

茎点枯病菌诱导后芝麻过氧化物酶活性 变化及其基因表达分析

刘莉铭^{1,2}, 刘红彦^{1,2*}, 田保明², 赵 辉¹, 王俊美¹

(1. 河南省农业科学院 植物保护研究所 农业部华北南部农作物有害生物综合治理重点实验室, 河南 郑州 450002;
2. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

摘要: 采用分光光度计法和实时荧光 PCR 分析茎点枯病菌诱导下芝麻过氧化物酶(POD)的活性变化和基因表达, 以探讨 POD 在芝麻抗茎点枯病过程中的作用。酶活变化分析表明, 在芝麻茎点枯病菌诱导下抗病品种豫芝 11 POD 活性比感病品种冀 9014 升高快, 感病品种在病原菌诱导 36 h 后, POD 活性才明显上升且高于抗病品种。定量 PCR 分析结果显示, 在芝麻茎点枯病菌诱导后, 抗病品种豫芝 11 中 POD 基因的表达从开始就有上调表达趋势, 而感病品种冀 9014 在 24 h 后才上调表达, 且表达量前者高出后者 5 倍多。在芝麻茎点枯病菌诱导下, POD 活性和基因的表达在芝麻抗病品种豫芝 11 和感病品种冀 9014 中有明显差异, 可以推测, 酶的活性变化、基因上调表达时间及表达量上的差异与芝麻的抗病反应有着密切关系。

关键词: 芝麻; 茎点枯病菌; 过氧化物酶; 酶活; 表达模式; 抗病反应

中图分类号: S435.653 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)08-0093-06

Analysis of POD Activity and Gene Expression Pattern in Sesame Infected with *Macrophomina phaseolina*

LIU Li-ming^{1,2}, LIU Hong-yan^{1,2}, TIAN Bao-ming², ZHAO Hui¹, WANG Jun-mei¹

(1. Ministry of Agriculture IPM Key Laboraton of Crops in Southern North China, Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
2. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: POD activity and expression pattern induced by *Macrophomina phaseolina* were investigated respectively by spectrophotometer and real-time PCR, to elucidate the role of POD in sesame resistance against the stem rot. The measurement of POD activity suggested that POD activity in the resistant cultivar Yuzhi 11 increased faster than in the susceptible cultivar Ji 9014 induced by *M. phaseolina*. But after 36 hours, the enzyme activity dramatically increased in the susceptible cultivar, which was higher than in the resistant cultivar. The result of real-time PCR showed that the expression of POD gene promptly increased in the resistant cultivar Yuzhi 11 induced by the *M. phaseolina*, while the tendency in the susceptible cultivar Ji 9014 showed up-regulated until after 24 hours. The expression level in the former was remarkably higher than in the latter (over 5 times). The enzyme activity and the gene expression level of POD were observably different in the resistant cultivar Yuzhi 11 and the susceptible cultivar Ji 9014 induced by *M. phaseolina*. Based on the difference of enzyme activity and expression in quantity and time in different cultivars, POD was speculated to be involved in sesame defense response to *M. phaseolina*.

Key words: *Sesamum indicum*; *Macrophomina phaseolina*; peroxidase; enzyme activity; expression pattern; disease-resistant response

收稿日期: 2012-03-31

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-15-1-05)

作者简介: 刘莉铭(1988-), 女, 河南周口人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。E-mail: llmyykl@163.com

