

侯维海,王建林,旦巴,等. 西藏野生甜荞碳酸酐酶基因 *FsCA1* 的克隆和生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):20-23.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.005

# 西藏野生甜荞碳酸酐酶基因 *FsCA1* 的克隆和生物信息学分析

侯维海, 王建林, 旦巴, 胡单

(西藏农牧学院西藏高原作物分子育种实验室, 西藏林芝 860000)

**摘要:**依据已公布的荞麦转录组测序信息,从 Contig 文库中获得了 1 个碳酸酐酶(carbonic anhydrase,简称 CA)转录本,通过逆转录 PCR(RT-PCR)扩增得到 CA 基因全长序列。生物信息学分析表明,*FsCA1* 基因全长 1 233 bp,开放阅读框 978 bp,编码 325 个氨基酸;分子量 35.11 ku,等电点 7.59;包含 9 个  $\alpha$ -螺旋、6 个  $\beta$ -折叠、多个无规则卷曲和延伸链;含有 1 个信号肽和 1 个跨膜区;具有  $\beta$ -类碳酸酐酶典型的 2 个氨基酸保守域。亚细胞定位显示,该蛋白出现在叶绿体中的可能性最大。利用同源建模法构建了 *FsCA1* 三维结构模型,表明甜荞 CA 与豌豆 CA 同型八聚体能很好地匹配,推测甜荞 CA 也是同型八聚体。用实时荧光定量 PCR 检测 *FsCA1* 在荞麦不同器官中的表达水平,结果显示,*FsCA1* 在叶中表达水平最高,其次是在茎中,在根中表达水平最低。

**关键词:**西藏甜荞;碳酸酐酶;*FsCA1* 基因;三维结构预测;生物信息学

**中图分类号:** S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0020-04

碳酸酐酶(carbonic anhydrase,简称 CA,EC4.2.1.1)是一类含锌的金属酶,广泛存在于动物、植物等有机体的组织和器官中<sup>[1]</sup>。植物中 CAs 至少包括 5 个基因家族( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$ ),主要分布在绿色组织中,可逆地催化  $\text{CO}_2$  的水合反应,产生  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{H}^+$ ,参与植物光合  $\text{CO}_2$  的固定、 $\text{CO}_2$  转运、呼吸作用、离子交换等生理过程<sup>[2-3]</sup>。CA 能加快  $\text{CO}_2$  在细胞内的水合速度,有助于  $\text{CO}_2$  运输到活跃的光合细胞中,从而提高光合速率;同时,CA 活性随着叶绿素含量、锌含量增加而增强,具有明显提高光合作用的能力,在一定程度上 CA 活性与光合作用呈正相关<sup>[4-6]</sup>。近年来,前人对植物 CA 的研究主要涉及生理生化作用和酶学特性,而对编码该酶的组成、结构和功能等尚未形成统一认识;现有研究仅限于少数几种植物,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[4,7]</sup>、黄顶菊(*Flaveria*)<sup>[8]</sup>、玉米(*Zea mays*)<sup>[2]</sup>、龙眼(*Dimocarpus longan* Lour)<sup>[9]</sup>等,尚未见关于荞麦 CA 基因克隆和表达分析的报道。在高等植物中 CA 主要有 3 类,即  $\alpha$ -CA、 $\beta$ -CA 和  $\gamma$ -CA,各种类型之间氨基酸序列保守性较低,同时每个亚基因家族又包含多个成员,其成员亚细胞定位有较大差异。例如,拟南芥  $\beta$ -CA 基因家族有 6 个成员( $\beta$ -CA1 ~  $\beta$ -CA6),其中  $\beta$ -CA1、 $\beta$ -CA5 定位于叶绿体中, $\beta$ -CA2、 $\beta$ -CA3、 $\beta$ -CA4 定位于细胞质中, $\beta$ -CA6 定位于线粒体中<sup>[4-5,10-11]</sup>;在黄顶菊属(*Flaveria*)中, $\text{C}_3$  类 *F. pringlei*、 $\text{C}_4$  类 *F. bidentis* 的叶片中均

