

专题介绍 Special Topics

植物种子脂氧合酶

汪仁¹ 沈文彪^{1,*} 翟虎渠² 万建民^{1,2,**}

¹南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏省植物基因工程研究中心, 南京 210095; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

Plant Seed Lipoxygenase

WANG Ren¹, SHEN Wen-Biao^{1,*}, ZHAI Hu-Qu², WAN Jian-Min^{1,2,**}

¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Jiangsu Plant Gene Engineering Research Center, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

提要 概述了植物种子脂氧合酶蛋白和编码其基因的特性、各种突变体及其遗传规律、基因表达和调控以及生理功能的研究进展。

关键词 植物种子; 脂氧合酶; 表达; 调控; 功能

脂氧合酶(lipoxygenase, LOX, EC1.13.11.12), 又名亚油酸: 氧化还原酶, 俗称脂肪氧化酶、脂肪加氧酶、脂肪加氧酶或类胡萝卜素氧化酶, 广泛存在于哺乳动物、植物和微生物中^[1~3]。从生化的角度看, 它是一种含非血红素铁或锰的加氧酶, 专一催化包括亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸在内具有顺、顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸及其相应酯的加氧反应, 从而生成具有共轭双键的脂氢过氧化物(hydroperoxides, HPOD), HPOD 再进一步代谢为其它生理活性物质; 此外, 某些植物 LOX 同工酶也能催化类胡萝卜素、叶绿素等化合物的共氧化反应形成其它次生产物。近年来, 植物种子 LOX 引起了植物学界的广泛兴趣, 而其基因表达和调控也已经成为研究真核生物基因表达的模式系统^[4,5]。本文概述这一问题的研究进展。

1 植物种子 LOX 蛋白的特性

1.1 分布 目前, 已在大豆、拟南芥、花生、黄瓜、大麦、水稻、豌豆和番茄等植物种子中均发现 LOX 的存在, 其活性随植物种类和种子的不同发育进程而变化。亚细胞定位的研究表明, 植物种子 LOX 主要存在于脂体、液泡、微粒体、叶绿体、质膜及胞浆。例如, 大豆和黄瓜中的 LOX 既可以以可溶性的形式存在于胞浆和液泡中, 也可以以跨膜蛋白的形式存在于脂体膜和质膜上^[4,5]。

1.2 分类 与动物LOX往往以花生四烯酸(20个碳)为底物所不同的是, 18个碳的亚油酸和亚麻酸则是植物种子 LOX 催化反应中常见的底物。因此, 根据催化亚油酸分子中单加氧位置的不同, 植物种子 LOX 又划分为3种类型: 第 I 类主要生成 13-*L*-氢过氧基-9,11(*Z,E*)-十八碳二烯酸[13-*L*-hydroperoxy-9,11(*Z,E*)-octadecadienoic acid, 13-HPOD, 又称为 13-氢过氧化亚油酸], 被命名为 13-LOX; 第 II 类则生成基本等量的 13-HPOD 和 9-*D*-氢过氧基-10,12(*E,Z*)-十八碳二烯酸[9-*D*-hydroperoxy-10,12(*E,Z*)-octadecadienoic acid, 9-HPOD, 又称为 9-氢过氧化亚油酸], 称为 9/13-LOX; 第 III 类则主要生成 9-HPOD, 也被命名为 9-LOX。因此, 植物的 13-LOX 也相当于动物中的 15-LOX^[4,5]。

1.3 结构特征 无论是动物还是植物 LOX(例如大豆 LOX、兔网状红细胞 15-LOX 和人 5-LOX 等)均包含 1 个非血红素铁或锰作为活性中心的催化成分, 1 个水分子和 5 个氨基酸残基作为铁/锰配基。5 个

