

油茶 *PODs* 基因鉴定及在自交和异交下的表达分析

姚亚轩¹, 袁 军¹, 卢梦琪¹, 彭邵锋², 王 婷¹, 谭晓风¹, 周俊琴¹

(¹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; ²湖南省林业科学院油茶研究所, 长沙 410004)

摘要: 油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 具有自交不亲和性 (SI, self-incompatibility), 自然座果率低, 这严重影响油茶产量, 制约了油茶产业的发展。为研究过氧化物酶 (POD, peroxidase) 在油茶自交不亲和反应中的作用, 本研究通过逆转录克隆技术从油茶中克隆出 4 条 *POD* 基因, 分别命名为 *CoPOD1/2/3/4*。其基因编码区长度分别为 1086、1011、1020 和 1218 bp, 编码 361、336、339 和 405 个无跨膜结构、有信号肽的蛋白质。同源序列比对显示 *CoPOD1/2/3/4* 蛋白质之间的同源性较低, 但均有过氧化物酶活性位点和过氧化物酶近端血红素配体序列; 系统进化树显示 *CoPOD1/2/3/4* 蛋白质与茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.) *POD* 蛋白质的亲缘关系最近。实时荧光定量结果显示, 油茶 *PODs* 基因在自交授粉后 24~48 h 范围内呈现显著上调后又下降的趋势, 在自交授粉 36 h 雌蕊中 *CoPOD1/3/4* 的表达量高于异交。自交授粉 24~72 h 油茶雌蕊内 *POD* 酶活性高于异交并在 36 h 达到最高值, 异交授粉雌蕊内 *POD* 活性前期处于动态平衡状态, 在 72 h 后出现明显上调, 据此推测油茶 *PODs* 基因可能参与了油茶自交授粉后花粉管程序性死亡, 进而参与了油茶自交不亲和反应。本研究为进一步研究油茶自交不亲和和机制提供参考。

关键词: 油茶; 过氧化物酶; 自交不亲和; 表达模式; 基因克隆

Expression Analysis under Self and Outcross Pollination and Identification of *PODs* Gene in *Camellia oleifera* Abel.

YAO Yaxuan¹, YUAN Jun¹, LU Mengqi¹, PENG Shaofeng², WANG Ting¹, TAN Xiaofeng¹, ZHOU Junqin¹

(¹Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest Trees, Ministry of Education, College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004; ²*Camellia oleifera* Abel. Research Institute, Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004)

Abstract: *Camellia oleifera* Abel., which shows self-incompatibility (SI) and low natural fruit setting rate, has seriously affected its yield production and the following development in industry. To uncover the function of Peroxidase (POD) in self-incompatibility, four *POD* genes *CoPOD1/2/3/4* were cloned from *C. oleifera* by reverse transcription cloning technology. The length of gene coding regions were 1086, 1011, 1020 and 1218 bp, encoding 361, 336, 339 and 405 amino acids non-transmembrane proteins with signaling peptides, respectively. Although lower sequence similarity among the *CoPOD1/2/3/4* proteins is observed, they all contain peroxidase active sites and heme ligand sequences near peroxidase. The phylogenetic analysis revealed closely sequence homology of *CoPOD1/2/3/4* to those of *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze. Real-time fluorescence quantitative results showed that *PODs* were significantly up-regulated, followed by decreased expression within 24-48 h after self-pollination. The transcripts of *CoPOD1/3/4* were higher than cross-pollinated in pistills at 36 h after self-pollination. The *POD* activity in the pistil of self-pollination was higher than that of cross-pollinated within 24-72 h, showing the highest expression peak at 36 h. The *POD* activity in the pistil of the cross-

收稿日期: 2023-03-09 修回日期: 2023-04-10 网络出版日期: 2023-05-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230309001>

第一作者研究方向为经济林栽培育种, E-mail: 1873079745@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: 湖南省林业科技攻关与创新项目 (XLKY202323, XLK201939); 中南林业科技大学研究生科技创新项目 (2023CX02043)

Foundation projects: Forestry Science and Technology Research and Innovation Project of Hunan Province (XLKY202323, XLK201939); Science Innovation Project for Post-graduates of Central South University of Forestry and Technology (2023CX02043)

pollinated was in dynamic balance at early stage, with significantly up-regulated after 72 h. We speculate that the *POD* genes might be involved in the programmed pollen tube death of *C. oleifera* after self-pollination, thus participating in the self-incompatibility reaction. Collectively, this paper provides reference for further research on self-incompatibility mechanism in *C. oleifera*.

Key words: *Camellia oleifera* Abel.; peroxidase; self-incompatibility; expression pattern; gene cloning

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)是我国特有且重要的木本食用油料树种,栽培面积大,分布广泛,在保障国家粮油安全和生态文明建设中占有重要的地位和作用^[1]。油茶在生产实践中存在开花量大、自然座果率极低(5%以下)的现象,导致油茶产量低且不稳定,进而影响我国油茶产业的健康发展^[2]。近几年,多位科研工作者通过田间授粉、荧光显微观察及统计学分析,对油茶的败育机制进行了系统研究,取得了一些重要进展,同时确定油茶为合子前期的后期自交不亲和(LSI, late-acting self-incompatibility)类型植物^[3-4]。

自交不亲和性(SI, self-incompatibility)是植物为防止近亲繁殖、促进杂交、保持物种多样性的一种授粉机制^[5],许多学者对其作用机制进行了一系列研究。其中多数植物的自交不亲和性是由于S基因编码的S-RNase(一种核糖核酸酶)抑制花粉管在花柱中的生长,从而导致不亲和反应的产生^[6-8]。一些研究者在砂梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai)中发现S-RNase通过抑制花粉管内NADPH酶(与过氧化物酶(POD, peroxidase)均参与活性氧的生成)的活性,使活性氧(ROS, reactive oxygen species)合成受到阻碍,进而破坏了自花授粉后顶端花粉管活性氧浓度梯度,引起花粉管微丝骨架断裂,最终导致花粉管无法正常生长^[9-10]。另有研究证实蔷薇科植物中S-RNase进入花粉管后通过改变胞质内Ca²⁺等因子的浓度,引起ROS含量显著上升,从而阻碍了花粉管的生长^[11]。由此可见,ROS含量过多或过少均会引起花粉管不正常生长。

ROS是植物环境胁迫信号中最重要的物质,植物已进化出一套自身的抗氧化机制来清除过多的ROS,使体内ROS的含量处于动态平衡状态^[12]。其中POD等酶类组成植物保护酶促系统的重要部分并发挥关键性作用,它能平衡体内的活性氧自由基代谢、延迟或阻止细胞结构的破坏,进而防止自由基对植物的毒害^[13]。为探索POD酶活性与自交不亲和的关系,齐国辉^[14]通过对不同鸭梨(*Pyrus bretschneideri*)品种的自交座果率和自花授粉后花柱内POD酶活性进行关联性分析,发现两者呈极显

著负相关关系。王保成等^[15]通过对芸芥(*Eruca sativa* Mill.)自交亲和系和自交不亲和系柱头POD等酶活性进一步探究后,推测芸芥自交亲和系的亲和基因调控可能与POD等保护酶活性的变化有关。He等^[16]在油茶授粉48 h后发现自花授粉中与过氧化物酶体生成有关的蛋白质含量与异花授粉相比有所上调,推测过氧化物酶体可能在油茶的自交不亲和反应中起关键作用。本研究从前期构建的油茶自、异交雌蕊转录组数据库^[17]中筛选获得4条POD基因的全长编码序列(CDS, coding sequence),并对油茶4条POD基因进行克隆和鉴定,同时分析不同授粉组合中的POD酶活性和POD基因家族的表达模式,以为揭示油茶自交不亲和性的生理响应机制提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料与样品处理

