

油茶 *SOD* 基因克隆及不同授粉处理下的表达分析

王艺颖, 袁军, 谭晓风, 卢梦琪, 周 奥, 周俊琴

(中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室, 长沙 410004)

摘要: 为了探究超氧化物歧化酶(SOD)基因家族在油茶自交不亲和反应中的作用, 通过 RT-PCR 法克隆出油茶 *SOD* 基因家族成员, 分别命名为 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD*。其 CDS 序列长度分别为 660、813 和 693 bp, 编码 219、270 和 230 个氨基酸。*CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 蛋白分子质量分别为 22.49 kDa、31.18 kDa 和 25.51 kDa, 结构分析发现三个蛋白均为亲水性蛋白, 无跨膜结构域和信号肽, 属于非分泌蛋白, 且均包含 21 个磷酸化位点。*CoCSD* 和 *CoMSD* 两者属于稳定蛋白, 而 *CoFSD* 属于不稳定蛋白。*CoCSD* 二级结构主要是无规则卷曲和延伸链, 而 *CoFSD* 和 *CoMSD* 的二级结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲构成。三个蛋白因结合不同的金属离子, 系统进化树构建时被划分到三个大支, 但均与茶树相应蛋白聚类在同一小枝上, 且序列上具有高度的同源性。自交授粉雌蕊中的 *SOD* 酶活性整体高于异交授粉, 但 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 在授粉前表达量最高, 自交和异交授粉处理均对其表达量有抑制作用。该研究结果为后续深入探究油茶 *SOD* 基因的生物学功能奠定基础, 也为揭示油茶自交不亲和作用机制提供参考。

关键词: 油茶; 自交不亲和; 超氧化物歧化酶; 生物信息学分析; 表达模式

Cloning and Expression Analysis of *SOD* Genes under Different Pollination Treatments in *Camellia oleifera*

WANG Yi-ying, YUAN Jun, TAN Xiao-feng, LU Meng-qi, ZHOU Ao, ZHOU Jun-qin

(Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest Trees, Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004)

Abstract: In order to investigate the role of superoxide dismutase (SOD) gene family members in the self-incompatibility response of *Camellia oleifera*, three family members *CoCSD*, *CoFSD* and *CoMSD* were isolated by RT-PCR. The CDS sequences of *CoCSD*, *CoFSD* and *CoMSD* were 660, 813 and 693 bp in length, encoding for 219, 270 and 230 amino acids, with a molecular weight of 22.49 kDa, 31.18 kDa and 25.51 kDa, respectively. Structural analysis revealed that three proteins were hydrophilic without transmembrane domain and signal peptide (non-secretory proteins), and all contained 21 phosphorylation sites. Both *CoCSD* and *CoMSD* are stable, while *CoFSD* is an unstable protein. The secondary structure of *CoCSD* is mainly composed of irregularly coiled and extended chains, while the secondary structure of *CoFSD* and *CoMSD* is mainly composed of α -helices and irregular coils. The three proteins were assigned to three categories in the phylogenetic tree, whereas all were clustered on the same branchlet with the corresponding proteins of tea tree and had high sequence homology. The *SOD* enzyme activity in self-pollinated pistils was overall higher than that in cross-pollinated pistils, but the expression of *CoCSD*, *CoFSD* and *CoMSD* was highest before pollination and was inhibited by both self and cross-pollination treatments. The results of this study lay the foundation for the subsequent in-depth investigation of the biological functions of *C. oleifera SOD* genes, and also provide a reference for revealing the mechanism of

收稿日期: 2022-07-17

修回日期: 2022-08-16

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为经济林, E-mail: wangyiyong99@qq.com

通信作者: 周俊琴, 研究方向为 经济林, E-mail: zhoujunqin@csuft.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31730016); 湖南省教育厅科学研究项目青年项目(21B0274); 湖南省企业科技创新创业团队支持计划“湖南神农油茶产业科技创新创业团队”

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31730016), Hunan Provincial Department of Education Scientific Research Project Youth Project(21B0274), Hunan Provincial Enterprise Science and Technology Innovation and Entrepreneurship Team Support Program "Hunan Shennong national oil *Camellia oleifera* Industry Science and Technology Innovation and Entrepreneurship Team"

self-incompatibility in *C. oleifera*.

Key words: *Camellia oleifera*; self-incompatibility; Superoxide dismutase; bioinformatics analysis; expression pattern

油茶(*Camellia oleifera*)作为我国特有的木本食用油料植物之一,具有经济价值高、用途广等特点^[1]。但在生产上存在“花多果少、座果率低、产量低下且不稳定”的现象,油茶自交不亲和性(SI, self-incompatibility)的遗传机制是导致这一现象的重要因素之一^[2,3]。自交不亲和性作为植物的一种特殊保护机制,在自然界中广泛存在,其主要目的是防止自交败育,增加杂交几率以保持遗传多样性^[4],其作用机制已有了一定的研究。在苹果和梨等配子体自交不亲和树种中,花柱中的S单体型核糖核酸酶(S-RNase)与自交不亲和性密切相关^[5,6]。S-RNase能够特异性地破坏自交不亲和花粉管顶端的ROS,引发肌动蛋白解聚,从而引起自交不亲和花粉管发生细胞程序性死亡,导致受精失败^[7,8]。除此之外,S-RNase进入花粉管后引发一系列涉及膜蛋白的反应,如活性氧(ROS)的产生和酶活性的改变等^[9]。在应激条件下,植物体内ROS水平显著增加,导致细胞结构氧化损伤^[10,11]。植物细胞中已经进化出一整套机制来清除过多的ROS,并调整内部环境,清除机制包括酶促和非酶系统,其中超氧化物歧化酶(SOD)是植物酶促防御系统的关键酶之一,与过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)具有协同作用^[12]。

超氧化物歧化酶(SOD, Superoxide dismutase)是一类抗氧化金属酶,是清除植物体内活性氧的一道防线,能够保护细胞免受超氧阴离子自由基损伤,广泛存在于各种动物、植物和微生物中^[13,14]。根据结合金属离子的种类,植物SOD基因主要分为3种类型,即Cu/Zn-SOD、Fe-SOD和Mn-SOD^[15,16],不同类型的SOD都由核基因编码^[17]。近年来研究表明,SOD基因能够参与植物的生长发育过程,影响植物的形态发生和建成,同时影响细胞膜结构功能的稳定性^[18-20]。王保成等^[21]研究发现芸芥(*Eruca sativa* Mill)自交亲和性和自交不亲和性都与SOD、POD和CAT 3种保护酶有一定关系,保护酶活性的变化可能与亲和基因的调控有关。另有研究发现,自交不亲和的苹果品种自花授粉后,24 h内花粉管能够正常生长并通过花柱基部,但在24~72 h花粉管已停止生长,此时SOD、POD、CAT活性含量变化较大;自交亲和的苹果品种自花授粉后0~48 h花柱内3种酶活性相对稳定^[22]。同一时期授粉下鸭梨的SOD花柱活性异交授粉高于自花授粉^[23]。自交不亲和甘蓝(*Brassica oleracea* L.)在自异交授粉后,花柱内SOD酶活性呈上升趋势,而自花授粉上升幅度明显低于异花授粉^[24]。但关于油茶保护酶活性与自交不亲和性的关系尚未见报道。因此,本研究先测定了自交和异交雌蕊中SOD酶活性,然后进行了油茶SOD基因家族的鉴定,并利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR, quantitative real-time PCR)分析了SOD基因家族在不同授粉组合中的表达模式,以期揭示油茶自交不亲和性生理响应机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以八年生油茶(*Camellia oleifera* Abel.)‘华硕’^[25]与‘华鑫’^[26]品种为研究对象,材料种植于湖南省长沙市望城区中南林业科技大学油茶试验基地。以‘华硕’作为母本,参照周俊琴等^[27]方法设计自交、异交2种授粉组合(‘华硕’×‘华硕’、‘华硕’×‘华鑫’)。两个品种均为自交不亲和类型,且两者杂交亲和。选取‘华硕’与‘华鑫’露白花苞,去雄后,人工控制授粉,授粉后用硫酸纸袋套袋,并用吊牌标记。在

