

黄瓜 *CsGPX* 基因克隆与细菌性角斑病胁迫下的表达分析

孟令波, 孙婷婷, 赵倩, 胡宝忠* (哈尔滨学院, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要 [目的]克隆 *CsGPX* 基因并研究其与黄瓜抗病性的关系。[方法]采用 RT-PCR 技术克隆黄瓜 *CsGPX* 基因 cDNA 序列全长, 并对其生物信息学分析; 采用荧光定量 PCR 的方法分析 *CsGPX* 基因在细菌性角斑病感染 0~96 h 下的表达情况。[结果]*CsGPX* 基因 cDNA 序列全长 914 bp, 包含一个 513 bp 的开放阅读框, 编码 170 个氨基酸, 该基因编码蛋白的相对分子质量约为 19.02 kD, 理论等电点是 8.66, 为亲水性蛋白, 不具有跨膜结构, 不含信号肽序列。实时荧光定量 PCR 分析表明, *CsGPX* 在黄瓜叶中有表达。在黄瓜细菌性角斑病菌感染下, 该基因在黄瓜叶中表达增高, 明显受黄瓜细菌性角斑病菌的诱导。[结论]*CsGPX* 基因的分子鉴定为进一步解析该基因在黄瓜抗病机制方面的作用提供重要依据。

关键词 黄瓜; 谷胱甘肽过氧化物酶; 基因克隆; 细菌性角斑病; 荧光定量 PCR

中图分类号 S436.421 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)07-0099-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.07.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Cloning of Glutathione Peroxidase Gene from Cucumber and Expression Analysis after Infected by *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*

MENG Ling-bo, SUN Ting-ting, ZHAO Qian et al (Harbin University, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract [Objective] To clone *CsGPX* gene and study the relationship between *CsGPX* gene and disease resistance of cucumber. [Method] The *CsGPX* gene cDNA full-length sequence was cloned by RT-PCR technology. Characteristics including the physicochemical properties and conserved domain of the deduced *CsGPX* protein were determined by a series of bioinformatics tools. qRT-PCR technology was performed to measure the transcript levels of *CsGPX* gene induced by *P. syringae* pv. *Lachrymans*. [Result] The full-length nucleotide sequence of *CsGPX* was 914 bp, containing a complete open reading frame of 513 bp which encoded a polypeptide of 170 amino acids. Bioinformatics analysis of the amino acid sequence showed that the molecular weight of encoded protein was 19.02 kD, and theoretical isoelectric point was 8.66. This protein was a hydrophilic protein, without transmembrane and signal peptide sequence. The expression analyses of the gene by qRT-PCR showed that the *CsGPX* expressed in Cucumber leaves. Induced by *P. syringae* pv. *Lachrymans*, the transcript levels of *CsGPX* in cucumber leaves remarkably increased with the extension of induction time. [Conclusion] This study laid a foundation for providing important basis for *CsGPX* gene on disease resistance mechanism of cucumber.

Key words Cucumber; Glutathione peroxidase; Gene cloning; *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*; Real-time fluorescence quantitative PCR

植物是好氧的生物体, 在呼吸和光合作用过程中, 线粒体、叶绿体和过氧化物酶体均可导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 尤其在外界环境胁迫下, 活性氧含量大大增加^[1]。为了避免 ROS 过量积累所造成的损伤, 植物细胞内的防御系统(包括酶促和非酶促解毒系统)发挥了重要的作用。其中, 酶促系统主要包括过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶等^[2-3]。其中, 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)是机体内清除活性氧自由基的主要酶类, 起到保护细胞免受氧化胁迫的作用, 具有重要的生理功能^[4]。人们对 GPX 的认识最早从动物开始, 1957 年, Mills^[5]在提取哺乳动物红细胞中的酶试验 H₂O₂ 反应时发现的。由于哺乳动物中的 GPX 利用谷胱甘肽(GSH)为电子供体还原 H₂O₂ 及有机氢过氧化物等, 故 GPX 名称由此而来。相比之下, 人们对植物 GPX 的研究开始较晚。第一个植物 GPX 的 cDNA 最早是从烟草中获得^[6], 后来相继在拟南芥^[7]、水稻^[8]、番茄^[9]、菠菜^[10]、小麦^[11]、茶树^[12]等植物中分离到 GPX 基因。近年来, 对于植物 GPXs 的研究主要集中在生物胁迫(感染细菌、真菌或病毒)和非生物胁迫(如高温、低温、干

