

2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶基因*F6'H1*促进拟南芥叶片衰老

胡有贞^{1,2,*}, 王雅欣²

¹华东师范大学生命科学学院, 上海200241; ²美国康奈尔大学园艺系, 美国纽约州伊萨卡14853

摘要: 拟南芥2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶基因*F6'H1*缺失突变体*f6'h1*出现叶片衰老延迟表型。利用根癌农杆菌介导的花序浸染法转化拟南芥, 再以抗性筛选方法获得了*F6'H1*基因诱导过量表达拟南芥植株, 地塞米松(DEX)喷施处理24 h能显著诱导*F6'H1*基因上调表达, *F6'H1*基因的过量表达使转基因拟南芥叶片衰老提前。结果表明, 拟南芥2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶基因*F6'H1*正向调控叶片衰老。

关键词: 拟南芥; 2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶基因*F6'H1*; 叶片衰老

2-Oxoglutarate Dependent Dioxygenase Gene *F6'H1* of *Arabidopsis thaliana* Promote Leaf Senescence

HU You-Zhen^{1,2,*}, WANG Ya-Xin²

¹School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China; ²Department of Horticulture, University Cornell, Ithaca, New York 14853, USA

Abstract: 2-oxoglutarate dependent dioxygenase gene *F6'H1* knockout mutant *f6'h1* exhibited significantly delayed leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. A dexamethasone (DEX, a synthetic glucocorticoid) inducible overexpression system containing the *F6'H1* gene was transformed into wild-type plants through floral dipping method, which was mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The transgenic plants resistant to hygromycin and kanamycin were obtained. The transcription of *F6'H1* in transgenic leaves was increased after DEX spraying whole plant. Comparing with the wild-type plants, the precocious leaf yellowing were observed 5 d after the DEX treatment in *F6'H1* inducible overexpression lines. Taken together, 2-oxoglutarate dependent dioxygenase gene *F6'H1* positively regulate leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; 2-oxoglutarate dependent dioxygenase gene *F6'H1*; leaf senescence

2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶(2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2OGD)是一类含非血红素铁的可溶性蛋白, 定位于细胞质(Hegg和Que 1997)。2OGD基因超家族遍布生物界, 在微生物、真菌、哺乳动物以及植物中都有报道, 主要参与DNA修复、胶原蛋白的生物合成、抗生素的生物合成和胁迫响应等(Aravind和Koonin 2001)。植物基因组中2OGD为第二大蛋白酶家族, 在多种生理过程中起作用, 包括DNA去甲基化、脯氨酸羟化、植物激素以及植物次级代谢物的生物合成等(Grotewold 2006; Hedden和Thomas 2012)。根据基因功能将植物2OGD分为3个亚族: DOXA、DOXB和DOXC, 其中大多数陆生植物的2OGD基因属于DOXC亚族。拟南芥和水稻中的2OGD基因超过100个, 说明植物2OGD基因对植物素通过特殊代谢进行的氧化修饰具有重要贡献, 但由于不同物种的2OGD氨基酸序列保守性不高, 且具有

底物专一性, 因此其家族基因的具体功能相当纷繁复杂。目前报道的DOXC亚族基因成员大多是植物激素以及黄酮类物质的合成或分解代谢关键酶。如拟南芥和水稻的C19-GA 2-氧化酶(C19-GA 2-oxidase)催化赤霉素的分解代谢(Thomas等1999), 1-环基丙烷羧酸氧化酶(1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidase, ACCO)参与乙烯合成(Hamilton等1991), 水稻2OGD双加氧酶(dioxygenase for auxin oxidation, DAO)将IAA催化成为无生物活性的2-氧化吲哚-3-乙酸(Zhao等2013)。

前人研究表明拟南芥中DOXC亚族的阿魏酰-

收稿 2015-06-16 修定 2015-09-15

资助 国家留学基金委员会(留金发[2012]3013)。

致谢 康乃尔大学园艺系Susheng Gan教授为本研究提供指导和研究条件, 华东师范大学生命科学学院许玲教授在文章撰写方面给予宝贵建议。

* 通讯作者(E-mail: hyz1106@126.com; Tel: 021-54341012)。

辅酶A-6-羟化酶(F6'H1)是香豆素东茛菪内酯合成的限速酶(Li等2010)。但该基因在拟南芥生长中发挥的生理作用却没有明确定论。本实验室根据拟南芥衰老叶片基因芯片数据对预测的衰老相关基因突变体进行筛选,发现F6'H1基因缺失突变体*f6'h1*与野生型相比,呈现出莲座叶片黄化延迟的表型,并且在野生型拟南芥中诱导过量表达F6'H1基因能够加速叶片衰老。据此,我们推测F6'H1基因可能通过某种方式调控着拟南芥的叶片衰老。