* 通讯作者: 刘红彦(1964-), 男, 河南嵩县人, 研究员, 博士, 主要从事植物病理学及植物病害生物防治研究。

E-mail: liuhy1219@163.com

芝麻 (*Sesamum indicum*), 是我国四大重要油料作物之一, 其含油率高达 62%。另外, 芝麻的蛋白质含量也很高, 并且富含铁、磷、钙和多种维生素, 具有较高的营养价值^[1]。芝麻生育期正处于高温多雨季节, 易发生多种病害, 其中茎点枯病是一种常见的病害, 在我国芝麻主产区普遍发生。茎点枯病严重影响芝麻的品质和产量, 所以, 加强相关抗病机制的研究以及对芝麻抗病性的开发利用具有重要意义。芝麻茎点枯病是由芝麻壳孢菌 [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.] 侵染芝麻根系和茎秆, 引起整株或部分茎枯萎的病害^[2]。病原菌侵染植物会诱导一系列相关蛋白的表达, 其中过氧化物酶 (peroxidase, POD) 是与植物生物胁迫和非生物胁迫有密切关系的一类氧化还原酶。POD 存在于由单层膜包裹的过氧化物酶体中, 与植物的呼吸作用、光合作用等多种生理代谢过程都有关系。POD 在维持活性氧的动态平衡中发挥着重要作用, 它可以将对细胞具有毒害作用的 O_2^- 和 H_2O_2 转化成无害的 H_2O 和 O_2 , 并能够抑制 $\cdot OH$ 的形成, 从而有效避免自由基的大量积累, 并使其维持在一个较低的水平, 使细胞免受伤害^[3]。更重要的是, POD 还能以 H_2O_2 为底物催化芳香胺和酚类等物质的氧化, 加速细胞壁的氧化交联, 并诱导木质素的合成, 以限制病原菌的扩散^[4]。关于 POD 与植物抗病性之间的关系存在 2 种观点: 一种观点认为, POD 及其同工酶与抗病性密切相关, 可以将其作为抗病反应的一种生理生化指标; 另一种观点认为, 只有大于 2.8 kD 的 POD 才与植物的抗病性有关, 而小于 2.8 kD 的 POD 只能反映植株的受损程度^[5-6]。目前尚无关于芝麻与病原菌互作过程中抗病机制研究的报道, 本实验室 (河南省农业科学院生物防治研究室) 经过抗性鉴定发现, 芝麻品种豫芝 11 号和冀 9014 对茎点枯病原菌分别表现高抗和高感, 可以作为研究芝麻抗病机制的良好材料。本研究测定了这 2 个芝麻品种在茎点枯病侵染后 POD 活性的变化情况, 并以芝麻基因组 DNA 为模板克隆 POD 基因全长, 利用 Real-time PCR 技术分析了芝麻与茎点枯病菌互作过程中 POD 的表达模式, 旨在了解 POD 与芝麻抗茎点枯病反应之间的关系, 为阐明芝麻的抗病机制和抗病性利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌丝悬液的制备 芝麻茎点枯病菌 09-54 菌株由河南省农科院生物防治研究室分离, 将该菌接种于 100 mL 的马铃薯葡萄糖培养基中, 28 °C 下、200 r/min 振荡培养 48 h 后, 用组织捣碎机处理培

养物即得到菌丝悬液。

1.1.2 材料处理 将分别表现高抗和高感茎点枯病的芝麻品种豫芝 11 号 (Y11) 和冀 9014 (9014) 种植于蛭石中, 待长至两叶一心期时分别接种芝麻茎点枯病菌, 采集接菌后 0、8、12、16、18、24、36、48、60、72 h 的植株, 并以每个相同时间点的未接菌植株作为同期对照, 液氮速冻后保存于 -70 °C 备用。

1.1.3 试剂和仪器 载体 pMD19-T、RNAiso Plus、rTaq 和定量 PCR 用 SYBR Premix Ex Taq II 均购于宝生物工程 (大连) 有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒购于美国 Axygen 公司, 反转录试剂盒购于上海英骏生物科技有限公司。酶活测定使用日本岛津 UV-2450 紫外分光光度计, 普通 PCR 在 Bioer PCR 仪上进行, 定量 PCR 在 Mastercycler ep realplex 定量 PCR 仪上进行。

