

猕猴桃果实 L-半乳糖内酯脱氢酶和脱氢抗坏血酸还原酶 cDNA 片段的克隆与序列分析

牛歆雨¹,雷玉山²,梁东¹,马锋旺¹,王西锐²

(1 西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100;2 陕西省中华猕猴桃科技开发公司,陕西 西安 710054)

[摘要] 克隆猕猴桃果实 L-半乳糖内酯脱氢酶(*GalLDH*)和脱氢抗坏血酸还原酶(*DHAR*)基因,可为揭示猕猴桃高抗坏血酸(AsA)含量的分子机制奠定基础。研究以猕猴桃果实为材料提取总 RNA,采用 RT-PCR 法,克隆出 *L-GalLDH* 基因的 cDNA 片段 857 bp 和 *DHAR* 基因的 cDNA 片段 594 bp 并测序,根据测序结果推测其氨基酸序列,并与刺梨、拟南芥、花椰菜、甘薯和草莓等植物的 *GalLDH* 基因和 *DHAR* 基因氨基酸序列进行亲缘分析。结果表明,猕猴桃 *GalLDH* 基因氨基酸序列和核苷酸序列与刺梨的相似性高达 88%,其在同源基因进化关系树中单独聚为一类;*DHAR* 基因氨基酸序列和核苷酸序列与苹果的相似性高达 98%和 99%,两者在进化关系上聚为一类。可知克隆到的 2 个核苷酸片段确为猕猴桃 *L-GalLDH* 和 *DHAR* 基因 cDNA 片段,同源基因植物亲缘关系聚类与传统的形态分类有一定的差异。

[关键词] 猕猴桃;L-半乳糖内酯脱氢酶(*GalLDH*);脱氢抗坏血酸还原酶(*DHAR*);维生素 C;基因克隆

[中图分类号] S663.401; Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0057-06

Cloning and sequence analysis of cDNA fragments of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and dehydroascorbate reductase from fruit of *Actinidia deliciosa*

NIU Xin-yu¹, LEI Yu-shan², LIANG Dong¹, MA Feng-wang¹, WANG Xi-rui²

(1 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Province Zhonghua Kiwifruit Science and Technology Development Company, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

Abstract: In order to research the molecular mechanism of Vc accumulation, 857 bp and 594 bp cDNA encoding L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase(*GalLDH*) and dehydroascorbate reductase(*DHAR*) fragment were cloned from fruit of *Actinidia deliciosa* by the method of RT-PCR, and then translated into amino acid sequences. In GenBank compared with *Rosa roxburghii* Tratt, *Arabidopsis thaliana*, *Ipomoea batatas*. et. homologous genes plants, the nucleotide sequence and the amino acid sequence of *GalLDH* gene showed 88% of identity with those of *Rosa roxburghii* Tratt. The nucleotide sequence and the amino acid sequence of *DHAR* gene showed 98% and 99% of identity with those apples, respectively, and they both were classified the same family. These results suggest that the both cDNA fragments are from *DHAR* and *GalLDH* gene of *Actinidia deliciosa*.

Key words: kiwifruit; L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (*GalLDH*); dehydroascorbate reductase

