

## 甘蔗抗坏血酸过氧化物酶基因(*ScAPX*)的克隆及表达分析

王竹青 陈云 杨玉婷 苏亚春 陈珊珊 吴期滨 许莉萍\*

福建农林大学 农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室, 福州 350002

\*通讯作者, xlpmail@126.com

**摘要** 抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)是清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)的重要酶类。本研究对针刺接种黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)后的抗、感基因型甘蔗(*Saccharum officinarum*)进行APX活性测定。结果表明,甘蔗接种黑穗病菌48 h内,抗病品种(崖城05-179)APX活性显著高于感病品种(柳城03-182) ( $P < 0.05$ )。借助电子克隆技术,结合RT-PCR方法,从甘蔗中分离到一个APX基因,并命名为*ScAPX*(GenBank登录号: KJ7565501)。生物信息学分析显示,*ScAPX*基因全长1 171 bp,包含一个1 038 bp的完整开放阅读框,编码345个氨基酸。*ScAPX*编码的蛋白不含信号肽,推测其为非分泌蛋白,定位于线粒体基质和叶绿体基质中的概率分别为91.1%和88.7%。实时荧光定量PCR检测结果显示,*ScAPX*在甘蔗根、芽、叶、蔗皮和蔗髓中均有表达,为组成型表达基因,表达量在蔗皮中最高,叶中最低,前者是后者的19.7倍;在外源因子处理后0~48 h,*ScAPX*基因的表达受水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、氯化钠(sodium chloride, NaCl)和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)诱导,SA、MeJA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后的*ScAPX*转录本积累量峰值较外源激素(ABA)和环境(NaCl和PEG)胁迫早。前者的*ScAPX*转录本变化呈现出胁迫初期积累量增加,达到峰值后又逐步下降的特点;在同样的测试时间(处理后24 h)内,ABA、NaCl和PEG处理后*ScAPX*转录本在达到峰值后未见下降。虽然在外源胁迫下,*ScAPX*表达量变化存在明显差异,但其表达均表现出正响应上述外源因子对甘蔗的胁迫。本研究为后续深入鉴定该基因的功能与进一步应用提供基础资料。

**关键词** 甘蔗,甘蔗黑穗病菌,抗坏血酸过氧化物酶基因(*ScAPX*),非生物胁迫,qRT-PCR

## Cloning and Expression Analysis of Ascorbate Peroxidase Gene (*ScAPX*) in Sugarcane (*Saccharum officinarum*)

WANG Zhu-Qing CHEN Yun YANG Yu-Ting SU Ya-Chun CHEN Shan-Shan WU Qi-Bin XU Li-Ping\*  
Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

\* Corresponding author, xlpmail@126.com

**Abstract** Ascorbate peroxidase (APX) is one of the important enzymes which can remove the reactive oxygen species (ROS) in the plant. In this study, APX activity in sugarcane (*Saccharum officinarum*) smut resistant variety (Yacheng05-179) was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that in the susceptible one (Liucheng03-182) after inoculated with *Sporisorium scitamineum* within 48 h. *ScAPX* (GenBank accession No. KJ7565501) was separated from sugarcane with cloning and RT-PCR technologies. The bioinformatic analysis showed that the total length of *ScAPX* gene was 1 171 bp, which contained a complete open reading

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金(No. CARS-20)

收稿日期:2014-06-03 接受日期:2014-08-20

frame (1 038 bp) and encoded 345 amino acids. The *ScAPX* contained no signal peptide and belonged to nonsecretory protein which was likely located in the matrix of mitochondrial (91.1%) and chloroplast (88.7%). The results of tissue specificity analysis showed that the highest expression level of *ScAPX* was in stem skin which was 19.7 times of that in leaves. The transcript of *ScAPX* increased under the stresses of salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), abscisic acid (ABA), sodium chloride (NaCl) and polyethylene glycol (PEG). The peak of the *ScAPX* transcript under the stresses of SA, MeJA and  $H_2O_2$  was accumulated during the initial period, which was earlierly found than that under ABA, NaCl and PEG stresses, and then it declined gradually. The expression pattern of *ScAPX* in response to ABA, NaCl and PEG treatments was not clear after 24 h, while the transcripts were kept in the peak at 24 h. Though the gene expression under the exogenous stresses were different, it was undoubted that *ScAPX* was positive response to the external stress. This study provides the basis for further functional analysis and application of this gene in the future.

**Keywords** Sugarcane, *Sporisorium scitamineum*, Ascorbate peroxidase gene(*ScAPX*), Abiotic stresses, qRT-PCR

过氧化物酶(peroxidase, PX)在生物界中广泛存在,是植物体中活性较高的一种酶,与光合作用、呼吸作用和生长素的氧化等相关,其酶活性随着植物的生长发育发生变化。根据过氧化物酶的来源不同,可将其分为3类超家族成员:Ⅰ类是胞内型PX,包括酵母细胞色素C过氧化物酶(cytochrome c peroxidase, CCP)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和细菌来源的过氧化物酶;Ⅱ类是来源于真菌的胞外型PX,包括木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiPs)和锰过氧化物酶(Mn peroxidase, MnPs),在木质素的生物降解中起重要作用;Ⅲ类是来源于高等植物的分泌型PX,参与多种不同的生理功能,如机体内毒性过氧化物的清除、细胞壁的合成、组织愈伤及生长素合成与代谢等(刘稳等, 2000; 刘稳, 2002)。

活性氧(active oxygen, ROS)产生于植物组织代谢过程中,在正常生理条件下,活性氧含量在氧化系统调控下处于一定的动态水平(Dat et al., 2000)。低浓度的ROS可作为信号分子,调控细胞中基因的表达,但高浓度的ROS则会导致蛋白质、膜质、DNA及其他细胞组分的严重损坏。过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )是植物体内一种相对稳定的活性氧,若不能及时清除,可以生成植物体内最活跃的ROS——羟自由基(OH)。OH寿命极短,会在短时间内与周围生物分子发生强氧化作用,产生不同反应性的二级自由基,破坏细胞组分。APX是PX的标志酶,由4个亚家族组成,分别涉及叶绿体、线粒体、细胞质和过氧化物酶体基因亚家族成员(李泽琴等, 2013)。APX作为抗坏血酸

——谷胱甘肽循环机制中消除 $H_2O_2$ 的关键酶,可与抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)高度亲和,利用其提供的电子将 $H_2O_2$ 还原为 $H_2O$ (Willekens et al., 1994; 曾秀存等, 2013)。在AsA存在情况下,低浓度的APX就可以使细胞内 $H_2O_2$ 的浓度降低,从而使其免受活性氧的伤害。研究人员已在多种植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、水稻(*Oryza sativa*)、西红柿(*Lycopersicon esculentum*)和菠菜(*Spinacia oleracea*) (Narendra et al., 2006; 李娜, 2011)等中分离到APX基因。迄今,虽然GenBank数据库能检索到3条甘蔗APX核酸序列(GenBank登录号: KC794939.1、JN591764.1和JQ958328.1),但仅见黄菲等(2013)关于水稻APX基因的克隆及生物信息学分析的报道。