收稿 2004-08-20 修定 2004-12-20

资助 科技部转基因专项(JY03-13-07)、“863”计划(2001AA241019)和科技部成果转化项目(03EFN216900272)。
*共同作者。

** 通讯作者(E-mail: wanjm@njau.edu.cn, Tel: 025-84395516)。

配基包括羧基末端的异亮氨酸(或缬氨酸)羧基上的氧、 α -螺旋9和 α -螺旋18上2个和1个组氨酸残基上的氮原子,最后一个配基是 α -螺旋18天门冬酰胺(丝氨酸)残基上远端的氧原子。其中,含有非血红素铁的的植物种子LOX酶分子中则也包括2-His-1-羧基化的三分体结构,其铁配基至少包含2个组氨酸残基上的氮、天门冬酰胺和羧基末端的异亮氨酸残基上的氧原子(图1)。

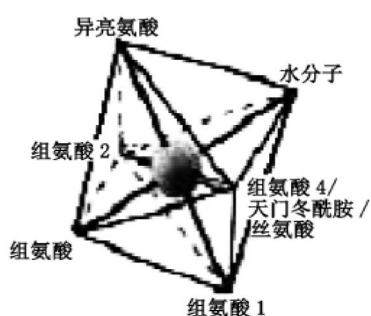


图1 植物LOX中与非血红素铁相连接的配基^[1]

LOX活性中心的非血红素铁与其催化能力密切相关^[6]。例如,无催化活性的大豆种子LOX休止状态(resting state)是无色的,非血红素铁以高自旋Fe(II)形式存在。当被等量的脂氢过氧化物氧化时,大豆种子LOX转变为有活性的浅黄色,在g=6处有一典型的高自旋Fe(III)电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)信号,表明非血红素铁又变为Fe(III)。进一步氧化后,还出现g=4.3的EPR信号,LOX为紫红色;一般认为,这种形式是不稳定的,容易衰变为浅黄色的活性形式,并与处理温度有关。扩展X-射线吸收精细结构(extended X-ray absorption fine structure, EXAFS)的结果表明,大豆种子L-1非血红素铁形成6个配位键,其中4个与咪唑氮,2个可能与来源于羧基中的氧,与默斯堡光谱的结论也是一致的^[6]。

此外,大豆种子LOX-1也可以以亚油酸的顺、反和反、顺两种类型的异构体作为底物,表明其活性中心在容纳底物时具有相对的可塑性。同时,通过对植物种子LOX的三维结构分析还发现,其包含1个小的氨基末端 β -桶结构域和1个大的羧基末端催化结构域。虽然 β -桶结构域的功能不明,但一般认为其同脂的结合以及膜的转运

有关^[1]。

1.4 酶学特性 同一种植物中不同区域化分布的种子LOX的酶学特性也是不同的。一般来说,植物种子LOX分子量为90~100 kD,且由单条多肽链组成^[5]。目前,有关大豆LOX的酶学特性研究比较详细。大豆种子中LOX具有3种同工酶类型,命名为LOX-1/2/3。由于大豆种子LOX在催化反应中,不仅能生成具有共轭双键的HPOD,还能继续分解产生醛、酮等具有挥发性物质,使豆制品产生豆腥味^[7]。大豆种子中的LOX都是球形的水溶性蛋白。进一步研究发现,大豆LOX-1/2/3的等电点分别为5.65、5.85和6.15,反应最适pH在9.0、6.5和7.0。LOX-1属于13-LOX,LOX-2/3为9/13-LOX^[5, 6]。此外,大豆LOX还能催化次生反应,例如,参与胡萝卜素的漂白作用^[8]。与大豆相类似,在水稻米糠和种胚中也发现了3种LOX同工酶,分别定名为LOX-1/2/3。属于第II类的LOX-2是种子萌发过程中的主要同工酶,而属于第III类的LOX-3在种子发育过程中大量表达,占收获后水稻种子LOX总活性的80%以上^[9]。另一方面,植物种子LOX也是重力因素的靶酶。例如,空间微重力可以使大豆LOX-1的表观 K_m 降低到对照的约25%,但对 k_{cat} (catalytic rate constant, 酶催化反应速度常数,指单位时间内每个催化中心催化的反应数)无明显影响,因此提高了LOX-1的催化效率(k_{cat}/K_m)约4倍^[10]。