1.2 试验方法

1.2.1 芝麻粗酶液提取与 POD 活性测定 粗酶液提取和 POD 活性测定参照王媛等^[7]的方法进行, 以各时间点处理组酶活值减去对照组酶活值, 绘制曲线图, 观察 POD 在病程中的反应趋势^[8]。

1.2.2 芝麻 DNA 提取与 POD 基因克隆 芝麻基因组 DNA 采用 CTAB 法提取, 最后加入 100 μ L ddH₂O 溶解 DNA。根据 NCBI 上 POD 基因序列 (GenBank 登录号: DQ287973.1) 设计扩增基因全长的引物, 上游引物: 5'-ACCCTGTAAGGTC-CCGATTTG-3', 下游引物: 5'-GCAATATGGGT-CAATCCAGTTTTTC-3'。PCR 体系为: 10 \times buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 mmol/L 的上下游引物各 1 μ L, rTaq (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 10 ng/ μ L DNA 模板 3 μ L, 用 ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 35 次; 最后总延伸 10 min。采用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 对目标条带的回收参照 Axygen 凝胶回收试剂盒说明书进行。将目的片段连接于 pMD19-T 后, 转化大肠杆菌, 选择阳性克隆送至生工生物工程 (上海) 有限测序, 并对测序结果做相关的信息学分析。

1.2.3 芝麻 RNA 提取及反转录 RNA 提取参照 RNAiso Plus 试剂说明书进行, 最后加入 20 μ L DEPC ddH₂O 溶解, 稀释 10 倍后的 RNA 用于 RNA 完整性检测和浓度测定, 达到反转录标准的样品于 -70 °C 保存。用于定量分析的 cDNA 由随机六聚体引物反转录所得, 具体反转录过程参照英骏公司反转录试剂盒说明书, 并对芝麻 NADH 脱氢酶基因 (GenBank 登录号: L36413.1) 进行定量分析, 检测反转录获得的 cDNA 质量。正向引物: 5'-

GGGGTAAGGGGTGTTCAA-3', 反向引物: 5'-ACATTCTCATCACTTCGGTAT-3'.

1.2.4 POD 基因的定量表达分析 根据测序结果设计 POD 基因定量 PCR 引物, 正向引物: 5'-ATACTTCAAGAATCTCGTCCAA -3', 反向引物: 5'-AATCTCCCGCAGTCAAAA-3', 用芝麻 NADH 脱氢酶基因作为内参对 72 h 内 POD 基因的表达模式进行分析[9]. 定量 PCR 反应总体积为 20 μL, 包括 2 × SYBR Premix Ex Taq 10 μL, 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 0.4 μL, 稀释 60 倍的 cDNA 模板 6 μL, 用 ddH₂O 补齐. 扩增反应在 Mastercycler ep realplex 定量 PCR 仪上进行, 程序为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 并收集荧光, 运行 35 个循环后于 57~95 °C 生成熔解曲线. 每个样品重复 3 次, 采用 2^{-ΔΔct} 法分析数据[10].

2 结果与分析

2.1 芝麻 POD 活性测定结果

从图 1 可以看出, 在感病品种 9014 中, 36 h 以前 POD 活性一直维持在较低的水平, 而抗病品种 Y11 从 0 h 起活性就开始上升, 并在 12 h 时达到峰值, 随后下降. 36 h 以后, POD 活性在 2 个品种中均表现出显著的上升趋势, 且在 9014 中的活性明显高于 Y11, 在 72 h 时仍未出现下降趋势, 而此时苗已经枯萎, 之所以会出现这种情况可能与病株衰老有关.

