

短季棉叶片早衰的比较蛋白质组学研究

卢超¹,张根连²,范术丽²,宋美珍²,庞朝友²,喻树迅^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国农业科学院棉花研究所 / 棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000)

摘要:选取短季棉品种中棉所 10 号为研究材料,在棉花叶片衰老过程中,分别取 30 d,40 d 和 50 d 时的叶片进行叶片全蛋白的提取,利用双向电泳技术分析叶片衰老过程中的差异蛋白。考马斯亮蓝染色、扫描得到双向电泳图谱后,利用软件 ImageMaster 2D Platinum 7.0 分析差异蛋白。结果表明,在这 3 个时期里,共有 33 个蛋白点表达水平显著变化;对选取的差异蛋白点进行 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定,最终成功鉴定其中 12 个蛋白点。蛋白质组学分析表明衰老过程中:参与病虫害防御反应的蛋白 6 个显著下调表达,1 个上调表达;参与光合作用的蛋白 2 个上调表达,1 个下调表达;参与信号转导的 2 个蛋白均下调表达。

关键词:棉花;叶片早衰;双向电泳;蛋白质组学

中图分类号:Q816 **文献标志码:**A

文章编号:1002-7807(2013)02-0162-07

Comparative Proteomic Analysis of Early Leaf Senescence in Short-season Cotton Variety

LU Chao¹, ZHANG Gen-lian², FAN Shu-li², SONG Mei-zhen², PANG Chao-you², YU Shu-xun^{1,2*}

(1. Northwest A&F University College of Agronomy, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Cotton Research of CAAS / State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: Short-season variety CCRI 10 was chosen as the experimental material, and during leaf senescence, cotton leaves were collected at 30 d, 40 d, 50 d for whole protein extraction. The extracted protein was further separated by the two-dimensional electrophoresis technology. After coomassie brilliant blue staining and gel scanning, protein spots from all the replicate gels were compared and quantified using the Image Master 2D Platinum Software Version 7.0, and a total of 33 stained spots were found to have significant changes during the three developmental stages. These protein spots were then subjected to MALDI-TOF-TOF analysis and finally 12 protein spots were successfully identified. Proteomic analysis revealed that during cotton leaf senescence: 6 proteins involved in disease defense were significantly down-regulated, while only 1 protein up-regulated; 2 proteins involved in photosynthesis were up-regulated, while 1 protein down-regulated; 2 proteins involved in signal transduction were down-regulated. Our study demonstrates that proteomics can be a powerful tool for different protein identification during leaf senescence, and provides new insight for understanding early leaf senescence in cotton.

Key words: cotton; early leaf senescence; two-dimensional electrophoresis; proteome

在棉花生产中,棉花叶片早衰比较普遍,大田环境下棉花叶片的早衰一般能导致 10% 的产量损失,早衰发生比较严重的棉田产量损失甚至高达 20% 以上^[1]。叶片的早衰不仅导致棉花产量的下降,而且导致棉纤维长度变短、强度降低以及棉纤维整齐度下降,进而降低棉纤维的成纱质量^[2]。因此,对棉花叶片早衰机理的研究对于提高

棉花产量,改善棉纤维品质具有重大的意义。

目前,关于植物叶片的衰老有很多假说。其中激素平衡、自由基伤害和钙离子调控这 3 个假说最具有代表性。Gene Guinn 等^[3]研究棉花大田叶片衰老过程中叶片的光合作用和 ABA、细胞分裂素的关系,证实了棉花叶片的早衰是细胞分裂素的下降和 ABA 含量的上升引起的,进而导致

收稿日期:2012-08-28 作者简介:卢超(1986-),男,硕士研究生;* 通讯作者,yu@cricaas.com.cn

基金项目:国家棉花产业技术体系(CARS-18)

叶片光合功能的衰退。沈法富等^[4]比较了不同衰老特性的短季棉品种叶片内源激素的变化,结果发现,棉花始絮后,叶片 ABA、IAA 含量高,细胞分裂素含量低的品种容易发生早衰。龚文芳等^[5]通过 RT-PCR 和电子克隆获得陆地棉抗细胞凋亡基因 *GhDAD1* 的基因组序列及全长 cDNA 序列,并对该基因的染色体定位、时空表达模式和外源激素对其表达的影响进行了分析。