旱、重金属毒害、耐盐等)方面。在生物胁迫条件下, Roedel-Drevet 等^[13]研究发现, 当向日葵被一种霜霉病(*Plasmopara halstedii*)感染后, GPXs 基因的表达丰度显著增加; Saidi 等^[14]研究发现, 枣椰树感染脆叶病(Brittle leaf disease)后, GPXs 基因的表达水平在患病的根、叶中显著提高。这些研究结果表明, 在植物应对病害胁迫的过程中, GPXs 基因可能发挥作用。

黄瓜细菌性角斑病于 20 世纪 70 年代在我国严重暴发, 目前已是我国乃至世界上影响黄瓜生长的重要病害之一^[15], 发病率在 30%~50%, 严重时可使植株中下部叶片全部坏死。目前黄瓜与细菌性角斑病相互作用的分子机理仍不清楚。该研究利用黄瓜叶 cDNA 文库数据获得了 *CsGPX* 编码区全长序列, 并对该序列进行生物信息学分析, 预测其功能。在此基础之上, 采用 qRT-PCR 技术对黄瓜细菌性角斑病菌不同时间诱导下 *CsGPX* 基因的表达模式进行深入分析, 以期探求黄瓜的抗病机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试验中采用的黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为抗病品种 D0462, 由东北农业大学园艺学院培育; 细菌性角斑病(*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*)由东北农业大学园艺学院惠赠。诱导试验在黄瓜 3 片真叶期开展, 用喷雾器将 1×10⁸ CFU/mL 菌悬液均匀喷至叶面密布水珠但不流动为可。病原菌诱导 0.8、24、48、72、96 h 后收集叶片, 用无菌水冲洗 3 遍, 滤纸吸干, 迅速置于液氮中后于 -80 ℃ 冰箱备用。

基金项目 黑龙江省高等学校青年学术骨干支持计划项目(1151G081); 大学生创新创业项目(201910234014)。

作者简介 孟令波(1970—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 副教授, 博士, 从事蔬菜遗传育种与土壤微生物研究。* 通信作者, 教授, 博士, 从事植物学和植物分子生物学研究。

收稿日期 2020-12-02; **修回日期** 2021-01-06

1.2 方法

1.2.1 黄瓜总 RNA 提取。采用植物总 RNA 提取试剂盒提取黄瓜抗病品种 D0462 总 RNA,具体步骤参照说明书进行。提取总 RNA 后采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并用核酸分析仪检测 RNA 的纯度和浓度。

1.2.2 *CsGPX* 全长 cDNA 克隆。根据前期所构建的黄瓜叶片 cDNA 文库^[16],筛选获得谷胱甘肽过氧化物酶 *GPX* 基因 cDNA 全长序列并设计引物 CF1、CR1(表 1),以黄瓜 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系(50 μL):2×PCR Mix 25 μL,正反引物 CF1、CR1(20 μmol/L)各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,不足的部分用 ddH₂O 补足。PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,57 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物送生物公司测序。

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

序号 Number	引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')
1	CF1	AGAAGGAAGGGAAGACAGAG
2	CR1	GCGCAATGCATAGATGGGAGG
3	CF-qRT	GTTCTGTAGTTTAAACCC
4	CR-qRT	GGGAAAGTTCCTCTGTGGT
5	18S-F	TAAGTAGCGTCCGTGTCGTG
6	18S-R	TTGCTGTTTGAGATTCCTG

