种子植物分化为单子叶植物和双子叶植物的前后，均可能发生了基因复制。

我们已经将本研究所有获得的玉米漆酶基因序列送交德国 KWS 公司，通过对已克隆的与饲用品质相关的等位基因进行大规模测序，结合 QTL 作图和相关农艺性状测定，利用有效的生物信息学工具（如 TASSEL, Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage），进行候选基因功能分析，设计功能标记，以此为饲用玉米的品质改良提供物质和理论依据。

第五章 利用 cDNA-AFLP 技术研究玉米水分胁迫诱导基因的表达

通过抗旱育种途径提高玉米种质的抗旱性和水分利用率是解决干旱问题的有效途径之一。研究表明,玉米在干旱环境下的遗传改良潜力很大,但是众所周知,常规的抗旱育种方法费时费力,效率不高。而且在干旱条件下,产量遗传力和遗传方差降低。

随着生物技术的不断发展,越来越多的抗旱基因被克隆,它们编码着已知功能的或者未知功能的各类基因产物。这对于探索水分胁迫条件下植物抗旱的作用机制以及转抗旱基因的研究起到了积极作用。但是,由于抗旱性是由多基因控制的综合性状,植物与环境间的相互作用涉及诸多代谢过程的生理生化变化,有许多被诱导的基因在不同组织、不同时期表达。对于某种作物而言,究竟哪些基因将会使其抗旱性更为增强,仍然是一个令人困惑的问题。因此,积极而深入地开展与抗旱相关的新基因的分离、克隆和功能鉴定,是十分必要的。

本研究利用 cDNA-AFLP 技术、测序技术和生物信息学技术平台,对 4 个玉米种质在水分胁迫条件下基因的差异表达情况进行深入研究,确定与玉米抗旱相关的功能基因。本研究的实施,将进一步在基因水平上对玉米抗旱性的分子机制进行澄清,并获得了具有重要实用价值的功能基因,为下一步的抗旱育种奠定了物质基础。此外,获得的转录本衍生片段(Transcript Derived Fragments, TDFs)还可以作为遗传作图的探针,这也为本课题组在同时进行的关于玉米抗旱性的数量性状位点(QTL)分析研究提供了有针对性的作图手段。

1 材料与方法

1.1 材料

A188、CN165、CN129 和农大 178 是中国农科院品资所与新疆农科院等合作单位经过多年的苗期和成株期抗旱鉴定材料。其中, A188 和 CN165 用于 PEG 胁迫处理的研究; CN129 和农大 178 则用于土壤干旱胁迫的研究。

PEG 胁迫选用的渗透压为-0.5Mpa, 取样策略共分为 14 个时间段:对照、0.5h、1h、3h、6h、12h、24h、36h、48h; 然后在开始复水后 0.5h、1h、3h、6h 和 12h 分别取样(图 5-1)。

土壤干旱胁迫采取如下措施:正常供水条件下,土壤含水量为田间最大持水量的 70%-80%; 土壤含水量占田间持水量的 55%-60%,为轻度干旱胁迫;达到 40%-45%,即为中度干旱;如果只有 30%-35%,就造成严重干旱。水分控制采用称重法。将经过挑选的 CN129 和农大 178 玉米种子进行浸种,恒温培养箱中催芽后播于塑料盆中。盆中土壤为田间耕层土:砂:草炭:肥=10:2:2:1,相对含水量为 80%。玉米幼苗自然条件下生长 20 天后停止供水,每天称重,待土壤含水量为中度胁迫时,分 11 个时间段取样:从播种到停水时生长正常的样品;中度胁迫 0 天、1 天、3 天、5 天、7 天和 9 天;从种植到复水前一直生长正常的玉米幼苗叶片;然后在开始复水后 6h、24h、72h 分别取样(图 5-2)。

1.2 方法

1.2.1 PEG 胁迫溶液的配制

通过对玉米幼苗期使用不同浓度 PEG6000 胁迫(CK、-0.25Mpa、-0.50 Mpa、-0.75 Mpa、-1.0

Mpa) 处理后, 确定了-0.5 Mpa 为本研究较适宜的胁迫指标。

用聚乙二醇 (PEG6000) 配制胁迫溶液：

渗透压 (Bar) = $-(1.18 \times 10^{-2})C - (1.18 \times 10^{-4}) C^2 + (2.67 \times 10^{-4}) CT + (8.39 \times 10^{-7}) C^2T$

注：C=g/kg H₂O；T=温度 (°C)；1ba=1Mpa。若已知渗透压、温度，则可求算溶液浓度。

本试验是在 20°C、-0.5 Mpa条件下进行。因此，PEG6000 的需求量为 192.6g/kg H₂O。

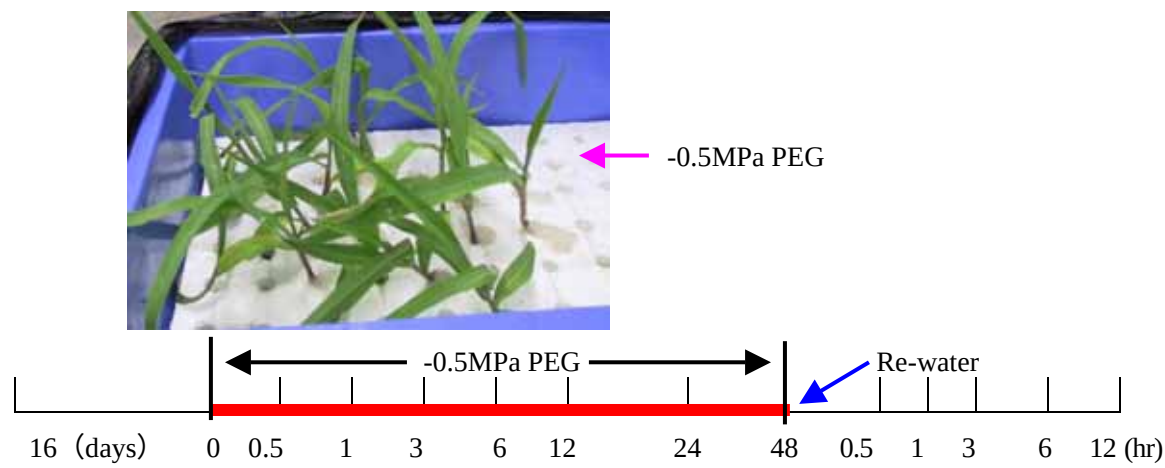


图 5-1 PEG 模拟胁迫取样策略

Fig.5-1 Sampling strategy of early seedling of maize in PEG stress.

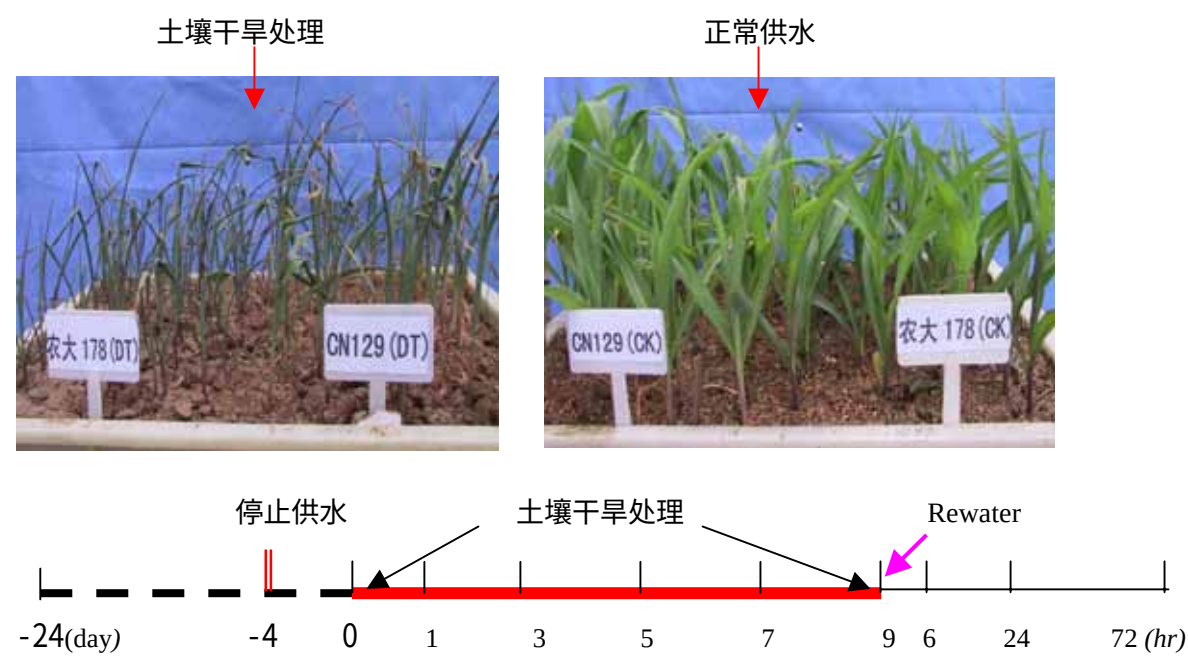


图 5-2 土壤干旱胁迫的取样策略

Fig 5-2 Sampling strategy of early seedling of maize in soil-drought stress.

1.2.2 总 RNA 的提取与检测

1.2.2.1 利用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒提取总 RNA：

- 1) RNA 操作中所用到的塑料制品用 0.1% DEPC 水处理。研钵、镊子、烧杯、试剂瓶等玻璃和金属制品，160°C 高温烘烤 8 小时以上以去除 RNase 污染；
- 2) 在液氮中加入 0.1-0.2 g 玉米叶片，迅速研磨成粉末，转入 1.5 ml 的 DEPC 处理过的 Eppendorf 管中；
- 3) 加入 1 ml Trizol 试剂，旋涡混合，室温（15-30°C）放置 5min；
- 4) 加入 0.2 ml 氯仿，盖好，用手剧烈摇动离心管 15 秒，然后静置 2-3min；
- 5) 2-8°C，12 000×g 离心 15min，管中分为 3 层，上层为无色的水相，RNA 位于水相中；
- 6) 小心吸取上层水相，加入 0.5 ml 异丙醇，沉淀 RNA。混匀后静置 10min。2-8°C，12,000×g 离心 10min，RNA 形成一胶状沉淀；
- 7) 移去上清，加入 1 ml 75% 的乙醇清洗沉淀。涡旋悬浮 RNA 沉淀；
- 8) 2-8°C，7500×g 离心 5min；
- 9) 倒去上清，干燥 RNA（不可太干燥，否则影响其溶解性）；
- 10) 加入 30-50 μ l 无 RNase 的水，55-60°C 温育 10min，以充分溶解 RNA；
- 11) 用紫外分光光度计检测 RNA 的纯度与浓度；甲醛变性胶检测 RNA 的质量。

1.2.2.2 用甲醛变性胶检测 RNA 的质量：

甲醛变性胶的配制：1.2 g 琼脂糖，加入 10ml 10×FA buffer，用无 RNA 酶的水定容至 100 ml，微波炉溶化琼脂糖，待胶稍凉至 65°C 时，加入 1.8 ml 37% 甲醛和一滴 EB。

电泳条件：甲醛变性胶配制好后，放在 1×FA gel buffer 中平衡至少 30 min。向一定的 RNA 样品中加入 5×RNA loading Buffer，65°C 水浴 3-5min。上样后稳压 5-7V/cm，电泳 1 小时。

1.2.3 双链 cDNA 的合成

PEG 胁迫 cDNA 合成的反转录酶为 AMV Reverse Transcriptase，土壤干旱胁迫 cDNA 合成的反转录酶为 SuperScript III。按照 Promega 公司的 cDNA 第一链和第二链的合成试剂盒（Universal RiboClone®）方法进行：

A. 第一链 cDNA 合成

- 1) 向灭过菌的 0.2 ml 微量离心管中加入下列试剂：

Total RNA (0.5 μ g/ μ l)	4 μ l
Primer (Oligo(dT) ₁₅) (0.5 μ g/ μ l)	2 μ l
Nuclease-free H ₂ O	9 μ l
Total volume	15 μ l

- 2) 混合样品，短暂离心。72 °C 保温 5-10 min；
- 3) 迅速置于冰上，冷却 5min。短暂离心收集样品于管底。
- 4) 加入下列试剂于反应管中：

上述混合样	15 μ l
5 $\times$ First-Strand Buffer	5 μ l
RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l

轻轻混匀, 42 $^{\circ}$ C保温 5 min ;

5) 加入下列试剂 :

Sodium Pyrophosphate (40mM)	2.5 μ l
AMV Reverse Transcriptase	1.5 μ l
Total volume	25 μ l

轻弹, 混匀, 短暂离心。

6) 42 $^{\circ}$ C保温 1h, 置于冰上, 随后进行 cDNA 第二链合成

B 第二链 cDNA 合成

1) 在冰上向第一链样品中加入下列试剂 :

First-Strand sample reaction	20 μ l
2.5 $\times$ First-Strand Buffer	40 μ l
Acetylated BSA (1mg/ml)	5 μ l
DNA Polymerase (9U/ μ l)	2.5 μ l
RNase H (0.5U/ μ l)	1.6 μ l
Nuclease-free H ₂ O	31 μ l
Total volume	100 μ l

2) 轻弹管底, 混合样品, 短暂离心 ;

3) 14 $^{\circ}$ C保温 2hrs ;

4) 70 $^{\circ}$ C保温 10min, 短暂离心后置于冰上 ;

5) 加入 T₄ DNA Polymerase (2U/ μ l) 2 μ l, 37 $^{\circ}$ C保温 10min ;

6) 加入 10 μ l 200mM EDTA, 置于冰上终止反应 ;

C 抽提 cDNA :

1) 加入等体积的酚 : 氯仿 : 异戊醇 (25 : 24 : 1), 充分混匀 ;

2) 室温 12000rpm 离心 10min ;

3) 移水相到另一离心管中, 加入 0.1 体积的 2.5M NaAc (pH5.2), 混匀 ;

4) 加入 2 倍体积冰冷 (-20 $^{\circ}$ C) 的 100% 乙醇, -70 $^{\circ}$ C放置 30min ;

5) 高速离心 10min ;

6) 小心移去上清, 加入 0.5 ml 冰冷 (-20 $^{\circ}$ C) 的 70% 乙醇, 使其沉淀, 高速离心 5min ;

7) 仔细移去上清, 短暂干燥沉淀 ;

8) 加入 10-50 μ l 的 TE 溶解沉淀。 -20 $^{\circ}$ C贮存备用。

1.2.4 cDNA-AFLP 分析

采用 Bachem 等 (1998) 所述方法, 略加修改。以 MseI 和 PstI 两种限制性内切酶对 cDNA 进行酶切; 用 MseI adaptor 和 PstI adaptor 两种接头连接, 以 M00 和 P00 为引物进行预扩增。以 MseI 选择性引物 (3 碱基) 和 PstI 选择性引物 (2 碱基) 进行扩增 (表 5-1)。

1.2.4.1 酶切与连接

10 ×BSA	0.25μl
PstI (20U/μl)	0.15μl
MseI (10U/μl)	0.30μl
PstI adaptor (5 pmol/μl)	1.0μl
MseI adaptor (50pmol/μl)	1.0μl
T ₄ -ligase (10U/μl)	0.4μl
T ₄ -ligase buffer (含 10mMATP)	2.5μl
ddH ₂ O	17.4μl
DNA (200ng/μl)	2μl
Total volume	25μl