甘蔗是重要的糖料作物,中国甘蔗种植区主要集中在广西、云南、广东湛江等湿热地区,真菌性病害是甘蔗上最严重的病害,并容易流行。同时,甘蔗80%种植在旱坡地,近年还频繁遭遇寒害,直接影响其产量和质量。其中黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)是一种气传型真菌,其引起的甘蔗黑穗病是世界各植蔗区最重要的病害,种植抗病品种是控制该病最经济有效的措施(Wu et al., 2013; Chao et al., 1990; 龚得明, 陈如凯, 1995; 许莉萍, 陈如凯, 2000)。新台糖22号是近10年来中国栽培面积最大的品种,由于该品种感黑穗病,导致蔗区黑穗病流行,使甘蔗生产遭受巨大损失(王伯辉, 2007; Su et al., 2013)。因此,培育抗逆性甘蔗品种具有重要意义。考虑到甘蔗为异源多倍体和非整倍体,遗传背景高度复杂,但却是转基因安全风险等级最低

(I级)的作物,且转基因甘蔗加工的蔗糖产品中未能检测到外源基因或蛋白成分(武胜燕, 2009),因此,分离抗逆基因具有重要意义。

本研究以受甘蔗黑穗病原菌胁迫 48 h 的崖城 05-179 蔗芽 cDNA 为材料,采用 RT-PCR 技术,从甘蔗中克隆获得 *APX* 基因,并将其命名为 *ScAPX*。通过生物信息学方法,对该基因的理化性质、细胞定位和蛋白结构等进行预测与分析,并借助实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术分析该基因表达情况,为甘蔗 *APX* 基因的开发利用提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与处理

供试材料为甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 抗黑穗病品种崖城 05-179 和感病品种柳城 03-182, 采自国家甘蔗产业技术研发中心试验基地。供试病原为甘蔗黑穗病菌 (*Sporisorium scitamineum*), 其孢子采集自柳城 03-182, 晾干后在 4 °C 冰箱保存备用。取表观相对一致的崖城 05-179 和柳城 03-182 的蔗茎, 参考 Su 等(2014)的方法进行催芽培养。将蔗茎砍成双芽段, 清水浸泡 24 h 后, 置于光照培养箱中, 12 h 光照/12 h 黑暗, 32 °C 培养至芽长 2 cm 后, 以浓度为  $5 \times 10^6$  个/mL 的甘蔗黑穗病菌孢子悬浮液针刺接种蔗芽, 在 28 °C 下培养, 对照以针刺接种无菌水代替病原孢子, 分别于接种后的 0、6、12、24、48、72 和 96 h, 各取 5 个甘蔗芽, 用液氮固定后 -80 °C 冰箱保存备用。

组织器官表达分析。田间随机选取 6 株处于成熟期且长势一致的崖城 05-179 植株, 取其白色嫩根、+1 叶(甘蔗最高可见肥厚带的第 1 叶)、蔗芽、蔗皮和蔗髓, 液氮冻存后, 保存于 -80 °C 冰箱。

非生物胁迫分析。甘蔗崖城 05-179 离体培养的组培苗, 待其株高达 10~20 cm, 叶完全展开出现 4~5 片叶时, 转移到清水中培养, 28 °C 下光照 16 h/黑暗 8 h, 复性培养 1 周。以 3 株为一个重复, 进行如下 6 个处理: 组培苗叶面分别喷施 25  $\mu$ mol/L 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA) (含 0.1% 乙醇和 0.05% 吐温-20, 体积比)、5 mmol/L 水杨酸(salicylic acid, SA) (含 0.01% 吐温-20, 体积比)、100  $\mu$ mol/L 脱落酸(abscisic acid, ABA)、10 mmol/L 过氧化氢和 25% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG), 取样时间点为 0、6、12 和 24 h; 另一份组培苗在含有 250

mmol/L NaCl 的水溶液中培养, 取样时间点为 0、12、24 和 48 h。实验取整株组培苗迅速用液氮固定, 保存于 -80 °C 备用。

### 1.2 甘蔗抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定

接种黑穗病菌和接种无菌水培养 0、6、12、24、48、72 和 96 h 的蔗芽材料 APX 酶活性的测定方法参考陈珊珊(2012)和孙云等(2008)。

### 1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

用 Trizol® Reagent 试剂提取样品总 RNA, 取 1.0  $\mu$ L RNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。根据 Prime-Script™ RT Reagent Kit 操作说明书, 将 RNA 反转录合成 cDNA 第一链, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。

### 1.4 甘蔗 APX 基因的电子克隆及其 cDNA 序列的分离

以大麦 (*Hordeum vulgare*) APX 基因(GenBank 登录号: gi|326528762)作为查询探针, 参考前人的电子克隆技术(苏亚春等, 2011), 在甘蔗 EST(expressed sequence tag) 数据库 cultivated sugarcanes (taxid: 286192)、wild sugarcane(taxid: 62335)、sugarcane(taxid: 128810) 和 sugarcane(taxid: 4547) 中进行查询与拼接, 最终组装获得 *ScAPX* 基因的全长序列。根据拼接的 *ScAPX* 序列, 设计特异性扩增引物: *ScAPX*-F: 5'-CATGGCCGAGCGCCTCGCCG-3'; *ScAPX*-R: 5'-TGAAAAGCCGGGACCAGTCCATCT-3'。并以接种黑穗病菌 48 h 的崖城 05-179 蔗芽 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术进行基因扩增。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): cDNA 1.0  $\mu$ L, Ex *Taq* DNA 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L, 10 $\times$ Ex *Taq* Buffer ( $Mg^{2+}$  plus) 2.5  $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2.0  $\mu$ L, 上/下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17.375  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 50 °C 退火 45 s; 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后在 72 °C 再延伸 10 min。将反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳上进行检测, 得到长度为 1 000 bp 左右的 PCR 产物; 胶回收的目的片段与 pMD18-T 载体 16 °C 连接 1 h; 将上述连接产物转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株的感受态细胞, 冰浴 30 min, 42 °C 热休克 90 s, 迅速置冰上 5 min, 然后加入 200  $\mu$ L LB 液体培养基, 置于 37 °C, 200 r/min 活化 1 h, 即为转

化液;于超净台中,取转化液 100  $\mu\text{L}$  涂布于含 100 mg/mL 氨苄的 LB 固体平板培养基上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜;最后从培养皿中挑取白色单菌落,摇菌,进行菌液 PCR 检测,PCR 检测呈阳性的菌落送测序确认。

