

# 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

王 鹏<sup>1,3,4</sup>, 段文静<sup>2,3,4</sup>, 王玉昆<sup>3,4</sup>, 白建芳<sup>3,4</sup>, 苑国良<sup>3,4</sup>, 苑少华<sup>3,4</sup>, 权 威<sup>3,4</sup>, 张立平<sup>3,4</sup>, 赵昌平<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; <sup>2</sup>首都师范大学生命科学学院, 北京 100048;

<sup>3</sup>北京市农林科学院杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097; <sup>4</sup>杂交小麦分子遗传北京市重点实验室, 北京 100097)

**摘要:**超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)是植物中一种主要的抗氧化酶,在植物应对逆境胁迫及抗衰老中起重要作用。本研究从基因芯片数据中筛选获得小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的 EST 序列,通过序列比对后拼接得到小麦 *Cu/Zn-SOD* 的候选基因,利用 PCR 技术在小麦光温敏雄性不育材料 BS366 中克隆并获得该基因。通过对 *Cu/Zn-SOD* 基因序列进行生物信息学分析,结果表明,该基因拥有连续且完整的开放阅读框,长 495bp,编码 164 个氨基酸。氨基酸序列分析发现,该蛋白具有保守的 Cu/Zn-SOD 功能结构域与典型的 Cu/Zn-SOD 三维结构,且定位于细胞质中。通过同源进化分析表明,该蛋白与二穗短柄草(*Brachypodium distachyon* (L.) Beauv.) 和大麦(*Hordeum vulgare* L.) 的 Cu/Zn-SOD 蛋白亲缘关系较近,相似度分别为 89% 和 94%。利用实时荧光定量 PCR 技术对其在小麦不同组织的表达特异性及不同逆境胁迫下的表达模式进行分析,结果表明,该基因在根、茎、叶、雌蕊、雄蕊、颖壳中均有表达,属于组成型表达,且在小麦的地上部含叶绿体的组织中含量较高;同时受多种胁迫诱导,可能参与了多种胁迫诱导调控途径。通过对该基因在不同育性环境中 BS366 育性转换期花药中的表达模式分析,发现可育环境下,在小孢子母细胞时期和减数分裂期的表达量分别约为对照的 8 倍与 16 倍;而不育环境下,该基因表达水平无明显变化。因而推测,小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因可能参与了光温敏雄性不育系 BS366 的育性调控。本研究为深入研究 *Cu/Zn-SOD* 基因在小麦中的作用机理奠定了重要基础。

**关键词:**小麦;铜锌超氧化物歧化酶;亚细胞定位;逆境胁迫;雄性不育;实时荧光定量 PCR

## Cloning and Expression Analysis of a Cupro-Zinc Superoxide Dismutase Gene from Wheat Photo-thermosensitive Genic Male Sterile Line BS366

WANG Peng<sup>1,3,4</sup>, DUAN Wen-jing<sup>2,3,4</sup>, WANG Yu-kun<sup>3,4</sup>, BAI Jian-fang<sup>3,4</sup>, YUAN Guo-liang<sup>3,4</sup>,

YUAN Shao-hua<sup>3,4</sup>, QUAN Wei<sup>3,4</sup>, ZHANG Li-ping<sup>3,4</sup>, ZHAO Chang-ping<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206; <sup>2</sup>College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048; <sup>3</sup>Beijing Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100097; <sup>4</sup>The Municipal Key Laboratory of Molecular Genetic of Hybrid Wheat, Beijing 100097)

**Abstract:** Reactive oxygen species (ROS) including superoxideradicals ( $O_2^-$ ), hydroxylradicals ( $OH^\cdot$ ) and hydrogenperoxide ( $H_2O_2$ ), were known to damage the survival of plants, by inactivation of lipid, nucleic acids and protein. In addition, during times of environmental stress (e. g., UV or heat exposure), ROS levels can increase dramatically. Thus, it is important and positive to remove the excess ROS from plants for maintaining normal metabolic

收稿日期:2017-01-02 修回日期:2017-03-02 网络出版日期:2017-05-03

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170503.1114.002.html>

**基金项目:**国家科技支撑计划项目(2013BAD04B01, 2014BAD01B09);国家自然科学基金(31371699);北京市自然科学基金项目(5131001);北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20140405);北京市农林科学院青年基金(QNJJ201427);北京市科技计划项目(Z141100002314018)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: 931874319@qq.com

通信作者:张立平,研究方向为分子遗传育种。E-mail: lpzhang8@126.com

赵昌平,研究方向为作物遗传育种。E-mail: cp\_zhao@vip.sohu.com

functions of plants. Superoxide dismutase (SOD) is a major antioxidant enzymes, which is important for plants to cope with adversity stress and anti-aging effect. In other words, SOD could act on ROS and reduce the level of ROS, to protect the plant from excessive ROS harm. Wheat is one of the most important food crops in the world. The yield and quality are strongly affected by harsh external environmental conditions. Therefore, it is important to avoid the violation of ROS for improving wheat yield. In this study, a cDNA of *Cu/Zn-SOD* gene defining by the EST sequence assembly from microarray data, was cloned from the wheat photo-thermosensitive male sterile (PTGMS) line BS366. The results showed that the fragment of 495 bp had one continuous and complete open reading frame (ORF), which encoded a 164-amino-acid polypeptide. Amino acid sequence analysis revealed that there were a typical *Cu/Zn-SOD* gene family functional domain and 3 dimensional structures. Besides, the *Cu/Zn-SOD* protein was located in the cytoplasm by subcellular localization analysis. Meanwhile, evolution and clustering analysis showed that the *Cu/Zn-SOD* protein of wheat shared 89% and 94% sequence similarities with the *Cu/Zn-SOD* protein of *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. and *Hordeum vulgare* L., respectively. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to analyze the expression patterns in wheat different tissues and abiotic stresses conditions. The results showed that the *Cu/Zn-SOD* gene was expressed in all tested tissues (root, stem, leaf, pistil, stamen and glume), suggesting that the *Cu/Zn-SOD* gene was constitutive expression in BS366. The significantly high expression level was found in chlorenchyma such as leaf, stem and glume. In addition, it was found that the gene expression was induced by variety of stresses, revealing that the wheat *Cu/Zn-SOD* gene might involve in multiple stress regulation pathway. To illuminate the regulation of *Cu/Zn-SOD* in wheat fertility, expression profile of *Cu/Zn-SOD* in pollen during fertility transformation in wheat PTGMS line BS366 was performed. The results showed that the relative expression of *Cu/Zn-SOD* at microsporocyte stage and meiosis stage in fertile environment were 8 times and 16 times higher than control, respectively, while there was no significant changes in sterility environment, suggesting that *Cu/Zn-SOD* might be involved in the regulation of fertility transformation in wheat PTGMS line BS366. That because low temperature may contribute to inhibit of *Cu/Zn-SOD* gene expression, resulting in removal of ROS untimely. As a result, microspore cellular structure was damaged. It may also because no nutrients to be provided from microspore cells, resulted in abnormal apoptosis of tapetal cells. However, the relationship between *Cu/Zn-SOD* gene and tapetal cells is need to be further researched. This study could lay a foundation for further functional study of *Cu/Zn-SOD* gene in wheat.

**Key words:** wheat; cupro-zinc superoxide dismutase; subcellular localization; adversity stress; male sterile; quantitative real-time PCR

在植物中, 活性超氧化物 (ROS, reactive oxygen species) 包括超氧阴离子 ( $O_2^-$ , superoxideradicals), 羟自由基 ( $OH^\cdot$ , hydroxylradicals) 和过氧化氢 ( $H_2O_2$ , hydrogenperoxide) 等, 可以使脂质、核酸和蛋白质失活, 导致细胞膜脂过氧化、碱基突变等不良后果, 进而影响植物生理代谢活动<sup>[1]</sup>, 在正常生理生化或受逆境胁迫条件下均可产生<sup>[2]</sup>。清除植物体内多余的 ROS 对于维持植物正常代谢功能具有正面、积极的作用。超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase, ECL. 15. 1. 1) 是一类广泛存在于植物体内的重要的抗氧化酶<sup>[3]</sup>, 可保护植物免受过量 ROS 的损伤。它可以通过歧化作用将 ROS 催化生成氧分子和过氧化氢:  $O_2^- + O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ , 过氧化氢又能在过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 的作

用下分解为水<sup>[4]</sup>, 从而高效无害地清除掉植物体内多余的 ROS。SOD 根据其所结合金属辅基的不同可分为 *Cu/Zn-SOD*、*Fe-SOD* 和 *Mn-SOD* 三类<sup>[5]</sup>。其中 *Cu/Zn-SOD* 广泛存在于植物各组织中, 且含量最为丰富, 在植物保护酶系中尤为重要, 与植物应对逆境胁迫与衰老关系密切<sup>[6-7]</sup>。

