

• 药材与资源 •

千里光过氧化物酶基因的 SSR 标记及序列分析

上官艳妮, 李 林, 潘胤池, 陈红波, 罗才林, 谢 欣, 张社波, 钱 刚, 徐德林*
遵义医学院 细胞生物学教研室, 贵州 遵义 563099

摘要: 目的 研究千里光过氧化物酶 (peroxidase, POD) 基因结构特征和功能的关系, 并根据其核苷酸序列设计 SSR 引物, 进一步验证其在多个千里光地方种中的多态性。方法 从千里光全长 cDNA 文库中分离到 POD 全长序列, 运用系列生物信息学软件进行核苷酸与氨基酸的序列特征分析, 分析序列中的 SSR 位点并对多个千里光品系进行 PAGE 检测和验证。结果 基因具有典型的 POD 结构特征, 表现出高度的保守性。PAGE 电泳显示该引物在不同地方品系的千里光中扩增稳定, 且存在明显多态性。结论 研究结果拓展了对千里光 POD 基因序列和功能的认识, 新开发标记能有效应用于 POD 基因的检测和育种鉴定, 同时也可为其他物种的 POD 研究提供参考。

关键词: 千里光; 过氧化物酶基因; 序列分析; SSR; PAGE 电泳

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1952-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.027

Sequence analysis and SSR marker mining of a peroxidase gene in *Senecio scandens*

SHANGGUAN Yan-ni, LI Lin, PAN Yin-chi, CHEN Hong-bo, LUO Cai-lin, XIE Xin, ZHANG She-bo, QIAN Gang, XU De-lin

Department of Cell Biology, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China

Abstract: Objective To study the relationship between the sequence structure and function of a peroxidase gene (POD) and mine and confirm SSR locus of this gene in *Senecio scandens*. **Methods** A POD gene was obtained from full-length cDNA library of *S. scandens*. Then a series of online bioinformatics tools were used to analyze nucleic acid sequence and amino acid structure of this gene. According to its nucleotide sequence, one SSR locus was searched and a pair of primers were designed. The PAGE electrophoresis confirmed that this primer pair had polymorphism among several landraces. **Results** The target gene had the structural characteristics of typical PODs. It showed a high conservation in functional domains. PAGE electrophoresis showed that the primer could be stably amplified in different landraces with obvious polymorphisms. **Conclusion** The results expanded the understanding of the function and sequence of a POD in *S. scandens*. The newly developed marker could be effectively applied to the detection of POD gene and breeding projects, and it also provided reference for POD researches of other species.

Key words: *Senecio scandens* Buch. -Ham. ex D. DO; peroxidase gene; sequence analysis; SSR; PAGE electrophoresis

千里光为菊科 (Compositae) 植物千里光 *Senecio scandens* Buch. -Ham. ex D. DO 的干燥地上部分, 表面灰绿色、黄棕色或紫褐色, 主要分布在我国西南部山区。千里光气微、味苦, 具有清热解毒、明目、利湿的效果, 主要用于治疗各种症状引起的肿痛疮毒、感冒发热、皮肤湿疹、痢疾、目赤

肿痛^[1-2], 是普遍使用的重要中药材。

过氧化物酶 (peroxidase, POD) 是广泛存在于各种动物、植物和微生物体内的一种氧化还原酶, 催化由过氧化氢参与的各种还原剂的氧化反应。POD 一共分为 I~III 型, 只有第 I 型和第 III 型存在于植物中, 并在植物正常和应激反应代谢中发挥重

收稿日期: 2018-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31560079); 国家自然科学基金资助项目 (31560087); 贵州省科学技术基金项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7549 号); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 (黔科合 ZY 字 [2013] 3002 号); 遵义市 2014 年度“15851”人才工程项目 (201424); 遵义医学院精英人才工程项目

作者简介: 上官艳妮 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药材细胞工程。Tel: 15266653040 E-mail: 472049236@qq.com

*通信作者 徐德林, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药材遗传育种。E-mail: xudelin2000@163.com

要作用^[3],特别是能够保护植物对抗外界极端的环境和气候,是植物保护酶系的重要保护酶之一。多数植物 POD 能与碳水化合物结合成为糖基化蛋白,糖基化可以避免蛋白酶降解以及稳定酶蛋白构象^[4]。一般来说,植物 POD 约由 300 个左右氨基酸残基构成,相对分子质量约 35 000,其中存在酸碱催化域和血红素结合区域^[5],一般含有 8 个半胱氨酸、约 8 个糖和 2~6 个糖基化位点、2 个葡萄糖胺、2 个钙离子和 1 个原高铁血红素、N-端为吡咯烷酮碳酸、C-端为精氨酸^[6]。