2 植物种子LOX的生理功能

2.1 催化种子萌发过程中储藏脂的降解 储藏脂的转运和降解是植物种子萌发过程中的重要生理生化代谢,而定位在脂体(lipid body,也称油体, oil body)膜上的LOX则是其中的限速酶^[4]。已经知道,脂体是一种由磷脂单分子层包裹的储藏甘油三酯的球体结构,也是储藏脂主要聚集的细胞器。在油料作物种子萌发过程中,脂体中储藏脂的降解为以后的幼苗生长和发育提供充足的碳源。

在油料作物种子萌发过程中,脂体的组成成分也会发生明显的改变。例如,种子休眠时,在脂体膜上可以明显发现存在有油体蛋白和钙油体蛋白两种结构蛋白;而萌发过程启动后,脂体膜上至少还能新检测到13-LOX、木瓜蛋白酶类型的磷

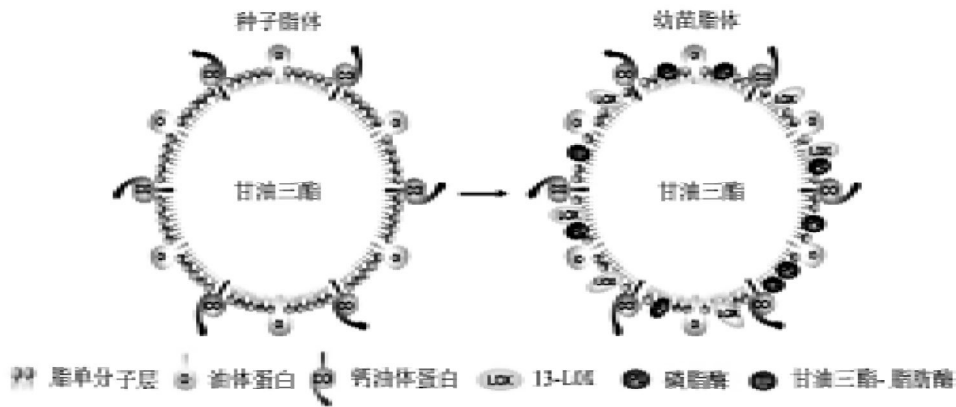


图2 植物种子萌发过程中脂体组成成分的变化^[4]

脂酶和甘油三酯-脂肪酶3种酶的活性,暗示这3种新蛋白在脂体膜的锚定以及具有的催化活性可能是启动萌发过程中储藏脂降解的关键因素(图2)^[4]。

Feussner等^[4]进一步研究发现,种子中储藏脂的降解除不依赖于LOX的氧化途径外,还包含有依赖于13-LOX的途径(图3),其中底物也可以是多元不饱和脂肪酸的酯类化合物。例如,在黑暗条件下的油料种子萌发过程中,储藏脂首先从

子叶的脂体中被转运出去,释放的游离脂肪酸再经过 β -氧化而彻底降解。在萌发的黄瓜种子的脂体中存在的LOX能够专一催化多元不饱和脂肪酸酯的加氧反应,从而产生带有1、2或3个13-HPOD残基的甘油三酯,氧化的脂肪酸可以优先从脂体上裂解并释放到胞浆中^[4]。