37°C 恒温水浴, 酶切连接过夜培育。

1.2.4.2 预扩增反应体系及程序

M00 (50ng/μl)	0.6μl
P00 (50ng/μl)	0.6μl
10× PCR buffer (含 Mg ²⁺)	2.0μl
dNTPs (10mM)	0.4μl
Taq polymerase (2U/μl)	0.3μl
ddH ₂ O	14.1μl
酶切-连接产物	2.0μl
Total volume	20μl

预扩 PCR 程序：

Step 1	94°C	2min
Step 2	94°C	30sec
Step 3	56°C	30sec
Step 4	72°C	1min
Step 5	go to step2	34 cycles
Step 6	72°C	5min
Step7	4°C	Hold
Step8		End

取 5μl 预扩增产物, 稀释 20 倍, 用于选择性扩增。

1.2.4.3 选择性扩增反应体系与扩增程序

取 4 μ l 稀释的预扩增产物，加入 16 μ l 下列反应液：

Mse I primer (50ng/ μ l)	0.8 μ l
Pst I primer (50ng/ μ l)	0.8 μ l
10 $\times$ PCR buffer (含Mg ²⁺)	2.0 μ l
dNTPs (10mM)	0.45 μ l
Taq polymerase (2U/ μ l)	0.35 μ l
ddH ₂ O	11.6 μ l
Total volume	16 μ l

选择性 PCR 扩增程序：

Step 1	94°C	2min
Step 2	94°C	35sec
Step 3	56°C	35sec (每循环降低 0.7°C)
Step 4	72°C	1min
Step 5	Go to step2	12 cycles
Step 6	94°C	35sec
Step7	56°C	35sec
Step8	72°C	1min
Step9	Go to step6	30 cycles
Step10	72°C	5min
Step 11	4°C	Hold
Step12		End

1.2.5 电泳分离与银染

参见第四章 1.2.3

1.2.6 聚丙烯酰胺胶中差异片段的回收

- 1) 取一洁净的小刀，从聚丙烯酰胺凝胶中挖取目的片段；
- 2) 将目的DNA片段转入 0.5ml 的离心管中，加入 50 μ l ddH₂O，100°C煮沸 20 min；
- 3) 短暂离心，吸取上清 2 μ l 作为模板，进行二次 PCR 扩增；

或者将挖取的目的片段，加入 100 μ l ddH₂O中，于 100°C溶解 5min，37°C浸泡过夜，去掉不溶物。然后用 2 倍体积的无水乙醇沉淀出极微量的DNA，加入 10 μ l ddH₂O溶解后用于PCR扩增。二次 PCR 条件与 cDNA-AFLP 预扩增相一致。但对于不同的目的回收带，切记选用与原来扩增中相对应的引物。

表 5-1 用于 cDNA-AFLP 扩增的引物

Fig. 5-1 Primers used for cDNA-AFLP amplification

接头/引物 Adaptors/primers	编号 Primer no.	引物序列 Primer sequence
Mse I adaptor		5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
Pst I adaptor		5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3' 3'-CATCTGACGCATGT-5'
M00		5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
P00		5'-GACTGCGTACATGCAG-3'
Mse I +3 primers	M31	M00+AAA
	M32	M00+AAC
	M33	M00+AAG
	M34	M00+AAT
	M35	M00+ACA
	M36	M00+ACC
	M37	M00+ACG
	M38	M00+ACT
	M39	M00+AGA
	M40	M00+AGC
	M41	M00+AGG
	M42	M00+AGT
	M43	M00+ATA
	M50	M00+CAT
	M51	M00+CCA
	M52	M00+CCC
	M55	M00+CGA
	M61	M00+CTG
	M62	M00+CTT
	M86	M00+TCT
Pst I +2 primers	P11	P00+AA
	P12	P00+AC
	P13	P00+AG
	P14	P00+AT
	P15	P00+CA
	P16	P00+CC
	P17	P00+CG
	P18	P00+CT
	P19	P00+GA
	P20	P00+GG
	P21	P00+GG
	P22	P00+GT
	P23	P00+TA
	P24	P00+TC
	P25	P00+TG
	P26	P00+TT

1.2.7 PCR 产物的纯化

选用 Promega 公司 PCR 产物纯化试剂盒 Wizard PCR Preps 进行：

- 1) 向 1.5ml 离心管中加入 30-300 μ l PCR 产物和 100 μ l PCR 产物直接纯化液，颠倒混匀；
- 2) 向混合液中加入 1ml 预先混匀的洗液，颠倒混匀，室温静置 1min；
- 3) 取 1ml 注射器，拔去针头极针柱，将针管接于纯化柱上。然后将混合液转移至针管内，缓慢推动针柱；
- 4) 拔去针管，取出针柱。重新将针管接于纯化柱上，向针管内加入 1ml 80%异丙醇，缓慢推动针柱。然后重复该过程一次。
- 5) 拔去针管，将纯化柱置于 1.5ml 离心管上，12000rpm 离心 20sec；
- 6) 将纯化柱转移至一个新的 1.5ml 离心管上，加入 50 μ l ddH₂O，静置 1min，12000rpm 离心 30sec，弃纯化柱，离心管内即为 PCR 纯化产物。

1.2.8 序列测定与分析

将纯化的 PCR 产物送交北京鼎国公司直接用于序列测定。对获得的序列结果在 GeneBank 数据库中，应用 BLAST 程序在核酸序列数据库或多肽序列数据库中搜寻同源序列。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的浓度、纯度与质量鉴定

用 1.2% 甲醛变性胶检测所提取的 RNA 质量（图 5-3），用 DU-600（BECHMAN）检测总 RNA 的浓度与纯度（表 5-2）。

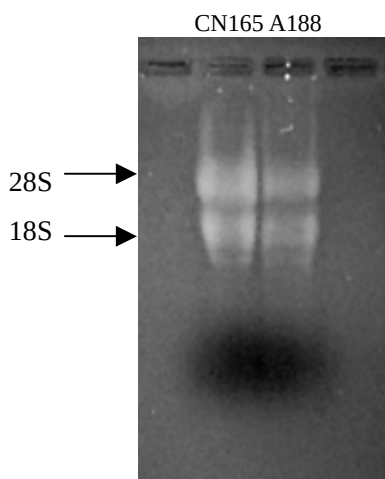


表 5-2 总 RNA 测定结果

Table 5-2 Detection of total RNA

Sample	260/280	Conc. (μ g/ml)
CN165	2.130	21.69
A188	2.146	24.58

图 5-3 总 RNA 甲醛变性琼脂糖胶检测结果

Fig.5-3 Total RNA identified by formaldehyde denatured agarose gel

2.2 双链 cDNA 的合成

琼脂糖凝胶电泳结果表明,所合成的双链 cDNA 大小集中于 0.5-1.6 Kb 之间(图 5-4)。

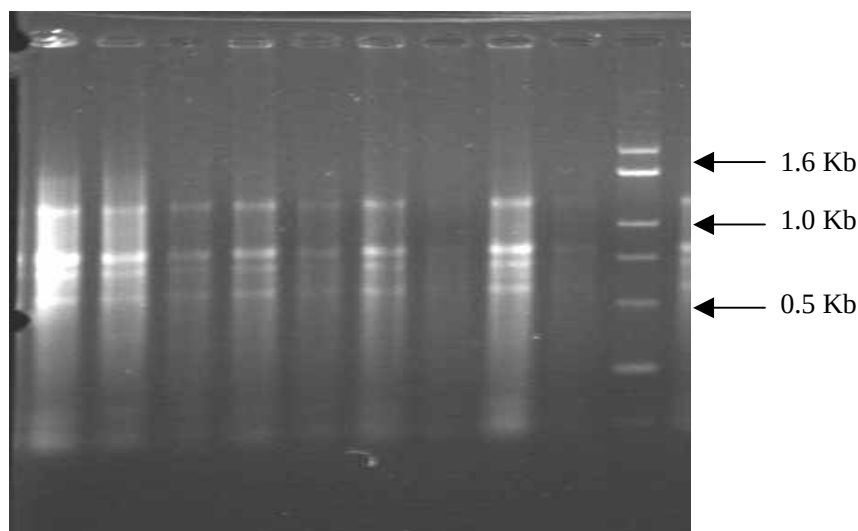


图 5-4 双链 cDNA 琼脂糖胶检测结果

Fig. 5-4 Identified results of ds cDNA by agarose gel

2.3 cDNA-AFLP 分析

首先对引物(表 5-1)进行筛选,共得到 60 对 MseI/PstI 引物组合,检测到近 500 条差异带。在回收 cDNA 带时主要以 PEG 胁迫和土壤干旱胁迫下特异表达、增量表达和抑制表达为主,同时也有少量类似特异表达的类型,共计 380 条(附录 2)。由于部分片段在模板回收过程丢失、二次 PCR 失败、假阳性以及 PCR 产物直接测序误差等原因,最终得到有效序列 42 个(表 5-2)。部分材料的 cDNA-AFLP 扩增的结果见图 5-5A、图 5-5B、图 5-5C 和图 5-5D。

2.3.1 二次 PCR

二次 PCR 扩增体系与 AFLP 选扩的程序相一致(图 5-6)为部分二次扩增琼脂糖检测结果。

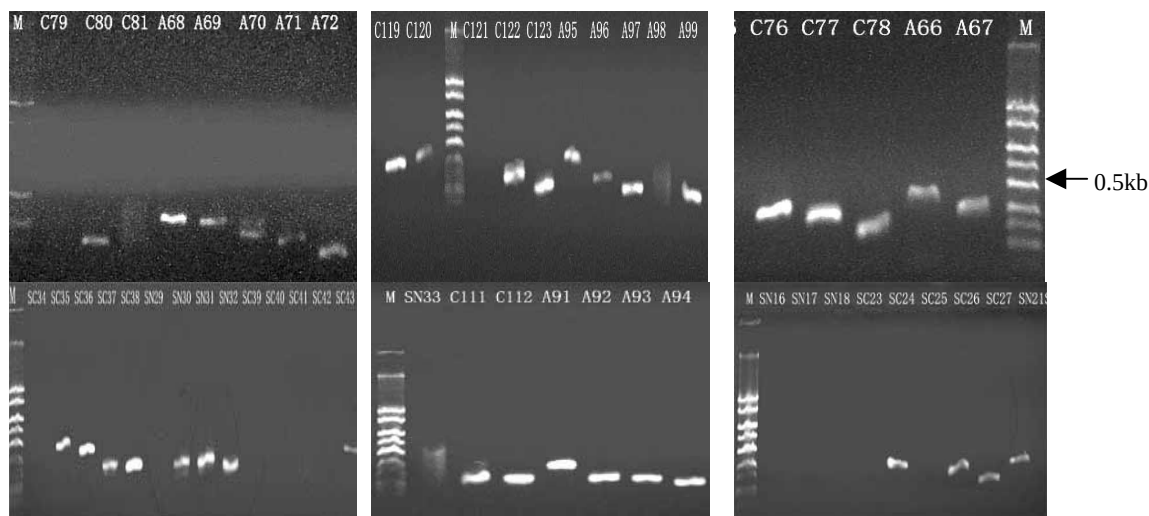


图 5-6 部分二次扩增琼脂糖检测结果 M=1 kb Plus ladder

Fig 5-6. The second PCR amplification identified by agarose gel

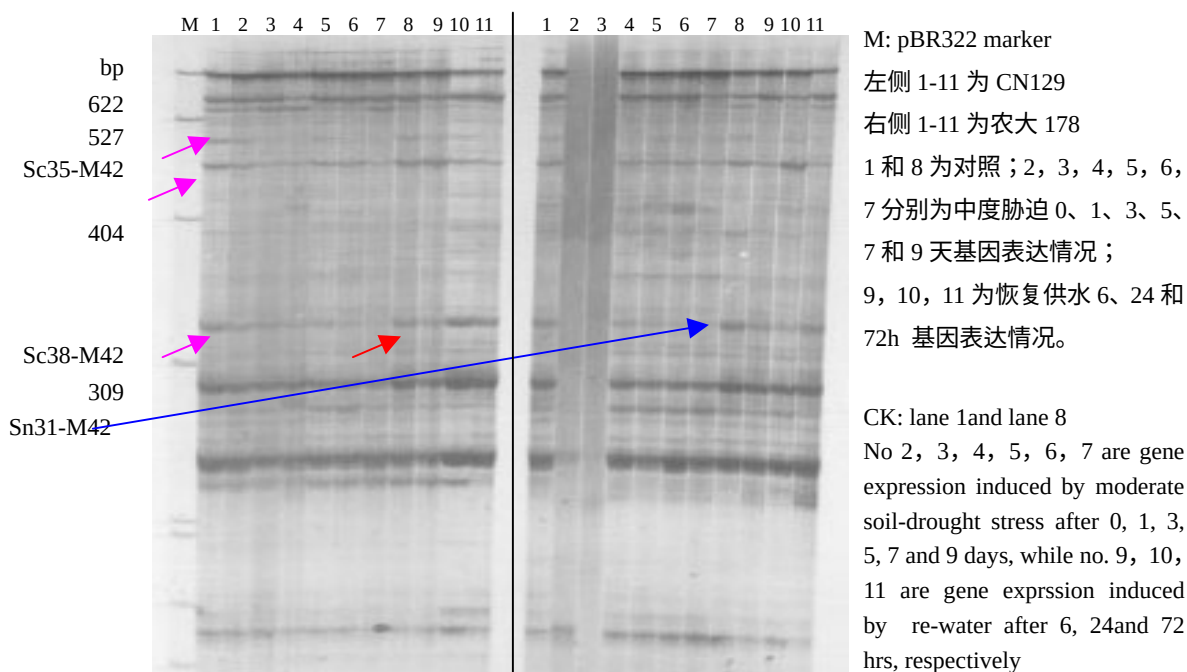


图 5-5A CN129 和农大 178 在土壤干旱条件下，cDNA-AFLP 扩增结果 (P25/M42)

Fig. 5-5A cDNA-AFLP amplification of CN129 and Nongda 178 using primer-paired P25/M42 treated by soil-drought

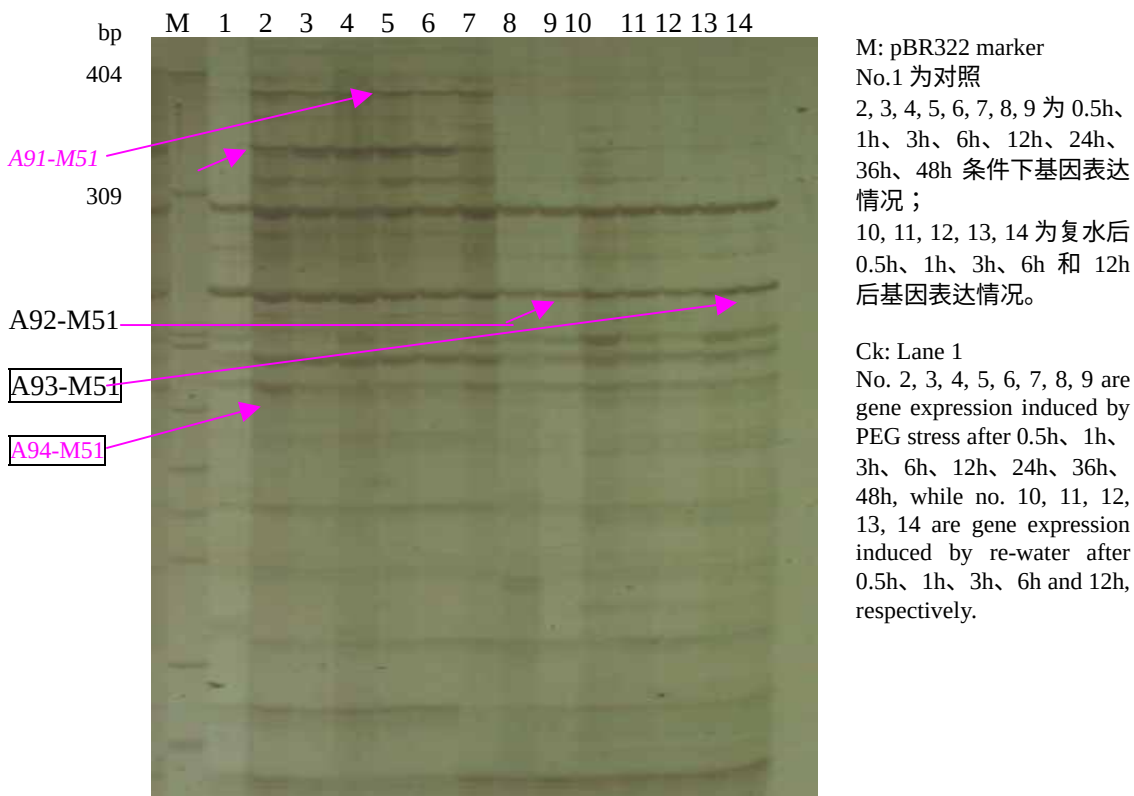


图 5-5B 玉米材料 A188 在 PEG 胁迫条件下，cDNA-AFLP 扩增结果 (P21/M51)

