

3 个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因的克隆及其序列和表达特性分析

田 畅, 蒋 倩, 王 枫, 李梦瑶, 贾晓玲, 熊爱生^①

(南京农业大学园艺学院 作物遗传与种质创新国家重点实验室 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 从芹菜 (*Apium graveolens* Linn.) 品种‘六合黄心芹’(‘Liuhe Huangxinqin’)、‘津南实芹’(‘Jinnan Shiqin’) 和‘文图拉’(‘Ventura’) 中分别克隆获得非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 *Agnp-G3PDH*。3 个品种的 *Agnp-G3PDH* 基因序列均包含 1 个全长 1 491 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 496 个氨基酸; 存在 84 个碱基位点差异, 导致 14 个氨基酸位点改变。由该基因编码的‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’的 *Agnp-G3PDH* 蛋白的理论相对分子质量分别为 53 201.6、53 051.4 和 52 960.3, 理论等电点分别为 pI 7.49、pI 7.86 和 pI 8.12, 氨基酸组成中碱性氨基酸数量大于酸性氨基酸数量; 该蛋白质具有亲水性与疏水性双重特性, 均为疏水性蛋白。多重比对结果表明: 3 个品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列同源性达到 99.09%, 具有高度保守性; 且与其他 11 种植物 *np-G3PDH* 的氨基酸序列的相似度也较高。在基于 *np-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列进化树上, 3 个芹菜品种聚在同一分支中, 并与杨柳科 (Salicaceae) 种类毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) 聚在一起, 表明它们的 *np-G3PDH* 进化关系较近。实时定量 PCR 分析结果表明: 在 3 个芹菜品种的不同组织中 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平均有明显差异, 其中, 在‘津南实芹’的叶、‘文图拉’的花和‘六合黄心芹’的根中该基因的相对表达水平最高; 经高温 (38 ℃)、低温 (4 ℃) 和干旱 (20% PEG) 胁迫处理后 3 个品种 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平均极显著高于或低于对照, 但经盐 (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) 胁迫处理后仅品种‘津南实芹’*Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平显著高于对照, 品种‘六合黄心芹’和‘文图拉’*Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平与对照无显著差异。表明该基因的表达具有组织特异性且与品种间的抗逆性差异有关。

关键词: 芹菜; *Agnp-G3PDH* 基因; 序列分析; 同源性; 非生物胁迫; 表达特性

中图分类号: Q785; Q943.2; S636.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2014)02-0001-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.02.01

Cloning of *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars of *Apium graveolens* and its sequence and expression characteristic analyses TIAN Chang, JIANG Qian, WANG Feng, LI Mengyao, JIA Xiaoling, XIONG Aisheng^① (State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(2): 1-10

Abstract: Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *Agnp-G3PDH* was cloned from cultivars ‘Liuhe Huangxinqin’, ‘Jinnan Shiqin’ and ‘Ventura’ of *Apium graveolens* Linn., respectively. The sequence of *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars contains an open reading frame (ORF) with the full length of 1 491 bp, which encodes 496 amino acids. There are 84 base site differences, leading to site changes of 14 amino acids. Theoretical relative molecular mass of protein encoded by *Agnp-G3PDH* gene from ‘Liuhe Huangxinqin’, ‘Jinnan Shiqin’ and ‘Ventura’ is 53 201.6, 53 051.4 and 52 960.3, respectively, and theoretical isoelectric point is pI 7.49, pI 7.86 and pI 8.12,

收稿日期: 2013-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31272175); 国家教育部“新世纪优秀人才支持计划” (NCET-11-0670); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20130027); 江苏高校优势学科建设工程一期项目 (2011PAPD); 江苏省高层次创新创业人才引进计划专项基金 (2011JSSC)

作者简介: 田 畅 (1990—), 女, 吉林大安人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜分子生物学相关的研究。

^① 通信作者 E-mail: xiongaisheng@njau.edu.cn

respectively. The number of basic amino acids is more than that of acidic amino acids in amino acid composition. And the proteins all possess double characteristics of hydrophilicity and hydrophobicity and all are the hydrophobic protein. The alignment result shows that homology of amino acid sequences encoded by *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars reaches 99.09%, which is highly conserved. Similarity of amino acid sequence among three cultivars and other eleven species is higher. Based on phylogenetic tree of amino acid sequence encoded by *np-G3PDH* gene, three cultivars are clustered in the same branch, and three cultivars and *Populus trichocarpa* Torr. & Gray in Salicaceae can be clustered together which shows that their *np-G3PDH* amino acid sequences have a closer evolutionary relationship. The result of quantitative real-time PCR shows that there are obvious differences in relative expression level of *Agnp-G3PDH* gene among different tissues of three cultivars, in which, relative expression level of the gene is the highest in leaf of 'Jinnan Shiqin', in flower of 'Ventura' and in root of 'Liuhe Huangxinquin'. After treated by stress of high temperature (38 °C), low temperature (4 °C) and drought (20% PEG), relative expression level of *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars is extremely significantly higher or lower than that of the control, but after treated by salinity (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) stress only that of 'Jinnan Shiqin' is significantly higher than that of the control, and that of 'Liuhe Huangxinquin' and 'Ventura' has no significant difference with that of the control. It is indicated that the expression of *Agnp-G3PDH* gene has tissue specificity and is related to resistance difference among cultivars.

Key words: *Apium graveolens* Linn.; *Agnp-G3PDH* gene; sequence analysis; homology; abiotic stress; expression characteristics

哺乳动物中甘油醛-3-磷酸脱氢酶(G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)在蛋白质和DNA互作、DNA修复、转录、调控、细胞信号转导及细胞凋亡等生命活动中表现出不同的功能性,在植物中此酶可能与哺乳动物具有相似的调控模式^[1]。高等植物的G3PDH分为磷酸化和非磷酸化两大类,是维持生命活动的最基本酶之一,主要参与糖酵解、糖异生以及卡尔文循环等能量代谢途径。按定位来说可以分为质体型和胞质型两类,磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)在质体及胞质中均存在,包含GAPC、GAPC_p和GAPA/B三类同工型蛋白质^[2];非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(np-G3PDH)定位于细胞质中,为4个同种亚基GAPC组成的多聚体^[3],是催化糖酵解“支路”反应的酶,具体反应过程为np-G3PDH氧化3-磷酸甘油醛生成3-磷酸甘油酸,该反应是依赖于NADP⁺并伴有NADPH生成的不可逆反应^[4]。np-G3PDH的氨基酸序列与磷酸化的GAPDH的氨基酸序列同源性很低,但与各种真菌和真核生物的醛脱氢酶(ALDHs)有约30%的氨基酸序列同源性^[5]。目前已从多种生物中克隆出np-G3PDH基因序列,如菠菜(*Spinacia oleracea* Linn.)^[6]、玉米(*Zea mays* Linn.)^[7]、小麦(*Triticum aestivum* Linn.)^[8]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.)^[9]和皱叶烟草(*Nicotiana plumbaginifolia* Viv.)^[10]等,np-G3PDH基因具有高度保守性,通过不同物种np-G3PDH基因核