目前,关于 POD 基因的克隆和抗逆性表达已经发展到数百种植物物种。王海波等^[7]研究表明,小桐子过氧化物酶 JcPOD73 基因的表达因其组织特异性明显,受到低温胁迫的诱导表达,因此参与调控小桐子低温胁迫的抗性应答。王竹青等^[8]发现,甘蔗 ScAPX 是在蔗皮中表达量最高的非分泌型蛋白,而且均表现出正响应外源因子对甘蔗的胁迫。但是该基因在菊科植物的相关研究未见报道,目前也尚无关于 POD 基因特异检测的分子标记报道。本研究率先开展菊科药用植物千里光 POD 基因的序列分析和功能研究,探索其蛋白理化性质和保守基序对功能结构域的决定作用,并进一步根据其序列开发设计特异检测的分子标记,以期为千里光及其他物种 POD 基因结构与功能及分子检测研究提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验材料(SC-1~10)系本研究组采自贵州省遵义地区的野生材料,由遵义医学院细胞生物学教研室钱刚教授鉴定为千里光 *Senecio scandens* Buch.-Ham. ex D. DO.

1.2 仪器和试剂

MICRO 21/21R 型冷冻离心机(Thermo 公司);DYCP-31DN 型水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司);C1000TM Thermal Cycler 型 PCR 仪、Gel DocTM XR+ 型凝胶成像仪(Bio-Rad 公司);DYCZ-30C 型垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司);AG 22331Hamburg 型紫外分光光谱仪(Eppendorf 公司)。

总 RNA 提取试剂 Trizol 购自宝生物工程(大连)公司;文库构建试剂盒 Creator SMART cDNA Library Constuction Kit 公司。2×PCR MIX 购自北京擎科梓熙生物科技有限公司;DNA 引物合成、DNA Marker 及提取基因组 DNA 所需分析纯试剂 CTAB、EDTA、

Tris 等均购自上海生工生物技术有限公司。

2 方法

2.1 cDNA 文库构建

按照 RNA 提取试剂盒说明提取千里光叶片组织的总 RNA,采用 SMART 方法构建了千里光的全长 cDNA 文库^[9],随机挑选阳性克隆进行测序(华大基因)。

2.2 DNA 的提取

(1)取新鲜千里光叶片 200 g,去除较粗的叶脉,75%乙醇擦拭消毒、晾干,液氮处理后充分研磨。(2)将粉末转移至 2 mL 的 EP 管中,加 1 mL 的 CTAB 裂解缓冲液,在 30 °C 水浴锅中恒温加热 30 min,12 000 r/min 离心 8 min,保留上清。(3)用移液枪吸取上清液 500 μL 转移至 2 mL 的灭菌 EP 管中,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),缓慢并充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min。(4)吸取上层水相 400 μL,至 1.5 mL EP 管中,加入等体积的无水乙醇(-20 °C 预冷),轻轻摇晃至出现白色絮状 DNA。(5)颠倒混匀,以促进 DNA 的抱团沉淀,12 000 r/min 离心 1 min。(6)倒掉无水乙醇,加入 75%乙醇洗涤 2 次,无水乙醇洗涤 1 次,弃掉无水乙醇,通风处晾干至无乙醇味。(7)加入 100 μL 含有 10 μL RNA-A 的灭菌 ddH₂O 溶解 DNA,DNA 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后 4 °C 保存。

2.3 序列的生物信息学分析

根据测序的结果,运用 NCBI 的 BLAST 在线分析软件进行千里光 POD 核苷酸序列比对分析,并利用 ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析 POD 核苷酸序列的开放阅读框;采用 ExPasy Prot Param(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)分析千里光 POD 的相对分子质量、等电点和氨基酸组成;使用 Prot Scale(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1>)软件对 POD 进行亲疏水性分析;用 NetPhos 3.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对千里光 POD 的磷酸化位点进行预测;用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.>)对编码蛋白信号肽进行分析;使用在线工具 SOPMA 分析千里光 POD 基因的二级结构,并用软件 SWISS MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/repository>)进行序列结构的三维预测;在线软件 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析其蛋白质保守结构域,应用在线工具 Psort

(https://www.genscript.com/tools/wolf-psort) 对亚细胞进行定位分析, 在线工具 Profun (http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/) 进行功能分类预测; 运用 DNAMAN (6.0) 对氨基酸序列进行多重比对; 使用 MEGA 6.0 软件的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建多物种 POD 序列的系统发生树。