2.2 合成传递生物胁迫和非生物胁迫信息的信号分子 植物种子LOX的催化产物脂氢过氧化物及其

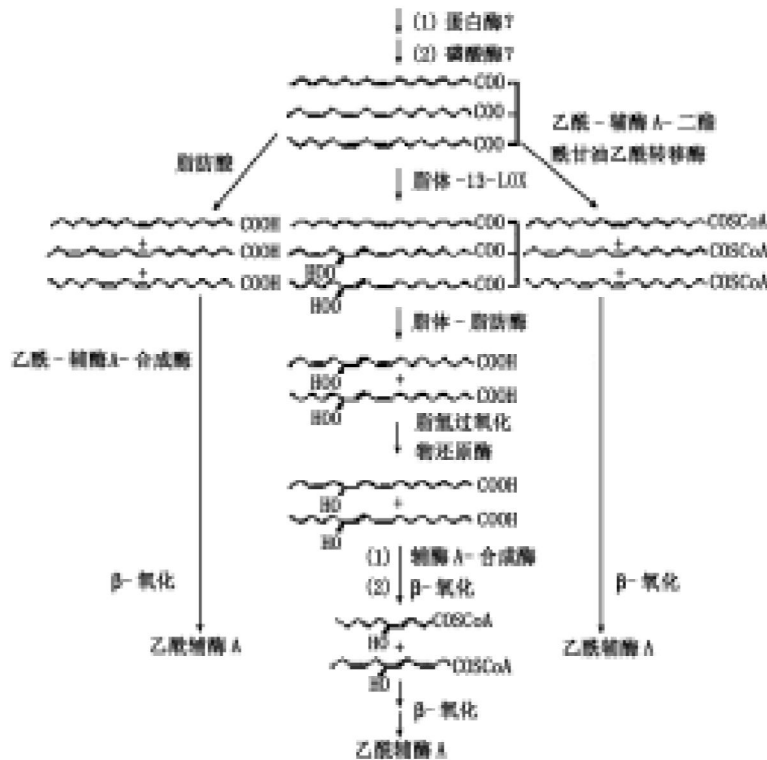


图3 植物种子萌发过程中储藏脂的降解途径^[4]

次生产物也可以进一步降解为传递生物胁迫和非生物胁迫信息的信号分子, 包括创伤素、植物二烯酸(phytodienoic acid, PODA)、茉莉酸甲酯(MeJA)/茉莉酸(JA)和脱落酸(ABA)等^[5]。通常, 植物种子中的LOX在外源伤害和病原菌感染时表达增强, 而降低其活性则可提高对昆虫和真菌病害的敏感性^[2,4]。例如, 花生种子受曲霉(*Aspergillus* spp.) 侵染后, 可显著诱导 *PnLOX1* 的表达, 而 *PnLOX1* 催化的产物为 13/9-HPOD, 其中 13-HPOD 是真菌毒素合成的抑制剂, 9-HPOD 则是真菌毒素合成的诱导剂, 表明种子 LOX 也可能参与植物和真菌的互作^[11,12]。

2.3 产生植物特有的风味物质 水稻种子LOX-3可以催化具有挥发性的己醛、戊醛和戊醇等羰基类低分子化合物的合成, 从而产生与稻米陈化变质有关的陈米霉味; 而LOX-3的缺失不仅可以明显阻止稻谷贮藏期间不饱和脂肪酸的过氧化水平, 而且可以明显降低陈化气味^[13]。此外, 在番茄果实成熟过程中至少存在有3种LOX基因, 分别为 *TomloxA/B/C*, 并具有不同的调控方式。Hatanaka^[14]进一步研究发现, LOX的催化产物还可能与番茄果实特有的风味形成有关, 这包括C6的醛类和醇类物质等; 同时, 这些物质也可以作为抗病信号分子。

2.4 调控营养器官的生长发育进程 *POTLX-1*是马铃薯中具有块茎专一性表达的LOX基因, 其编码产物具有9-LOX的活性, 原位杂交也证实其主要是在发育的块茎中表达, 而转反义基因的马铃薯植株, 其块茎的产量明显下降, 而且形状是畸形的。这暗示 *POTLX-1* 参与控制块茎的发育和生长, 并可能与LOX的产物——羟脂(oxylin)有关。此外, 也不排除LOX调控种子萌发和根瘤发育的可能性^[4]。

2.5 可能作为储藏蛋白 在出现贫血症状的兔网织红细胞中, 15-LOX是除了血红蛋白以外含量最大的蛋白质。非常有意义的是, 非种子表达的植物LOX也可以作为营养生长储藏蛋白(vegetative storage protein, VSP)形式存在。例如, 定位在大豆叶肉细胞液泡中的营养器官储藏蛋白就是LOX。大豆种子发育过程中的3种LOX含量占到