1.2.3 序列分析。使用 NCBI 中的开放阅读框(open reading frame,ORF)程序查找序列的 ORF。分析 ORF 编码的氨基酸序列采用 ExPASy 服务器上的 ProtParam tool 软件(<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>)。*CsGPX* 蛋白跨膜区、信号肽的预测和分析分别采用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、Signalp5.0(<http://www.cds.dtu.dk/services/signal.p/>)。通过 NCBI 中 CDD 程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)对 *CsGPX* 氨基酸序列的保守结构域进行分析。用 Netphos 3.1 server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)对 *CsGPX* 氨基酸序列进行潜在磷酸化位点分析。分别用 Plant-mPloc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)和 psort prediction(<https://www.psorthgc.jp/form.html>)对 *CsGPX* 进行亚细胞定位分析。利用 SOPMA(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/sopma.html>)对 *CsGPX* 氨基酸序列进行二级结构分析,*CsGPX* 三级结构采用 SWISS-model(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测。

1.2.4 荧光定量 PCR 分析。采用 qRT-PCR 方法,对经黄瓜细菌性角斑病菌不同时间诱导下的 *CsGPX* 基因的表达情况进行检测,分别提取侵染 0、8、24、48、72、96 h 处理的黄瓜叶总 RNA,反转录合成 cDNA,取 2 μL cDNA 为模板,加入 SYBR Premix ExTaq™(2×)10 μL,具体按宝生物工程大连有限公司说明书操作。在 Agilent Mx3000P 型核酸扩增荧光检测仪上进行 RT-PCR,用于定量 PCR 的 *CsGPX* 基因的特异性引物(CF-qRT、CR-qRT)及内参引物(18S-F、18S-R)见表 1。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 12 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环,读板温度为 81 ℃,扩增完成后采用

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算^[17]。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及检测 提取黄瓜叶片总 RNA,检测结果如图 1 所示,28S rRNA 的亮度大约是 18S rRNA 的 2 倍,说明黄瓜总 RNA 完整性较好;经核酸蛋白检测仪测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.88,介于 1.8~2.1,表明提取的 RNA 纯度较高,可用于后续试验。

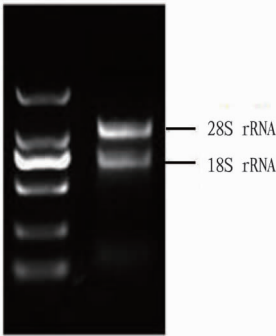
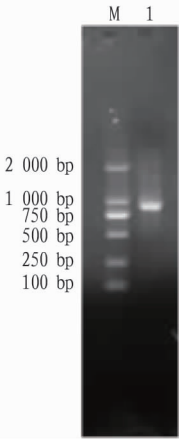


图 1 黄瓜总 RNA 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of total RNA of Cucumber

2.2 *CsGPX* 基因全长 cDNA 的获得 以黄瓜 cDNA 为模板,用特异性引物进行 PCR 扩增。由图 2 可知,在 1 000 bp 附近得到 1 条 *CsGPX* 基因的特异片段,与预期大小相符。PCR 产物经回收纯化、测序后得到长度为 914 bp 的序列。



注:M. DL 2000;1. *CsGPX* 基因 cDNA 全长

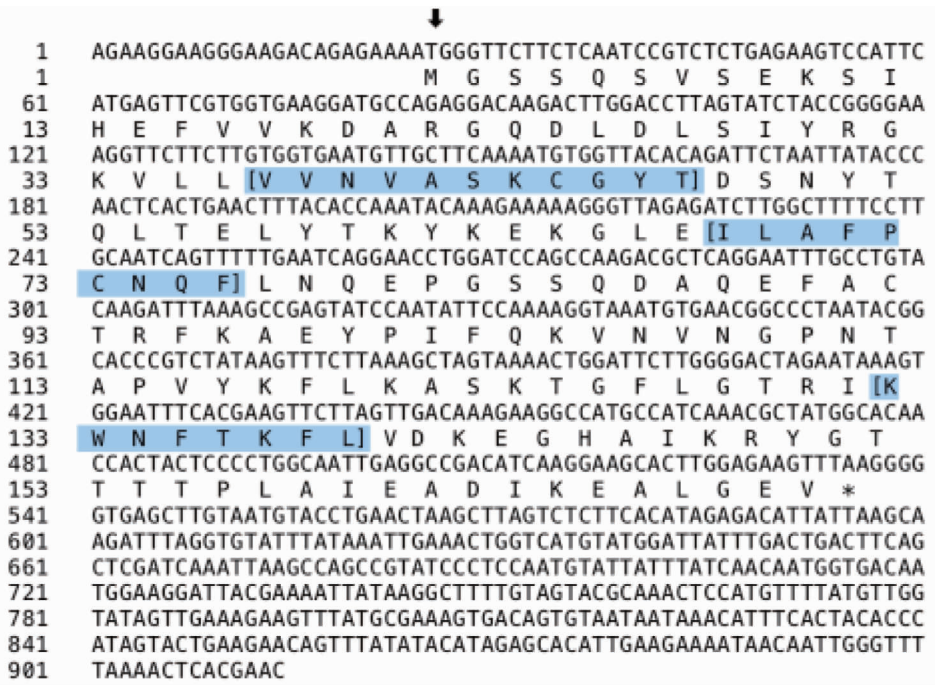
Note:M. DL 2000;1. Full-length cDNA of *CsGPX*