苷酸或氨基酸序列的比较,可为物种分类及发育关系研究提供一定的证据。

芹菜(*Apium graveolens* Linn.)是常用蔬菜之一,富含蛋白质、碳水化合物、胡萝卜素、B族维生素以及钙、磷、铁、钠等元素,栽培历史悠久,栽培区域广泛且品种丰富。南京六合地区栽培的品种‘六合黄心芹’(‘Liuhe Huangxinquin’)具有植株矮小、晚熟、喜湿、耐肥、耐热和耐寒等特点;天津津南地区栽培的品种‘津南实芹’(‘Jinnan Shiqin’)具有植株直立、抽薹晚、抗逆性强和适应性强等特点;而引进品种‘文图拉’(‘Ventura’)则具有株型大、质地脆嫩和抗病能力强等特点,具有典型的西芹特征。作者以上述3个芹菜品种为实验材料,克隆获得芹菜非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因*Agnp-G3PDH*并进行序列分析;利用生物信息学方法推导其氨基酸序列并对氨基酸组成、亲水性/疏水性及其与其他物种的进化关系进行预测和分析;通过实时定量PCR对该基因的组织表达特异性及胁迫诱导表达特性进行了研究,以期对芹菜*Agnp-G3PDH*基因功能的深入研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株DH5 α 为南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室伞形科(Apiaceae)植物

课题组保存;质粒载体 pMD18-T Vector、*Ex Taq* DNA 聚合酶和各类限制性内切酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品。

供试芹菜品种‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’均种植于南京农业大学园艺学院江浦实验农场,保存于人工气候室中,采集成熟的根、茎、叶和花用于总 RNA 提取及 cDNA 合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 采用 RNA simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]从3个品种的根、茎、叶和花中提取总 RNA,利用 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]将总 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.2 *Agnp-G3PDH* 基因的克隆 根据 GenBank 中芹菜的 *np-G3PDH* 基因(登录号 AF196292)设计引物 NXR37(序列为 5'-ATGGCTGGAAGTGCTGTGTATG-3')和 NXR38(序列为 5'-CTAGCCCATGGTATAAGAA GGGGA-3')。然后分别以‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’的 cDNA 为模板进行扩增、克隆和测序^[11]。

1.2.3 序列分析 用 BLASTp 及 DNAMAN 进行氨基酸序列比对,相关种类的 *np-G3PDH* 氨基酸序列均来自 NCBI 数据库。利用 DNAMAN 和 [http:// web.expasy.org](http://web.expasy.org) 网站相关软件进行亲水性/疏水性鉴定和氨基酸类型等相关分析,利用 Signal P 软件分析蛋白质信号肽,蛋白质基本性质分析用 [http:// www.expasy.org](http://www.expasy.org) 网站相关软件完成。利用 DNAMAN 构建系统进化树,然后用 MEGA 5.0 软件对进化树进行编辑并生成报告图形^[12]。

1.2.4 胁迫处理及实时定量 PCR 反应 分别对3个品种的2月龄幼苗各20株进行高温、低温、盐和干旱胁迫处理。其中,高温和低温胁迫处理分别将植株置于 38 °C 光照培养箱和 4 °C 冰箱中处理 2 h,盐和干旱胁迫处理则分别将植株用 0.2 mol · L⁻¹ NaCl 和质量体积分数 20% PEG 溶液室温处理 2 h。

分别取经高温、低温、盐和干旱胁迫处理后3个芹菜品种植株的叶片进行实时定量 PCR 分析,各3次重复。根据克隆获得的‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’的 *Agnp-G3PDH* 基因序列分别设计表达检测上游引物 NRX37BDF1(序列为 5'-AGGGACAT CAACAAAGCAATG-3')和下游引物 NRX31BDR1(序

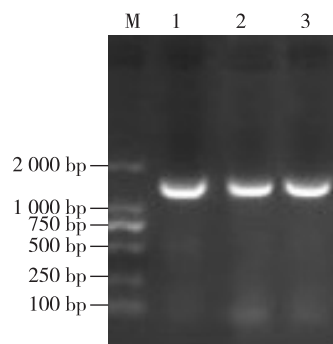
列为 3'-CATATTGATGCTGTT TGTGATG-5');以芹菜 *actin* 基因为内参设计表达检测上游引物 ACTIN-F(序列为 5'-CTTCCTGCCATATATGATTGG-3')和下游引物 ACTIN-R(序列为 3'-GCCAGCACCTCGATCTTCATG-5')。采用 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]进行实时定量 PCR 反应;相对定量使用参照基因的 ΔCt 法,表达差异用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。其中, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{actin}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样品}} - \Delta Ct_{\text{对照}}$ (式中, Ct 表示每个 PCR 反应管内荧光信号到达阈值时所经历的循环数)。

2 结果和分析

2.1 芹菜 *Agnp-G3PDH* 基因的序列分析及其编码的氨基酸序列分析结果

分别以品种‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’嫩叶的 cDNA 为模板,用引物 NRX37 和 NRX38 分别扩增出一段长约 1 500 bp 的扩增产物(图 1),经测序得到3个芹菜品种的 *Agnp-G3PDH* 基因序列及其编码的氨基酸序列(图 2、图 3 和图 4)。

序列测定与分析结果显示:3个芹菜品种的 *Agnp-G3PDH* 基因均含有1个长度为 1 491 bp 的开放阅读框(ORF, open reading frame),编码 496 个氨基酸。3个品种的 *Agnp-G3PDH* 基因序列中存在 84 个碱基差异,编码的氨基酸序列存在 14 个氨基酸位点的改变;其中,品种‘六合黄心芹’与‘文图拉’间的 *Agnp-G3PDH* 基因序列有 6 个不同位点、编码的氨基



M: DL2000 marker; 1: 芹菜品种‘六合黄心芹’ *A. graveolens* ‘Liuhe Huangxinqin’; 2: 芹菜品种‘津南实芹’ *A. graveolens* ‘Jinnan Shiqin’; 3: 芹菜品种‘文图拉’ *A. graveolens* ‘Ventura’.