Fig. 5-5B cDNA-AFLP amplification of A188 using primer-paired P21/M51 treated by PEG stress

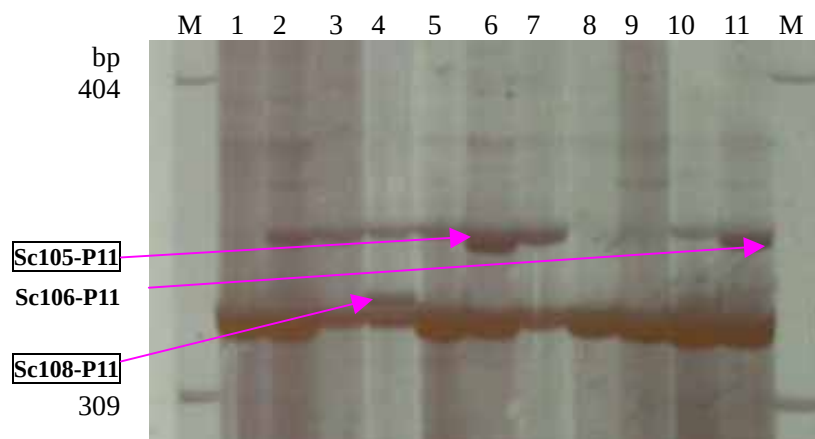


图 5-5C CN129 在土壤干旱条件下, cDNA-AFLP 扩增结果 (P11/M52)

Fig. 5-5C cDNA-AFLP amplification of CN129 using primer-paired P11/M52 treated by soil-drought.

1 和 8 为对照; 2, 3, 4, 5, 6, 7 分别为中度胁迫 0、1、3、5、7 和 9 天基因表达情况; 9, 10, 11 为恢复供水 6、24 和 72h 基因表达情况。

CK: lane 1 and lane 8

No 2, 3, 4, 5, 6, 7 are gene expression induced by moderate soil-drought stress after 0, 1, 3, 5, 7 and 9 days, while no. 9, 10, 11 are gene expression induced by re-water after 6, 24 and 72 hrs, respectively

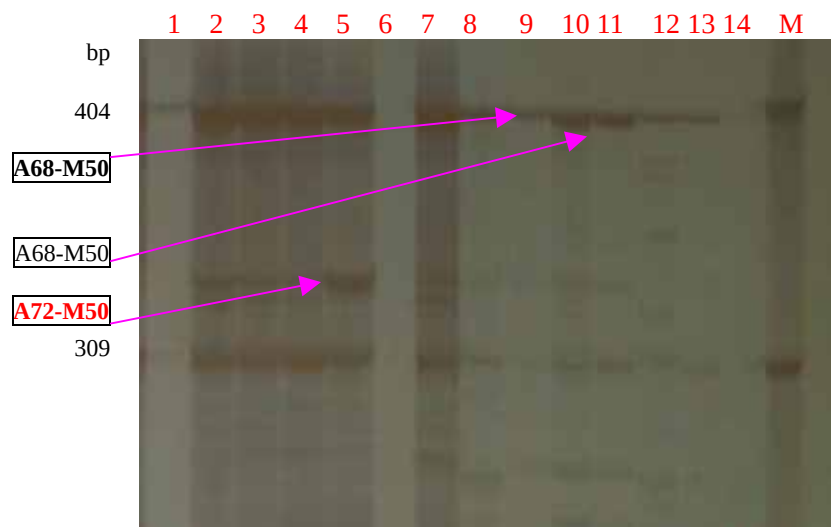


图 5-5D 玉米材料 A188 在 PEG 胁迫条件下, cDNA-AFLP 扩增结果 (P21/M50)

Fig. 5-5D cDNA-AFLP amplification of A188 using primer-paired P21/M50 treated by PEG stress

M: pBR322 marker

No.1 为对照; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 为 0.5h、1h、3h、6h、12h、24h、36h、48h 条件下基因表达情况; 10, 11, 12, 13, 14 和 15 为复水后 0.5h、1h、3h、6h 和 12h 后基因表达情况。

Ck: Lane 1 No. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 are gene expression induced by PEG stress after 0.5h、1h、3h、6h、12h、24h、36h、48h, while no. 10, 11, 12, 13, 14 are gene expression induced by re-water after 0.5h、1h、3h、6h and 12h, respectively

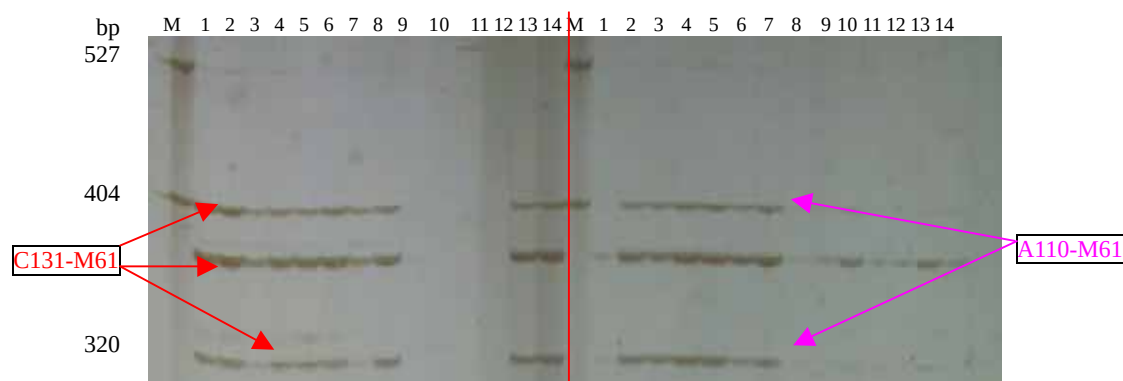


图 5-5E 玉米材料 CN165 和 A188 在 PEG 胁迫条件下, cDNA-AFLP 扩增结果 (P25/M61)

Fig. 5-5 E cDNA-AFLP amplification of CN165 and A188 using primer-paired P25/M61 treated by PEG stress
左侧为 CN165 材料 右侧为 A188 材料

M: pBR322 marker.No.1 为对照

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 为 0.5h、1h、3h、6h、12h、24h、36h、48h 条件下基因表达情况；

10, 11, 12, 13, 14 为复水后 0.5h、1h、3h、6h 和 12h 后基因表达情况。

Ck: Lane 1. No. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 are gene expression induced by PEG stress after 0.5h、1h、3h、6h、12h、24h、36h、48h, while no. 10, 11, 12, 13, 14 are gene expression induced by re-water after 0.5h、1h、3h、6h and 12h, respectively.

2.3.2 回收片段的序列分析

测序片段的同源性比较结果表明 (表 5-2): 只有 SC43-P25 片段在现有的核酸和多肽数据库中没有找到同源序列; 有 2 个 (Sc62-M31、Sc110-P11) 片段的同源序列为功能未知的蛋白; 有 15 个 cDNA (C120-M55、C147-M62、A118-M51、Sc38-M42、A111-P25、A113-P25、C75-M50、C136-M61、Sc116-P26、Sc105-P11、Sn31-M42、A130-P19、A94-M51、SC30-M51、C119-M55) 的同源序列均为功能未知的玉米克隆。

在有已知功能的同源序列中, C06-M42 是一个与水稻蛋白激酶 C 保守 domain (XM_465295) 同源的序列, 同源程度为 82% (216/263), 其同源区段如图 5-6A。

Sc106-P11 是与一个水稻昼夜摆动组成基因 OsCOC1 同源的序列, 该基因参与调控水稻开花, 属于 MYB 转录因子 (Xiong and Yang, 2003)。同源区段为 52 个氨基酸, 同源度为 59%。而且这个片段还和其它的一些蛋白序列同源 (图 5-6B)。

A91-M51 与水稻的 BRI1-KD interacting protein 108 具有 90% (236/262) 的同源性。进一步分析发现, 该片段含有 2 个重要的转录因子 WRKY 和 TGAI (图 5-6C)。

A96-M55 与一个玉米非趋光性下胚轴基因 (nph1) 具有 98% (218/222) 的同源性。该蛋白编码一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (EC 2.7.1), 具有趋光性信号传导作用 (图 5-6D) (Zacherl *et al.*, 1998)。大多数情况下, 蛋白激酶在干旱胁迫及渗透胁迫的信号传导途径具有重要作用。在 MAPK 蛋白激酶的信号传导途径中, 其三个主要成分均为丝氨酸和苏氨酸类蛋白激酶。Lee 等 (1999) 从拟南芥中分离到一个与酵母 Dbf2 激酶基因同源的基因 AtDBF2, 二者均为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 受干旱、盐、冷热等逆境胁迫的诱导, 并在转基因植物中过量表达。

表 5-2 cDNA 序列同源性比较结果

Table 5-2 BLAST results of TDFs

目的片段 TDFs	处理条件 Treatment	引 物 Primer	大 小 Size (bp)	同源序列 Homology sequence	GeneBank Accession no.	同源性 Identity
C06-M42	PEG 胁迫	P26/M42	290	Protein kinase C conserved region 2(CalB)	XM_465295 <i>Oryza sativa</i> .	216/263 (82%)
C120-M55	PEG 胁迫	P22/M55	338	Zea mays PCO102084	AY105723	311/314 (99%)
C77-P23	PEG 胁迫	P23/M50	307	Putative gag-pol polypeptide	AE017093 <i>Oryza sativa</i>	112/123 (91%)
C75-M50	PEG 胁迫	P23/M50	297	Zea mays CL3259_2	AY109334	131/148 (88%),
C136-M61	PEG 胁迫	P25/M61	250	Zea mays PCO108332	AY105057	217/217 (100%)
C147-M62	PEG 胁迫	P12/M62	305	Zea mays CL3404_-2	AY111346	236/253 (93%)
C119-M55	PEG 胁迫	P12/M38	347	Zea mays PCO068796	AY108004	317/338 (93%)
C80-M50	PEG 胁迫	P21/M50	276	Contains similarity to 40S ribosomal protein S17	NM_196466 <i>Oryza sativa</i>	186/212 (87%)
C149-P12	PEG 胁迫	P12/M62	276	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) cDNA clone:001-205-B12	AK105941	92/105 (87%)
C122-P22	PEG 胁迫	P22/M55	262	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PhhR-like protein and PhaC (phaC) genes	AY232443	205/227 (90%)
C131-M61	PEG 胁迫	P25/M61	366	Putative zinc finger protein	AF532781 <i>Zea mays</i>	315/332(94%)
A93-M51	PEG 胁迫	P21/M51	235	Putative mitochondrial carrier protein	AF503433, <i>Sorghum</i>	173/200 (86%)
A92-M51	PEG 胁迫	P21/M51	277	geranyl-geranyl reductase	XM_467759 <i>Oryza sativa</i> .	160/171 (93%)
A95-P22	PEG 胁迫	P22/M55	354	Type III effector HopPtoH	AE016858 Tomato	283/322 (87%)
A110-M61	PEG 胁迫	P25/M61	290	Putative zinc finger protein	AF532781, <i>Zea mays</i>	185/207 (89%)
A68-M50	PEG 胁迫	P21/M50	375	cytosolic glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2	ZMU45855 <i>Zea mays</i>	338/342 (98%)
A74-P25	PEG 胁迫	P25/M42	184	Putative RNA helicase (japonica cultivar-group)	AP003301 <i>Oryza sativa</i>	95/108 (87%)
A69-M50	PEG 胁迫	P21/M50	363	<i>Zea mays</i> CL2022_2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2 (gpc2)	AY109359_ ZMU45855 <i>Zea mays</i>	324/328 (98%) 323/328 (98%)
A96-M55	PEG 胁迫	P22/M55	240	<i>Zea mays</i> CL1834_1 <i>Zea mays</i> nonphototropic hypocotyl 1 (nph1), signal transduction for phototropism	AY109754 AF033263	218/222 (98%) 218/222 (98%)

(接下页, continued)

续 (continued)

目的片段 TDFs	处理条件 Treatment	引 物 Primer	大 小 Size (bp)	同源序列 Homology sequence	GeneBank Accession no.	同源性 Identity
A73-P25	PEG 胁迫	P25/M42	245	cytochrome c oxidase subunit III	NP_944665 <i>Oryza sativa</i>	18/41 (43%)
A72-P21	PEG 胁迫	P21/M50	201	Putative RAB7A protein (GTP-binding protein)	NM_191744 <i>Oryza sativa</i> .	36/38 (94%)
A111-P25	PEG 胁迫	P25/M61	310	Zea mays PCO125270	AY105875	142/158 (89%)
A113-P25	PEG 胁迫	P25/M61	258	PCO108332 mRNA sequence	AY105057 Zea mays	192/206 (93%)
A91-M51	PEG 胁迫	P21/M51	350	BRI1-KD interacting protein 108	AB117995 <i>Oryza sativa</i>	236/262 (90%)
A118-M51	PEG 胁迫	P22/M51	341	CL19330_1 mRNA sequence	AY111793 Zea mays	285/295 (96%)
A130-P19	PEG 胁迫	P19/M42	344	Zea mays PCO130312	AY105902	314/325 (96%)
A94-M51	PEG 胁迫	P21/M51	191	Zea mays CL27324_1	AY109875	147/159 (92%)
A63-P21	PEG 胁迫	P21/M34	256	OSJN00203	AL663003 <i>Oryza sativa</i>	52/59 (88%)
Sc106-P11	土壤干旱胁迫	P11/M52	326	circadian oscillator component (COC1) — MYB transcription factor	AY103618 Zea mays	292/305 (95%),
SC30-M51	土壤干旱胁迫	P13/M51	273	Zea mays PCO133236	AY104494	198/204 (97%)
SC43-P25	土壤干旱胁迫	P25/M43	360	No match		
Sc38-M42	土壤干旱胁迫	P25/M42	350	PCO102084 mRNA sequence	AY105723 Zea mays	291/291 (100%)
Sc108-P11	土壤干旱胁迫	P11/M52	338	Putative geranylgeranyl reductase	XM_467759, <i>Oryza sativa</i>	156/172 (90%),
Sc35-M42	土壤干旱胁迫	P25/M42	311	triose phosphate/ phosphate translocator	Z26595 Zea mays	257/275 (93%)
Sc110-P11	土壤干旱胁迫	P25/M52	259	Unknown protein	XM_468026, <i>Oryza sativa</i>	174/200 (87%)
Sc28-M51	土壤干旱胁迫	P13/M51	391	OSJNBa0032F06.20	AK121846 <i>Oryza sativa</i> .	185/229 (80%)
Sc62-M31	土壤干旱胁迫	P14/M31	237	Unknown protein	XM_468026, <i>Oryza sativa</i>	180/206 (87%)
Sc115-P26	土壤干旱胁迫	P26/M42	317	Light Grown 1 (LG1)	AW286524 Sorghum	245/275 (89%)
Sc116-P26	土壤干旱胁迫	P26/M42	273	Zea mays PCO115768	AY105023	62/65 (95%)
Sc105-P11	土壤干旱胁迫	P11/M52	318	Zea mays PCO118792	AY103618	266/271 (98%)
Sn31-M42	土壤干旱胁迫	P25/M42	299	Zea mays PCO116159	AY103868	165/185 (89%)
Sn23-M51	土壤干旱胁迫	P13/M51	314	Oryza sativa cDNA clone J023043B05	AK070134	266/290 (91%)

注：A：代表 A188 在 PEG 胁迫下的 ESTs；C：代表 CN165 在 PEG 胁迫下的 ESTs；

Sc：代表 CN129 在土壤干旱胁迫下的 ESTs；Sn：代表农大 178 在土壤干旱胁迫下的 ESTs。

Note: A, C indicate that A188 and CN165 TDF fragments induced by PEG stress, while Sc, Sn indicate that CN129 and Nongda 178 TDF fragments induced by soil-drought stress.

