

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

(中南林业科技大学林学院/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、31.18 和 25.51 kDa, 结构分析发现 3 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。3 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 3 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* 基因的生物学功能提供依据, 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* Abel

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

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

Abstract: In order to investigate the role of superoxide dismutase (SOD) gene family members in the self-incompatibility response of *Camellia oleifera* Abel, 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, 31.18 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

收稿日期: 2022-07-17 修回日期: 2022-08-16 网络出版日期: 2022-09-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220717002>

第一作者研究方向为经济林栽培育种, E-mail: wangyiyi99@qq.com

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

基金项目: 国家自然科学基金(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(湘人办发[2022]9号)

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 (Xiang ren cai fa [2022]No.9)

inhibited by both self and cross-pollination treatments. The results of this study provide a basis for the subsequent in-depth investigation of the biological functions of *C. oleifera* Abel SOD genes, and also provide a reference for revealing the mechanism of self-incompatibility in *C. oleifera* Abel.

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

油茶(*Camellia oleifera* Abel)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)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衰退,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进入花粉管后引发一系列自交不亲和反应,部分酶活性发生了改变,同时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^[7-9]。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, superoxide dismutase)是植物酶促防御系统的关键酶之一,与过氧化物酶(POD, peroxidase)和过氧化氢酶(CAT, catalase)具有协同作用^[12]。

超氧化物歧化酶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花柱SOD酶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amp;方法

1.1 试验材料

以8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 试验方法

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。

SOD总活性(U/g·FW)=(对照OD值-样品OD值)×V总/(Vt×FW)

其中V总:提取液总体积;Vt:反应体系中的酶粗提液体积;FW:样品鲜重。

1.2.2 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)试剂盒说明书合成cDNA第一链。

1.2.3 油茶SOD基因的克隆 植物SOD基因主要分为Cu/Zn-SOD、Fe-SOD和Mn-SOD 3种类型,试验中CoCSD、CoFSD和CoMSD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聚合酶扩增相应基因。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® 5 α 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。

1.2.4 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。

1.2.5 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,利用SPSS 25.0软件的邓肯分析进行表达量差异分析。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

正向引物 Forward primer	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	反向引物 Reverse primer	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')
CoCSD-F	ATGCAAGCCCCATTGCAACA	CoCSD-R	TTAAACTGGAGTCAAACCCACCAC
CoFSD-F	ATGGGTTGGTCATCCTCTTGTG	CoFSD-R	TCAAGCAATAGGAATTTGGGTTTCG
CoMSD-F	ATGGCTCTTCGACTCTGTTGA	CoMSD-R	TCAAGGCATACCTTTTCATACAC
CoCSD-QF	CTCCGCTCTTCCTTCCA	CoCSD-QR	GGGTTACAACGCCTTCG
CoFSD-QF	ATGGGTCTTCTTCAGCA	CoFSD-QR	CTTCAAGTCGTTTCTCAC
CoMSD-QF	GAAGCATTGATACAGAAGA	CoMSD-QR	AAGCCAAGCAGAGGAAC

表2 本研究使用的在线网站

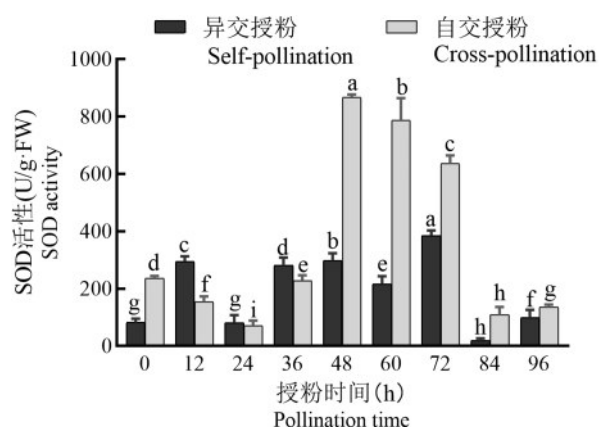
Table 2 Online website used in this study