本研究开展于2019年,选取的试验材料为油茶良种华硕和华金,两个品种均为自交不亲和品种,且两者杂交亲和,两个品种均种植于湖南省株洲市渌口区中南林业科技大学油茶基地。采摘露白期花朵,带回实验室在26℃干燥14 h后收集花粉。随后进行野外人工授粉,以华硕为母本,授粉组合为华硕×华金(异交)和华硕×华硕(自交),授粉后迅速套袋。在授粉后0、12、24、36、48、60、72、84、96 h时间点分别用镊子将雌蕊取下,液氮速冻后-80℃冰箱中保存备用。材料均选取即将开放但花瓣未打开的材料,避免品种间花粉污染。

1.2 试验方法

1.2.1 POD酶活性测定 采用愈创木酚法^[18]进行POD酶活性测定,样本为1.1采集的雌蕊样品,将样品切碎放入研钵中,制成酶液留作备用。在洁净试管中加入0.05 mol/L pH7.0磷酸缓冲液2.9 mL, 2% H₂O₂ 1.0 mL, 0.05 mol/L愈创木酚1.0 mL和0.1 mL酶液。反应液混匀后,在37℃水浴中保温15 min,然后加入20%三氯乙酸2.0 mL终止反应,以pH7.0磷酸缓冲液调零点,在470 nm波长下测定吸光度。

POD酶活性($u/(g(FW)\cdot min)$)= $\Delta OD\cdot Vt/(Vs\cdot T\cdot FW)$,

其中, ΔOD 为样品OD值减对照OD值; Vt 为酶液总体积(mL); Vs 为测定酶液体积(mL); T 为反应时间(min); FW 为鲜重(g)。使用SPSS 25.0软件的Duncan's方差分析方法对数据进行显著性差异分析,采用本地软件Origin 2019进行相关图表制作。

1.2.2 油茶总RNA提取及cDNA合成 按照Omega公司总RNA提取试剂盒说明书,提取油茶各样品的总RNA。提取完毕后取2 μL 进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性及条带亮度。油茶cDNA的合成参照Vazyme公司的荧光定量逆转录试剂盒说明书进行。

1.2.3 油茶PODs基因的克隆 根据油茶转录组数据库中的POD基因序列^[17],利用Primer Premier 5.0软件设计两端引物CoPOD1/2/3/4-F/R(表1)。以

油茶华硕雌蕊的cDNA为模板进行PCR扩增,PCR反应体系(25 μL):12.5 μL Phanta Master Mix,10 $\mu mol/L$ 正反向引物各1 μL ,1 μL 油茶华硕雌蕊的cDNA,用灭菌水(ddH₂O)补齐至25 μL 。反应程序:98 $^{\circ}C$ 3 min;98 $^{\circ}C$ 30 s,55 $^{\circ}C$ 15 s,72 $^{\circ}C$ 2 min,40个循环;72 $^{\circ}C$ 10 min。产物经电泳检测后,用Gel Extraction Kit(OMEGA Bio-Tek,美国)试剂盒进行回收,将回收后的目的片段与pClone007载体混匀后在25 $^{\circ}C$ 连接10 min,后转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,冰上静置30 min后,42 $^{\circ}C$ 水浴热激活45 s后冰上静置2 min,在无菌操作台加入无抗性LB培养基800 mL,在37 $^{\circ}C$ 、200 r/min震荡培养1 h,去除上清混匀并吸取100 μL 菌液均匀涂布于含有氨苄抗生素的LB固体培养基上。用通用引物M13F/R经菌液PCR检测后,挑选阳性菌液送至长沙擎科生物公司进行测序验证。

表1 PODs基因引物序列

Table 1 Primer sequence of PODs gene

| 引物名称 Primer name | 正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence | 反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence | 用途 Application |
|---------------------|--|--|-------------------|
| CoPOD1-F/R | ATGGCTTTCAACCTCTCAGCTGT | TTACCGTAACTCTGCGGCAGTCT | CoPODs基因克隆 |
| CoPOD2-F/R | ATGACATTTTCTCTTCTTCTTC | TCAATTAAGCTTCTTACAATCC | |
| CoPOD3-F/R | ATGACATTGCCTTTTATTCTTC | CTATGCCTTCATATATTTGCCT | |
| CoPOD4-F/R | ATGGAAGGAAGAATTAGAGTACG | TCAATGCACAAATATGGTTGGA | |
| CoPOD1-QF/QR | AATCTAAGTCTGAGGGCG | GGGAGGTTGTCCAATGTT | 实时定量RT-PCR |
| CoPOD2-QF/QR | CTGGTTCTGCCACGATTT | TCTCTCCACTGCTCCCTGT | |
| CoPOD3-QF/QR | CAAGCCCTATTGACCGA | CTCACATCTATGCCTCACCT | |
| CoPOD4-QF/QR | GTTGCTGGCTTTCTTCG | CCTCTATTCTTGCCTTGAC | |
| GAPDH-F/R | CTACTGGAGTTTTACCCGA | TAAGACCCTCAACAATGCC | 内参基因 |

1.2.4 生物信息学分析 利用ProtParam、ProtScale、SOPMA等在线软件(表2)对CoPOD1/2/3/4基因的蛋白质理化性质、疏水性、二级结构等进行分析;使用本地软件Jalview、MEGA 11和TBTOOLS进行同源序列比对、系统进化树的构建以及保守基序的分析。

1.2.5 实时荧光定量PCR 为检测CoPODs基因在油茶自交和异交花柱和子房中的表达模式,选择油茶常用的三磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)作为内参基因^[19],根据克隆得到的CoPOD1/2/3/4基因全长序列设计实时定量PCR引物(表1),扩增片段

长度分别为215、126、154和172 bp。实时荧光定量反应体系按照湖南长沙擎科公司的2 \times T5 Fast qPCR Mix试剂盒说明书进行,在BIO-RAD公司的CFX96TMReal-time PCR反应系统中进行,反应体系为20 μL :10 μL 2 \times TSINGKE®Master qPCR Mix-SYBR,正反向引物各0.8 μL ,1 μL 的cDNA模板,7.4 μL 无菌无酶的水。实时荧光定量PCR反应程序:96 $^{\circ}C$ 预变性30 s;96 $^{\circ}C$ 变性5 s,58 $^{\circ}C$ 退火30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸30 s,40个循环。每个样品进行3个生物学重复,采用2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[20]分析相关数据。后续数据显著性差异分析及图表制作方法同1.2.1。

表 2 基因生物信息学分析软件

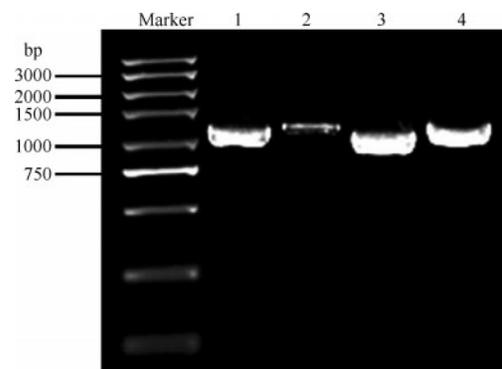
Table 2 Gene bioinformatics analysis software

| 序号 Number | 在线软件 Online software | 在线软件网址 Online software website | 分析内容 Analysis content |
|--------------|-------------------------|--|--------------------------|
| 1 | ProtParam | https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam | 蛋白质理化性质分析 |
| 2 | ProtScale | https://web.expasy.org/protscale/ | 蛋白质疏水性分析 |
| 3 | TMHMM Server v.2.0 | https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? TMHMM-2.0 | 蛋白质跨膜结构分析 |
| 4 | SignalIP 5.0 | https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? SignalIP-5.0 | 蛋白质信号肽分析 |
| 5 | SOPMA | https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=npsa_sopma.html | 蛋白质二级结构分析 |
| 6 | PHYRE2 | http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi? id=index | 蛋白质三级结构分析 |
| 7 | IncLocator | http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/IncLocator/ | 亚细胞定位预测 |
| 8 | InterPro | https://www.ebi.ac.uk/interpro/ | 蛋白质结构域分析 |
| 9 | PROSCAN | https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=/NPSA/npsa_proscan.html | 蛋白质基元分析 |
| 10 | NCBI Blast | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi | 同源序列搜索 |
| 11 | ITOL | https://itol.embl.de/ | 构建系统进化树 |
| 12 | MEME | https://meme-suite.org/meme/tools/meme | 保守基序 (motif) 分析 |