自 R. E. Cannon 等<sup>[8]</sup>于 1987 年从玉米中首次克隆得到植物 SOD 基因, 迄今国内外学者分别在烟草<sup>[9]</sup>、水稻<sup>[10]</sup>、拟南芥<sup>[11]</sup>、大麦<sup>[12]</sup>等植物中克隆得到 SOD 基因。E. E. Kurama 等<sup>[13]</sup>通过对甘蔗 EST 序列的生物信息学分析与实时荧光定量 PCR 分析, 获得 *Mn-SOD* 基因的启动子和 6 个 *Cu/Zn-SOD* 的 EST。D. Juan 等<sup>[14]</sup>在玉米中过表达外源 SOD 基因, 发现转基因株系抗氧化损伤能力显著提高。胡根海

等<sup>[15]</sup>利用 RACE 技术克隆得到棉花 *Cu/Zn-SOD* 基因,并对其进行表达谱分析及酶活性分析,发现该基因主要在棉花苗期的根和叶中表达,同时发现该基因在盛花期的酶活性最高。

小麦是重要的粮食作物,提高其产量对于粮食安全稳定具有重要意义。近年来,涉及小麦 *SOD* 的研究报道已有不少。张海娜等<sup>[16]</sup>于转基因烟草植株中过表达小麦 *SOD* 基因,发现转基因植株的 *SOD* 活性明显提高,其抵御盐胁迫的能力显著增强。E. Esfandiari 等<sup>[17]</sup>的研究表明,小麦幼苗中 *SOD* 的活性随着盐胁迫浓度的升高而升高,同时发现,抗氧化酶系能够有效缓解过氧化程度。另外发现光温敏型雄性不育小麦可育与不育植株花药在不同时期的 *SOD* 活性和花药中过氧化程度有显著区别,不育花药的 *SOD* 活性在其育性敏感时期较之可育花药有明显的下调趋势,且不育花药的过氧化程度极显著高于可育花药<sup>[18]</sup>,表明 *SOD* 的活性可能影响花药育性。Q. S. Ba 等<sup>[19]</sup>发现小麦经化学杀雄后花粉囊中  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  的含量高于正常情况,同时 *SOD* 等抗氧化酶活性降低,认为这可能是引起花粉败育的原因。

尽管涉及小麦 *SOD* 的研究已取得了较大进展,但多局限于生理生化的相关研究,对于其分子水平的研究相对滞后。基于本实验室前期的基因芯片数据<sup>[20]</sup>,从小麦光温敏雄性不育系 BS366 中克隆并获得 *Cu/Zn-SOD* 基因,通过生物信息学手段分析该基因核酸及蛋白序列特征,阐述其分子结构及生物学功能,并运用实时荧光定量 PCR 技术研究其在小麦不同组织间的特异性表达情况及不同胁迫处理情况下的表达模式,分析在 BS366 不同育性环境下的不同发育时期内,该基因在花药中的表达差异情况。初步探讨 *SOD* 与小麦光温敏雄性不育的关系,以期为进一步研究 *Cu/Zn-SOD* 基因在小麦中的作用机理奠定基础,为进一步丰富小麦 *SOD* 基因研究内容提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

本研究以小麦光温敏雄性不育系 BS366(北京杂交小麦工程技术研究中心提供)为供试材料。该材料是由京农 8121 × E8075-7 杂交后花药培养的 DH(doubled haploid)群体中选育获得的。正常光照条件下,BS366 育性转换临界温度为 10 ℃,表现为完全雄性不育,而在平均温度 20 ℃下,BS366 育性

正常。BS366 的育性转换时期为小孢子母细胞时期至减数分裂时期。

### 1.2 处理方法

选取饱满、大小一致的 BS366 种子,经消毒、杀菌后,在 20 ℃、光周期 12 h/12 h 的条件下水培(培养皿)生长 2 周,①取幼苗叶片组织于 -80 ℃保存,用于克隆 *Cu/Zn-SOD* 基因。②按照王玉昆等<sup>[21]</sup>的方法,向叶片表面喷洒水杨酸(2 mmol/L SA)、赤霉素(50 mmol/L GA)、茉莉酸甲酯(100 mmol/L MeJA)、生长素(2 mmol/L IAA)和脱落酸(2 mmol/L ABA),以及模拟高盐(200 mmol/L NaCl)、干旱(20% PEG6000)、低温(10 ℃)等非生物胁迫。处理 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 后对幼苗叶片组织分别进行取材,每组取 3 个生物学重复, -80 ℃保存。用于研究 *Cu/Zn-SOD* 基因在不同胁迫下的表达模式。

将 BS366 种植于北京试验田,采取普通田间管理,待材料自然春化、返青后,培养至抽穗期。分别取其根、茎、叶、雌蕊、雄蕊及颖壳等组织于 -80 ℃保存,每个组织取 3 个生物学重复,用于分析 *Cu/Zn-SOD* 基因在小麦 BS366 不同组织中的特异性表达情况。

将 BS366 种植于北京(116°17'E、39°57'N)与安徽阜阳(115°81'E、32°89'N)大田环境下,普通田间管理,待材料自然春化。根据叶龄和雄蕊长度确定 BS366 的育性敏感时期,当麦苗 5.5 叶龄,雄蕊长度约 1.5 mm 时,为 BS366 的育性敏感时期<sup>[20-22]</sup>。此时北京平均温度约 20 ℃,即 BS366 生长的可育环境;阜阳平均温度约 10 ℃,即不育环境。于两地分别选取药隔形成期、小孢子母细胞时期和减数分裂时期长势相同的小麦植株 50 株以上,剥离花药,混合取样。用于分析 *Cu/Zn-SOD* 基因在 BS366 的可育环境与不育环境下,育性敏感时期花药中的差异性表达。

### 1.3 总 RNA 提取及反转录

利用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen)提取上述所取材料的总 RNA,并参照 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)操作说明反转录 cDNA,cDNA 终浓度稀释为 100 ng/μL,置于 -20 ℃冰箱保存备用。

### 1.4 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的克隆

从基因芯片数据筛选得到小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的 EST 序列,将其提交到普通小麦 EST 库中进行比对,得到小麦同源基因的表达序列,比对结果利用 Cap3 拼接软件(<http://doua.prabi.fr/software/cap3>)拼接 EST 序列片段,将拼接结果通过 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>)确定编码序列的完整性,从而确定 *Cu/Zn-SOD* 候选基因。利



用 Primer Premier 5.0 软件设计 *Cu/Zn-SOD* 基因编码区的特异性 PCR 引物, *Cu/Zn-SOD-F*: 5'-ATGGCAGG-GAAACCCGTTA-3'; *Cu/Zn-SOD-R*: 5'-TTAAACAG-CAGGCTGAATTCC-3'。

以培养 2 周的小麦幼苗叶片 cDNA 为模板, 利用 *Cu/Zn-SOD-F* 和 *Cu/Zn-SOD-R* 特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增体系 (20  $\mu$ L): 2  $\times$  EasyTaq Super Mix (全式金公司) 10  $\mu$ L, 正反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 模板 cDNA (100 ng/L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 36 cycles; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 参考 E. Z. N. A. Gel Extraction Kit (OMEGA) 操作流程回收目的条带, 按照 Lethal Based Fast Cloning Kit (天根生化科技有限公司) 说明书连接 pLB-simple Vector 载体, 构建克隆载体, 并转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 菌落 PCR 筛选阳性菌株, 并由华大基因测序 (北京), 最终确定该基因核酸序列。

## 1.5 生物信息学分析

### 1.5.1 小麦 *Cu/Zn-SOD* 氨基酸序列信息分析

利用 DNAMAN (ver. 6.0) 软件确定上述序列的阅读框 (ORF), 并完成翻译; 利用 ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白理化性质分析; 应用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白跨膜区段; 采用 SignalP 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽序列预测; 使用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 进行在线亲疏水性分析; 运用 ExPASy 工具中的 SOPMA (<http://www.expasy.org/>) 预测蛋白质二级结构; 利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对蛋白三级结构进行预测; 通过 NCBI 在线 CDS 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi/>) 及 InterPro 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 预测其保守结构域; 使用 NCBI 在线 BLAST 搜索引擎 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) 进行同源性分析; 应用 DNAMAN (ver. 6.0) 软件进行多序列比对并将比对结果提交至 MEME 在线工具 (<http://meme-suite.org/>) 分析蛋白保守 Motif, 其中最大发现数目设置为 4, Motif 长度设置为 20 ~ 50 aa, 其余参数均为默认值; 利用 MEGA 5.2 软件, 采取 Neighbor-joining 算法构建系统进化树。