全部可溶性蛋白的1%, 而这在萌发的早期就完全消失, 同时在子叶中则出现3种新的LOX同工酶, 组织区域分布的结果也表明它们均不定位在脂体膜上, 也不参与储藏脂的降解。与正常材料相比, *Lox* 双元和三元缺失大豆品系的农艺形状并没有明显的变化。上述结果也暗示植物种子LOX也可能具有种子储藏蛋白的功能^[5]。

3 植物种子LOX突变体及其遗传规律

目前, 大豆种子LOX的各种突变体及其遗传规律的研究比较深入。20世纪80年代早期^[15~17]就发现分别由隐性等位基因 *lox-1*、*lox-2*和*lox-3*控制的大豆种子LOX-1、LOX-2和LOX-3缺失的品系, 以后又分别发现了 *Lox* 双元和三元缺失的品系。研究发现, 上述各品系的耐储性明显提高, 其它农艺性状无明显变化^[17~19]。遗传分析结果表明, *lox-1*和*lox-2*位点是紧密连锁的, *lox-3*位点则是独立的。并且, 陆续克隆了控制大豆种子LOX-1、LOX-2和LOX-3表达的结构基因——*Lox-1*、*Lox-2*和*Lox-3*, 不过一开始并不太清楚相应的隐性等位基因是属于调节位点等位基因还是属于结构基因^[18]。

通过对缺失体材料的研究, 不仅可以探讨表现型与基因型的关系, 而且能了解缺失对基因表达调控的影响。Wang等^[19]进一步的分子机理研究表明, 大豆LOX-1和LOX-3的缺失与相应的结构基因转录本的存在是相对应的。而在LOX-2缺失体却发现了 *Lox-2* 转录本的存在, 暗示 *Lox-2* 与 *lox-2* 碱基序列差异很小, 而且LOX-2的缺失可能是与转录后加工和翻译水平有关。序列分析表明, *Lox-2* 与 *lox-2* 的差异只有两处, 其中在2557~2559碱基处插入了GAA, 编码氨基酸为Glu852, 但与LOX-2缺失关系不大。另一处是在1596碱基处的单碱基颠换(T→A), 结果导致错义突变, 即LOX-2与铁离子形成中心配基的His532替换成Gln532。研究表明, *Lox-2* 中单碱基颠换并不会影响其基因表达, 但能显著影响LOX-2结构与功能, 包括导致结构畸变及活性丧失, 当然也不能排除为泛素(ubiquitin)或其它蛋白水解系统提供作用位点的可能性。Western印迹和酶学分析也确实证明, LOX-2缺失品系种子成熟中期的 *lox-2* 编码产物是部分失活的酶, 而后期LOX-2的活性完全

丧失则与蛋白质降解有关^[19]。另一方面, 大豆种子 LOX-1 和 LOX-3 缺失的分子机理却是不一样, 可能与 *Lox-1* 和 *Lox-3* 结构基因 5' 调节区域的小片段改变有关, 从而最终导致转录和转录加工的下降或关闭以及酶活性的丧失^[20, 21]。

此外, 水稻种胚中也存在 3 种 LOX 同工酶 LOX-1、LOX-2 和 LOX-3, 其中 LOX-3 在种胚中的表达量最高, 占 3 种同工酶总表达量的 90% 以上^[22]。通过配制水稻 LOX-3 的缺失体材料 Daw Dam 与有正常 LOX-3 活性的水稻品种的杂交组合来研究 LOX-3 缺失的遗传规律, 结果发现水稻 LOX-3 的缺失是受单隐性孟德尔基因控制^[23]。

同样, 在豌豆种胚中也存在 LOX 的 3 个同工酶。Forster 等^[24]在豌豆品种中鉴定到一个 LOX-2 缺失的品系。将该突变体表型渗入到一个普通豌豆品种 Birte 中, 从而创造缺失或不缺失 LOX-2 的近等基因系。基因型分析表明, 该突变体也是由一个单隐性的孟德尔基因所控制。