图 2 *CsGPX* 基因 cDNA 全长凝胶电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of full-length cDNA of Cucumber

2.3 *CsGPX* 全长序列分析 根据 *CsGPX* 全长测序结果,利用 NCBI 网站上的 ORF Finder 进行开放阅读框查找,发现 *CsGPX* 的 cDNA 序列全长 914 bp,其中包含 513 bp 的开放阅读框,23 bp 的 5'非翻译区以及 378 bp 的 3'非翻译区,编码 170 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA(图 3)。通过与拟南芥的 *GPXs* 家族成员比较,发现有 3 个保守程度较高的特征结构域分别为 VNVASKCGYT、ILAFPCNQF、KWNFTKFL,同时这 3 个结构域也是 *GPX* 的特征性基序。

2.3.1 理化性质分析。通过 Protparam 对 *CsGPX* 进行分析可知其分子式为 C₈₅₈H₁₃₄₁N₂₂₃O₂₅₇S₄,相对分子质量为 19.02 kD,等电点(pI)为 8.66,不稳定参数为 24.23,蛋白质



注:箭头所指为起始密码子,“*”标记为终止密码子,蓝色部分为特征性结构域

Note:The arrow pointed to the start codon,“*” pointed to the termination codon and marked in blue as the characteristic domains

图 3 CsGPX 基因 cDNA 序列及编码的氨基酸

Fig.3 CsGPX gene cDNA sequence and its coding amino acid sequence

性质稳定(标准:40 以下为稳定蛋白)。该蛋白中相对含量较多的氨基酸是 Lys(10.0%,17 个)、Leu(8.2%,14 个)、Thr(7.6%,13 个)。总的带负电荷残基(Asp+Glu)为 19,总的带正电荷残基(Arg+Lys)为 22。亲水性平均系数为-0.369,预测该蛋白为亲水性蛋白,其脂肪系数为 78.00。TMHMM 2.0 分析显示 CsGPX 无跨膜结构域。Signalp 5.0 分析结果表明

该蛋白无信号肽。将 CsGPX 与部分拟南芥 GPXs 家族成员的理化性质进行比较,结果显示 CsGPX 与 AtGPX4 在编码氨基酸个数、等电点、相对分子质量、所带正负电荷氨基酸的数量等方面均较相似(表 2),因此可以推断黄瓜 CsGPX 与 AtGPX4 可能具有相似的功能。

表 2 CsGPX 与拟南芥 GPXs 理化性质比较

Table 2 Comparison of physical and chemical properties between CsGPX and Arabidopsis thaliana GPXs

GPX	氨基酸数量 Number of amino acids	等电点 Isoelectric point	相对分子质量 Relative molecular mass/×10 ³	负电荷氨基酸数量 Number of negatively charged amino acids	正电荷氨基酸数量 Number of positively charged amino acids	蛋白质类型 Protein type
CsGPX	170	8.66	19.02	19	22	亲水性
AtGPX1	236	9.42	26.02	19	28	亲水性
AtGPX2	169	5.60	18.94	22	21	亲水性
AtGPX3	206	9.24	23.26	19	27	亲水性
AtGPX4	170	8.87	19.30	19	23	亲水性
AtGPX5	137	9.28	19.33	16	23	亲水性