然而目前对于棉花叶片早衰的研究主要是从生理生化和功能基因组学方面进行的,蛋白质组学相关研究仍处于起步阶段。对生命代谢活动的直接体现者——蛋白质的功能分析、鉴定及其翻译后修饰的研究,将会对阐明基因的功能起到极大的推动作用,并能更加客观准确地揭示生命现象。因此,开展棉花叶片衰老的蛋白质组学研究,将会为棉花叶片早衰机理的研究以及早衰问题的解决奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料及取样

试验材料为早熟早衰型陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 品种中棉所 10 号。试验材料来源于中国农业科学院棉花研究所种质库。选择成熟饱满的中棉所 10 号的种子,浓硫酸脱绒后,于 2010 年 5 月种植于中国农业科学院棉花研究所东场试验基地,栽培管理措施同常规大田。棉花主茎叶片完全展平后记为 0 d,并进行挂牌标记。自叶龄为 30 d 时开始取材,每 10 d 取 1 次,一部分用于测定叶片内叶绿素含量变化,另一部分叶片经液氮迅速冷冻后置于超低温冰箱内,用于蛋白质提取以及后续试验。

1.2 主要试剂与仪器

巯基乙醇、丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、苯甲磺酰氟(PMSF)、甲叉双丙烯酰胺、乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na)、N, N, N', N'-四甲基乙二胺、尿素、硫脲、硫代硫酸钠、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸均购买于 Sigma 公司;胰蛋白酶、IPTG、三氟乙酸、乙腈来源于 Amersco 公司;蛋白质定量试剂盒、24 cm pH 4~7 的线性 IPG 预制胶条、蛋白质纯化试剂盒均购于 GE 公司。

主要仪器:美国 Beckman 公司的高速离心

机、DU800 分光光度计;GE 公司的双向电泳仪器:IPGphor 电泳单元、制胶和灌胶模具、循环冷凝装置、垂直电泳单元、EPS-301 电源、2-D Image-master ElitTM;真空加速干燥离心机、MALDI TOF/TOF 4700 (ABI 公司)、Powerlook 2100XL UMAX 扫描仪。

1.3 叶片蛋白的提取及定量

采用 TCA-丙酮法提取叶片总蛋白质并稍做修改:研钵用液氮预冷后,加入适量 PVP 和棉花叶片样品 0.5~1 g,在液氮中研磨至粉状,转入 50 mL 离心管中,悬浮于约 3 倍体积的 -20 °C 预冷的 TCA-丙酮(含 10% TCA 和 0.07% 的 β -巯基乙醇)溶液,涡旋后静置于 -20 °C 下,沉淀蛋白过夜,离心(4 °C, 15000 \times g) 1 h。弃上清液,取沉淀,加入约 3 倍体积的 -20 °C 预冷丙酮溶液(含 0.07% 的 β -巯基乙醇),混匀后 -20 °C 下静置 2 h。同上离心,弃上清,重复 2~3 次。最后取沉淀,用封口膜封住管口,真空冷冻干燥成干粉,置于 -80 °C 保存备用。

1 mg 干粉加入 30 μ L 裂解液(含 7 mol \cdot L⁻¹ 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol \cdot L⁻¹ DTT, 2 mol \cdot L⁻¹ 硫脲),每 10~20 min 振荡一次,振荡至沉淀完全溶解即可,离心(4 °C, 10000 \times g) 1 h,即得蛋白质样品,使用 2D Quant kit 测定蛋白质浓度后分装, -80 °C 保存备用。