2 结果与分析

2.1 油茶 *PODs* 基因的克隆

参考油茶转录组数据,利用 Primer Premier 5.0 设计目的基因全长扩增产物,以油茶反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,测序得到 *CoPOD1/2/3/4* 基因的 CDS 长度分别为 1086、1011、1020 和 1218 bp(图 1),与转录组数据库中的碱基序列一致,分别编码 361、336、339 和 405 个氨基酸。



Marker: DL5000 DNA Marker; 1: *CoPOD1*; 2: *CoPOD2*; 3: *CoPOD3*; 4: *CoPOD4*

图 1 *CoPOD1/2/3/4* 基因的 PCR 扩增结果

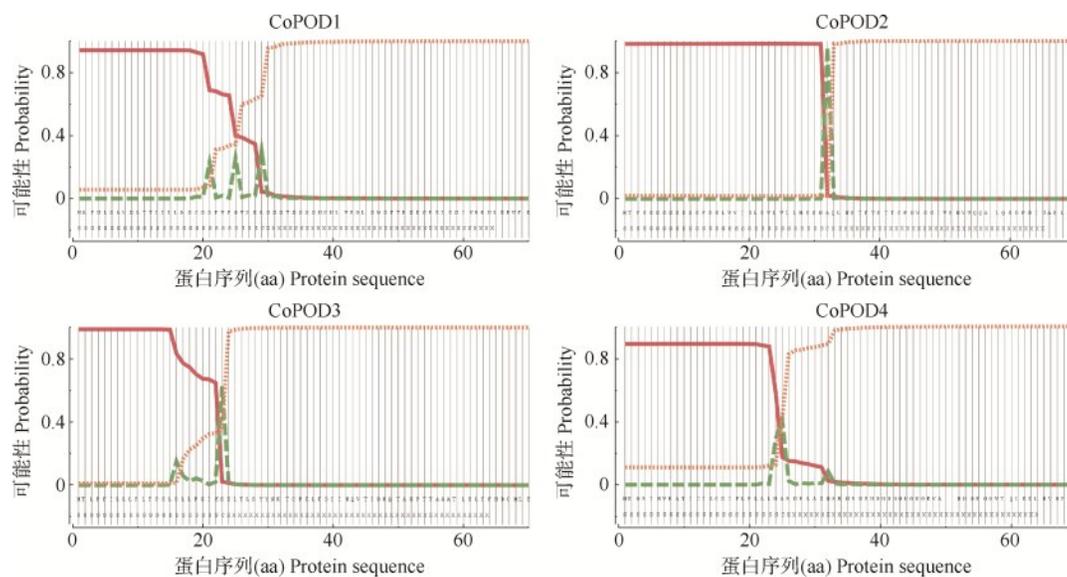
Fig.1 The PCR amplification product of *CoPOD1/2/3/4*

2.2 油茶 *PODs* 基因的生物信息学分析

2.2.1 油茶 *PODs* 蛋白质的理化性质分析 使用在线网站 ProtParam 和 ProtScale 对 *CoPOD1/2/3/4* 四个

蛋白质的理化性质进行预测和分析,结果表明它们的分子式分别为 $C_{1725}H_{2719}N_{475}O_{552}S_{13}$ 、 $C_{1535}H_{2421}N_{425}O_{514}S_{11}$ 、 $C_{1691}H_{2652}N_{442}O_{488}S_{17}$ 、 $C_{1956}H_{3101}N_{567}O_{582}S_{20}$, 原子总和分别为 5484、4906、5290、6226, 分子质量分别为 39.36、35.41、37.53、44.51 KDa, 理论等电点分别为 5.22、4.83、8.64 和 6.47, 总平均亲水性分别为 -0.150、-0.002、-0.062、-0.225, 均为亲水性蛋白质; 不稳定系数分别为 38.86、40.46、32.69、40.52, 根据不稳定系数推测 *CoPOD1/3* 属于稳定蛋白质、*CoPOD2/4* 属于不稳定蛋白质(不稳定系数高于 40 为不稳定蛋白,反之为稳定蛋白)。

2.2.2 油茶 *PODs* 蛋白质的信号肽分析 通过在线软件 TMHMM Server v. 2.0 和 SignalIP5.0 预测 *CoPOD1*、*CoPOD2*、*CoPOD3* 和 *CoPOD4* 这 4 个蛋白质的跨膜结构和信号肽,结果(图 2)表明:*CoPOD1/2/3/4* 这 4 个蛋白质均无跨膜结构,有信号肽,说明 4 个蛋白质不参与物质的跨膜运输,但均属于分泌蛋白质。其中 *CoPOD1* 前 29 个氨基酸为信号肽区,剪切位点在第 29 位点和第 30 位点间;*CoPOD2* 前 32 个氨基酸为信号肽区,剪切位点在第 32 位点和第 33 位点间;*CoPOD3* 前 23 个氨基酸为信号肽区,剪切位点在第 23 位点和第 24 位点间;*CoPOD4* 前 25 个氨基酸为信号肽区,剪切位点在第 25 位点和第 26 位点间。



红线表示信号肽类型(常规分泌通路/I型信号肽酶);绿线表示切割位点;橙线表示其他信号肽类型

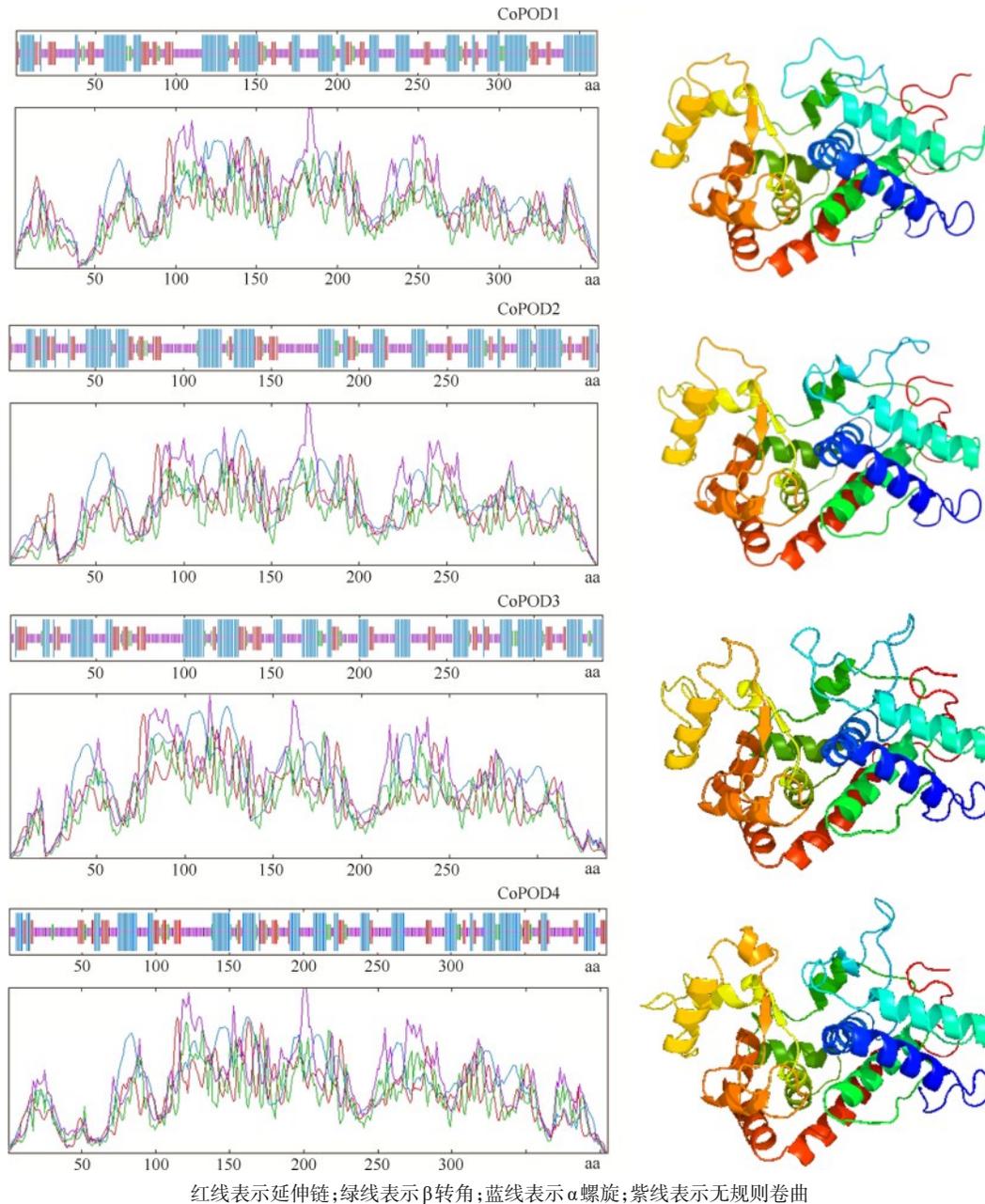
Red part indicated signal peptide type (conventional secretory pathway/I type signal peptidase); Green part indicated cleavage sites; Orange part indicated other signal peptide types