分离到 3 个不同的  $\beta$ -CA 单体( $\beta$ CA1 ~  $\beta$ CA3),这些成员基因之间的序列相似性或保守性超过 90%。CA 基因的功能验证在模式植物拟南芥上已取得进展,以  $\beta$ -CA 基因家族的研究较为深入。有研究发现,*At* $\beta$ -CA1 编码蛋白可发生巯基亚硝酸化,降低与水杨酸结合的能力,进而影响 CA 活性,其表达丰度与拟南芥幼苗存活率相关<sup>[12-13]</sup>;同时 *At* $\beta$ -CA1、*At* $\beta$ -CA4 参与调控保卫细胞气孔运动,是保卫细胞气孔运动的上游调节因子<sup>[14]</sup>。但是,关于其他  $\beta$ -CA 的功能目前还不清楚<sup>[10]</sup>。总体而言,在  $\text{C}_3$  植物中, $\beta$ -CA 主要分布在叶绿体叶肉细胞的基质中<sup>[7]</sup>,可能参与协助  $\text{CO}_2$  从叶绿体被膜扩散或者催化  $\text{HCO}_3^-$  快速脱水形成  $\text{CO}_2$ ;质粒中也存在  $\beta$ -CA,可能与气孔的关闭、脂类合成和抗病性有关<sup>[12,15-17]</sup>。

甜荞属蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*),是一种重要的杂粮兼药用植物。随着市场上对荞麦需求量的增加,荞麦育种研究显得愈发重要。荞麦起源于西藏地区,该区是世界荞麦的起源中心之一<sup>[18]</sup>,属于低纬度高海拔农业区,具有全球最典型的立体生境,其地质独特,地形地貌复杂,土壤种类繁多,生态环境千差万别,产生了丰富的荞麦变异类型,具有区域独特的荞麦种质。本研究拟以西藏林芝市郊区野生甜荞为材料,根据已公布的甜荞转录组 Contig 文库中筛选出的碳酸酐酶转录本信息,设计 CA 基因的特异引物,通过逆转录 PCR(RT-PCR)获得荞麦 CA 基因全长序列,并进行生物学信息分析,初步明确荞麦 CA 基因的结构和表达特点,为荞麦抗逆品种的选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及其总 RNA 提取

甜荞种子于 2013 年 10 月在西藏林芝市章麦村(地理位置 29°50'N、93°25'E,海拔 3 000 m)野外收集,次年 4 月初,将收集的野生甜荞种子散播种植于西藏大学农牧学院试验田内,除人

收稿日期:2016-02-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360300、31560362);西藏自治区重点项目(编号:XZXTCX-2016)。

作者简介:侯维海(1985—),男,甘肃张掖人,硕士,讲师,从事作物遗传育种研究。E-mail:418267205@qq.com。

通信作者:王建林,教授,从事作物栽培与育种研究。E-mail:xzwangjl@126.com。

工除草、浇水外,均在自然条件下生长。在荞麦 5 叶期,选取 5 株健壮植株的幼嫩叶片,作为提取 RNA 的试验材料。选取材料均设 3 次重复,用清水冲洗 5~8 次,然后再用吸水纸轻轻吸去水分,立刻置于液氮中速冻, -80 ℃ 保存备用。

取新鲜幼叶 3.0 g,在液氮保护中快速研磨成粉末状,然后按照 TRIzol 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)说明书介绍的方法提取总 RNA,用 DNase I 去除 RNA 中的痕量 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶检测总 RNA 的完整性,紫外分光光度计分析其浓度、纯度。