1.4 蛋白质的双向电泳分析

0.1 mg 总蛋白与水化液(8 mol \cdot L⁻¹ 尿素, 2% CHAPS, 0.3% DTT, 0.6% IPG Buffer)充分混合,上样总体积 450 μ L,使用 pH 4~7、24 cm 线性 IPG 胶条,在 18 °C 按以下程序进行第一向等电聚焦:30 V 8 h, 50 V 4 h, 100 V 1 h, 300 V 1 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 8000 V 12 h, 500 V 任意小时。第一向等电聚焦结束后,先将 IPG 胶条放入平衡缓冲液 I (1.5 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 6 mol \cdot L⁻¹ 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT) 中平衡 15 min,再将 IPG 胶条转入平衡缓冲液 II (1.5 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 6 mol \cdot L⁻¹ 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 4% 碘乙酰胺)中平衡 15 min。IPG 胶条平衡后,在电极缓冲液(25 mmol \cdot L⁻¹ Tris-base, 0.1% SDS, 192 mmol \cdot L⁻¹ 甘氨酸)中进行第二向 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。第二向电泳参数设

定为:先以每块胶 2 W 的功率预电泳 45 min;再以每块胶 15 W 的功率电泳直到溴酚兰前沿恰好跑出胶外的时候停止电泳。采用银染法进行染色,SDS-PAGE 胶图像信息的获取采用 Power look 2100XL UMAX 扫描仪,分辨率采用 300 dpi。利用 ImageMaster 2D Platinum 7.0(GE 公司)分析软件对电泳图谱进行差异分析。

1.5 质谱分析与数据库检索

在进行质谱分析前,用剪平前端的黄枪头把差异表达的蛋白点从制备胶上挖取出来,放在 Eppendorf(EP)离心管中,并用 ddH₂O 水润洗 3 次。(1)脱色:EP 管内加入 100 μ L 的 100 mmol·L⁻¹ 碳酸氢铵(NH₄HCO₃),摇床上振荡 5 min 后弃去上清液。再加入 100 μ L 乙腈(ACN),轻微振荡 10 min 再弃去上清。重复 1 次上述步骤。(2)酶解:加入测序级胰蛋白酶在 4 $^{\circ}$ C 条件下处理胶粒 45 min。加入碳酸氢铵在 37 $^{\circ}$ C 倒置 12 h。(3)抽提酶解产物:在 EP 管中加入 20 μ L 混合液(50% ACN/0.5% TFA),摇床上振荡 1 h 后离心。最后将上清液置于真空中干燥。(4)脱盐处理:脱盐后的样品可以置于 -80 $^{\circ}$ C 长期保存,或直接用于后续的质谱检测工作。

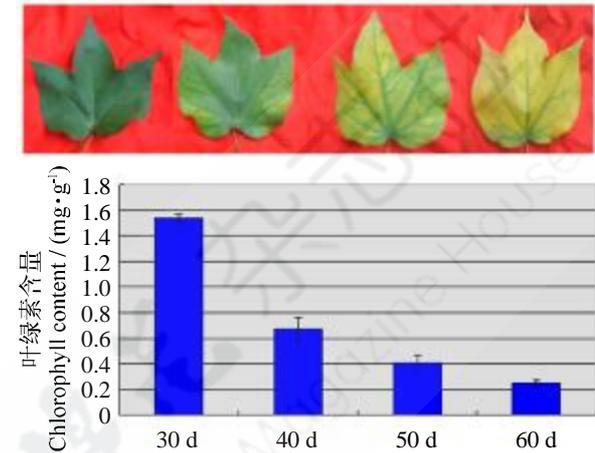
数据库搜索:采用美国 ABI 公司的 MALDI-TOF-MS 质谱仪(ABI 4700 型)进行质谱分析,采用 GPS3.0 分析软件进行质谱的检索以及 Mascot 搜索。对 GPS 分析软件的搜索参数设定如下:选择数据库种类为 NCBIInr;固定修饰和可变修饰不选;分类学选择 Viridiplantae (Green plants);肽段质量误差一般以 0.2 Da 为参考,此参数是根据胰酶自解峰的理论与实际质量数的误差做参考而设定;酶选择胰蛋白酶,并且每个允许肽片段有 1 个不完全裂解位点;多肽的电荷数设为 +1;峰过滤的质量范围为 800~4000 Da,最小信噪比为 20;提交的峰的最高数量为 65;MS-MS 的质量误差设为 0.2 Da。