A69-M50 和 A68-M50 是一类与 3-磷酸脱氢酶高度同源的序列, 同源性的 323/328 (98%)。而且在该片段中含有多个 G-box. (图 5-6F)。

Query: 29 EDVKVISDQEMERLNGIQIRSKCEHSHEGYLDISTQQMKLMPKSVETTYVDEQTARASHT 208
+D K I+DQEMERLNGI I SK +HSHE LD S+QQ K SVETTYVD A+ASH
Sbjct: 212 KDAKDINDQEMERLNGIHISSKPDHSHENCLDTSSQQFKPKSNSVETTYVDWSAAKASHY 271
Query: 209 LAESNGTASVPVTVPEGTHPDQTSDDVG 292
+ NG T EG+HPDQTSDD+G
Sbjct: 272 OMDRNGVTGFOATGTGEGSHPDQTSDDMG 299

Query: 118 LAESNGTASVPVTVPEGTHPDQTSQVG 35
+ NG T EG+HPDQTSQ+G
Sbjct: 278 QMDRNGVTGFOATGTEGSHPDQTSQMG 305

C

同源序列 (Sbjct) :gi|42733477|dbj|AB117995 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) bip108 mRNA for BRI1-KD interacting protein 108, complete cds Length = 669 Identities = 236/262 (90%)

Query: 15 tgcaggggcgcatcaaggtcgccggcggaaggctggcaacctcggcgactccgtcacca 74
 ||||| |||||||||||||||| ||||||| ||||||||||||| |||||||
 Sbjct: 210 tgcaggagcgcatcaaggtcgccggaggcaaggccggcaacctcggcgagtcctccgtcaccg 269

Query: 75 tctctcgcgagaagaccaagggtcaccgtcacctc**tgacg**gaccttctccaagaggtacc 134
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 270 tctcccgcgacaagaccaagggtcaccgtcacctccgcgggcccttctccaagaggtacc 329

Query: 135 tgaagtac **ttgac** caagaagtacttgaagaagcacacgtgcgggattggctacgcgtgg 194
 |||||
 Sbjct: 330 tgaagtac **ttgac** caagaagtacctaagaagcacatgtgcgtgactggctacgggtga 389

Query: 195 ttgctgccaacaaggaccgaaacgtctatgagctccgctacttcaacattgctgagaacg 254
 |||| |||||||||||| |||| | ||||||| ||||||||| || |||||||
 Sbjct: 390 ttgcatccaacaaggaccgcaacgtgtacgagctccggtacttcaacatcgccgagaacg 449

```
Query: 255 agggggagggaagaagattagat 276
      |||| |||| || |||||
Sbjct: 450 agggcgaggaggaggattagat 471
```

D

同源序列 (Sbjct) : gi|2687357|gb|AF033263.1|AF033263 Zea mays nonphototropic hypocotyl 1 (nph1) mRNA, complete cds Length = 3330 Identities = 218/222 (98%)

Query: 14 tgcagggttttttcaaggacctgaaactgaccgtggggcagtaaagaagataagagatgcc 73

||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
 Sbjct: 1726 tgcaggtttcttcaaggacctgaaactgaccgtgggacagtaaagaagataagagatgcc 1785

Query: 74 atagataaccaacagaagttactgttcagctgataaattatacaaagagcggtaagaaa 133
 ||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
 Sbjct: 1786 atagataaccaacagaagttactgttcagctgataaattatacaaagagcggtaagaaa 1845

Query: 134 ttctggaacctctttcacttgagcctatgcgtgatcagaagggtgatgttcaatacttc 193
 ||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
 Sbjct: 1846 ttctggaacctctttcacttgagcctatgcgtgatcagaagggtgatgttcaatacttc 1905

Query: 194 attggggttcaattggatggaactgagagtgttcgagaggct 235
 ||||||| ||||||||||||||||| |||||||||||||
 Sbjct: 1906 attggggttcaattggatggaactgagcgtgttcgagaggct 1947

E

cDNA 片段 (Query) : **C131-M61**

同源序列 1 (Sbjct) : gi|34911328|ref|NP_917011.1|putative zinc finger protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
 gi|18844905|dbj|BAB85374.1|putative zinc finger protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
 Length = 1063 Identities = 75/76 (98%),

Query: 15 TNCPICCDFLTSSAAVRALPCGHFMHSACFQAYTWSHYTCPI CCKSLGDMAVYFGMLDA 194
 TNCPICCDFLTSSAAVRALPCGHFMHSACFQAYT SHYTCPI CCKSLGDMAVYFGMLDA
 Sbjct: 944 TNCPICCDFLTSSAAVRALPCGHFMHSACFQAYTCSHYTCPI CCKSLGDMAVYFGMLDA 1003

Query: 195 LLAAEELPEEYRDRCQ 242
 LLAAEELPEEYRDRCQ
 Sbjct: 1004 LLAAEELPEEYRDRCQ 1019

Identities = 37/39 (94%), Positives = 38/39 (97%)

Query: 241 KDILCND CERKGR FHWLYHKCGSCGSYNTRVIKTDTA 357
 +DILCND CERKGR RFHWLYHKCGSCGSYNTRVIKTDTA
 Sbjct: 1019 QDILCND CERKGRSRFWLYHKCGSCGSYNTRVIKTDTA 1057

同源序列 2 (Sbjct) : gi|22347790|gb|AAM95976.1|putative zinc finger protein [Zea mays]

Length = 400 Identities = 74/76 (97%)

Query: 15 TNCPICCDFLTSSAAVRALPCGHFMHSACFQAYTWSHYTCPI CCKSLGDMAVYFGMLDA 194
 TNCPICCDFLTSSAAVRALPCGH MHSACFQAYT SHYTCPI CCKSLGDMAVYFGMLDA
 Sbjct: 281 TNCPICCDFLTSSAAVRALPCGHSMHSACFQAYTCSHYTCPI CCKSLGDMAVYFGMLDA 340

Query: 195 LLAAEELPEEYRDRCQ 242
 LLAAEELPEEYRDRCQ
 Sbjct: 341 LLAAEELPEEYRDRCQ 356

Identities = 37/39 (94%)

Query: 241 KDILCND CERKGRCFHWLYHKCGSCGSYNTRVIKTDTA 357
 +DILCND CERKGRCFHWLYHKCGSCGSYNTRVIKT TA
 Sbjct: 356 QDILCND CERKGRCFHWLYHKCGSCGSYNTRVIKTATA 394

F

cDNA 片段 (Query) : **A69-P21**

同源序列 1 (Sbjct) : gi|1184771|gb|U45855.1|ZMU45855 Zea mays glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2 (gpc2) mRNA, complete cds Length = 1307 Identities = 323/328 (98%),

Query: 23 tcaccacggattacatgacctacatgttcaagtacgacaccgtgcacgccaatggaag 82
 |||||
 Sbjct: 179 tcaccacggattacatgacgtacatgttcaagtacgacacc-gtgcacgccaatggaag 237

Query: 83 cacaagacatgcctcaaggactccaagacgttctcttcggagaaacggtcacc 142
 |||||
 Sbjct: 238 cacaagacatgcctcaaggactccaagacgttctcttcggagaaacggtcacc 297

Query: 143 gtctttggcatcaggaaccccgaggagatcccggtgggtgaggtggtgctgagtatgtc 202
 |||||
 Sbjct: 298 gtctttggcatcaggaaccccgaggagatcccggtgggtgaggtggtgctgagtatgtc 357

Query: 203 gtggagtccacaggtgtcttcactgacaaggacaaggtgctgacatctgaagggtggt 262
 |||||
 Sbjct: 358 gtggagtccaccggtgtcttcactgacaaggacaaggtgctgacatctgaagggtggt 417

Query: 263 gccagaaggttggtatctctgcccgaagcgaagatgcccacatgtttgttgggtgtc 322
 |||||
 Sbjct: 418 gccagaaggttggtatctctgcccgaagcgaagatgcccacatgtttgttgggtgtc 477

Query: 323 aacgaggacaagtacacctccgatgtta 350
 ||
 Sbjct: 478 aatgaggacaagtacacctccgatgtta 505

图 5-6 部分克隆片段的同源性比较

Fig 5-6 Homology search results of some cloned maize laccase sequences.

植物在水分胁迫条件下,有许多被诱导的基因在不同的阶段表达。那么使用何种方法分离与鉴定这些基因,是一个值得探讨的问题。转座子标签与图位克隆技术,每次只能得到一个目的基因,而且实验周期长,程序繁琐(Parniske, 2000)。而 cDNA-AFLP 技术结合了 RT-PCR 和 AFLP (Vos *et al.*, 1995) 技术的优点,可用于转录水平上基因不同表达系统比较,可以进行大规模 cDNA 的筛选,分离大量特异表达的基因(Durrant *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2000; Van der Biezen *et al.*, 2000; Breyne *et al.*, 2002, 2003; Reijans *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003)。

本研究利用该技术分析了 4 个玉米材料在两种不同的干旱胁迫条件下,基因差异表达规律,回收了近 500 条差异带,最终获得了 42 个差异片段。由于我们采取了 PCR 产物直接测序,这可能是导致最后有效测序序列偏低的一个主要原因。但是,对于不同材料、不同胁迫处理以及复水条件下,势必涉及到大量的基因表达,这就要求分析大量的有表达差异的候选基因。目前,鉴于我们实验室的条件,对如此大量的回收片段进行克隆,提取质粒去测序,需要大力的人力与财力。因而,我们采用 cDNA-AFLP 技术首先大量的回收差异 TDFs,二次 PCR 后直接测序,对于缩小范围可以起到一定的效果。然后可以用高密度地 cDNA 点杂交方法加以验证。从研究结果来看,这种技术路线还是行之有效的。

在两种不同胁迫处理条件下,我们得到以下结果:

在 PEG 室内模拟水分胁迫和盆栽培养土壤干旱以及两种胁迫处理后恢复供水条件下研究基因表达的规律。从表现型上来看,在选用的-0.5Mpa 渗透压条件下,幼苗很快不行萎蔫,胁迫 48h 后,重新恢复供水,也很难恢复生长。而在土壤干旱条件下,相关的基因的变化比较缓慢,在恢复供水 24h 后,幼苗又恢复正常生长。

从基因表达规律可以看出,PEG 胁迫条件下,相关基因迅速被诱导或抑制;而土壤干旱条件下,短时间内基因响应不明显。从由 cDNA-AFLP 分析所获得的 TDFs 发现,当胁迫开始后,抑制诱导基因片段相对较多,而由胁迫诱导增量表达的基因相对少些。

本研究所获得 42 个 cDNA 片段中,一个没有找到同源序列;有 2 个 (Sc110-P11、Sc62-M31) 为功能未知的蛋白。15 个与功能未知的玉米克隆同源;4 个与功能未知的水稻克隆同源;2 个与功能已知的高粱基因同源 (Sc115-P26 与光调控有关;A93-M51 为保守的线粒体转运蛋白);1 个与西红柿的 Type III 效应因子 HopPtoH 有关;1 个与荧光假单胞杆菌的 PhhR-like 蛋白具有 90% (205/227) 的同源度。

在 9 个与功能已知的水稻基因同源的序列中:有 2 个 (A92-M51 来自 PEG 胁迫;Sc108-P11 来自土壤干旱胁迫) 与牻牛儿苗牻牛儿苗基还原酶同源;C06-M42 与一个保守的蛋白激酶 (Ca1B) 同源。植物在受到干旱、高盐等胁迫后,会作出一系列的生理生化调节反应,最后诱导特定基因的表达。众多的研究表明,蛋白激酶在信号传递中起到了重要作用(刘强等, 2000a)。

Sc106-P11 是与一个水稻昼夜摆动组成基因 OsCOC1 同源的序列,该基因参与调控水稻开花,属于 MYB 转录因子(Xiong and Yang, 2003)。MYB 蛋白是一类在植物转录因子中有特殊作用的 DNA 结合蛋白。它可通过一个保守的 52 个氨基酸的 DNA 结合域 (MYB) 来与 DNA 结合。植物 MYB 蛋白的功能包括次生代谢的调节细胞多肽,控制分生组织形成和细胞周期的调控,在信号传递和基因调控中起关键作用(刘强等, 2000b; Jin and Cathie, 1999; Meissner *et al.*, 1999; Petroni *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2004)。而且,有关 MYB 在玉米中的作用也大量的报道(Goff *et al.*, 1992; Grotewold *et al.*, 1994; 2000; Rabinowicz *et al.*, 1999)。

A91-M51 与水稻的 BRI1-KD 作用蛋白 108 具有 90% 的同源性 (Hirabayashi *et al.*, 2004)。进一步分析发现, 该片段含有 2 个重要的转录因子 WRKY 和 TGA1。转录因子 WRKY 在防御、愈伤、衰老和植物生长发育中有重要作用 (Eulgem *et al.*, 2000; Maleck *et al.*, 2000; Robatzek and Somssich, 2001; Chen *et al.*, 2002)。而 TGA1 则是亮氨酸拉链中组成 G-box-like 元件 TGACGTGG 的重要因子 (Schindler *et al.* 1992)。bZIP 类转录因子是普遍存在于植物和微生物中, 参与寡聚化作用的亮氨酸拉链区与碱性区紧密相连。

在 7 个与功能已知的玉米基因同源的序列中: A96-M55 与一个玉米非趋光性下胚轴基因 (nph1) 具有 98% 的同源性。该蛋白编码一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (EC 2.7.1) (Zacherl *et al.*, 1998)。根据被蛋白激酶磷酸化的蛋白质氨基酸不同, 将其分为丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸两种。近年来, 在多种植物中相继分离到一系列的蛋白激酶基因, 它们在各种信号响应及传递中起作用。如受干旱、高盐及低温诱导的受体蛋白激酶 PRK1, 即是属于丝氨酸/苏氨酸类型的蛋白激酶 (刘强 等, 2000)。Lee 等 (1999) 从拟南芥中分离到一个与酵母 Dbf2 激酶基因同源的基因 AtDBF2, 二者均为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 受干旱、盐、冷热等逆境胁迫的诱导, 并在转基因植物中过量表达。