### 1.5 *ScAPX* 基因生物信息学分析

用 EXPASY 工具中的 ProtParam(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 分析 *ScAPX* 基因编码蛋白的氨基酸序列组成、分子量、等电点及其编码蛋白的亲/疏水性等理化性质;TMHMM Server v.2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行编码蛋白的跨膜结构预测;DNASstar 软件预测其二级结构;psort 软件 (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 进行编码蛋白亚细胞定位分析;利用 SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)) 和 ExPASy 服务器的 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对目标蛋白进行二级结构和三级结构预测;借助 Vector NTI 软件进行不同物种间同源基因的氨基酸序列比对,并构建系统进化树。

### 1.6 基因表达模式分析

根据克隆获得的 *ScAPX* 序列,设计定量 PCR 检测用的特异性引物:

*ScAPX*-QF: 5'-CTTGTCTGGAGCACATACACTTGGA-3';

*ScAPX*-QR: 5'-TTCTCCGCATAGACCTTGAACCTTG-3'。

以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) (GenBank 登录号: CA254672) 作为内参基因,检测该基因的引物为:

*GAPDH*-QF: 5'-CACGGCCACTGGAAGCA-3';

*GAPDH*-QR: 5'-TCCTCAGGGTTCCTGATGCC-3'。

采用实时荧光定量 PCR 技术(美国 ABI 7500),检测 *ScAPX* 基因在不同甘蔗组织和不同外源胁迫处理样品中的相对表达量。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): SYBR Primix Ex *Taq*<sup>TM</sup> (2 $\times$ ) 7.4  $\mu\text{L}$ , 上/下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.8  $\mu\text{L}$ , cDNA 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 50  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 循环 40 次。每个样品设置 3 次重复,以无菌水作对照,实验采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  算法进行基因表达水平分析。病原接种样品中,为消除机械损伤对基因表达的影响,*ScAPX* 基因的表达量为接种样品的表达量减去相应时间点对照(即以无菌水替代病原的模拟接种)的表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑穗病菌胁迫下甘蔗 APX 酶活性的变化

甘蔗接种黑穗病菌后 0~96 h 过程中 APX 酶活性的变化情况见图 1。结果显示,崖城 05-179 在接种后的 72 h 内,APX 酶活性总是高于柳城 03-182,虽然 2 个甘蔗基因型的 APX 酶活性最高点都出现在 48 h,但前者是后者的 3.6 倍;病原菌接种 72 h 后,2 个甘蔗基因型中 APX 酶的活性基本已经检测不到。

### 2.2 甘蔗 *ScAPX* 基因的克隆与生物信息学分析

#### 2.2.1 甘蔗 *ScAPX* 基因 cDNA 全长获取

以大麦 *APX* 基因 (GenBank 登录号: gi 326528762) 作为查询探针,借助电子克隆技术,结合 RT-PCR 反应,从甘蔗中分离到一条 *APX* 基因序列,命名为 *ScAPX* (GenBank 登录号: KJ7565501)。该序列片段全长 1 171 bp,经过 ORF Finder 软件预测,其开放阅读框长 1 038 bp,推导编码 345 个氨基酸残基(图 2)。

#### 2.2.2 *ScAPX* 蛋白保守结构域分析

利用 NCBI 保守结构域数据库 (Conserved Domain Database, CDD),对 *ScAPX* 编码蛋白的保守结构域进行分析,结果显示(图 3),*ScAPX* 属第 I 类过氧化物酶超家族,含有 APX-POD 和类植物 POD 蛋白保守结构域,为编码多功能酶的基因。Motif Scan 在线预测结果表明,该编码蛋白含有血红素结合区,丙氨酸在第 2~80 位氨基酸编码区含量丰富。

#### 2.2.3 *ScAPX* 蛋白的一级结构预测

*ScAPX* 编码氨基酸的一级结构预测结果显示,该蛋白的等电点为 8.95,为碱性蛋白,理论相对分子质量约为 37.49 kD;该基因编码氨基酸不稳定系数为 46.43,表明该蛋白可能是不稳定蛋白。

#### 2.2.4 *ScAPX* 蛋白的信号肽预测

运用 SignalP 4.0 Server 软件预测甘蔗 *ScAPX* 蛋白的信号肽,结果显示,第 16 位丙氨酸残基(A)具有最高的信号肽分值(S)0.344,第 19 位丙氨酸残基(A)具有最高的综合剪切位点分值(Y)0.184,第 31 位丝氨酸残基(S)具有最高的原始剪切位点分值(C)0.128。由此可知,氨基酸残基的信号肽分值和原始剪切位点均小于 0.5,故可推测由 *ScAPX* 所编

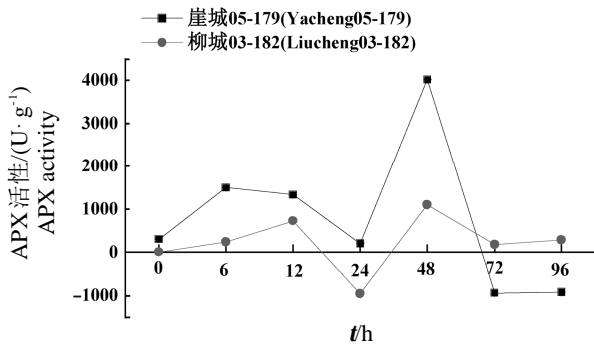


图1 黑穗病菌胁迫下甘蔗APX活性的变化  
Figure 1 The enzyme activity of APX under *Sporisorium scitamineum* stress in sugarcane

码的蛋白不存在信号肽或转运能力较低,推测其为非分泌蛋白,合成后不能进行蛋白转运。这一结果也证实了该蛋白属第 I 类胞内型过氧化物酶。

2.2.5 ScAPX 蛋白亲/疏水性的预测和分析

对 *ScAPX* 所编码的氨基酸序列的亲/疏水性进行预测,结果表明,ScAPX 蛋白的总平均疏水指数为 -0.486,位于多肽链的第 66 和第 67 位的丙氨酸(A)具有最高分值(1.711),疏水性最强;第 282 位的

谷氨酸(E)具有最低的分值 -2.856,亲水性最强。该多肽链的总平均疏水指数大部分小于 0,因此可推测该蛋白具有高度的亲水性,翻译后所合成的 ScAPX 蛋白具有可溶性。

2.2.6 ScAPX 蛋白的亚细胞定位预测

应用 PSORT 工具,在线预测 ScAPX 蛋白定位于线粒体基质和叶绿体基质中的可能性最大,概率分别为 91.1% 和 88.7%;基于 MHMM Server v.2.0 软件分析显示 ScAPX 蛋白位于膜外的概率为 98.40%,位于膜内的概率为 1.60%,该蛋白不存在跨膜螺旋区,因此可以推测 ScAPX 不是膜蛋白,该结果进一步为 ScAPX 蛋白不具备转运肽功能提供了依据。