2.2 芝麻 POD 基因扩增与序列分析

图 2 是在 Y11 和 9014 两个品种中扩增 POD 基因的结果, 可以看出, 从二者中均能扩增出大小约 1.9 kb 的特异条带. 测序结果显示, 二者长度均为 1 990 bp, 其 GenBank 登录号分别为 JN166017、JN166016, 与 DQ287973.1 具有 99% 的相似性,

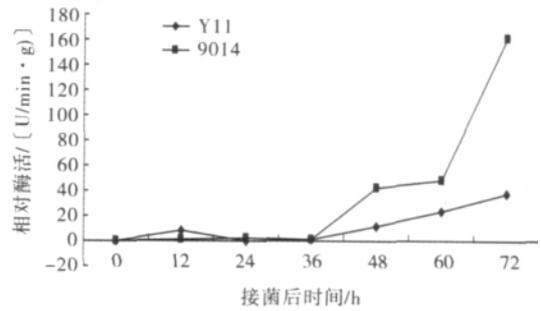
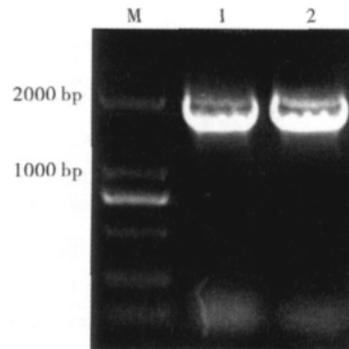


图 1 接菌诱导 72 h 内 POD 活性在芝麻抗感品种中的变化趋势

ORF 则完全一致, 在 225—298、500—592、759—1 439 碱基位置上是 3 个内含子. Y11 中的 POD 基因序列与 9014 的相似性也高达 99%, 只存在 3 个碱基的差异, 且这 3 个碱基都位于内含子中, 并不影响编码蛋白的序列, 二者的编码序列全长均为 990 bp. 同源性搜索发现, 芝麻 POD 基因序列与拟南芥、棉花、苜蓿等植物的 POD 均具有同源性, 聚类分析显示, 其与荔枝 (*Litchi chinensis*) 的 POD 基因具有较近的亲缘关系 (图 3).