A92-M51 和 C131-M61 是一类与水稻和玉米保守的锌指蛋白同源的序列。含有锌指结构域的转录因子大多具有 His/Cys 的保守区域, 可以结合 DNA 中 G-rich 三联体结构。Sugano 等 (2003) 对一个胁迫应答的锌指基因 ZPT2-3 在矮牵牛抗旱中所起的作用进行了全面的研究。该基因编码一个 Cys₂/His₂ 类型的锌指蛋白, 在拟南芥和矮牵牛中, 其对愈伤、干旱以及低温胁迫反应, 具有非常相似的表达机制。

A69-M50 和 A68-M50 是一类与 3-磷酸脱氢酶 (GAPC2) 高度同源的序列。GAPC2 是 Manjunath 等 (1996) 在从缺氧胁迫的玉米幼苗中克隆的一个基因。该基因含有与已经克隆的玉米 *adh1* 和拟南芥 *adh* 基因高度同源的厌氧应答元件、G-box 以及 GC motifs。Sc35-M42 与丙糖磷酸转运蛋白同源性为 93% (257/275)。而 A69-M50 和 A68-M50 是在渗透压为 -0.5Mpa 的 PEG 模拟胁迫条件下, 获得的 TDFs。在此环境下必然导致玉米幼苗的根部缺氧, 这两个 ESTs 与 Manjunath 等 (1996) 克隆的 GAPC2 高度同源的结果, 就是个很好的例证。

3 小结

本研究结合 cDNA-AFLP 技术、PCR 产物直接测序技术和生物信息学技术等, 对水分胁迫条件下不同抗旱玉米种质在不同时期、不同处理方式下的基因表达变化情况进行了深入研究, 最终获得了 42 个有效的 TDFs, 其中包含有几个十分重要的与抗旱性相关的基因片段, 为在基因水平上解析玉米抗旱性的分子机制及抗旱分子育种提供了理论依据, 并奠定了物质基础。此外, 获得的 TDFs 片段可用于遗传作图的探针。

下一步, 我们将对几个重要的基因片段, 在进行 Northern 分析的基础上, 获得基因全长。

第六章 结 论

1 对 64 个高等植物漆酶基因的结构与功能进行了系统分析,并阐述其分子进化机制

对 64 个来自不同物种的植物漆酶的氨基酸序列的分子特征进行了比较分析,同时对其功能、组织分布、特异性表达、在染色体上的位置等方面做了详尽的阐述。发现了漆酶作为蓝铜氧化酶蛋白家族的成员,具有一个或数个不等的保守区域及 N-末端结合位点,为通过同源序列基因克隆提供了依据。

通过对供试材料的一系列特征进行分析发现:同一物种的不同漆酶成员在序列上差异很大;在单子叶和双子叶植物中均有细胞外和细胞内漆酶蛋白;糖基化位点数目和等电点值的变化范围都很大(8-23 和 5-10);漆酶的催化底物广泛;在不同组织中差异表达。因此我们推断,植物漆酶除了参与木质素的生物合成外,还可能具有其它功能。

系统发生关系表明,植物漆酶是一个高度趋异的多铜氧化酶蛋白家族。在种子植物分化为被子植物和裸子植物的前后,漆酶均可能发生了基因复制。

2 克隆了三个黑麦草漆酶基因片段

以一个黑麦草作图群体的两个亲本 F#30 和 F#39 的基因组 DNA 为模板,利用 5 对黑麦草特异引物,进行漆酶基因克隆。最终得到 3 个黑麦草漆酶基因片段 *Lac10-1*、*Lac10-1*、*Lac11-2*。通过对推导后的氨基酸序列进行比较分析发现,它们与已经克隆的植物漆酶基因具有较高的同源性,并且含有保守的铜离子结合位点。

3 获得了 168 个玉米漆酶基因片段,并将一个玉米漆酶基因定位到第 4 号染色体上

利用 GeneBank 数据库中已有的 7 个黑麦草漆酶的序列,在玉米数据库分别进行同源搜索,再利用 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> 网上工具对得到的所有序列进行多序列比对分析,选取有代表性的序列,设计了 24 对特异引物。梯度 PCR 验证得到 21 对玉米漆酶特异引物。以 8 份 AS 系列玉米自交系的基因组 DNA 为模板,用 21 对特异引物进行玉米漆酶基因克隆。通过利用 M13 正、反向测序,共得到有效序列 81 个,占总克隆基因的 24%。对其中一组 cDNA 克隆的氨基酸序列进行分析,找到一个属于多铜氧化酶基因家族的 COG2132, SufI 保守域。同时,分子进化分析表明,所克隆的漆酶基因片段均含有保守的 motif。

将玉米漆酶基因 ZmP7 定位到 H21×Mo17 作图群体的第 4 号染色体短臂的 nc004 (Bin 4.03) 和 phi026 (Bin 4.05) 标记之间。

4 发掘了一批与抗旱相关的 TDFs

筛选到 60 对可用于 cDNA-AFLP 分析的 MseI/PstI 引物组合,检测到近 500 条差异带,回收 cDNA 带 380 条。将测序结果在 GenBank 进行同源搜索,得到有效 cDNA 序列 42 个。1 个 cDNA 序列没有相匹配的序列;2 个片段的同源序列为功能未知的蛋白;15 个 cDNA 的同源序列均为功

能未知的玉米克隆；4 个 cDNA 的同源序列为功能未知的水稻克隆。在所剩余的 20 个功能已知的 cDNA 片段中，含有几个在干旱胁迫途径中其重要作用的转录因子如 C06-M42（与蛋白激酶 C 的保守序列同源）、A72-P21（与 GTP 结合蛋白同源）、A96-M55（与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶）、A110-M61 和 C131-M61（保守的锌指蛋白）、Sc106-P11(circadian oscillator component, MYB 转录因子)。而 A92-M51、Sc108- P11 则与一个牻牛儿酰牻牛儿基还原酶同源；A68-M50、A69-M50 则与 3-磷酸脱氢酶（GAPC2）具有 98%（323/328）同源度；Sc35-M42 与丙糖磷酸转运蛋白同源，同源性为 93%（257/275）。

5 MYB 转录因子不仅与漆酶有关，也与水分胁迫下基因的应答反应有关

在我们所克隆的一个玉米漆酶基因片段 *ZmP7-AS30* 的启动子区域有一个 MYBST1 转录因子的结合位点。同时，在土壤干旱胁迫条件下得到的 *Sc106-P11* 是与一个水稻昼夜摆动组成基因 *OsCOC1* 同源的序列，该基因参与调控水稻开花，也属于 MYB 转录因子。因此，我们推测漆酶基因也可能与水分胁迫有关。

附录

附录-1

主要试剂及培养基配方

1. LB Medium (*E. Coli*): 1 liter

To 950 ml of deionized H₂O, add:

Bacto-tryptone	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Agar (for plate)	15g

摇匀，溶解。用 5M NaOH (~200 μ l)，将pH 值调至 7.0，add H₂O to 1 liter 高压灭菌。

2. 50 X TAE for 1 liter

Tris-HCl	242 g
Glacial acetic acid	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml

3. Ethidium bromide (10 mg/ml) for 100 ml

Ethidium bromide	1 g
ddH ₂ O	100 ml

4. SOB Medium for 1 litre

Bacto Tryptone	20 g
Yeast extract	5 g
NaCl	0.6 g
KCl	0.19 g

5. SOC Medium

To 1 ml of SOB add 7 μ l sterile glucose 50% (w/v)

6. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) [2% w/v in DMF]

Make a stock solution by dissolving 0.2 g of X-gal in dimethyl formamide (DMF).

7. DNA 提取缓冲液

CTAB (Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromide)	2%
Tris.Cl	1 M
NaCl	5 M
EDTA	0.5 M
PVPP/1L	10 g

8. 100×TE for 1 litre

Tris	121.1g
------	--------

EDTANa ₂ ·2H ₂ O	37.2g
--	-------

用 HCl 调 pH 至 8.0, 定容至 1000 ml, 灭菌。

9. 3 M NaAc (pH5.2) for 1 liter

NaAc·3H ₂ O	408.24g
------------------------	---------

用冰醋酸调 pH 至 5.2, 定容至 1000 ml, 灭菌。

10. RNase

用超纯水溶解 RNase, 终浓度 10mg/ml, 煮沸 20min, 缓慢冷却, 分装, -20℃下保存备用。

11. 6% PA 胶的配制 for 1 liter

Acrylamide (聚丙烯酰胺)	57g
--------------------	-----

Bis-Acry (甲叉-丙烯酰胺)	3g
--------------------	----

10×TBE	50ml
--------	------

Urea (尿素)	420.8g
-----------	--------

定容至 1L, 热水下溶解, 过滤。

12. 10×TBE for 1 liter

Tris	108g
------	------

Boric acid	55g
------------	-----

EDTANa ₂ ·2H ₂ O	7.44g
--	-------

Urea (尿素)	420.8g
-----------	--------

13. Loading buffer

98% Formamide	49ml
---------------	------

10mM EDTA (pH8.0)	1ml (0.5M, pH8.0)
-------------------	-------------------

0.25% Brph Blue	0.125g
-----------------	--------

0.25% X·Cynol	0.125g
---------------	--------

14. 10%过硫酸铵

过硫酸铵	1g
------	----

ddH ₂ O	9ml
--------------------	-----

15 10× FA Gel Buffer

MOPS (free acid)	200 mM
------------------	--------

NaAc	50 mM
------	-------

EDTA	10 mM
------	-------

用 NaOH 调节 pH 至 7.0

16 5×RNA Loading Buffer

饱和溴酚蓝	16 μ l
500mM EDTA, pH 8.0	80 μ l
37% 甲醛	720 μ l
100% 甘油	2 ml
甲酰胺	3.084 ml
10×FA gel buffer	4 ml
加入 DEPC 水至终体积为 10 ml	

附录 2

cDNA-AFLP 分析回收的目的片段

TDFs used in cDNA-AFLP analysis

引 物 Primer	编 号 No.	TDFs 大小(bp) Size (bp)	片段位置 Fragment location	引 物 Primer	编 号 No.	TDFs 大小(bp) Size (bp)	片段位置 Fragment location
P25/M42	SC34	550	CN3	P25/M43	SC39	680	CN5
	SC35	480	CN1		SC40	680	CN10
	SC36	470	CN10		SC41	640	CN11
	SC37	330	CN5		SC42	480	CN9
	SC38	330	CN10		SC43	460	CN11
	SN29	550	ND8		SC44	360	CN11
	SN30	380-	ND5		SN33	500	ND6
	SN31	330	ND11	P23/M61	SC49	490	CN4
	SN32	260	ND11		SC50	320	CN10
P21/M51	C111	230	C12		SN37	380	ND4
	C112	230	C2	P19/M52	SN38	340	ND6
	A91	390	A6		C108	500	C10
	A92	280	A9		C109	450	C14
	A93	280	A13		C110	330	C2
P19/M41	A94	225	A1		A89	320	A5
	C113	280	C11	P18/M31	A90	310	A7
	C114	260	C5		SC17	480	CN9
	C115	225	C14		SC18	340	CN11
P12/M38	C116	225	C6		SC19	390	CN10
	C117	330	C6		SN13	500	ND1
P22/M55	C118	280	C4		SN14	400	ND6
	C119	390	C6		SN15	380	ND8
	C120	380	C11		SN16	340	ND8
	C121	290	C12		SN17	260	ND3
	C122	280	C10		SN18	205	ND6
	C123	220	C9	P25/M62	SC23	500	CN3
	A95	380	A12		SC24	410	CN10
	A96	280	A2		SC25	330	CN11
	A97	240	A4		SC26	310	CN7
	A98	230	A1		SC27	290	CN10
	A99	165	A12		SN21	390	ND5
	SC45	550	CN7		SN22	340	ND2
P24/M61	SC46	380	CN10	P13/M51	SC28	430	CN10
	SC47	290	CN7		SC29	380	CN10
	SC48	270	CN11		SC30	320	CN11
	SN34	380	ND9		SN23	360	ND5
	SN35	290	ND4		SN24	200	ND3
	SN36	230	ND4				
P11/M42	SC31	320	CN1	P25/M51	C88	420	C12
	SC32	238	CN3		C89	380	C1

	SC33	230	CN4		C90	340	C10
	SN25	520	ND8		C91	290	C10
	SN26	320-	ND1		C92	188	C9
	SN27	320	ND9		A77	420	A2
	SN28	290	ND10		A78	350	A3
P23/M50	C75	440	C10	P11/M34	C93	550	C10
	C76	350	C10		C94	360	C9
	C77	300	C12		C95	330	C12
	C78	225	C4		C96	320	C4
	A66	380	A3		C97	400	C1
	A67	300	A2		A79	500	A3
P21/M50	C79	680	C10	P19/M51	A80	480	A11
	C80	309	C10		C106	250	C2
	C81	280	C12		C107	210	C5
	A68	400	A9		A86	250	A2
	A69	400	A10		A87	140	A10
	A70	350	A5		A88	125	A1
	A71	309	A2	P14/M34	C67	280	C10
P25/M42	A72	250	A3		C68	260	C12
	C82	560	C10		C69	190	C10
	C83	460	C5		A51	375	A8
	C84	380	C11		A52	370	A10
P21/M86	A73	340	A3		A53	280	A10
	A74	290	A2		A54	260	A10
	C85	650	C10		A55	240	A8
	C86	460	C10	P26/M61	A56	380	A9
	C87	380	C12		C53	420	C10
P22/41	A75	640	A2		C54	340	C10
	A76	380	A12		C55	320	C10
	C70	220	C6		C56	170	C11
	C71	220	C11	P25/M41	A40	340	A2
	A57	560	C10		SN11	350	ND3
	A58	360	C10		SN12	280	ND2
P23/M50	A59	320	C10		SC15	380	CN4
	A60	180	C11		SC16	280	CN6
	C65	490	C11	P11/M40	SC51	530	CN9
	C66	410	C10		SC52	410	CN3
	A47	380	A2		SN39	450	ND4
P17/M41	A48	300	A4		SN40	380	ND5
	A49	490	A12	P25/M62	C129	620	C10
	C124	480	C10		C130	500	C12
	C125	380	C7		A106	550	A14
	C126	380	C11	P25/M62	A107	380	A12
P22/M43	A100	400	A7		A108	360	A14
	A101	290-	A9		A109	290	A14
P22/M43	C127	400	ND9	P21/M34	A63	290	A10
	C128	400	ND10		C57	340	C6

	A102	570	C10		C58	235	C4
	A103	510	C10		C59	230	C12
	A104	500	C12		C60	210	C9
	A105	400	C4		C61	450	C10
P18/M51	SC53	350	CN1		C62	390	C6
	SC54	350	CN10		C63	380	C10
	SC55	280	CN6		C64	340	C11
	SC56	280	CN9		A41	270	A10
P14/M31	SC57	600	CN1		A42	480	A2
	SC58	560	CN8		A43	450	A1
	SC59	410	CN5		A44	450	A4
	SC60	410	CN10		A45	380	A1
	SC61	290	CN3		A46	320	C10
	SC62	250	CN10		A50	400	C12
	SC63	200	CN3		A61	280	C10
	SN41	600	ND1		A62	240	A8
	SN42	410	ND2	P22/M55	C72	350	C5
	SN43	320	ND4		C73	280	C4
	SN44	320	ND11		C74	250	C1
	SN45	195	ND2		A65	285	A6
P18/M50	SC64	390	CN1	P21/M39	SC75	320	CN5
	SC65	390	CN9		SC76	320	CN10
	SC66	380	CN10		SN53	320	ND4
	SC67	280	CN11		SN59	290	ND5
	SN46	480	ND6		SN60	280	ND9
	SN47	380	ND9		SN61	260	ND80
	SN48	360	ND6		SN62	210	ND10
	SN49	280	ND7				
P17/M62	SC68	630	CN10	P18/M43	SC77	360	CN10
	SC69	460	CN5		SC78	290	CN11
	SC70	460	CN10		SC79	260	CN9
	SC71	410	CN6	P11/M50	SC80	320	CN9
	SC72	430	CN9		SN54	320	ND10
	SC73	410	CN10		SN55	280	ND5
	SC74	340	CN5		SN56	225	ND10
	SN50	460	ND4	P11/M31	SC81	315	CN6
	SN51	460	ND9		SC82	290	CN9
	SN52	300	ND5		SN57	315	ND7
					SN58	90	ND7
P11/M61	SC83	390	CN10	P13/M51	SC97	550	CN7
	SC84	238	CN10		SC98	550	CN11
	SC85	205	CN3		SC99	420	CN10
	SC86	205	CN11		SN65	550	ND4
	SC87	185	CN8		SN66	550	ND9
P21/M51	SC88	464	CN5		SN67	360	ND11
	SC89	460	CN8				
	SC90	410	CN1	P11/M62	SC100	520	CN10