2.2.7 ScAPX 蛋白的二级结构预测

对 ScAPX 蛋白的二级结构进行在线预测(图 4),发现 ScAPX 蛋白中形成无规则卷曲所含的氨基酸残基数为 161 个,占总氨基酸残基数的 46.67%;β-折叠所含氨基酸数目为 19 个(5.51%);延伸链和 α-螺旋所含的氨基酸数目分别为 31 个(8.99%)和

```

1                                     C
2  atggccgagcgctcgcgcatccgccaccctccgcgctcggccgcccgccgcccaccctccgcgctcggccgcccgccgcccaccctccgcgctcggccgccggcgccggcgccggcc
   M A E R L A A S A A T L R A S A A A A A T P S A R R A A R A
92  agccgcgcgcttctcccgccctcgcggcgctcgtcagctcgcgcgcgcttggcctcccgccgcccggcgtctccgctcccgcagaaggcg
   S R A F F P P S P A S S A R A R V G L R A A P S P L P Q K A
182 agggcagtgaggctgcgcgctgtggcgcgcgctcgtgacgtggctcagggtgaaggccgcccggcggcaggacatcaggaggcttctcaggagc
   R A V R C A A V A A A S D V A Q V K A A R E D I R E L L R T
272 actcactgccacccatcctggtagcttaggatggcatgatgctggtacatatgacaagaatattgaggagtggccacaacgaggtgga
   T H C H P I L V R L G W H D A G T Y D K N I E E W P Q R G G
362 gctaataagagcttaagattgatggttgagttgaaacatggagccaatgctggtctgataaatgctctaaagcttccaaccaattaag
   A N G S L R F D V E L K H G A N A G L I N A L K L I Q P I K
452 gacaagtaccggagatcatcacttatgcagatttattcagttggcaagtgtacagcaattgaggaagctggtggccaaagattcca
   D K Y P S I I T Y A D L F Q L A S A T A I E E A G G P K I P
542 atgaaatcgggagagttgatgttacaggacctgagcagtgcccacctgaggggaagcttctgatgctggcccaagttcacctgctgac
   M K Y G R V D V T G P E Q C P P E G K L P D A G P S S P A D
632 cacttgagggaggtattctacagaatggccttgatgacaaggaattggtgccttgtctggagcacatacacttgaaggtccaggcct
   H L R E V F Y R M G L D D K E I V A L S G A H T L G R S R P
722 gaacggagtggtggggaaaccagaaacaaaataactaaaaatggtcctggtgcacctggtgggcaatcatggacagttgagtggtg
   E R S G W G K P E T K Y T K N G P G A P G G Q S W T V E W L
812 agatttgataacagttacttcaaggatatcaagagaaacagagatcaggatcttctggtcctacctacagatgctgctttatttgaggac
   R F D N S Y F K D I K E K R D Q D L L V L P T D A A L F E D
902 ccaagttcaaggtctatgcggagaaatgcagaggaccaagacgattcttcagagactacgctgaggctcatgctaaactgagcaat
   P K F K V Y A E K Y A E D Q D A F F R D Y A E A H A K L S N
992 ctgggtgcaagttccaaccgcccagggattcttcttggatgatagtgagcaccagaccagctccctgaaacaggaaaatgctgt
   L G A K F Q P P Q G F S L D D *
1182 ccttgaacaggatcaagattcaagaggaacatataattcattgcttctcatatcatcgtaagatggactggtccccggcttttca

```

图2 甘蔗 ScAPX 的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列  
Figure 2 Nucleotide acid sequences and deduced amino acid sequences of sugarcane ScAPX gene

134个(38.84%)。由此可推测,无规则卷曲是*ScAPX*蛋白二级结构中的大量结构元件, $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和延伸链分散于整个蛋白质中。

### 2.2.8 *ScAPX*蛋白的三维结构预测

SWISS-MODEL在线预测甘蔗*ScAPX*蛋白的三维结构,得到空间构象模拟图,*ScAPX*与其近缘属植物谷子(*Setaria italic*, XP\_004975656.1)、玉米(*Zea mays*, NP\_001132683.1)和高粱(*Sorghum bicolor*, XP\_002447862.1)的氨基酸序列一致性分别为91%、97%和99%。将4种植物APX蛋白模拟图进行多方位比较(图5),发现上述4个物种APX蛋白三维结构中氨基酸序列的螺旋和折叠等空间结构特点基本相同,说明该类蛋白在序列和结构上较为保守。

### 2.2.9 *ScAPX*氨基酸同源性分析

将*ScAPX*编码蛋白的氨基酸序列进行Blastp同源搜索,选取高粱(XP\_002447862.1)、玉米(NP\_

001132683.1)、谷子(XP\_004975656.1)、短柄草(*Brachypodium distachyon*, XP\_003579783.1)和水稻(*Oryza sativa*, NP\_001052844.1)5条与*ScAPX*氨基酸序列同源性达80%以上的APX蛋白序列进行同源性分析。由其系统进化树可以看出,*ScAPX*基因编码蛋白与高粱APX蛋白同源性最高,其次是玉米,同源性分别为99%和97%(图6)。氨基酸多序列比对结果显示(图7),抗坏血酸过氧化物酶基因的编码氨基酸保守性较高。

### 2.3 组织特异性表达分析

基于实时荧光定量PCR技术,对甘蔗各组织*ScAPX*含量进行特异性分析。以叶的表达量为参照基准,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对基因表达量进行分析。结果显示(图8),自然生长状态下,*ScAPX*属组成型表达基因,在甘蔗的根、叶、蔗芽、蔗皮和蔗髓中均有表达,但其表达量差异较大,在蔗皮中表达量最高,显

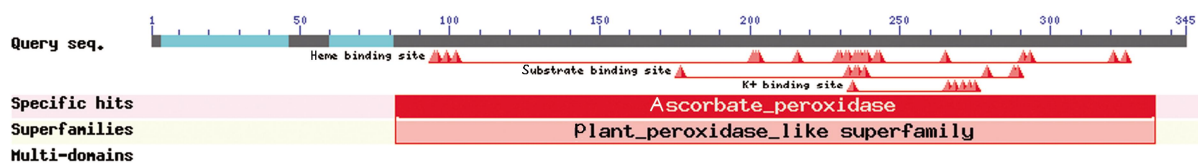


图3 *ScAPX*蛋白保守结构域预测

Figure 3 The prediction of conserved domain in sugarcane *ScAPX* protein

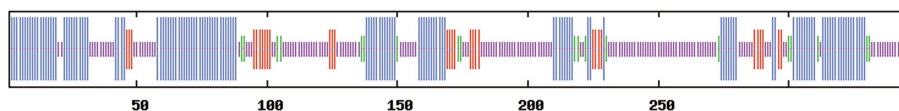


图4 *ScAPX*蛋白二级结构预测

Figure 4 Predicted secondary structure of sugarcane *ScAPX* protein

蓝、紫、红和绿色线条分别代表 $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲、延伸链和 $\beta$ -转角