1.2 *FsCAI* 基因全长序列的克隆

按照 MMLV Transcriptase cDNA 反转录(TaKaRa)试剂盒

说明书方法将提取的 RNA 反转录合成 cDNA 第 1 链,于 20 ℃ 保存备用。以荞麦转录组中碳酸酐酶 Contig(*Fagopyrum\_esculentum\_MIRA\_VER3 - c119*) 序列开放阅读框为模板,利用 Primer Primer5.0 软件设计用于 *FsCAI* 基因全长克隆的 1 对特异引物 *FsCAI - F*/*FsCAI - R*(表 1),其基因全长克隆的 PCR 反应体系按照 KOD FX DNA[东洋纺(上海)生物科技有限公司]说明书进行,PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测浓度,紫外灯下切取目的片段,利用胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]对产物进行回收,回收产物进行 T/A 克隆,阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 本研究使用的引物对其序列

引物名称	引物序列(5'→3')	引物目的
FSCAI	F:TACAGCTGCTCGAAGCTAAGT;R:TTATACAGTGAGGGAAGC	基因克隆
GAPDH	F:TGAGGTCGTCGTTTGAATG;R:AGCTCCAGCTTGAATGTGCT	用作 qPCR 的内参基因
FSCAI - r	F:TCCACCGTCGTCGCCGGA;R:TATGGTGT TTGCTTGCTC	用作 qPCR 的引物序列

1.3 *FsCAI* 基因的生物信息学分析

测序结果经 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 BLAST 比对和开放阅读框(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析,用 DNAMAN 软件进行同源核苷酸和氨基酸序列多重比对分析,确定克隆序列为  $\beta - CAI$ 。利用在线工具 ExPASy Proteomics Server(<http://www.expasy.org>)预测 *FsCAI* 编码蛋白质的理化性质,用 Psipred Server,SWISS - MODEL(<http://swissmodel.expasy.org>)分别对 *FsCAI* 编码蛋白二级结构进行预测和三级结构建模。用 Scan Prosite(<http://prosite.expasy.org/scanprosite>)在线工具预测 *FsCAI* 编码蛋白的 motif 保守序列,并用 Signal P4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测蛋白定位信号。用 WOLF PSORT(<http://wolfpsort.org>)对 *FsCAI* 进行亚细胞定位,用 TMHMM Server v. 2.0 软件([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))预测跨膜区。用 Clustalx,MEGA5.1 构建邻接(Neighbor - Joining)系统发生树。

1.4 荞麦不同器官中 *FsCAI* 实时定量 PCR 分析

在荞麦开花期,选取叶片、主茎和主根作为试验材料,按照“1.2”节的 cDNA 第 1 链合成法分别获得叶片、主茎和主根

cDNA 第 1 链,将 3 种器官的 cDNA 溶液按倍比稀释成相同浓度,再按 SYBR premix Ex *Taq II* 试剂盒说明书操作方法,在 CFX - 96 PCR 仪(Bio - Rad)上进行 qRT - RCR 反应,每个样品至少重复 3 次。反应体系 20  $\mu$ L,含 10  $\mu$ L 2  $\times$  PrimeScript buffer,各 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol 上、下游引物,10 ng cDNA 模板。PCR 反应程序:94 ℃ 30 s,94 ℃ 15 s,退火温度 56~95 ℃,每个循环增加 0.5 ℃,持续 20 s,72 ℃ 延伸 15 s,40 个循环。延伸阶段搜集信号,持续 0.05 s 获得解链温度,采集熔解曲线荧光信号。程序运行结束后,系统自带的 CFX 管理软件根据设定的参数给出结果。qRT - RCR 扩增片段长度均为 150 bp。以三磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)为内参基因(表 1),以叶片中的表达量为对照。