图1 3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因 cDNA 的 PCR 扩增图谱
Fig. 1 PCR amplification pattern of cDNA of *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars of *Apium graveolens* Linn.

```

1 ATGGCTGGAAGTGGTGTATGCAGATATAATGAAGGTGATGTTTAAAGTACTACTCTGATGGAGAGTGAAGAATCTCTTCTGGGA
  M A G S G V Y A D I I E G D V F K Y Y S D G E W K K S S S G
91 AAATCTGTGGCATTATAATCTACTACCAGAATCACTAGTTTAAAGTCCAAGCTTGTACGCAAGAAGAGGTCAACAAGGCTATGGAA
  K S V A I I N P T T R M T Q F K V Q A C T Q E E V N K A M E
181 ACAGCGAAAAAAGTACAAAAACAGTGGGCAAAAACCTCCGCTCTGGAAGCGAGCAGAAGTCTTCCAAAAGCAGCTGCAATCTCAAAGAA
  T A K K V Q K Q W A K T P L W K R A E L L H K A A A I L K E
271 CACAAGGCAGCAATGCTGATTGCTTAGTGAAGAAATCGCAAAACCAGCAAGGACTCAGTTACAGAGGTAGTAAGATCTGGTGATCTG
  H K A A I A D C L V K E I A K P A K D S V T E V V R S G D L
361 GTGCTTATGCGCTGAAGAAGGAGTTCGGTACTAGGAGAAGGAAAGTCTTGGTGTCTGATAGTTTTCTCGAAATGAAAGGACCAAG
  V S Y C A E E G V R L L G E G K F L V S D S F P G N E R T K
451 TATTGCCTTACCTTAAAGATTCCACTTGGGGTATTTTAGCCATACCACCCTTCAACTATCCTGTCAATCTCGCTGTCTCCAAAATTTGGT
  Y C L T S K I P L G V I L A I P P F N Y P V N L A V S K I G
541 CCTGCACTCATTGAGGAAACGCTCTTGTCTGAAACCCCAACTCAGGGGGCTGTGGCTTGCCTGCATATGCTGCATTGCTTTCACTTG
  P A L I A G N A L V L K P P T Q G A V A C L H M V H C F H L
631 GCTGCTTCCAAAAGGCTGATCAGCTGATTACTGGCAAAGGATCAGAAATAGGAGATTTCCCTAACATGCACCCGGGTGTAACCTGT
  A G F P K G L I S C I T G K G S E I G D F L T M H P G V N C
721 ATAAAGCTTACAGGTGGTATACCGGCATTGCAATTTCAAAGAAAGCAGGATGGTCCCTCTACAGATGGAAGTGGGAGAAAGATGCG
  I S F T G G D T G I A I S K K A G M V P L Q M E L G G K D A
811 TGCATTGTGCTGAGGATGCTGATCTAGATTAGTAGCCTCAATGTTATCAAAGGAGGTTTTTCTTACAGTGGTCAAAGATGCCACAGCT
  C I V L E D A D L D L V A S N V I K G G F S Y S G Q R C T A
901 ATCAAGGTTATCTTGTGATGCAATCAGTTGTCGACACTCTAGTCGAGAAAGTGAATGCCAAAGTGGCGAAAGTGCAGTGTGCTCCACCT
  I K V I L V M Q S V V D T L V E K V N A K V A K L T V G P P
991 GAGGACAACCTCAGACATCACTCCGTTGCTCAGAAATCATGCAAACTTCATAGAAGGATTGGTCAAGGATGCTAAAGAGAAAGGAGCA
  E D N S D I T P V V S E S A N F I E G L V K D A K E K G A
1 081 ACATTTTGGCAGGAGTATAAGAGAGAAGGTAACCTTATATGGCCTCTGTTGTTAGATAACGTTAAGCCTGATATGAGGATAGCATGGGAG
  T F C Q E Y K R E G N L I W P L L D N V K P D M R I A W E
1 171 GAGCCTTTGGACCTATTTACCAGTTATCAGAAATCAACTGCTGCAAGAAGGAATCCACCATTGCAATGCTAGCAACTTTGGCTCCAG
  E P F G P I L P V I R I N S A E E G I H H C N A S N F G L Q
1 261 GCTTGTCTTCCACAGGACATCAACAAAGCAATGTTAATCAGTGATGCTATGGAGTCCGGAACGATTCAAATTAACCTCAGCTCCAGCT
  G C V F T R D I N K A M L I S D A M E S G T I Q I N S A P A
1 351 CGCGCTCCAGATCATTTCCATTCCAGGATTGAAAGACAGTGAATGGATCCAGGCCATCACAAACAGCATCAATATGATGACAAAG
  R G P D H F P F Q G L K D S G I G S Q G I T N S I N M M T K
1 441 ATTAAGACCACCTTATTAAGTTCCTTCCCTTCTTATACCATGGGCTAG
  I K T T V I N L P S P S Y T M G

