



碎米荠超氧化物歧化酶基因家族成员的鉴定和分析

付伟, 李林, 康宇, 龙澜, 杨永康, 殷红清, 向极钎, 梅磊

引用本文:

付伟, 李林, 康宇, 龙澜, 杨永康, 殷红清, 向极钎, 梅磊. 碎米荠超氧化物歧化酶基因家族成员的鉴定和分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(3): 301–310.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4476>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

铁皮石斛DoSMT2基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of DoSMT2 Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

三裂叶薯NBS-LRR类抗病基因的筛选鉴定与结构分析

Screening and Identification and Structural Analysis of NBS-LRR Family Genes in *Ipomoea triloba*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(5): 495–504 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4184>

铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析

Identification and Analysis of WOX Transcription Factor in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 301–310 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

蔓花生PEPC基因家族的生物信息学分析

Bioinformatics Analysis of PEPC Gene Family in *Arachis duranensis*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(2): 107–115 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3804>

向下翻页, 浏览PDF全文

碎米荠超氧化物歧化酶基因家族成员的鉴定和分析

付伟^{1,2}, 李林^{1,2}, 康宇^{1,2}, 龙澜^{1,2}, 杨永康^{1,2}, 殷红清^{1,2*}, 向极钎^{1,2}, 梅磊^{2,3}

(1. 恩施土家族苗族自治州农业科学院, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北省富硒产业技术研究院, 湖北 恩施 445000; 3. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: 为了解碎米荠(*Cardamine hirsuta*)的 SOD 基因特征, 对 SOD 家族成员的基因结构、染色体定位、系统进化关系进行了分析, 对顺式作用元件和蛋白结构进行了预测, 并利用 qRT-PCR 技术检测各家族成员的组织表达模式。结果表明, 碎米荠基因组中共有 10 个 SOD 基因(*ChSODs*), 包括 6 个 *Cu/Zn-SOD*、3 个 *Fe-SOD* 和 1 个 *Mn-SOD*。编码的 *ChSODs* 蛋白有 57~324 个氨基酸, 分子量为 6 419.41~34 659.01 kDa, 理论等电点为 4.92~9.60; 系统进化树分析表明, 碎米荠的 *ChSOD* 与拟南芥的 *AtSOD* 的同源性较高; *ChSODs* 在根、茎、叶中均有表达, 且在叶中高表达, 其中 CARHR085500 和 CARHR256690 在叶和茎中表达量较高; 顺式作用元件预测表明, 碎米荠 SOD 响应多种非生物胁迫, 其中对 ABA 和低温胁迫较为敏感; *ChSODs* 蛋白质的二级和三级结构具有差异性。这表明碎米荠 SOD 基因在抗氧化过程中发挥重要作用。

关键词: 碎米荠; SOD; 基因家族

doi: 10.11926/jtsb.4476

Identification and Analysis of Superoxide Dismutase Gene Family Members of *Cardamine hirsuta*

FU Wei^{1,2}, LI Lin^{1,2}, KANG Yu^{1,2}, LONG Lan^{1,2}, YANG Yongkang^{1,2}, YIN Hongqing^{1,2*}, XIANG Jiqian^{1,2}, MEI Lei^{2,3}

(1. Enshi Tujia & Miao Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445000, Hubei, China; 2. Hubei Selenium Industrial Technology Research Institute, Enshi 445000, Hubei, China; 3. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: In order to understand the characteristics of SOD gene in *Cardamine hirsuta*, the gene structure, chromosome location, phylogenetic relationship of SOD gene family were analyzed, the cis-acting element and protein structure were predicted, and the tissue expression patterns of the gene family numbers were measured by qRT-PCR. The results showed that a total of 10 SOD genes, named *ChSODs*, were identified from *C. hirsuta* genome, including 6 *Cu/Zn-SOD*, 3 *Fe-SOD* and 1 *Mn-SOD*. The amino acid numbers of *ChSODs* ranged from 57 to 324, with molecular weight from 6 419.41 to 34 659.01 kDa, and theoretical isoelectric point from 4.92 to 9.60. Phylogenetic tree showed that *ChSOD* had close relation with *AtSOD* of *Arabidopsis*. There were expression of *ChSOD* in root, stem and leaf, and the expression in leaves was high. Furthermore, the expression of CARHR085500 and CARHR256690 were high in leaves and stems. There were cis-acting elements responded to various abiotic stresses, in especial to ABA and low temperature stress. The secondary and tertiary structures of *ChSODs* were different. Therefore, these indicated that SOD gene of *C. hirsuta* play an important role in antioxidant process.