2 结果与分析

2.1 *FsCAI* 全长基因的获得

测序结果表明,目的基因长 1 233 bp,是正确的 *CA* 基因序列。ORF finder 预测发现,该序列具有完整的开放阅读框(ORF),长度为 978 bp,编码 325 个氨基酸残基,详见图 1。

```
3 atgtcgacagcttcattcaccgagcgtccctctcttattctcttcttctcacttgaagaagagatcttgctcctctcttctgctct
M S T A S I H G S C L S Y S L L S S H L K K R S C S S L R S
93 tcgttttttcgttctgtcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
S F F V R A S S S S S S S S S F P S L I R N Q P V I A A P S P
183 atcatcactccaactttgaaggacgatattgcctacgaagaagccattgctgcctcaagaacctctctgttgaggagggtgagctgaa
I I T P T L K D D M A Y E E A I A A L K N L L V E R G E L E
273 gctgaagctgcatcaaaggtatcacagataacgcgcgaactgtcaactccaggtggcagcagcgccctcacatccgaggcagttgagaga
A E A A S K V S Q I T A Q L S T P G G S S T P G L T S E A V E R
363 atcaggccgggttcatccatttcaagaagaaaaatacagagaagaatccagctttgtatgtgtgaacttgccaaaggacaagcccccaag
I K A G F I H F K K E K Y E K N P A L Y G E L A K G Q A P K
453 tttatgtgtgttgcctcagactgcgtgtctgccttcacagctcttgatttcagccggagaggcattgtgtgttcgcaacatt
F M V F A C S D S R V C P S H V L D F Q P G E A F V V R N I
543 gctaacatgttccctgcctatgacaaggttaggtactctgtgttgagctgccattgagtagcggcttctgcatcttaaggtttccaac
A N M V P A C K V R Y S G V G A A I E Y A V L H L K V S N
633 attgttgtgattggacacagtgctgtgtgtgaatcaaaggacttatgtccacccagagaagatctctccgaatccactgacttcattgaa
I V V I G H S A C G G I K G L M S T P E D L S E S T D F I E
723 gactgggtgaagatctgcttgcctgctaaggccaaggtcaaggcagagcatggcgacgccattttctctgaacaatctaccactgtgaa
D W V K I C L P A K A K V K A E H G D A I F S E Q C Y H C E
813 aaggaggcagtgaaatgtttcccttgacacttggtgacataccattgtgagagatggtttgtgaagaagactttggctctcaaggga
K E A V N V S L G H L L T Y P F V R D G L V K K T L A L K G
903 gggtactatgacttcacaaaggctcttctgactctgcagcctcgagtttgcccttagcccttccctcactgtataa 980
G Y Y D F I K G S F E L W S L E F G L S P S L T V *
```

“\*”表示终止子

图 1 *FsCAI* 基因 ORF 与编码的氨基酸

## 2.2 *FsCA1* 编码蛋白的理化性质和高级结构预测

预测 *FsCA1* 的分子式为  $C_{1574}H_{2484}N_{412}O_{470}S_{13}$ , 分子量 35.11 ku; 正电残基 (Arg + Lys)、负电残基 (Asp + Glu) 分别为 34、33 个, 等电点 7.59; 不稳定指数为 50.78, 表明该蛋白不稳定; 脂肪系数 89.75; 亲水性系数 0.023。

预测 *FsCA1* 蛋白的二级结构主要有 4 种类型, 由 9 个  $\alpha$ -螺旋、6 个  $\beta$ -折叠、多个延伸链和无规则卷曲组成。利用 SWISS MODEL 蛋白质在线建模工具 Alignment Model, 以荞麦 *FsCA1* 为目标序列, 以同源性高达 82.38% 的豌豆 CA 蛋白三维结构 (POB; 1ekj. 1. B) 为模板进行同源建模, 建模残基范围 116 ~ 325 个, 目标序列和模板蛋白序列相似性达到 56%。豌豆 CA 蛋白为同型八聚体, 而 *FsCA1* 蛋白三维结构具有丰富的  $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲, 因此推测本研究获得的 *FsCA1* 编码产物也是同型八聚体 (图 2)。



图2 *FsCA1* 蛋白三维结构预测结果

## 2.3 *FsAC1* 编码蛋白信号肽、亚细胞定位和跨膜区的预测

Signal P4.0 软件预测表明, *FsAC1* 的第 1 ~ 25 位氨基酸残基间有 1 个信号肽。用 WoLF PSORT 预测表明, 该蛋白在叶绿体的定位系数为 12.0 (chlo; 12), 在线粒体的定位系数为 2.0 (mito; 2.0), 在其他细胞器官中无分布。据此判断, *FsAC1* 编码蛋白最有可能在叶绿体、线粒体内发挥作用, 或附着在这些细胞器上共同完成。HMMTOP 分析结果显示, 第 192 ~ 214 位氨基酸之间有 23 个氨基酸形成的跨膜区。