网站 Web	网址链接 Web link	功能 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.PHYRE2ProteinFoldRecognitionServer/	预测蛋白三级结构
MEME	https://meme-suite.org/meme/tools/meme	预测蛋白motif结构

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, 24~96 h 整体呈现先上升后下降的趋势, 72 h 异交雌蕊中 SOD 酶活性达到最高值, 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。自交授粉后 24 h 内, SOD 酶活性呈直线下下降的趋势, 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。



图中小写字母表示不同时期的显著性差异 ($P < 0.05$)

Lowercase letters in the graph indicate significant differences between periods ($P < 0.05$)

图 1 自异交授粉雌蕊内 SOD 酶活性的变化

Fig.1 Changes of SOD enzyme activity in self-pollination and cross-pollination pistil

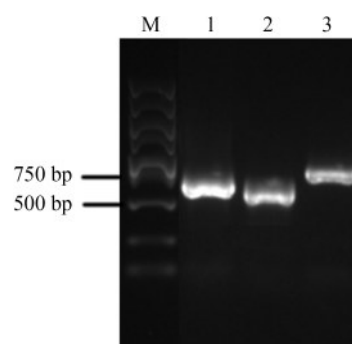
2.2 油茶 SOD 基因家族的克隆

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。测序结果与转录组数据库中序列一致, 可用于后续生物信息学研究。

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, 其中 *CoCSD* 等电点 (pI) 小于 7, 呈酸性, 其余均大于 7, 呈碱性。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 3 个蛋白的平均亲疏水性为 -0.004、-0.465 和 -0.283 均为负值, 表明都是亲水性蛋白。



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* Abel

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 3), 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* 蛋白定位于叶绿体上, *CoFSD* 和 *CoMSD* 蛋白定位于线粒体中。

表3 油茶SOD蛋白的磷酸化位点预测

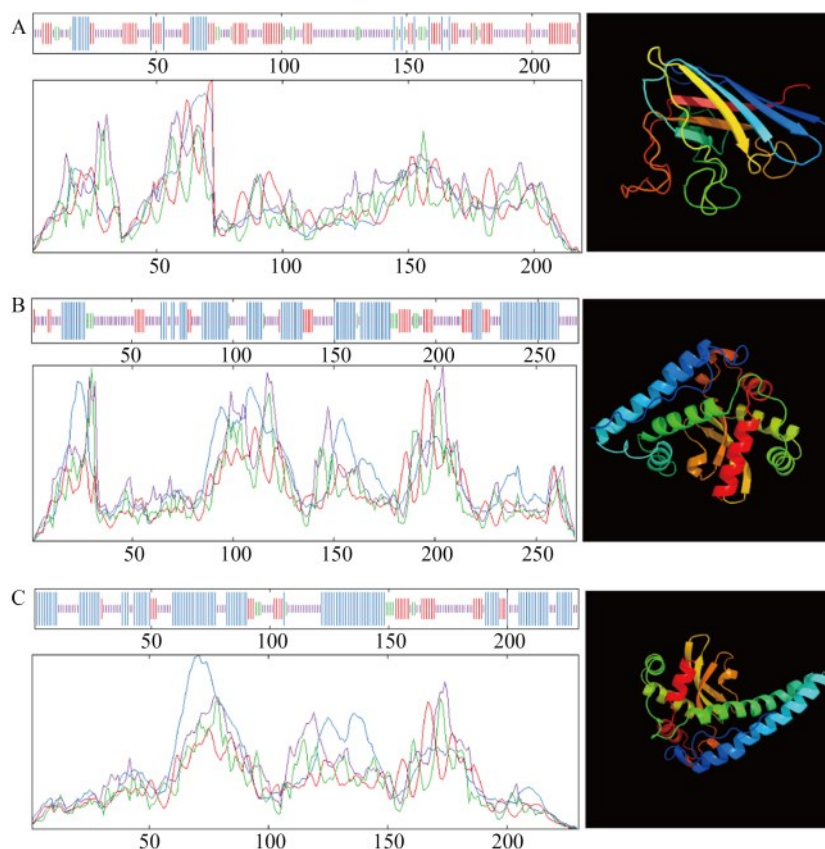
Table 3 Prediction of phosphorylation sites of SOD protein in *C. oleifera*.

