

禄亚洲,尹秀,左晓宇,等.棉花 *GhGGPase2* 基因克隆、功能序列分析、原核表达及烟草的遗传转化[J].江苏农业科学,2016,44(7):26-30. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.007

棉花 *GhGGPase2* 基因克隆、功能序列分析、原核表达及烟草的遗传转化

禄亚洲¹,尹秀¹,左晓宇²,梁卓²,李鸿彬^{2,3}

(1. 西藏大学农牧学院,西藏林芝 860000; 2. 石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003;

3. 石河子大学农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832003)

摘要:以棉花纤维组织为材料,根据 NCBI 棉花 EST 进行同源搜索、比对和序列拼接,经 RT-PCR 从陆地棉纤维组织中扩增得到 *L*-半乳糖磷酸化酶基因(*GhGGPase2*)的 cDNA 开放阅读框为 1 335 bp,为包含 445 个氨基酸的蛋白质,分子质量约为 49 ku。利用软件进行蛋白质序列分析,*GhGGPase2* 蛋白具有组氨酸三聚体(HIT)蛋白超家族的主要特性的结构域。进化树分析的结果表明棉花 *GhGGPase2* 与猕猴桃 *AdGGPase* 在进化上亲缘关系上较近。构建原核表达载体 pET28a-*GhGGPase2* 并转化大肠杆菌,将重组载体 pET28a-*GhGGPase2* 导入大肠杆菌 BL21(DE3)中通过 IPTG 诱导表达后经过 SDS-PAGE 分析,显示成功获得分子质量为 49 ku 左右的诱导表达蛋白 *GhGGPase2*。将 *GhGGPase2* 基因构建到植物真核表达载体 pCambia2300 中,利用农杆菌通过叶盘法转化烟草,经 PCR 分子鉴定,获得了含 *GhGGPase2* 转基因烟草植株。研究结果将进一步阐明该基因的生物学功能奠定基础。

关键词:棉花纤维;*L*-半乳糖磷酸化酶基因;原核表达;克隆;遗传转化

中图分类号: S562.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0026-05

棉花是全球重要的经济作物,也是我国重要的农产品及纺织原料,是国民经济的支柱产业之一,具有极其重要的战略地位^[1]。棉花纤维品质中最重要的参考指标是纤维的强度和长度,而细胞的伸长或膨大发育与纤维的最终品质密切相关^[2]。抗坏血酸是广泛存在于植物组织中的一种抗氧化小分子物质,尤其是在细胞分裂旺盛的植物组织含量较高,不仅对植物生长发育、防卫、分化等许多生理过程起重要作用,还与细胞伸长密切相关^[3-5]。棉花纤维细胞的结构是长而不分支的单细胞,是研究细胞生长发育与分化的理想材料。之前的研究表明:抗坏血酸代谢可能参与纤维的发育过程^[6]。

目前已知的植物体内抗坏血酸生物合成途径中,甘露糖/*L*-半乳糖途径(又称为 Smirnoff/Wheeler 途径)是主要途径^[7]。*L*-半乳糖磷酸化酶(*GDP-L-galactose phosphorylase*, *GGPase*)基因的表达产物是 *L*-半乳糖磷酸化酶(*GGP*),该酶能够将 *GDP-L*-半乳糖转化成 *GDP-L*-半乳糖-1-磷酸,是甘露糖/*L*-半乳糖途径中的重要基因,对植物抗坏血酸的合成起着重要作用。目前已在拟南芥、猕猴桃、烟草、大豆、蓖麻、柑橘、葡萄、番茄和马铃薯等多种植物中分离出 *GGPase* 基因。通过转基因研究表明在多个物种中过量表达 *GGPase* 基因可提高植物体内抗坏血酸的含量^[7-15]。