授粉 0、12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 后，用尖头镊子将雌蕊取下，液氮速冻后于-80 ℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 SOD 酶活性测定 参照文献^[23]所述方法测定 SOD 酶活性，设置样品组 pH7.5 的磷酸缓冲液+130 mmol/L 甲硫氨酸+300 μmol/L NBT+200 μmol/L 核黄素+10 μmol/L EDTA+酶粗提液，对照组相同的处理不需要加酶粗提液，置于 4000 lx 光照培养箱下 30 min，用分光光度计于 560 nm 下测其 OD 值。

结果计算：OD 总活性(OD 值/g)=(对照 OD 值-样品 OD 值)×V 总/(Vt×Fw)

其中：V 总：提取液总体积；Vt：反应体系中加入酶粗提液体积；Fw：样品鲜重。

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 合成 参照 Omega 公司的 Plant RNA Kit 试剂盒说明书提取油茶雌蕊总 RNA。利用紫外/可见光分光光度计(Lambda35, Perkin Elmer, USA)检测 RNA 的纯度和浓度，并用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。参照 Vazyme 公司 HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthese Kit (+gDNA wiper)试剂盒说明书进行合成 cDNA 第一链。

1.2.2 油茶 SOD 基因的克隆 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 三条基因的全长编码序列(CDS, coding sequence)来源于本课题组构建的油茶雌蕊转录组数据库^[28]。通过本地软件 Primer Premier 5.0 设计 3 对特异引物(表 1)：*CoCSD*-F 和 *CoCSD*-R、*CoFSD*-F 和 *CoFSD*-R、*CoMSD*-F 和 *CoMSD*-R，用 Takara 公司 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶进行扩增。PCR 扩增产物利用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带的特异性，参照 TSINGKE 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒说明书纯化目的片段。将目的片段连接到 pClone007 Versatile Simple Vector Kit 载体上，转化至 Trelief[®] 5α 大肠杆菌感受态，涂布于氨苄抗性的培养基上进行筛选，经菌液 PCR 和电泳检测后，挑选阳性克隆送至擎科生物科技有限公司完成测序。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	碱基数 bases
CoCSD-F	ATGCAAGCCCCATTCGCAACA	21
CoCSD-R	TTAAACTGGAGTCAAACCCACCAC	24
CoFSD-F	ATGGGTGGTCATCCTCTGTGTTG	23
CoFSD-R	TCAAGCAATAGGAATTTGGGTTCG	25
CoMSD-F	ATGGCTCTTCGGACTCTGTTGA	22
CoMSD-R	TCAAGGGCATACTTTTCATACAC	24
CoCSD-QF	CTCCGCTCTTCCTTCCA	17
CoCSD-QR	GGGTACAACGCCTTCG	17
CoFSD-QF	ATGGGTCTTCTTCAGCA	17
CoFSD-QR	CTCAAGTCGTTTCTCAC	18
CoMSD-QF	GAAGCATTGATACAGAAGA	19
CoMSD-QR	AAGCCAAGCAGAGGAAC	17

1.2.3 油茶 SOD 蛋白的生物信息学分析 使用在线网站(表 2)分析油茶 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 蛋白的理化性质、蛋白结构特点以及结构域等；通过 NCBI 数据库中的 BLASP 工具搜索同源序列；使用本地软件 Jalview 和 GeneDoc 进行同源序列比对和分析，并用 MEGA11 软件构建系统发育进化树。

表 2 本研究使用的在线网站

Table 2 online website used in this study

网站	网址链接	功能
web	Web Link	Function
ORF Finder	(http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html)	基因的开放阅读框
ExPASy-ProtParam Tool	(http://web.expasy.org/protparam/)	理化性质分析
ExPASy-ProtScale	(https://web.expasy.org/protscale/)	疏水性分析
SignalP4.1	(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/)	预测信号肽
TMHMM 2.0	(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)	预测跨膜结构域
NetPhos3.1 Server	(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)	磷酸化位点分析
EukmPLoc	(http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/EukmPLoc2.cgi)	亚细胞定位预测
PSIPRED	(http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)	预测蛋白二级结构
Phyre2	(http://www.PHYRE2 Protein Fold Recognition Server/)	预测蛋白三级结构
MEME	https://meme-suite.org/meme/tools/meme	预测蛋白 motif 结构

1.2.4 油茶 SOD 基因在雌蕊中的表达模式分析 根据克隆得到的 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 全长序列设计 qRT-PCR 引物(表 1)，选择油茶 GAPDH 作为定量分析的内参基因^[29]。使用 Bio-Rad 公司荧光定量 PCR 仪 Mini Option 进行 qRT-PCR，反应体系为 20 μ L，包含 10 μ L 的 2 $\times$ TSINGKE[®] Master qPCR Mix-SYBR(+UDG)，1 μ L 的 cDNA，各 1 μ L 的正反向引物和 7 μ L 无酶无菌的水。每个样品进行 3 次生物学重复，采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法^[30]进行相对表达量的计算，用 SPSS 25.0 软件的邓肯分析进行表达量差异分析。

2 结果与分析

2.1 不同授粉时间自异交雌蕊中 SOD 活性的变化

自交和异交授粉后雌蕊中的 SOD 酶活性变化由图 1 所示，授粉后 12 h，异交雌蕊 SOD 酶活性上升，12~24 h 显著下降，授粉后 24~96 h 整体呈现先上升后下降的趋势，在 72 h 异交雌蕊中，SOD 酶活性达到最高值，在 84 h 骤降达到最低值。与 0 h 相比，SOD 酶活性是有变化的，说明 SOD 可能参与了授粉过程。在自交授粉后的 24 h 内，SOD 酶活性呈直线下降的趋势，在 24 h 达到最低值。自交授粉和异交授粉相比，自交授粉的 SOD 酶活性变化整体大于异交授粉。在 24~48 h 阶段自交授粉提高了油茶的 SOD 酶活性，SOD 酶活性大幅度上升，48 h 时达到峰值，紧接着逐渐下降，与异交授粉的 SOD 酶活性存在显著差异，说明 SOD 可能参与了自交不亲和。

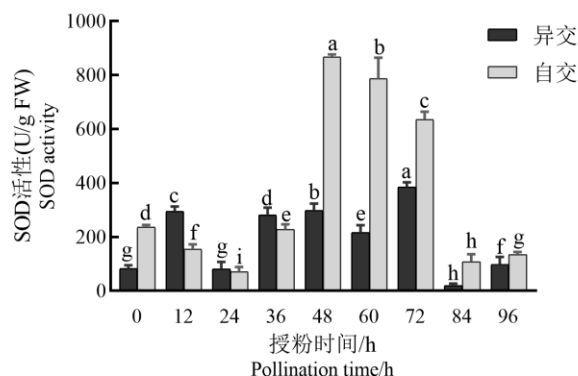
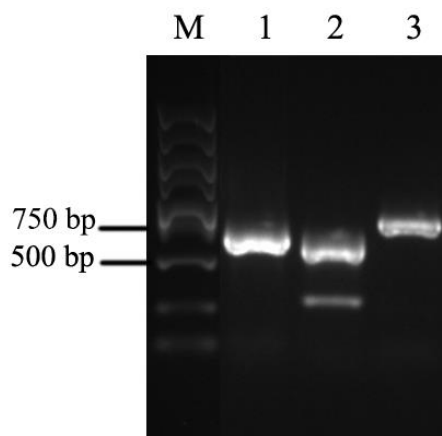


图 1 自异交授粉雌蕊内 SOD 酶活性的变化(P<0.05)