2 结果与分析

2.1 棉花叶片衰老表型观察及叶绿素含量

植物叶片叶绿素含量的下降是叶片衰老明显的标志,故叶绿素含量的变化通常作为监测叶片衰老的生理指标。从图 1 可知,棉花主茎叶片

在 30 d 时叶绿素含量达最高值;随着生育期的增长,叶片开始衰老,至 40 d 时,叶片边缘已出现部分黄化现象,叶绿素含量较 30 d 时下降了 50%以上;到 60 d 时叶片已经完全黄化,叶绿素含量只有 30 d 时的 16%左右。中棉所 10 号叶片叶绿素含量急剧下降的现象,与它早衰的生理特性一致。



叶片分别为中棉所 10 号主茎叶片完全展平后 30、40、50、60 d 后采集。

Leaves were taken at 30, 40, 50, 60 d after full expansion of true leaves in CCRI 10.

图 1 叶片衰老表现及其叶绿素含量变化

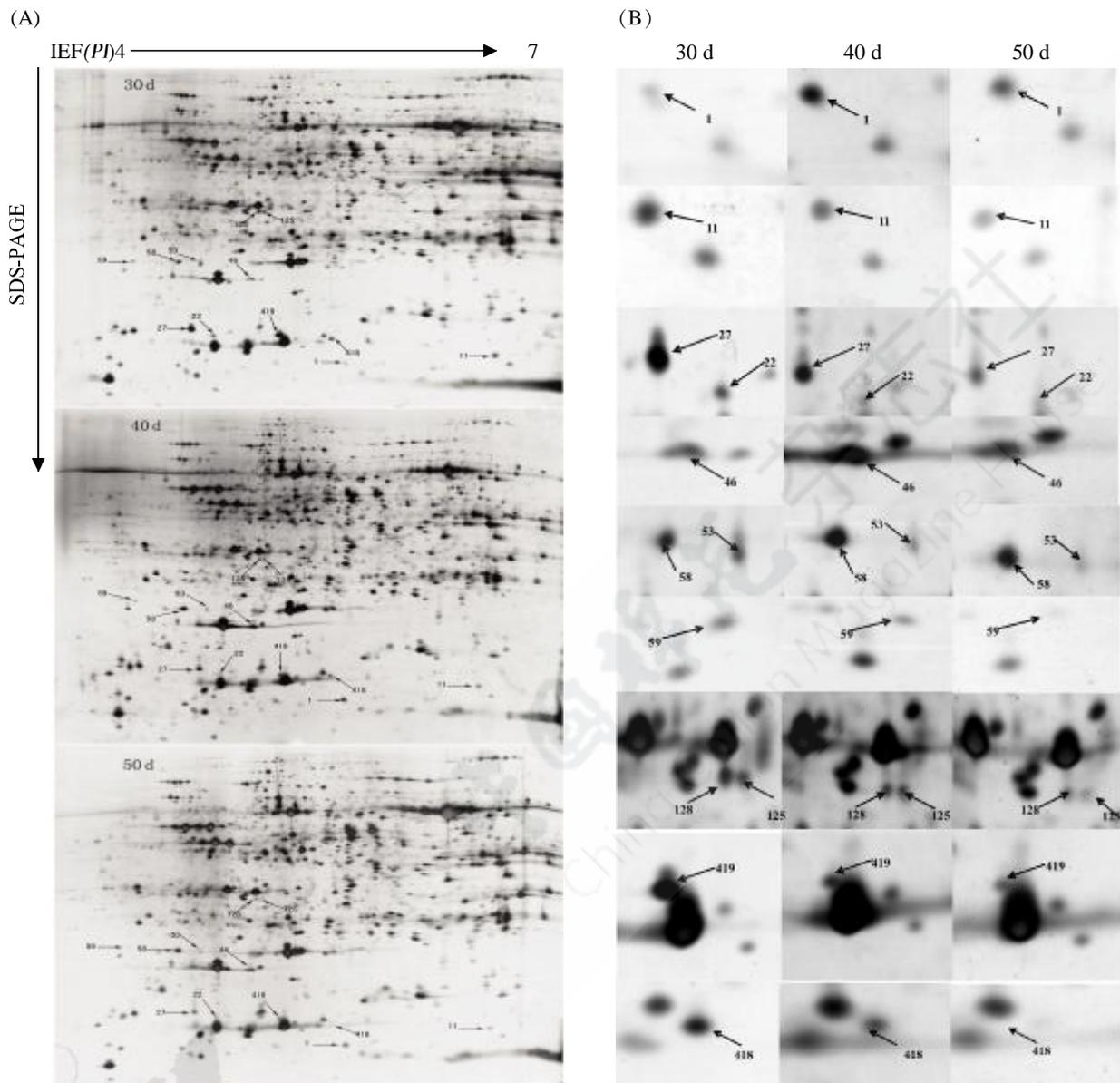
Fig. 1 Changes of leaves and their chlorophyll contents