对棉花 *GGPase2* 基因的克隆、功能分析、原核表达和转化

烟草,有助于解析抗坏血酸参与棉纤维发育的重要功能。从处于快速伸长发育时期的棉花纤维组织中克隆得到了抗坏血酸合成途径中的关键基因(*GDP-L*-半乳糖磷酸化酶基因)*GGPase2*,并对其编码的蛋白进行序列功能结构域分析,构建原核表达载体并转化大肠杆菌 BL21(DE3)进行重组蛋白的诱导表达,构建植物表达载体并转化烟草,为深入探究抗坏血酸和 *GGPase* 参与棉花纤维发育的重要功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 植物材料为陆地棉徐-142 棉花纤维,由笔者所在实验室培养。经液氮速冻后于 -70℃ 保存备用。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌菌株(*Escherichia coli*)、Top10 由本实验室保存;克隆载体为大连宝生物 pGEM-T vector;原核表达载体为 pET28a,真核表达载体为 pCambia2300 由笔者所在实验室保存。

1.1.3 酶及生化试剂 RNA 反转录试剂盒、TaKaRa LA *Taq* DNA 聚合酶、*T₄*-DNA 连接酶、*EcoR* I、*Bam* H I、*Xho* I、*Kpn* I 和 *Xba* I 等相关酶购自大连宝生物公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取微量试剂盒购自 TIANGEN 公司;其他相关试剂均为国产分析纯,购自上海生工生物工程公司。

1.1.4 主要仪器 高压蒸汽灭菌锅(HVE-50)、Eppendorf 5417 R 型台式冷冻离心机、电泳仪(Tannon Epson100 型)、PCR 仪(Biomotra Tpersonal)、凝胶成像系统、超净工作台(BHC-1300A/B3)、恒温培养箱(HIQ-X100)、恒温摇床(HWY-100B)。

1.2 方法

1.2.1 棉花总 RNA 的提取 根据改良的 CTAB 法^[16]提取

收稿日期:2015-05-12

基金项目:西藏自治区高等院校教师专业实践实战能力提高计划。

作者简介:禄亚洲(1987—),男,甘肃白银人,硕士,助教,主要从事植物分子生物学研究。E-mail: Luyazhou001@126.com。

通信作者:李鸿彬,博士,教授,硕士生导师,从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail: lihb@shzu.edu.cn。

棉花总 RNA。所使用的研钵经高温烘烤数小时,其他器皿均用 DEPC 水处理^[17]。

1.2.2 *GhGGPase2* 基因的克隆 根据从 GenBank EST 数据库中所获得的完整 cDNA ORF 基因片段进行保守性分析后,利用 Primer Premier 5.0 进行引物设计(正向引物:5'-CGC GGATCCATGATGCTTAGGATTAAGAGGGTTC-3';反向引物:5'-CCGCTCGAGCTGCAGAACAAGGCATTGTTG-3')。设计引物在上下游引物的两端添加 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点(下划线)和保护性碱基。用 Prime-Script™ 反转录试剂盒以总 RNA 为模板合成 cDNA^[18],通过 PCR 扩增获得全长的 *GhGGPase2* 基因。

PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 45 s,57 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 70 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 存放。

1.2.3 蛋白质序列比对和结构域分析 蛋白质序列比对通过 DNAMAN 软件和 NCBI 网站在线完成,通过 MEGA 软件完成进化树构建。

1.2.4 pET28a-GhGGPase2 原核表达载体的构建与鉴定 将克隆得到 *GhGGPase2* 基因的 PCR 产物经过回收后连接到 pGEM-T Easy 载体上,将连接产物转入大肠杆菌 Top10 感受态细胞中,菌落 PCR 鉴定后挑取阳性单克隆,摇菌做穿刺管后送至华大基因公司测序^[18-19]。将经测序正确的重组质粒 pGEM-T-GhGGPase2 和 pET28a 原核表达载体同时用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收目的基因小片段和原核表达载体大片段,并将回收好的大小片段按一定体系用 T₄-DNA 连接酶 16 ℃ 过夜连接,将连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,涂布于 50 mg/L 卡那霉素抗性固体 LB 培养基 37 ℃ 恒温箱中培养 12 h,挑取单克隆进行 PCR 和双酶切鉴定^[19-20]。