蛋白名称 Protein Name	总位点数 Total no.	丝氨酸 Ser		苏氨酸 Thr		酪氨酸 Tyr	
		数量 No.	位点 Site	数量 No.	位点 Site	数量 No.	位点 Site
CoCSD	21	10	17,27,37,42,49,51,53,78,124,199	11	8,13,61,67,77,87,95,104,163,172,217	0	—
CoFSD	21	11	4,25,37,74,140,163,191,201,205,216,245	4	47,50,107,177	6	56,64,116,225,228,235
CoMSD	21	10	15,31,40,90,103,123,134,152,183,217	6	5,8,61,84,85,130	5	37,62,197,201,225

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, CoCSD 蛋白的三级结构主要类型为无规则卷曲和延伸链, CoFSD 蛋白的三级结构主要类型为 α 螺旋和无规则卷曲, CoMSD 蛋白的三级结构主要类型为 α 螺旋和延伸链(图3)。



A: CoCSD 蛋白结构; B: CoFSD 蛋白结构; C: CoMSD 蛋白结构; 蛋白二级结构(左)和三级结构(右); 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

A: The structure of CoCSD protein; B: The structure of CoFSD protein; C: The structure of CoMSD protein; Protein secondary structure (left) and tertiary structure (right); The blue part indicated α -helix; The red part indicated extended strand; The green part indicated β -turn; The purple indicated random coil

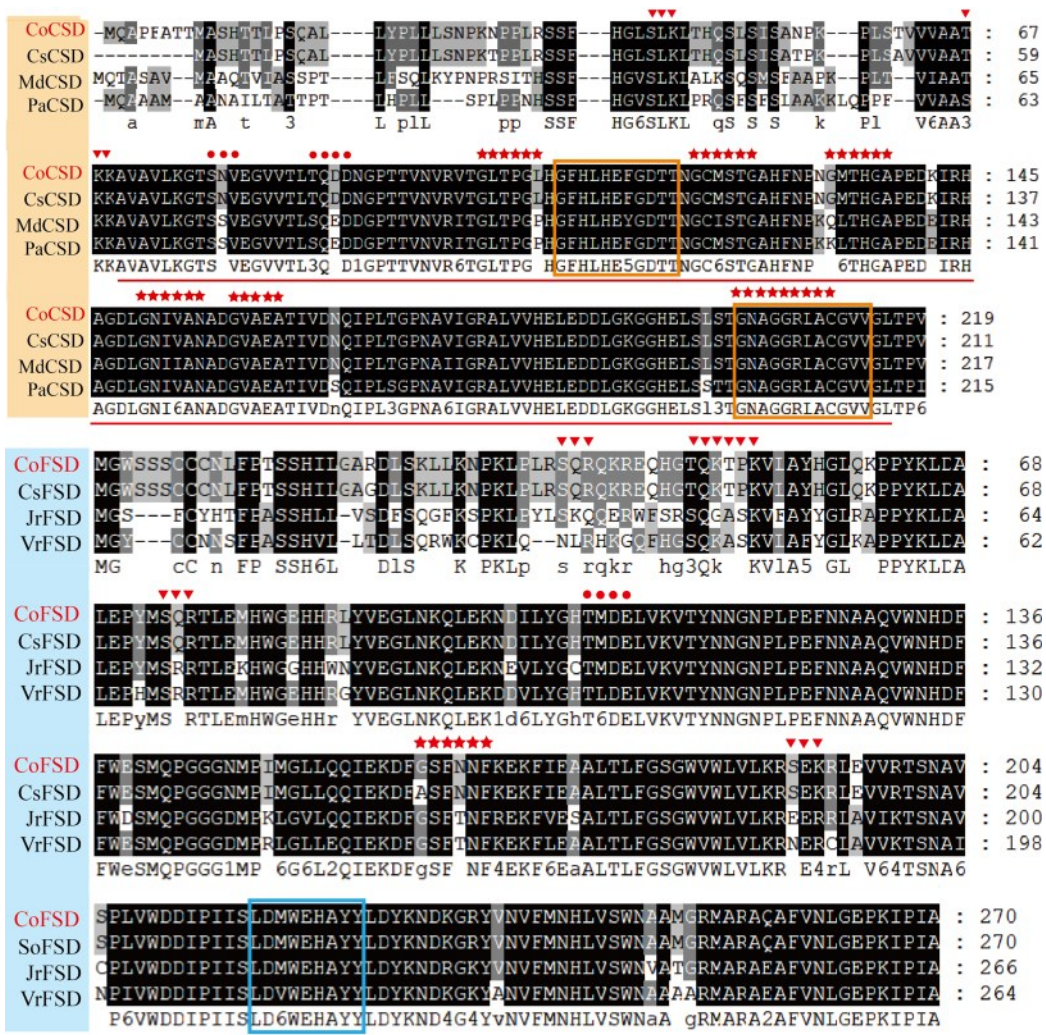
图3 CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 蛋白结构预测