4 植物种子 LOX 基因的特性、表达与调控

4.1 特性 所有的 *Lox* 属于一个基因家族。动物和植物的比对结果表明, 它们的 *Lox* 同源性仅达到 21%~27%, 而在特定的区域则达到 40% 或以上。同样, 即使是属于同一类型的 *Lox*, 同源性也不会超过 30%。有关克隆的作物种子 LOX 基因的特性见表 1。

4.2 表达与调控 源库比、MeJA/JA、ABA 以及各种生物胁迫和非生物胁迫均可以诱导植物 LOX 基因的表达, 并具有器官和发育特异性的特点。研究表明, 在植物种子发育(胚形态建成)和萌发过程中均存在有各种 LOX 编码基因表达的现象。例如, 在开花后 20~40 d 的大麦籽粒糊粉层/胚乳中, *Lox1* 呈低水平表达; 相反, 在发育过程中的种胚, 其表达量则比较高, 在开花后 30 d 达到最高。融合表达实验表明, 与 *Lox1* 种胚专一性表达有关的必要启动子或增强子位于 -129~-75 处。Boille 等^[35]发现, 分别编码叶绿体和类囊体蛋白的 3 个菠菜核基因 (*PetH*、*PetE* 和 *PsaF*) 5' 非翻译前导序列中, 均包含与控制调节组织特异性表达中数量有关的元件。他们进一步研究表明, 大麦种子 *Lox1* 5' 前导序列中确实包含与调节组织特异性表达中的数量有关的顺式作用元件。此外, 大麦种胚 *Lox1* 的表达调控是一个高度复杂的组织与时空表达模式, 并与叶片 *Lox* 对伤害和 MeJA 的响应模式是相类似的, 其中 *Lox1* 种胚特异性表达的顺式作用元件位于 5' 前导序列, 而 MeJA 响应元件则位于 TATA 盒的上游^[36]。此外, 在种子萌发过程中, *Lox* 的表达主要集中在幼苗和子叶, 大约能持续几小时到几天, 并能受 JA、ABA 以及包括伤害、水分胁迫、病原菌侵染等各种生物胁迫和非生物胁迫所诱导, 而在成熟的植

表1 已经克隆的作物种子LOX基因(截止2004年4月)

材料	名称	GenBank登陆号	表达部位	产物专一性	文献
大豆	<i>Lox-1</i>	J02795	发育的种子	13-LOX	15
	<i>Lox-2</i>	J03211	发育的种子	9/13-LOX	16
	<i>Lox-3</i>	X06928	发育的种子	9/13-LOX	17
	<i>LoxA</i>	U04785	萌发的种子		11
	<i>LoxD</i>	U04526	萌发的种子	13-LOX	11
拟南芥	<i>Lox-1</i>	L04637	萌发的种子		12
	<i>Lox-2</i>	L23968	萌发的种子		25
花生	<i>PnLox1</i>	AF231454	发育的种子	13-LOX	26
黄瓜	<i>CSLBLox</i>	X92890	萌发的种子	13-LOX	27
大麦	<i>LoxA</i>	L35931	发育和萌发的种子		28
	<i>LoxC</i>	L37358	发育和萌发的种子		29
水稻	<i>L-2</i>	X64396	萌发的种子	13-LOX	30
豌豆	<i>Lox1:Ps:1</i>	AF098918	萌发的种子		31
	<i>Lox1:Ps:2</i>	X78580	发育的种子	13-LOX	32
	<i>Lox1:Ps:3</i>	X78581	发育的种子	9/13-LOX	33
番茄	<i>LoxA</i>	U09026	萌发的种子		34