### 1.5.2 数据来源及小麦 *Cu/Zn-SOD* 同源基因筛查

小麦全基因组序列、编码区 (CDS) 序列及蛋白

序列收集于 Phytozome10.3 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)。大麦 (*Hordeum vulgare* L., BAJ88982.1)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) Beauv., XP\_003558478.1)、水稻 (*Oryza sativa* L., XP\_015631402.1)、谷子 (*Setaria italica* (L.) Beauv., XP\_004985172.1)、玉米 (*Zea mays* L., NP\_001149119.1)、高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench., XP\_002465634.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., AAC24833.1) 的 *Cu/Zn-SOD* 序列信息来自 GenBank 数据库。利用 BLAST 程序, 以确定的小麦 *Cu/Zn-SOD* 的核酸序列和蛋白序列为目的序列, 从中筛选同源基因, 其中 E-value  $\leq 0.05$ 。通过 NCBI 中的 CDD (conserved domain database) 数据库和 SMART 在线结构域筛查工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行去冗余处理, 剔除不含 SOD 保守结构域和重复的蛋白序列, 从而确定小麦 *Cu/Zn-SOD* 的同源基因。

**1.5.3 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因启动子区顺式作用元件预测** 本研究参考小麦 *Cu/Zn-SOD* 的 CDS 序列及基因组序列, 截取起始密码子上游 2 kb 的基因组序列作为该基因的启动子序列。利用 Plant CARE 在线工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对该序列进行启动子区顺式作用元件预测分析。

## 1.6 亚细胞定位载体的构建

根据所获得的小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的 cDNA 序列, 设计带有酶切位点的特异引物, SL-F: 5'-GCGTTCGACATGGCAGGGAAACCCGTTAGC-3' (下划线部分为 *SalI* 的酶切位点) 和 SL-R: 5'-GCTCTA-GAAACAGCAGGCTGAATTCCAATGATA-3' (下划线部分为 *XbaI* 的酶切位点), 以 1.4 中所构建的克隆载体为模板, 扩增带有酶切位点的小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的完整编码区, 并纯化回收该扩增产物。

利用限制性内切酶 *SalI* 和 *XbaI* 酶切植物亚细胞定位载体 16318hGFP vector, 该载体带有绿色荧光蛋白基因 (GFP, green fluorescence protein) 和带有上述酶切位点的 *Cu/Zn-SOD* 基因的扩增产物, 将目的片段连接到载体上, 构建亚细胞定位载体 *Cu/Zn-SOD-GFP*, 并转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 筛选鉴定阳性菌株, 按照 EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) 操作步骤提取质粒。

## 1.7 拟南芥原生质体的制备与亚细胞定位观察

按照 S. Abel 等<sup>[23]</sup> 的方法制备拟南芥原生质体。将 16318hGFP 空载体和构建的 *Cu/Zn-SOD-*



GFP 载体分别与原生质体按体积比 1:10 的比例混合,25 ℃ 孵育 24 h,使载体转入原生质体细胞中。以转入 16318hGFP 空载体的原生质体为对照,分别在荧光显微镜下观察<sup>[24]</sup>。

1.8 qRT-PCR 分析

根据所确定的小麦 *Cu/Zn-SOD* 同源基因的 cDNA 序列,利用保守区段设计 qRT-PCR 引物(F:5'-CCAACGGCTGCAACTCCA-3'; R: 5'-ACAACAAC-TGCCCTTCCCAAT-3'),扩增片段长 196 bp,以 1.2 中获得的 cDNA 为模板,小麦 *β-actin* 基因(F:5'-TACTCCCTCACAACAACCG-3'; R: 5'-AGAACCTC-CACTGAGAACAA-3')为内参进行 qRT-PCR 分析。反应体系(10 μL):SYBR premix EX Taq (2 × )(Takara)5 μL,正反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,模板 cDNA(100 ng/L)1 μL,ddH<sub>2</sub>O 3 μL。反应采用两步法扩增程序进行:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s,45 cycles;95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 1 min,95 ℃ 变性 15 s。每个样品设 3 次重复。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行计算分析<sup>[25]</sup>。

2 结果与分析

2.1 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的克隆

以提取的小麦幼苗叶片组织的 cDNA 为模板,利用小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因 CDS 序列引物 *Cu/Zn-SOD-F* 和 *Cu/Zn-SOD-R* 进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到一条约 500 bp 的特异性条带,如图 1A 所示。回收纯化该片段,经测序后分析表明,片段长 495 bp,包含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,是一个连续且完整的开放

阅读框(ORF),共编码 164 个氨基酸。

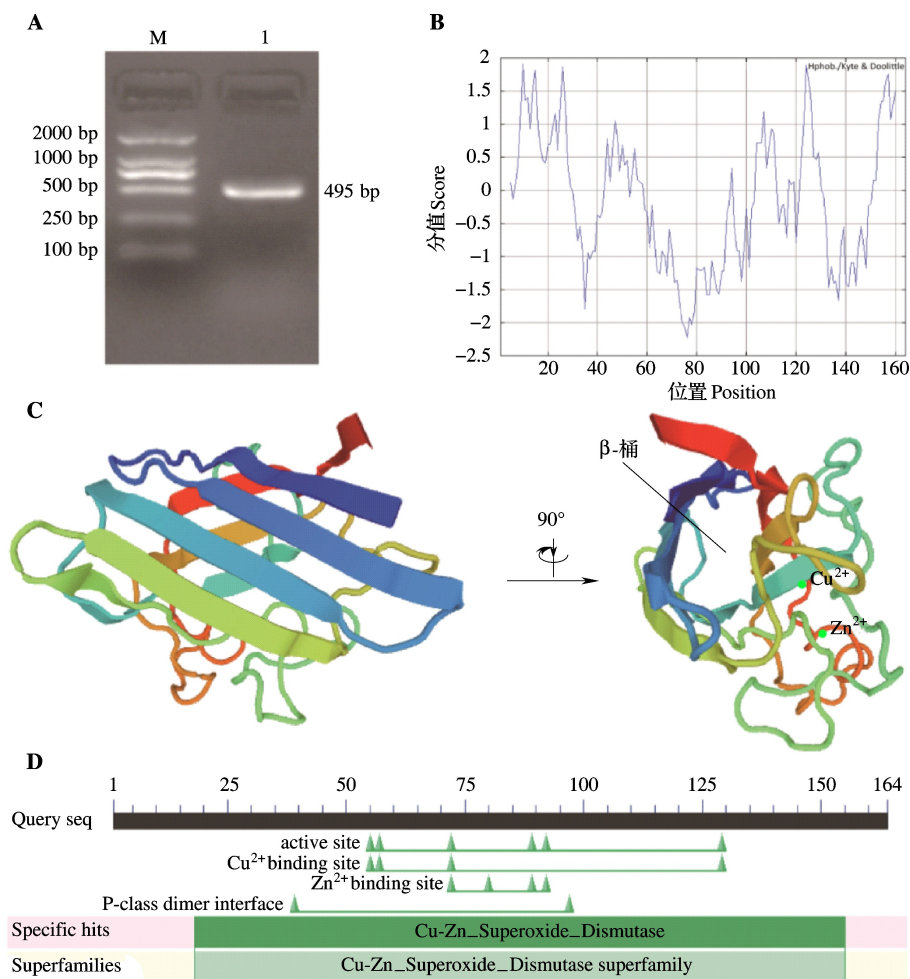
2.2 氨基酸序列特性分析

对小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因所编码蛋白的理化性质分析,结果显示(表 1),其分子式为 C<sub>727</sub>H<sub>1144</sub>N<sub>220</sub>O<sub>225</sub>S<sub>3</sub>,由 20 种氨基酸组成,其中 Ala 与 Gly 含量最高,分别为 10.4% 和 16.5%,酸性氨基酸(Asp 和 Glu)占 9.1%,碱性氨基酸(Arg 和 Lys)占 7.3%。该蛋白相对分子质量为 16.66 kD,理论等电点为 6.39,预测不稳定系数为 24.91,属于一个稳定蛋白(稳定系数 >40 时即为不稳定蛋白)。通过蛋白质跨膜区段预测与 N-末端信号肽分析,发现此酶蛋白无跨膜结构,且不含信号肽序列,推测该酶蛋白是位于细胞质当中的非分泌蛋白。亲疏水性分析结果如图 1B 所示,蛋白总平均疏水指数为 -0.112,为亲水性蛋白。其中亲水性最高的是组氨酸(His),疏水性最高的是甘氨酸(Gly)。蛋白二级结构预测显示,该蛋白由 20.73% 的 α-螺旋、10.98% 的 β-折叠、25% 的延伸链和 43.29% 的无规则卷曲组成。三级结构预测结果显示,可清晰看到该蛋白由 8 股反平行的 β-折叠围成的筒状结构和较多的无规则卷曲,在其筒状结构之外包含 1 个铜原子和 1 个锌原子,前者参与电子传递,后者与保持酶活性中心构象有关(图 1C)。通过对该酶蛋白的保守结构域与功能位点进行分析,发现第 55、57、72、129 位为 Cu 离子结合位点,第 72、80、89、92 位为 Zn 离子结合位点,酶活性位点位于第 55、57、72、89、92、129 位,此外第 39、97 位还拥有 2 个二聚体结合位点,表明该酶蛋白属于铜锌超氧化物歧化酶家族,是组成全酶的一个亚基(图 1D)。