```

图 2 芹菜品种‘六合黄心芹’*Agnp-G3PDH* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列
 Fig. 2 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *Agnp-G3PDH* gene from cultivar ‘Liuhe Huangxinjin’ of *Apium graveolens* Linn.

```

1 ATGGCTGGAAGTGGTGTATGCAGAGATAATGAAGGTGATGTTTCAAGTACTACTCTGAAGGAGAGTGAAGACATCTCTTCTGGG
  M A G S G V Y A E I I E G D V F K Y Y S E G E W K T S S S S G
91 AAATCTGTGGCATTATAATCCAACCTACCCGAAAGACTCAGTTTAAAGTCCAAGCTTGTACACAAGAAGAGGTCAACAAGGCTATGGGA
  K S V A I I N P T T R K T Q F K V Q A C T Q E E V N K A M E
181 ACAGCGAAAAAAGTACAAAAACAGTGGGCAAAAACCTCCGCTCTGGAAGCGAGCAGAAGTCTTCCAAAAGCAGCTGCAATCTCAAAGAA
  T A K K V Q K Q W A K T P L W K R A E L L H K A A A I L K E
271 CACAAGGCTGCAATGCTGATTGCTTTACTGAAGAAATGCAAAAACCAGCAAGGACTCAGTTACTGAGTTGTAAGATCTGGTGATCTG
  H K A A I A D C L V K E I A K P A K D S V T E V V R S G D L
361 GTGCTTATGCGCTGAAGAAGGAGTTCGGTACTAGGAGAAGGAAAGTCTTGGTGTCTGATAGTTTTCTCGAAAGTGAAGGACCAAG
  V S Y C A E E G V R L L G E G K F L V S D S F P G N E R T K
451 TATTGCCTTACCTTAAAGATTCCACTTGGGGTATTTTAGCCATACCACCCTTCAACTATCCTGTCAATCTCGCTGTCTCCAAAATTTGGC
  Y C L T S K I P L G V I L A I P P F N Y P V N L A V S K I G
541 CCTGCACTCATTGAGGAACTCCCTTGTCTGAAACCCCAACTCAGGGTGTCTGGCTTGCCTGCATTTGGTGCATTGCTTTCACTTG
  P A L I A G N S L V L K P P T Q G A V A C L H L V H C F H L
631 GCTGCTTCCAAAAGGCTTATCAGCTGATTACTGGCAAAGGATCAGAAATAGGAGATTTCCCTAACATGCACCCGGTATAAACTGT
  A G F P K G L I S C I T G K G S E I G D F L T M H P G I N C
721 ATAAAGCTTACAGGTGGTATACCGGCATTGCAATTTCAAAGAAAGCAGGATGGTCCCTCTACAGATGGAAGTGGGAGAAAGATGCA
  I S F T G G D T G I A I S K K A G M V P L Q M E L G G K D A
811 TGCATTGTGCTGAGGATGCTGATCTAGATTAGTAGCATCAATGTTATTAAGGAGGTTTTTCTTACAGTGGTCAAAGATGCCACTGCT
  C I V L E D A D L D L V A S N V I K G G F S Y S G Q R C T A
901 ATAAAAGTTATCTTACTTATGCAATCAGTAGCTGACACTCTAGTCGAGAAAGTAAATGCCAAAGTGGCGAAGCTGCAGTGTGCTCCACCT
  I K V I L V M Q S V A D T L V E K V N A K V A K L T V G P P
991 GAGGATAACTCGACATCACTCCTGTTTTCAGAAATCATCCGAAATTTTATAGAAGGATTACTAAAGGATGCTAAAGAGAAAGGCTGCA
  E D N S D I T P V V S E S A N F I E G L V K D A K E K G A
1 081 ACATTTTGGCAGGAGTACAAGAGAGAAGGTAACCTCATATGGCCTTCTGTTGTTAGATAATGTTAAGCCTGATATGAGGATAGCATGGGAA
  T F C Q E Y K R E G N L I W P L L D N V K P D M R I A W E
1 171 GAACTTTTGGACCTATTTACCAGTTATAGAAATCAACTGCTGCAAGAAGGAATCCACCATTGCAATGCTAGCAACTTTGGCTCCAG
  E P F G P I L P V I R I N S A E E G I H H C N A S N F G L Q
1 261 GCTTGTCTTCCACAGGACATCAACAAAGCAATGTTGATCAGTGATGCCATGGAGTCCGGAACAATTCAAATTAACCTCAGCTCCAGCT
  G C V F T R D I N K A M L I S D A M E S G T I Q I N S A P A
1 351 CGCGCTCCAGATCATTTCCATTCCAGGATTGAAAGACAGTGAATCGGATCACAGGCCATCACAAACAGCATCAATATGATGACGAAG
  R G P D H S P F Q G L K D S G I G S Q G I T N S I N M M T K
1 441 ATCAAGACCACCGTATTAAGTTCCTTCCCTTCTTATACCATGGGCTAG
  I K T T V I N L P S P S Y T M G

```

图 3 芹菜品种‘津南实芹’*Agnp-G3PDH* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列
 Fig. 3 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *Agnp-G3PDH* gene from cultivar ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn.

```

1  ATGCGTGAAGTGTGTGTATGCAGATATAATGAAGGTATGTTAAGTACTACTCTGTATGGAGAGTGAAGAATCTCTTCTGGA
M A G S G V Y A D I I E G D V F K Y Y S D G E W K K S S S G
91  AAATCTGTGCCATCATTAATCCTACTACCAGAATGACTCAGTTAAGGTCCAAAGCTTGTACGCAAGAAGAGGTCAACAAGGCTATGGAA
K S V A I I N P T T R M T Q F K V Q A C T Q E E V N K A M E
181 ACAGCGAAAAAAGTACAAAAACAGTGGGCAAAAACCTCCGCTCTGGAAGCGAGCAGGACTCCTTCACAAAGCAGCTGCAATCCTCAAAGAG
T A K K V Q K Q W A K T P L W K R A G L L H K A A A I L K E
271 CACAAGGCAGCAATGCTGATTGCTTACTGGAAGGAAATCGCAAAACAGGCAAGGACTCAGTTACAGAGGTAGTAAAGTCTGCTGATCTG
H K A A I A D C L V K E I A K P A K D S V T E V V R S G D L
361 GTGCTCTATTGCGCTTAAGAAGGAGTTCGGTACTAGGAGAAGGGAAGTCTTGGTCTCTGATAGTTTTCTGGAAATGAAAGGACCAAG
V S Y C A E - G V R L L G E G K F L V S D S F P G N E R T K
451 TATTGCTTACTCTAAGATTCCACTTGGGGTATTTTTAGCCATACCACCCTTCAACTATCCTGTCAATCTCGCGCTTCCAAAATTTGCT
Y C L T S K I P L G V I L A I P P F N Y P V N L A V S K I G
541 CCTGCACTCATTGCGAGAAACGCTCTTCTTCTGAAACCCCAACTCAGGGGGCTGTGGCTTGCCTGCATATGCTGCATTGCTTTCACCTT
P A L I A G N A L V L K P P T Q G A V A C L H M V H C F H L
631 GCTGGTTCCCAAAAGGCTGATCAGCTGATTACTGGCAAGGATCAGAATAGGAGATTTCTTAACAATGCACCGGGTGTAAACTGT
A G F P K G L I S C I T T G K G S E I G D F L T M H P G V N C
721 ATAAGCTTTACAGGTGATACCGGCAATGCAATTTCAAAGAAAGCAGGATGGTCCCTCTACAGATGGAAGTGGGAGAAAAGATGGC
I S F T G G D T G I A I S K K A G M V P L Q M E L G G K D A
811 TGCACTGTGCTTGAAGATGCTGATCTAGATTACTAGCGTCAATGTTATCAAAGGAGGTTTTTCTTACAGTGGTCAAAGATGCACAGCT
C T V L E D A D L D L V A S N V I K G G F S Y S G Q R C T A
901 ATCAAGTTATCTTGGTGTGATCAATCAGTTGCCGACACTCTAGTCGAGAAAGTGAATGCCAAAGTGGCGAAACTGACAGTTGCTCCACT
I K V I L V M Q S V A D T L V E K V N A K V A K L T V G P P
991 GAGGACAACTCAGACATCACTCCCGTCTCAGAATCATCTCGAAACTTCATAGAAGGATGGTCAAGGATGCCAAAGAGAAAGGAGCA
E D N S D I T P V V S E S S A N F I E G L V K D A K E K G A
1 081 ACATTTGCCAGGACTATAAGACAGAAGTAACTTATATGGCCTCTCTTGTAGATAACGTTAAGCCTGATATGAGGATAGCATGGGAG
T F C Q E Y K R E G N L I W P L L L D N V K P D M R I A W E
1 171 GAGCCATTTGACCTATTTTACCAGTTATCAGAATCAACTCTGCTGAAGAAGGAATCCACCATTGCAATGCTAGCAACTTTGGCCTCCAG
E P F G P I L P V I R I N S A E E G I H H C N A S N F G L Q
1 261 GGTGTGCTTACCAGGACATCAACAAAGCAATGTAATCAGTATGCTATGAGTGGGAAACGATTCAAATTAACCTCAGCTCCAGCT
G C V F T R D I N K A M L I S D A M E S G T I Q I N S A P A
1 351 CCGGTCACATCTTCCATCCAGGATTGAAGACAGTGAATTGGATCCGAGGGCATCAAAACGATCAATATGATGACAAAAG
R G P D H F P F Q G K D S G I G S Q G I T N S I N M M T K
1 441 ATTAAGACCACTGTATTAACCTGCTTCCCTTCTTATACCATGGCTAG
I K T T V I N L P S P S Y T M G

```

图4 芹菜品种‘文图拉’*Agnp-G3PDH* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *Agnp-G3PDH* gene from cultivar ‘Ventura’ of *Apium graveolens* Linn.