2.4 SSR 检测与 PAGE 验证

用 NWISRL 在线服务器对克隆所得到的 POD 核苷酸序列进行分析 (https://ssr.nwisrl.ars.usda.gov/), 参数设定为默认值, 检测序列的 SSR 位点, 进一步用 DNAMAN 程序对检测到的 SSR 位点进行特异引物 HYF (5'-GATTAGACAACAATGCAATGT-3') 和 HYP (5'-TGTCACACCATCATCATCAT-3') 的设计。进一步用 PCR 扩增验证 PAGE 检测结果。PCR 反应体积 10 μL, 含千里光模板 DNA 1.5 μL, 2×PCR MIX 6 μL, 引物 (HYF 和 HYP) 各 0.75 μL, ddH₂O 1 μL。扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 34 个循环; 72 °C 延伸 5 min。用 10% 聚丙烯酰胺凝胶分离扩增产物, 电泳仪为 PowerPac 型稳压稳流电泳仪, 设定其恒定电压为 120 V, 电泳

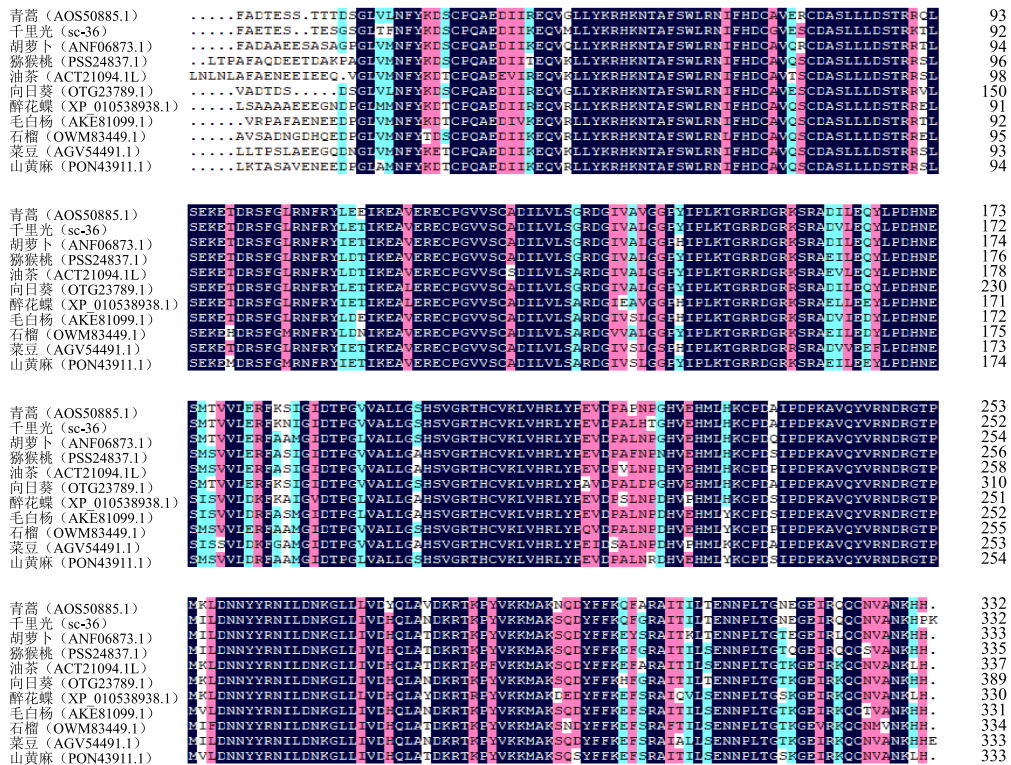
150 min, 硝酸银银染后观察条带并照相。

3 结果与分析

3.1 POD 序列与氨基酸理化性质特征分析

从千里光 cDNA 文库中挑选出初步注解为 POD 的 unigene, 该序列全长为 1353 bp, ORF finder 查找开放阅读框发现, 该序列包含 1 个完整的开放阅读框, 全长 1014 bp, 共编码 337 个氨基酸序列残基 (amino acid, AA)。Expsasy Prot Param 软件预测显示千里光 POD 由 20 种氨基酸组成, 其中 Leu 和 Val 含量最高, 分别为 10.8% 和 7.1%, 不含 Pyl 和 Sec。该蛋白相对分子质量为 37 970, 理论等电点 (pI) 为 8.32, 原子组成为 C₁₆₈₄H₂₆₇₈N₄₇₄O₄₉₇S₁₄, 负电荷残基 (Asp+Glu) 41 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 44 个, 不稳定系数为 39.84, 根据不稳定参数值在 40 以下是稳定蛋白的标准, 表明该蛋白质结构稳定。将该基因序列提交 NCBI 数据库。