表 1 *Cu/Zn-SOD* 蛋白的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of *Cu/Zn-SOD* proteins

序列编号 Sequence ID	分子式 Formula	蛋白长度(aa) Protein	分子量(kD) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index	疏水性平均值 Grand average of hydropathicity
TaCu/Zn-SOD	C <sub>727</sub> H <sub>1144</sub> N <sub>220</sub> O <sub>225</sub> S <sub>3</sub>	164	16.66	6.39	24.91	-0.112
Traes_4AS_8AC85AB54.2	C <sub>968</sub> H <sub>1526</sub> N <sub>298</sub> O <sub>296</sub> S <sub>4</sub>	212	22.20	8.81	26.24	-0.302
Traes_4BL_F765C4AA5.1	C <sub>759</sub> H <sub>1174</sub> N <sub>222</sub> O <sub>229</sub> S <sub>3</sub>	163	17.17	6.43	22.88	-0.221
Traes_4DL_08EEED1A6.1	C <sub>683</sub> H <sub>1062</sub> N <sub>200</sub> O <sub>212</sub> S <sub>3</sub>	151	15.63	5.85	29.65	-0.132
BAJ88982.1	C <sub>837</sub> H <sub>1318</sub> N <sub>246</sub> O <sub>255</sub> S <sub>4</sub>	184	19.05	6.86	34.75	-0.107
XP_003558478.1	C <sub>714</sub> H <sub>1135</sub> N <sub>221</sub> O <sub>226</sub> S <sub>3</sub>	164	16.53	6.38	24.21	-0.140
XP_015631402.1	C <sub>714</sub> H <sub>1129</sub> N <sub>223</sub> O <sub>224</sub> S <sub>3</sub>	164	16.52	6.82	22.16	-0.142
XP_004985172.1	C <sub>723</sub> H <sub>1135</sub> N <sub>223</sub> O <sub>222</sub> S <sub>3</sub>	163	16.60	6.82	22.07	-0.172
NP_001149119.1	C <sub>730</sub> H <sub>1144</sub> N <sub>224</sub> O <sub>229</sub> S <sub>3</sub>	163	16.82	6.23	22.75	-0.243
XP_002465634.1	C <sub>726</sub> H <sub>1142</sub> N <sub>226</sub> O <sub>224</sub> S <sub>3</sub>	163	16.72	7.19	20.15	-0.280
AAC24833.1	C <sub>724</sub> H <sub>1158</sub> N <sub>224</sub> O <sub>224</sub> S <sub>3</sub>	162	16.68	8.02	29.42	-0.202



A: 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因扩增产物电泳结果, 其中 M: DNA 分子量标准; 1: 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因扩增产物;  
B: 小麦 *Cu/Zn-SOD* 蛋白亲水性分析; C: 小麦 *Cu/Zn-SOD* 蛋白三级结构预测; D: 小麦 *Cu/Zn-SOD* 蛋白保守结构域预测

A: Electrophoresis pattern of amplicon of *Cu/Zn-SOD* gene of wheat, M: DNA Marker, 1: Amplified product of *Cu/Zn-SOD* gene of wheat, B: The hydrophilicity analysis of *Cu/Zn-SOD* protein of wheat, C: Predicted tertiary structure of *Cu/Zn-SOD* protein of wheat, D: Conservative domain of *Cu/Zn-SOD* protein of wheat

图 1 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因序列与蛋白序列特征分析

Fig. 1 Characteristics of *Cu/Zn-SOD* gene sequence and protein sequence of wheat

### 2.3 小麦 *Cu/Zn-SOD* 同源基因筛查

利用本地 BLAST 程序比对筛查小麦 *Cu/Zn-SOD* 的同源基因序列, 经去冗余处理后, 得到 3 条候选序列: Traes\_4AS\_8AC85AB54.2、Traes\_4BL\_F765C4AA5.1 和 Traes\_4DL\_08EEED1A6.1, 对应序列信息见表 1, 分析发现, 三者间理化性质相差不大, 与 *TaCu/Zn-SOD* 的相似度分别为 97%、95% 和 95%, 同时均含有 *Cu/Zn-SOD* 保守 Motif (图 2)。故而认定该基因为多拷贝基因, 实验所得序列是 Traes\_4AS\_8AC85AB54.2 的同源变异基因。

### 2.4 氨基酸序列的同源性及进化分析

于 GenBank 库中挑选了主要的禾本科作物和模式植物拟南芥的 *Cu/Zn-SOD* 氨基酸序列, 与小麦 *Cu/Zn-SOD* 的氨基酸序列及其同源拷贝序列进行比

对, 结果发现小麦 *Cu/Zn-SOD* 氨基酸序列与其他物种的 *Cu/Zn-SOD* 氨基酸序列有较高保守性, 且在第 53~63、147~158 位为该酶蛋白家族典型的功能区域 (图 3)。进化分析结果表明 (图 2), 小麦 *Cu/Zn-SOD* 及其同源拷贝蛋白与大麦、二穗短柄草和水稻的 *Cu/Zn-SOD* 蛋白亲缘关系较近, 相似度分别为 94%、89% 和 87%, 属同一进化分支, 蛋白长度均在 164 aa 左右; 而与拟南芥 *Cu/Zn-SOD* 蛋白的相似度相对较远, 仅为 70%, 表明拟南芥属另一个进化分支。保守 Motif 预测结果表明, 所发现的 4 个 Motif 中, Motif 2 和 Motif 3 分别包含有 *Cu/Zn-SOD* 蛋白家族的功能区域; Motif 1 为 *Cu/Zn-SOD* 蛋白的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角的富集区域。小麦 *Cu/Zn-SOD* 蛋白及其同源拷贝蛋白与大麦、二穗短柄草和水稻的 *Cu/Zn-SOD* 蛋白含有 4

个保守 Motif;而谷子、玉米、高粱和拟南芥的 Cu/Zn-SOD 蛋白不含有 Motif 4;进一步表明了 Cu/Zn-SOD

蛋白结构与功能的保守性,在不同物种进化中可能产生了分支分化。

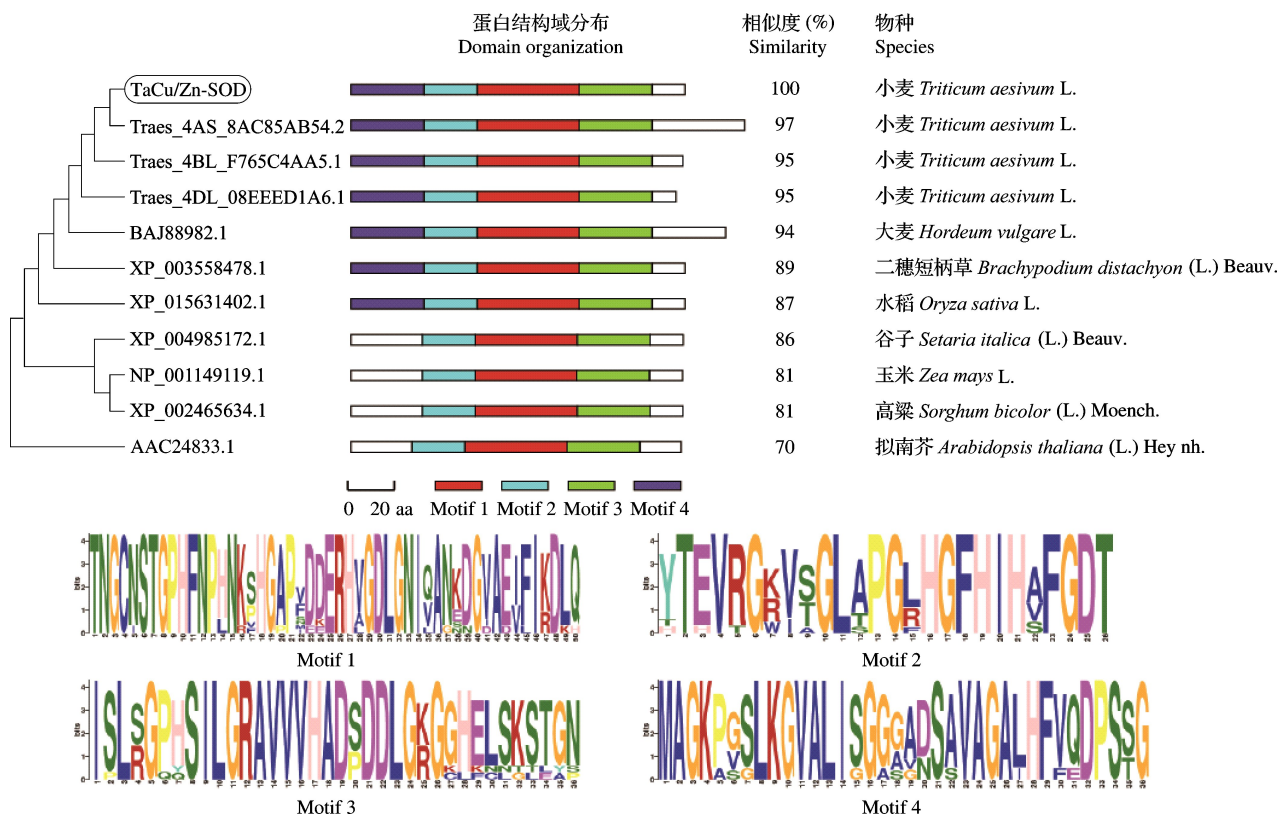
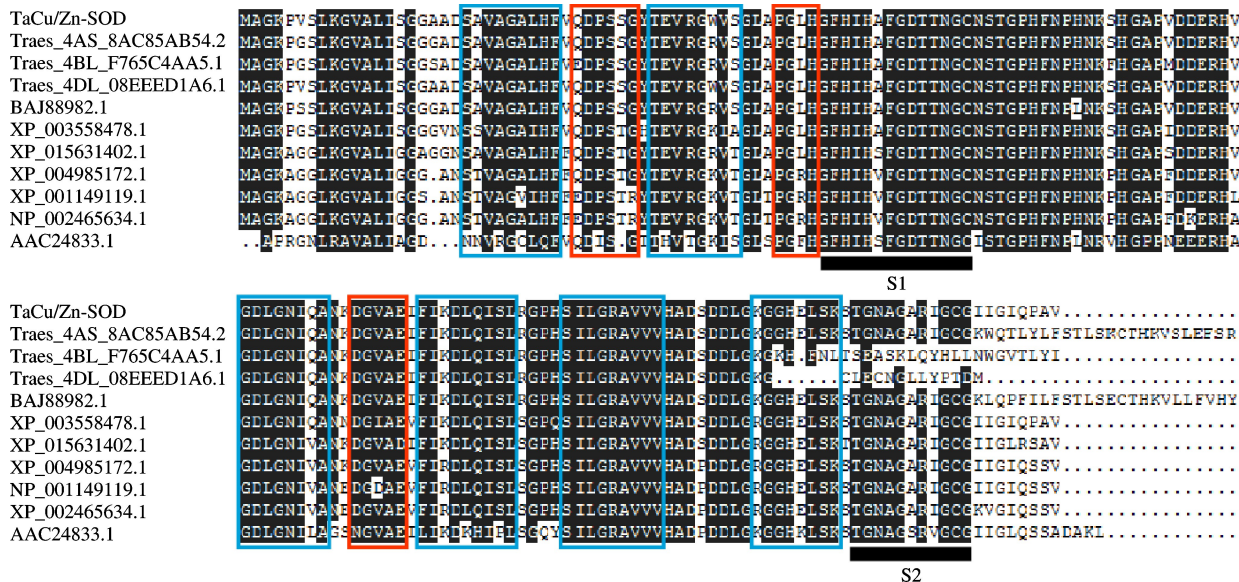