Blue, purple, red and green lines represent alpha helix, randomcoil, extended strand and  $\beta$ -turn, respectively

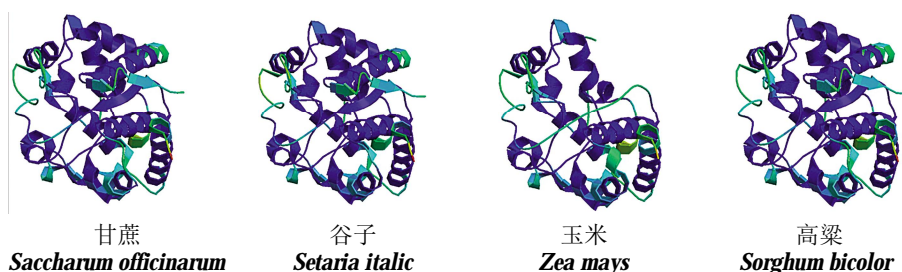


图5 甘蔗*ScAPX*与谷子、玉米和高粱的APX蛋白空间构象模拟图对比

Figure 5 The conformation simulated diagrams of APX proteins from *Saccharum officinarum*, *Setaria italic*, *Zea mays* and *Sorghum bicolor*

4个物种APX蛋白三维结构中氨基酸序列的螺旋和折叠等空间结构特点基本相同

Spatial structure characteristics of APX proteins from 4 plant species were similar, such as the spiral and folding structure

著高于其他组织( $P < 0.05$ ), 蔗髓次之, 叶中最低, 显著低于其他组织( $P < 0.05$ ), 蔗皮中 *ScAPX* 的表达量是叶中的 19.7 倍。

### 2.4 外源胁迫下 *ScAPX* 基因的表达情况分析

由图 9 可知, *ScAPX* 应答不同外源因子胁迫的表达量变化有明显差异, 胁迫后的 *ScAPX* 最高表达量出现的时间点也各不相同, 但总趋势是信号因子 (SA、MeJA 和  $H_2O_2$ ) 处理后的 *ScAPX* 转录本积累量

峰值出现的时间比 ABA 以及 NaCl 和 PEG 胁迫更早, 而且, 前者的 *ScAPX* 转录本变化呈现出胁迫初期积累量增加, 达到峰值后又逐步下降的特点; 而在同样的测试时间 (处理后 24 h) 内, ABA、NaCl 和 PEG 处理后 *ScAPX* 转录本在达到峰值后未见下降, 尤其是经 NaCl 处理后。另一方面, 在外源因子 SA、MeJA、 $H_2O_2$ 、ABA、NaCl 和 PEG 胁迫下, 虽然 *ScAPX* 表达量变化特点存在明显差异, 但该基因的表达均表现出正响应上述外源因子对甘蔗的胁迫。

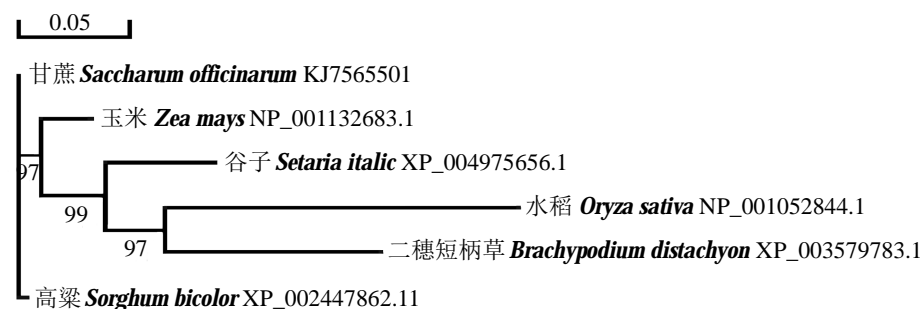


图 6 6 个物种 APX 氨基酸序列同源树

Figure 6 Homology tree of 6 plant species based on amino acid sequences of the APXs

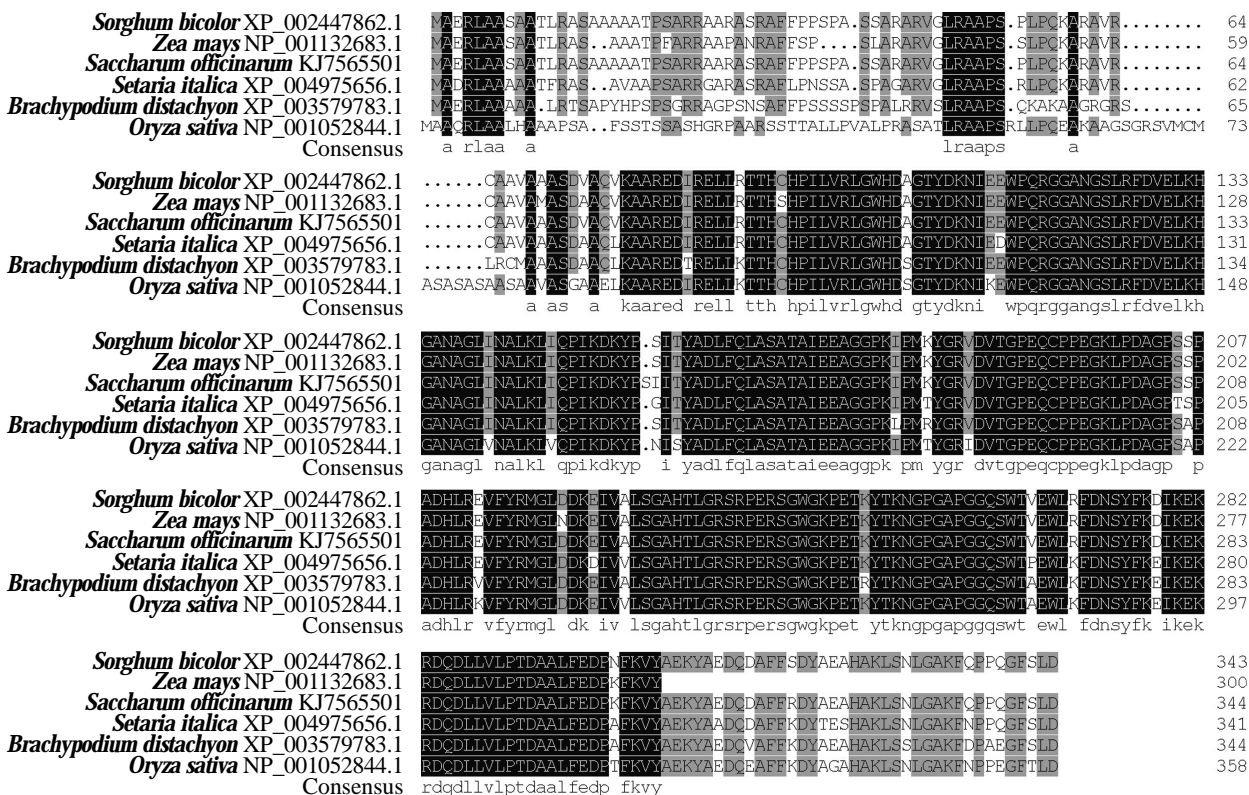


图 7 *ScAPX* 基因编码氨基酸与其同源性植物编码抗坏血酸过氧化物酶的氨基酸比对

Figure 7 Homology analysis of *ScAPX* encodes amino acids sequences and those from other plant species