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

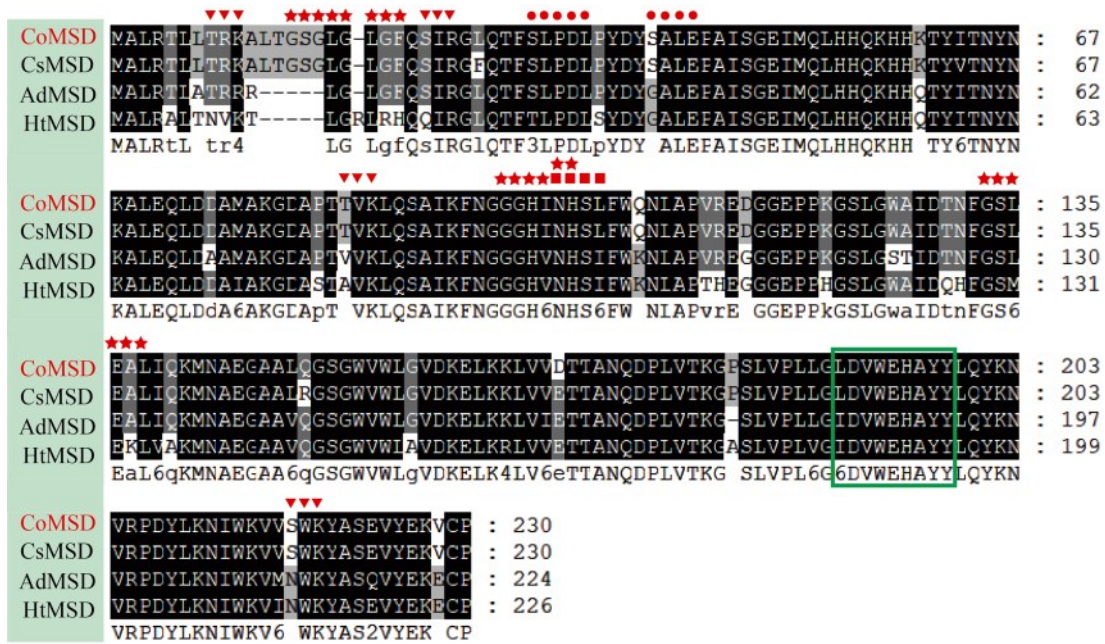
2.6 油茶 SOD 蛋白的同源性分析与结构域分析

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* (L.) Kuntze, XP_028064147.1)、CsFSD (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, AKN10569.1) 和 CsMSD (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, 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* (Suckow) Borkh.) 和银白杨 PaCSD (*Populus alba* L.) 的同源蛋白氨基酸序列进行比对, 发现相似度达到 81.42% 以上。CDD 数据库分析 CoCSD 蛋白的保守结构发现含有铜、锌超氧化物歧化酶(SOD)结构域, 位于第 69~216 位氨基酸, 和两个保守的 Cu²⁺、Zn²⁺ 金属离子结合位点, 分别位于第 109~119 位氨基酸和第 203~214 位氨基酸, 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* L.) 和葡萄 VrFSD (*Vitis riparia* Michx.) 的同源蛋白氨基酸序列进行比对, 发现相似度达到 77.64% 以上。CDD 数据库分析 CoFSD 蛋白的保守结构发现含有 Fe³⁺ 金属离子结合位点, 位于第 218~225 位氨基酸, 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* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson) 和菊芋 HtMSD (*Helianthus tuberosus* L.) 的同源蛋白氨基酸序列进行比对, 发现相似度达到 84.83%, CDD 数据库分析 CoMSD 蛋白的保守结构发现含有 Mn²⁺ 金属离子结合位点, 位于第 191~198 位氨基酸, 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。