图2 小麦与其他物种 Cu/Zn-SOD 蛋白系统进化分析及蛋白结构域分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of the deduced Cu/Zn-SOD protein of wheat with other related proteins and domain organization analysis



蓝色方框表示 Cu/Zn-SOD 蛋白的  $\alpha$ -螺旋结构;红色方框表示 Cu/Zn-SOD 蛋白的  $\beta$ -转角结构;S1 和 S2 分别表示 Cu/Zn-SOD 蛋白的功能结构域

The blue represent  $\alpha$ -helix conservative domain of Cu/Zn-SOD, the red represent  $\beta$ -turn conservative domain of Cu/Zn-SOD, S1 and S2 represent functional domain of Cu/Zn-SOD, respectively

图3 小麦与其他植物 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列的多重比对

Fig.3 Sequence multi-alignment of the deduced Cu/Zn-SOD protein of wheat with other species



## 2.5 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因启动子区顺式作用元件分析

将小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的启动子序列提交至 Plant CARE 在线工具,对其顺式作用元件分布情况进行预测。结果显示,该启动子序列不仅含有真核生物所必需的核心元件 CAAT-box 和 TATA-box,还含有其他调控元件。如光应答元件: ACE、Box 4、G-Box、GAG-motif、GA-motif、GT1-motif 和 Sp1;激素应答元件: ABRE(脱落酸应答元件)、AuxRR-core(植物生长素应答元件)、CGTCA-motif(茉莉酸甲酯应答元件)

和 TCA-element(水杨酸应答元件);胁迫应答元件: ARE(厌氧应答元件)、GC-motif(厌氧应答元件)、Box-W1(真菌诱导应答元件)、HSE(高温应答元件)、LTR(低温应答元件)和 TC-rich repeats(防御与应激响应元件)等;结合与识别位点: CCAAT-box(MYBHv1 结合位点)、MBS(MYB 结合位点)和 MRE(光响应 MYB 结合位点);此外还具有 CCGTCC-box(分生组织特异表达调控元件)、MSA(细胞周期调控元件)和 Skn-1\_motif(胚乳表达调控元件)。元件定位、调控方向及序列见表 2。

表 2 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因启动子区域顺式作用元件预测

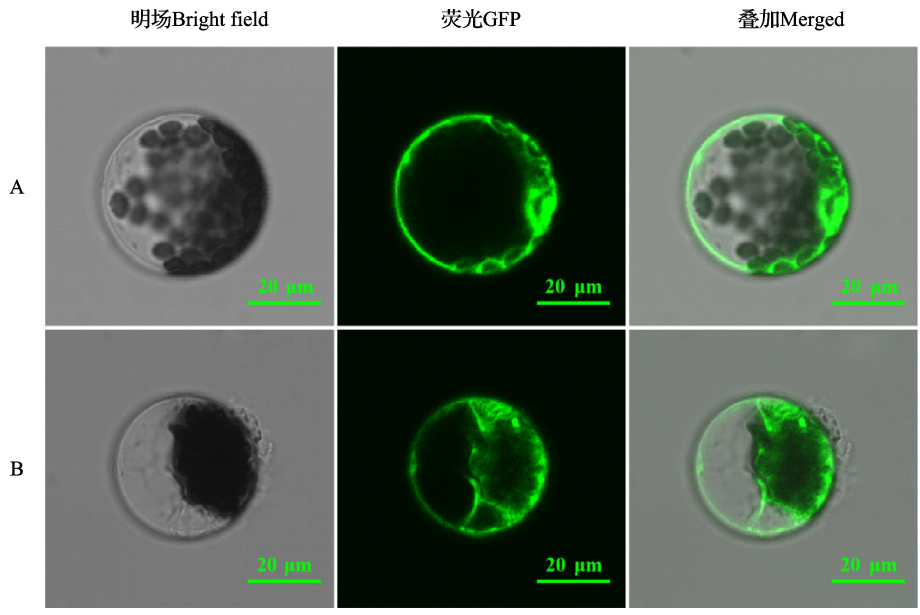
Table 2 Analysis of *cis*-elements in the promoters of *Cu/Zn-SOD* gene of wheat

元件 Element	定位 Location	调控方向 Regulating directions	核心序列 Core sequence	功能注释 Functional annotation
ABRE	-1658	-	CCGCGTAGGC	脱落酸应答元件
ACE	-1795, -1784	-	ACGTGGA	光应答元件
ARE	-1481, -571, -262	+	TGGTIT	厌氧应答元件
AuxRR-core	-242	-	GGTCCAT	植物生长素应答元件
Box 4	-1278	-	ATTAAT	部分保守的光应答元件
Box-W1	-1760, -1751	+	TTGACC	真菌诱导应答元件
CAAT-box	-1281, -1563, -1327, -1212, -349, -122, -295; -1761, -1449, -1167, -1166	+	CA(A)AT	启动子与增强子区域关联调控元件
CCAAT-box	-415	+	CAACGG	MYBHv1 结合位点
	-1431	-		
CCGTCC-box	-718	-	CCGTCC	分生组织特异表达调控元件
	-854	+	CCGTCC	
CGTCA-motif	-358	+	CGTCA	茉莉酸甲酯应答元件
G-Box	-1797, -1875, -1782, -1360, -906, -529; -1976, -1833, -1782, -237	+	(C)ACGTC(G)	光应答元件
GC-motif	-1139	-	CCCCCG	厌氧应答元件
GAG-motif	-797, -24	-	GGAGATG	光应答元件
GA-motif	-61	+	AAGGAAGA	光应答元件
GT1-motif	-15;	+	GGTTAA	光应答元件
	-764	-		
HSE	-1300	-	AGAAAATTCG	高温应答元件
LTR	-301, -1193	+	CCGAAA	低温应答元件
MBS	-1412	+	CGGTCA	MYB 结合位点
MRE	-1246	+	AACCTAA	光响应 MYB 结合位点
MSA	-1417	+	TCCAACGGT	细胞周期调控元件
Skn-1_motif	-808, -789, -289	+	GTCAT	胚乳表达调控元件
Sp1	-1725, -1548, -741; -553, -512, -602	+	CC(G/A)CCC	光应答元件
		-		
TATA-box	-32	+	TATA	-30 区启动转录核心元件
TC-rich repeats	-1912	+	ATTTTCTTCA	防御与应激响应元件
TCA-element	-779	-	GAGAAGAATA	水杨酸应答元件