M. DNA marker DL2000; 泳道 1. Y11 中的 POD 基因; 泳道 2. 9014 中的 POD 基因

图 2 芝麻 POD 基因 PCR 结果

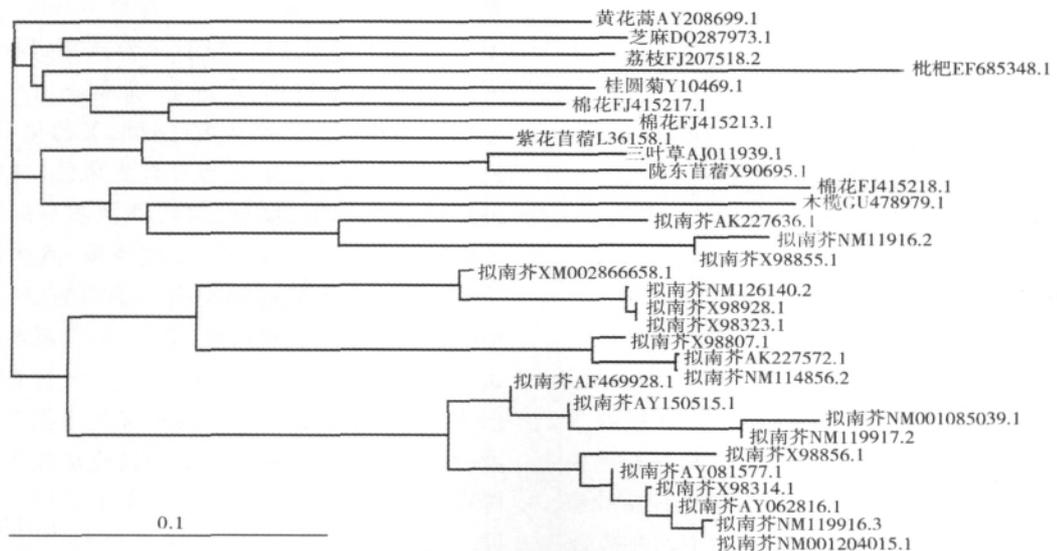


图 3 芝麻 POD 与其他同源序列的聚类分析结果

2.3 芝麻 RNA 提取及 cDNA 合成结果

图 4 是芝麻部分样品的 RNA 完整性检测结果。从图 4 可以看出, RNA 的 3 条带非常清晰, 说明无降解现象。紫外吸光值 OD_{260}/OD_{280} 介于 1.8~2.0, 表明提取的 RNA 质量能够满足反转录要求。采用随机六聚体引物反转录得到的 cDNA, 用内参 NADH 脱氢酶基因的引物检测, 均能扩增出 200 bp 左右的目标条带, 因此, 得到的 cDNA 可用于定量 PCR 分析。

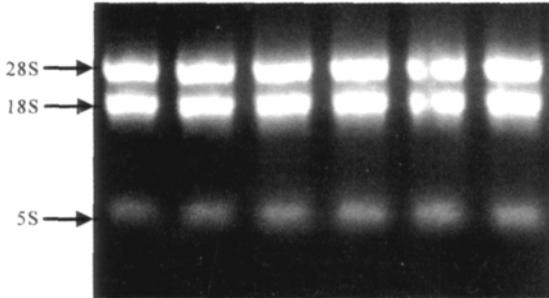


图 4 芝麻部分样品总 RNA 电泳图谱

2.4 芝麻 POD 基因表达模式分析

利用 Real-time PCR 技术对芝麻 POD 基因各时间点相对于无处理对照的表达量进行分析。图 5 是 NADH 脱氢酶和 POD 2 个基因的熔解曲线, 2 条曲线都只有 1 个峰, 表明扩增的特异性能够满足定量分析的需要。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 72 h 内 POD 的表达趋势进行分析(图 6)。2 个品种的同时对照在整个病程中的表达量始终维持在较低的水平, 没有明显的变化趋势。抗病品种 Y11 经芝麻茎点枯病菌诱导后上调表达, 在 24 h 后表达量急剧上升, 并且在 48 h 时达到表达高峰, 随后开始下降。在感病品种 9014 中, POD 前 24 h 内的表达量没有明显变化, 之后才开始上调表达, 同样在 48 h 时达到表达高峰, 之后表达量下降。从表达趋势对比可以看出, POD 在 9014 中的表达相对于 Y11 具有一定的滞后性, 并且在 Y11 中的最高表达量比 9014 高出 5 倍多, 这预示着其与抗病反应有密切的关系。