	SC91	350	CN4		SC101	330	CN7
	SC92	340	CN1		SC102	310	CN10
	SC93	310	CN7		SN68	290	ND5
	SC94	310	CN11		SN69	280	ND11
	SC95	240	CN8		SN70	225	ND11
	SC96	210	CN10		SC105	360	CN6
	SN64	460	ND4		SC106	360	CN11
	SN63	330	ND6		SC107	510	CN5
P11/M51	SC103	360	CN9	P11/M52	SC108	330	CN4
	SC104	280	CN9		SC109	280	CN6
	SN71	630	ND8		SC110	280	CN10
	SN72	260	ND10		SN74	500	ND4
	SN73	250	ND8		SC114	350	CN6
P15/M31	SC111	320	CN6	P26/M42	SC115	340	CN11
	SC112	320	CN10		SC116	285	CN10
	SC113	300	CN9		SN77	460	ND10
	SN75	395	ND7		SN78	385	ND3
	SN76	430	ND11		SN79	270	ND8
P25/M86	C137	430	C7	P22/M51	C143	390	C9
	C138	380	C8		C144	315	C8
	C139	370	C3		C145	208	C6
	C140	480	C12		C146	185	C7
	C141	380	C10		A118	380	A7
	C142	240	C6		A119	208	A5
	A114	390	A3		A120	185	A2
	A115	310	A5		A121	170	A12
	A116	280	A9		C150	520	C5
	A117	260	A7		C151	380	C9
P12/M62	C147	320	C8	P12/M61	A123	520	A2
	C148	315	C10		A124	350	A7
	C149	290	C12		C153	390	C9
	A122	415	A6		C154	390	C14
P21/M86	C152	400	C10	P19/M42	A129	490	A8
	A125	430	A10		A130	390	A11
	A126	330	A9		C155	125	C3
	A127	260	A10		A131	185	A3
	A128	195	A12		A132	185	A13
P15/M62	C156	550	C10	P23/M55	C163	400	C11
	C157	500	C12		C164	380	C12
	A133	550	A4		C165	265	C2
	A134	500	A5		A139	480	A10
	A135	380	A4		A140	400	A4
	A136	250	A9		A141	390	A11
P15/M61	C158	620	C10	P17/M34	A1472	235	A2
	C159	380	C2		C166	225	C9
	C160	360	C8		C167	220	C11
	C161	295	C4		C168	195	C10
				P16/M38			

	C162	295	C12		A143	380	A10
	A137	495	A4		A144	310	A5
	A138	410	A11		A145	290	A9
P16/M34	C169	500	C7	P25/M61	C131	400	C8
	C170	340	C4		C132	320	C6
	A146	460	A4		C133	260	C8
	A147	360	A9		C134	255	C10
	A148	360	A12		C135	230	C10
	A149	320	A5		C136	280	C9
P26/M42	C05	340	C5		A110	4010	A5
	C06	280	C8		A111	380	A13
	A03	380	A5		A112	310	A2
	A08	240	A4		A113	280	A8

参考文献

1. 程殿龙.旱情与抗旱对策的思考. *中国水利*, 2000, 7: 20-24.
2. 胡荣海.农作物抗旱鉴定方法与指标. *作物品种资源*, 1986, 4: 36-390.
3. 霍仕平,晏庆九,宋光英,许明陆. 玉米抗旱鉴定的形态和生理生化指标研究进展. *干旱地区农业研究*, 1995, 13: 67-73.
4. 李德全, 邹琦, 程炳嵩.土壤干旱条件下不同抗旱性小麦品种的渗透调节和渗透调节物质. *植物生理学报*, 1992, 18: 37-44.
5. 李伟, 熊谨, 陈晓阳. 木质素代谢的生理意义及其遗传控制研究进展. *西北植物学报*, 2003, 23: 675-681.
6. 李新海,高根来,梁晓玲等. 我国主要玉米自交系开花期耐旱性及改良. *作物学报*, 2002, 28: 595-600.
7. 李岩, 潘海春, 李德全.土壤干旱条件下玉米叶片内源激素含量及光合作用的变化. *植物生理学报*, 2000, 26: 301-305.
8. 黎裕. 作物抗旱性鉴定方法和指标. *干旱地区农业研究*, 1993, 11: 91-98.
9. 黎裕, 王天宇, 贾继增. 植物比较基因组学的研究进展. *生物技术通报*, 2000, 5: 11-14.
10. 黎裕, 王天宇, 石云素, 宋艳春. 玉米抗旱性的 QTL 分析研究进展和发展趋势. *干旱地区农业研究*, 2004, 22: 32-39.
11. 刘强, 张勇, 陈受宜. 干旱、高盐及低温诱导的植物蛋白激酶基因. *科学通报*, 2000, 6: 561-566.
12. 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用. *科学通报*, 2000, 1: 11-16.
13. 罗淑平.玉米抗旱性及鉴定指标的相关分析. *干旱地区农业研究*, 1990, 3: 72-78.
14. 盛良学, 贺喜全. 我国优质饲用玉米育种研究进展. *杂粮作物*, 2002, 22: 134-137.
15. 田曾元, 戴景瑞. 利用 cDNA-AFLP 技术分析玉米灌浆期功能叶基因差异表达与杂种优势. *科学通报*, 2002, 47: 1412-1416.
16. 王茅雁, 邵世勤, 张建华, 张瑞霞. 饲用玉米发芽出苗期抗旱鉴定方法和指标的研究. *内蒙古农牧学院学报*, 1994, 15: 37-42.
17. 王茅雁, 张建华, 邵世勤, 张瑞霞, 张海明. 饲用玉米抗旱性生理生化指标的研究. *内蒙古农业大学学报*, 1996, 3: 71-76.
18. 王西瑶. 玉米抗旱性的生理生化机制研究进展 (综述). *四川农业大学学报*, 1996, 14: 352-357.
19. 王元东,段民孝,邢锦丰,滕海涛,郭景伦,赵久然. 青贮玉米育种研究进展. *玉米科学*, 2002, 10: 17-21.
20. 吴敏生,戴景瑞,谢友菊. 一个与玉米基因表达沉默有关的 cDNA 片段的克隆及序列分析. *植物生理学报*, 2000, 26: 557-560.
21. 张烈, 沈秀瑛,孙彩霞,刘金刚. ABA与玉米抗旱性关系的研究. *玉米科学*, 1998 (增刊): 42-44.
22. Acunzo F, Galli C, Masci B. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. *Eur J*

- Biochem*, 2002, **269**: 5330-5335.
23. Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, Dubnick M, Polymeropoulos M H, Xiao H, Merrill C R, Wu A, Olde B, Moreno R F, Kerlavage A R, McCombie W R, Venter J C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 1991, **252**: 1651-1656.
 24. Agrama, H A S, Moussa, M E. Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize (*Zea mays L.*). *Euphytica*, 1996, **91**: 89-97.
 25. Ahn IP, Lee YH. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *Mol Plant-Microbe Int*, 2001, **14**: 496-507.
 26. Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol*, 2000, **18**: 41-42.
 27. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, **408**: 796-815.
 28. Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard P S, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe D M, Kaplan J. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*, 1994, **76**: 403-410.
 29. Assmann S M, Shimazaki K. The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology*, 1999, **119**: 809-815.
 30. Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*, 1996, **9**: 745- 753.
 31. Bachem, C W B, Oomen, R J, Visser, R G F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, **16**: 157-173.
 32. Bao W, O'Malley D M, Whetten R, Sederoff R R. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science*, 1993, **260**: 672-674.
 33. Barnes R F, Muller L D, Bauman L F, Colenbrander V F. In vitro dry-matter disappearance of brownmidribmutants, *J Anim Sci*, 1971, **33**: 881-884.
 34. Bar-Nun N, Tal L A. Harel E, Mayer A M. Repression of laccase formation in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. *Phytochem*, 1988, **27**: 2505-2509.
 35. Barriere Y, Guillet C, Goffner D, Pichon M. Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. *Anim Res*, 2003, **52**: 193-228.
 36. Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev in plant Sci*, 1998, **17**: 125-197.
 37. Baucher M, Halpin C, Petit-Conil M, Boerjan W. Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2003, **38**: 305-350.
 38. Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Ann Rev Plant Biol*, 2003, **54**: 519-546.
 39. Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 1995, **7**: 1099 - 1111.
 40. Bohnert H J, Jensen R G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**: 89-97.

41. Bolanos J, Edmeades GO. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. *Field Crops Res*, 1993, **31**: 253-268.
42. Bolanos J, Edmeades GO. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res*, 1996, **48**: 65-80.
43. Boudet A M, Lapierre C, Grima-Pettenati J. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol*, 1995, **129**: 203-236.
44. Boudet A M. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol Biochem*, 2000, **38**: 81-96.
45. Bourbonnais R, Paice M G, Reid I D, Lanthier P, Yaguchi M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonate) in Kraft lignin depolymerisation. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1876-1880.
46. Bray EA. Molecular response to water deficit. *Plant Physiol*, 1993, **103**: 1035-1040.
47. Bray EA. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*, 1997, **2**: 48-54.
48. Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, Rombauts S, Raes J, Cannoot B, Engler G, Inze ' D, Zabeau M (2002) Analysis of the transcriptome during cell division in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:14825-14830.
49. Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, Vanderhaeghen R, Inze D, Zabeau M. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wise expression studies. *Mol Gen Genomics*, 2003, **269**: 173-179.
50. Bruce W, Folkerts O, Garnaat C, , Crasta O, Roth B, Bowen B. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *Plant Cell*, 2000, **12**: 65-79.
51. Bruce W, Desbons P, Crasta O, Folkerts O. Gene expression profiling of two related maize inbred lines with contrasting root-lodging traits. *J Exp Bot*, 2001, **52**: 459-468.
52. Bruce W, Edmeades G O, Barker T C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J Exp Botany*, 2002, **53**: 13-25.
53. Burnham C.R., Brink R.A., Linkage relations of a second brown-midrib gene (bm2) in maize. *J Am Soc Agric*, 1932, **24**: 960-963.
54. Burnham C R. Maize genetics, *Crop. Newslett*, 1947, **21**:36.
55. Caron H, van Schaik B, van der Mee M, Baas F, Riggins G, van Sluis P, Hermus M C, van Asperen R, Boon K, Voute PA, Heisterkamp S, van Kampen A, Versteeg R. The Human Transcriptome Map: Clustering of Highly Expressed Genes in Chromosomal Domains. *Science*, 2001, **291**: 1289-1292.
56. Cattivell L, Baldi P, Crosatti C, et al. Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae. *Plant Mol Biol*, 2002, **48**: 649-665.
57. Champoux M C, Wang G, Sarkarung S, Mackill D J, O ' Toole J C, Huang N, McCouch S R. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 969 - 981.
58. Chang W W P, Huang, L, Shen M, Webster C, Burlingame A L, Roberts J K M. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen

- environment, and identification of proteins. *Plant Physiol*, 2000, **122**: 295-317.
59. Chapman SC, Edmeades GO. Selection improves tolerance to mid/late season drought in tropical maize populations. II. Direct and correlated responses among secondary traits. *Crop Sci*, 1999, **39**: 1315-1324.
60. Champoux M C, Wang G, Sarkarung S, Mackill D J, O ' Toole J C, Huang N, McCouch S R. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 969-981.
61. Chen C, Meyermans H, Burggraeve B, De Rycke R, Inoue K, De Vleeschauwer V, Steenackers M, Van Montagu M, Engler G, Boerjan W. Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-CoA O-methyltransferase in poplar. *Plant Physiol*, 2000, **123**: 853-867.
62. Chen W, Provart N J, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham S A, Budworth P R, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps J A, Harper J F, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangel J L, Wang X, Zhu T. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 2002, **14**: 559-574.
63. Cho Y J, Meade J D, Walden J C, Chen X, Guo Z, Liang P. Multicolor fluorescent differential display. *BioTechniques*, 2001, **30**: 562-572.
64. Choi G H, Larson T G, Nuss D L. Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. *Mol Plant Microb Interact*, 1992, **5**: 119-128.
65. Claus H. 2004. Laccase: structure, reaction, distribution. *Micron*, **35**: 93-96.
66. Claus H, Filip Z. The evidence for a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus phaericus* strain. *Microbiol Res*, 1997, **152**: 209-216.
67. Clutterbuck A J. The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**: 1731-1738.
68. Colao M C, Garzillo A M, Buonocore V, Schiesser A, Ruzzi M. Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the asidiomycete *Trametes trogii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **63**: 153-158.
69. Crasta O R, Xu W, Rosenow D T, Mullet J E, Nguyen H T. Mapping of post flowering drought resistance traits in grain sorghum: association between QTLs influencing premature senescence and maturity. *Mol Gen Genet*, 1999, **262**: 579 - 588.
70. Damerval C, Le Guilloux M. Characterization of novel proteins affected by the o₂ mutation and expressed during maize endosperm development. *Mol Gen Genet*, 1998, **257**: 354-361.
71. Davin L B, Bedgar D L, Katayama T, Lewis N G. On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspense* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochem*, 1992, **31**: 3869-3874.
72. Davin L B, Wang H B, Crowell A L, Bedgar D L, Martin D M, Sarkanen S, Lewis N G, Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an

- active center. *Science*, 1997, **275**: 362-366.
73. Dean J F D, Eriksson K E L. Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung*, 1992, **46**: 135-147.
74. Dean J F D, Eriksson K E L. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung*, 1994, **48**: 21-33.
75. Deinum B., Steg A., Hof G., Measurement and prediction of digestibility of forage maize in the Netherlands, *Anim Feed Sci Technol*, 1984, **10**: 301-313.
76. De Vienne D, Leonardi A, Damerval C, Zivy M. Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. *J Exp Bot*, 1999, **50**: 303-309.
77. Diamantidis G, Effosse A, Potier P, Bally R. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol Biochem*, 2000, **32**:319-327.
78. Dijkstra N D, Becker W R. Deverteerbaarheid en voederwaarde van verse en geensileerde snijmais, Pudoc, Wageningen, Verslagen Landbouwk. Onderz., 1964, **66**: 48.
79. Donovan W, Zheng L, Sandman K, Losick R. Genes encoding spore coat polypeptides from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 1987, **196**:1-10.
80. Donson J, Fang Y, Espiritu-Santo G, Xing W, Salazar A, Miyamoto S, Armendarez V, Volkmuth W. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol*, 2002, **48**: 75-97.
81. Douglas C. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci*, 1996, **1**: 171-178.
82. Driouich A, Laine A C, Vian B, Faye L. Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. *Plant J*, 1992, **2**: 13-24.
83. Ducros V, Brzozowski A M, Wilson K S, Brown S H, Østergaard P, Schneider D S, Pedersen A H, Davies G J. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolutions. *Nat Struc. Bio*, 1998, **5**: 310-316.
84. Ducros V, Brzozowski A M, Wilson K S, Østergaard P, Schneider D S, Svendsen A, Davies G J. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2001, **57**: 333-336.
85. Durrant W E, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack K E, Jones J D G. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell*, 2000, **12**: 963-977.
86. Edmeades G O, Bolanos J, Hernandez M, Bello S. Causes for silk delay in a lowland tropical maize population. *Crop Sci*, 1993, **33**: 1029-1035.
87. Eggert C, Temp U, Ericsson K E. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett*, 1996, **407**: 89-92.
88. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000, **300**: 1005-1016.
89. Emerson R A. Cornell Univ. *Agric. Exp. Stn., Memoir*, 1935, 180.
90. Enguita F J, Martins L O, Henrique A O, Carrondo M A. Crystal structure of a bacterial endospore

- coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 19416–19425.
91. Esaka M T, Hattori K, Fujisawa S, Sakaio S, Asahi T, Molecular cloning and nucleotide sequence of full length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells, *Eur J Biochem*, 1990, **191**: 537-/541.
 92. Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, Somssich I E: The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 2000, **5**:199-206.
 93. Ewing R M, Ben Kahla A B, Poirot O Lopez F, Audic S, Claverie J M. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res*, 1999, **9**: 950-959.
 94. Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 1989, **5**: 164-166.
 95. Fernandes J, Brendel V, Gai X W, Lal S, Chandler V L, Elumalai R P, Galbraith D W, Pierson E A Walbot V. Comparison of RNA expression profiles based on maize expressed sequence tag frequency analysis and micro-array hybridization. *Plant Physiol*, 2002, **128**: 896-910.
 96. Fisher D S, Burns J C, Pond K R. Kinetics of in vitro cell-wall disappearance and in vivo digestion. *Agron J*, 1989, **81**: 25-33.
 97. Freudenberg K, Harkin J M, Rechert M, Fukuzumi T. Die and der verholzung beteiligten enzyme. Die dehydrierung des sinapyl alcohol. *Chem Ber*, 1958, **91**: 581-590.
 98. Frova C, Krajewski P, Di Fonzo N D, Villa M, Sari-Gorla M. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers I. Yield components. *Theor Appl Genet*, 1999, **99**:280-288.
 99. Fukushima Y, Kirk T K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 872–876.
 100. Galliano H, Gas G, Series J L, Boudet A M. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb Technol*, 1991, **13**: 478–482.
 101. Gao Z H, Xue Y B, Dai J R. cDNA-AFLP analysis reveals that maize resistance to *Bipolaris maydis* is associated with the induction of multiple defense-related genes. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46**: 1454-1458.
 102. Gavnholt B, Larsen K. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol Plant*, 2002, **116**: 273-280.
 103. Gavnholt B, Larsen K, Rasmussen S K. Isolation and characterisation of laccase cDNAs from meristematic and stem tissues of ryegrass (*Lolium perenne*). *Plant Sci*, 2002, **162**: 873-885.
 104. Gelo PM, Kim HH, Butlin NG, Palmore G T R. Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 5515–5521.
 105. Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J*, 1999, **3**: 1-25.
 106. Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant M L, Bally R. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **108**: 205–210.

107. Goff S A, Cone K C, Chandle V L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene, evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev*, 1992, **6**:864-875.
108. Goff S A, Ricke D, Lan T H, Presting G, Wang R L, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange B M, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun W L, Chen L, Cooper B, Park S, Wood T C, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller R M, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, 2002, **296**:92-100.
109. Goldberg, R B. From cot curves to genomics: how gene cloning established new concepts in plant biology. *Plant Physiol*, 2001, **125**: 4-8.
110. Grotewold E, Drummond B J, Bowen B, Peterson T. The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, 1994, **76**: 543-553.
111. Grotewold E, Sainz M B, Tagliani L, Hernandez J M, Bowen B, Chandler V L. Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 13579-13584.
112. Guan L, Scandalios J G. Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. *Physiol Plant*, 1998, **104**: 413-422.
113. Harkin J M, Obst T R. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science*, 1973, **180**: 296-297.
114. Hately F, Tosser-Klopp G, Clouscard-Martinato C, Mulsant P, Gasser F. Expressed sequence tags for genes: a review. *Genet Sel Evol*, 1998, **30**: 521-541.
115. Hall AJ, Vilella f, Trapani N, Chimenti C. The effects of water stress and genotype on hte dynamics pf pollen-shedding and silking in maize. *Field Crops Res*, 1982, **5**: 349-363.
116. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *coprinaceae*). *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 1601-1606.
117. Heisey P W; Edmeades G O. Part 1 Maize Production in Drought-Stressed Environments: Technical Options and Research Resource Allocation. *World Maize Facts and Trends*, 1997/98. 1999, 1-36.
118. Hirabayashi S, Matsushita Y, Sato M, Oh-I R, Kasahara M, Abe H, Nyunoya H. Two Proton Pump Interactors Identified from a Direct Phosphorylation Screening of a Rice cDNA Library by Using a Recombinant BRII Receptor Kinase. *Plant Biotechnol*, 2004, **21**: 35-45.
119. Hopkins TL, Kramer KJ. Insect cuticle sclerotization. *Ann Rev Entomol*, 1992, **37**: 273-302.
120. Hu W J, Kawaoka A, Tsai C J, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang V L. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen *Populus tremuloides*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 5407-5412.

121. Hughes T R, Mao M, Jones A R, Burchard J, Marton M J, Shannon K W, Lefkowitz S M, Ziman M, Schelter J M, Meyer M R, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He Y D, Stephanian S B, Cavet G, Walker W L, West A, Coffey E, Shoemaker D D, Stoughton R, Blanchard A P, Friend S H, Linsley P S. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol.* 2001, **19**: 342-347.
122. Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Ann Rev Plant Physiology Plant Mol Biol*, 1996, **47**: 377-403.
123. Ishitani M, Majumder A L, Bornhouser A, Michalowski C B, Jensen RG, Bohnert H J. Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J*, 1996, **9**: 537-548.
124. Jin H L, Cathie M. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol*, 1999, **41**: 577-585.
125. Johansson M, Denekamp M, Asiegbu F O. Production and isozyme pattern of extracellular laccase in the S and P intersterility groups of the root pathogen *Heterobasidion annosum*. *Mycol Res*, 1999, **103**: 365-371.
126. Jone C S, Davies H V, Taylor M A. Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. *Planta*, 2000, **211**: 708-714.
127. Jongeneel C V, Iseli C., Stevenson B J, Riggins G J, Lal A, Mackay A, Harris R A, O'Hare M J, Neville A M, Simpson A J G, Strausberg R L. Comprehensive sampling of gene expression in human cell lines with massively parallel signature sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 4702-4705.
128. Jung H, Xu F, Li K. Purification and Characterization of laccase from wood-degrading fungus *trichophyton rubrum* LKY-7. *Enz. Microbial Technol*, 2002, **30**: 161-168.
129. Katayama T, Davin L B, Lewis N G. An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochem*, 1992, **31**: 3875-3881.
130. Khairallah M M, Bohn M, Jiang C, Deutsch J A, Jewell D C, Mihm J A, Melchinger A E, González de León D, Hoisington D A. Molecular mapping of QTL for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. *Plant Breeding*, 1998, **117**: 309-318.
131. Kiefer-Meyer M C, Gomord V, O'Connell A, Halpin C, Faye L. Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco. 1996, *Gene*, **178**: 205-207.
132. Kim DH, Rigling D, Zhang L, Van A N. A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of Lac1. *Mol Plant-Microbe Int*, 1995, **8**: 259-266.
133. Kramer K J, Kanost M R, Hopkins T L, Jing H, Zhu Y C, Xu R, Kerwin J L, Turecek F. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 2001, **57**: 385-392.
134. LaFayette P, Eriksson K E, Dean J F. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.). 1995, *Plant Physiol*, **107**: 667- 668.
135. LaFayette P R, Eriksson K E, Dean J F. Characterization and heterologous expression of laccase

- cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Mol Biol*, 1999, **40**: 23-35.
136. Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, **1**:174-181.
137. Larsson S, Cassland P, Jonsson L J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1163-1170.
138. Lebreton C, Lazic-Jancic V, Steed A, Pekic S, Quarrie S A. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *J Exp Bot*, 1995, **46**: 853-865.
139. Lee J H, Montagu M V, Verbruggen N. A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 5873-5877.
140. Lee J M, Williams M E, Tingey S V, Rafalski J A. DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development. *Funct Integr Genomics*, 2002, **2**:13-27.
141. Lee M, Qi M, Yang Y. A novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, **14**: 527-535.
142. Leitner C, Hess J, Galhaup C, Ludwig R, Nidetzky B, Kulbe K D, Haltrich D. Purification and characterization of a laccase from the white-Rot fungus *trametes multicolor*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, **99**: 497-508.
143. Leonowicz A, Cho N S, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol*, 2001, **41**: 185 – 227.
144. Leung J, Giraudat J. Absciscic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, **49**: 199-222.
145. Lewis N G, Yamamoto E. Lignin: occurrence, biogenesis, and biodegradation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, **41**: 455-496.
146. Li K, Xu F, Eriksson E. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl and Enviro Micro*, 1999, **65**: 2654–2660.
147. Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257**: 967-971.
148. Lilley J M, Ludlow M M, McCouch S R, O ' Toole J C. Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Ex. Bot*, 1996, **47**: 1427 – 1436.
149. Lipshutz R J, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal M J, Shah N, Shen N, Yang R, Fodor S P. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *BioTechniques*, 1995, **19**: 442-447.
150. Liu G, Loraine AE, Shigeta R, Cline M, Cheng J, Valmeekam V, Sun S, Kulp D, Siani-Rose M A. NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 82-86.
151. Lockhart D, Dong H, Byrne M C, Follettie M T, Gallo M V, Chee M S, Mittmann M, Wang C,

- Kobayashi M, Horton H, Brown E L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 1675-1680.
152. Mai C, Schormann W, Milstein O, Huettermann A. Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**: 510-514.
153. Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton K A, Dangl J L, Dietrich R A: The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 2000, **26**:403-410.
154. Manjunath S, Sachs M M. Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. *Plant Mol Biol*, 1997, **33**: 97-112.
155. Mann K G, Jenny R J, Krishnaswamy S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem*, 1988, **57**: 915-956.
156. Martin K J, Pardee A B. Principles of differential display. *Meth Enzymol*, 1999, **303**: 234-297.
157. Martins L O, Soares C M, Pereira M M, Teixeira M, Costa T, Jones G H, Henriques A O. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the bacillus subtilis endospore coat. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 18849- 18859.
158. Matz M V, Lukyanov S A. Different strategies of differential display: areas of application. *Nucl Acids Res*, 1998, **26**: 5537-5543.
159. Mayer A M, Staples R C. Laccase:new functions for an old enzyme. *Phytochem*, 2002,**60**: 551-565.
160. McCue K F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol*, 1990, **8**: 358-362.
161. McDougall G J, Stewart D, Morrison I M. Cell-wall bound oxidases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) xylem participate in lignin formation. *Planta*, 1994, **194**: 9-14.
162. McGonigle B, Keeler S J, Lau S M C, Koeppe M K, O'Keefe D P. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol*, 2000, **124**: 1105-1120.
163. Meissner R C, Jin H, Cominelli E, Denekamp M, Fuertes A, Greco R, Kranz HD, Penfield S, Petroni K, Urzainqui A, Martin C, Paz-Ares J, Smeekens S, Tonelli C, Weisshaar B, Baumann E, Klimyuk V, Marillonnet S, Patel K, Speulman E, Tissier A F, Bouchez D, Jones J J, Pereira A, Wisman E. Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis, assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell*, 1999, **11**: 1827-1840.
164. Messerschmidt A, Huber R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur J Biochem*, 1990, **187**: 341-352.
165. Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 9828-9832.
166. Morgan JM, Tan MK. Chromosomal location of a wheat osmoregulation gene using RFLP analysis.

- Australian J Plant Physiol*, 1996, **35**: 299-319.
167. Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, **8**: 4321-4325.
168. Nakamura W. Studies on the biosynthesis of lignin 1. Disproof against the catalytic activity of laccase in the oxidation of coniferyl alcohol. *J Biochem*, (Japan), 1967, **62**: 54-60.
169. Nguyen H T, Babu B C, Blum A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics consideration. *Crop Sci*, 1997, **37**: 1426 – 1434.
170. Nicolas C, Nicolas G, Rodriguez D. Transcripts of a gene, encoding a small GTP-binding protein from *Fagus sylvatica*, are induced by ABA and accumulated in the embryonic axis of dormant seeds. *Plant Mol Biol*, 1998, **36**: 487-91.
171. Nuss DL. Using hypoviruses to probe and perturb signal transduction processes underlying fungal pathogenesis. *The Plant Cell*, 1996, **8**: 1845-1853.
172. Ohkawa I, Okada N, Shinmyo A, Takano M, Primary structure of cucumber (*Cucumis sativum*) ascorbate oxidase deduced from cDNA sequence: homology with blue copper proteins and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, **86**: 1239-1243.
173. Qin L, Overmars H, Helder J, Popeijus H, Rouppe van der Voort J, Groenink W, van Koert P, Schots A, Bakker J, Smant G. An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, **13**: 830-836.
174. O' Malley D M, Whetten R, Bao W, Chen C, Sederoff R R. The role of laccase in lignification. *Plant J*, 1993, **4**: 751-757.
175. Ouzounis C, Sander C. A structure-derived sequence pattern for the detection of type I copper binding domains in distantly related proteins. *FEBS Lett*, 1991, **279**: 73-78.
176. Palmieri G, Giardina P, Blanco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. A novel white laccase from *Pleurotis ostreatus*. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 31301-31307.
177. Parniske M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol*, 2000, **3**: 320-328.
178. Petroni K, Tonelli C, Paz-Ares J. The MYB transcription factor family, from maize to Arabidopsis. *Maydica*, 2002, **47**: 213-232.
179. Prashar Y, Weissman S M. Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 659-663.
180. Rabinowicz P, Braun E, Wolfe A, Bowen B, Grotewold E. Maize R2R3 Myb genes, sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics*, 1999, **153**: 427-444.
181. Ramanjulu S, Bartels D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plant. *Plant Cell Environ*, 2002, **25**: 141-151.
182. Randall DW, George S DB, Holland P L, Hedman B, Hodgson K O, Tolman W B, Solomon E I. Spectroscopic and electronic structural studies of blue copper model complexes: comparison of three- and four-coordinate Cu (II)-thiolate complexes and fungal laccase. *J Am Chem Soc*, 2001, **122**:

- 11632-11648.
183. Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes- Macheteau M, Boudet A M, Goffner D. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases- a divergent gene family- in poplar. *Eur J Biochem*, 1999, **259**: 485- 495.
184. Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet A M, Goffner D. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol*, 2002, **29**: 145-155.
185. Reijans M, Lascaris R, Groeneger A, Wittenberg A, Wesselink E, van Oeveren J de Wit E, Boorsma A, Voetdijk B, van der Spek H, Grivell L, Simons G. Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae* *Genomics*, 2003, **82**: 606-618.
186. Ribaut J M, Hoisington D A, Deutsch J A, Jiang C, Gonzalez-de-Leon D. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor Appl Genet*, 1996, **92**: 905-914.
187. Ribaut J M, Jiang C Z, Gonzalez-de-leon D, Edmeades G O, Hosington D. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize .2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 887-896.
188. Ribaut J M, Banziger M, Hoisington D. Genetic dissection and plant improvement under abiotic stress conditions: drought tolerance in maize as an example. *JIRCAS Working Report*, 2002, 85-92
189. Rigling D. Isolation and characterization of *Cryphonectria parasitica* mutants that mimic a specific effect of hypovirulence-associated dsRNA on laccase activity. *Can J Bot*, 1995, **73**, 1655-1661.
190. Rigling D, Heiniger U, Hohl H R. Reduction activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. *Phytopathology*, 1989, **79**:219-223.
191. Rigling D, Van Alfen N K. Regulation of laccase biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 8000-8003.
192. Robatzek S, Somssich I E: A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J* 2001, **28**:123-133.
193. Rodriguez E, Pickard M A, Vazquez D R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol*, 1999, **38**, 27-32.
194. Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin A C, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev*, 2001, **15**: 2122-2133.
195. Sanguineti M C, Conti S, Landi P, Tuberosa R. Absciscic acid concentration in maize leaves: genetic control and response to divergent selection in two populations. *Maydica*, 1996, **41**:141-203.
196. Sanguineti M C, Tuberosa R, Landi P, Salvi M, Maccaferri M, Casarini E, Conti S. QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf absciscic acid concentration in field-grown maize. *J Exp Bot*, 1999, **50**: 1289-1297.