## 2.4 *FsAC1* 编码蛋白的 motif 分析

$\beta$ -碳酸酐酶具有 2 个典型的保守区, 保守区 H1: C - [SA] - D - S - R - [LIVM] - x - [AP], 保守序列 L2 [EQ] - [YF] - A - [LIVM] - x(2) - [LIVM] - x(4) - [LIVMF] (3) - x - G - H - x(2) - C - G。 *FsAC1* 序列完全与此符合, 其中保守区 H (第 156 ~ 163 位) 的保守序列为 CSDSRVcP, 保守区 F (第 200 ~ 220 位) 的保守序列为 EYAVlhLkvsnIVViGHsaCG。

## 2.5 不同物种 *AC1* 基因及其编码蛋白的序列同源比对

以 *FsAC1* 基因序列为探针, 通过 BLASTn 同源对比, 发现 9 条与 *FsAC1* 基因相似度较高的序列, 分别为大豆 (*Glycine max*) *GmCA* (XM\_003553786.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtCA1* (NM\_111016.3)、豇豆 (*Vigna unguiculata*) *VuCA* (JQ429799)、黄百合 (*Flaveria brownii*) *FbCA* (FBU08402)、绿豆 (*Vigna radiata*) *VrCA1* (AF139464.2)、豌豆 (*Pisum sativum*) *PsCA* (M63627.1)、线叶黄顶菊 (*Flaveria linearis*) *FICA1* (FLU19738)、甘蓝 (*Brassica oleracea*) *BoCA1* (XM\_003553786.1)、甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) *BnCA* (GQ36780)、鹰嘴豆 (*Cicer atietinum*) *CaCA* (XM\_004489219.1)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) *NtCA* (AF4479.2)、蓖麻 (*Ricinus communis*) *RcCA* (XM\_002524596.1)、亚洲棉 (*Gossypium arboreum*) *GaCA* (KHG255181)、亚麻荠 (*Camelina sativa*) *CaCA1* (XP\_010496563)、日中花 (*Mesembryanthemum nodiflorum*) *MnCA1* (JN228098.1)、川桑 (*Morus notabilis*) *MnCA* (XM\_010110474)、龙眼 (*Dimocarpus longan*) *DICA* (JN033201)、欧洲与美洲山杨杂种 (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*) *PtCA* (PTU838)、胡杨 (*Populus euphratica*) *PeCA2* (XM\_011049011)、富贵草 (*Pachysandra terminalis*) *PtCA* (DQ781308.1)、银合欢 (*Leucaena leucocephala*) *LICA* (KC92476.1)、菠菜 (*Spinacia*) *SpCA* (J05403.1) 和葡萄 (*Vitis vinifera*) *VvCA1* (XM\_002277921.3)。利用 ClustalX、MEGA5.1 软件, 构建 *FsCA1* 和其他物种 *CA1* 编码蛋白的系统进化树, 可见 5 种豆科植物 *CA1* 蛋白序列相似度较高, 明显聚为一类, 除凤科藜亚科的菠菜、番杏科的日中花 *AC1* 序列有一定相似度外, 其他物种均单独成类 (图 3)。