Fig.1 Changes of SOD enzyme activity in self- and cross-pollination pistil(P<0.05)

2.2 油茶 SOD 基因家族的克隆

通过基因序列分别设计相应引物(表 1)，以油茶自交 72 h 雌蕊 cDNA 为模板进行扩增，用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 2)。将扩增的 cDNA 片段进行测序，得到 3 个 SOD 基因。其中，*CoCSD* 基因的开放阅读框为 660 bp，编码 219 个氨基酸，*CoFSD* 基因的开放阅读框为 813 bp，编码 270 个氨基酸，*CoMSD* 基因的开放阅读框为 693 bp，编码 230 个氨基酸。



M: DL5000, 1: *CoMSD*, 2: *CoCSD*, 3: *CoFSD*

图 2 油茶 *CoMSD*、*CoCSD* 和 *CoFSD* 基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification product of *CoMSD*、*CoCSD* and *CoFSD* in *C. oleifera*

2.3 油茶 SOD 蛋白的基本理化性质分析

利用在线网站 ExPASy-ProtParam 分析 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 蛋白的理化性质，结果表明：*CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 蛋白的分子式分别为 $C_{983}H_{1589}N_{283}O_{308}S_6$ 、 $C_{1409}H_{2159}N_{385}O_{390}S_{14}$ 和 $C_{1160}H_{1799}N_{305}O_{333}S_5$ ；分子质量分别为 22.49 kDa、31.18 kDa 和 25.51 kDa；理论等电点为 6.39、8.83 和 7.06，由此可见这三个蛋白的理论等电点均在酸性范围内，说明蛋白分子内含大量酸性氨基酸。脂肪系数越高表明蛋白的热稳定性越高，*CoCSD* 和 *CoMSD* 脂肪系数都在 91 以上，且不稳定系数均低于 40，说明 *CoCSD* 和 *CoMSD* 属于稳定蛋白；*CoFSD* 脂肪系数为 79.44，不稳定系数为 43.05，说明 *CoFSD* 编码的蛋白不稳定。这三个蛋白的平均

亲疏水性为-0.004、-0.465 和-0.283 均为负值，表明三者蛋白都是亲水性蛋白。

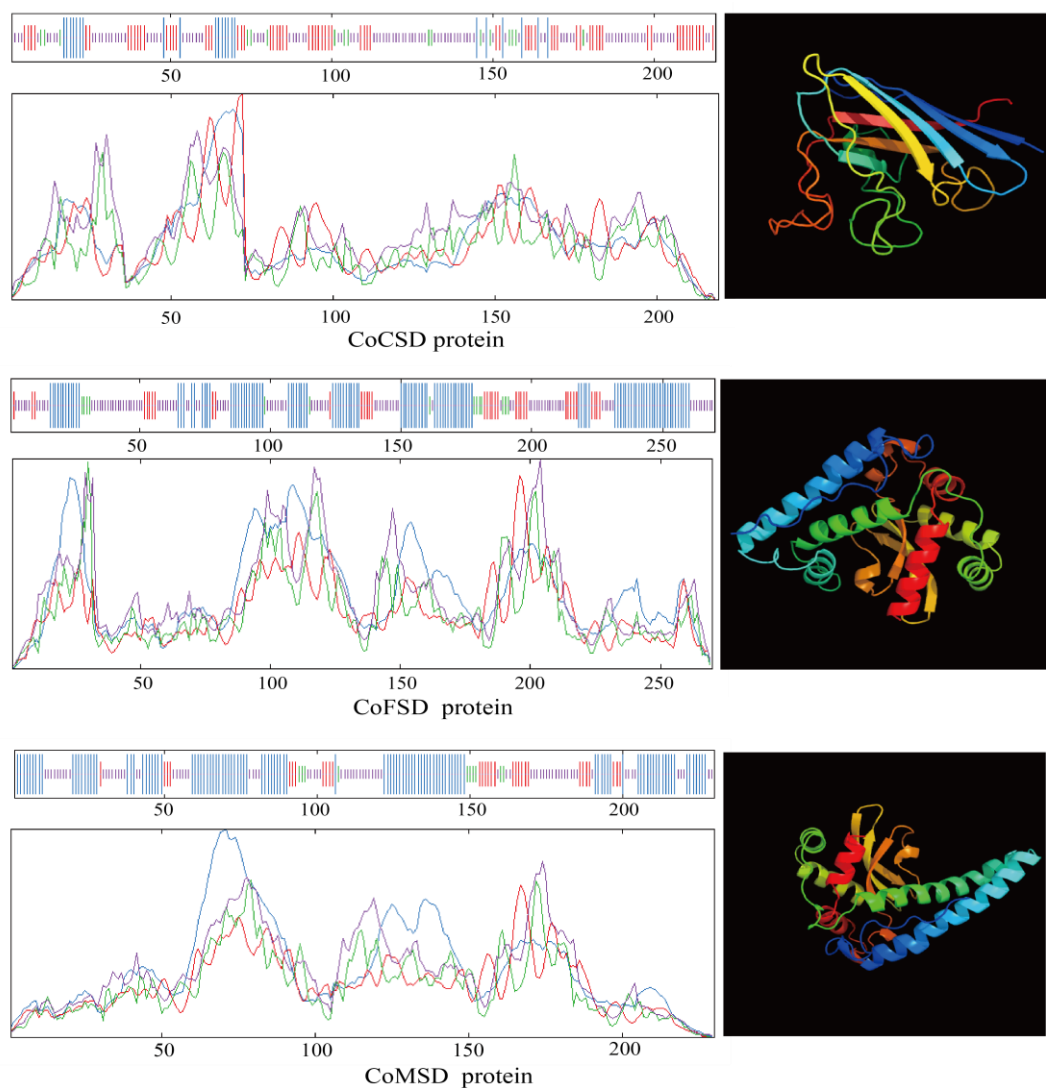
2.4 油茶 SOD 蛋白的信号肽、跨膜结构域、磷酸化位点与亚细胞定位的预测分析

利用 SignalP4.1 和 TMHMM 2.0 在线程序对 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 进行信号肽和跨膜结构域的预测，结果显示它们都不含信号肽和跨膜结构域，说明它们均属于非分泌蛋白，不参与物质的跨膜运输。

运用 NetPhos 3.1 Server 在线程序预测 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 的磷酸化位点，结果显示：CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 蛋白都具有 21 个磷酸化位点，其中 CoCSD 不具有酪氨酸(Tyr)磷酸化位点，CoFSD 和 CoMSD 蛋白都具有丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr)3 种磷酸化位点，表明不同蛋白家族成员之间所含的磷酸化位点的数量和位置存在明显差异，蛋白质磷酸化是一种蛋白质翻译后修饰，不同的磷酸化方式影响油茶 SOD 蛋白的翻译水平，进而影响蛋白质的结构和活性，因而产生功能差异。亚细胞定位预测结果显示，CoCSD 蛋白定位在叶绿体上，CoFSD 和 CoMSD 蛋白定位于线粒体中。

2.5 油茶 SOD 蛋白结构预测

运用 SPOMA 在线工具对 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 蛋白二级结构进行预测，结果显示(图 3)：CoCSD 蛋白的二级结构主要类型是无规则卷曲和延伸链，其次是 β 转角，最少的是 α 螺旋。CoFSD 和 CoMSD 蛋白的二级结构主要类型是 α 螺旋和无规则卷曲，其次是延伸链，最少的是 β 转角(图 3)。使用 Phyre2 在线工具进行模拟蛋白质的三维结构，结果如(图 3)所示。CoCSD 和 CoFSD 蛋白的三级结构与二级结构主要类型相对一致；CoMSD 蛋白的三级结构主要类型是 α 螺旋和延伸链。