1.2.5 GhGGPase2 重组蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定 将构建成功的重组质粒 pET28a-GhGGPase2 和空质粒 pET28a 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,经 PCR 鉴定后挑取阳性单克隆菌落接种于 10 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 ℃ 培养过夜。各取上述过夜菌 500 μL 转接入 50 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 中,37 ℃ 振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.4~0.6 时,各取 10 mL 菌液记为 0 h(作为对照),加入 IPTG 至终浓度为 2 mmol/L,继续振荡培养,分别取加入 IPTG 后 2、4、6 h 菌液 10 mL,4 ℃ 5 000 r/min 离心 8 min 收集菌体然后加入冰预冷 PBS 磷酸缓冲液悬浮菌体后再加入 SDS,100 ℃ 水浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液进行 SDS-PAGE 电泳(5% 浓缩胶,12% 分离胶),凝胶用考马斯亮蓝染色^[18-19]。

1.2.6 GhGGPase2 植物表达载体的构建 将经过测序鉴定正确的 pGEM-T-GhGGPase2 重组质粒和植物表达载体 pCAMBIA2300 同时用 *Kpn* I 和 *Xba* I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收纯化所需的片段,用 T₄-DNA Ligase 将回收的目的基因片段与 pCAMBIA2300 载体大片段相连接,4 ℃ 过夜;将连接产物转入到大肠杆菌 Top10 感受态细胞,涂布于含有卡那霉素(Kan)的 LB 平板上 37 ℃ 培养过夜。筛选阳性克隆并摇菌提取重组质粒,酶切鉴定,即构建 p35S::GhGGPase2 植物表达载体。

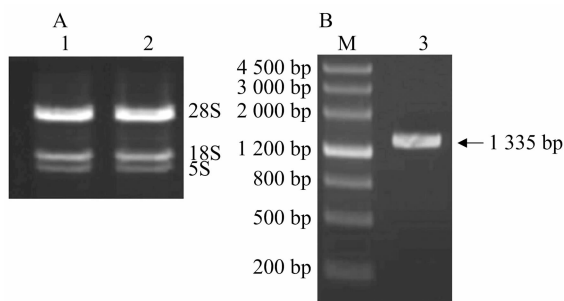
1.2.7 烟草的遗传转化 将构建好的 p35S::GhGGPase2 表达载体用电击法转入根癌农杆菌 GV3101 中,转化产物涂布在含有 100 mg/L Rif+5 mg/L Gen+75 mg/L Kan 的 LB 培养基上,28 ℃ 培养 2 d。从平板上挑取单菌落,接种到含 Rif、Gen 和 Kan 的 LB 液体培养基中,28 ℃ 摇菌培养,PCR 鉴定阳性克隆。采用叶盘法转化烟草^[20]:将烟草叶片切成 1×1 cm 大小的叶盘,放入鉴定出的农杆菌侵染液中,侵染 10 min,吸干菌液,放入共培养培养基(MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+50 mg/L AS)上(铺滤纸),暗培养 2 d 后转移至筛选分化培养基(MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+50 mg/L Kan+400 mg/L Cef)上诱导再生芽,每 2 周换 1 次培养基。再生芽长至 1~2 cm 时,将不定芽切下,转到生根培养基(1/2MS+0.3 mg/L IAA+50 mg/L Kan+400 mg/L Cef)中诱导生根^[21]。

1.2.8 转基因烟草分子鉴定 用天根 RNA simple Total RNA Kit 提取烟草总 RNA,反转录合成 cDNA 第一链,以合成的 cDNA 为模板,利用正向和反向引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 45 s,57 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 70 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 存放。