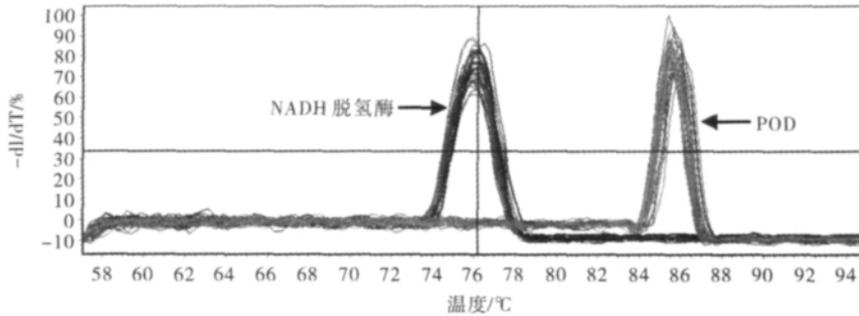


图 5 芝麻 NADH 脱氢酶和 POD 基因的熔解曲线

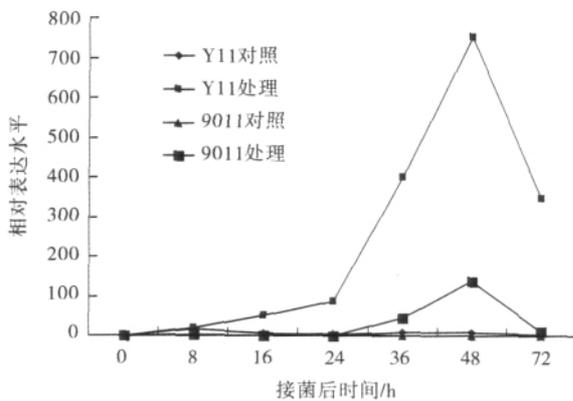


图 6 POD 基因在芝麻抗感品种中 72 h 内的表达模式

3 结论与讨论

POD 与 SOD、CAT 等抗氧化酶类共同组成了细胞保护酶, 在维持细胞正常代谢方面发挥着重要功能^[11]。本研究利用常规 PCR 技术在抗病品种豫芝 11 号和感病品种冀 9014 的基因组 DNA 中克隆得到了 POD 全长 DNA 序列, 内含子分析表明, 其

存在 3 个内含子, 2 条序列存在的 3 个碱基差异正好位于其中, 所以二者的 ORF 完全一致, 并且与 GenBank 中 DQ287973.1 的 CDS 也完全一致。同源性搜索可以在多种植物中找到与其同源的 DNA 序列, 但在其近源的物种中并未找到, 聚类分析显示, 其与荔枝的 POD 属于同一亚群。

活性氧(ROS)是一类比较活泼的化学基团, 在植物抗病反应过程中充当着重要角色, 首先其能够引起侵染部位的过敏反应, 即植物与病原菌互作过程中的一种细胞程序性死亡现象; 其次就是作为信号分子启动下游防御类相关基因的表达, 最终使植物表现出系统获得抗性; 此外, 活性氧本身对病原菌具有毒害作用, 并与细胞的木质化和结构蛋白的积累有密切关系^[12-13]。但活性氧过多积累会对植物细胞产生严重损害, 所以, 必须及时清除才能保证植株正常的生理状态。植物体一般会通过酶促和非酶促 2 种清除系统来保持活性氧的动态平衡^[14]。POD 不仅能够与 SOD、CAT、APX(抗坏血酸过氧

化物酶)等抗氧化酶类共同作用组成酶促体系,清除体内过多的活性氧,使植株免受其害,同时可以加固细胞壁和诱导木质素的合成,以阻止病原菌的蔓延,因此,POD 活性和表达的变化可以间接反映活性氧的变化,同时还可以直接体现抗病反应的强弱^[15-19]。但 POD 活性与抗病性反应之间的关系却存在着多种不同的观点。一种观点认为抗病性与 POD 活性呈正相关,如袁庆华等^[20]在研究苜蓿与假盘菌之间的互作时发现,POD 的活性在接种前感抗品种间并没有显著差异,但接种后二者中酶活性均出现了升高现象,且抗病品种中的活性要高于感病品种。另一种观点则认为,POD 活性在接菌诱导后呈现不规则变化趋势,与抗病性没有明显关系。柯玉琴等^[21]研究烟草与青枯菌互作中发现,初期 POD 活性下降后期上升,而抗病品种的活性要低于感病品种。刘学敏等^[22]在研究烟草赤星病时也发现,POD 活性与抗病性无直接关系。本研究对芝麻 POD 活性测定结果显示,接菌后 36 h 之前感病品种中的 POD 活性始终维持在一个较低的水平,而抗病品种在 12 h 时就有一个酶峰的出现,说明 POD 的活性变化与植物抗病性呈正相关,与袁庆华等^[20]的结论一致。