2.2 棉花叶片衰老过程中蛋白质组的双向电泳分析

对中棉所 10 号主茎叶完全展平后的 30、40、50 d 3 个时期的样品进行叶片全蛋白的双向电泳分析,总计 3 个样品,每个样品进行 3 次生物学重复。以中棉所 10 号 30 d 时的样品作为蛋白质双向电泳的参考胶,其他各个样品的电泳图谱均与参考胶进行比较。利用 GE 的分析软件 ImageMaster 2D Platinum 7.0 对蛋白质电泳图谱进行分析,以蛋白表达丰度大于或等于 2 倍且 $P < 0.05$ 作为差异蛋白点显著表达的筛选标准,图 2(A)中箭头标记的为最终成功鉴定的 12 个差异蛋白点。其中,与对照中棉所 10 号 30 d 的蛋白点相比,表达量上升的有 3 个点(1,46,58),下降的有 9 个点(11,22,27,53,59,125,128,418,419),图 2(B)为各差异点在 3 个时期的放大图。

2.3 叶片衰老过程中差异表达蛋白质的质谱鉴定

对表达量显著变化的 33 个蛋白点进行二级质谱 MALDI-TOF/TOF 鉴定。由于棉属尚未完成



A)为3个时期双向电泳图谱,箭头所指为差异表达的蛋白;B)为各差异点在3个时期的放大图。

A) refers to 2-DE protein profile at three stages, and differentially expressed proteins are indicated by arrows; B) illustrates the enlarged version of the differentially expressed protein spots during leaf senescence.

图2 各时期双向电泳图谱

Fig. 2 2-DE image analysis of cotton leaf proteome

全基因组测序,且已知的蛋白质种类较少,从而给蛋白质的鉴定带来了困难。实验过程中有很多蛋白点都有比较好的质谱检测结果,但在数据库比对过程中无法找到相匹配的蛋白,最终我们成功鉴定到的蛋白点为12个。蛋白质质谱MALDI-TOF-TOF分析以及数据库Mascot检索鉴定结果见表1。从表1可以看出,差异蛋白主要参与了光合作用、病虫害防御以及信号转导的生物代谢过程,其中大部分蛋白为病虫害防御相关蛋

白,说明中棉所10号叶片的早衰可能与这些防御蛋白在衰老过程中的差异表达密切相关。

3 讨论

棉花早衰即“未老先衰”,即衰老过程过早发生,引起棉花体内生理生化过程较正常植株提前发生衰退。喻树迅等^[9]对短季棉品种的研究表明,品种是否早衰与后期棉花叶片内的抗氧化酶类如SOD、POD、CAT等活性有关。不易早衰的

表 1 棉花叶片衰老过程中差异表达的蛋白

Table 1 Identification of differentially expressed protein spots during leaf senescence in cotton