2 结果与分析

2.1 棉花 *GhGGPase2* 基因克隆

采用改良的 CTAB 法提取棉花纤维组织的总量 RNA,结果表明:所提取的总量 RNA 呈现 28S、18S 完整条带,28S 的含量约为 18S 的 2 倍,表明所提取的 RNA 较好,可以进行后续反转录试验(图 1-A)。以反转录获得的棉花纤维 cDNA 作为模板,经过 PCR 扩增得到特异性条带,经测序正确后获得 *GhGGPase2* 基因的全长开放阅读框(图 1-B),包含 1 335 个碱基对的核苷酸,编码含有 445 个氨基酸的蛋白质。



A—棉花纤维组织总 RNA 提取;1、2—纤维组织 RNA 电泳条带;B—*GhGGPase2* 基因的 PCR 扩增;M—DNA marker III;3—PCR 扩增条带。

图1 *GhGGPase2* 基因的克隆

2.2 序列比对与进化树分析

将 *GhGGPase2* 基因的 cDNA 序列翻译为氨基酸序列,将该序列与以下几种 *GGPase* 基因的氨基酸序列进行对比:拟南芥(*AtGGPase*; GenBank 登录号为 At4g26850)、番茄(*SIGG-Pase*; GenBank 登录号为 AFD54988)、马铃薯(*StGGPase*; GenBank 登录号为 AEQ64271)、猕猴桃(*AdGGPase*; GenBank 登录号为 ABP65665)、烟草(*NtGGPase*; GenBank 登录号为 ACD92981)、蓖麻(*RcGGPase*; GenBank 登录号为 XP_002529463)、柑橘(*CuGGPase*; GenBank 登录号为

ADV59925)、葡萄(VvGGPase; GenBank 登录号为 XP_002278339)。结果显示:植物中的 GhGGPase2 蛋白质在序列相似性较高,具有保守的结构域,黑色部分为保守的氨基酸序列,灰色部分为保守性一般的序列。GhGGPase2 蛋白和其他

植物一样含有 1 个 HIT (HxHxQ) 基序,是组氨酸三联体(HIT)超家族的一员。它也是一种核定位蛋白,核定位基序为 NLS(图 2)。进化树分析的结果表明棉花 GhGGPase2 与柑橘 AdGGPase 在进化上亲缘关系上较近(图 3)。