植株衰老是植物生长发育的最后一步,由内部遗传因素和外部环境共同控制,是植物细胞程序化死亡的一种类型。植物衰老最明显的外观标志是叶片由绿变黄直到脱落(梁秋霞等2006)。因此探讨F6'H1基因对拟南芥叶片衰老的影响将为进一步解析F6'H1基因在拟南芥衰老过程的分子机理奠定基础,同时也为利用基因工程技术调控植物衰老关键基因提供靶位点,从而达到高效改良植物性状和品质的目的。

材料与amp;方法

1 实验材料

本研究使用的植物材料拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh]野生型Columbia (Col)及拟南芥突变体*f6'h1* (SALK-005264),种子从美国拟南芥生物学资源中心(ABRC, Columbus, OH, USA)购得。

2 材料处理

拟南芥种子经70%乙醇(含0.01% TritonX)消毒处理后在1/2MS培养基上4 °C放置2~3 d,移至光下萌发培养7 d,幼苗移入花盆中培养。植物培养室温度为22 °C,空气湿度60%,光源为日光灯(光照强度为110 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。培养40 d后测定各个项目。

F6'H1的基因诱导过量表达拟南芥经30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松(dexamethasone, DEX)溶液(含0.01% TritonX-100)喷施处理后,分别于0、3、6和24 h取样检测基因转录水平,喷施5 d后拍照。

3 实验方法

3.1 *f6'h1*突变体的分子鉴定

采用CTAB法(Jia等2002)分别提取野生型拟南芥和*f6'h1*突变体基因组DNA,以在线引物设计软件T-DNA primer design (<http://signal.salk.edu/td->

[naprimers.2.html](http://signal.salk.edu/td-naprimers.2.html))设计LP、RP和BP、LB/RB引物,扩增T-DNA插入位点附近的F6'H1基因组序列(1 132 bp),引物BP/RB扩增T-DNA及其后一段F6'H1基因组序列(800 bp左右)。

采用Trizol试剂盒(Invitrogen)分别提取野生型拟南芥和*f6'h1*突变体植株叶片中总RNA,用M-MLV反转录试剂盒(TaKaRa)将RNA反转录为cDNA,RT-PCR用F6'H1的特异上游引物Semi F和下游引物Semi R进行PCR扩增。

3.2 叶片衰老相关的生理生化检测

叶片的离子渗透率测定参考王玉等(2014)的抽气法测定。叶绿素(chlorophyll, Chl)含量测定参照邹琦(1995)的方法进行,分别测定待测样品在649和665 nm波长下的吸光值,以95%乙醇为空白对照。

叶片光合速率的测定使用便携式叶绿素荧光仪(OS1-FL; Opti-Sciences)进行,采用其中检测模式1 (fluorometer's test mode 1)直接定量检测叶片荧光,换算后获得光合速率 F_v/F_m 的测定值。

叶片衰老相关生理生化检测柱状图显示平均值 \pm 标准差,每个数据有3个重复,由Tukey's HSD检测分析。

3.3 F6'H1基因诱导表达质粒的构建及其转化拟南芥

以CTAB法提取获得野生型拟南芥的基因组DNA作为模板,以引物Induced F和Induced R进行PCR扩增SAG203基因表达框(含内含子),PCR参数为:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 30个循环; 72 °C 7 min。琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段,依照Invitrogen公司DNA凝胶回收试剂盒说明书进行回收。回收后的目的片段构建到pGEM-T Easy vector (Promega)上,通过SpeI、SbfI双酶切和SbfI补平构建到经过SpeI、PstI双酶切且补平PstI的pGL1152载体上。壮观霉素(Spe)抗性筛选阳性菌落,经PCR鉴定正确后,进行测序。将测序正确的重组质粒转入根癌农杆菌ABI。按照Clough等(1998)的DIP法浸染拟南芥花序,选取经过抗性筛选的种子,干燥条件保存备用。