蛋白点 Spot No.	登录号 Accession No.	蛋白名称 Protein name	物种 Species	分子量/ 等电点 Mr/PI	得分 Score	期望值 Expect	序列覆 盖率 Sequence coverage /%	肽段匹 配数 Peptide number	生物学功能 Biological function
上调 表达的 蛋白 Upregu- lated proteins	1	gij119368505	<i>Gossypium barbadense</i>	14558/5.41	364	2.00E-33	54	12	光合作用与能量 Energy/ Photosynthesis
	46	gij416681	<i>Nicotiana tabacum</i>	26768/8.96	75	0.0056	16	8	光合作用与能量 Energy/ Photosynthesis
	58	gij115446541	<i>Oxyza sativa</i>	28079/5.67	152	1.20E-10	32	11	病虫害防卫 Disease defense
下调 表达的 蛋白 Downreg- ulated proteins	11	gij209419744	<i>Gossypium arboreum</i>	15156/5.64	172	3.20E-14	20	5	病虫害防卫 Disease defense
	22	gij10505376	<i>Gossypium hirsutum</i>	17282/4.95	224	2.00E-19	49	10	病虫害防卫 Disease defense
	27	gij45644508	<i>Gossypium barbadense</i>	17199/4.94	335	1.60E-30	62	12	病虫害防卫 Disease defense
	53	gij29836417	<i>Gossypium raimondii</i>	9235/9.85	53	0.026	40	5	光合作用与能量 Energy/ Photosynthesis
	59	gij124294787	<i>Gossypium hirsutum</i>	31621/4.84	93	0.0000026	16	7	病虫害防卫 Disease defense
	125	gij38679313	<i>Gossypium hirsutum</i>	29956/9.37	330	5.10E-30	53	20	信号转导 Signal transduction
	128	gij38679313	<i>Gossypium hirsutum</i>	29956/9.37	746	1.30E-71	50	21	信号转导 Signal transduction
	418	gij45644508	<i>Gossypium barbadense</i>	17199/4.94	129	6.50E-10	29	5	病虫害防卫 Disease defense
	419	gij10505372	<i>Gossypium hirsutum</i>	17144/5.21	561	4.10E-53	71	18	病虫害防卫 Disease defense

品种,在生长后期棉花叶片中活性氧自由基清除酶保持较高活力,能及时清除活性氧自由基,避免其对细胞膜系统的破坏;而易早衰的品种,后期棉花叶片中活性氧清除酶活性处于较低水平,对外界环境条件变化反应较敏感。谢庆恩等^[7]对子叶衰老过程中的叶绿素、可溶性蛋白含量、干物质质量和3种保护酶(超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶)活性以及丙二醛含量的变化进行研究,发现子叶在出土后19d开始衰老;叶绿素含量变化在很大程度上与SOD和CAT活性变化正相关,与MDA的含量变化显著负相关,但是与POD活性变化不存在显著的相关性。本试验中,我们采用双向电泳技术对衰老过程中各时期的叶片全蛋白进行分析,结果表明,衰老过

程中,差异表达的蛋白点参与了一些代谢途径,包括病虫害防御、信号转导以及光合作用。

3.1 活性氧清除相关酶类

活性氧包括超氧自由基、过氧化氢和单线态氧,广泛存在于细胞代谢过程或组织中^[8]。SOD作为生物体内超氧阴离子自由基的清除剂,广泛参与植物应对环境胁迫、病害侵袭以及衰老等一系列过程。SOD构成植物体内防御ROS(Reactive oxygen species)的第一道屏障,其主要功能是将超氧阴离子和水催化为过氧化氢和氧气,因此,SOD对于延缓叶片衰老十分重要。研究指出转基因拟南芥过量表达SOD后表现出对高光强、重金属及氧化胁迫具有很强的耐受力,在其他转基因植株中同样可以观察到对非生物胁迫的较强

忍耐力与植株过量表达 SOD 有关^[9-10]。Pitcher 等^[11]使转基因烟草植株过量表达 Cu/Zn-SOD,发现过表达 Cu/Zn-SOD 能够显著提高植株对氧化胁迫的耐受力。本研究中,点 11 被鉴定为 Cu/Zn-SOD,该蛋白点在衰老的 3 个时期里下调表达。我们推测 SOD 在叶片衰老后期下调表达,植物体内积累了过多的活性氧,从而加快了叶片的早衰。