* [收稿日期] 2006-12-06

[基金项目] 陕西省重大科技专项计划项目(2006kz05-G4);西北农林科技大学“拔尖人才支持计划”项目

[作者简介] 牛歆雨(1974-),男,陕西长安人,在读硕士,主要从事果树生物技术研究。

[通讯作者] 马锋旺(1964-),男,山东汶上人,教授,博士,博士生导师,主要从事果树抗性生理与生物技术改良研究。

Email: fwm64@sina.com

维生素 C 又叫抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA), 是植物和大多数动物体内合成的一类高丰度己糖内酯化合物^[1]。由于人类缺乏其合成关键酶而只能从食物中获取, 因此 AsA 含量已成为衡量农产品品质的重要指标。研究表明, 高等植物主要以 Smirnoff-Wheeler 提出的 L-半乳糖途径合成 AsA^[2-3]。该途径中, L-半乳糖内酯脱氢酶 (GalLDH) 直接氧化半乳糖内酯形成 AsA, 起着关键酶的作用。植物中的 AsA 还在抗氧化和清除自由基、光合作用和光保护、细胞生长和分裂、某些次生代谢物和乙烯的合成等诸多方面具有非常重要的生理功能^[4]。AsA 作为一种重要的抗氧化剂, 在植物细胞的酶促和非酶促反应中发挥着重要作用。为了维持抗坏血酸的抗氧化活力, 其再生就显得尤为重要。在抵抗氧化胁迫的反应中, 抗坏血酸自身被氧化为单脱氢抗坏血酸, 一部分单脱氢抗坏血酸在单脱氢抗坏血酸还原酶的催化作用下还原为抗坏血酸, 另一部分单脱氢抗坏血酸在歧化作用下被不成比例地还原为抗坏血酸或氧化为脱氢抗坏血酸。脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 以谷胱甘肽为底物, 催化脱氢抗坏血酸还原为抗坏血酸, 在循环利用抗坏血酸、保护细胞组分抵御氧化损伤中发挥重要作用^[5-6]。

猕猴桃 (*Actinidia Lindl.*) 是 20 世纪野生果树人工驯化栽培最有成就的四大果树树种之一^[7]。由于其风味独特、营养丰富、Vc 含量高、经济价值高、医疗效果好而备受关注。猕猴桃较高的 Vc 含量预示其可能存在特殊的合成和再生机制。从已登陆 GenBank 的生物来看, 到目前为止, GalLDH 基因和 DHAR 基因已从刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt)、苹果 (*Malus × domestica*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、甘薯 (*Ipomoea batatas*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 等植物中得到克隆和鉴定, 但在猕猴桃上还未见报道。有关 GalLDH 和 DHAR 基因表达与 Vc 积累量已有不少研究, 安华明等^[8-9] 研究了 GalLDH 基因在刺梨不同器官的表达量, 并指出在刺梨果实 AsA 的积累过程中, DHAR 不是一个关键的酶。有关影响 GalLDH 和 DHAR 酶活性的研究, Arrigoni 等^[10] 认为石蒜碱抑制 GalLDH 活性, 而 Ostergaard 等^[11] 并未得出同样的结论。从已知的研究来看, 在猕猴桃上还没有克隆出这 2 个酶基

因的报道, 而猕猴桃富含 Vc, 可能有不同的合成和再生机制, 只有从合成和再生 2 个酶基因共同着手研究, 才能更好地阐明 Vc 积累的分子机制。本研究从美味猕猴桃果实中克隆 GalLDH 和 DHAR 基因, 以期探讨其与其他植物同源基因的相似性, 为揭示猕猴桃高 AsA 含量的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为西北农林科技大学园艺场美味猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*) 品种秦美的果实。7 月下旬采取果实样品, 并用液氮速冻后存于 -70 °C 冰箱, 用于 RNA 的分离与提取。

1.2 猕猴桃果实中 RNA 的提取与质量检测

猕猴桃果实 RNA 提取参照文献^[12]的方法, 取 1.5 g 果肉于液氮中研磨成粉末, 加入 6 mL 提取缓冲液 (500 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 60 g/L SDS) 充分混匀后, 于 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 用 V(酚): V(氯仿): V(异戊醇)=25: 24: 1、V(氯仿): V(异戊醇)=24: 1 的混合液分别抽提 2 次, 上清液用等体积 4 mol/L LiCl 于 4 °C 沉淀过夜, 然后于 4 °C 离心 20 min, 沉淀溶于 DEPC 中, 再用 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.2) 于 -20 °C 沉淀 3 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 最后沉淀溶于 DEPC 中, 贮藏于 -70 °C 冰箱中备用。取 2 μL 提取物经 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测其质量后, 用于 RT-PCR。

1.3 猕猴桃果实 RNA 的 RT-PCR

1.3.1 GalLDH 基因中间片段的获得 根据 GenBank 中登录的刺梨、拟南芥、花椰菜、甘薯和草莓等植物的 GalLDH 基因保守序列设计引物 S: 5'-ATT-TAGCTCGCTGTGGCCTCG-3' 和引物 A: 5'-CT-CAATCTTGGCCAGTGTTTC-3', 用引物 oligT18 按 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (MBI) 说明进行反转录反应, 其中 42 °C 下的反应延长至 40 min。然后以反转录液为模板用引物 S 和引物 A 进行 PCR 反应, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 循环 38 次; 最后 72 °C 延伸 7 min。