2.6 小麦 Cu/Zn-SOD 蛋白亚细胞定位分析

将带有 16318hGFP 空载体和 Cu/Zn-SOD-GFP 重组载体的拟南芥原生质体孵育 24 h,置于荧光显微镜下观察,结果显示,在未导入目的基因的 16318hGFP 空载体的对照试验中,荧光信号主要集中于细胞膜系统和细胞核上,其他位置未检测

到明显的荧光信号。而融合 Cu/Zn-SOD 基因的材料中,GFP 荧光信号在细胞膜、细胞质与叶绿体中均可检测到,其中在细胞膜上的荧光信号相对较弱,后两者的则相对较强(图 4)。由此可以判断,小麦 Cu/Zn-SOD 蛋白主要定位于细胞质和叶绿体中。



A:16318hGFP 空载体的瞬时表达;B:Cu/Zn-SOD-GFP 重组载体的瞬时表达

A:Transient expression of the 16318hGFP empty vector,B:Transient expression of Cu/Zn-SOD-GFP

图 4 小麦 Cu/Zn-SOD 蛋白在拟南芥原生质体中的亚细胞定位

Fig.4 Subcellular location of Cu/Zn-SOD protein of wheat in arabidopsis protoplast

2.7 小麦 Cu/Zn-SOD 基因的表达分析

采用 qRT-PCR 技术分析小麦 Cu/Zn-SOD 基因在小麦光温敏雄性不育系 BS366 的根、茎、叶、雌蕊、雄蕊及颖壳等不同组织间的表达特异性(图 5A)。结果显示,小麦 Cu/Zn-SOD 基因在上述组织中均有表达,属于组成型表达。将基因在根中的表达量设为对照,发现该基因在茎、叶和颖壳中的表达量较高,分别为根的 6.59 倍、6.61 倍与 5.32 倍;雄蕊组织中的表达量为根的 3.04 倍;在雌蕊中的表达量与根中的相差不大,为根的 1.16 倍。可见 Cu/Zn-SOD 基因在供试材料的地上部含叶绿体的组织,即茎、叶和颖壳中具有较为高效的表达,推测 Cu/Zn-SOD 基因在小麦地上部含叶绿体组织中起作用。

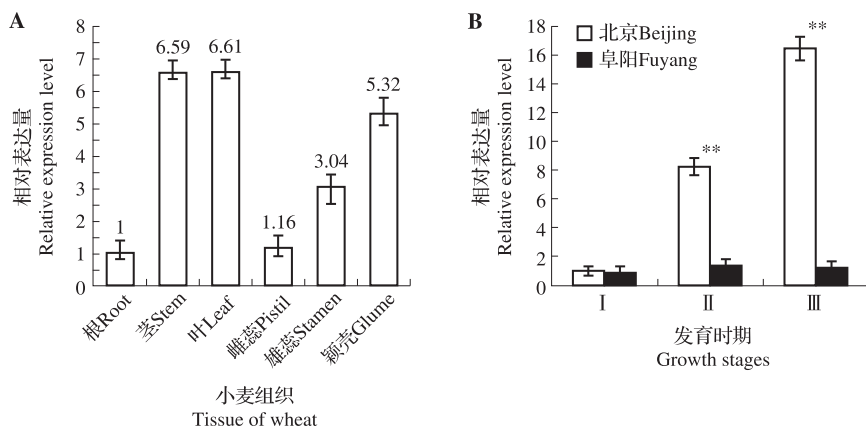
为研究小麦 Cu/Zn-SOD 基因在花药育性转换中的作用,本研究对该基因在 BS366 的可育与不育环境下,育性转换时期花药中的表达变化与差异性进行分析,结果如图 5B 显示,可育环境(北京)下,随着花药的发育,该基因的表达水平呈上调趋势,且

呈线性增长,在小孢子母细胞时期和减数分裂期的表达量分别约为对照的 8 倍与 16 倍;而不育环境(阜阳)下,随着发育时期的进行,该基因在花药中的表达水平无明显变化。同时发现,在药隔形成期时,该基因在 2 种环境下花药中的表达量相差不大,而在之后的 2 个时期,可育环境下的表达量要显著高于不育环境。因而推测,在 BS366 的育性敏感时期,Cu/Zn-SOD 基因在花药中的表达差异可能与雄性不育现象的发生有关。

分析小麦 Cu/Zn-SOD 基因经由水杨酸、赤霉素、茉莉酸甲酯、生长素、脱落酸、盐、干旱、低温等胁迫处理后在连续时间内的表达模式,以 0 h 即尚未进行胁迫处理时的小麦幼苗 cDNA 样品作为对照,结果如图 6 所示,该基因在受脱落酸、生长素、干旱胁迫处理后表达模式基本相似,均为先升高后下降的表达趋势,且皆于处理 8 h 时达到表达峰值,分别为对照的 5.9 倍、4.1 倍和 6 倍。经低温处理后的 0~8 h 内,该基因受到诱导呈上调表达,但之后其表达受到明显抑制,表现出对低温的敏感性。经水

杨酸和赤霉素胁迫处理后,其表达水平均受到抑制作用,但于 8 h 时其表达量都有小幅升高,分别为对照的 1.7 倍和 1.4 倍,之后又再次受到抑制。茉莉酸甲酯和盐胁迫处理后,该基因的表达始终呈现下调

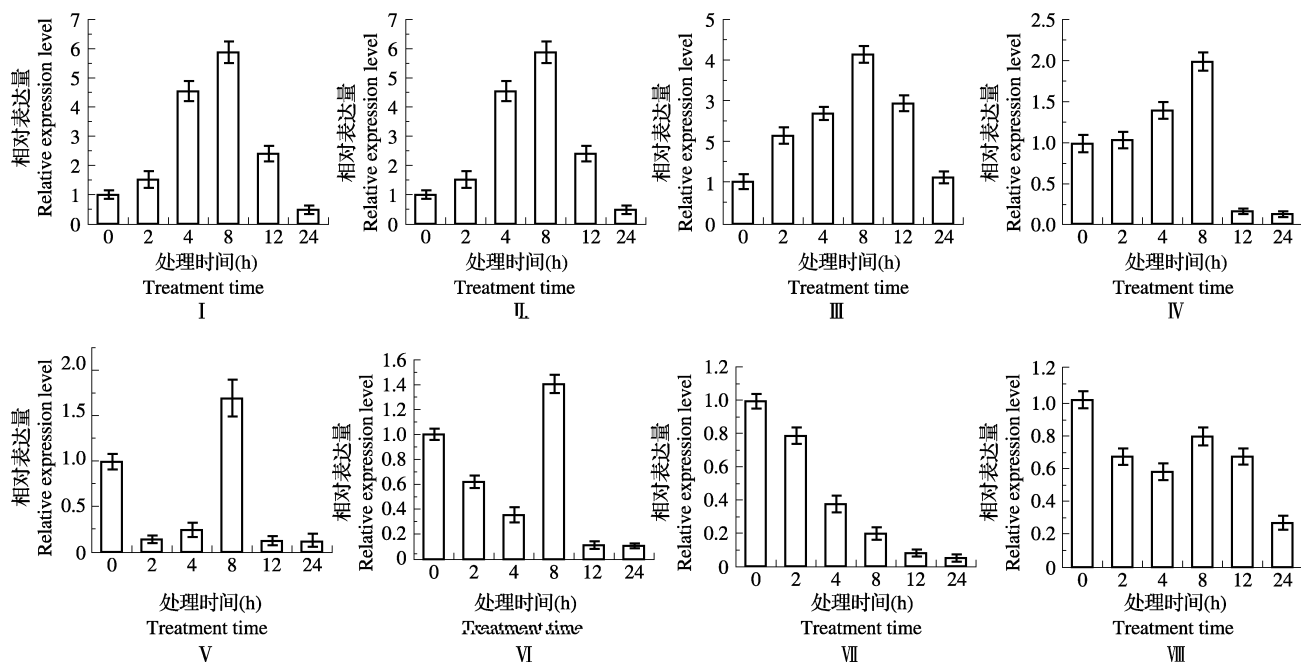
水平,且受到茉莉酸甲酯的强烈抑制;上述结果表明,小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因在多种逆境胁迫情况下均产生不同程度的响应,可能与多种逆境胁迫调控途径相关。



A: BS366 中小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的组织特异性表达分析,  $n \geq 3, P \leq 0.05$ ; B: 不同育性环境中 BS366 花药发育时期小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因表达差异性分析, 其中 \*\* 表示差异显著, I: 药隔形成期; II: 小孢子母细胞时期; III: 减数分裂时期,  $n \geq 3, P \leq 0.05$