注：横轴表示氨基酸位置；蓝线表示 α 螺旋；红线表示延伸链；绿线表示 β 转角；紫线表示无规则卷曲；蛋白二级结构（左）和三级结构（右）
 Note: Horizontal axis indicated amino acid position; the blue part indicated α -helix; the red part indicated extended strand; the green part indicated β -turn; the purple indicated random coil; Protein secondary structure (left) and tertiary structure (right)

图3 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 蛋白结构预测

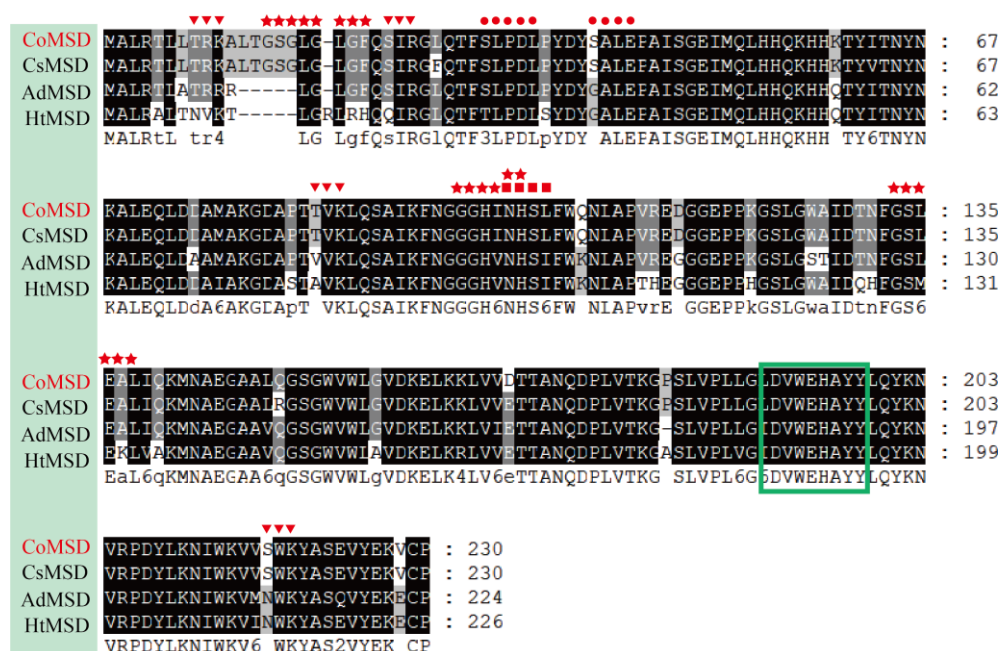
Fig.3 The structure prediction of CoCSD、CoFSD and CoMSD

2.5 油茶 SOD 蛋白的同源性分析与结构域分析

运用 BLASTp 程序搜索油茶 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 氨基酸序列的同源序列，发现与茶树的 CsCSD (*Camellia sinensis*, XP_028064147.1)、CsFSD (*Camellia sinensis*, AKN10569.1)和 CsMSD (*Camellia sinensis*, AKN10569.1)相似性最高，分别达到 98.58%、99.26%和 98.16%。将油茶 CoCSD 蛋白序列与茶树 CsCSD、苹果 MdCSD (*Malus domestica*)和银白杨 PaCSD (*Populus alba*)的同源蛋白氨基酸序列进行比对，发现它们均含有铜、锌超氧化物歧化酶(SOD)结构域和两个保守的 Cu^+ 、 Zn^+ 金属离子结合位点，说明油茶 CoCSD 蛋白序列属于 Cu/ZnSOD 亚家族基因的一员。将油茶 CoFSD 蛋白序列与茶树 CsFSD、胡桃 JrFSD (*Juglans regia*)和葡萄 VrFSD (*Vitis riparia*)的同源蛋白氨基酸序列进行比对，发现均含有 Fe^+ 金属离子结合位点，说明油茶 CoFSD 蛋白序列属于 FeSOD 亚家族基因的一员。将油茶 CoMSD 蛋白序列与茶树 CsMSD、猕猴桃 AdMSD

(*Actinidia deliciosa*)和菊芋 *HtMSD* (*Helianthus tuberosus*)的同源蛋白氨基酸序列进行比对, 发现含有超氧化物家族结构域(PLN02471 superfamily), 均含有 Mn^{+} 金属离子结合位点, 说明油茶的 *CoMSD* 蛋白序列属于 *MnSOD* 亚家族基因的一员。油茶 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 蛋白均具有激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和豆蔻酰化位点(图 4), 除此之外, *CoMSD* 蛋白还具有糖基化位点。

CoCSD	MQAPFATTMASTTTFSCAL---LYPIILLSNPKNPELRSSF---HGLSLKLTHTCSLSISANPK---PLSTVVVAAT : 67
CsCSD	-----VASHTTTFSCAL---LYPIILLSNPKTPELRSSF---HGLSLKLTHTCSLSISATPK---PLSAVVVAAT : 59
MdCSD	MQTTSAAV---MAAQVVAASPT---LFSQKYPNPRSIHTSSSF---HGVSLKLTALKSCSMFAAPK---PLT---VIAAT : 65
PaCSD	MQTAAM---PANAILTATPT---LHPILL---SPLPENNHSF---HGVSLKLTPTCSHSFSLAAKRLQPPF---VVAAS : 63
	a nA t 3 L p l L pp SSF HG6SLKL qS S S k P l V6AA3
CoCSD	KKAVAVLKGTSSVEGVVTLTQIDNGPTTVNVRVTGLTPGLIGFHLHEFGDTTNGCMSTGAHFNFNGMTHGAPEDKIRH : 145
CsCSD	KKAVAVLKGTSSVEGVVTLTQIDNGPTTVNVRVTGLTPGLIGFHLHEFGDTTNGCMSTGAHFNFNGMTHGAPEDKIRH : 137
MdCSD	KKAVAVLKGTSSVEGVVTLSCEDDGPPTTVNVRITGLTPGPIGFHLHEYGDTTNGCISTGAHFNEKQLTHGAPEDKIRH : 143
PaCSD	KKAVAVLKGTSSVEGVVTLSCEDDGPPTTVNVRITGLTPGPIGFHLHEFGDTTNGCMSTGAHFNEKQLTHGAPEDKIRH : 141
	KKAVAVLKGTSSVEGVVTL3Q D1GPTTVNVR6TGLTPGPIGFHLHE5GDTTNGC6STGAHFNP 6THGAPED IRH
CoCSD	AGDLGNIVANADGVAEATIVDNQIPLTGPNAVIGRALVVHELEDDLKGGGHELSTSGNAGGRIACGVVGLTPV : 219
CsCSD	AGDLGNIVANADGVAEATIVDNQIPLTGPNAVIGRALVVHELEDDLKGGGHELSTSGNAGGRIACGVVGLTPV : 211
MdCSD	AGDLGNIIANADGVAEATIVDNQIPLTGPNAIIGRALVVHELEDDLKGGGHELSTSGNAGGRIACGVVGLTPV : 217
PaCSD	AGDLGNIVANADGVAEATIVDSQIPLSGPNAVIGRALVVHELEDDLKGGGHELSTSGNAGGRIACGVVGLTPI : 215
	AGDLGNI6ANADGVAEATIVDnQIPL3GPNA6IGRALVVHELEDDLKGGGHEL513SGNAGGRIACGVVGLTP6
CoFSD	MGWSSSCCCNLFETSSSHILGARDLSKLLKNPKLPLRSQRQKREQHGTQKTEKVIAYHGLQKPPYKLDA : 68
CsFSD	MGWSSSCCCNLFETSSSHILGAGDLSKLLKNPKLPLRSQRQKREQHGTQKTEKVIAYHGLQKPPYKLDA : 68
JrFSD	MGS---FGYHTTFEASSHLL-VSDFSQGEKSPKLEYLSKQCEFWESRSQGASKVFIAYYGLRAPPYKLDA : 64
VrFSD	MGS---GCNNSFEASSHVL-LDLSQRWKCCKLQ---NLRHNGCEHGSQRASKVFIAYYGLRAPPYKLDA : 62
	MG cC n FP SSH6L DLS K PKLp s rqkr hg3Qk KV1A5 GL PPYKLDA
CoFSD	LEPYMSQRTLEMHWGEHHRILYVEGLNKQLEKNDILYGHMTDELVKVTYNNGNPLPEFNNAAQVWNHDF : 136
CsFSD	LEPYMSQRTLEMHWGEHHRILYVEGLNKQLEKNDILYGHMTDELVKVTYNNGNPLPEFNNAAQVWNHDF : 136
JrFSD	LEPYMSRRTLEKHWWGHHWNYVEGLNKQLEKNEVLYGCTMDELVKVTYNNGNPLPEFNNAAQVWNHDF : 132
VrFSD	LEPYMSRRTLEMHWGEHHRGYVEGLNKQLEKDDVLYGHTLDELVKVTYNNGNPLPEFNNAAQVWNHDF : 130
	LEPYMS RTLEmHWGEHHR YVEGLNKQLEK1d6LYGht6DELVKVTYNNGNPLPEFNNAAQVWNHDF
CoFSD	FWESMQPGGGNMEIMGLLQQIEKDFGSENNFKEKFIEAALTFLGSGWVWLVLKRSEKRIEIVVRTSNAV : 204
CsFSD	FWESMQPGGGNMEIMGLLQQIEKDFGSENNFKEKFIEAALTFLGSGWVWLVLKRSEKRIEIVVRTSNAV : 204
JrFSD	FWESMQPGGGDMKGLVLQIEKDFGSETNFEKFFVESALTFLGSGWVWLVLKRSEKRIEIVVRTSNAV : 200
VrFSD	FWESMQPGGGDMERLGLLEQIEKDFGSETNFEKFFLEAALTFLGSGWVWLVLKRSEKRIEIVVRTSNAV : 198
	FWESMQPGGG1MP 6G6L2QIEKDFGfSF NF4EKf6EaALTFLGSGWVWLVLKR E4rL V64TSNA6
CoFSD	SPLVWDDIPIISLDMWEHAYYLDYKNDKGRYVNVFMNHLVSWNAAMGRMARACAFVNLGEFKIPIA : 270
SoFSD	SPLVWDDIPIISLDMWEHAYYLDYKNDKGRYVNVFMNHLVSWNAAMGRMARACAFVNLGEFKIPIA : 270
JrFSD	CPLVWDDIPIISLDMWEHAYYLDYKNDRGKYVNVFMNHLVSWNVATGRMARAEAFVNLGEFKIPIA : 266
VrFSD	NPIVWDDIPIISLDVWEHAYYLDYKNDKGRYVNVFMNHLVSWNAAMGRMARAEAFVNLGEFKIPIA : 264
	P6VWDDIPIISLD6WEHAYYLDYKND4G4YvNVFMNHLVSWNaA gRMARA2AFVNLGEFKIPIA