2.3.2 保守结构域、磷酸化位点、亚细胞定位的分析。通过 NCBI 中 CDD 程序对 CsGPX 氨基酸序列的保守结构域分析结果(图 4)显示,该基因所表达的蛋白质具有典型的保守结构域 GSH_Peroxidase,属于硫氧还原蛋白超家族(thioredoxin-like super family)。用 Netphos 3.1 server 对 CsGPX 氨基酸序列进行潜在磷酸化位点分析,预测结果显示,潜在的磷酸化位点位于 Ser、Thr 和 Tyr 3 个氨基酸上,其中 Ser 为 8,Thr 为 6,Tyr 为 3,共 17 个磷酸化位点。分别用 Plant-mPloc 和 psort prediction 进行 CsGPX 的亚细胞定位,CsGPX 可能在叶

绿体、细胞质、线粒体等位置。

2.3.3 蛋白质二级、三级结构的预测。利用 SOPMA 对 CsGPX 氨基酸序列进行分析,其结果显示 CsGPX 是由无规则卷曲、α 螺旋、β 转角、延伸链等组成,其中,无规则卷曲(41.18%)为主要结构,无规则卷曲存在的部位往往与该蛋白质分子维持空间构象有着重要的联系。

用 SWISS-model 对 CsGPX 的三级结构进行预测。由图 5(A)可看出,CsGPX 有 4 个 α 螺旋和 6 个 β 折叠,与植物中 GPX 的经典结构一致;图 5(B)中 3 个带黄色标记的是半胱

氨基酸位点,通过这个位置容易与氢过氧化物类的底物相结合,从而消除机体内过多的活性氧自由基。

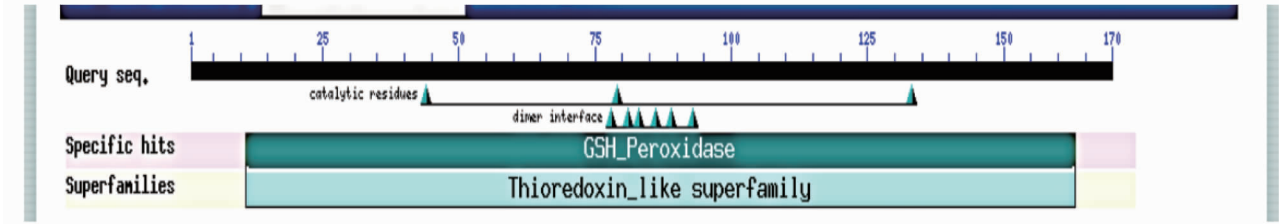


图 4 CsGPX 的保守结构域分析

Fig. 4 Putative conserved domains of CsGPX

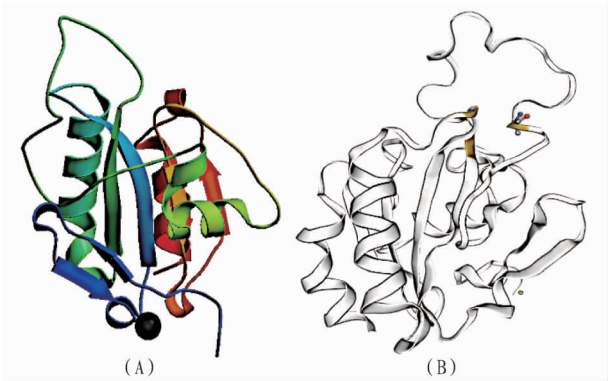


图 5 CsGPX 蛋白质三级结构预测

Fig. 5 Tertiary structures prediction of CsGPX protein

2.4 黄瓜 CsGPX 基因的表达特性分析 采用 qRT-PCR 方法分析经黄瓜细菌性角斑病菌诱导不同时间的 CsGPX 基因表达情况。结果如图 6 所示,该基因在 0~96 h 的表达水平呈现先升高(0~24 h)后降低(24~48 h)再升高(48~96 h)的变化趋势。整体看,CsGPX 基因受病原菌诱导后(8~96 h)的表达量均高于对照,最高可达对照表达量的 363.5 倍。由此说明,CsGPX 基因明显受黄瓜细菌性角斑病菌的诱导,推测该基因可能参与黄瓜细菌性病害的防御,在抵御生物胁迫中发挥作用。