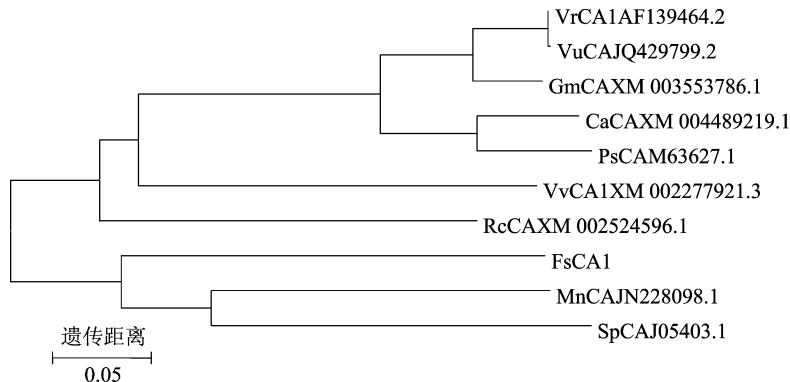


图3 邻接法分析不同植物  $\beta$ -AC 编码蛋白序列的系统发生树

## 2.6 *FsAC1* 基因的组织特异表达分析

荞麦 *AC1* 基因在根、茎、叶中均有表达, 其中叶片中的表达水平最高, 并且明显高于其他器官中的表达量, 在根中的表达水平最低 (图 4)。这与龙眼 *AC1* 基因在根、茎、叶中的表达

特性<sup>[13]</sup>一致。

## 3 讨论

碳酸酐酶 (CA) 普遍存在于绿色植物中, 但物种间 CA 活

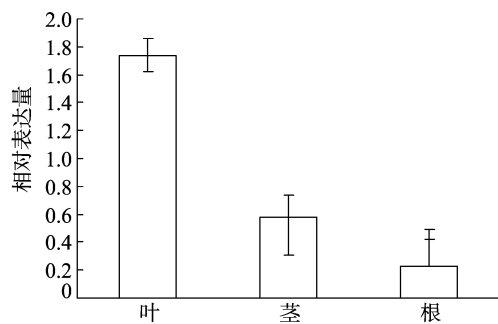


图4 *F5AC1* 基因在荞麦根、茎、叶中的相对表达量

性差别很大。本试验对荞麦 *CA* 基因进行全长克隆和序列分析,通过生物信息学分析、多物种同源序列比对,初步明确了 *F5AC1* 基因编码蛋白的基本特性、高级结构。亚细胞定位和跨膜区预测发现,*F5CA1* 主要定位于叶绿体中,少量分布于线粒体中;组织特异性表达分析印证了上述结果,表明  $\beta$ -*CA* 主要分布在叶绿体叶肉细胞的基质中<sup>[16]</sup>。*F5CAI* 在荞麦绿色组织中的表达丰度显著高于在非绿色组织中,暗示 *F5CA1* 可能与光合作用有关。*F5CA1* 编码蛋白 motif 预测发现 2 个保守序列,具有  $\beta$ -*CA* 典型结构特征,进一步证明 *F5CAI* 编码蛋白是  $\beta$ -*CA*,似乎也支持 *F5CA1* 可能在光合作用中发挥功能的推测。这些结果为深入研究 *F5AC1* 基因奠定了基础。

不同物种 *ACI* 基因序列比对结果显示,荞麦与菠菜的同源性(64%)略高于豌豆(61%),远高于日中花(58%)。有趣的是,根据蛋白序列比对生成的进化树却显示,荞麦 *F5AC1* 却与 *MnCA* 关系最近,其次是菠菜,而与豌豆的进化距离较远。分析蛋白序列发现,荞麦与日中花存在 1 段完全相同的序列(FMVFACSDSRVCPSHVLDLDFQGEAFVVRNIANMVP),与菠菜的片段仅差异 1 个氨基酸(CEKEAVNVSLGHLL-TYPFVRDGLVKKTLALKGGYYDFI),而与豌豆在 2 段蛋白片段上都有差异,分别相差 1、2 个氨基酸。这种同源基因保守序列上的差异可能反映物种的亲缘关系,也可能与蛋白官能团有关,但与预测的 motif 保守序列存在异议,还须进一步论证。根据现有结果推测,荞麦 *CA* 可能由上述 2 个官能团决定功能,*F5CA1* 在功能上可能更接近 *MnCA*。本研究建立 *F5CAI* 编码蛋白的三维结构时,是以已知的同源豌豆 *CA* (POB:1ekj.1.B)为模板的,这可能会带来误差,但是 POB 数据库现存的模板数量有限,未发现与荞麦 *CA* 功能最接近物种的模板,因此,*F5CA1* 三维结构还需进一步完善。