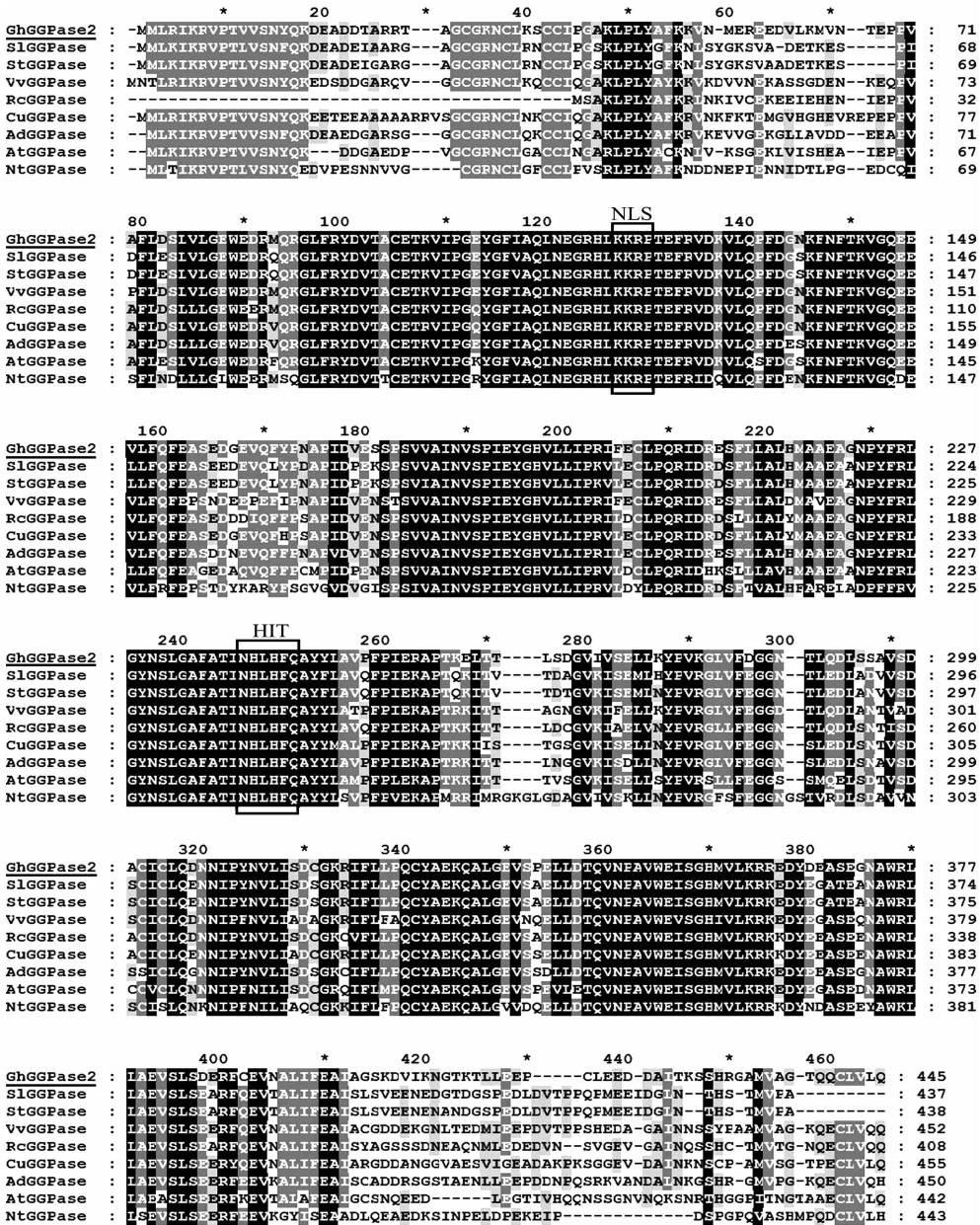


图2 棉花 GhGGPase2 蛋白质与其他几种 GGase 蛋白质序列对比

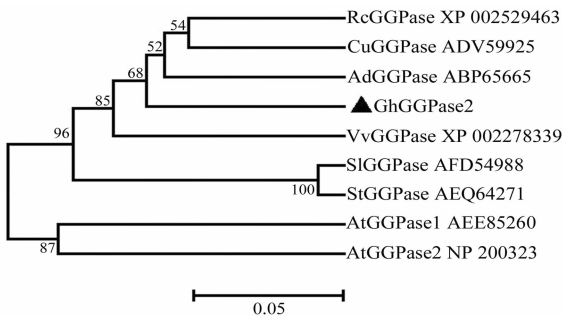


图3 棉花 GhGGPase2 与其他几种植物 GGase 的进化树构建

2.3 原核表达载体 pET28a - GhGGPase 的构建与鉴定

将经测序正确的重组质粒 pGEM - T - GhGGPase2 和 pET28a 原核表达载体同时用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,回收目的基因小片段和原核表达载体大片段,连接并转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,转化成功的菌株挑取单克隆做菌落 PCR 鉴定(图 4 - A),PCR 鉴定为阳性的菌落摇菌提取质粒进一步做双酶切鉴定(图 4 - B),成功构建 pET28a - GhGGPase2 原核表达载体。