此外,本试验中,点 58 被鉴定为 2-cys 过氧化物酶(2-cys peroxidase)。该蛋白在植物中被称为 BAS1,是过氧化蛋白(Prxs)的一种。Prxs 是一类新的过氧化物酶,它可以催化 H₂O₂ 还原为水,或在供氢体的存在下,催化各种烷基过氧化物还原为水和相应的醇,从而避免植物体内代谢过程中产生的 H₂O₂ 对植物细胞膜造成的伤害。周伟辉等^[12]研究高温胁迫对水稻叶片蛋白质组的影响时发现,抗逆相关蛋白 2-cys 过氧化物酶 BAS1 的表达量在高温胁迫下显著上调表达。有意思的是,我们的结果显示 2-cys 过氧化物酶(点 58)在衰老过程中也表现上调表达,与 Cu/Zn-SOD 呈现出相反的表达模式。我们猜测,2-cys 过氧化物酶可能类似于 POD,具有双重功能。一方面它可以清除细胞代谢产生的 H₂O₂,起到抗氧化酶的作用;另一方面,它可能参与叶绿素的降解和活性氧的产生,进而引发植物细胞的膜脂过氧化,表现为促进衰老的效应。

3.2 病虫害防御相关的蛋白质

我们的研究还发现一些病虫害防御相关的蛋白质在棉花叶片衰老过程中显著表达。总共有 7 个蛋白被鉴定为病虫害防御相关的蛋白质,且这 7 个蛋白点在衰老的过程中均下调表达。4 个蛋白点(点 22、27、418 和 419)与病原相关蛋白 PR10 具有同源性,1 个蛋白点(点 59)与酸性几丁质酶具有同源性,2 个结合蛋白(点 125、128)与 HrBP1 具有同源性。一般认为,病原相关蛋白 PR10 受病原体感染后积累表达,也可以在各种生物和非生物逆境中在植物体内积累。PR10 基因可以被各种非生物胁迫诱导,如氯化钠、热、紫外线照射和臭氧刺激。PR10 蛋白在脱水胁迫下可以起保护作用,这可能是由于它们的空间结构类似于脱水蛋白^[13]。本研究结果表明,PR10 蛋白

在衰老过程中的显著下调可能与棉花叶片的衰老密切相关。HrBP1 为植物体内产生的一种受体蛋白,能够特异结合病原菌侵染植物时产生的 harpin 蛋白;该蛋白能够激发植物的过敏反应^[14]。研究表明 HrBP1 广泛分布于各种植物中,并且已被定位于细胞壁上,但是目前关于其具体的生物学功能尚不太清楚。一些研究表明,激活状态的 HrBP1 蛋白能够选择性地上调植物体内的一些信号通路,包括一些植物抗病相关的信号通路、促进植物生长发育的通路以及植物抗逆胁迫相关的信号通路,从而达到增强植株抗病性和促进生长的效应^[15]。本研究结果表明,HrBP1 蛋白在中棉所 10 号叶片衰老过程中显著下调表达,推测可能与叶片早衰有密切的联系。

3.3 光合作用能量相关的蛋白质

研究中还发现一些参与光合作用能量相关的蛋白(点 1 和 46),这 2 个蛋白点均定位于叶片的叶绿体中。植物叶片衰老的过程中,植物细胞在细胞的结构、代谢以及基因表达等水平均表现出非常有序的变化。其中,在细胞水平上最显著的变化就是植物细胞的叶绿体降解,从而表现为叶片逐渐失绿变黄。本研究中,蛋白点(1 和 46)被鉴定为 ATP 合成酶的 2 个亚基,参与光合作用中的能量代谢。尽管前期 2 个蛋白点的表达水平随着叶片的衰老逐渐升高,但是在第 50 天均出现了一定水平的下降,推测可能是前期叶绿体中大量被降解的蛋白等大分子的转运需要一定的能量,最终这 2 个蛋白也随着叶绿体结构的彻底破坏而被降解。