株中也发现类似的现象^[37, 38]。

14-3-3 蛋白是植物前体蛋白(precursor proteins)折叠与运输过程中的分子伴侣和磷酸化/脱磷酸化中的接头蛋白, 在信号转导、逆境应答以及细胞周期调控中也起着十分重要的调控作用^[39]。已经发现, 植物14-3-3蛋白所具有的代谢调节开关功能与其不同的分子类型和相对应的靶蛋白(例如, 质膜H⁺-ATPase、硝酸还原酶、蔗糖磷酸合酶、LOX、咖啡酸O-甲基转移酶和抗坏血酸过氧化酶等)结合有关^[40]。例如, 在大麦种子萌发过程的胚组织中, 就存在有14-3-3 A、B和C 3种类型。Holtman等^[39]采用免疫沉淀反应和表面等离子体谐振(surface plasmon resonance, SPR)技术, 发现大麦种子中只有13-LOX(Lox-2)能以浓度依赖性的形式结合14-3-3 A、B和C, 并与LOX-2蛋白中的PKPSDSKP基序有关, 暗示LOX通过与14-3-3的互作从而涉及植物种子脂质的降解和对生物或非生物胁迫的应答, 而后者可能与种子13-LOX催化合成的创伤素和JA有关。

5 结语

不同类型植物的种子LOX基因表达和调控非常复杂, 14-3-3蛋白通过与种子13-LOX的结合来调控其活性的发现即暗示种子13-LOX酶活性调节的复杂性。此外, 尽管对植物种子发育过程中表达的LOX功能已经有了一个初步的轮廓, 但是其明确的生理意义还有待进一步阐明^[41]。从现有研究结果来看, 今后植物种子LOX的研究热点可能是: (1)种子中9-LOX和13-LOX的生理功能有哪些差异? 能否通过定点突变的方法来改变种子LOX加氧部位的专一性^[42]? (2)种子中编码9-LOX和13-LOX基因的表达调控和信号转导途径有哪些不同? 为什么某些LOX基因具有种子发育和萌发的特异性? (3)种子LOX是否可以作为储藏蛋白? 是否有一定的普遍性? (4)发育过程中的作物种子LOX与不良气味的关系及其分子机制如何? 这些均值得进一步探讨。

参考文献

- 1 Brash AR. Lipoxygenase: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem*, 1999, 274(34): 23679~23682
- 2 Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 275~297
- 3 Oliw EH. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002, 68: 313~323
- 4 Feussner I, Kühn H, Wasternack C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(6): 268~273
- 5 Siedow JN. Plant lipoxygenase: Structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 42: 145~188
- 6 Rajewala DA, Pamela JR, Chris EC et al. The environment of the lipoxygenase iron binding site explored with novel hydroxypyridinone iron chelators. *J Biol Chem*, 1996, 271(14): 7965~7972
- 7 Robinson DS, Wu Z, Domoney C et al. Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chem*, 1995, 54: 33~43
- 8 Wang CX, Croft KP, Järlfors U et al. Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. *Plant Physiol*, 1999, 120(1): 227~235
- 9 Ida S, Masaki Y, Morita Y. The isolation of multiple forms and product specificity of rice lipoxygenase. *Agr Biol Chem*, 1983, 47(3): 637~641
- 10 Maccarrone M, Bari M, Battista N et al. The catalytic efficiency of soybean lipoxygenase-1 is enhanced at low gravity. *Biophys Chem*, 2001, 90: 97~101
- 11 Park T, Holland MA, Laskey JG et al. Germination-associated lipoxygenase transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. *Plant Sci*, 1994, 96(1~2): 109~117
- 12 Melan MA, Dong X, Endara ME et al. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 1993, 101(2): 441~450
- 13 Suzuki Y, Yasui T, Matsukura U et al. Oxidative stability of bran lipids from rice [*Oryza sativa* (L.)] lacking lipoxygenase-3 in seeds. *J Agr Food Chem*, 1996, 44: 3479~3483
- 14 Hatanaka A. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 1993, 34: 1201~1218
- 15 Shibata D, Steczko J, Dixon JE et al. Primary structure of soybean lipoxygenase-1. *J Biol Chem*, 1987, 262(21): 10080~10085
- 16 Shibata D, Steczko J, Dixon JE et al. Primary structure of soybean lipoxygenase-2. *J Biol Chem*, 1988, 263(14): 6816~6821
- 17 Yenofsky RL, Fine M, Liu C. Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. *Mol Genet*, 1988, 211: 215~222
- 18 Steczko J, Donoho GP, Clemens JC et al. Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: Functional consequences of their replacement. *Biochem*, 1992, 31: 4053~4057
- 19 Wang WH, Takano T, Shibata D et al. Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: Substitution of glutamine for an iron-ligand histidine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5828~5832
- 20 Start WG, Ma Y, Polacco JC et al. Two soybean seed