2.4 重组 GhGGPase2 蛋白的诱导表达

将构建成功的 pET28a - GhGGPase2 重组子转入表达菌

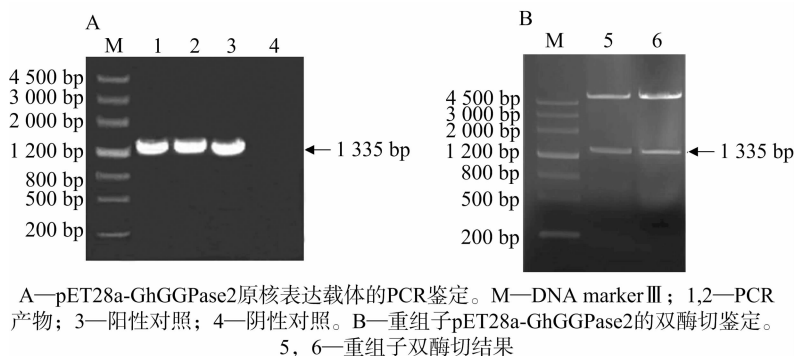


图4 pET28a-GhGGPase2 原核表达载体构建及双酶切鉴定

株 BL21 (DE3) 中,经 PCR 筛选鉴定后(图 5),进行扩大培养,利用 IPTG 诱导菌体表达,提取蛋白质后进行 SDS - PAGE 电泳分析,获得了 49 ku 左右的重组 GhGGPase2 蛋白(图 6)。

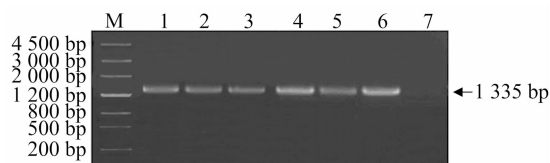


图5 pET28a-GhGGPase2 重组子的菌液 PCR 鉴定

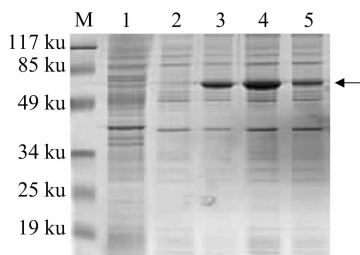


图6 GhGGPase2 重组蛋白的诱导表达与SDS-PAGE分析

2.5 p35S::GhGGPase2 植物表达载体构建

将经测序正确的重组质粒 pMD - T - GhGGPase2 和 pCAMBIA2300 真核表达载体同时用 *Bam*H I 和 *Xba* I 进行双酶切,回收目的基因小片段和真核表达载体大片段。连接后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞培养。经 PCR 和双酶切鉴定均含有目的片段,表明成功植物表达载体 p35S::GhGGPase2 (图 7)。

2.6 烟草的遗传转化与鉴定

采用电击法将重组质粒 p35S::GhGGPase2 转化农杆菌 GV3101,经筛选和 PCR 鉴定,结果 PCR 扩增条带与预期大小一致,表明 p35S::GhGGPase2 植物表达载体已经成功导入到农杆菌 GV3101 中,可用于下一步的遗传转化(图 8 - A)。

将已经成功导入 p35S::GhGGPase2 重组质粒的农杆菌 GV3101 采用叶盘法转化野生型烟草,诱导芽再生和生根,获取再生的转基因烟草。提取转基因烟草叶片总量 RNA 并反转录合成 cDNA,以 p35S::GhGGPase2 质粒作阳性对照,非转基因烟草作阴性对照,通过 RT - PCR 利用特异性引物鉴定转基因植株,结果显示成功获得了转基因烟草植株(图 8 - B)。