(图 4)



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Cu²⁺、Zn²⁺金属离子结合位点;蓝色方框表示Fe³⁺金属离子结合位点;绿色方框表示Mn²⁺金属离子结合位点;红色直线表示铜、锌超氧化物歧化酶结构域;Cs:茶树;Md:苹果;Pa:银白杨;Jr:胡桃;Vr:葡萄;Ad:猕猴桃;Ht:菊芋;下同

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 Cu²⁺, Zn²⁺ metal ion binding sites; Blue boxes indicate Fe³⁺ metal ion binding sites; Green boxes indicate Mn²⁺ metal ion binding sites; Red lines indicate copper and zinc superoxide dismutase structural domains; Cs: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze; Md: *Malus domestica* (Suckow) Borkh.; Pa: *Populus alba* L.; Jr: *Juglans regia* L.; Vr: *Vitis riparia* Michx.; Ad: *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson; Ht: *Helianthus tuberosus* L.; The same as below

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* Abel SOD with other plants

2.7 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个蛋白被划分为3个大支,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,不同类型的SOD蛋白motif排列方式不一样(图5B)。在MSD类蛋白中具有相同的motif基序类型和排列方式,而在FSD类蛋白中,茶树CsFSD缺少motif 5,在CSD类蛋白中,葡萄VrCSD的motif 2和motif 5的位置与其他CSD不一样。