1.3.2 DHAR 基因中间片段的获得 根据 GenBank 中登录的苹果、番茄、土豆、烟草等植物的 DHAR 基因保守序列设计 2 对巢式引物: MI1 和 MI4 为外侧引物对, MI2 和 MI3 为内侧引物对。

MI1: 5'-TTC ATC TTC CAC ACT CTC TAC CCC-3'; MI2: 5'-CTA ATG GCT CTC GAG GTC GCT GCT G-3'; MI3: 5'-AGG AGC GGT CTT CAC GAA GG-3'; MI4: 5'-GCT TCC ACA ACT GAC ATG CA-3'.

1.3.3 cDNA 第一链的合成 将 RNA 于 70 °C 水浴 5 min 打开其二级结构,立即插入冰中依次加入 100 μg RNA, 4 μL 5 × M-MLV Buffer, 0.5 μL RNasin(40 U/μL), 2 μL dNTP(10 mmol/L), 4 μL Mg²⁺ (25 mmol/L), 2.5 μL 六碱基随机引物(0.2 μg/μL), 1 μL M-MLV (200 U/μL), 用 DEPC 水补齐至 20 μL 体系。轻轻搅拌混匀后,轻甩至管底。30 °C 孵育 10 min, 42 °C 孵育 15 min, 95 °C 孵育 5 min 后于 4 °C 或 -20 °C 存放。

1.3.4 PCR 扩增 (1)一次 PCR。冰上依次加入 2 μL 反转录产物, 10 μL 10 × Taq Buffer, 2 μL dNTP(10 mmol/L), 10 μL Mg²⁺ (25 mmol/L), 2.5 μL MI1 (20 μmol/L), 2.5 μL MI4 (20 μmol/L), 0.2 μL Taq (5 U/μL), 用灭菌双蒸水补齐至 100 μL 体系。轻轻搅拌混匀后,轻甩至管底。扩增程序为: 94 °C 4 min ; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 35 次; 72 °C 7 min; 4 °C 存放。将 RT-PCR 产物在 3~5 V/cm 电压下,经 10~20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/mL 的溴化乙锭) 30 min 左右,通过凝胶成像系统观察和记录结果。(2)二次 PCR。冰上依次加入 1.5 μL 一次 PCR 产物, 2.5 μL 10 × Taq Buffer, 1 μL dNTP(10 mmol/L), 2 μL Mg²⁺ (25 mmol/L), 1 μL MI2 (20 μmol/L), 1 μL MI3 (20 μmol/L), 0.2 μL Taq (5 U/μL), 用灭菌双蒸水补齐至 25 μL 体系。轻轻搅拌混匀后,轻甩至管底。扩增程序为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 56.5 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 35 次; 72 °C 7 min; 4 °C 存放。琼脂糖凝胶电泳观察和记录 PCR

结果。将得到的 857 和 594 bp 两个 cDNA 片段用 PCR Fragment Recovery Kit Ver. 2.0 (TaKaRa) 回收,克隆到 pMD18-T 载体(上海生工)上,然后转化大肠杆菌 DH5α 菌株,并涂布在含有 50 mg/mL Amp(氨苄)、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上,挑选白色菌落,用 PCR 和酶切检测确定带有目的片断的菌落。序列测定由上海捷瑞生物工程有限公司完成,用 BLASTN、DNASTAR 及 DNATOOLS 等软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃 *GalLDH* 和 *DHAR* 基因的 RT-PCR 扩增

RNA 质量对反转录反应的影响很大。从图 1 可以看出,用文献[8]的方法提取的 RNA,其 28 S 和 18 S 两条带较亮,且 28 S 亮度约为 18 S 的 2 倍,这表明 RNA 质量较好。

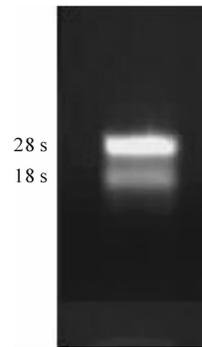


图 1 猕猴桃果实的总 RNA

Fig. 1 Total RNA from fruit of *Actinidia deliciosa*

取约 100 μg RNA 进行 RT-PCR 反应,扩增产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,在约 800 和 600 bp 处获得特异条带,其大小与预期的一致(见图 2 和图 3)。