酸序列有4个氨基酸位点改变;而品种‘津南实芹’的 *Agnp-G3PDH* 基因序列与其他2个品种差异较大。

通过品种‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’*Agnp-G3PDH* 基因预测的3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 蛋白的理论相对分子质量分别为53 201.6、53 051.4和52 960.3,理论等电点分别为pI 7.49、pI 7.86和pI 8.12,酸性氨基酸(天冬氨酸+谷氨酸)与碱性氨基酸(赖氨酸+组氨酸+精氨酸)的比值分别为51/61、50/61和49/61,可见,在3个芹菜品种的 *Agnp-G3PDH* 蛋白中碱性氨基酸数量均大于酸性氨基酸数量。

对3个芹菜品种的预测 *Agnp-G3PDH* 蛋白的氨基酸序列进行亲水性/疏水性分析,结果见图5。结果显示:3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 蛋白的氨基酸序列的亲水性/疏水性基本一致,均具有亲水性与疏水性双重特性,均为疏水性蛋白。

2.2 芹菜 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列与其他植物的 np-G3PDH 氨基酸序列比对结果

对芹菜品种‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’的 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列进行多重比对,结果显示:3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编

码的氨基酸序列均具有高度的保守区域,同源性达99.09%。BLASTp分析结果显示(图6):品种‘六合黄心芹’*Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列属于ALDH-SF超家族,归为ALDHF11家族,是NAD(P)⁺依赖醛脱氢酶,具有多个NADP结合位点,属于多结构域蛋白序列。BLASTp分析结果还显示:3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn.)、毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)^[13]、黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)、葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)、可可(*Theobroma cacao* Linn.)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum* Linn.)、*Solanum lycopersicum* Linn.、二穗短柄草[*Brachypodium distachyum* (Linn.) Beauv.]、大豆[*Glycine max* (Linn.) Merr.]、节节麦(*Aegilops tauschii* Coss.)、乌拉尔图小麦(*Triticum urartu* Tum.)^[14]等种类的 np-G3PDH 氨基酸序列具有很高的相似度。

3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列与其他11种植物 np-G3PDH 氨基酸序列的多重比对结果(图7)显示:它们的氨基酸序列同源性达93.81%,表明 np-G3PDH 蛋白在进化上高度保守。

对3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基

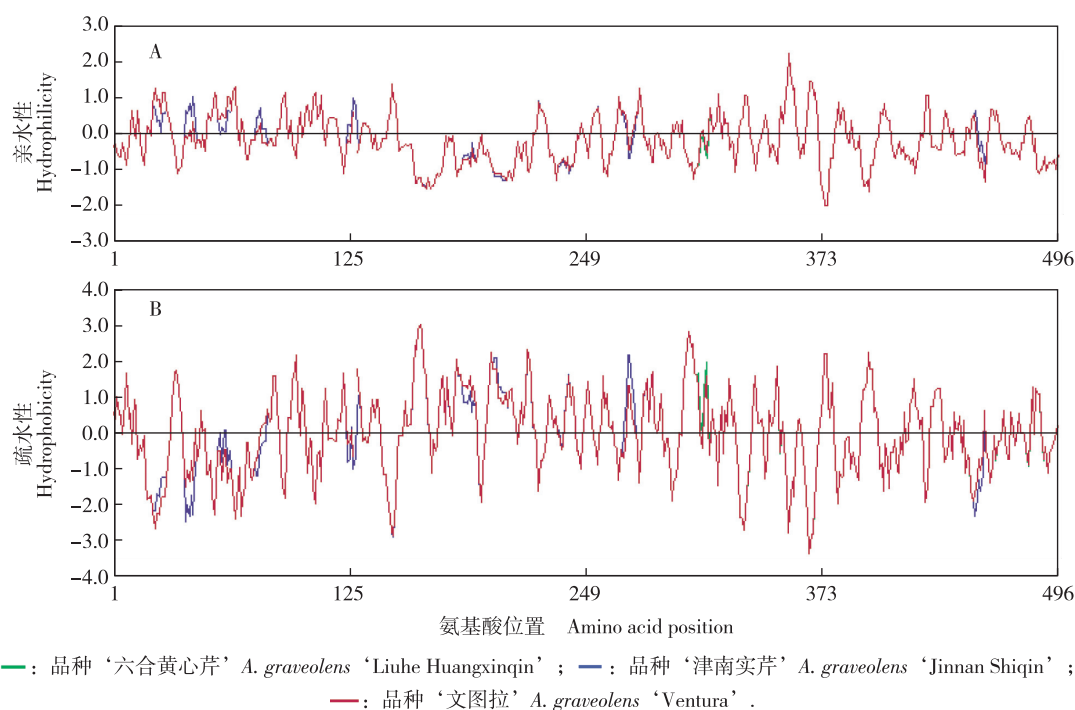


图 5 3 个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列的亲水性 (A) 和疏水性 (B) 比较

Fig. 5 Comparison of hydrophilicity (A) and hydrophobicity (B) of amino acid sequences encoded by *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars of *Apium graveolens* Linn.

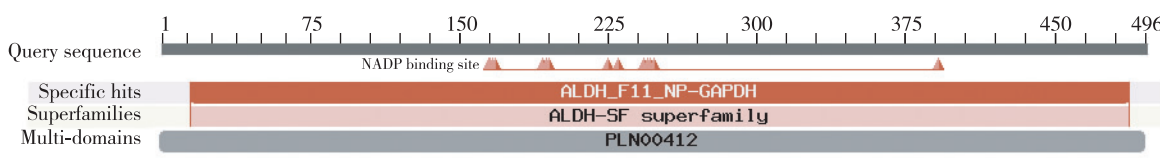


图 6 芹菜品种‘六合黄心芹’ *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列保守域预测

Fig. 6 Prediction of conserved domain of amino acid sequences encoded by *Agnp-G3PDH* gene from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinquin’