注：红色字指示目的蛋白；▼表示蛋白激酶 C 磷酸化位点；●表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点；★表示豆蔻酰化位点；■表示糖基化位点
黄色方框表示 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 金属离子结合位点；蓝色方框表示 Fe^{3+} 金属离子结合位点；绿色方框表示 Mn^{2+} 金属离子结合位点

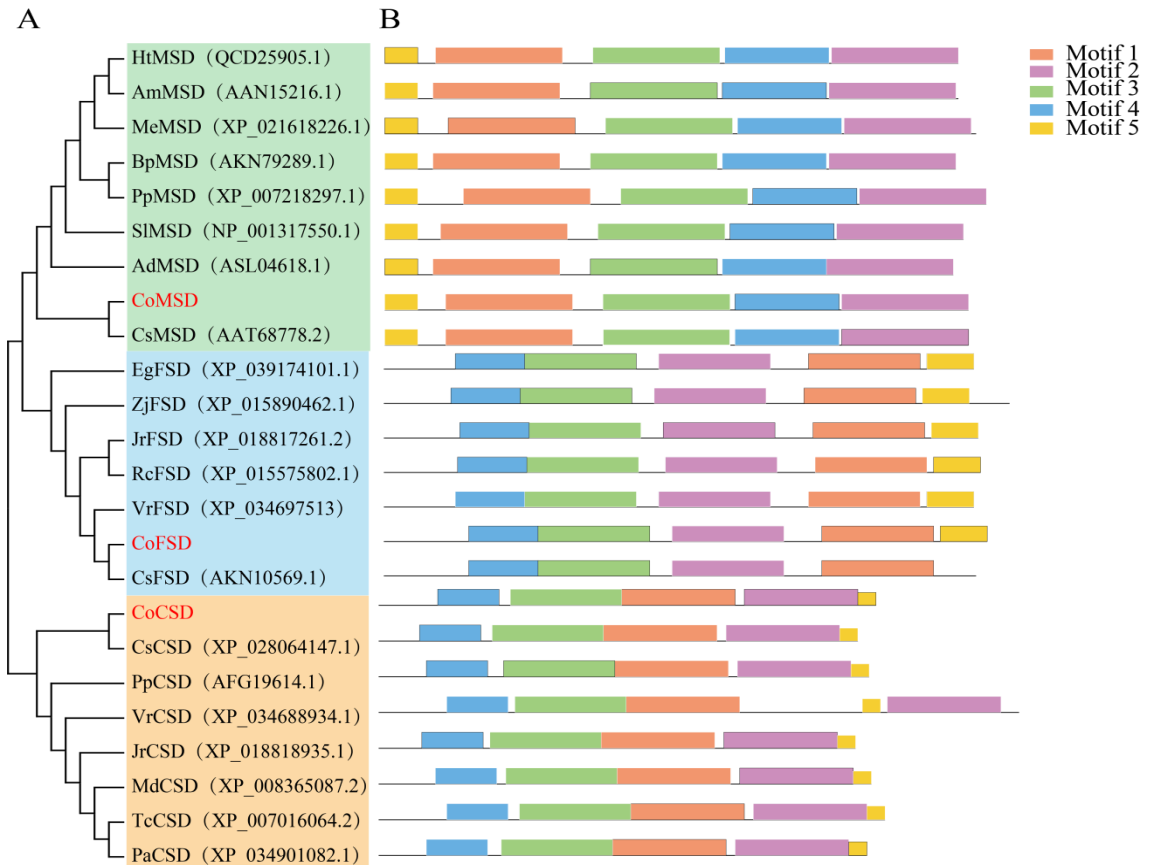
Note: Red letters indicate target protein; ▼ indicates protein kinase C phosphorylation site; ● indicates casein kinase II phosphorylation site; ★ indicates N-myristoylation site; ■ indicates N-glycosylation site
Yellow boxes indicate Cu^{+} , Zn^{+} metal ion binding sites; blue boxes indicate Fe^{+} metal ion binding sites; green boxes indicate Fe^{+} metal ion binding sites

图 4 SOD 蛋白与其他植物的氨基酸序列比对

Fig.4 Comparison of amino acid sequences of *C. oleifera*. SOD with other plants

2.6 油茶 SOD 蛋白的系统进化树

为了分析油茶 SOD 基因家族与其他植物 SOD 基因之间的关系，利用本地软件 MEGA 11.0 中的邻接法构建了油茶 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 蛋白序列与其他植物 SOD 蛋白序列的系统进化树(图 5)，结果显示 24 个蛋白被划分 3 个大枝，分别为 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD 和 Mn-SOD。油茶 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 分别与茶树 CsCSD、CsFSD 和 CsMSD 汇聚在一个小支上，说明油茶 SOD 蛋白与茶树 SOD 蛋白亲缘关系最近。使用 MEME 程序预测 SOD 蛋白的 motif，结果显示一共获得 5 个 motif(图 5-B)，而不同类型的 SOD 蛋白有相同的 motif 和排列方式，其中茶树 CsFSD 缺少 motif 5。