图2 油茶PODs蛋白质信号肽预测

Fig.2 The signal peptides prediction of PODs protein in *C. oleifera*

2.2.3 油茶PODs蛋白质的二级结构、三级结构及亚细胞定位分析 通过在线网站SOPMA预测POD蛋白质的二级结构,结果(图3)表明:CoPOD1蛋白质 α 螺旋所占比例最多,为39.89%; β 转角所占比例最少,为5.82%;无规则卷曲占37.67%;延伸链占16.62%。CoPOD2蛋白质无规则卷曲所占比例最多,为42.86%; β 转角所占比例最少,为5.06%; α 螺旋占36.01%;延伸链占16.07%。CoPOD3蛋白质无规则卷曲所占比例最多,为41.30%; β 转角所占比例最少,为5.60%; α 螺旋占36.87%;延伸链占16.22%。CoPOD4蛋白质无规则卷曲所占比例最多,为44.44%; β 转角所占比例最少,为6.91%; α 螺旋占32.10%;延伸链占16.54%。通过在线网站PHYRE2预测分析CoPOD1/2/3/4这4个蛋白质的三级结构,结果显示这4种蛋白质的三级结构较为相似并且主要类型均为 α 螺旋和无规则卷曲(图3),推测其在某些功能上存在相似之处。使用在线网站IncLocator对CoPOD1/2/3/4四个蛋白质进行预测分析,结果显示:CoPOD2/3/4蛋白质定位在细胞核的可能性最大,预测分数分别为0.774、0.684、0.552;CoPOD1蛋白质定位细胞质的可能性最大,预测得分为0.335。

2.2.4 油茶PODs蛋白质同源序列比对及系统进化树分析 利用NCBI Blast比对CoPOD1/2/3/4蛋白质并进行蛋白质同源序列搜索,根据每条蛋白质同源序列相似度高到低下载其他物种的POD蛋白质共19条,用于同源序列比对与系统进化树分析。发现油茶PODs蛋白质的氨基酸序列与茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.)PODs蛋白质的氨基酸序列相似度最高,分别为98.34%、98.38%、98.74%和92.10%。通过在线网站InterPro分析油茶PODs蛋白质的结构域显示:CoPOD1/2/3/4蛋白质均有过氧化物酶核心结构域、活性位点、血红素结合位点、钙结合位点和底物结合位点,据此初步验证CoPOD1/2/3/4属于POD家族成员。利用在线网站PROSCAN分析显示,CoPOD1/2/3/4含有数目不等的蛋白质基元,包括酰胺化位点(Amidation site)、N-豆蔻酰化位点(N-myristoylation site)、酪蛋白激酶II磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site)、N-糖基化位点(N-glycosylation site)等。其中cAMP和cGMP依赖性蛋白质激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site)是CoPOD2特有的,位于156~159 aa。



红线表示延伸链;绿线表示 β 转角;蓝线表示 α 螺旋;紫线表示无规则卷曲

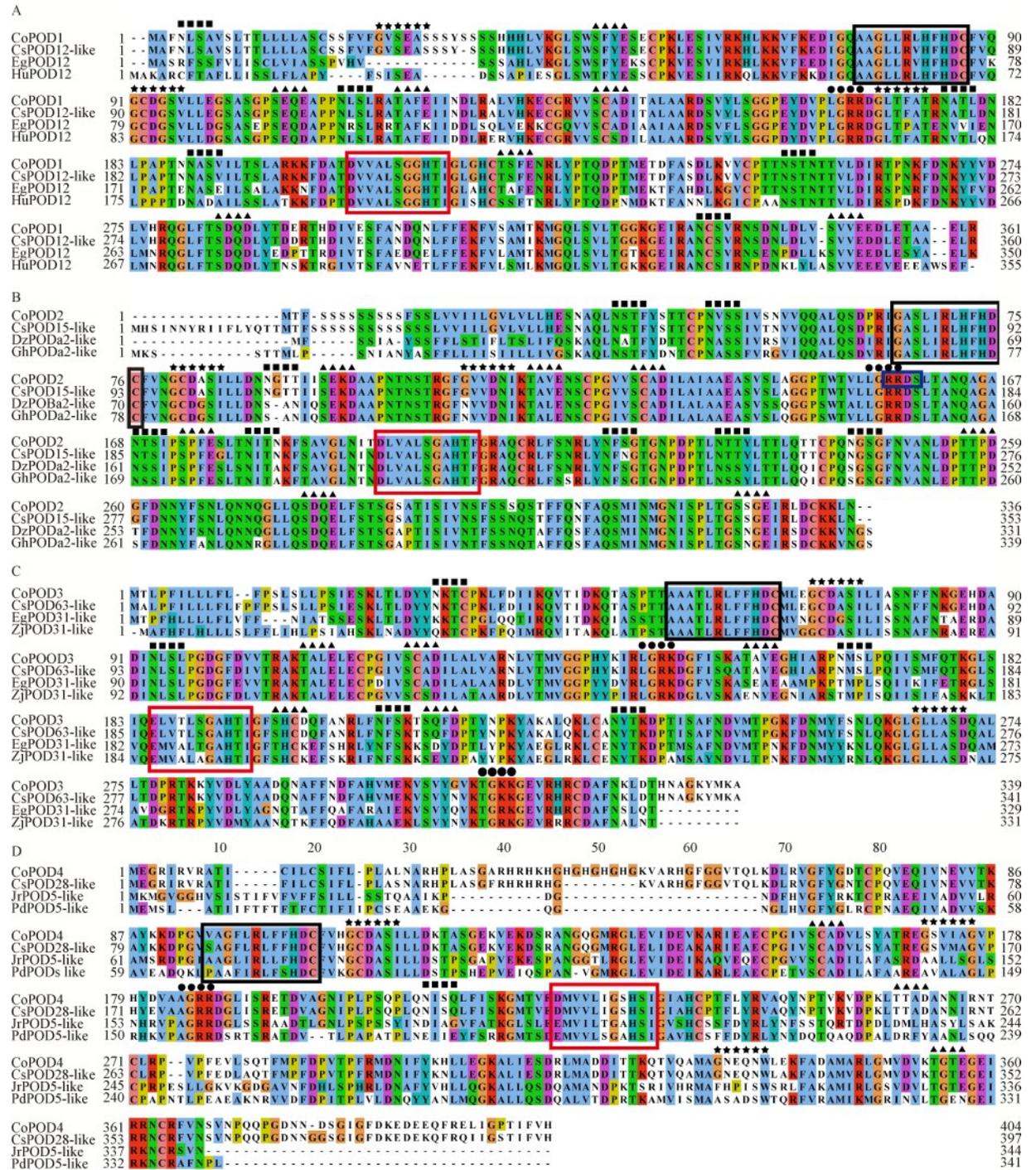
The red part indicated extended strand; The green part indicated β -turn; The blue part indicated α -helix; The purple indicated random coil