应用软件 DNAMAN 进行多物种氨基酸序列比对, 发现千里光 POD 的氨基酸序列与向日葵、青蒿、胡萝卜等植物的 POD 蛋白基因序列有同源性很高 (图 1), 说明 POD 蛋白基因在植物中的序列具有非常高的保守性。



不同背景颜色表示序列同源性大小: 黑色 100%, 红色 75%, 蓝色 25%, 白色 0; “*” 表示氨基酸缺失

Different background colors indicate sequence homology: black 100%, red 75%, blue 25%, white 0; “*” indicates amino acid deletion

图 1 POD 一级结构在 10 个不同亲缘关系物种中的比对结果
Fig. 1 Amino acid sequence alignment of PODs from 10 species

3.2 千里光 POD 亲疏水性分析

利用常用的在线软件 Prot Scale 对千里光 POD 的亲疏水性进行预测分析, 其中分值越低代表亲水性越强, 分值越高其疏水性越强。结果表明, 千里光 POD 亲水性最大的氨基酸是精氨酸, 分值为-4.5, 疏水性最大的氨基酸是异亮氨酸, 分值为 4.5。从整体上看, 千里光 POD 的亲水性氨基酸要明显多于疏水性氨基酸, 其亲水性评估系数为 0.696。因此, 千里光 POD 是一个相对亲水的蛋白质 (图 2)。

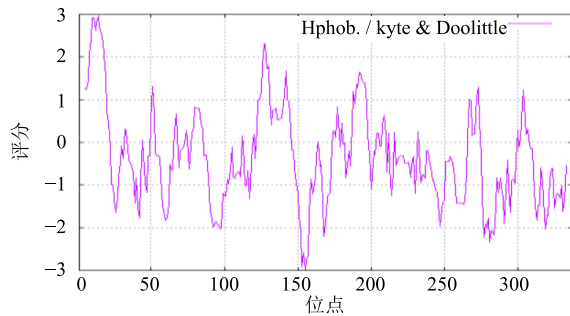


图 2 千里光 POD 疏水性分析结果
Fig. 2 Hydrophobic analysis of POD

3.3 千里光 POD 磷酸化修饰

丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基是蛋白质磷酸化的主要氨基酸位点。蛋白磷酸化是一种最普遍的翻译后修饰, 几乎调节着生命活动的整个过程, 因此蛋白质的磷酸化分析对了解蛋白质可能的功能具有重要意义。一般来说, 多肽链中的氨基酸潜在的磷酸化位点越多, 发挥更多功能的可能性就越大。用 NetPhos 3.1 Server 对千里光 POD 的蛋白质序列进行潜在磷酸化位点分析。千里光 POD 共有 37 个磷酸化位点, 其中 17 个丝氨酸磷酸化作用位点、15 个苏氨酸磷酸化作用位点和 5 个酪氨酸磷酸化作用位点 (图 3)。

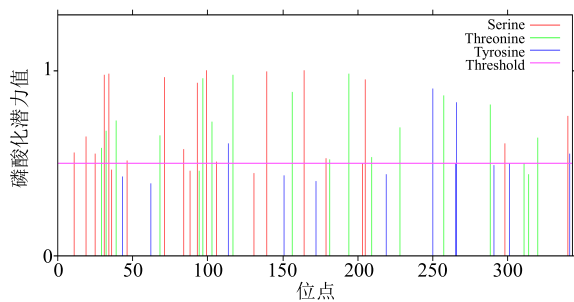


图 3 NetPhos 2.0 Server 对千里光 POD 的磷酸化位点预测
Fig. 3 Prediction of phosphorylation site of POD by NetPhos 2.0 Server

3.4 编码蛋白的信号肽分析

利用在线工具 SignalP, 对千里光 POD 进行信号肽预测分析。结果显示: 千里光 POD 的第 1~70 个氨基酸可能是其信号肽序列, 在 C 值最大、S 值最陡峭、Y 的最高峰处被预测为信号肽剪切位点 (图 4), 表明该蛋白为分泌性蛋白。