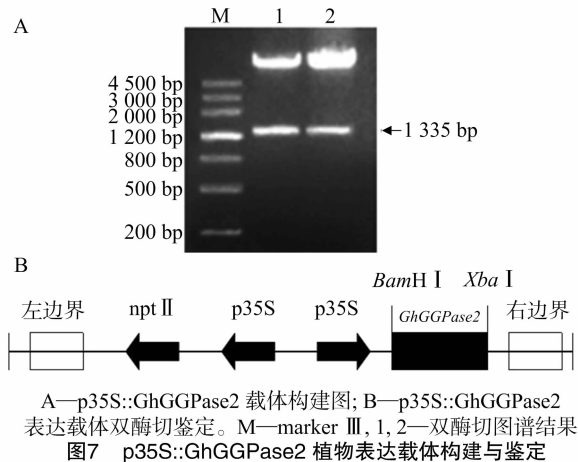


图7 p35S::GhGGPase2 植物表达载体构建与鉴定

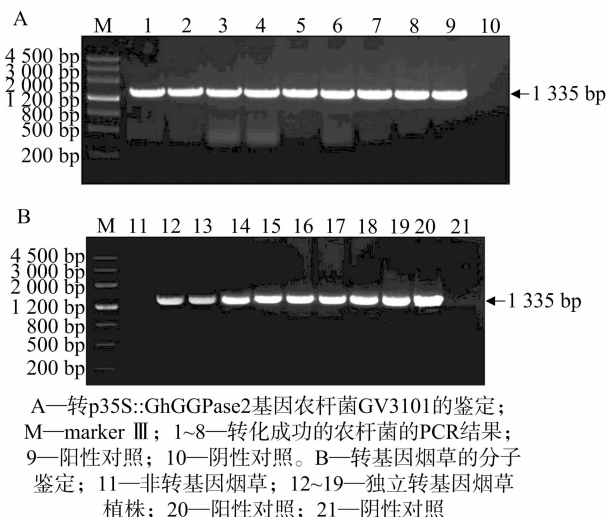


图8 转p35S::GhGGPase2 烟草的遗传转化和鉴定

3 讨论

本研究从棉花纤维组织中克隆得到 *GhGGPase2* 基因,该基因 cDNA 的开放阅读框为 1 335 bp。GhGGPase2 拥有保守的 HxHxQ 功能结构域,是 D - 半乳糖 - 1 - 磷酸鸟苷酰基转移酶 (GalT) 家族和组氨酸三联体 (HIT) 超家族的一员,这些功能结构可能与棉花抵御非生物胁迫的能力相关。进化树分析的结果表明棉花 GhGGPase2 与柑橘 AdGGPase 在进化上亲缘关系上较近。构建了原核表达载体 pET28a - GhGGPase2,

转化大肠杆菌,通过诱导表达和 SDS-PAGE 分析获得了大小约为 49 ku 的 GhGGPase2 重组蛋白质。构建了真核表达载体 p35S::GhGGPase2,导入农杆菌 GV3101,通过叶盘法转化野生型烟草,诱导芽再生和生根,获得了再生的转基因烟草。

抗坏血酸参与一系列植物的生长发育过程,并且可以影响氧化还原反应相关的进程,包括病原反应^[22-23]。植物体内抗坏血酸合成途径中从 GDP-甘露糖转化为 L-半乳糖/L-古洛糖的过程中以糖醛酸作为前体,编码 GDP-甘露糖途径中相关酶的基因已经被证实和鉴定。在拟南芥中 *AtGGPase* 基因编码 GDP-L-半乳糖磷酸化酶,该酶催化抗坏血酸合成过程中 GDP-L-半乳糖转化为 L-半乳糖-1-磷酸的这一步反应。GDP-甘露糖途径是拟南芥幼苗抗坏血酸来源的主要且显著的途径,并且抗坏血酸是幼苗生长所必需的^[24-25]。光合作用的电子传递链与拟南芥中 L-半乳糖途径中的酶相互关联,持续光照可以使拟南芥体内的抗坏血酸含量增加,与此同时该途径中的 *GMPase*、*GGPase*、*GPPase* 的表达量也上升;强光处理后拟南芥体内的抗坏血酸含量增加,同时 *GGPase* 表达和 *GGPase* 的酶活快速升高,该途径中的其他酶的酶活变化不是很大;拟南芥中光周期的开始阶段是 *GGPase* 和 *VTC5* 的表达高峰期,并且其表达受到生物钟的调控^[14]。拟南芥中 *GGPase* 蛋白具有底物特异性,底物 GDP-L-半乳糖比 GDP-D-甘露糖更容易被 *GGPase* 蛋白利用,而不宜以 GDP-L-葡萄糖为底物^[15]。