A: Relative expression analysis of *Cu/Zn-SOD* gene of wheat in different tissues of wheat BS366,  $n \geq 3, P \leq 0.05$ ,  
B: Relative expression analysis of *Cu/Zn-SOD* gene of wheat in the stamen of wheat BS366 at various growth stages in different ambient, \*\* mean significant difference, I: Formation phase of drug,  
II: Mother cell stage, III: Meiosis stage,  $n \geq 3, P \leq 0.05$

图 5 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的组织特异性表达分析与其在不同育性环境下花药发育时期的表达差异性分析  
Fig. 5 Relative expression analysis of *Cu/Zn-SOD* gene in different tissues and fertility environmental condition at various pollen development stages



I: 脱落酸处理; II: 干旱处理; III: 生长素处理; IV: 低温处理; V: 水杨酸处理; VI: 赤霉素处理; VII: 茉莉酸甲酯处理; VIII: 盐处理,  $n \geq 3, P \leq 0.05$

I: ABA treatment, II: PEG treatment, III: IAA treatment, IV: Cold treatment, V: SA treatment,  
VI: GA treatment, VII: MeJA treatment, VIII: NaCl treatment,  $n \geq 3, P \leq 0.05$

图 6 小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因在胁迫处理后 BS366 叶片中的表达特性分析

Fig. 6 Relative expression analysis of *Cu/Zn-SOD* gene in the leaf of wheat BS366 under different stresses



### 3 讨论

植物体内存在活性氧自由基的产生与清除两个过程,正常情况下两者趋于平衡,但当植物受到逆境胁迫或衰老时,该平衡被打破,导致活性氧的沉积,进而引发膜脂过氧化,核酸、蛋白质等生物大分子的失活,危及植物生存<sup>[26]</sup>。SOD 作为植物体内重要的保护酶,在抵抗逆境胁迫与衰老过程中发挥着重要作用。

近年来,对于小麦 SOD 的研究多集中于生理生化方面,而在分子水平上却并不多见。本研究从小麦光温敏雄性不育系 BS366 中克隆得到了一条 *Cu/Zn-SOD* 基因,明确了该基因为多拷贝基因,实验所得序列为该基因的同源变异序列。对其进化分析和多序列比对分析表明,该基因所编码的氨基酸序列高度保守,具有典型的 *Cu/Zn-SOD* 的功能区域,与前人研究报道的 *Cu/Zn-SOD* 序列是相对保守的<sup>[27-28]</sup>结论一致。蛋白结构分析表明,该蛋白由 2 个结构相同的亚基构成,亚基结构核心是由 8 股反向平行的  $\beta$ -折叠环绕而成具有拓扑性的活性通道,称为“ $\beta$ -桶”,铜离子和锌离子位于其外,锌离子主要起到稳定亚基结构的作用,而铜离子则起到催化作用<sup>[29]</sup>。*Cu/Zn-SOD*、*Fe-SOD* 和 *Mn-SOD* 这 3 种不同类型的 SOD 在细胞中的定位各不相同,*Mn-SOD* 主要位于线粒体内;*Fe-SOD* 一般存在于植物叶绿体中;*Cu/Zn-SOD* 在细胞中的分布最为广泛,约占总 SOD 的 90%,进一步又可分为细胞内 *Cu/Zn-SOD* (ic *Cu/Zn-SOD*) 和细胞外 *Cu/Zn-SOD* (ec *Cu/Zn-SOD*),细胞内 *Cu/Zn-SOD* 主要定位在细胞质和叶绿体中<sup>[30]</sup>,而细胞外 *Cu/Zn-SOD* 则多见于动物细胞中,分布在细胞外基质如淋巴液和血液中<sup>[31]</sup>。研究中,通过显微观察,发现小麦 *Cu/Zn-SOD* 蛋白主要定位于细胞质与叶绿体中,属于细胞内 *Cu/Zn-SOD*。

李玉坤等<sup>[32]</sup>对东方山羊豆中克隆的 *Cu/Zn-SOD* 基因进行组织特异性表达分析发现,该基因在东方山羊豆叶中的表达量最高,茎中次之,在根中的表达量最少。本研究通过 qRT-PCR 技术分析 *Cu/Zn-SOD* 基因在小麦雄性不育系 BS366 的不同组织中的表达特异性,同样发现该基因在叶片中表达量最高,其次为茎,同时在雄蕊和颖壳组织中也具有较高表达量。可能是由于小麦中含有叶绿体的组织在光合作用和呼吸作用的双重影响下,可以产生更多的活性氧,进而诱导 *Cu/Zn-SOD* 基因的表达。结合

亚细胞定位结果,进一步表明该基因主要在小麦含有叶绿体的组织(茎、叶、颖壳)中表达。

为进一步研究小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因与小麦育性的关系,分析该基因在育性敏感时期不同育性环境花药中的表达模式,发现该基因在可育环境下的表达量明显高于不育环境。另外,在低温胁迫下发现该基因在处理时间低于 8 h 时为诱导其表达,而之后受到明显抑制,表明当 BS366 在其不育环境下生长至小孢子母细胞时期,植株受到低温胁迫,*Cu/Zn-SOD* 基因的表达受到抑制,无法及时清除过多的活性氧自由基,致使小孢子细胞结构受到破坏,而引起 BS366 雄性不育的发生。有研究报道称,少量的活性氧对于细胞正常代谢功能是必需的,但当活性氧过量累积时则会对细胞造成损伤,甚至引起细胞异常程序性死亡(PCD)<sup>[33]</sup>。又有研究指出绒毡层细胞中贮存有大量营养物质,通过适时地自我凋亡,为小孢子的发育提供保障<sup>[34]</sup>,在拟南芥中某些基因,如 *AMS*<sup>[35]</sup>、*DYTI*<sup>[36]</sup> 等,可以通过调控绒毡层细胞的延迟降解,占据小孢子发育的空间,同时无营养供给,导致小孢子败育;而矮牵牛的 *TAZI* 基因功能缺陷使绒毡层提前降解,导致小孢子的提前退化<sup>[37]</sup>;绒毡层细胞的异常 PCD 会影响小孢子的正常发育,引起雄性不育<sup>[38]</sup>。因此,下一步 *Cu/Zn-SOD* 基因与绒毡层细胞的关系研究将从分子及细胞层面展开。

启动子区域在转录水平调控中重要的顺式作用元件的研究对于探讨植物基因表达调控机理具有重要意义。本研究基于最新的小麦基因组测序数据,对 *Cu/Zn-SOD* 基因的启动子区域顺式作用元件进行预测分析,发现该基因启动子区除含有必需的 CAAT-box 和 TATA-box 外,还含有多种激素应答元件和胁迫应答元件,推测该基因可以对多种激素与胁迫产生响应,同时可能参与多种信号传递途径。小分子物质(如茉莉酸甲酯类)在植物生长发育及应对胁迫过程中发挥着重要作用,同时亦可作为信号分子直接或间接地诱导基因表达<sup>[39-40]</sup>。本研究分析了 *Cu/Zn-SOD* 基因在多种胁迫(水杨酸、赤霉素、茉莉酸甲酯、生长素、脱落酸、盐、干旱、低温等)处理条件下小麦幼苗叶片中的表达情况,发现该基因对于多种胁迫均有不同程度的响应,表明小麦 *Cu/Zn-SOD* 可能参与了多种逆境胁迫调控途径及信号分子调控网络。其中脱落酸、干旱与生长素处理时的表达模式基本类似,呈现先升高后降低的趋势;在水杨酸与赤霉素胁迫下,两者皆出现“降低—

升高—降低”的表达趋势;在经茉莉酸甲酯和盐处理后,该基因的表达水平均受到抑制,且受茉莉酸甲酯的抑制作用尤为明显。近年来报道发现,植物花器官的正常生理代谢受茉莉酸甲酯合成及信号转导途径的直接调控<sup>[41]</sup>。在拟南芥茉莉酸甲酯合成或信号途径的突变体,如 *reductase3 (opr3)*、*allene oxide synthase (aos)* 和 *fatty acid desaturation (fad)* 等,均表现出雄性不育的表型<sup>[42]</sup>。水稻突变体 *osjar1-2* 和 *osjar1-3* 中,植株表现出对茉莉酸甲酯的不敏感,出现了花药不开裂和颖壳的异常开闭现象<sup>[43-44]</sup>。本研究中,茉莉酸甲酯处理条件下,小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的表达受到抑制呈持续下调趋势,表现出对茉莉酸甲酯的敏感性,推测其可能参与了茉莉酸甲酯介导的信号转导途径,同时可能在小麦花器官的发育与代谢过程中发挥作用。茉莉素还可以与生长素共同作用来调控包括花粉育性、受精过程等<sup>[45]</sup>。本研究中,小麦幼苗在生长素处理下,小麦 *Cu/Zn-SOD* 基因的表达水平呈现先升高后降低的趋势,推测小麦植株在受到胁迫后活性氧含量升高,随即植物启用活性氧清除程序,因而 *Cu/Zn-SOD* 基因的表达量上升,酶活性增强;但由于活性氧的过多沉积仍使植株受到损伤,使其正常生理代谢受到影响,随之保护酶表达量有所降低。Z. Tang 等<sup>[46]</sup> 的研究发现,小麦 *miR167* 家族积极响应低温胁迫,通过影响其靶基因 *Auxin response factor (ARF)* 的表达,进而调控花药发育;同时发现 *ARF* 又能参与茉莉酸甲酯调控通路,与茉莉酸甲酯共同作用,进一步对花药的发育产生调控。本研究中小麦幼苗在低温胁迫处理条件下,*Cu/Zn-SOD* 基因的表达量在前期呈现小幅升高的趋势,而后则明显下调,表达受到抑制,表现出对低温诱导的敏感性<sup>[47-48]</sup>,可能参与低温胁迫调控通路。由上述结果可以推测,植物在受到生物或非生物等逆境胁迫时,植株受到损害,活性氧增多,活性氧可作为一种信号,进而诱导 *Cu/Zn-SOD* 基因的表达,而由于各个信号传导途径的调控机制不同或多种途径间的相互作用,导致 *Cu/Zn-SOD* 基因对胁迫的响应又各不相同<sup>[27]</sup>。