植物在与病原菌的互作过程中活性氧的大量产生被称为活性氧迸发(oxidative burst),这种现象被认为是植物体对病原应答的早期反应之一,一般分接菌后诱导的第 1 小时和第 5 小时 2 个阶段,前者持续时间短,后者持续时间长,第 1 个阶段只出现在亲和互作中,而在非亲和互作中则具有 2 个阶段,在第 2 次活性氧迸发后随即出现过敏反应^[23-26]。由于第 1 次活性氧迸发的持续时间较短,基于目前检测手段的局限,可能在酶活和基因表达水平上还无法检测出相应的反应特征。第 2 次活性氧迸发产生的活性氧在激活系统抗性后必须马上得到清除,以使细胞免受其害,Y11 中的 POD 在接菌后 12 h 时有一个酶峰,这与第 2 次活性氧迸发在时间上有相关性,预示着它在清除第 2 次活性氧迸发产生的自由基中发挥着重要作用,也间接反映 Y11 有 2 次活性氧迸发,可能已经激活了系统抗性。与此同时,9014 中的 POD 活性一直维持在较低水平,也就不能正常清除自由基而使细胞免受损害。在基因表达水平上,9014 在接菌后 24 h 前没有明显的上调表达,Y11 虽有微量的上调表达但没有明显的表达高峰,推测原因可能是,在病原侵染前细胞中已经储备了一定量的 POD 蛋白,但它的活性是在病原侵染后经过一系列的信号转导才被激发,转录水平上微量上调表达可以弥补在清除自由基时的消耗,而 9014

可能因缺乏相应的信号途径而无法激活 POD 活性,也就不能正常清除自由基。

许多研究报道显示,基因在转录组和蛋白组水平上经常表现出量上的不对等关系,造成这一现象的原因可能存在于转录、转录后加工、翻译、翻译后加工和蛋白活性调节等多个层面上^[27-28]。在这 2 个品种中,POD 基因在接菌 24 h 后显著上调表达并且在 48 h 时达到高峰随后下降,酶活在 36 h 后明显上升并且在 72 h 仍未见下降。时间上二者具有对应关系,但在量上不是对等关系,Y11 的 POD 基因表达量要高于 9014,而酶活性正好相反。伴随着病情逐渐加重,植物体的组织结构遭到破坏,产生了许多活性氧等自由基,这些自由基加速了植株的衰老和死亡^[29-32]。分析原因可能是,9014 中的活性氧等自由基的含量高于 Y11,所以 POD 的活性也相应要高,但其活性还不足以使自由基的含量下降到不损害细胞的水平;而在基因表达水平上,Y11 的量要高于 9014,但它在前期已经清除过一次活性氧,也就无需表现过多的活性,从而在蛋白水平上调节了它的活性,也正是这一原因,在病情表现上 Y11 的衰老速度明显低于 9014。另外,在感抗品种中扩增得到的 POD 基因的 ORF 完全一致,但在 POD 表达模式和酶活反应方面均存在着明显差异,进一步说明在其上游和下游还可能存在着促使差异表达的其他调控蛋白,而这些蛋白在芝麻对茎点枯菌的抗病反应中可能起着关键作用。

本研究在芝麻抗、感茎点枯病 2 个品种中成功克隆了 POD 基因的全长 DNA 序列,分析表明二者的编码序列没有差异。通过分析酶活变化和利用定量 PCR 技术可知,POD 在抗、感品种中活性变化、表达量变化和基因开始上调表达出现时间的早晚存在着明显的差异,说明 POD 很可能参与了芝麻对茎点枯病原菌的早期抗病反应过程,而且 2 个品种在 POD 基因表达上的差异也预示着在其上游可能存在调控其表达的相关蛋白,需要进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] 安凤平,宋洪波,宋江良,等. 擂茶加工中的超声波辅助水提取芝麻有效成分研究[J]. 中国粮油学报,2011,26(2):47-51.
- [2] 谢天丁,裴桂英,刘保才,等. 芝麻枯萎病和茎点枯病防治效果试验[J]. 河北农业科学,2010,14(4):60-61.
- [3] 段云清. 两种白菜 POD、PPO 和 SOD 对 Cd 胁迫的反应[J]. 广西农业科学,2006,37(1):7-9.
- [4] Kozłowska M, Fryder K, Wolko B. Peroxidase involve-