4 结论

本试验从棉花纤维组织中克隆获得 *GhGGPase2* 基因是抗坏血酸生物合成中的关键基因,调控着植物体内抗坏血酸的生物合成,预示着其可能通过影响抗坏血酸含量从而参与纤维细胞的发育过程。结果将为深入研究 *GhGGPase* 基因的生物学功能以及为解析棉花纤维细胞发育的分子机制提供参考,同时也为利用基因工程进行优质转基因新品种的培育奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] 刘进元,赵广荣,李 骥. 棉花纤维品质改良的分子工程[J]. 植物学报,2000,42(10):991-995.
- [2] 钱雯婕,王 斐,石 峰,等. 棉花单脱氢抗坏血酸还原酶基因的克隆及原核表达[J]. 西北农业学报,2012,21(5):118-122.
- [3] Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants[J]. Annals of Botany,1996,78(6):661-669.
- [4] Shao H B, Chu L Y, Lu Z H, et al. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells[J]. International Journal of Biological Sciences,2008,4(1):8-14.
- [5] 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]. 植物学通报,2004,21(5):608-617.
- [6] Li H B, Qin Y M, Pang Y, et al. A cotton ascorbate peroxidase is involved in hydrogen peroxide homeostasis during fibre cell development[J]. New Phytologist,2007,175(3):462-471.
- [7] 王丽燕,王 玉,孟 夏,等. 过表达番茄 GDP-L-半乳糖磷酸酶基因提高烟草抗 MV 诱导的氧化胁迫能力[J]. 植物生理学报,2012,48(7):689-698.
- [8] Massot C, Stevens R, Génard M, et al. Light affects ascorbate content

- and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits[J]. Planta,2012,235(1):153-163.
- [9] Bulley S M, Rassam M, Hoser D, et al. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanylyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis[J]. Journal of Experimental Botany,2009,60(3):765-778.
 - [10] Ūrzić E I, Adler L N, Page M D, et al. Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the *VTC2* gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase[J]. The Journal of Biological Chemistry,2012,287(17):14234-14245.
 - [11] Mellidou I, Chagné D, Laing W A, et al. Allelic variation in paralogs of GDP-L-galactose phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit[J]. Plant Physiology,2012,160(3):1613-1629.
 - [12] Linster C L, Clarke S G. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2[J]. Trends in Plant Science,2008,13(11):567-573.
 - [13] Melino V J, Soole K L, Ford C M. Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries[J]. BMC Plant Biology,2009,9(9):145.
 - [14] Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, et al. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology,2007,52(4):673-689.
 - [15] Linster C L, Gomez T A, Christensen K C, et al. *Arabidopsis* VTC2 encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants[J]. The Journal of Biological Chemistry,2007,282(26):18879-18885.
 - [16] 蒋建雄,张天真. 利用 CTAB/酚法提取棉花组织总 RNA[J]. 棉花学报,2003,15(3):166-167.
 - [17] 夏兰芹,郭三堆. 棉花 RNA 的快速提取方法[J]. 棉花学报,2000,12(4):205-207.
 - [18] 田大鹏,葛 娟,石 峰,等. 棉花 *GhDTHAR2* 基因克隆、功能序列分析及原核表达[J]. 生物技术通报,2012(7):65-69.
 - [19] 李学宁,杜军伟,李鸿彬. 棉花脱氢抗坏血酸还原酶基因的克隆、原核表达与纯化[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2010,28(5):542-545.
 - [20] 魏春红,李 毅. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006:167-168.
 - [21] 王 芳,王 斐,孙 辉,等. 棉花 *GhDTHAR3* 基因克隆、功能序列分析及烟草的遗传转化[J]. 西北农业学报,2011,20(5):88-93.
 - [22] 陈坤明,宫海军,王锁民. 植物抗坏血酸的生物合成、转运及其生物学功能[J]. 西北植物学报,2004,24(2):329-336.
 - [23] Conklin P L, Saracco S A, Norris S R, et al. Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants[J]. Genetics,2000,154(2):847-856.
 - [24] 戚智尧,王铁良. 膜下滴灌水肥耦合对青椒维生素 C 含量的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):144-146.
 - [25] 冯 营,胡新燕,冯清伟,等. 不同熟期辣椒果实农艺性状和维生素 C 含量动态变化[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):156-157.