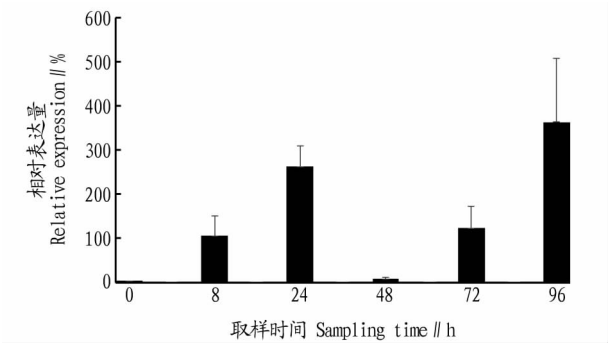


图 6 黄瓜细菌性角斑病侵染下 CsGPX 基因在叶片中的表达

Fig. 6 CsGPX expression after infected by *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* in the leaves

3 讨论与结论

GPXs 是生物体内至关重要的活性氧自由基清除剂,可催化谷胱甘肽(GSH)转化为氧化型谷胱甘肽(GSSG),将有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,同时也可以促进 H₂O₂ 的分解,从而保护细胞膜的结构及功能不遭受损害^[18]。与动物相比,对植物中 GPX 的研究起步较晚。有研究表明,

GPX 氨基酸序列携带的是一个半胱氨酸残基,替代了动物基因组 GPX 核苷酸 UGA 终止密码子处插入的硒代半胱氨酸^[19],即植物中的 GPX 蛋白不含有硒。GPXs 常作为植物抗逆指标,用来反映植物的氧化胁迫伤害程度和评价该植物的抗逆能力。当植物遭受病原菌侵染^[13]、高盐^[20]、重金属^[21]、干旱^[22]、低温^[23]等不同生物和非生物胁迫时,多数 GPX 的表达及活性会增强。目前,对植物 GPXs 的研究多集中在非生物胁迫中的功能作用。如烟草中过量表达 *NiGPX* 基因能够减少活性氧导致的膜损伤,提高烟草的耐盐性及抗冻性^[24]。番茄中过表达 *Le PHGPX* 基因可提高其耐高温胁迫的能力^[25]。而有关于 GPXs 在生物胁迫中的功能作用研究相对较少。

黄瓜细菌性角斑病是黄瓜的一类重要细菌性病害,近年来,黄瓜细菌性角斑病几乎遍布全国各个黄瓜产区,严重时可导致整个温室的黄瓜发病死亡,发病率达 100%^[26]。目前黄瓜细菌性角斑病以化学防治为主,然而化学防治一方面会给环境和人类带来危害,另一方面还会引起病原物的抗药性,加重该病害防治的难度。因此,深入了解寄主植物与病原物的互动关系可为黄瓜细菌性角斑病的有效防治提供参考。

该研究通过对黄瓜 CsGPX 基因 cDNA 全长序列进行克隆和分析,获得全长 cDNA 序列 914 bp,包含一个 513 bp 的开放阅读框,编码 170 个氨基酸,蛋白质性质稳定。通过与拟南芥 GPXs 比较发现,CsGPX 与拟南芥具有相似的典型保守结构,无信号肽和跨膜结构,共有 17 个磷酸化位点,一般来说,氨基酸序列中的磷酸化位点越多,该蛋白越可能会发挥更多功能^[27]。根据 CsGPX 的亚细胞定位可以推测该基因可能与光合作用、生理生化反应、能量传递、信号转导等有关。为进一步了解 CsGPX 在黄瓜抗病方面的功能,深入分析细菌性角斑病菌侵染下黄瓜 CsGPX 基因的表达模式,发现 CsGPX 的表达显著提高,最高可达对照表达量的 363.5 倍,说明该基因明显受黄瓜细菌性角斑病菌的诱导。该结果可为研究 CsGPX 基因在黄瓜抗病方面的功能以及解析黄瓜与病原物互作网络提供重要依据。

参考文献

[1] RODRIGUEZ MILLA M A, MAURER A, RODRIGUEZ HUETE A, et al. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways[J]. *Plant J*, 2003, 36 (5): 602-615.
[2] 杜秀敏,殷文璇,赵彦修,等. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 121-125.