A: 油茶 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 系统蛋白进化树；B: 油茶 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 及同源蛋白保守基序分布；目标蛋白以红色字体显示
A: Protein evolutionary tree of *C. oleifera* CoCSD, CoFSD and CoMSD systems; B: Distribution of *C. oleifera* CoCSD, CoFSD and CoMSD and conserved motifs of homologous proteins; Target proteins are shown in red font

HtMSD: 菊芋 *Helianthus tuberosus*; AmMnSOD: 海欖雌 *Avicennia marina*; MeMSD: 木薯 *Manihot esculenta*; BpMSD: 白桦 *Betula platyphylla*; PpMSD: 桃 *Prunus persica*; SIMnSOD: 番茄 *Solanum lycopersicum*; AdMSD: 猕猴桃 *Actinidia deliciosa*; CsMSD 茶树 *Camellia sinensis*; EgFSD: 桉树 *Eucalyptus grandis*; ZjFSD: 枣 *Ziziphus jujuba*; JrFSD: 胡桃 *Juglans regia*; RcFSD: 蓖麻 *Ricinus communis*; VrFSD: 葡萄 *Vitis riparia*; CsFSD: 茶树 *Camellia sinensis*; CsCSD: 茶树 *Camellia sinensis*; PpCSD: 桃 *Prunus persica*; VrCSD: 葡萄 *Vitis riparia*; JrCSD: 胡桃 *Juglans regia*; MdCSD: 苹果 *Malus domestica*; TcCSD: 可可 *Theobroma cacao*; PaCSD: 银白杨 *Populus alba*

图 5 不同物种 CSD、FSD 和 MSD 及同源蛋白系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic tree of predicted CSD、FSD 和 MSD and other homologous proteins from various species

2.7 油茶 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 基因的表达模式分析

利用 qRT-PCR 分析 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 基因在不同授粉处理（自交和异交）雌蕊中的表达情况（图 6）。结果表明，*CoCSD* 基因的表达量在自交和异交授粉后的 0~24 h 都呈现显著下降的趋势；在 24~48 h 时异交雌蕊表达量明显上升，而自交雌蕊呈现先上升后下降的趋势，并在 48 h 时达到最低值；在 48~72 h 时则是自交雌蕊的表达量明显上升，而异交雌蕊呈现先下降后上升的趋势，在 60 h 时降到最低值；72~96 h 时异交雌蕊表现出大幅度下降后缓慢上升，自交雌蕊是一直下降。*CoFSD* 基因的表达量在自交和异交授粉 0~12 h 后表达显著下降，都在 12 h 达到最低值；在 12~60 h 时自、异交雌蕊表达量都是先上升后下降的趋势，但上升与下降的时间段不同，异交雌蕊表达量在 12~48 h 上升，48~60 h 时下降，而自交雌蕊表达量在 12~36 h 时上升，36~60 h 下降；在 60~96 h 自交雌蕊的表达量表现出大幅度上升后持续下降，异交雌蕊表达量呈现上调后大幅度下降紧接着缓慢上升。*CoMSD* 基因在 36~60 h 和 60~72 h 时自、异交雌蕊表达量都表

现出相似的下降和上升的趋势，且在 60 h 时都达到最低值。*CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 基因的表达模式分析结果显示 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 三者 在自交和异交授粉(0 h)相较于后期表达量均达到最高值，后期表达量受到抑制。三个基因表达量均随着授粉时间的推移存在一定的幅度变化，说明 *SOD* 基因参与自交和异交授粉的过程。

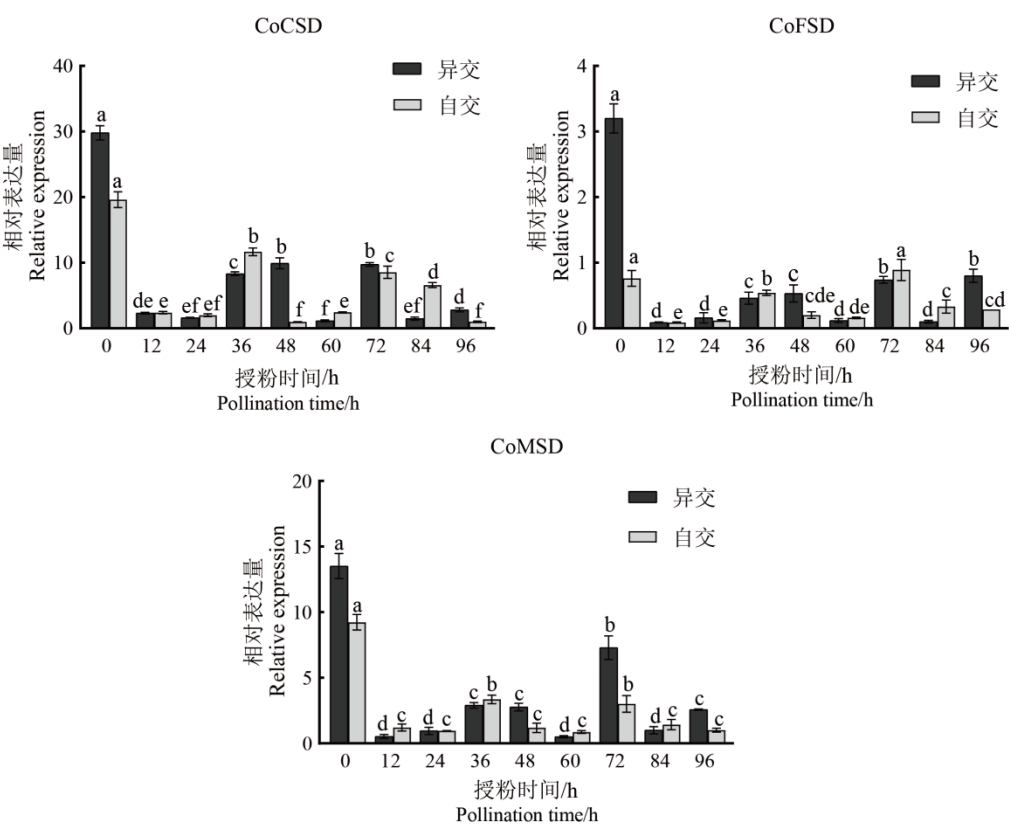


图 6 SOD 基因在自异交雌蕊中的表达模式($P<0.05$)

Fig.6 The expression pattern of SOD genes in self- and cross-pistil($P<0.05$)

3 讨论

自交不亲和性是一个复杂的过程，是阻止植物自我受精以维持和增加遗传变异性的机制之一。授粉时存在花粉与雌蕊间的相互作用和细胞与细胞间的识别系统，该过程涉及到多种基因的参与，使得体内产生一定的物质促进花粉管的萌发和生长，有利于完成授粉^[31]。已有研究表明，未授粉时，ROS 会在柱头中积累，当成熟柱头接触到花粉粒时，花粉管中 ROS 的增加抑制了花粉管的生长，活性氧含量降低，促进花粉萌发。在花粉管生长的过程中，花柱会维持低水平的活性氧，保证花粉管顺利生长^[32]。酶促抗氧化体系(如 SOD、CAT、POD)共同参与了花粉管—柱头互作机制，在清除 ROS 的过程中起着重要作用^[33]。Sharma 等人^[34]研究表明柱头发育过程中 ROS 的积累和 ROS 清除酶(SOD 和 POD)的活性之间存在明显的相关性，SOD 总活性增加，Mn-SOD(线粒体)和 Cu/Zn-SOD(细胞质)在柱头发育的阶段表现出差异表达。有学者在自交不亲和的芸芥^[21]、鸭梨^[23]和甘蓝^[24]品种研究上发现，自花授粉和异花授粉都使得 SOD 花柱活性有明显变化，其中鸭梨和甘蓝在异花授粉后 SOD 花柱活性均高于自花授粉。对油茶自交和异交授粉处理下雌蕊 SOD 酶