酸序列和其他 11 种植物的 np-G3PDH 氨基酸序列组成及理化性质进行分析,结果见表 1。分析结果显示:仅大豆 np-G3PDH 氨基酸序列的氨基酸残基数为 497,3 个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列和其他 10 种植物的 np-G3PDH 氨基酸序列的氨基酸残基数均为 496,且均不存在信号肽序列与剪切位点;理论相对分子质量为 52 000 ~ 54 000,理论等电点 pI 6 ~ pI 8;脂肪族氨基酸所占比例较高;芹菜品种‘津南实芹’ *Agnp-G3PDH* 基因编码的蛋白质与毛果杨 np-G3PDH 蛋白的总平均疏水性 (GRAVY) 分别为 -0.001 和 -0.015,其他植物 np-G3PDH 蛋白的总平均疏水性均为正值。

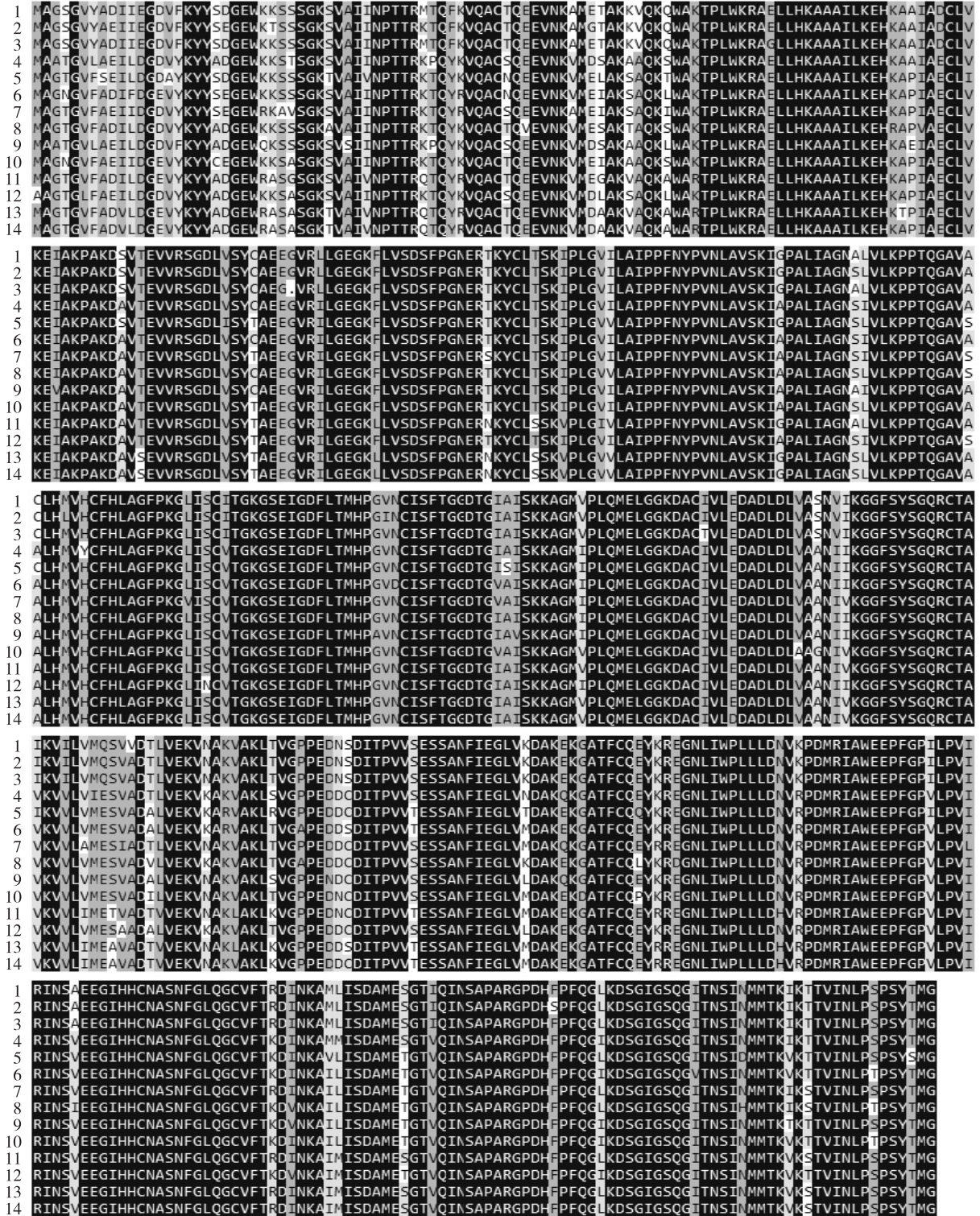
2.3 芹菜 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列同源进化分析

根据 BLASTp 检索结果,选取上述 11 种植物的

np-G3PDH 氨基酸序列与 3 个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列构建同源进化树,结果见图 8。分析结果显示:同属于禾本科 (Gramineae) 的节节麦、乌拉尔图小麦和二穗短柄草以及同属于豆科 (Leguminosae) 的大豆、鹰嘴豆以及蒺藜苜蓿均各自聚在同一分支中,表明属于同科的植物其 np-G3PDH 氨基酸序列的进化关系较近;而 3 个芹菜品种也聚在同一分支中,表明 3 个芹菜品种的 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列的进化关系较近,并且与属于杨柳科 (Salicaceae) 的毛果杨的 np-G3PDH 氨基酸序列的进化关系也较近。

2.4 芹菜 *Agnp-G3PDH* 基因的表达特性分析

2.4.1 在不同组织中表达量的差异 实时定量 PCR 检测结果显示 (图 9):芹菜 *Agnp-G3PDH* 基因在品种‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’根、茎、叶和



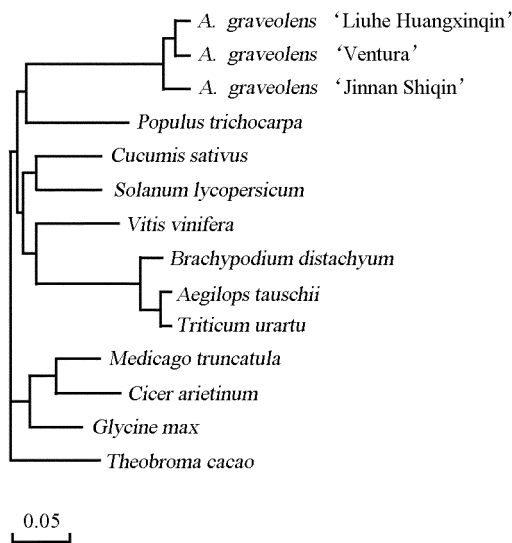
1. 品种‘津南实芹’ *A. graveolens* ‘Jinnan Shiqin’; 2. 品种‘六合黄心芹’ *A. graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’; 3. 品种‘文图拉’ *A. graveolens* ‘Ventura’; 4. 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.; 5. 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray; 6. 黄瓜 *Cucumis sativus* Linn.; 7. 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; 8. 可可 *Theobroma cacao* Linn.; 9. 鹰嘴豆 *Cicer arietinum* Linn.; 10. *Solanum lycopersicum* Linn.; 11. 二穗短柄草 *Brachypodium distachyum* (Linn.) Beauv.; 12. 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.; 13. 节节麦 *Aegilops tauschii* Coss.; 14. 乌拉尔图小麦 *Triticum urartu* Tum.