197. Sari-Gorla M, Krajewski P, Di Fonzo N, Villa M, Frova C. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. II. Plant height and flowering. *Theor Appl Genet*, 1999, **99**: 289-295.
198. Sasaki T, Matsumoto T, Yamamoto K, Sakata K, Baba T, Katayose Y, Wu J, Niimura Y, Cheng Z, Nagamura Y, Antonio BA, Kanamori H, Hosokawa S, Masukawa M, Arikawa K, Chiden Y, Hayashi M, Okamoto M, Ando T, Aoki H, Arita K, Hamada M, Harada C, Hijishita S, Honda M, Ichikawa Y, Idonuma A, Iijima M, Ikeda M, Ikeno M, Ito S, Ito T, Ito Y, Ito Y, Iwabuchi A, Kamiya K, Karasawa W, Katagiri S, Kikuta A, Kobayashi N, Kono I, Machita K, Maehara T, Mizuno H, Mizubayashi T, Mukai Y, Nagasaki H, Nakashima M, Nakama Y, Nakamichi Y, Nakamura M, Namiki N, Negishi M, Ohta I, Ono N, Saji S, Sakai K, Shibata M, Shimokawa T, Shomura A, Song J, Takazaki Y, Terasawa K, Tsuji K, Waki K, Yamagata H, Yamane H, Yoshiki S, Yoshihara R, Yukawa K, Zhong H, Iwama H, Endo T, Ito H, Hahn JH, Kim HI, Eun MY, Yano M, Jiang J, Gojobori T. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature*, 2002, **420**:312-316.
199. Sato Y, Bao W, Sederoff R R, Whetten R W. Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J Plant Res*, 2001, **114**:147-156.
200. Savidge R, Udagama-Randenlya P. Cell wall-bound coniferyl alcohol oxidase associated with lignification in conifers. *Phytochem*, 1992, **31**: 2959-2966.
201. Schena M, Shalon D, Davis R W, Brown P O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270**: 467-470.
202. Schindler U, Beckmann H, Cashmore A R. TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. *Plant Cell*, 1992, **4**:1309-1319.
203. Schussler J R, Westgate M E. Assimilate flux determines kernel set at low water potential in maize. *Crop Sci*, 1995, **35**: 1074-1080.
204. Shimkets R A, Lowe D G, Tai J T, Sehl P, Jin H, Yang R, Predki P F, Rothberg B E G, Murtha M T, Roth M E, Shenoy S G, Windemuth A, Simpson J W, Simons J F, Daley M P, Gold S A, McKenna M P, Hillan K, Went G T, Rothberg J M. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 798-803.
205. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 1997, **115**: 27-334.
206. Shoemaker D D, Schadt E E, Armour C D, He Y D, Garrett-Engle P, McDonagh P D, Loerch P M, Leonardson A, Lum P Y, Cavet G, Wu L F, Altschuler S J, Edwards S, King J, Tsang J S, Schimmack G, Schelter J M, Koch J, Ziman M, Marton M J, Li B, Cundiff P, Ward T, Castle J, Krolewski M, Meyer M R, Mao M, Burchard J, Kidd M J, Dai H, Phillips J W, Linsley P S, Stoughton R, Scherer S, Boguski M S. Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature*, 2001, **409**:922-927.
207. Skriver K, Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 1990, **6**: 503-512.
208. Sterjiades R, Dean J F D, Eriksson K E L. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*)

- polymerizes monolignols. *Plant Physiol*, 1992, **99**: 1162-1168.
209. Sterjiades R, Dean J F D, Gamble G, Himmelsbach D S, Eriksson K E L. Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. Reactions with monolignols and lignin model compounds. *Planta*, 1993, **190**: 311-318.
210. Stracke R., Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, **4**: 447-456.
211. Solomon E I, Sundaram U M, Machonkin E T. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev*, 1996, **96**: 2563-2605.
212. Sompayrac L, Jane S, Burn T C, Tenen D G, Danna K J. Overcoing limitations of the mRNA differential display technique. *Nucl Acids Res*, 1995, **23**: 4738-4739.
213. Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Mastsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H. Stress-responsive zinc finger gene *ZPT2-3* plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant J*, 2003, **36**: 830-841.
214. Sugumaran M, Burgio G L, Kundzicz H, Saul S, Semensi V. Studies on the enzymes involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1992, **19**: 271-283.
215. Sun Y, Helentjaris T, Zinselmeier C, Habben JE. Utilizing gene expression profiles to investigate maize response to drought stress. <http://www.intl-pag.org/8/abstracts/pag8808.html>
216. Suresh Kumar S V, Phale P S, Durani S, Wangikar P P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotech and Bioengineering*, 2003, **83**: 387-394.
217. Sutcliffe J G, Foye P E, Erlander M G, Hilbush B S, Bodzin L J, Durham J T, Hasel KW. TOGA: An automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 1976-1981.
218. Takahama U. Oxidation of hydroxycinnamic acid hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase. Interactions among *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiol Plant*, 1995, **93**: 61-68.
219. Thomas B R, Yonekura M., Morgan T D, Czapla T H, Hopkins T L, Kramer K J. A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem*, 1989, **19**: 611-622.
220. Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res*, 1994, **22**: 4673-4680.
221. Thurston C F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, **140**: 19-26.
222. Torres J, Svistunenko D, Karlsson B, Cooper C E, Wilson M T, Fast reduction of a copper center in laccase by nitric oxide and formation of a peroxide intermediate. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 963-967.
223. Tuberosa, R, Sanguineti M C, Landi P, Salvi S, Casarini E, Conti S. RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (*Zea mays L.*).

- Theor Appl Genet*, 1998, 97: 744-755.
224. Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Landi P, Maccaferri M, Conti S. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann Bot*, 2002, 89: 941-963.
225. Ueno O. Induction of kranz anatomy and C4-like biochemical characteristics in a submerged amphibious plant by abscisic acid. *Plant Cell*, 1998, 10: 571-84.
226. Van der Biezen E A, Juwana H, Parker J E, Jones J D G. cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13: 895-898.
227. Valderrama B, Oliver P, Medrano-Soto A, Vazquez-Duhalt R. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 84: 289-299.
228. Vance C P, Kirk T K, Sherwood R T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann Rev Phytopathol*, 1980, 18: 259-288.
229. Velculescu V E, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler K W. Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, 70: 484-487.
230. Vogel K P, Jung H. Genetic Modification of herbaceous plants for feed and fuel. *Crit Rev in plant Sci*, 2001, 20: 15-49.
231. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4407-4414.
232. Wahleithner J A, Xu F, Brown K M, Brown S H, Golightly E J, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A, Schneider P. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet*, 1996, 29: 395-403.
233. Wang G D, Li Q J, Luo B, Chen X Y. Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 893-897.
234. Welsh J, Chada K, Dalal S S, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucl Acids Res*, 1992, 20: 4965-4970.
235. Westgate M E, Boyer J S. Reproduction at low silk and pollen water potentials in maize. *Crop Sci*, 1986, 26: 951-956.
236. Whetten W, Sederoff R. Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1001-1013.
237. Wilson J R, Mertens D R. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci*, 1995, 35: 251-259.
238. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 2001, 126: 485-493.
239. Wong Y, Yu J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res*, 1999, 33: 3512-3520.
240. Xiong L, Yang Y. A rice circadian oscillation component gene OsCOC1 is involved in flowering regulation. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=38455771>.

241. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 924-928.
242. Xu F, Berka R M, Wahleithner J A, Nelson B A, Shuster J R, Brown S H, Palmer A E, Solomon E I. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem J*, 1998, **334**: 63-70.
243. Xu F, Palmer A E, Yaver D S, Berka R M, Gambetta G A, Brown S H, Solomon E I. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase. Axial perturbations of the T1 copper. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 12372-12375.
244. Xu F, Shin W, Brown S H, Wahleithner J A., Sundaram U M, Solomon E I. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1292**: 303-311.
245. Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*, 1992, **33**: 217-224.
246. Yang L, Zheng B S, Mao C, Yi K K, Liu F Y, Wu Y R, Wu P. cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit. *Gene*, 2003, **314**: 141-148.
247. Yaropolov A I, Skorobogat'ko O V, Vartanov S S, Varfolimeyev S D. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, **49**: 257-280.
248. Yaver, DS and EJ Golightly. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene*, 1996, **181**: 95-102.
249. Yoshida H. Chemistry of lacquer (urushi). *J Chem Soc*, 1883, **43**: 472-486.
250. Yu J, Hu S N, Wang J, Wong K S, Li S G, Liu B, Deng Y J, Dai L, Zhou Y, Zhang X Q, Cao M L, Liu J, Sun J D, Tang J B, Chen Y J, Huang X B, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L J, Geng J N, Han Y J, Li L, Li W, Hu G Q, Huang X G, Li W J, Li J, Liu Z W, Li L, Liu J P, Qi Q H, Liu J S, Li L, Li T, Wang X G, Lu H, Wu T T, Zhu M, Ni P X, Han H, Dong W, Ren X Y, Feng X L, Cui P, Li X R, Wang H, Xu X, Zhai W X, Xu Z, Zhang J S, He S J, Zhang J G, Xu J C, Zhang K L, Zheng X W, Dong J H, Zeng W Y, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X D, Chen X W, He J, Liu D F, Tian W, Tian C G, Xia H A, Bao Q J, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W M, Li P, Chen W, Wang X D, Zhang Y, Hu J F, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G Y, Xiong Y Q, Li Z J, Mao L, Zhou C S, Zhu Z, Chen R S, Hao B L, Zheng W M, Chen S Y, Guo W, Li G J, Liu S Q, Tao M, Wang J, Zhu L H, Yuan L P, Yang H M. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, **296**: 79-92.
251. Zacherl M, Huala E, Rudiger W, Briggs W R, Salomon M. Isolation and Characterization of cDNAs from Oat Encoding a Serine/Threonine Kinase: An Early Component in Signal Transduction for Phototropism (Accession Nos. AF033096 and AF033097) (PGR98-028). *Plant Physiol*, 1998, **116**: 869.

252. Zimmermann I M, Heim M A, Weisshaar B, Uhrig J F. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J*, 2004, **40**:22-34.
253. Zinselmeier C, Jeong B R, Boyer J. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiol*, 1999, **121**: 25-36.
254. Zinselmeier C, Sun Y J, Helentjaris T, Beatty M, Yang S, Smith H, Habben J. The use of gene expression profiling to dissect the stress sensitivity of reproductive development in maize. *Field Crop Res*, 2002, **75**:111-121.
255. Zoppellaro G, Sakurai T, Huang H, A novel mixed valence form of *Rhus vernicifera* laccase and its reaction with dioxygen to give a peroxide intermediate bound to the trinuclear center. *J Biochem-Tokyo*, 2001, **129**: 649-653.

致 谢

本研究是在王天宇研究员和黎裕研究员的悉心指导下完成的。从论文的选题、设计、实施至成文，每一步都凝聚着导师辛勤的汗水。导师谦虚的品德、渊博的知识、严谨求实的治学态度、勤奋忘我的工作精神、循循善诱的高尚品格使我受益终身。在三年多的博士生活中，导师对我的成长倾注了大量的心血，使我在思想素质和科研能力等方面有了显著提高。在此论文完成之际，谨表示最诚挚的谢意！

本研究的部分工作为中国和丹麦政府间合作项目内容，受到科技部和丹麦 DANIDA Fellowship Center 10 个月奖学金的资助，特表谢意！

本研究相当一部分工作（高等植物漆酶基因的比较分析、黑麦草和玉米漆酶基因的克隆与测序）在导师的鼎力支持下于丹麦农业科学院植物生物系完成的。在丹麦期间，Thomas Lübberstedt 博士、Torben ASP 博士在科研和生活方面给予了极大的关心和帮助。同时，在异国他乡一起工作和生活的邢永忠博士后、徐明良教授也给予了许多帮助。在此深表感谢！

论文的顺利完成得益于实验室良好的科研条件和融洽的工作氛围。石云素副研究员在技术路线和实验思路方面给予了热情的指导和帮助。宋艳春老师在实验材料及试剂准备方面也对寄予了很大的帮助。在实验和工作过程中，于永涛博士、田松洁硕士、张吉民硕士、袁进成硕士、李会永博士、黄素华博士后、王荣焕博士、程春明硕士、吴建伟硕士、王阳硕士、公强硕士等都给我提供了极大的方便和必不可少的帮助。刘金辉和彭景慧同学为本论文中水分胁迫实验部分给予了极大的帮助。

我的同班同学王睿辉、陈国跃和毛新国等在学习和生活上也给予了许多帮助。

中国农业科学院研究生院和作物品种资源研究所的各位领导、老师和同学在我攻读博士学位期间也给予了无私的指导、关心和帮助，他们对我的成长付出了辛勤的劳动。

特别感谢我的妻子张凤云在我求学和出国过程中给予了我莫大的鼓励 and 无私的奉献、理解和支持，使得我能够全身心地投入到科研工作。

最后感谢我的父母与兄弟们，并祝福我的儿子。祝愿他们健康、平安！

路运才

2004 年 9 月

作者简历

路运才，男，1969 年 6 月出生，山东省曹县人，中共党员。1996 年 7 月毕业于东北农业大学农学系土壤与农业化学专业，获得农学学士学位；2001 年 7 月毕业于中国农业科学院研究生院，获得农学硕士学位；2001 年 9 月考入中国农业科学院研究生院作物遗传育种专业攻读农学博士学位。2003 年 8 月至 2004 年 5 月在丹麦农业科学院植物生物系进行为期 10 个月的合作研究。1996 年 7 月至 2001 年 8 月在中国农业科学院甜菜研究所工作。

研究生期间发表或待发表的主要论文：

1. **路运才**, ASP T, Schejbel B, 石云素, 宋燕春, 黎裕, Lübberstedt T, 王天宇. 玉米漆酶基因的克隆与序列分析. 中国农业科学 (已接受)。
2. **Lu Y C**, Asp T, Lübberstedt T, Li Y, Wang T Y. Comparative Analysis of Laccase Gene Family in Higher Plants. *Journal of Molecular Evolution* (Submitted).