3.4 F6'H1在DEX诱导过量表达拟南芥叶片中的定量RT-PCR分析

以Trizol试剂盒提取的F6'H1基因诱导过量表

达拟南芥DEX处理不同时间的cDNA作为模板, 用Actin2 F和Actin2 R作为*Actin2*基因检测引物, 引物qPCR F和qPCR R作为*F6'H1*基因检测引物, RT-PCR检测*F6'H1*在DEX诱导的*F6'H1*过表达拟南芥叶片中的转录水平。定量PCR体系依照定量PCR试剂盒(SYBR Premix, Bio-Rad)说明书进行, 实验

仪器为Bio-Rad IQ-5 thermocycler, 40个循环, 退火温度为55 °C, 循环阈值由IQ-5 Bio-Rad软件测定引物效率为100%。每个样品有3个生物学重复。相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 样法, 以*Actin2*基因作为内参进行相对定量。显示结果为平均值±标准差, 每个数据为3个重复的结果。

表1 实验引物序列

Table 1 Sequences of experimental primers

引物名称	核苷酸序列(5'→3')	说明
LP	CGAAGATCTTGAATTCAACG	基因组PCR检测 <i>f6'h1</i> 突变体
RP	TAGTCCTCTGCAGAGCAAGC	T-DNA插入位点
BP	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	
Semi F	AAGGCTGCGACTCACAAG	RT-PCR检测 <i>f6'h1</i> 突变体中
Semi R	TCGAATCGAGCCCATAAA	<i>F6'H1</i> 基因的表达
Induced F	ACTAGTATTCCAATGGCTCCAACACTC	<i>F6'H1</i> 基因诱导表达载体的构建
Induced R	CCTGCAGGATCAGATCTTGGCGTAAT	
Actin2 F	AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT	qPCR检测 <i>Actin2</i> 的基因转录
Actin2 R	GATGGCATGAGGAAGAGAGAAAAC	
qPCR F	CTGTTGAAGAGAAGCGCAAG	q-PCR检测 <i>F6'H1</i> 基因的转录
qPCR R	CTAGAAGCCTCCTACCATC	

实验结果

1 基因组PCR及RT-PCR鉴定*f6'h1*突变体

从美国拟南芥生物学资源中心(ABRC)购得的*f6'h1*突变体(SALK-005264) T-DNA插入位点如图1-A所示。以野生型和*f6'h1*突变体叶片基因组DNA为模板, 分别以LP和RP、BP和RP为引物, PCR扩增鉴定T-DNA的插入位点(图1-B); 以野生型和*f6'h1*突变体cDNA为模板, 以引物Semi F和Semi R扩增*F6'H1*基因的核心片段(图1-C)。电泳结果显示, T-DNA正确插入*F6'H1*的第一个内含子, 且完全抑制了*F6'H1*基因的转录。

2 *f6'h1*突变体衰老表型延迟

相同条件下培养野生型拟南芥和经过分子鉴定的*f6'h1*纯合突变体。播种40 d后, 与野生型拟南芥相比, *f6'h1*突变体呈现莲座叶衰老推迟的表型。当野生型莲座叶片第5片叶片开始黄化时, *f6'h1*突变体的莲座叶片仅黄化至第3片叶片(图2-A和B)。