活性的测定结果显示,花柱中 SOD 酶活性在自交和异交授粉不同时间段内存在显著性差异,其中 SOD 酶活性在自交后的 48~96 h 均显著高于异交授粉,推测 SOD 保护酶通过调节柱头 ROS 水平,参与自交不亲和反应的保护机制,同时延缓细胞骨架的解聚进程。

通过克隆得到油茶 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 基因的 cDNA 序列,经生物信息学分析、多重比对和系统发育进化树分析发现:油茶 SOD 蛋白因结合不同的金属离子而划分为不同的种类,24 个蛋白被划分 3 个大支,分别为 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD 和 Mn-SOD 3 类蛋白分支,且 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 蛋白均与同为山茶科山茶属的 SOD 茶树蛋白汇聚在相同的小支上,与茶树的 SOD 蛋白序列亲缘关系最近,进一步证明克隆的 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 基因是 *Cu/Zn-SOD*、*Fe-SOD* 和 *Mn-SOD* 基因,属于 SOD 基因家族。*MSDs* 和 *FSDs* 在植物中是不同的,*MSDs* 与植物的 *FSDs* 具有 70% 的同源性,表明两个祖先基因起源于不同的地方^[35]。不同的非生物胁迫和不同的环境条件控制着植物中 SOD 基因的表达,导致 SOD 基因表达的差异^[36]。在逆境胁迫下小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因在根、茎、叶、雌蕊、雄蕊中均有表达^[37]。此外,有研究显示植物中不同的金属离子浓度能影响 SOD 的酶活性,在非生物胁迫下高浓度的 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 可使 SOD 酶活性增加^[38,39]。植物 SI 与植物免疫系统具有相同的代谢途径,植物 SI 对花粉管生长的抑制作用可被认为是应激反应^[40],由此推测 SOD 基因的表达可能会被 SI 反应所诱导。

对油茶雌蕊中 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 表达分析发现,在自交和异交授粉后 0 h 表达量均达到最高值,后期表达量显著下调。有研究表明油茶自交不亲和反应主要发生于花柱基部接近子房处,即油茶自交与异交授粉 40 h~48 h 期间,自交雌蕊部分花粉管到达花柱基部,且生长缓慢异常,而异交雌蕊能够继续生长并进入子房^[41]。本研究对油茶雌蕊中 *CoCSD*、*CoFeSD* 和 *CoMSD* 表达分析发现,在自异交授粉 36~48 h 内,自交雌蕊表达量均明显下降,而异交雌蕊的表达量均是上调状态。其中,在 48 h 时 *CoCSD*、*CoFeSD* 和 *CoMSD* 表达量均显示异交授粉高于自交授粉,而 SOD 酶活性在自交授粉后 48 h 达到峰值,随后呈现缓慢下降趋势。有研究显示植物不同发育阶段的酶活性与基因表达之间并无直接的相关性,可能的原因是植物 SOD 基因的表达调控包括转录调控、转录后水平调控和翻译调控,导致从基因表达到酶活性中间有很多过程,如 SOD 基因的 mRNA 在翻译成蛋白的过程中有 microRNA 调节、蛋白质受到翻译后修饰以及 SOD 酶的活性表现等^[42]。根据 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 基因自异交表达量的变化推测 *CoCSD*、*CoFSD* 和 *CoMSD* 基因可能参与了油茶自交不亲和分子机制,后续将进一步对 SOD 基因家族在油茶自交不亲和中的作用进行深入研究,旨在为全面解析油茶自交不亲和生理响应机制提供研究基础。

参考文献

- [1] 庄瑞林. 中国油茶. 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2008:3
Zhuang R L. China *camellia*. 2nd edn. Beijing: China Forestry Publishing House, 2008: 3
- [2] 高超,袁德义,杨亚,王碧芳,刘冬明,邹锋,谭晓风. 油茶自交不亲和性的解剖特征. 林业科学, 2015, 51(2):60-68.
Gao C, Yuan D Y, Yang Y, Wang B F, Lui D M, Zhou F, Tan X F. Anatomical Characteristics of Self-Incompatibility in *Camellia oleifera*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51 (2):60-68.
- [3] 廖婷. 油茶自交不亲和性初步研究. 长沙: 中南林业科技大学, 2013
Liao T. Study on self-incompatibility of *Camellia oleifera*. Changsha: Central South University of Forestry Science and Technology, 2013.
- [4] 刘素玲,赵国建,吴欣,张百行,高岭巍,丁美玲,陈威. 植物自交不亲和机制研究进展. 中国农业科技导报, 2016, 18 (4):31-37.