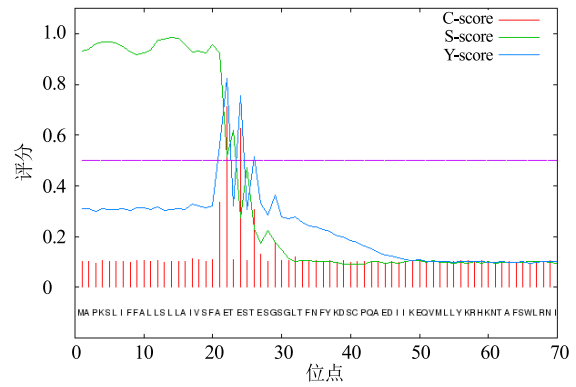


图 4 千里光 POD 的信号肽分析
Fig. 4 Signal peptide analysis of POD

3.5 保守结构域特征分析

利用 NCBI 搜索千里光 POD 功能结构域, 结果表明, 千里光 POD 具有血红素、钙、底物结合位点和活性位点, 而且这些结合位点与其他与之相似的物种无论是在位点的位置还是在位点的个数上表现出高度的相似性 (图 5)。

3.6 蛋白质结构预测分析

对千里光 POD 的二级结构用 SOPMA 进行预测, 分析表明主要的结构元件是 α -螺旋和无规卷曲 (图 6)。分布比例上看, 该基因 337 个氨基酸残基中, 127 个氨基酸残基为 α -螺旋占 37.69%, 53 个氨基酸残基为线性结构占 15.73%, 141 个氨基酸残基为无规卷曲占 41.84%, 16 个氨基酸残基为 β -转角占 4.75%。利用 SWISS-MODEL 绘制出千里光 POD 的三级结构图, 结果显示蛋白螺旋与无规卷曲占据了该蛋白高级结构的大部分空间 (图 6), 这与千里光 POD 的二级结构相吻合。

3.7 亚细胞定位与功能预测

不同的亚细胞定位决定植物不同的特异的生物学功能。使用在线工具 Psort 对千里光 POD 亚细胞定位进行预测, 结果显示, 其主要定位于细胞质中。采用 ProtFun 对千里光 POD 的功能预测, 如表 1 所示, 该蛋白具有电压门控离子通道 (12.682)、离子通道 (2.965)、阳离子通道 (3.174) 功能的概率较高。