力。③在试验过程中发现使用潮汐式的红掌盆土比对照组干得慢,浇水周期较长,有利于节省人工成本。

3.2 使用不同基质处理的潮汐式托盘对盆栽红掌产品质量的影响 使用潮汐托盘进行红掌栽培时,阿拉巴马和红斑比诺使用 T_3 处理基质种植,成品植株的株高、冠幅、花苞直径、花苞数量均表现最好。结果表明,运用潮汐式托盘进行红掌栽培生产时,选用配比基质(KLA614:椰糠=1:1)相对更加适宜。红掌产品销售是以花苞数量和花苞直径为主要标准进行产品分级,花苞数量越多,花苞直径越大,红掌产品质量越好。原因分析:基质的物理结构决定了其水分、养分的吸附性能和通气状况,从而影响作物幼苗水分养分的供应、吸收甚至运输^[10],配比基质 T_3 (KLA614:椰糠=1:1)在结构上疏松多空隙,且有更多的长纤维,这种结构既增加了盆土中空气含量,又利于水分传导。在今后实际生产中建议采取潮汐式托盘和配比基质 T_3 (KLA614:椰糠=1:1)配合使用。

目前红掌栽培温室的常规灌溉模式是人工接管浇水和自动滴管模式。前者肥水浪费严重、灌溉效果受人为影响较大,后者节水效果明显,但滴管系统维护成本较高,且对水肥纯净度要求较高,这2种灌溉模式都会出现盆土干湿不均情况,影响了盆花质量。针对种植过程中常规灌溉方法造成的水肥浪费严重、耗电多、人工成本高、效果不到位等问题,该试验采用潮汐式托盘用于盆栽红掌的种植。潮汐式托盘用

于盆栽红掌灌溉是一种高效、节水、先进的新型灌溉技术,该装置利用植物的毛细管原理吸收托盘内存的肥水,达到根部吸收水肥的目的,已逐渐成为温室栽培重要的灌溉方式之一。病害控制是制约潮汐式灌溉推广应用的技术障碍之一^[11],但潮汐式托盘的应用可以有效阻止病害传播,保证盆栽红掌生产的安全进行。