黑色部分为氨基酸保守序列, 灰色部分为 5 个序列中保守

Conserved domains are shaded in black and similar residues in 5 sequences are shaded in gray

### 3 讨论

前人的研究显示, APX 编码蛋白相对分子质量大约为 30 kD, 有些以单体存在, 但有些则以二聚体形式存在(韩立敏, 2007)。本研究中, *ScAPX* 基因编码蛋白的生物信息学分析结果显示, 其相对分子质量为 37.49 kD, 这与前人从马铃薯块茎线粒体中纯化获得的类似于 APX 蛋白的相对分子质量 (31 kD) 相似(De-Leonardis et al., 2000)。此外, Elia 等(1992)也从马铃薯块茎中纯化获得一相对分子质量为 30 kD 的可溶性 APX 蛋白。本研究氨基酸序列同源比对结果显示, 甘蔗 *ScAPX* 与高粱 APX 蛋白同源性最高, 达 99%。有关高粱 APX 蛋白序列结构分析表明, 其不含信号肽, 疏水性弱, 是亲水性蛋白, 定位于细胞质概率大, 第 33~34 位氨基酸序列是其酶活区域, 第 155~165 位氨基酸序列是其亚铁血红素配基结合区域(陈国强等, 2011)。黄菲等(2013)以水稻 APX 基因 (GenBank 登录号: AB053297) 为种子序列, 利用电子克隆技术获得一条甘蔗 APX 的 cDNA 全长序列, DNAMAN 序列比对结果显示该序列与本研究获得的 *ScAPX* 氨基酸序列相似度仅为 44.06%, 氨基酸结构预测中两者的分子量、等电点等均不相同, 且其为疏水性蛋白, 具有信号肽, 为分泌蛋白, 无跨膜结构域。而本研究中, 生物信息学预测分析显示 *ScAPX* 为亲水性蛋白, 无信号肽, 为非分泌蛋白, 推测两者属于 APX 基因家族的两个不同的成员。本研究中, 利用生物信息学预测 *ScAPX* 编码蛋白也表现出了亚铁

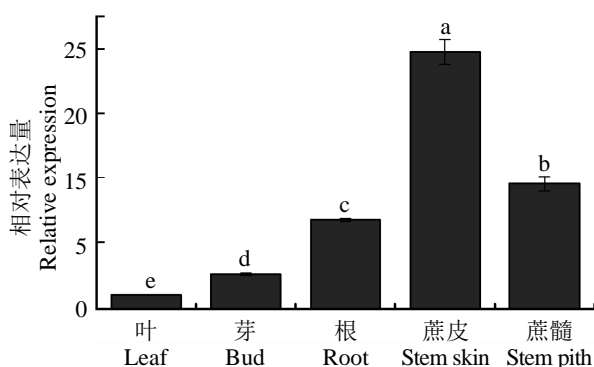


图 8 *ScAPX* 在甘蔗组织中的表达情况

Figure 8 The specificity analysis of *ScAPX* in sugarcane tissue 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 内参基因: *GADPH*,  $n=3$ ; 下同

Different minuscules indicate significant differences ( $P < 0.05$ ); Reference gene: *GADPH*,  $n=3$ ; The same below

血红素结合位点, 并具有丙氨酸残基等高度保守区域, 进一步为甘蔗 *ScAPX* 和高粱 APX 基因具高度同源性提供了佐证, 也为今后该基因的功能研究提供了一定基础资料。

APX 基因的表达受钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ )、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、SA 和 ABA 等的诱导, Agarwal 等(2005)研究发现, 1 mmol/L 的 SA、0.5 mmol/L 的 ABA、5 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  和 0.05 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  均可有效地提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、APX 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性。本研究对非生物胁迫下 ROS 变化引起的 *ScAPX* 表达情况进行分析, 发现目标基因的表达受 5 mmol/L SA、25  $\mu\text{mol/L}$  MeJA、100  $\mu\text{mol/L}$  ABA、10 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、250 mmol/L NaCl 和 25% PEG 的诱导(图 9), 导致 *ScAPX* 表达量总体呈明显的上调趋势。这与前人在不同的植物逆境系统中研究 APX 基因的表达结果相似, 韩立敏(2007)对丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) (250 mmol/L NaCl)、李

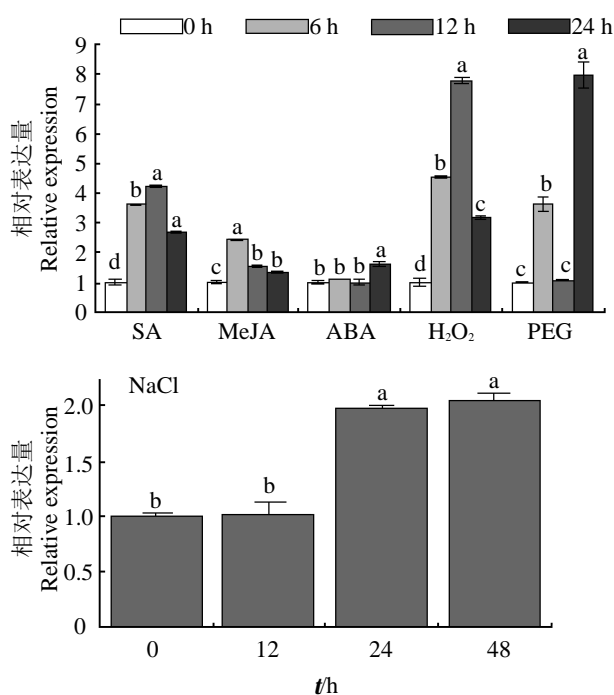


图 9 外源胁迫下 *ScAPX* 的表达情况

Figure 9 Relative expression of *ScAPX* under exogenous stress

SA: 水杨酸(5 mmol/L); MeJA: 茉莉酸甲酯(25  $\mu\text{mol/L}$ ); ABA: 脱落酸(100  $\mu\text{mol/L}$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 10 mmol/L; NaCl: 250 mmol/L; PEG: 聚乙二醇(25%)