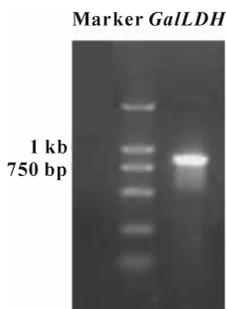


图 2 猕猴桃果实 *GalLDH* 基因的 RT-PCR 扩增
Fig. 2 RT-PCR product of *GalLDH* from fruit of *A. deliciosa* cv. Qinmei

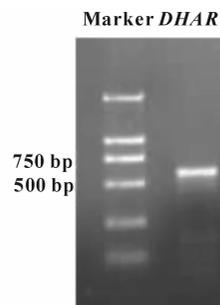


图 3 猕猴桃果实 *DHAR* 基因的 RT-PCR 扩增
Fig. 3 RT-PCR product of *DHAR* from fruit of *A. deliciosa* cv. Qinmei

2.2 PCR 产物的克隆、酶切鉴定和 PCR 分析

将回收的目的片段克隆到 TaKaRa pMD 18-T Vector 上,从筛选到的阳性克隆中提取质粒 DNA,对其进行 *Sal* I、*Eco*R I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定。电泳检测表明,PCR 扩增所对应的阳性克隆产生了 600 bp 和 800 bp 左右的明亮条带(如图 4),这进一步说明 PCR 扩增产物是正确的。

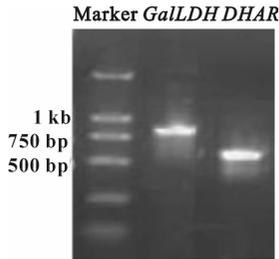


图 4 重组质粒 PCR 的鉴定

Fig. 4 Recombinant plasmid characterized by PCR

2.3 猕猴桃 *GalLDH* 和 *DHAR* cDNA 及其氨基酸的序列分析

将 2 个酶基因目的片段回收后克隆于 pMD-

T18 载体并测序,获得 857 和 594 bp 序列,分别命名为 MHT-*GalLDH* 和 MHT-*DHAR*,其碱基序列如图 5 和图 6 所示。通过与 GenBank 中登录的同源基因进行相似性比较表明,猕猴桃 *GalLDH* 基因的碱基序列与刺梨的相似性最高,达 88%,与拟南芥、甜瓜、番茄、花椰菜、甘薯等的相似性也均在 80% 以上;猕猴桃 *GalLDH* 基因氨基酸序列与刺梨的相似性高达 88%,其次是草莓(83%)、拟南芥和厚皮甜瓜(均为 81%)、花椰菜和甘薯(均为 80%),而与番茄和烟草(75%)相距较远。从图 7 可以看出,甘薯、番茄、烟草聚为一类,猕猴桃单独聚为一类。猕猴桃 *DHAR* 基因的碱基序列与苹果的相似性最高,达 99%,与烟草、番茄、土豆的相似性均在 78% 以上;猕猴桃 *DHAR* 基因的氨基酸序列与苹果相似性高达 98%,与烟草、土豆、番茄的相似性均为 75%,相距较远。从植物 *DHAR* 基因氨基酸序列系统树(图 8)可以看出,猕猴桃和苹果在进化上亲缘关系较近且聚为一类,这与传统的形态分类有巨大差异。

```

ATTTAGCTCG CTGTGGCCTC GGTGGCCTTG GAGTGGTTGC TGAAGTCACC ATCCAATGTG TTGATAGACA          70
GGAGCTTGTG GAGCACACTA CTGTTTCAAC CATGGCAGAG ATCAAGAAAA ATCATAAGAA ATTGCTATCC          140
GAGAATAGAC ATGTGAAGTA CCTTTACATT CCATATACCG ACACTGTTGT GGTTGTGAAA TGTAACCCTG          210
TATCAAAATG GAAAGGTCCC CCGAAGTTC CACCCAAATA TAGCAGTAAT GAAGCCATAC AGCACGTTCC          280
AGATCTCTAC AGGGAATGCC TCCAGAAATA CAGGGTAGTT CCAGATAAGA GTGAAGTAGA CATGAATGAG          350
CTCTCATTTA CTGAGTTAAG AGATAAACTA CTCGCCTAG ATCCTCTCGA CAAAGATCAC GTTGCAAAGG          420
TTAACCAAGC TGAGGCTGAG TTCTGGAAGA AGTCGGAGGG GTACAGAGTG GGATGGAGTG ATGAAATTTT          490
GGGCTTCGAT TGTGGTGGTC AACAGTGGGT CTCAGAGACT TGTTTTCCAG CAGGAACCCT AGCCAAACCA          560
AGCATGAAAG ACCTTGAATA CATAGAAGGT GTAAAGCAGC TCATCGAGAA GAATGAGATA CCTGCACCTG          630
CTCCAATAGA GCAGCGCTGG ACCGCCTGCA CTAAGAGCCC CATGAGTCCA GCTTCAAGCA CAAGAGAGGA          700
TGATATATTT TCATGGGTTG GTATAATCGT GTACCTTCTT ACAACAGATC CCCGTCAAAG AAAGGAAATT          770
ACAGAAGAGT TTTTCACTA CAGGCGACTG ACCCAAACAC AATTGTGGGA TAAGTATCC CCGTATGAAC          840
ACTGGGCCAA GATTGAG
    
```