参考文献:

- [1] WRIGHT P R. Premature senescence of cotton(*Gossypium hirsutum* L.)-Predominantly a potassium disorder caused by an imbalance of source and sink[J]. *Plant and Soil*, 1999, 211: 231-239.
- [2] 沈法富,喻树迅,范术丽,等. 棉花叶片衰老过程中激素和膜脂过氧化的关系[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(6): 589-592.
SHEN Fa-fu, Yu Shu-xun, Fan Shu-li, et al. The relationship between hormone and membrane lipid peroxidation in cotton leaf during senescence[J]. *Acta Photophysiological Sinica*, 2003, 29(6): 589-592.

- [3] GUINN G, Brummett D L. Leaf age, decline in photosynthesis, and changes in abscisic acid, indole-3-acetic acid, and cytokinin in cotton leaves[J]. *Field Crops Research*, 1993, 32(3): 269-275.
- [4] 沈法富, 喻树迅, 范术丽, 等. 不同短季棉品种生育进程中主茎叶内源激素的变化动态[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(9): 1014-1019.
- SHEN Fa-fu, Yu Shu-xun, Fan Shu-li, et al. Changes of endogenous hormone in stem leaves of different short season cotton varieties in development processes[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(9): 1014-1019.
- [5] 龚文芳, 喻树迅, 宋美珍, 等. 棉花抗细胞凋亡基因 *GhDAD1* 的克隆、定位及表达分析[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(18): 3713-3723.
- GONG Wen-fang, Yu Shu-xun, Song Mei-zhen, et al. Chromosome mapping and expression analysis after the cloning of defender against apoptotic cell death gene from *Gossypium hirsutum*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(18): 3713-3723.
- [6] 喻树迅, 范术丽, 原日红, 等. 清除活性氧酶类对棉花早熟不早衰特性的遗传影响[J]. *棉花学报*, 1999, 11(2): 100-105.
- YU Shu-xun, Fan Shu-li, Yuan Ri-hong, et al. Genetic influence of eliminating active oxydase on the characteristic of early maturity but late senescence of cotton[J]. *Cotton Science*, 1999, 11(2): 100-105.
- [7] 谢庆恩, 王瑞芳, 范作晓, 等. 棉花子叶衰老过程中的生理生化变化[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(3): 212-216.
- XIE Qing-en, Wang Rui-fang, Fan Zuo-xiao, et al. Physiological and biochemical changes of cotyledon during senescence in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(3): 212-216.
- [8] KOTCHONI S O, Gachomo E W. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants[J]. *Journal of Biosciences*, 2006, 31(3): 389-404.
- [9] 窦俊辉, 喻树迅, 范术丽, 等. SOD 与植物胁迫抗性[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(2): 359-364.
- DOU Jun-hui, Yu Shu-xun, Fan Shu-li, et al. SOD and plant stress resistance[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(2): 359-364.
- [10] SUNKAR R, Kapoor A, Zhu Jian-kang. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(8): 2051-2065.
- [11] PITCHER L H, Zilinska B A. Overexpression of Copper/Zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis [J]. *Plant Physiology*, 1996, 110: 583-588.
- [12] 周伟辉, 薛大伟, 张国平, 等. 高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异[J]. *作物学报*, 2011, 37(5): 820-831.
- ZHOU Wei-hui, Xue Da-wei, Zhang Guo-ping, et al. Protein response of rice leaves to high temperature stress and its difference of genotypes at different growth stage[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(5): 820-831.
- [13] EKRAMODDOULLAH A K, Liu J J, Zamani A. Cloning and characterization of a putative antifungal peptide gene (*Pm-AMPI*) in *Pinus monticola*[J]. *Phytopathology*, 2005, 96: 164-170.
- [14] WEI Zhong-min, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*[J]. *Science*, 1992, 257: 85-88.
- [15] CHEN Zhuo, Zeng Meng-jiao, Song Bao-an, et al. Dufulin activates hrbp1 to produce antiviral responses in tobacco [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): 1-17. ●