- ment in the defense response of red raspberry to *Didymella applanata* (Niessl/Sacc.) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2001, 23(3): 303-310.
- [5] 李靖, 利容干, 袁文静. 黄瓜感染霜霉病叶片中一些酶活性的变化[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(4): 277-283.
- [6] 杨家书, 李舜芳, 吴畏, 等. 小麦品种对白粉病抗病性与过氧化物酶的关系[J]. *植物病理学报*, 1984, 14(4): 235-240.
- [7] 王媛, 梁军, 张星耀. 抗、感病杨树与溃疡病菌互作中活性氧及相关酶的动态[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2008, 32(5): 41-46.
- [8] 崔瑞峰, 杜娟. 甘蓝幼苗感染黑腐病后 SOD、POD 活性的变化[J]. *吉林农业科学*, 2009, 34(5): 35-37, 40.
- [9] Gregoris T B, Borra M, Biffali E, *et al.* Construction of an adult barnacle (*Balanus amphitrite*) cDNA library and selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 62.
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [11] Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1982, 33: 73-96.
- [12] Apostol I, Heinstejn P F, Low P S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: Role in defense and signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 1989, 90: 109-116.
- [13] 芦光新. 活性氧与植物抗病性的关系[J]. *青海大学学报: 自然科学版*, 2002, 20(2): 11-15.
- [14] 吴顺, 萧浪涛. 植物体内活性氧代谢及其信号传导[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2003, 29(5): 450-456.
- [15] Keppler L D, Baker C J. O_2^- -initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions[J]. *Physiology and Biochemistry*, 1989, 79: 555-559.
- [16] Chai H B, Doke N. Superoxide anion generation: A response of potato leaves to infection with *Phytophthora infestans* [J]. *Physiology and Biochemistry*, 1987, 77: 645-648.
- [17] Mauch-Mani B, Slusarenko A J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica* [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 203-212.
- [18] Alvarez M E, Pennel R I, Meijer P, *et al.* Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity[J]. *Cell*, 2000, 92: 772-784.
- [19] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105: 467-472.
- [20] 袁庆华, 桂枝, 张文淑. 苜蓿抗感褐斑病品种内超氧化物歧化酶、过氧化物酶和多酚氧化酶活性的比较[J]. *草业学报*, 2002, 11(2): 100-104.
- [21] 柯玉琴, 潘廷国, 方树民. 青枯菌感染对烟草叶片 H_2O_2 代谢、叶绿素荧光参数的影响及其与抗病性的关系[J]. *中国生态农业学报*, 2002, 10(2): 36-39.
- [22] 刘学敏, 陈宇飞, 董长军. 烟草对赤星病菌的抗性与其防御酶系活性的关系[J]. *烟草科技*, 2003, 186(1): 43-46.
- [23] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 251-275.
- [24] Wojtaszek P. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection[J]. *Biochem J*, 1997, 322: 681-692.
- [25] Baker C J, Orlandi E W. Active oxygen in plant pathogenesis [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1995, 33: 299-321.
- [26] Tenhaken R, Levine A, Brisson L F, *et al.* Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4158-4163.
- [27] Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk V A, *et al.* Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(6): 1-17.
- [28] Mary M. Transcriptome to proteome and back to genome[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(8): 518.
- [29] 王孝威, 曹慧. 高等植物衰老的机理研究[J]. *山西农业大学学报*, 2004, 24(4): 416-419.
- [30] 刘洪展, 郑风荣, 赵世杰. 不同衰老类型小麦品种在衰老过程中光合特性的变化[J]. *华北农学报*, 2006, 25(3): 13-15.
- [31] 李健, 赵宇, 李锦锦, 等. 不同基因型玉米叶片衰老与活性氧代谢的关系及其调控[J]. *华北农学报*, 2011, 26(1): 131-135.
- [32] 马蓓, 武文明, 李金才, 等. 氮肥运筹技术对孕穗期受渍小麦旗叶衰老特性的影响[J]. *天津农业科学*, 2011, 7(2): 8-10.