图 5 猕猴桃 *GalLDH* cDNA 的核苷酸序列

Fig. 5 Nucleotide sequence of MHT-*GalLDH* cDNA

```

CTAATGGCTC TCGAGGTGCG TGCCAAGGCC GCTGCCGGCG CACCTGATCT CCTCGGCGAC          60
TGCCCTTTCT GCCAAAGGGT TACTCTAACC TTGGAGGAGA AGAAAGTACC CTACAAGCTG          120
CACCTCATCA ATCTCAGCGA CAAACCCAAA TGGTTTACGG AAGTGAATCC AGAGGGGAAA          180
GTGCCTGTGG TGAAGTTTGA TGAATAATGG GTGCCTGATT CCGATGTGAT TGTTGGGATC          240
ATTGAGGAAA AATACCCTGA GCCTTCTCTC AAAACCCCTC CTGAATCTGC TTCTGTGGGA          300
TCAAAGATAT TGGGATCATT TGTGACATTT CTGAAGAGCA AGGATCCCGG TGACGGATCA          360
GAACAGGCTT TGCTTACCGA ACTGAAGGCA TTAGATGAGC ATCTTAAGGC ACATGGTCCA          420
TACATTGCTG GGGAGAAGGT CACTGCTGCG GATCTAAGCT TGGCACAAA ACTGTACCAT          480
CTCAAGGTGG CTCTCGGCCA TTTCAAGAAG TGGACGGTTC CAGCAGATTT GCGCCATTAT          540
CATAAGTACA CCGAGCTGCT TTTCTCAAGG GAATCCTTCG TGAAGACCGC TCCT          594
    
```

图 6 猕猴桃 *DHAR* cDNA 的核苷酸序列

Fig. 6 Nucleotide sequence of MHT-*DHAR* cDNA

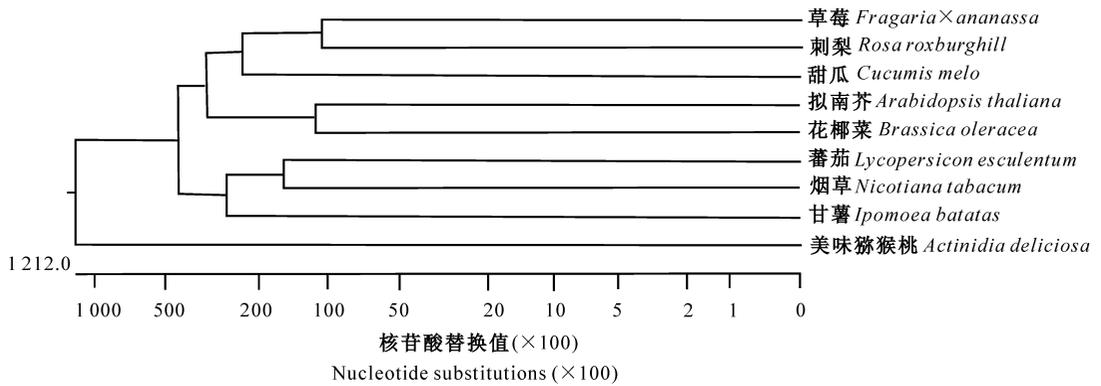


图 7 植物 *GalLDH* 基因氨基酸序列系统树分析

Fig. 7 Phylogenetic trees of the deduced amino acid sequences of plant *GalLDH* by Dnastar