SA: Salicylic acid (5 mmol/L); MeJA: Methyl jasmonate(25  $\mu\text{mol/L}$ ); ABA: Abscisic acid(100  $\mu\text{mol/L}$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 10 mmol/L; NaCl: 250 mmol/L; PEG: Polyethylene glycol(25%)

娜(2011)对毛白杨(*Populus tomentosa*) (200 mmol/L NaCl 和干旱处理)、马长乐等(2002)对盐地蓬菜(*Suaeda salsa*) (400 mmol/L NaCl)、王利军等(2003)对葡萄(*Vitis vinifera*) (100  $\mu$ mol/L SA)以及蒋明等(2012)对青花菜(*Broccoli*) (1 mmol/L SA)胁迫下, *APX*基因的表达量均有不同程度上升。

本研究结果表明,甘蔗 *APX* 为组成型表达基因,这在蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*) (许传俊等, 2012)、茶树(*Camellia sinensis*) (孙云等, 2008)和黄芩(*Scutellaria baicalensis*) (谢小群, 高山林, 2002)中也已得到验证。王媛(2007)研究发现,杨树(*Populus*)受真菌性溃疡病菌(*Botryosphaeria dothidea*)感染后, *APX* 酶的活性在杨树抗、感品种中均有变化,且 *APX* 酶活性在抗病品种中明显高于感病品种。关西贞等(2000)分析小麦(*Triticum aestivum*)不同抗病性水平的品种与白粉病菌(*Erysiphe graminis*)互作时,其感病品种叶片中的 *APX* 酶活性上升的时间较抗病品种滞后。甘蔗在黑穗病菌胁迫下,抗、感基因型的 *APX* 酶活性均有显著提高,但抗黑穗病基因型(崖城 05-179)的酶活性全程明显高于对黑穗病敏感的基因型(柳城 03-182) (图 1),所以,推测 *APX* 在甘蔗响应黑穗病菌胁迫中发挥积极的作用。本研究表明,甘蔗受黑穗病菌感染后 *APX* 酶活性增强,其编码基因 *ScAPX* 在各种外源胁迫下表达量增加,说明该基因正响应生物和非生物逆境胁迫。研究结果为后续进一步研究该基因功能以及开发逆境相关生物标记提供基础数据。

#### 4 结论

本研究对黑穗病菌感染后的甘蔗抗、感黑穗病基因型进行 *APX* 酶活性测定,结果表明,抗病品种的 *APX* 酶活性显著高于感病品种。实验从甘蔗中分离到一个抗坏血酸过氧化物酶基因 *ScAPX* (GenBank 登录号: KJ7565501),全长 1 171 bp,编码 345 个氨基酸。*ScAPX* 推导的编码蛋白不含信号肽,推测其为非分泌蛋白,定位于线粒体基质和叶绿体基质中的概率分别为 91.1% 和 88.7%,与高粱、玉米 *APX* 蛋白氨基酸序列同源性高达 97% 以上。*ScAPX* 为组成型表达基因,在甘蔗根、芽、叶、蔗皮和蔗髓中均有表达,但表达量在蔗皮中最高,叶中最低,前者是后者的 19.7 倍。在外源胁迫下,尽管 *ScAPX* 表达量变化特点存在差异,但该基因的表达

均表现出正响应 SA、MeJA、 $H_2O_2$ 、ABA、NaCl 和 PEG 对甘蔗的胁迫。

#### 参考文献

- 陈国强, 孟鹏, 刘李黎, 等. 2011. 高粱抗坏血酸过氧化物酶基因的电子克隆及序列分析[J]. 生物信息学, 9(2): 124-125. (Chen G Q, Meng P, Liu L L, et al. 2011. In silico cloning and characterization of *Sorghum APX* gene[J]. China Journal of Bioinformatics, 9(2): 124-125.)
- 陈珊珊. 2012. 甘蔗活性氧代谢途径关键酶基因的克隆与表达分析[D]. 硕士学位论文, 福建农林大学, 导师: 许莉萍. (Chen S S. 2012. Cloning and expression analysis of ROS metabolism pathway key genes from sugarcane [D]. Thesis for M.S., Fujian Agriculture and Forestry University. Supervisor: Xu L P.)
- 关西贞, 张卫东, 田纪春. 2000. 小麦近等基因系与白粉病菌互作的生理指标研究[J]. 华北农学报, 25(1): 217-221. (Guan X Z, Zhang W D, Tian J C. 2000. Physiological indicators of near-isogenic wheat lines in interaction with *Powdery Mildew*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 25(1): 217-221.)
- 龚得明, 陈如凯. 1995. 甘蔗对黑穗病抗病机制及遗传的研究进展[J]. 福建省农科院学报, 10(1): 33-36. (Gong D M, Chen R K. 1995. Advances in the study on resistance mechanism and heritance to sugarcane smut caused by *Usilago scitaminea*[J]. Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences, 10(1): 33-36.)
- 韩立敏. 2007. 丹参 *APX* 和 *GPX* 基因克隆及其表达分析[D]. 硕士学位论文, 陕西师范大学, 导师: 王喆之. (Han L M. 2007. Study on cloning and expression of ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase gene of *Salvia Miltiorrhiza* bge[D]. Thesis for M.S., Shaanxi Normal University, Supervisor: Wang Z Z.)
- 黄菲, 张云鹤, 李雪梅. 2013. 甘蔗抗坏血酸过氧化物酶的电子克隆及生物信息学分析[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学学报), 31(2): 295-300. (Huang F, Zhang Y H, Li X M. 2013. In silico cloning and characterization of ascorbate peroxidase gene from *Saccharum* using bioinformatics tools[J]. Journal of Shenyang Normal University(Natural Science), 31(2): 295-300.)
- 蒋明, 张志仙, 袁菱婧. 2012. 青花菜抗坏血酸过氧化物酶基因 *BoAPX2* 的克隆与表达分析[J]. 植物病理学报, 42(4): 374-380. (Jiang M, Zhang Z X, Yuan L J. 2012. Cloning and expression analysis of an ascorbate peroxidase gene *BoAPX2* from *Brassica oleracea* var. *italica*[J].