图3 油茶 PODs 蛋白质二级结构(左)与三级结构(右)预测

Fig.3 The secondary structure (left) and tertiary structure (right) prediction of PODs protein in *C. oleifera*

使用本地软件Jalview将CoPOD1/2/3/4蛋白质的氨基酸序列与茶树CsPOD12-like(XP_028106509.1)、大桉树(*Eucalyptus grandis* Hill.) EgPOD12(XP_010063836.2)、虎耳草(*Herrania umbratica*) HuPOD12(XP_021284657.1)、茶树CsPOD15-like(XP_028056399.1)、榴莲(*Durio zibethinus* Murr.) DzPODa2-like(XP_022743122.1)、陆地棉(*Gossypium hirsutum* Linn.) GhPODa2-like(XP_016669429.2)、茶树CsPOD63-like(XP_028074173.1)、大桉树EgPOD31-like(XP_010046652.2)、枣(*Ziziphus jujuba* Mill.) ZjPOD31-like(XP_015884246.1)、茶树CsPOD28-like(XP_

028101761.1)、核桃(*Juglans regia* L.) JrPOD5-like(XP_018805205.1)、扁桃(*Prunus dulcis* Mill.) PdPOD5-like(XP_034201876.1)等物种蛋白质的氨基酸序列进行比对(图4),发现以上蛋白质序列均有过氧化物酶活性位点(Peroxidases active site)和过氧化物酶近端血红素配体(Peroxidases proximal heme-ligand)序列。与CoPOD1/2/3/4蛋白质结构域分析结果有相似之处,再次验证CoPOD1/2/3/4蛋白质及其比对序列属于POD家族成员,猜测它们具有清除植株体内活性氧自由基的功能。



A~D 分别为 CoPOD1/2/3/4 与其亲缘关系较近物种同源 POD 蛋白质氨基酸序列比对。黑色矩形框为过氧化物酶活性位点,红色矩形框为过氧化物酶近端血红素配体序列,蓝色矩形框为 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白质激酶磷酸化位点。■ 标示为 N-糖基化位点, ▲ 标示为酪蛋白质激酶磷酸化 II 位点, ★ 标示为 N-豆蔻酰化位点, ● 标示为酰胺化位点。Co-: 油茶; Cs-: 茶树; Eg-: 大桉树; Hu-: 虎耳草; Dz-: 榴莲; Gh-: 陆地棉; Zj-: 枣; Jr-: 核桃; Pd-: 扁桃; 下同

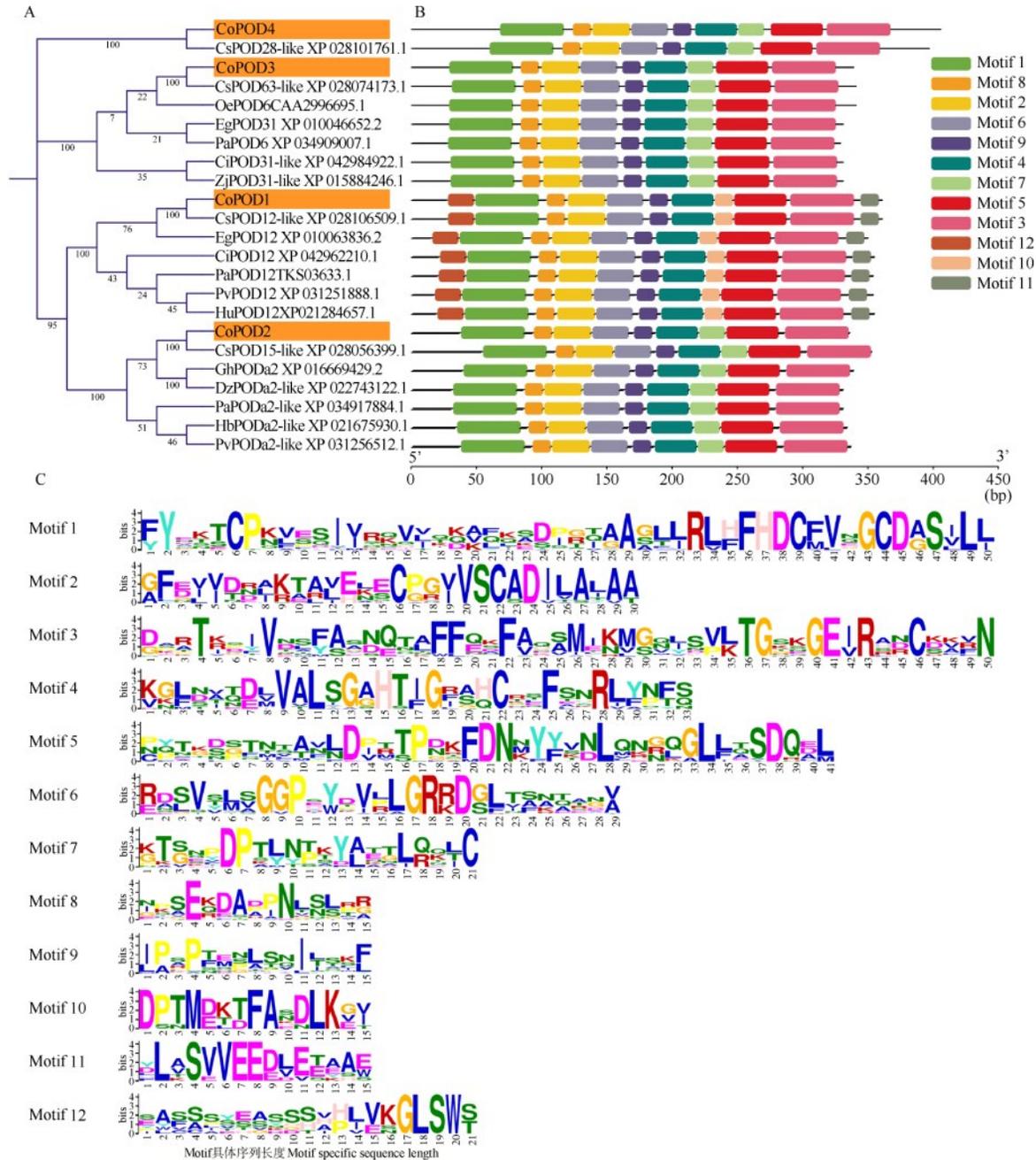
A-D are amino acid sequences of POD proteins homologous to CoPOD1/2/3/4 and closely related species, respectively. The black rectangle box is the peroxidase active site, the red rectangle box is the heme ligand sequence of peroxidase proximal, and the blue rectangle box is the cAMP and CGMP-dependent protein kinase phosphorylation site. ■ Identified as the N-glycosylation site, ▲ Identified as the casein kinase II phosphorylation site, ★ Identified as the N-myristamylation site, ● Identified as the amidation site. Co-: *C. oleifera*; Cs-: *C. sinensis*; Eg-: *Eucalyptus grandis* Hill.; Hu-: *Herrania umbratica*; Dz-: *Durio zibethinus* Murr.; Gh-: *Gossypium hirsutum* Linn.; Zj-: *Ziziphujuba* Mill.; Jr-: *Juglans regia* L.; Pd-: *Prunus dulcis* Mill.; The same as below

图4 油茶 PODs 蛋白质与其他物种同源 POD 蛋白质氨基酸序列比对

Fig. 4 The amino acid sequence comparison between PODs protein in *C. oleifera* and POD protein in other species

本研究从 NCBI 下载了其他物种的 19 条 POD 蛋白质并利用本地软件 MEGA 11、在线网站 ITOL 使用 NJ(Neighbor Joining)邻接法将 CoPOD1/2/3/4 与其他物种的 PODs 蛋白质构建系统进化树,结果(图 5A)显示,这 23 条蛋白质聚为 3 个独立分支,其中 CoPOD1/2 属于一个分支,CoPOD3/4 分别属于另

外两个分支。CoPOD1 与 CsPOD12-like、EgPOD12 聚合,其中与 CsPOD12-like 亲缘关系最近;CoPOD2 与 CsPOD15-like 聚为一支;CoPOD3 与 CsPOD63-like 聚为一支;CoPOD4 与 CsPOD28-like 聚为一支。由此可见油茶 PODs 蛋白质与茶树 PODs 蛋白质的亲缘关系最高。



A: 油茶 PODs 蛋白质系统进化树;B: 油茶 PODs 蛋白质与同源 POD 蛋白质保守基序分布;C: 油茶 PODs 蛋白质的保守基序(此图展示了 motif 在每个位置的保守程度,字母越高代表该位置的保守性越好)。Oe-: 油橄榄;Pa-: 白杨;Ci-: 山核桃;Hb-: 巴西橡胶树;Pv-: 开心果
A: PODs protein phylogenetic tree of *C. oleifera*; B: Distribution of conserved motif of PODs protein and homologous POD protein in *C. oleifera*; C: Conserved motif of PODs protein in *C. oleifera* (This figure shows the degree of conservatism of the motif in each position, the higher the letter, the better the conservatism of the position). Oe-: *Olea europaea* L.; Pa-: *Populus alba*; Ci-: *Carya illinoensis* Koch.; Hb-: *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.); Pv-: *Pistacia vera* L.