图 7 3 个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 *np-G3PDH* 氨基酸序列的多重比对结果
 Fig. 7 Alignment result of amino acid sequences encoded by *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars of *Apium graveolens* Linn. with amino acid sequences of *np-G3PDH* from other species

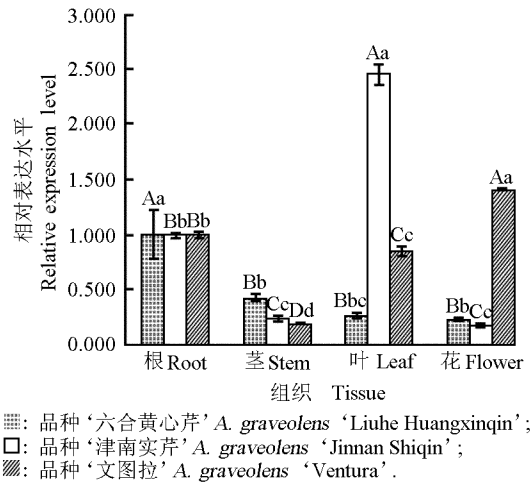
表1 3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的蛋白质与其他植物 np-G3PDH 蛋白的氨基酸组成及理化性质Table 1 Amino acid composition and physicochemical property of proteins encoded by *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars of *Apium graveolens* Linn. and np-G3PDH protein from other species

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	登录号 Accession No.	氨基酸 残基数 Number of amino acid residue	理论相对 分子质量 Theoretical relative molecular mass	理论等电点 Theoretical isoelectric point	比例/% Percentage			总平均疏水性 Grand average of hydrophobicity
					酸性氨基酸 Acidic amino acids	碱性氨基酸 Basic amino acids	脂肪族氨基酸 Aliphatic amino acids	
1		496	53 051.4	7.86	10	12	92.42	-0.001
2		496	53 201.6	7.49	10	12	92.02	0.011
3		496	52 960.3	8.12	10	12	91.03	0.009
4	XP_003610350	496	53 029.4	7.05	10	12	93.41	0.039
5	XP_002308391	496	53 269.6	7.08	11	13	92.00	-0.015
6	XP_004168601	496	53 224.6	6.53	11	12	93.19	0.036
7	XP_002279374	496	53 174.5	6.76	10	12	93.59	0.037
8	EOY29581	496	53 043.5	7.87	10	13	94.56	0.064
9	XP_004507722	496	52 939.3	6.53	10	12	94.58	0.060
10	XP_004242576	496	53 115.5	6.76	10	12	93.19	0.041
11	XP_00357454	496	53 060.3	6.57	10	12	92.98	0.033
12	XP_003549550	497	53 159.6	6.76	11	12	94.00	0.041
13	EMT24014	496	53 047.2	6.39	11	12	92.78	0.029
14	EMS58577	496	53 005.2	6.39	11	12	92.78	0.041

1) 1. 品种‘津南实芹’ *A. graveolens* ‘Jinnan Shiqin’; 2. 品种‘六合黄心芹’ *A. graveolens* ‘Liuhe Huangxinquin’; 3. 品种‘文图拉’ *A. graveolens* ‘Ventura’; 4. 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.; 5. 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray; 6. 黄瓜 *Cucumis sativus* Linn.; 7. 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; 8. 可可 *Theobroma cacao* Linn.; 9. 鹰嘴豆 *Cicer arietinum* Linn.; 10. *Solanum lycopersicum* Linn.; 11. 二穗短柄草 *Brachypodium distachyum* (Linn.) Beauv.; 12. 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.; 13. 节节麦 *Aegilops tauschii* Coss.; 14. 乌拉尔图小麦 *Triticum urartu* Tum.

图8 3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 np-G3PDH 氨基酸序列的系统进化树Fig. 8 Phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by *Agnp-G3PDH* gene from three cultivars of *Apium graveolens* Linn. and amino acid sequences of np-G3PDH from other species

花中的表达量差异较大。品种‘六合黄心芹’不同组织中 *Agnp-G3PDH* 基因相对表达水平由高到低依次为根、茎、叶、花;其中,在根中的相对表达水平极显著高于茎、叶和花;在叶与花间的相对表达水平也有显



图中不同的大写和小写字母分别表示同一品种不同组织间差异极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$)。The different capitals and small letters in the figure indicate the extremely significant ($P < 0.01$) and significant ($P < 0.05$) differences among different tissues of the same cultivar, respectively.

图9 3个芹菜品种不同组织中 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平
Fig. 9 Relative expression level of *Agnp-G3PDH* gene in different tissues of three cultivars of *Apium graveolens* Linn.

著差异。品种‘津南实芹’不同组织中 *Agnp-G3PDH* 基因相对表达水平由高到低依次为叶、根、茎、花;其中,在茎和花间的相对表达水平无显著差异,在其他组织间的相对表达水平有极显著差异。品种‘文图

拉’不同组织中 *Agnp-G3PDH* 基因相对表达水平由高到低依次为花、根、叶、茎,且在各组织中的相对表达水平均有极显著差异。

2.4.2 经不同胁迫处理后表达量的差异 经高温(38 ℃)、低温(4 ℃)、盐(0.2 mol · L⁻¹ NaCl)和干旱(20% PEG)胁迫处理后3个芹菜品种叶片中 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平见表2。由表2可见:经不同胁迫处理后3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因的表达量有明显差异。经高温和低温处理后品种‘六合黄心芹’叶片中 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平均极显著高于对照,但经盐胁迫处理后其相对表达水平

与对照差异不显著,而经干旱胁迫处理后其相对表达水平极显著低于对照。

经高温胁迫和干旱胁迫处理后品种‘津南实芹’叶片中 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平极显著高于对照,经盐胁迫处理后其相对表达水平显著高于对照,而经低温胁迫处理后其相对表达水平极显著低于对照。

经盐胁迫处理后品种‘文图拉’叶片中 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平与对照差异不显著,但经高温、低温及干旱胁迫处理后其相对表达水平均极显著低于对照。

表2 经不同胁迫处理后3个芹菜品种叶片中 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平比较($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 2 Comparison of relative expression level of *Agnp-G3PDH* gene in leaf of three cultivars of *Apium graveolens* Linn. after treated by different stress treatments ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