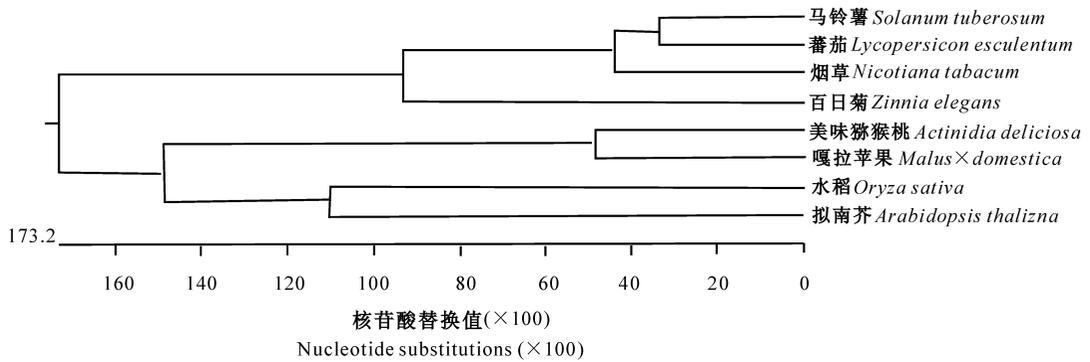


图 8 植物 *DHAR* 基因氨基酸序列系统树分析

Fig. 8 Phylogenetic trees of the deduced amino acid sequences of plant *DHAR* by Dnastar

3 讨论

Tabata 等^[13]研究表明, *GalLDH* 基因在烟草细胞中的反义表达明显抑制了 AsA 的合成; Chen 等^[14]从小麦中克隆的 *DHAR* 基因 cDNA 导入烟草和玉米植株, 结果 ASA 水平提高了 2~4 倍, 这说明 *GalLDH* 和 *DHAR* 两个基因在 AsA 的积累过程中起着重要作用。

不同植物种类及不同组织具有不同的 AsA 含量, 甚至相差达数十倍, 可以说 ASA 库的大小由遗传决定并具有组织特异性。本试验从猕猴桃果实中克隆到 L-半乳糖途径中的关键酶 *GalLDH* 基因和 AsA 再生酶 *DHAR* 基因片段, 经分析其与已知的刺梨、苹果、草莓、烟草、土豆等植物的同源基因具有较高的保守性。这说明这两个基因在高等植物中是普遍存在的, 可为揭示高等植物合成和再生维生素 C 的普遍机理提供更多佐证。同时, 作为一种大量合成和积累 AsA 的植物, 猕猴桃 *GalLDH* 基因与高维生素 C 含量的刺梨同源基因具有很高的相似性, 二者在核苷酸和氨基酸水平上的相似性均达到 88%。安华明等^[8]研究指出, 刺梨不同器官 *Gall-*

DH 基因的表达量不同, 在 AsA 积累量越高的器官中, *GalLDH* 基因的表达也越高; 同时认为 *DHAR* 并不是刺梨果实积累高含量 ASA 的关键因素。这两个基因在猕猴桃各个器官中的表达量及 *DHAR* 基因在猕猴桃果实中的作用如何, 还需进一步研究。Zou 等^[15]研究表明, 植物 *DHAR* 可能是一个基因家族, 猕猴桃 *DHAR* 与苹果 *DHAR* 基因的同源性高达 99%, 而与烟草、土豆等只有 78%, 其主要原因可能是猕猴桃采用了与苹果相同的特异引物, 且引物保守性很强, 从而克隆得到的猕猴桃 *DHAR* 和苹果的 *DHAR* 基因很可能是同一个亚型。同时也反映了不同植物材料适应逆境的能力存在差异, 这还有待今后深入研究。

[参考文献]

[1] 安华明, 陈力耕, 樊卫国, 等. 高等植物中维生素 C 的功能、合成及代谢研究进展[J]. 植物学通讯, 2004, 21(5): 608-617.
 [2] Wheeler G L, Jones M A, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants[J]. Nature, 1998, 393: 365-369.
 [3] Davey M W, Gilot C, Persian G, et al. Ascorbate biosynthesis in arabidopsis cell suspension culture[J]. Plant Physiology, 1999,