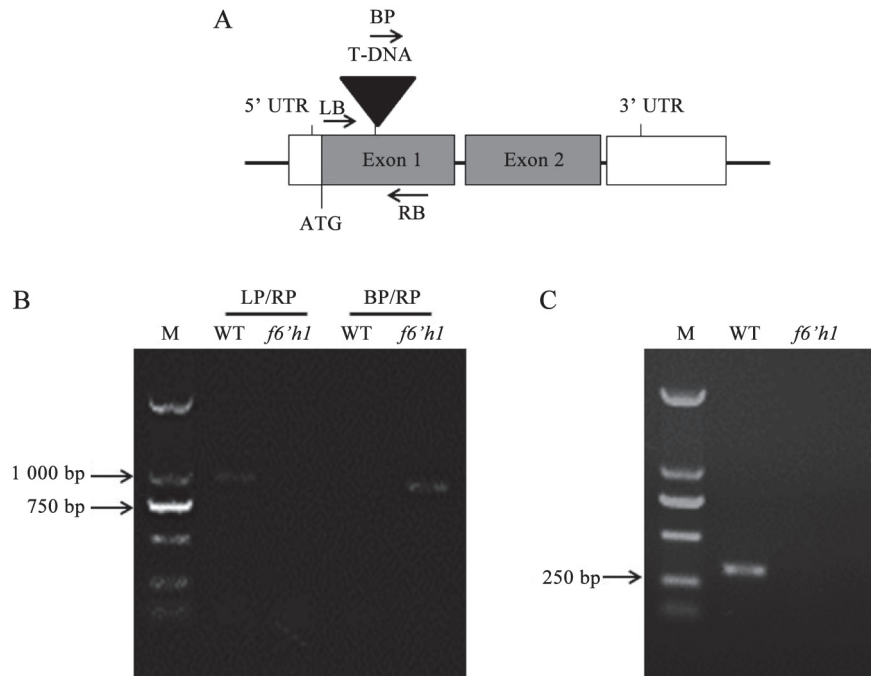
3 *f6'h1*突变体的叶片衰老相关生理生化检测

研究表明, 叶绿素含量和衰老之间存在明显的负相关, 叶绿素分解是衰老的原发过程及衰老

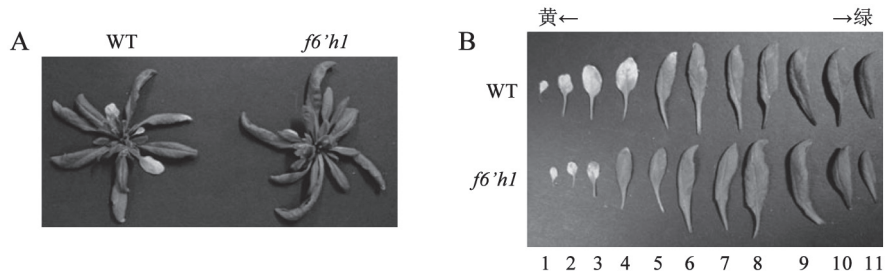
的标志, 而由此带来的光合功能下降是决定衰老症状开始的一个重要因子(陈俊毅等2014)。因此本文对生长40 d的*f6'h1*突变体及野生型拟南芥叶片第1~6片叶片进行叶绿素含量及光合速率的检测。结果(图3)显示, *f6'h1*突变体第4、5片叶片的叶绿素含量高于相同叶龄的野生型叶片, 且差异极显著($P<0.01$) (图3-A); 光合速率(F_v/F_m)也极显著高于相同叶龄的野生型叶片($P<0.01$) (图3-B)。另外, 植物衰老劣变过程中活性氧、自由基的累积促进膜脂质过氧化, 使胞内离子泄漏(McCord和Fridovich 1969), 因此离子渗透率也是检测植物叶片衰老的生理指标之一。图3-C显示*f6'h1*突变体第4、5片叶片的离子渗透率低于相同叶龄的野生型叶片, 差异极显著($P<0.001$)。而*f6'h1*突变体其他叶片与野生型相同叶龄叶片无显著差异, 这或许是由于生长40 d的两个株系第1~3片叶片都已完全衰老, 生理状态类似; 而第6片叶片还未进入衰老阶段, 各项生理指标也比较接近。

4 *F6'H1*基因诱导过量表达拟南芥载体的构建

为了进一步验证*F6'H1*基因参与叶片衰老的过程, 构建了*F6'H1*的诱导过量表达拟南芥(*F6'H1ⁱⁿ*)

图1 *f6'h1*突变体的分子鉴定Fig.1 Molecular identification of *f6'h1* mutant

A: T-DNA在*F6'H1*基因组序列中的插入位点示意图; B: 基因组PCR检测T-DNA插入位点。LP/RP和BP/RP为检测T-DNA插入*F6'H1*基因组序列位置的引物, 引物位点如图A所示; C: RT-PCR检测*F6'H1*基因在*f6'h1*突变体中的转录水平。WT: 野生型拟南芥; *f6'h1*: *F6'H1*基因缺失突变体; M: Marker DL2000。