- Liu SL, Zhao GJ, Wu X, Zhang B X, Gao L W, Ding ML, Chen W. Research progress on plant self-incompatibility mechanism. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(4):31-37
- [5] 胡彬,蒋建雄,易自力. 植物配子体自交不亲和和机制研究进展. 中国农学通报, 2012, 28 (18): 168-173
Hu B ,Jiang J X ,Yi Z L . Advances in studies on the mechanism of plant gametophyte self-incompatibility. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28 (18): 168-173
- [6] Wang C L, Xu G H, Jiang X T, Chen, G., Wu, J., Wu, H. Q. Zhang, S L. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* in vitro. The Plant Journal, 2009, 57 (2):220-229
- [7] Chen J, Wang P, DeGraaf B H J, Zhang, H., Jiao, H., Tang, C., Zhang S, Wu, J. Phosphatidic acid counteracts S-RNase signaling in pollen by stabilizing the actin cytoskeleton. The Plant Cell, 2018, 30 (5):1023-1039
- [8] Wang C L, Zhang S L. A cascade signal pathway occurs in self-incompatibility of *Pyrus pyrifolia*. Plant signaling & behavior, 2011, 6 (3):420-421
- [9] Del Duca S, Aloisi I, Parrotta L, Cai, G. Cytoskeleton, transglutaminase and gametophytic self-incompatibility in the Malinae (Rosaceae). International journal of molecular sciences, 2019, 20(1): 209
- [10] Sewelam N, Kazan K, Schenk P M. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:187
- [11] Gupta S, Dong Y, Dijkwel P P, Mueller-Roeber B, Gechev, T S. Genome-Wide Analysis of ROS Antioxidant Genes in Resurrection Species Suggest an Involvement of Distinct ROS Detoxification Systems during Desiccation. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 (12):3101
- [12] Xu X, Yu Z, Kong J, Yi M J, Huan C, Jiang L. Molecular Cloning and Expression Analysis of Cu/Zn SOD Gene from *Gynura bicolor* DC. Journal of Chemistry, 2017, 2017
- [13] 董亮,何永志,王远亮,董志扬.超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展.中国农业科技导报, 2013, 15 (5):53-58
Dong L, He YZ, Wang YL, Dong Z Y. Research progress in the application of superoxide dismutase (SOD). Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, 15(5): 53-58
- [14] 马伟荣,童军茂,单春会.超氧化物歧化酶(SOD)的特征及在植物抗逆性方面的研究进展. 食品工业, 2013, 34(9): 154-158
Ma W R, Tong J M, Shan C H. Characteristics of superoxide dismutase (SOD) and its research progress in plant stress resistance. The food industry, 2013, 34 (9):154-158
- [15] Abreu I A, Cabelli D E. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. Biochimica et biophysica acts-proteins and proteomics, 2010, 1804(2): 263-274.
- [16] Zelko I N, Mariani T J, Folz R J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.Free Radical Biology and Medicine, 2002, 33 (3):337-349
- [17] 冯新.香蕉 SOD 基因家族的全基因组鉴定及功能分析. 福州: 福建农林大学, 2016
Feng X. Genome-wide identification and functional analysis of SOD gene family in *Banana* . Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016
- [18] Allen R D, Webb R P, Schake S A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 23 (3):473-479.
- [19] 郭栋,张艳阳,杜娟,周宝元,高卓晗,赵明,袁卉馥.油菜超氧化物歧化酶基因家族生物信息学分析.分子植物育种, 2020, 18 (2):367-373
Guo D, Zhang Y Y, Du M, Zhou B Y, Gao Z H, Zhao M, Yuan H F. Bioinformatics analysis of superoxide dismutase gene family in *Brassica napus*. Molecular plant breeding, 2020, 18 (2):367-373
- [20] Rizhsky L, Liang H, Mittler R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (40):38921-38925.
- [21] 王保成,孙万仓,范惠玲,孟亚雄,马静芳,叶剑,刘雅丽,邵登魁,燕妮,朱惠霞,武军艳,曾军,张亚宏.芸芥自交亲和系与自交不亲和系 SOD、POD 和 CAT 酶活性.中国油料作物学报, 2006 (2):162-165+171.
Wang B C ,Sun W C ,Fan H L Meng Y X, Ma J F, Ye J, Lui Y L, Shao D K, Yan N, Zhu H X, Wu J Y, Zeng J, Zhang Y H. Physiological and biochemical characteristics of self-compatible and self-incompatible lines in *Brassica oleracea*. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2006 (2):162-165+171
- [22] 张雪梅,李保国,赵志磊,郭素萍,齐国辉.苹果自花授粉花粉管生长和花柱保护酶活性与内源激素含量的关系[J].林业科学,2009, 45 (11):20-25.
Zhang X M, Li B G, Zhao Z L, Guo S P, Qi G H. Relationship between compatibility of self-pollination and changes in protecting enzyme and hormone in different apple cultivars. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45 (11):20-25
- [23] 齐国辉 鸭梨自交不亲和与亲和变异的生理生化特性及分子机理研究. 河北: 河北农业大学, 2005
Qi GH. Physiological and biochemical characteristics, molecular mechanism of Self incompatibility *Yali Pear* and its self-compatible mutations . Hebei: Agricultural University of Hebei, 2005
- [24] 吴能表,徐光德,唐于婷,朱利泉,王小佳.自交不亲和甘蓝的花粉萌发与花柱内保护酶活性变化[J].西南师范大学学报(自然科学版), 2004 (5):848-851.
Wu N B, Xu G D, Tang Y T, Zhu L Q, Wang X J. Pollen germination and change of protective enzyme activity in Style of Self-Incompatible *Brassica oleracea* L. J Southwest Chin Normal Univ (Nat Sci Ed), 2004 (5):848-851
- [25] 谭晓风,袁德义,袁军,邹锋,谢鹏,苏勇,杨定桃,彭建桃.大果油茶良种 ‘华硕’ .林业科学, 2011, 47 (12):184+209
Tan X F, Yuan D Y, Yuan J, Zhou F, Xie Y, Yang D T, Peng J T. An elite variety: *Camellia oleifera* ‘Huashuo’. Scientia Silvae Sinicae, 2011, 47 (12):184+209
- [26] 谭晓风,袁德义,邹锋,袁军,谢鹏,苏勇,王渊,杨定桃,彭建桃.油茶良种 ‘华鑫’ .林业科学,2012,48(03):170-171

- Tan X F, Yuan D Y, Zou F, Yuan J, Xie Y, Wang Y, Yang D T, Peng J T. An elite variety of oiltea: *Camellia oleifera* 'Huaxin'. *Scientia Silvae Sinicae*, 2011, 47 (12):184+209
- [27] 周俊琴,卢梦琪,余姝姝,刘懿瑶,杨进,谭晓风.油茶 *ETR* 基因鉴定及其在不同授粉处理下的表达分析.植物生理学报, 2020, 56 (4):721-733
- Zhou J Q, Lu M Q, Yu S S, Lui Y Y, Yang J, Tan X F. Identification and expression analysis of *ETR* genes under different pollination treatments in *Camellia oleifera*. *Plant Physiology Journal*. 2020, 56 (4):721-733
- [28] Zhou J Q, Lu M Q, Yu S S, Yang J, Tan X F. In-depth understanding of *Camellia oleifera* self-incompatibility by comparative transcriptome, proteome and metabolome. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(5): 1600
- [29] Zeng Y, Tan X, Zhang L, Long H., Wang B, Li Z, Yuan Z. A fructose-1, 6-biphosphate aldolase gene from *Camellia oleifera*: molecular characterization and impact on salt stress tolerance. *Molecular breeding*, 2015, 35 (1):1-12.
- [30] Livak KJ, Schmittgen TD . Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25 (4):402–408
- [31] McCubbin A G, Kao T H. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual review of cell and developmental biology*, 2000, 16 (1):333-364
- [32] McInnis S M, Desikan R, Hancock J T, Hiscock S J. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk?. *New Phytologist*, 2006, 172 (2):221-228
- [33] Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 2002, 53 (372):1331-1341.
- [34] Sharma B, Bhatla S C . Accumulation and scavenging of reactive oxygen species and nitric oxide correlate with stigma maturation and pollen-stigma interaction in sunflower. *Acta physiologiae plantarum*, 2013, 35 (9):2777-2787
- [35] Miller A F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters*, 2012, 586 (5):585-595
- [36] Zhang J, Chen T, Wang J, Chen, Q, Luo, Y, Zhang, Y, Wang X R. Genetic diversity and population structure in cherry (*Cerasus pseudocerasus* (Lindl). G. Don) along Longmenshan Fault Zones in China with newly developed SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 2016, 212:11-19
- [37] 王鹏,段文静,王玉昆,白建芳,苑国良,苑少华,权威,张立平,赵昌平.小麦光温敏雄性不育系 BS366 铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆及表达分析. 植物遗传资源学报, 2017,18 (5):939-951.
- Wang P, Duan W J, Wang Y K, Bai J F, Yuan G L, Yuan S H, Zhang L P, Zhao C P. Cloning and Expression Analysis of a Cupro-Zinc Superoxide Dismutase Gene from Wheat Photo-thermosensitive Genic Male Sterile Line BS366. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017,18 (5):939-951.
- [38] 殷恒霞,李霞,米琴,王文颖,张文胜,徐进.镉、锌、铜胁迫对向日葵早期幼苗生长的影响.植物遗传资源学报, 2009,10 (2):290-294+299.
- Yin H X, Li X, Mi Q, Wang W Y, Zhang W S, Xu J. Effects of Cadmium, Zinc and Copper -induced Stresses on the Early Seedling Growth of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2009,10 (2):290-294+299.
- [39] 李涛,高俊杰,于贤昌.高浓度 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 营养液对冷胁迫黄瓜幼苗叶片 SOD 活性的影响.西北农业学报, 2009,18 (3):192-195.
- Li T, Gao J J, Yu X C. Effects of High Concentrations of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} in Nutrient Solution on SOD Activity in Cucumber Seedling Leaves under Chilling Stress. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009,18 (3):192-195.
- [40] Nasrallah J B. Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility: comparisons to animal histocompatibility. *TRENDS in Immunology*, 2005, 26 (8): 412-418.
- [41] 高超. 油茶后期自交不亲和性的细胞学研究. 长沙: 中南林业科技大学, 2017
- Gao C. Cytological study on late self-incompatibility of *Camellia oleifera* . Changsha: Central South University of Forestry Science and Technology, 2017
- [42] 王梦馨,吴国火,崔林,韩宝瑜.茶树花 *Cu/Zn-SOD* 酶活性及其基因表达分析. 热带作物学报,2020,41 (6):1167-1173.
- Wang M X, Wu G H, Cui L, Han B Y. Enzyme Activity Characteristics and Expression of *Cu/Zn-SOD* Gene in Tea Flowers. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41 (6):1167-1173.