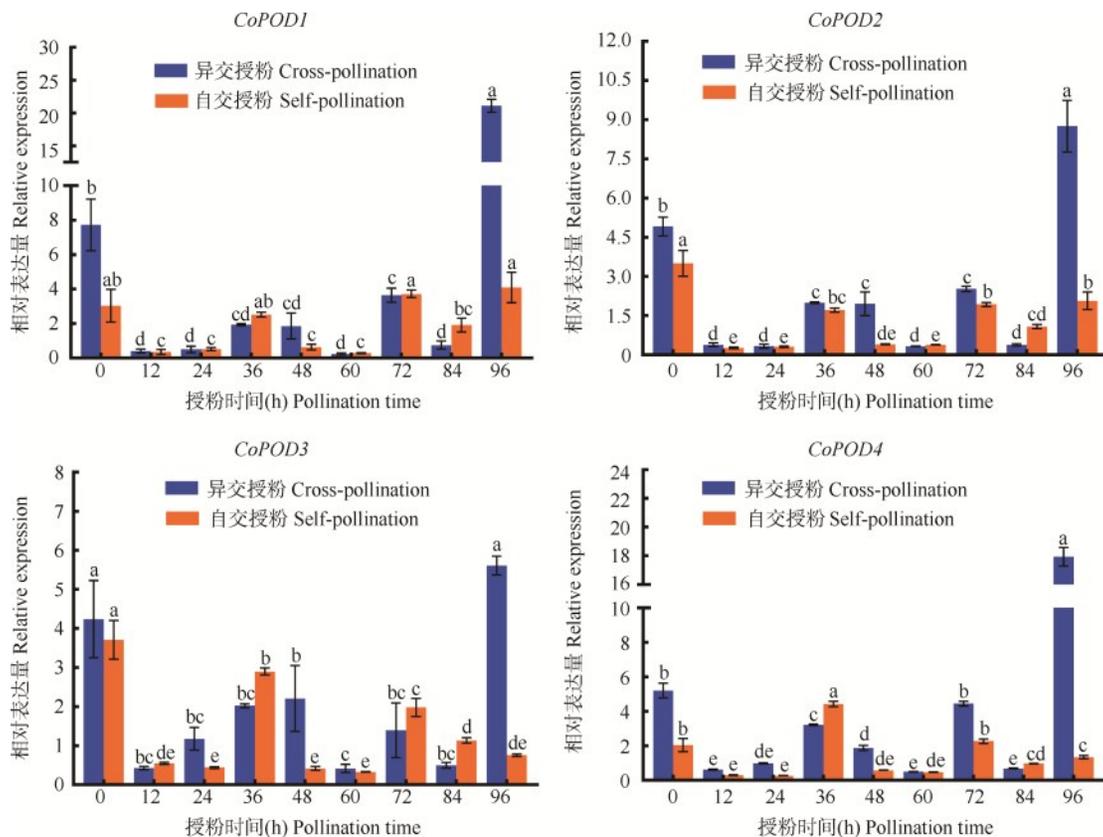
图5 油茶 PODs 蛋白质与其他物种 POD 蛋白质的系统进化树及蛋白质保守基序

Fig.5 The phylogenetic tree and conserved motifs of PODs proteins in *C. oleifera* and other species

2.2.5 油茶 PODs 蛋白质保守基序分析 使用在线网站 MEME、TBTOOLS 预测并分析以上参与构建系统进化树蛋白质的保守基序(motif),保守基序的数目设定为12。结果(图 5B、C)显示:所有建树蛋白质保守基序数目在9~11个,基序长度在15~50 aa。其中 motif 1、2、3、4、5、6、8、9 这8个保守基序是所有成员共有的,由此推测以上8个保守基序是 POD 家族的保守基序;而 motif 10、11、12 是 CoPOD1 及其亲缘关系较近的 CsPOD12-like、EgPOD12、CiPOD12、PaPOD12、PvPOD12、HuPOD12 特有的,从而推测 motif10、11、12 是 POD1 及 POD12 的特征保守基序;CoPOD1 及其亲缘关系较近的建树成员缺少 motif7。由此猜测保守基序的种类会对基因功能的行使产生影响,共有的保守基序决定基因在某些功能行使方面存在相似性,某些基因拥有的特征保守基序决定基因功能行使的特定性。

2.3 不同授粉处理下油茶雌蕊中 PODs 基因的表达模式分析

采用实时荧光定量 PCR 检测 *CoPODs* 基因在自交、异交授粉雌蕊中的表达情况。如图 6 所示,在自交授粉中,*CoPOD1/2/3/4* 基因相对表达量在授粉后 36 h 和 72 h 高于授粉后 12~84 h 内其他时间,只有 *CoPOD4* 基因的相对表达量在自交授粉后 36 h 与自交授粉 0 h 相比显著性上升,据此猜测 *CoPOD4* 基因在油茶自交不亲和反应中发挥重要作用。在异交授粉中,*CoPOD1/2/3/4* 基因的相对表达量在授粉后 0~84 h 均低于授粉 0 h,其中 *CoPOD1/2/4* 基因的相对表达量在授粉后 96 h 的相对表达量显著高于其他时期。总体来看,在授粉 0 h 自交授粉中 *CoPODs* 基因相对表达量低于异交,而在授粉 36 h 时自交授粉中 *CoPOD1/3/4* 基因相对表达量高于异交。因此猜测 *CoPOD1/2/3/4* 基因在油茶自交不亲和反应中的不同时间段发挥各自的保护机能。



不同小写字母代表在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

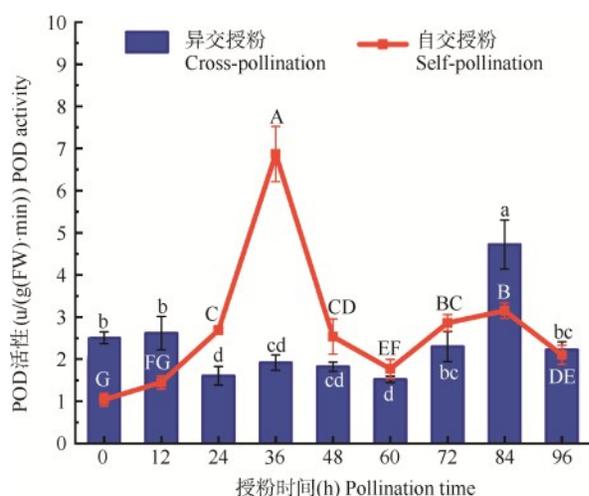
Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level

图 6 油茶 PODs 基因在自异交雌蕊中不同授粉时间下的表达分析

Fig.6 The expression analysis under different pollination time in pistils after self- and cross-pollination of PODs gene in *C. oleifera*