图2 *f6'h1*突变体叶片衰老推迟Fig.2 Delayed leaf senescence phenotype in *f6'h1* mutant

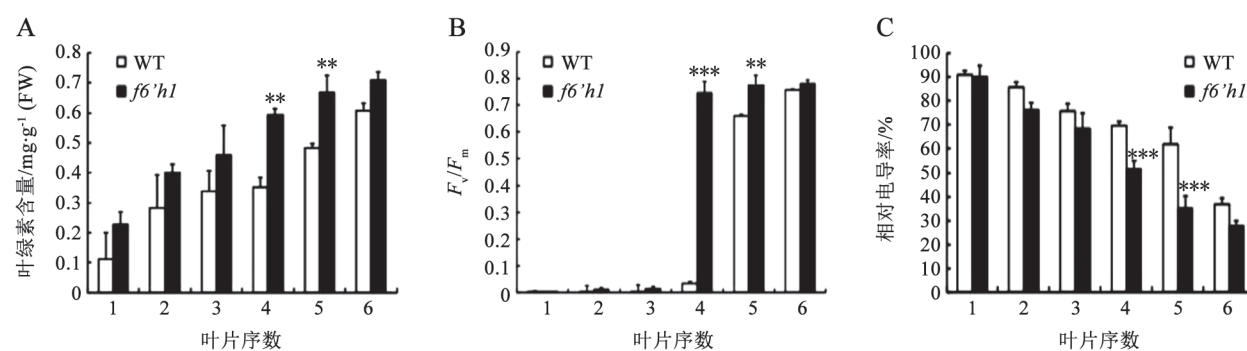
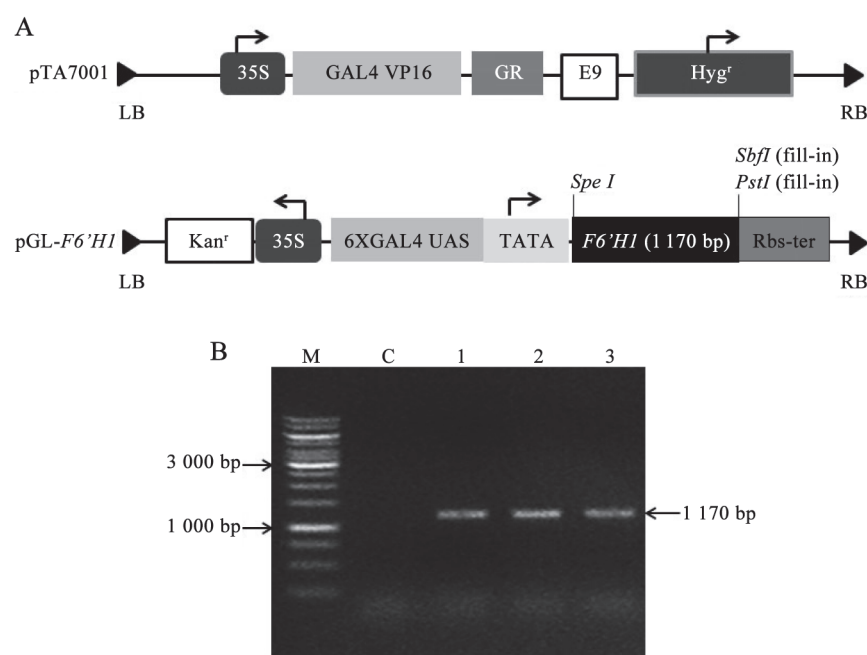
A: 相同苗龄的野生型拟南芥和*f6'h1*突变体拟南芥莲座叶衰老表型; B: 2种拟南芥莲座叶按照相同叶龄(从老到嫩依次为1~11)依次摆开。照片拍于播种后40 d。

来研究*F6'H1*的基因功能。本研究采用糖皮质激素诱导表达系统在拟南芥中诱导过量表达*F6'H1*基因。重组质粒的构建如图4-A所示, 质粒pTA7001含有重组转录因子GVG (GAL4 DNA结合区、VP16激活区以及糖皮质激素受体), 而重组质粒pGL-*F6'H1*中含有GAL4顺式调控元件和1 170 bp的*F6'H1*基因表达框。目的片段通过*SpeI*、*SbfI*双酶切和*SbfI*补平构建到经过*SpeI*、*PstI*双酶切且补平*PstI*的载体上。抗性筛选获得的阳性菌经过

菌落PCR鉴定, 可得到1 170 bp的目的片段(图4-B), 与预期片段大小一致, 表明构建正确。

5 *F6'H1*基因的诱导过量表达造成拟南芥叶片衰老提前

生长22 d的野生型拟南芥和*F6'H1*基因诱导过表达拟南芥(*F6'H1^{im}*)经 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEX喷施处理5 d后, 野生型拟南芥表型正常, 而*F6'H1*基因诱导过量表达拟南芥(*F6'H1^{im}*)叶片明显变黄, 停止生长(图5)。PCR检测*F6'H1*基因诱导过量表达拟南