- lipoxygenase nulls accumulate reduced levels of lipoxygenase transcripts. *Plant Mol Biol*, 1986, 7: 11~23
- 21 Wang WH, Kato T, Takano T et al. Two single-base substitutions involved in altering in a paired-box of AAATAC in the promoter region of soybean lipoxygenase L-3 gene impair the promoter function in tobacco cells. *Plant Sci*, 1995, 109: 67~73
- 22 Suzuk Y, Matsukura U. Lipoxygenase activity in maturing and germinating rice seeds with and without lipoxygenase-3 in mature seeds. *Plant Sci*, 1997, 125: 119~126
- 23 Suzuki Y, Yasui T, Okuno K. Genetic analysis of null-allele for lipoxygenase-3 in rice seeds. *Euphytica*, 1996, 91: 99~101
- 24 Forster C, North H, Afzal N et al. Molecular analysis of a null mutant for pea (*Pisum sativum* L.) seed lipoxygenase-2. *Plant Mol Biol*, 39: 1209~1220
- 25 Bell E, Mullet JE. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol*, 1993, 103(4): 1133~1137
- 26 Burow GB, Gardner HW, Keller NP. A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(5): 689~701
- 27 Hohne M, Nellen A, Schwennesen K et al. Lipid body lipoxygenase characterized by protein fragmentation, cDNA sequence and very early expression of the enzyme during germination of cucumber seed. *Eur J Biochem*, 1996, 241(1): 6~11
- 28 Van Mechelen JR, Smits M, Douma AC et al. Primary structure of a lipoxygenase from barley grain as deduced from its cDNA sequence. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1254(2): 221~225
- 29 Van Mechelen JR, Schuurink RC, Smits M et al. Molecular characterization of two lipoxygenases from barley. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(6): 1283~1298
- 30 Ohta H, Shirano Y, Tanaka K et al. cDNA cloning of rice lipoxygenase L-2 and characterization using an active enzyme expressed from the cDNA in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1992, 206(2): 331~336
- 31 Wisniewski JP, Gardner CD, Brewin NJ. Isolation of lipoxygenase cDNA clones from pea nodule mRNA. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 775~783
- 32 Forster C, Knox M, Domoney C et al. *lox1:Ps:2*, a *Pisum sativum* seed lipoxygenase gene. *Plant Physiol*, 1994, 106(3): 1227~1228
- 33 Knox M, Forster C, Domoney C et al. Structure of the *Pisum sativum* seed lipoxygenase gene *lox1:Ps:3*. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1214(3): 341~343
- 34 Ferrie BJ, Beaudoin N, Burkhart W et al. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol*, 1994, 106(1): 109~118
- 35 Bolle C, Spory S, Lubberstedt T et al. Segment encoding 5' untranslated leaders of genes for thylakoid proteins contain *cis*-elements essential for transcription. *Plant J*, 1994, 6: 513~523
- 36 Rouster J, Mechelen JV, Cameron-Mills V. The untranslated leader sequence of the barley lipoxygenase 1 (*Lox1*) gene confers embryo-specific expression. *Plant J*, 1998, 15(3): 435~440
- 37 Porta H, Rueda-Benítez P, Campos F et al. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40(8): 850~858
- 38 Schmitt NF, Van Mechelen JR. Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains. *Plant Sci*, 1997, 128: 141~150
- 39 Holtman WL, Roberts MR, Oppedijk BJ et al. 14-3-3 proteins interact with a 13-lipoxygenase, but not with a 9-lipoxygenase. *FEBS Lett*, 2000, 474: 48~52
- 40 Finnie C, Borch J, Collinge DB. 14-3-3 proteins: Eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 545~554
- 41 Feussner I, Balkenhohl TJ, Porzel A et al. Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 21635~21641
- 42 Hornung E, Walther M, Kühn H et al. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenase species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4192~4197