胁迫处理 Stress treatment	3个品种 <i>Agnp-G3PDH</i> 基因的相对表达水平 Relative expression level of <i>Agnp-G3PDH</i> gene from three cultivars		
	六合黄心芹 Liuhe Huangxinqin	津南实芹 Jinnan Shiqin	文图拉 Ventura
对照 CK	1.005 0±0.038 6Cc	1.000 1±0.013 9Cd	1.000 6±0.042 6Aa
高温 High temperature (38 ℃)	1.125 2±0.023 4Bb	3.419 7±0.134 1Bb	0.810 7±0.027 5Bb
低温 Low temperature (4 ℃)	1.367 6±0.093 8Aa	0.098 6±0.010 0De	0.379 1±0.013 1Cc
盐 Salinity (0.2 mol · L ⁻¹ NaCl)	1.062 6±0.045 3BCbc	1.199 1±0.078 1Cc	1.047 8±0.038 1Aa
干旱 Drought (20% PEG)	0.009 6±0.001 7Dd	6.637 8±0.292 7Aa	0.049 1±0.002 6Dd

¹⁾ 同列中不同的大写和小写字母分别表示差异极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$)。Different capitals and small letters in the same column indicate the extremely significant ($P < 0.01$) and significant ($P < 0.05$) differences, respectively.

3 讨 论

研究表明:从芹菜品种‘六合黄心芹’、‘津南实芹’和‘文图拉’中分离得到的 *Agnp-G3PDH* 基因序列具有高度同源性,在芹菜中该基因进化非常保守,大部分基因位点突变属于同义突变。品种‘六合黄心芹’和‘文图拉’的 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列同源性更高,表明供试3个芹菜品种中品种‘六合黄心芹’与‘文图拉’进化关系更为接近。3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列与蒺藜苜蓿和毛果杨等其他11种植物的 np-G3PDH 氨基酸序列的同源性为93.81%,且3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因编码的氨基酸序列与毛果杨的进化关系较近,葡萄科(Vitaceae)的葡萄与禾本科植物的进化关系较近,而属于葫芦科(Cucurbitaceae)的黄瓜与属于茄科(Solanaceae)的 *Solanum lycopersicum* 聚在同一个分支,表明 np-G3PDH 氨基酸序列的进化也是非常

保守的,这可能与 np-G3PDH 参与糖酵解等能量代谢途径并生成光呼吸及甘露醇等生物合成过程所必需的还原剂 NADPH 的重要功能有关^[15-16]。

供试3个芹菜品种中 *Agnp-G3PDH* 基因的表达差异较大,表现出明显的组织特异性,这可能与品种差异有关。经不同胁迫处理后3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平也有明显差异,其中,品种‘文图拉’*Agnp-G3PDH* 基因的表达对胁迫处理的响应与另2个芹菜品种明显不同。在不同胁迫处理后品种‘文图拉’*Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平与对照差异不显著或极显著低于对照,而品种‘六合黄心芹’在高温和低温胁迫处理后以及品种‘津南实芹’在高温和干旱胁迫处理后 *Agnp-G3PDH* 基因的相对表达水平均极显著高于对照。

Gao 等^[17]的研究结果表明:np-G3PDH 的代谢与甘露糖-6-磷酸还原酶的表达水平有紧密联系,并且甘露醇合成的 NADPH 供给受 np-G3PDH 的严格控制。甘露醇参与植物体的抗逆代谢机制响应,如抗盐

胁迫^[18]、抗干旱胁迫、抗低温胁迫^[19]和抗氧化胁迫^[20]等,同时在调节植物生长发育及果实成熟等方面也具有重要作用^[21]。推测 np-G3PDH 通过影响甘露醇代谢进而在植物体的生长发育及抗逆代谢机制中发挥作用。

参考文献:

- [1] 卢倩, 弭晓菊, 崔继哲. 植物甘油醛-3-磷酸脱氢酶作用机制的研究进展[J]. 生物技术通报, 2013(8): 1-6.
- [2] 马凌波, 张凤英. 条斑紫菜细胞质甘油醛-3-磷酸脱氢酶的cDNA克隆和序列分析[J]. 海洋渔业, 2004, 26(4): 300-305.
- [3] MARTIN W, BRINKMANN H, SAVONNA C, et al. Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes; eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(18): 8692-8696.
- [4] VALVERDE F, ORTEGA J M, LOSADA M, et al. Sugar-mediated transcriptional regulation of the Gap gene system and concerted photosystem II functional modulation in the microalga *Scenedesmus vacuolatus*[J]. Planta, 2005, 221(6): 937-952.
- [5] HABENICHT A, HELLMAN U, CERFF R. Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH [J]. Journal of Molecular Biology, 1994, 237(1): 165-171.
- [6] IGLESIAS A A, LOSADA M. Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988, 260(2): 830-840.
- [7] IDDAR A, VALVERDE F, SERRANO A, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant nonphosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*[J]. Protein Expression and Purification, 2002, 25(3): 519-526.
- [8] BUSTOS D M, IGLESIAS A A. Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is post-translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. FEBS Letters, 2002, 530(1): 169-173.
- [9] PIATTONI C V, RIUS S P, GOMEZ-CASATI D F, et al. Heterologous expression of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochimie, 2010, 92(7): 909-913.
- [10] HABENICHT A, QUESADA A, CERFF R. Sequence of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana plumbaginifolia* and phylogenetic origin of the gene family [J]. Gene, 1997, 198(1/2): 237-243.
- [11] 李梦瑶, 王枫, 侯喜林, 等. 2个芹菜品种泛变应原 *Api g 4* 基因的克隆与分析[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(1): 1-7.
- [12] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [13] TUSKAN G A, DIFAZIO S, JANSSON S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. Science, 2006, 313(5793): 1596-1604.
- [14] LING H Q, ZHAO S C, LIU D C, et al. Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu* [J]. Nature, 2013, 496(7443): 87-90.
- [15] SCAGLIARINI S, TROST P, VALENTI V, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate: NADP⁺ reductase of spinach leaves steady state kinetics and effect of inhibitors [J]. Plant Physiology, 1990, 94(3): 1337-1344.
- [16] TROST P, PUPILLO P. Inhibition of spinach D-glyceraldehyde 3-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase (nonphosphorylating) by adenylate compounds; the effect of dead-end inhibitors on a steady state random reaction mechanism [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993, 306(1): 76-82.
- [17] GAO Z F, LOESCHER W H. NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves [J]. Plant Physiology, 2000, 124(1): 321-330.
- [18] 王慧中, 刘俊君, 卢德赵, 等. 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因转化水稻的研究[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 6-10.
- [19] CALMES B, GUILLEMETTE T, TEYSSIER L, et al. Role of mannitol metabolism in the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 1-18.
- [20] VÉLÉZ H, GLASSBROOK N J, DAUB M E. Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(4): 258-268.
- [21] STOOPE J M H, WILLIAMSON J D, MASON PHARR D. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress [J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(5): 139-144.

(责任编辑: 张明霞)