图3 *f6'h1*突变体与野生型拟南芥叶片的生理生化检测Fig.3 Physiological analysis of leaves in wild-type and *f6'h1* mutant**和***表示不同拟南芥之间差异极显著($P<0.01$ 和 $P<0.001$)。图4 *F6'H1*基因诱导过量表达载体的构建Fig.4 Construction of *F6'H1* gene induced expression vectorA: DEX诱导基因表达的质粒构建示意图; B: 卡那霉素抗性菌落PCR检测, M: 1 kb DNA ladder; C: 阴性对照; 1-3: 转化*F6'H1*基因诱导过量表达载体质粒菌落。

芥(*F6'H1^{im}*)中的*F6'H1*基因转录水平, 结果显示, *F6'H1*基因在DEX喷施处理24 h内转录水平显著上升, 处理12 h时基因表达量最高, 是处理前的27倍(图6)。

讨 论

叶片作为植物进行光合作用的主要器官, 它的生长发育直接影响植物的生长和产量。大多数农作物产品器官的形成时期, 叶片衰老引起的光

合作用减退将极大地限制作物产量潜力的发挥, 因此揭示植物自身调控衰老的分子机制具有重要的经济意义。

叶片衰老是植株发育后期由内外因共同控制的、高度有序的生理过程(张海娜等2009), 大约16%的基因在衰老叶片中表达模式发生变化(Miao等2004), 这些基因被称为衰老相关基因(senescence associated genes, SAGs)。叶片衰老伴随着蛋白水解、营养成分的再利用以及衰老调控物质的

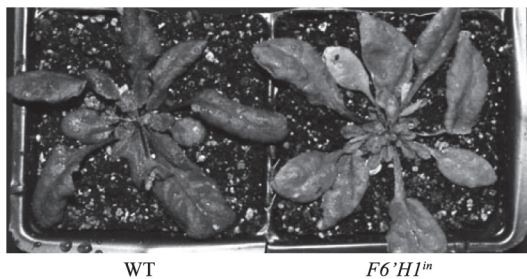


图5 DEX诱导*F6'H1*基因的过量表达促进植物叶片衰老
Fig.5 DEX-induced *F6'H1* gene overexpression accelerates leaf senescence

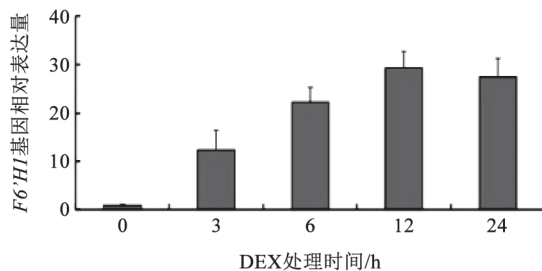


图6 DEX处理下转基因拟南芥中*F6'H1*基因的表达
Fig.6 Expression of *F6'H1* gene in transgenic plant under DEX treatment

合成, 因此代谢相关基因在SAG中的比率最大, 占14.4% (Guo等2004), 而由这些基因编码的酶类在催化产生叶片衰老过程中的具体功能还未完全阐明。

Kai等(2008)证明拟南芥2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶*F6'H1*是香豆素东茛菪内酯生物合成的中间产物限速酶, *F6'H1*基因的缺失显著降低了东茛菪内酯在拟南芥根部的积累。而在本研究中, *F6'H1*基因缺失突变体*f6'h1*与野生型相比, 莲座叶片的黄化衰老明显延迟, 当野生型莲座叶片黄化至第5片时, *f6'h1*的莲座叶片仅黄化至第3片。生理生化检测结果也表明, *f6'h1*突变体比相应的野生型叶片细胞膜完整性较好、叶绿素含量及光合效率更高, 说明*F6'H1*基因对拟南芥的叶片衰老过程可能具有调控作用。另外, 将含有*F6'H1*基因开放阅读框的诱导表达系统转入拟南芥, 获得的转基因拟南芥经地塞米松(DEX)喷施处理24 h后能显著诱导*F6'H1*基因上调表达, 并且在喷施处理第5天出现整个莲座叶片变黄、衰老提前的表型。这些结果说明*F6'H1*基因转录变化是影响叶片衰老表型的主要原因。