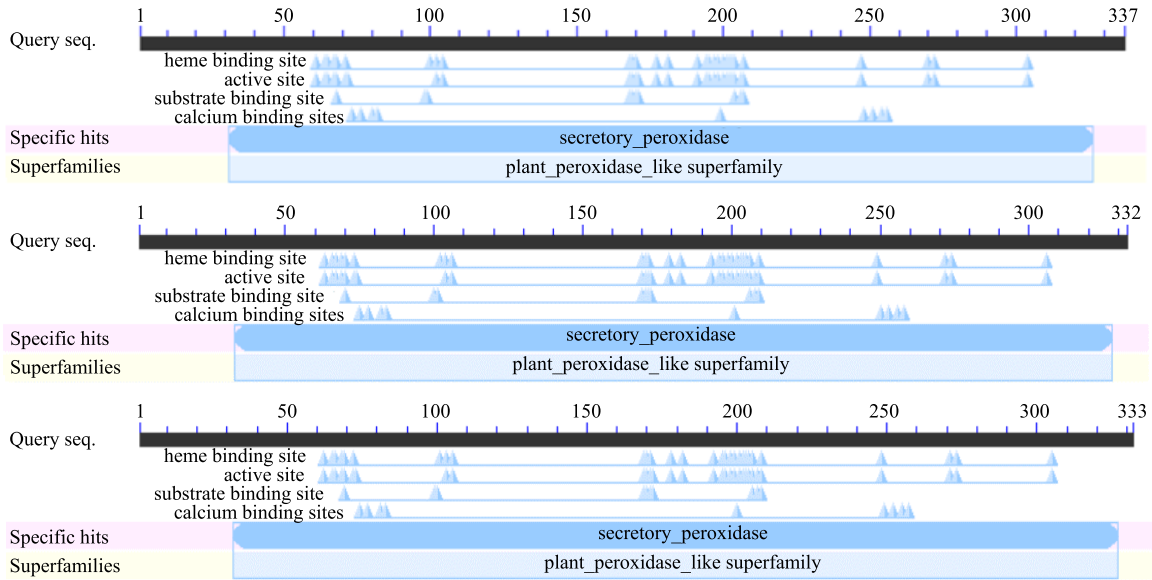


图 5 千里光和 2 个相似物种 POD 的保守结构域

Fig. 5 Conserved domain of POD from two similar species

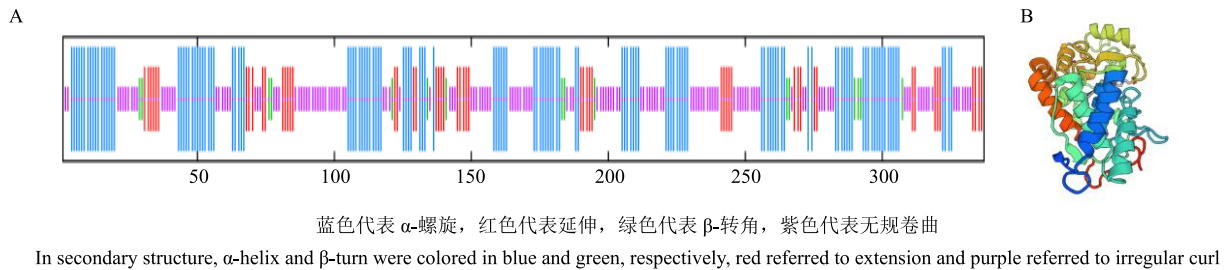


图 6 千里光 POD 二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig. 6 Predicted secondary structure (A) and tertiary structure (B) of POD

表 1 POD 功能预测结果

Table 1 Functional prediction result of POD

功能分类	预测值	概率/%
信号传导	0.205	0.958
受体	0.007	0.041
激素	0.001	0.154
结构蛋白	0.003	0.107
运载体	0.025	0.229
离子通道	0.169	2.965
电压门控离子通道	0.279	12.682
阳离子通道	0.146	3.174
转录	0.219	1.711
转录调控	0.111	0.888
胁迫因子	0.073	0.830
免疫应答	0.011	0.129
生长因子	0.005	0.357
金属离子转移	0.018	0.039

3.8 千里光 POD 系统进化分析

利用 MEGA 6.0 软件, 选择 NJ 法构建系统进化树, 比较分析不同物种中该基因的进化与亲缘关系。从构建的进化树中可见(图 7), 共涉及 37 个物种(相同物种取 Score 值最高的序列进行比对)。向日葵 *Helianthus annuus* L. 与千里光 POD 在一个小分支下面, 说明千里光和向日葵具有较近的亲缘关系。

3.9 SSR 标记多态性分析

利用设计出的 SSR 引物对 10 个品系的千里光的基因组 DNA 进行扩增, 共扩增出 15 条条带, 扩增产物长度介于 100~150 bp (图 8)。其中 7 个品系的条带单一且一致, 另外 3 个 DNA 扩增出各不相同的多态性条带, 多态位点百分率为 30%, 说明遵义地区千里光的 POD 基因在遗传上既有保守性, 同时也呈现出不同的多态性。同时, 千里光 SSR 引物可以作为鉴定不同品系 POD 基因的分子标记。