参考文献

- [1] 彭扬,汪海霞,王继华,等. 进口安祖花栽培品种的筛选[J]. 天津农林科技,2006(2):14-17.
- [2] 王德欢,施先锋,张娜,等. 红掌组织培养育苗技术的研究进展[J]. 贵州农业科学,2016,44(10):107-110.
- [3] 刘铭,张英杰,吕英民. 荷兰设施园艺的发展现状[J]. 农业工程技术(温室园艺),2010(8):24-33.
- [4] 孙飞,吴海东,上官芳,等. 月季潮汐式无土栽培试验初探[J]. 园林科技,2018(4):1-4.
- [5] 董春娟,张晓蕊,尚庆茂. 蔬菜潮汐式育苗技术应用概况与研究进展[J]. 中国蔬菜,2018(3):16-26.
- [6] 郭丽英,吉前华,郭雁君,等. 不同育苗基质在柑橘简易潮汐式灌溉中的应用效果研究[J]. 现代农业科技,2020(18):58-59,62.
- [7] 杨巍,段正凤,王天文,等. 番茄潮汐式育苗基质筛选研究[J]. 耕作与栽培,2020(3):25-27.
- [8] 曹宁,孙静双,张丽媛,等. 花卉产品等级 红掌:DB11/T 1145—2014 [D]. 北京:北京市质量技术监督局,2015.
- [9] 张黎,王勇. 盆栽八仙花潮汐灌溉栽培试验初探[J]. 北方园艺,2011(20):77-79.
- [10] 鲍士旦. 土壤化学分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2000:30-165.
- [11] 郝海平,刘青,赵亮,等. 潮汐式灌溉技术发展及特点[J]. 中国花卉园艺,2014(18):52-55.
- [12] 苗雨晨,白玲,苗琛,等. 植物谷胱甘肽过氧化物酶研究进展[J]. 植物学通报,2005,40(3):350-356.
- [13] FLOHÉ L, GÜNZLER W A. Assays of glutathione peroxidase[J]. Methods Enzymol, 1984, 105(1):114-121.
- [14] MILLIS G C. Hemoglobin catabolism: I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown[J]. J Biol Chem, 1957, 229(1):189-197.
- [15] CRIQUI M C, JAMET E, PARMENTIER Y, et al. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases[J]. Plant Mol Biol, 1992, 18(3):623-627.
- [16] SUGIMOTO M, SAKAMOTO W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress[J]. Genes Genet Syst, 1997, 72(5):311-316.
- [17] LI W J, FENG H, FAN J H, et al. Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa* [J]. Biochim et Biophys Acta(BBA)-Gene Struct Expr, 2000, 1493(1/2):225-230.
- [18] DEPEGE N, DREVET J, BOYER N. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like-proteins[J]. Eur J Biochem, 1998, 253(2):445-451.
- [19] SUGIMOTO M, FURUI S, SUZUKI Y. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(8):1379-1381.
- [20] 张蕾,于永昂,张明霞,等. 小麦 GPX 基因的克隆及植物表达载体构建[J]. 贵州农业科学,2015,43(4):31-34.
- [21] 刘赛,刘硕谦,龙金花,等. 茶树谷胱甘肽过氧化物酶编码基因 *CsGPX1* 功能分析[J]. 茶叶科学,2019,39(4):382-391.
- [22] ROECKEL-DREVET P, GAGNE G, DE LABROUHE D T, et al. Molecular characterization, organ distribution and stress-mediated induction of two glutathione peroxidase encoding mRNAs in sunflower (*Helianthus annuus*) [J]. Physiol Plant, 1998, 103(3):385-394.
- [23] SAIDI M N, JBIR R, GHORBEL I, et al. Brittle leaf disease induces an oxidative stress and decreases the expression of manganese-related genes in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) [J]. Plant Physiol Biochem, 2012, 50(1):1-7.
- [24] 孙福在,何礼远. 黄瓜细菌性角斑病原菌与寄生范围鉴定[J]. 植物病理学报,1988,18(1):23-28.
- [25] 刘关君,王丽娟,秦智伟,等. 黄瓜叶片细菌性角斑病侵染初期 cDNA 文库分析[J]. 遗传,2009,31(10):1042-1048.
- [26] 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(4):402-408.
- [27] 齐增园,陶鹏,李必元,等. 白菜谷胱甘肽过氧化物酶基因 GPX 的鉴定与分析[J]. 浙江农业学报,2016,28(1):64-69.
- [28] ESHDAT Y, HOLLAND D, FALTIN Z, et al. Plant glutathione peroxidases [J]. Physiol Plant, 1997, 100(2):234-240.
- [29] HOLLAND D, BEN-HAYIM G, FALTIN Z, et al. Molecular characterization of salt-stress-associated protein in citrus: Protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21(5):923-927.
- [30] NAVROT N, COLLIN V, GUALBERTO J, et al. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses [J]. Plant Physiol, 2006, 142(4):1364-1379.
- [31] FERREIRA NETO J R C, PANDOLFI V, GUIMARAES F C, et al. Early transcriptional response of soybean contrasting accessions to root dehydration [J]. PLoS One, 2013, 8(12):1-20.
- [32] KIM Y J, JANG M G, NOH H Y, et al. Molecular characterization of two glutathione peroxidase genes of *Panax ginseng* and their expression analysis against environmental stresses [J]. Gene, 2014, 535(1):33-41.
- [33] ROXAS V P, LODHI S A, GARRETT D K, et al. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase [J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41(11):1229-1234.
- [34] CHEN S R, VAGHCHHIPAWALA Z, LI W, et al. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants [J]. Plant Physiol, 2004, 135(3):1630-1641.
- [35] 陈璐. 黄瓜细菌性角斑病菌和多主棒孢菌 PCR 检测技术的建立 [D]. 北京:中国农业科学院,2014.
- [36] 周立敬,周宜君,高飞,等. 拟南芥谷胱甘肽过氧化物酶的生物信息学分析[J]. 中央民族大学学报(自然科学版),2010,19(2):11-17.

(上接第102页)