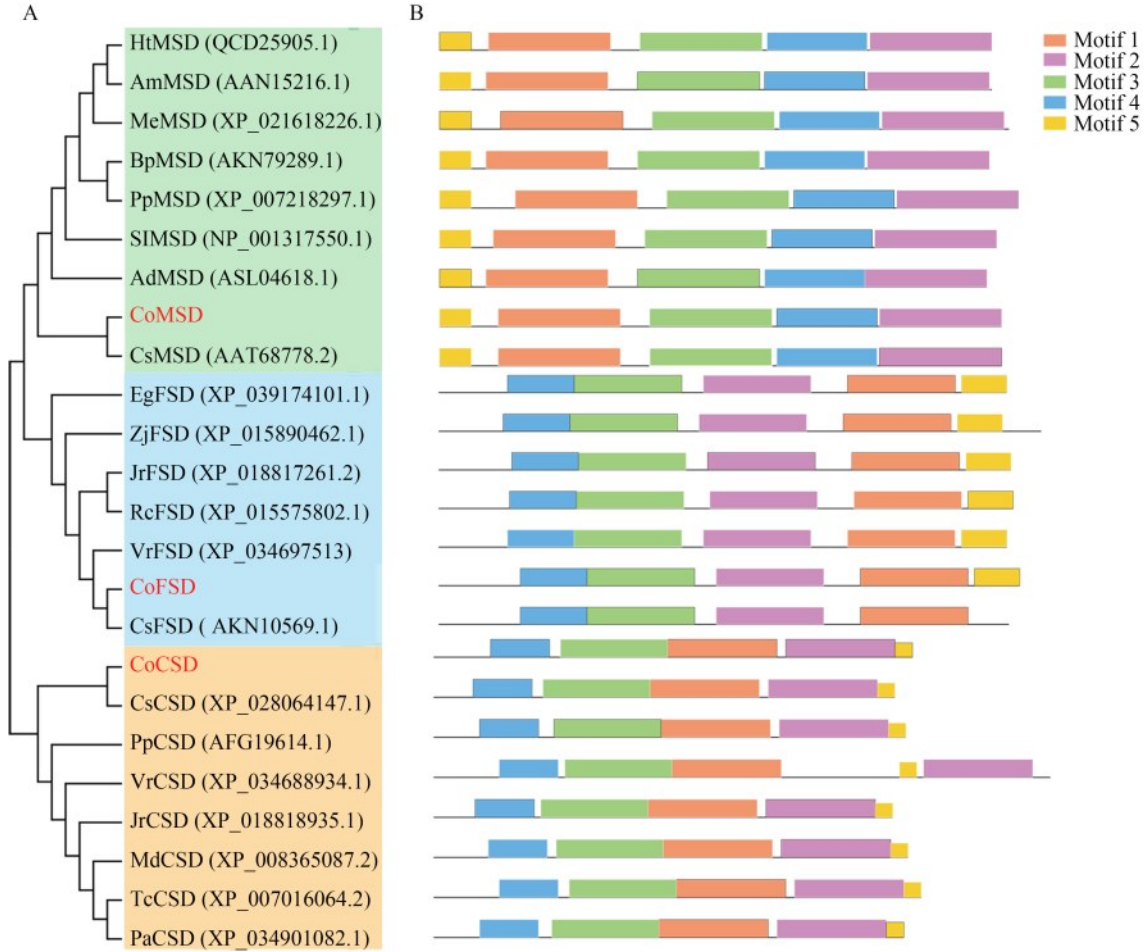
2.8 油茶CoCSD、CoFSD和CoMSD基因的表达模式分析

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,自交雌蕊则是一直下降。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,相较于后期表达量,CoCSD、CoFSD 和 CoMSD 三者在自交和异交授粉 0 h 均达到最高值,

后期表达量受到抑制。3 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。



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; Am: 海榄雌; Me: 木薯; Bp: 白桦; Pp: 桃; Sl: 番茄; Eg: 桉树; Zj: 枣; Rc: 蓖麻; Tc: 可可

A: Protein evolutionary tree of *C. oleifera* Abel CoCSD, CoFSD and CoMSD systems; B: Distribution of *C. oleifera* Abel CoCSD, CoFSD and CoMSD and conserved motifs of homologous proteins; Target proteins are shown in red font; Am: *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh; Me: *Manihot esculenta* Crantz; Bp: *Betula platyphylla* Sukaczew; Pp: *Prunus persica* (L.) Batsch; Sl: *Solanum lycopersicum* L.; Eg: *Eucalyptus grandis* W. Mill ex Maiden; Zj: *Ziziphus jujube* Mill.; Rc: *Ricinus communis* L.; Tc: *Theobroma cacao* L.