本研究从小麦光温敏雄性不育系 BS366 中克隆并获得小麦特异的 *Cu/Zn-SOD* 基因,该基因定位于细胞质与叶绿体中,通过分析该基因所编码的氨基酸序列特征,发现其在进化上相对保守;且主要在小麦植株地上部含叶绿体的组织中表达,同时可能参与应答多种逆境胁迫与信号转导途径。本研究从分子水平初步探讨了该基因与光温敏雄性不育现象

的关系,证明其对低温诱导的敏感性,进一步的功能验证还有待研究。

#### 参考文献

- [1] Quartacci M F, Pinzino C, Sgheri C, et al. Lipid composition and protein dynamics in thylakoids of two wheat cultivars differently sensitive to drought [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108 (1): 191-197
- [2] Nagai T, Inoue R, Inoue H, et al. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autooxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals [J]. *Nutr Res*, 2002, 22 (4): 519-526
- [3] Dionisi O, Galeotti T, Terranova T, et al. Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 403 (2): 292-300
- [4] Szechyńska M, Skrzypek E, Dałbrowska G, et al. The effect of endogenous hydrogen peroxide induced by cold treatment in the improvement of tissue regeneration efficiency [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 34 (2): 547-560
- [5] Raven J A, Evans M C W, Korb R E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in  $O_2$ -evolving organisms [J]. *Photosynth Res*, 1999, 60 (2): 111-150
- [6] Bowler C, Slight L, Vandenbranden S, et al. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants [J]. *EMBO J*, 1991, 10 (7): 1723-1732
- [7] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review [J]. *Ann Bot*, 2003, 91 (2): 179-194
- [8] Cannon R E, White J A, Scandalios J G. Cloning of cDNA for maize superoxide dismutase 2 (SOD2) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (84): 179-183
- [9] Bowler C, Alliotte T, De Loose M, et al. The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana glauca* [J]. *EMBO J*, 1989, 8 (1): 31-38
- [10] Hironori K, Shigeto M, Megumi T. Molecular cloning and characterization of a cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1999, 63 (2): 302-308
- [11] Kliebenstein D J, Dietrich R A, Martin A C, et al. LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1999, 12 (11): 1022-1026
- [12] Abu S. Isolation and expression analysis of chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase gene in barley [J]. *S Afr J Bot*, 2011, 77 (2): 328-334
- [13] Kurama E E, Fenille R C, Jr V E R, et al. Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane [J]. *Mol Plant Pathol*, 2002, 3 (4): 251-259
- [14] Juan D, Zhu Z, Chen W L I. Over-expression of exotic superoxide dismutase gene *MnSOD* and increase in stress resistance in maize [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2006, 32 (1): 57-63
- [15] 胡根海, 喻树迅, 范术丽, 等. 编码棉花胞质铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与表达分析 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40 (8): 1602-1609
- [16] 张海娜, 李小娟, 李存东, 等. 过量表达小麦超氧化物歧化酶 (SOD) 基因对烟草耐盐能力的影响 [J]. *作物学报*, 2008, 34 (8): 1403-1408
- [17] Esfandiari E, Shekari F, Shekari F, et al. The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling [J]. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*, 2007, 35 (1): 48-56
- [18] 张建奎, 宗学风, 王俊义, 等. 温光敏核雄性不育小麦花药中

- 保护酶活性的变化[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(4): 26-30
- [19] Ba Q S, Zhang G S, Wang J S, et al. Relationship between metabolism of reactive oxygen species and chemically induced male sterility in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Can J Plant Sci, 2013, 93(4): 675-681
- [20] Tang Z, Zhang L, Yang D, et al. Cold stress contributes to aberrant cytokinesis during male meiosis I in a wheat thermosensitive genic male sterile line [J]. Plant Cell Environ, 2011, 34(3): 389-405
- [21] 王玉昆, 高建刚, 苑国良, 等. 普通小麦 *TaADF8* 基因的克隆及表达分析[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(2): 143-150
- [22] 张立平, 许晨光, 赵昌平, 等. 应用水稻基因芯片分析小麦光温敏核雄性不育系的基因差异表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(8): 761-767
- [23] Abel S, Theologis A. Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression [J]. Plant J, 1994, 5(3): 421-427
- [24] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. Nat Protoc, 2007, 2(7): 1565-1572
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [26] Gómez J M, Hernández J A, Jiménez A, et al. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants [J]. Free Radic Res, 1999, 31(1): 11-18
- [27] Shin S Y, Lee H S, Kwon S Y, et al. Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of *Manihot esculenta* [J]. Plant Physiol Bioch, 2005, 43(1): 55-60
- [28] 王盛, 张保青, 黄杏, 等. 甘蔗 *Cu/Zn-SOD* 的克隆和表达分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3277-3284
- [29] Wang J H, Liu H X. The role of superoxide dismutase (SOD) in stress physiology and senescence physiology of plant [J]. Plant Physiol Commun, 1989, 1: 1-7
- [30] Bannister J V, Bannister W H, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase [J]. CRC Crit Rev Biochem, 1987, 22(2): 111-180
- [31] 杜金芳, 曾勇庆, 陈伟, 等. 猪 *CuZnSOD* 基因的克隆、表达及功能分析[J]. 遗传, 2010, 32(10): 1037-1042
- [32] 李玉坤, 王学敏, 高洪文, 等. 东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因的克隆及表达分析[J]. 遗传, 2012, 34(1): 95-101
- [33] Li S, Wan C, Kong J, et al. Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria [J]. Funct Plant Biol, 2004, 31(4): 369-376
- [34] 李懿星, 李莉, 陈光辉. 高等植物花药绒毡层发育研究进展[J]. 作物研究, 2009, 23(5): 287-289
- [35] Sorensen A M, Kröber S, Unte U S, et al. The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor [J]. Plant J, 2003, 33(2): 413-423
- [36] Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, et al. Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *DYSFUNCTIONAL TAPE-TUMI (DYTI)* encoding a putative bHLH transcription factor [J]. Development, 2006, 133(16): 3085-3095
- [37] Kapoor S, Kobayashi A, Takatsuji H. Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene *TAZI* causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia [J]. Plant Cell, 2002, 14(10): 2353-2367
- [38] Ku S, Yoon H, Suh H S, et al. Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum [J]. Planta, 2003, 217(4): 559-565
- [39] Spoel S H, Johnson J S, Dong X. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(47): 18842-18847
- [40] Mur L A, Kenton P, Atzorn R, et al. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death [J]. Plant Physiol, 2006, 140(1): 249-262
- [41] Zhao Z, Zhang Y, Xi L, et al. A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice [J]. Dev Cell, 2013, 27(1): 113-122
- [42] Browse J. The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling [J]. Phytochemistry, 2009, 70(13-14): 1539-1546
- [43] Riemann M, Riemann M, Takano M. Rice *JASMONATE RESISTANT 1* is involved in phytochrome and jasmonate signalling [J]. Plant Cell Environ, 2008, 31(6): 783-792
- [44] Xiao Y, Chen Y, Charnikova T, et al. OsJAR1 is required for JA-regulated floret opening and anther dehiscence in rice [J]. Plant Mol Biol, 2014, 86(1-2): 19-33
- [45] Zhao Z, Zhang Y, Xi L, et al. A Role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice [J]. Dev Cell, 2013, 27(1): 113-122
- [46] Tang Z, Zhang L, Xu C, et al. Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing [J]. Plant Physiol, 2012, 159(2): 721-738
- [47] Wu G, Wilen R W, Robertson A J, et al. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat [J]. Plant Physiol, 1999, 120(2): 513-520
- [48] 杜秀敏, 殷文璇, 张慧, 等. 超氧化物歧化酶 (SOD) 研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(1): 48-50