目前对于2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶超家族(2OGD)成员调控叶片衰老的报道还不多见, Zhang等(2013)证明拟南芥水杨酸3-羟化酶AtS3H可以将水杨酸羟基化为2, 3-二羟基苯甲酸(2, 3-DHBA), 以此降低细胞水杨酸含量, 从而抑制叶片衰老。而*F6'H1*对拟南芥叶片衰老的调控机理还不是很清楚, 我们推测*F6'H1*促进拟南芥叶片衰老的原因可能有两点: 一、*F6'H1*的催化产物东茛菪内酯或东茛菪内酯的合成中间产物能调节拟南芥叶片衰老。香豆素被普遍认为是植物抗毒素(Carpinella等2005)。东茛菪内酯(6-甲氧基-7羟基香豆素)是主要的香豆素种类之一, 作为强还原化合物, 东茛菪内酯通常是植物体内活性氧物质的清道夫(Chong等1999)。Gechev等人(2005)报道*F6'H1*的基因表达受到过氧化氢的强烈诱导, 并且参与活性氧物质介导的植物衰老。因此东茛菪内酯等或许正是活性氧诱导的植物叶片衰老促进化合物。二、*F6'H1*可能参与其他调控植物叶片衰老的次生代谢物催化反应, 如植物激素。植物激素生物合成/分解过程中普遍存在中间产物的羟化或脱氢反应, 大量文献也表明2OGD家族成员调节赤霉素的分解代谢(Thomas等1999), 乙烯的合成(Hamilton等1991), 以及生长素的降解等(Zhao等2013)。 *F6'H1*很有可能也在叶片衰老相关的植物激素代谢过程中扮演重要角色。

总之, 本研究通过对*F6'H1*基因缺失突变体拟南芥*f6'h1*和*F6'H1*基因诱导过量表达拟南芥的衰老表型, 叶片离子渗透率、叶绿素含量及光合效率的测定分析, 证明拟南芥2-氧化戊二酸依赖的双加氧酶*F6'H1*的基因转录水平在叶片衰老期发生变化, 影响叶片的衰老, 但对其调控叶片衰老的分子机制仍有待进一步深入研究。

参考文献

- 陈俊毅, 朱晓宇, 蒯本科(2014). 绿色器官衰老进程中叶绿素降解代谢及其调控的研究进展. 植物生理学报, 50 (9): 1315~1321
- 梁秋霞, 曹刚强, 苏明杰, 秦广雍(2006). 植物叶片衰老研究进展. 中国农学通报, 8: 282~285
- 王玉, 孔凡英, 尹波, 董新纯, 孟庆伟(2014). 过表达单脱氢抗坏血酸还原酶基因提高番茄抗UV-B胁迫能力. 植物生理学报, 50 (1): 95~104
- 张海娜, 谷俊涛, 郭程瑾, 李存东, 肖凯(2009). 植物衰老的分子生物学基础. 草业学报, 18 (1): 163~170
- 邹琦(1995). 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社,

- 33~34
- Aravind L, Koonin EV (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and Ipreca define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol*, 2: RESEARCH0007.0001~RESEARCH0007.0008
- Biswas AK, Choudhuri MA (1980). Mechanism of monocarpic senescence in rice. *Plant Physiol*, 65: 340~345
- Carpinella MC, Ferrayoli CG, Palacios SM (2005). Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *J Agric Food Chem*, 53: 2922~2927
- Chong J, Baltz R, Fritig B, Saindrenan P (1999). An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Lett*, 458: 204~208
- Gechev TS, Minkov IN, Hille J (2005). Hydrogen peroxide-induced cell death in *Arabidopsis*: transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life*, 57: 181~188
- Grotewold E (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 761~780
- Guo Y, Cai Z, Gan S (2004). Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell Environ*, 27: 521~549
- Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7434~7437
- Hedden P, Thomas SG (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J*, 444: 11~25
- Hegg EL, Que Jr. L (1997). The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron (II) enzymes. *Eur J Biochem*, 250: 625~629
- Kai K, Mizutani M, Kawamura N, Yamamoto R, Tamai M, Yamaguchi H, Sakata K, Shimizu BI (2008). Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 55: 989~999
- Li H, Zhang J, Vierstra RD, Li H (2010). Quaternary organization of a phytochrome dimer as revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 10872~10877
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244: 6049~6455
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 55: 853~867
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 4698~4703
- Zhang K, Halitschke R, Yin C, Liu CJ, Gan SS (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 14807~14812
- Zhao Z, Zhang Y, Liu X, Zhang X, Liu S, Yu X, Ren Y, Zheng X, Zhou K, Jiang L et al (2013). A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev Cell*, 27: 113~122