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

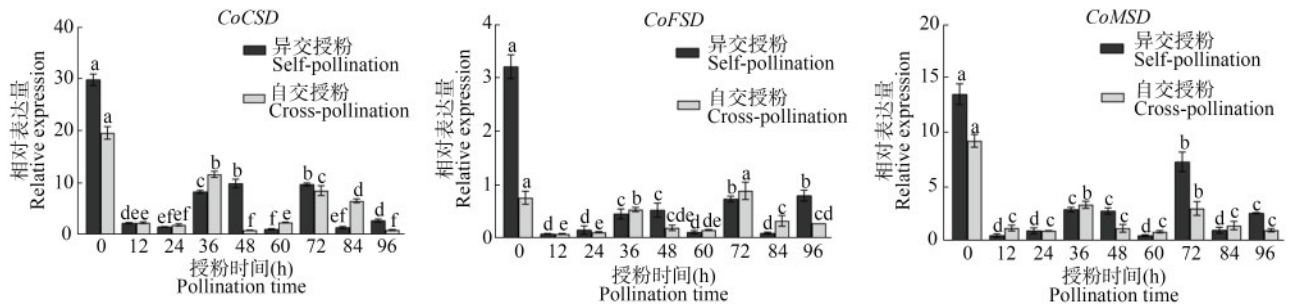


图6 SOD 基因在自异交雌蕊中的表达模式

Fig.6 The expression pattern of SOD genes in self-and cross-pistil

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]。未授粉的被子植物柱头中ROS会大量积累,在授粉后其含量会降低,并维持在一个低水平状态,从而促进花粉萌发和花粉管生长^[32]。而在自交不亲和植物中,授粉后柱头ROS含量反而增加,抑制花粉萌发和花粉管生长^[33]。其中酶促抗氧化体系(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^[34]。Sharma等^[35]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花柱SOD酶活性有明显变化,其中鸭梨和甘蓝在异花授粉后花柱SOD酶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,雌蕊中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(除84 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,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*FSDs*具有70%的同源性,表明两个祖先基因起源于不同的地方^[36]。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^[37]。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^[38]。此外,有研究显示植物中不同的金属离子浓度能影响SOD酶活性,在非生物胁迫下高浓度的Mn²⁺、Cu²⁺或Zn²⁺可使SOD酶活性增加^[39-40]。植物SI与植物免疫系统具有相同的代谢途径,SI对花粉管生长的抑制作用可被认为是应激反应^[41],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40~48 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^[42]。本研究对油茶雌蕊中*CoCSD*、*CoFSD*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*、*CoFSD*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^[43]。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,期望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. 植物自交不亲和和机制研究进展. 中国农业科技导报, 2016, 18 (4):31-37
Liu S L, Zhao G J, Wu X, Zhang B X, Gao L W, Ding M L, 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 Q, Wang P, DeGraaf B H J, Zhang H, Jiao H J, Tang C, Zhang S L, Wu J Y. 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 N, 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, <https://doi.org/10.1155/2017/5987096>
- [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 Y Z, Wang Y L, 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 Acta-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, 杜媚, 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, Liu 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. 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. 保定: 河北农业大学, 2005
Qi G H. Physiological and biochemical characteristics, molecular mechanism of Self incompatibility *Yali Pear* and its self-compatible mutations. Baoding: 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. 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. Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition, 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, Su yong, 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(3):170-171
Tan X F, Yuan D Y, Zou F, Yuan J, Xie Y, Su yong, Wang Y, Yang D T, Peng J T. An elite variety of oiltea: *Camellia oleifera* ‘Huaxin’. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48 (3): 170-171
- [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, Liu 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 K J, Schmittgen T D. 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] Zhang L L, Huang J B, Su S Q, Wei X C, Yang L, Zhao H H, Yu J Q, Wang J, Hui J Y, Hao S Y, Song S S, Cao Y Y, Wang M S, Zhang X W, Zhao Y Y, Wang Z Y, Zeng W Q, Wu M H, Yuan Y X, Zhang S X, Cheung A Y, Duan Q H. FERONIA receptor kinase-regulated reactive oxygen species mediate self-incompatibility in *Brassica rapa*. Current Biology, 2021, 31 (14):3004-3016
- [34] 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
- [35] 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
- [36] Miller A F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. FEBS Letters, 2012, 586 (5):585-595
- [37] 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
- [38] 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, Quan wei, 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
- [39] 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
- [40] 李涛,高俊杰,于贤昌.高浓度Mn²⁺、Cu²⁺或Zn²⁺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 Cu²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ in nutrient solution on SOD activity in cucumber seedling leaves under chilling stress. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2009, 18 (3):192-195
- [41] Nasrallah J B. Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility: Comparisons to animal histocompatibility. Trends in Immunology, 2005, 26 (8): 412-418
- [42] 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
- [43] 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