2.4 自交和异交授粉后不同时间雌蕊内 POD 酶活性变化

油茶自交和异交授粉后不同时间雌蕊内 POD 酶活性变化如图 7 所示:在 24~72 h 范围内自交授粉后雌蕊 POD 活性高于异交授粉;油茶自交授粉后雌蕊 POD 酶活性变化在授粉 12~36 h 范围内呈上升趋势,并在 36 h 时 POD 酶活性明显上升,达到最高峰,均值为 6.867 u/(g(FW)·min),授粉后 36~48 h 范围内 POD 酶活性明显下降,后随着时间的增加有所上升;油茶异交授粉后前期雌蕊 POD 酶活性变化幅度较小,在授粉 84 h 时达到最高峰,均值为 4.7203 u/(g(FW)·min)。总体而言,油茶自交授粉后雌蕊内 POD 酶活性与异交授粉相比有显著性差异,说明 POD 酶可能参与油茶内自交不亲和机制反应。



大写和小写字母分别表示自交和异交授粉中油茶雌蕊内 POD 酶活性显著性差异,不同字母代表在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

Uppercase and lowercase letters indicate significant differences in POD enzyme activity in pistil of *C. oleifera* during self-pollination and cross-pollination respectively, different letters represent significant differences at $P < 0.05$ level

图 7 油茶自、异交雌蕊中 POD 酶活性的动态变化

Fig.7 Dynamic change analysis of POD in pistils after self- and cross-pollination of *C. oleifera*

3 讨论

油茶是我国重要的木本食用油料树种^[21],茶油中富含 90% 油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸^[22]。根据国家林业和草原局数据统计,截至 2020 年,我国实有油茶林面积为 445.1 万公顷,油茶籽产量为 706 kg/hm²^[23]。造成油茶低产的原因有很多,其中最重要的原因之一是油茶具有自交不亲和性的特性。自交不亲和性是一种用于防止近亲繁殖和促进多种被子植物异交的机制,有研究发现在梨和油茶等

植物中自花授粉后花粉管的死亡属于细胞程序性死亡(PCD, programmed cell death),并且在梨中发现植物发生 PCD 之前会出现 ROS 积累的现象^[9,24]。前人研究发现在正常或胁迫条件下,植物细胞过氧化物酶体等很多部位中能产生 ROS^[25];同时有研究发现当植物体内 ROS 含量过多时,过氧化物酶会对其进行清除以维持内部环境的平衡^[26]。因此通过对油茶自、异交授粉后不同时间雌蕊内 POD 酶活性以及 *PODs* 基因表达量进行测定和分析,以此来探究油茶自交不亲和性与 POD 酶活性以及表达模式之间的关系。

POD 是过氧化物酶体的标志酶,是一类氧化还原酶,一方面参与 ROS 的产生,另一方面与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶相互协作,清除含量过高的自由基,使植物免受过多损害,在植物生长和发育过程中发挥至关重要的作用^[27-28]。本研究发现油茶在 0~12 h 范围内自交授粉后雌蕊内 POD 酶活性低于异交授粉,吴能表等^[29]在甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 中也发现授粉后初期花柱内自花授粉的 POD 酶活性低于异花授粉,猜测自花授粉属于不亲和授粉,而植株体内的受精机制尚未启动,自花授粉的 POD 酶活性与异花授粉相比相对较低。本研究发现自交授粉 24 h 后雌蕊内 POD 酶活性急剧上升在 36 h 达到峰值此后呈现下降趋势;同时根据实时荧光定量结果分析表明:*CoPOD1/2/3/4* 基因均在自交授粉后 24~48 h 范围内呈现显著上升至 36 h 又下降的趋势,与 POD 酶活性变化趋势相似,并且在授粉后 36 h 时 *CoPOD1/3/4* 基因的自交雌蕊表达量均高于异交雌蕊表达量。有研究发现油茶在自交授粉后前期花粉管能够正常生长,40 h 后花粉管生长速度开始放缓^[29],POD 酶活性和基因表达量先急剧上升又下降,猜测雌蕊内 POD 快速开启自我保护机制后^[30],在自交授粉 36 h 时 POD 酶活性和基因表达量达到顶峰,此后随着时间的增加抵御有害物质(活性氧自由基如 H₂O₂)的能力减弱,从而使花粉管的生长停滞;在授粉后 36 h 只有 *CoPOD2* 自交雌蕊表达量低于异交雌蕊表达量并且此时 *CoPOD4* 基因相对表达量显著高于授粉 0 h,通过蛋白质序列分析发现这 4 个蛋白质的三级结构、保守结构域和 motif 结构较为相似,暗示其功能和作用方式可能较为相似,因此猜测 *CoPOD1/2/3/4* 这 4 个基因之间在行使某些功能时可能存在功能冗余^[31],*CoPOD4* 基因在油茶自交不亲和反应中发挥重要作用。张雪梅^[32]研究发现具有自交不亲和性的苹果 (*Malus pumila*

Mill.)自花授粉24 h后POD酶含量变化较大,花粉管停止生长,这与本研究结果相似。本研究结果显示油茶异交授粉后前期雌蕊内POD酶活性总体基本稳定,异交授粉后0~84 h期间*CoPODs*基因相对表达量均低于授粉0 h,猜测异交授粉后前期雌蕊内活性氧的产生和清除处于动态平衡状态,花粉管能够正常生长,有利于花粉管顺利通过花柱,因异交授粉属于亲和反应,雌蕊内没有受到过量活性氧攻击,所以授粉后前期PODs基因相对表达量较低。本研究结果显示异交授粉60 h后雌蕊内基因相对表达量均有不同幅度的上调,而后在授粉72 h后雌蕊内POD酶活性显著上调,由此可以看出基因相对表达量与酶活性之间存在滞后性,因此猜测此时POD酶清除活性氧的能力变强,有利于花粉管穿过珠孔进入胚囊,这与前人研究发现72 h后油茶花粉管到达胚珠^[30]的结果相呼应。对于异交授粉84 h后基因相对表达量出现显著性上调这一现象,猜测是由于酶活性上升的信号反馈给基因调控通路,从而使PODs基因相对表达量急剧上升。为了进一步探究PODs基因在油茶自交不亲和中的作用,本研究对其分子特征和基因相对表达量进行深入分析。

本研究通过对*CoPOD1/2/3/4*这4个基因编码的蛋白质分别进行预测后发现均有信号肽,信号肽(Signal peptide)是蛋白质肽链N端包含16~30个氨基酸的一段多肽,可以引导蛋白质跨膜转移到特定亚细胞结构或分泌到胞外^[33]。因此初步认为CoPOD1/2/3/4这4个蛋白质属于分泌蛋白质。蛋白质结构域预测发现CoPOD1/2/3/4这4个蛋白质均含有过氧化物酶核心结构域、活性位点、血红素结合位点等,已研究的石榴^[34]、苧麻^[35]等物种POD蛋白质也含有上述结构域和位点,并且属于过氧化物酶III基因家族,据此初步认为油茶CoPOD1/2/3/4这4个蛋白质也属于过氧化物酶家族。同源序列比对结果发现,油茶PODs的蛋白质序列与其他物种的POD蛋白质序列均含有过氧化物酶活性位点和过氧化物酶近端血红素酶体序列,其中油茶POD与茶树POD的相似性最高,系统进化树结果显示,CoPOD1与CsPOD12-like聚在同一小支,CoPOD2与CsPOD15-like聚在同一小支,CoPOD3与CsPOD63-like聚在同一小支,CoPOD4与CsPOD28-like聚在同一小支,与比对结果一致,由此证明油茶POD与茶树POD亲缘关系最近。有研究发现POD基因在茶树生长发育和非生物胁迫响应中发挥重要作用^[36],由此猜测POD基因在油茶自交不亲和反