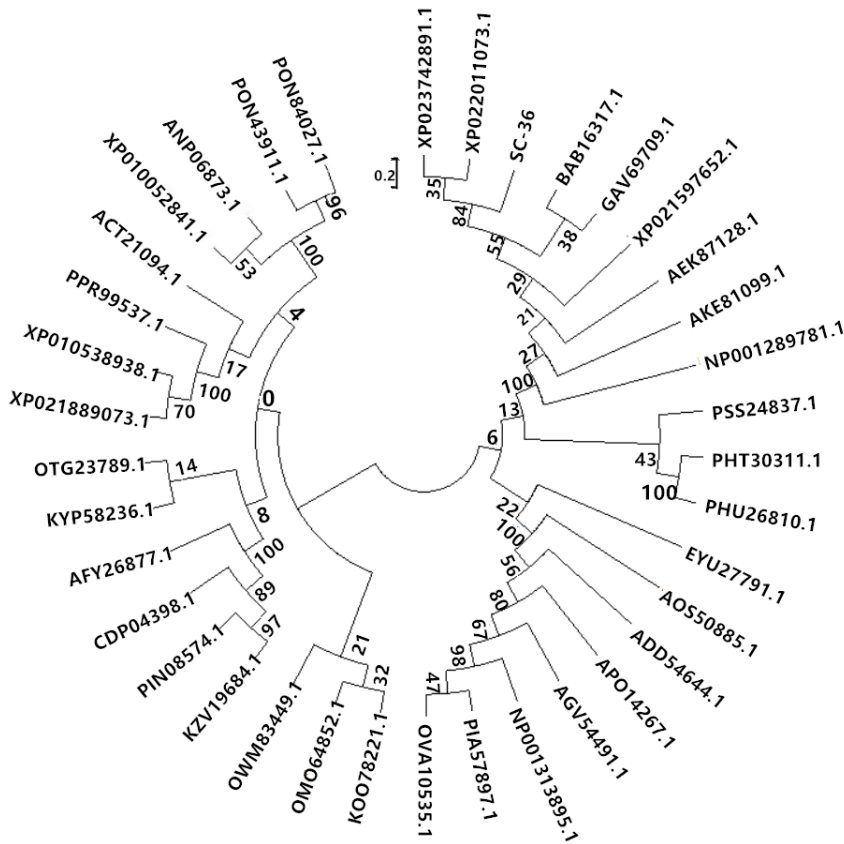


图 7 POD 基因的系统进化树

Fig. 7 Analysis of phylogenetic tree of POD in different species

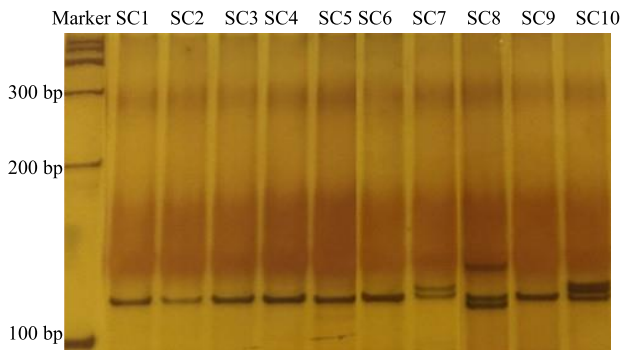


图 8 千里光 SSR 扩增电泳结果

Fig. 8 SSR PCR profiles of *S. scandens*

4 讨论

近年来,关于不同植物 POD 的研究层出不穷,本研究是基于提取并且纯化千里光叶片 mRNA 构建的全长 cDNA 文库^[9],利用 LD-PCR 和 SMART 方法,从千里光中成功克隆出 1 产物对高等植物千里光有重要作用。

序列分析结果显示,千里光 POD 的结构特点符合植物 POD 的通性,是比较典型的 POD。对千

里光 POD 的核苷酸和氨基酸序列分析表明,该蛋白是相对保守的分泌蛋白。千里光 POD 的氨基酸序列与其他植物的同源性均在 90% 以上,与向日葵氨基酸序列的同源性高达 91%。与其他物种的比较,千里光 POD 序列表现出高度的保守性,这样有利于植物遗传和生物学功能的稳定性。

蛋白质的磷酸化存在于植物各种不同生理生态环境以及不同生长发育过程中,对植物的影响是全面而直接的^[10]。千里光 POD 拥有 37 个磷酸化位点,能够在千里光的生长代谢、分裂分化、信号调控等过程中发挥重要作用^[11-12]。疏水性结果显示,千里光 POD 是亲水性蛋白质,说明该基因能够保护细胞内的水分,减少水分丧失,而且可以同大分子表面反应,在脱水组织中防止蛋白质的失活^[13]。

利用蛋白的系统进化树,物种之间的亲缘和遗传进化关系能够被更加准确地揭示,并为蛋白功能的验证提供证据,从进化树分支的远近可以分析其物种间的亲缘关系和功能的相关性。从千里光 POD

构建的进化树可以看出, 千里光 POD 与向日葵在同一个分支上, 说明千里光 POD 和它们在亲缘上和功能上都有相似性^[14]。植物在遭受环境胁迫时, 在 POD 的参与下通过木质素合成、活性氧爆发、多种氧化反应来逆转环境胁迫给植物造成的危害^[15-17]或者是激活 POD, 通过改变细胞壁的结构来抵御外来病原菌的入侵^[18]。Sorokan 等^[19]研究发现转基因的马铃薯 POD 含量降低, 导致其木质素积累减少和抗性显著下降。所以说, 千里光 POD 通过这些功能, 在适应逆境的进化过程中, 保护自己不受环境胁迫的过分影响。这些功能基因在环境胁迫中的保护作用表现得相对保守, 和亲缘关系保守性基本保持了一致, 这些结果说明千里光 POD 基因可作为物种鉴定的参考依据^[20]。