- [4] Conklin P L. Recent advance in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants[J]. *Plant Cell and Environment*, 2001, 24: 383-394.
- [5] Foyer C H, Lelandais M, Edwards E A, et al. The role of ascorbate in plants, interactions with photosynthesis, and regulatory significance[C]// Pell E J, Steffen K L. Active oxygen, oxidative stress and plant metabolism. USA: American Society of Plant Physiologists, 1991: 131-144.
- [6] Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, et al. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress[J]. *Plant*, 2002, 32: 915-925.
- [7] 徐小彪, 张秋明. 中国猕猴桃种质资源的研究与利用[J]. *植物学通报*, 2003, 20(6): 648-655.
- [8] 安华明, 陈力耕, 樊卫国. 刺梨果实半乳糖内脂脱氢酶基因 cDNA 片段的克隆及在不同器官的表达[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(3): 571-575.
- [9] 安华明, 陈力耕, 樊卫国, 等. 刺梨果实中维生素 C 积累与相关酶活性的关系[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31(4): 431-436.
- [10] Arrigoni O, De Gara L, Paciolla C, et al. Lycorine: a powerful inhibitor of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase activity[J]. *Plant Physiol*, 1997, 150: 362-364.
- [11] Ostergaard J, Persian G, Davey M W, et al. Isolation of a cDNA coding for L-galactono-g-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants[J]. *Biol Chem*, 1997, 272: 30009-30016.
- [12] 任小林, 金志强, 彭世清, 等. 猕猴桃 ACC 氧化酶 cDNA 克隆及全序列测定[J]. *园艺学报*, 1997, 24(4): 333-337.
- [13] Tabata K, Oba K, Suzuki K, et al. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase[J]. *Plant*, 2001, 27: 139-148.
- [14] Chen Z, Young T E, Ling J, et al. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3525-3530.
- [15] Zou L P, Li H X, Ouyang B, et al. Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism[J]. *Plant Science*, 2006, 170: 120-127.

(上接第 56 页)

- [3] Robinson T J. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep[J]. *Nature*, 1965, 206: 39-41.
- [4] Crosby T F. Effect of rumen degradable bolus containing melatonin or progestagen pessary plus pregnant mare serum gonadotropin on estrus response and lambing rate in ewes[J]. *Theriogenology*, 1991, 35(4): 747-752.
- [5] Motlomelo K C, Greyling J P C, Sehwalbach L M J. Synchronization of oestrus in goats; the use of different progestagen treatments[J]. *Small Ruminant Research*, 2002, 45: 45-49.
- [6] Romano J E. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats[J]. *Animal Reproduction Science*, 2004, 55: 15-19.
- [7] Hashemi M, Safdarian M, Kafi M. Estrous response to synchronization of estrus using different progesterone treatments outside the natural breeding season in ewes[J]. *Small Ruminant Research*, 2006, 65: 279-283.
- [8] Ungerfeld R, Rubianes E. Estrus response to the ram effect in corriedale ewes primed with medroxyprogesterone during the breeding season[J]. *Small Ruminant Research*, 1999, 320: 89-91.
- [9] Mielniczuk M, Boryczko Z, Udala J. Evaluation of selective methods of oestrus synchronization and ovulation stimulation in sheep during physiological anoestrus[J]. *Medycyna Weterynaryjna*, 1996, 52(3): 185-187.
- [10] Luther J S, Grazul-Bilska A T, Kirsch J D, et al. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes[J]. *Small Ruminant Research*, 2006: 10-15.
- [11] 马保华, 赵晓娥. 实用型炔诺酮阴道栓对陕南山羊的同期发情[J]. *动物医学进展*, 2000, 21(4): 131-133.
- [12] 马保华, 张红, 李键, 等. 山羊胚胎移植受体同期发情优化程序研究[J]. *西南农业学报*, 2004, 17(5): 664-667.
- [13] 何晓红, 杨利国. 阴道海绵栓“羊乐”中醋酸氟孕酮体外释放规律研究[J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 75-78.
- [14] 董伟. 家畜的生殖激素[M]. 北京: 农业出版社, 1985.