应中发挥了重要作用。

4 结论

本研究通过对*CoPOD1/2/3/4*基因进行克隆和生理信息学分析,发现*CoPOD1/2/3/4*基因均属于过氧化物酶家族,含有过氧化物酶核心结构域和活性位点等。通过对油茶自交和异交授粉下POD基因相对表达量和POD酶活性进行分析,发现在异交授粉前期POD酶活性处于动态平衡、CoPODs基因相对表达量均低于授粉0 h,授粉60 h后CoPODs基因相对表达量有所上调,授粉72 h后酶活性出现显著性上调,由此可以看出因油茶异交授粉属于亲和反应,所以授粉前期雌蕊内酶活性处于动态平衡、基因相对表达量较低,在后期花粉管穿过珠孔时基因表达和酶活性会存在滞后性。在自交授粉中油茶雌蕊内POD酶与CoPODs基因相对表达量在授粉24~48 h呈现显著上调至36 h后又下降的趋势,并有研究表明油茶自交授粉36 h后花粉管生长变缓^[2],因此本研究认为在油茶自交授粉中,为减少活性氧对雌蕊的损害,油茶体内保护机制对此迅速作出反应,使CoPODs基因相对表达量和酶活性均显著上调并参与油茶的自交不亲和反应,后续将对该类基因的相关功能进行进一步研究,为揭示油茶自交不亲和性生理响应机制提供研究基础。

参考文献

- [1] 胡芳名, 谭晓风, 刘惠民. 中国主要经济树种栽培与利用. 北京: 中国林业出版社, 2006: 370-383
Hu F M, Tan X F, Liu H M. Culture and utilization of Chinese non-wood product forest trees. Beijing: Chinese Forestry Publishing House, 2006: 370-383
- [2] 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. The cytological study on late-acting self-incompatibility in *Camellia oleifera*. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2017
- [3] 廖婷, 袁德义, 彭邵锋, 邹锋. 油茶自交和异交过程花粉管生长的荧光显微观察. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(7): 34-37
Liao T, Yuan D Y, Peng S F, Zou F. Fluorescence microscopic observation of pollen tube growth in self-crossing and outcrossing of *Camellia oleifera*. Journal of Central South University of Forestry and Technology, 2012, 32(7): 34-37
- [4] 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, Liu D M, Zou F, Tan X F. Anatomical characteristics of self-incompatibility in

- Camellia oleifera*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51 (2): 60-68
- [5] Franklin-tong N, Franklin F. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science*, 2003, 8 (12): 598-605
- [6] Hiscock S J, Doughty J, Dickinson W H G. A 7-kDa pollen coating-borne peptide from *Brassica napus* interacts with S-locus glycoprotein and S-locus-related glycoprotein. *Planta*, 1995, 196 (2): 367-374
- [7] Murfett J, Atherton T L, Mou B Q, Gassert C S. S-RNase expressed in transgenic nicotiana causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 1994, 367 (6463): 563-566
- [8] Huang S, Lee H S, Kao T H. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell*, 1994, 6 (7): 1021-1028
- [9] 王春雷. 梨花柱 S-RNase 介导自花花粉管死亡特点和路径研究. 南京: 南京农业大学, 2010
Wang C L. Study on the characteristics and pathway of incompatible pollen tube death mediated by style S-RNase in *Pyrus pyrifolia*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [10] 吕品, 张岩, 李建华, 张凤云, 陈玉玲. 植物细胞活性氧的产生和清除机制. *生物学教学*, 2010, 35 (2): 4-5
Lv P, Zhang Y, Li J H, Zhang F Y, Chen Y L. Mechanism of production and clearance of reactive oxygen species in plant cells. *Biology Teaching*, 2010, 35 (2): 4-5
- [11] Del D 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): 1-11
- [12] Nasser S, Kemal K, Schenk P M. Global plant stress signaling: Reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7 (187): 187
- [13] 何学利. 植物体内的保护酶系统. *现代农业科技*, 2010, 528 (10): 37-38
He X L. The protective enzyme system in plants. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2010, 528 (10): 37-38
- [14] 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 incompatible Yali pear and its self-compatible mutations. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2005
- [15] 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, 28 (2): 162-165
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. Studies on SOD, POD and CAT activity between self-compatible and self-incompatible lines in *Eruca sativa* Mill.. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 2006, 28 (2): 162-165
- [16] He Y F, Song Q Q, Wu Y F, Chen H. TMT-Based quantitative proteomic analysis reveals the crucial biological pathways involved in self-Incompatibility responses in *Camellia oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (6): 1987
- [17] Zhou J Q, Lu M Q, Yu S S, Liu Y Y, 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
- [18] 李合生. 植物生理生化试验原理与技术. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-169
Li H S. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments. Beijing: Higher Education Press, 2000: 164-169
- [19] Zeng Y L, Tan X F, Zhang L, Long H X, Wang B M, 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
- [20] 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. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2001, 25 (4): 402-408
- [21] 庄瑞林. 中国油茶. 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2008: 1-14
Zhuang R L. *Camellia oleifera* in China. 2nd edn. Beijing: Chinese Forestry Publishing House, 2008: 1-14
- [22] 何方, 胡芳名. 经济林栽培学. 北京: 中国林业出版社, 2004: 278-279
He F, Hu F M. Cultivation of economic forest. Beijing: Chinese Forestry Publishing House, 2004: 278-279
- [23] 范筱元, 杜娟, 周晓亮, 李自博, 严茂林. 中国油茶生产区比较优势分析与影响因素研究. *中国油脂*, 2022, DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220608
Fan X Y, Du J, Zhou X L, Li Z B, Yan M L. Comparative advantage analysis and influencing factors of *Camellia oleifera* production areas in China. *China Oils and Fats*, 2022, DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220608
- [24] 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
- [25] Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, 2011, 194 (1): 7-15
- [26] You J, Chan Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front Plant Science*, 2015, 6 (4): 690-695
- [27] Pan R H, Liu J, Hu J P. Peroxisomes in plant reproduction and seed-related development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 61(7): 784-802
- [28] 徐晶, 谢彦兵. 植物体内保护酶系统的研究. *海峡药学*, 2016, 28 (9): 40-42
Xu J, Xie Y B. The study of protective enzyme system in

- plants. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2016, 28 (9): 40-42
- [29] 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
- [30] 周俊琴. 油茶自交不亲和性的组学解析与关键基因研究. 长沙: 中南林业科技大学, 2020
Zhou J Q. Omic analysis and key genes research of self-incompatibility in *Camellia oleifera*. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2020
- [31] 郝向阳, 孙雪丽, 刘范, 项蕾蕾, 王天池, 赖钟雄, 程春振. 非洲菊4个POD基因的克隆及表达分析. *西北植物学报*, 2018, 38 (10): 1777-1786
Hao X Y, Sun X L, Liu F, Xiang L L, Wang T C, Lai Z X, Cheng C Z. Cloning and expression analysis of four *gerbera* peroxidase genes. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38 (10): 1777-1786
- [32] 张雪梅. 不同苹果品种S基因交互作用的分子及生理学研究. 保定: 河北农业大学, 2009
Zhang X M. Studies on molecule and physiology of S gene interaction in apple cultivars. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2009
- [33] 薛庆中. DNA和蛋白质序列数据分析工具. *新疆农业科学*, 2012, 49 (7): 130
Xue Q Z. DNA and protein sequence data analysis tools. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2012, 49 (7): 130
- [34] 冯立娟, 史作亚, 杨雪梅, 唐海霞, 焦其庆, 尹燕蕾. 石榴POD基因家族鉴定及生物信息学分析. *分子植物育种*, 2020, 18 (10): 3172-3184
Feng L J, Shi Z Y, Yang X M, Tang H X, Jiao Q Q, Yin Y L. Bioinformatics analysis and identification of POD gene family in *Pomegranate*. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18 (10): 3172-3184
- [35] 朱守晶, 周精华, 揭雨成, 邢虎成, 钟英丽, 余玮, 段卓. 苧麻抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆和表达分析. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 (5): 879-884
Zhu S J, Zhou J H, Jie Y C, Xing H C, Zhong Y L, She W, Duan Z. Cloning and expression analysis of homologous gene APX from Ramie (*Boehmeria nivea* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 (5): 879-884
- [36] 史晓霞, 张宝会, 姚新转, 吕立堂. 茶树III类过氧化物酶基因家族的鉴定及表达模式分析. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (11): 1314-1319
Shi X X, Zhang B H, Yao X Z, Lv L T. Identification and expression pattern analysis of class III peroxidase gene family in *Camellia sinensis* (L.). *Chinese Journal of Biologics*, 2021, 34 (11): 1314-1319