- Acta Phytopathologica Sinica, 42(4): 374-380.)
- 李娜. 2011. 741 毛白杨 *APX* 基因的克隆及表达分析[D]. 硕士学位论文, 北京林业大学, 导师: 陆海. (Li N. 2011. Cloning of *APX* gene from *Populus tomentosa* and expression analysis[D]. Thesis for M.S., Beijing Forestry University, Supervisor: Lu H.)
- 李泽琴, 李静晓, 张根发. 2013. 植物抗坏血酸过氧化物酶的表达调控以及对非生物胁迫的耐受作用[J]. 遗传, 35(1): 45-54. (Li Z Q, Li J X, Zhang G F. 2013. Expression regulation of ascorbate peroxidase and its tolerance to abiotic stress[J]. Hereditas, 35(1): 45-54.)
- 刘稳. 2002. 植物过氧化物酶超家族的分子结构[J]. 生命科学, 14(4): 212-215. (Liu W. 2002. Molecular structure of plant peroxidase superfamily[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 14(4): 212-215.)
- 刘稳, 李杨, 高培基, 等. 2000. 过氧化物酶研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 8(2): 50-64. (Liu W, Li Y, Gao P J, et al. 2000. The research progress of ascorbate peroxidase[J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 8(2): 50-64.)
- 马长乐, 王萍萍, 曹子谊, 等. 2002. 盐地碱蓬(*Suaeda salsa*) *APX* 基因的克隆及盐胁迫下的表达[J]. 植物生理与分子生物学学报, 28(4): 261-266. (Ma C L, Wang P P, Cao Z Y, et al. 2002. cDNA cloning and gene expression of *APX* in *Suaeda salsa* in response to salt stress[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 28(4): 261-266.)
- 苏亚春, 李国印, 阙友雄, 等. 2011. 甘蔗几丁质酶基因的电子克隆与生物信息学分析[J]. 生物信息学, 9(4): 322-326. (Su Y C, Li G Y, Que Y X, et al. 2011. In silico cloning and characterization of chitinase gene from sugarcane using bioinformatics tools[J]. China Journal of Bioinformatics, 9(4): 322-326.)
- 孙云, 江春柳, 赖钟雄, 等. 2008. 茶树鲜叶抗坏血酸过氧化物酶活性的变化规律及测定方法[J]. 热带作物学报, 29(5): 562-566. (Sun Y, Jiang C L, Lai Z X, et al. 2008. Determination and observation of the changes of the ascorbate peroxidase activities in the fresh leaves of tea plants[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 29(5): 562-566.)
- 王伯辉. 2007. 我国甘蔗病害的发生现状与研究进展[J]. 中国糖料, 2007(3): 48-51. (Wang B H. 2007. The occurrence status and the research progress of sugarcane disease in China[J]. Sugar Crops of China, 2007(3): 48-51.)
- 王利军, 黄卫东, 战吉成. 2003. 水杨酸和高温锻炼与葡萄抗热性及抗氧化的关系[J]. 园艺学报, 30(4): 452-454. (Wang L J, Huang W D, Zhan J C. 2003. Thermotolerance related to antioxidation induced by SA and heat acclimation in grape seedlings[J]. Acta Horticulturae Sinica, 30(4): 452-454.)
- 王媛. 2007. 杨树与溃疡病菌(*Botryosphaeria dothidea*) 互作中的细胞生物学、活性氧代谢及细胞过敏性反应[D]. 博士学位论文, 中国林业科学研究院, 导师: 张星耀, 梁军. (Wang Y. 2007. Cell biology, reactive oxygen metabolism and cell hypersensitive response of Poplar-canker pathogen interaction[D]. Dissertation for Ph. D., State Forestry Administration, P. R. China. Supervisor: Zhang X Y, Liang J.)
- 武胜燕. 2009. 基因枪介导 BT 基因转化能源甘蔗的研究[D]. 硕士学位论文, 广东海洋大学, 导师: 陈彪. (Wu S Y. 2009. BT gene genetic transformation of sugarcane by particle bombardment[D]. Thesis for M. S., Guang Dong Ocean University, Supervisor: Chen B.)
- 谢小群, 高山林. 2002. 黄芩过氧化物酶同工酶电泳和抗坏血酸过氧化物酶活性分析[J]. 植物资源与环境学报, 11(1): 5-8. (Xie X Q, Gao S L. 2002. The analysis of peroxidase isoenzyme electrophoresis and activity of ascorbate peroxidase(ASP) in *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 11(1): 5-8.)
- 许传俊, 孙叙卓, 李玲, 等. 2012. 蝴蝶兰抗坏血酸过氧化物酶基因克隆及其表达研究[J]. 园艺学报, 39(4): 769-776. (Xu C J, Sun X Z, Li L, et al. 2012. Molecular cloning and expression analysis of homologous gene *APX* from phalaenopsis[J]. Acta Horticulturae Sinica, 39(4): 769-776.)
- 许莉萍, 陈如凯. 2000. 甘蔗黑穗病及其抗病育种的现状与展望[J]. 福建农业学报, 15(2): 26-31. (Xu L P, Chen R K. 2000. Current status and prospects of smut and smut resistance breeding in sugarcane[J]. Fujian Journal of Agricultural of Sciences, 15(2): 26-31.)
- 曾秀存, 孙万仓, 方彦. 2013. 白菜型冬油菜抗坏血酸过氧化物酶(*APX*)基因的克隆、表达及其活性分析[J]. 作物学报, 39(8): 1400-1408. (Zeng X C, Sun W C, Fang Y. 2013. Cloning, expression and activity analysis of ascorbate peroxidase (*APX*) gene from winter turnip rape (*Brassica campestris* L.)[J]. Acta Agronomica Sinica, 39(8): 1400-1408.)
- Agarwal S, Sairam R K, Srivastava G C, et al. 2005. Role of salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings[J]. Plant Science, 169: 559-570.
- Chao C P, Hoy J W, Saxton A M, et al. 1990. Heritability of re-

- sistance and repeatability of clone reactions to sugarcane smut in *Louisiana* [J]. *Phytopathology*, 80(7): 622-626.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, et al. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5): 779-795.
- De-Leonardis S, Dipierro N, Dipierro S. 2000. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 773-779.
- Elia M R, Borraccino G, Dipierro S. 1992. Soluble ascorbate peroxidase from potato tuber[J]. *Plant Science*, 85(1): 17-21.
- Narendra S, Venkataramani S, Shen G X, et al. 2006. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 57(12): 3033-3042.
- Su Y C, Guo J L, Ling H, et al. 2014. Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses[J]. *PLoS ONE*, 9(1): e84426.
- Su Y C, Xu L P, Xue B T, et al. 2013. Molecular cloning and characterization of two pathogenesis-related  $\beta$ -1,3-glucanase genes *ScGluA1* and *ScGluD1* from sugarcane infected by *Sporisorium scitamineum*[J]. *Plant Cell Reports*, 32(10): 1503-1519.
- Willekens H, Langebartels C, Tire C, et al. 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91(22): 10450-10454.
- Wu Q B, Xu L P, Guo J L, et al. 2013. Transcriptome profile analysis of sugarcane responses to *Sporisorium scitaminea* infection using solexa sequencing technology[J]. *BioMed Research International, The Scientific World Journal*, Volume 2013(2013).

(责任编辑 靳晓霞)