SSR 是共显性分子标记^[21], 能够对物种之间的遗传多态性进行精确地揭示^[22]。本研究利用 SSR 标记揭示千里光的多态等位位点 (allele) 比率为 30%, 说明不同地区的千里光遗传具有较高的保守性, 主要源于其 DNA 转录序列的保守性, 但是也同时显示了遗传的多样性, 遗传的多样性有利于千里光适应周围的生长环境和气候条件, 抵御环境胁迫。物种与物种之间存在不同程度的流动性^[23], 千里光 SSR 分子标记位点的多态性也表示不同地区的千里光资源存在流动性。因此, 可以利用该引物扩增出条带的不同位置和数量, 来鉴定不同地区千里光的亲缘关系。Teshome 等^[24]研究表明不同群体的豌豆存在高度的遗传多样性, 并且利用基因库改善豌豆所需特性, 所以对不同地区千里光进行 SSR 分子标记, 建立基因库, 对千里光品种进行优化, 有利于增加千里光的药用成分, 提高千里光的药用价值。

本研究首次对千里光 POD 基因进行了 SSR 分子标记和生物学分析, 有益于千里光资源的合理利用、种质评价和资源保护, 对进一步研究千里光资源遗传多态性和 POD 的作用机制及功能应用奠定了理论基础, 为千里光 POD 基因的分子研究提供了理论依据和基础资料。在以后的研究中, 将收集不同地区和种属的千里光, 以分析 POD 序列特性和基于 POD 序列 SSR 分子标记在更多千里光研究中的适用性。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[3] Welinder K G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1992, 3: 388-393.
[4] 耿玉珂. 盐芥 ThPER32 和 ThPER42 植物表达载体的构建及转基因研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2010.
[5] Buffard D, Breda C, van Huystee R B, et al. Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(22): 8874-8878.
[6] 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展 [J]. *武汉植物学研究*, 2001, 19(4): 332-344.
[7] 王海波, 郭俊云, 赵志军, 等. 小桐子过氧化物酶 73 基因的克隆及表达分析 [J]. *核农学报*, 2017, 31(1): 29-36.
[8] 王竹青, 陈云, 杨玉婷, 等. 甘蔗抗坏血酸过氧化物酶基因(ScAPX)的克隆及表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(2): 170-180.
[9] 平军娇, 张珍, 蔡振锋, 等. 千里光全长 cDNA 文库的构建及分析. 千里光全长 cDNA 文库的构建及分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 557-561.
[10] Kersten B, Agrawal G K, Iwahashi H, et al. Plant phosphoproteomics: A long road ahead [J]. *Proteomics*, 2010, 6(20): 5517-5528.
[11] Ye J, Zhang Z, Long H, et al. Proteomic and phosphoproteomic analyses reveal extensive phosphorylation of regulatory proteins in developing rice anthers [J]. *Plant J*, 2015, 84(3): 527-544.
[12] 张智敏, 叶娟英, 龙海飞, 等. 玉米早期花药蛋白质组和磷酸化蛋白质组分析 [J]. *生物工程学报*, 2016, 32(7): 937-955.
[13] Soulagès J L, Kim K, Walters C, et al. Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(3): 822-832.
[14] Khuri S, Bakker F T, Dunwell J M. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(4): 593-605.
[15] Takahama U, Oniki T. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate [J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33(4): 379-387.
[16] Łojkowska E, Hołubowska M. The Role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora* [J]. *J Phytopathol*, 2010, 136(4): 319-328.
[17] Messner B, Boll M. Cell suspension cultures of spruce

- (*Picea abies*): Inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst) [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1994, 39(1): 69-78.
- [18] 蒋选利, 李振岐, 康振生. 过氧化物酶与植物抗病性研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(6): 124-129.
- [19] Sorokan A V, Kuluev B R, Burkhanova G F, *et al*. RNA-silencing of anionic peroxidase gene decreases the potato plant resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary [J]. *Mol Biol*, 2014, 48(5): 814-823.
- [20] 钱刚, 平军娇, 张珍, 等. 3 种棱型大麦中脱水素 6 (DHN6) 的性质、突变位点与蛋白质进化分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(3): 322-329.
- [21] 朱宇佳, 焦凯丽, 罗秀俊, 等. 基于 SSR 分子标记的酸浆属植物亲缘关系研究 [J]. 植物学报, 2018, 53(3): 20-27.
- [22] Feng S G, Jiang M Y, Shi Y J, *et al*. Application of the ribosomal DNA *its2* region of *Physalis* (Solanaceae): DNA barcoding and phylogenetic study [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7(7): 1047-1058.
- [23] Wang F, Yang T, Burlyaeva M, *et al*. Genetic diversity of grasspea and its relative species revealed by SSR markers [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0118542.
- [24] Teshome A, Bryngelsson T, Dagne K, *et al*. Assessment of genetic diversity in Ethiopian field pea (*Pisum sativum* L.) accessions with newly developed EST-SSR markers [J]. *BMC Genet*, 2015, 16(1): 102-114.