#### 参考文献:

- [1] Hewett - Emmett D, Tashian R E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha -, beta -, and gamma - carbonic anhydrase gene families[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, 5(1): 50 - 77.
- [2] Tems U, Burnell J N. Characterization and expression of the maize  $\beta$ -carbonic anhydrase gene repeat regions[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 945 - 951.
- [3] Deng Q H, Gan L, Fu C H, et al. Comparison of carbonic anhydrase

- activities of several species in *Brassica*[J]. Plant Physiol Commun, 2009, 45(7): 663 - 666.
- [4] Moroney J V, Bartlett S G, Samuelsson G. Carbonic anhydrases in plants and algae[J]. Plant Cell and Environment, 2001, 24(2): 141 - 153.
- [5] 杨 霄, 刘再华, 曹建华, 等. 岩溶区和非岩溶区玉米光合作用与锌含量和碳酸酐酶关系的对比研究[J]. 中国岩溶, 2008, 27(2): 20.
- [6] Tsuzuki M, Miyachi S, Edwards G E. Localization of carbonic anhydrase in mesophyll cells of terrestrial  $C_3$  plants in relation to  $CO_2$  assimilation[J]. Plant Cell Physiol, 1985, 26: 881 - 891.
- [7] Ivanov B N, Ignatova L K, Romanova A K. Diversity informs and functions of carbonic anhydrase interstitial higher plants[J]. Russ J Plant Physiol, 2007, 54(2): 143 - 162.
- [8] Tetu S G, Tanz S K, Vella N, et al. The flaveria bidentis  $\beta$ -carbonic anhydrase gene family encodes cytosolic and chloroplastic isoforms demonstrating distinct organ - specific expression patterns[J]. Plant Physiol, 2007, 144(3): 1316 - 1327.
- [9] 陈 虎, 何新华, 罗 聪, 等. 低温胁迫下龙眼碳酸酐酶基因(*CA*)的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 243 - 252.
- [10] Fabre N, Reiter I M, Becuwe - Linka N, et al. Characterization and expression analysis of genes encoding  $\alpha$  and  $\beta$ -carbonic anhydrases in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Environ, 2007, 30(5): 617 - 629.
- [11] Coleman J R. Carbonic anhydrase and its role in photosynthesis[J]. Adv Photosyn Respiration, 2000, 9: 353 - 367.
- [12] Wang Y Q, Feechan A, Yun B W, et al. S - nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(4): 2131 - 2137.
- [13] Ferreira F J, Guo C, Coleman J R. Reduction of plastid - localized carbonic anhydrase activity results in reduced *Arabidopsis* seedling survivorship[J]. Plant Physiology, 2008, 147(2): 585 - 594.
- [14] Hu H H, Boisson - Dernier A, Israelsson - Nordstroem M, et al. Carbonic anhydrases are upstream regulators of  $CO_2$  - controlled stomatal movements in guard cells[J]. Nature Cell Biology, 2010, 12(1): 87 - 93, S1 - S18.
- [15] Price G D, von Caemmerer S, Evans J R, et al. Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic  $CO_2$  assimilation[J]. Planta, 1994, 193(3): 331 - 340.
- [16] Hoang C V, Chapman K D. Biochemical and molecular inhibition of plastidial carbonic anhydrase reduces the incorporation of acetate into lipids in cotton embryos and tobacco cell suspensions and leaves[J]. Plant Physiology, 2002, 128(4): 1417 - 1427.
- [17] Restrepo S, Myers K L, del Pozo O, et al. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase[J]. Mol Plant - Microbe Interact, 2005, 18(9): 913 - 922.
- [18] Tomiyoshi M, Yasui Y, Ohsako T, et al. Phylogenetic analysis of AG-AMOUS sequences reveals the origin of the diploid and tetraploid forms of self - pollinating wild buckwheat, *Fagopyrum homotropicum* Ohnishi[J]. Breeding Science, 2012, 62(3): 241 - 247.