Key words: *Cardamine hirsuta*; SOD; Gene family

收稿日期: 2021-06-29

接受日期: 2021-09-27

基金项目: 硒蛋白产业化关键技术研究与项目(12602-2-120); 湖北省引进国外人才和智力项目(2020BJH024)资助

This work was supported by the Project for Key Technology Research and Application of Selenoprotein Industrialization (Grant No. 12602-2-120), and the Project for Introduction of Foreign Talents and Intelligence in Hubei (Grant No. 2020BJH024).

作者简介: 付伟(1988~), 男, 硕士研究生, 研究方向为硒资源开发与利用。E-mail: 1872554198@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 709862376@qq.com

活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)是植物细胞在需氧代谢过程中产生的具有高度化学反应活性的含氧集团,如超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟基自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧(1O_2)等。当植物遭受胁迫时,抗氧化酶系统受到损伤导致活性氧大量积累,引起一系列生理生化紊乱对植物造成损害,甚至导致不可修复性的代谢功能障碍以及细胞死亡^[1]。在长期的进化过程中,植物为了抵御氧化伤害,维持正常的生理代谢,形成了抗氧化酶促清除系统和非酶促清除系统协同作用清除活性氧。而超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)作为植物防御系统的第一道防线对清除氧自由基起关键作用,可催化超氧阴离子自由基(O_2^-)歧化生成 H_2O_2 和 O_2 ,再通过过氧化物酶和氧化物酶将 H_2O_2 转化为 H_2O ,从而实现活性氧的清除^[2],其活性与植物的生长发育以及抗逆性等密切相关性^[3-5]。

超氧化物歧化酶是一种含金属的酶,其通过金属辅因子得失电子清除活性氧自由基。根据 SOD 结合的金属辅因子种类,可分为 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD 和 Ni-SOD 等 4 类^[5-6]。其中, Cu/Zn-SOD 主要存在于高等植物的叶绿体和细胞质中,与植物抗逆性有密切关系^[7]。在小麦(*Triticum aestivum*)中,组成型表达的 Cu/Zn-SOD 响应各种非生物胁迫的程度不同^[8]。低温胁迫下,茶树(*Camellia sinensis*)的 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 基因上调表达, Fe-SOD 基因受到抑制^[9]。转基因植株中, Cu/Zn-SOD 基因的过表达增强了木薯(*Manihot esculenta*)^[10]耐旱性和甘薯(*Dioscorea esculenta*)^[11]的盐胁迫耐受性。而 Fe-SOD 和 Mn-SOD 主要分布于低等植物中,主要涉及植物的抗逆性^[12]。在烟草(*Nicotiana tabacum*)与苜蓿(*Medicago sativa*)中, Fe-SOD 和 Mn-SOD 明显增强了植株的抗冷、抗氧化能力^[13-14]。Ni-SOD 首次从链霉菌(*Streptomyces*)中发现,目前报道其仅存在于少数原核生物如绿藻和细菌中^[15]。Tsang 等^[16]通过亚细胞和系统发育分析表明,仅 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD 和 Mn-SOD 在植物中共存。

碎米荠(*Cardamine hirsuta*)为十字花科(Brassicaceae)碎米荠属碎米荠组植物,分布广泛,全株可作野菜食用和入药^[17]。有研究表明,碎米荠组有些植物具有较强的耐盐性,如弯曲碎米荠(*C. flexuosa*)^[18]和堇叶碎米荠(*C. violifolia*)^[17]等。碎米荠全基因组测序的完成,为 *ChSOD* 基因家族的全基因

组分析奠定了基础。然而,目前尚未有从全基因组水平上对碎米荠 *SOD* 基因功能进行研究的报道。本研究通过生物信息学对碎米荠 *SOD* 基因家族进行全基因组鉴定分析,分析其结构、进化关系和染色体定位等信息,为碎米荠抗氧化机制研究提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

选取颗粒饱满的碎米荠种子于 4 °C 冰箱春化 24 h 后,置于培养皿中黑暗催芽 4 d。待种子萌发后,将其移至塑料花盆中(蛭石:营养土=1:1),并在光周期为 12 h/12 h、25 °C 下培养 15 d,分别收集碎米荠幼苗的根、茎和叶,用液氮快速冷冻后保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 *SOD* 基因家族成员鉴定

通过数据库(<http://chi.mpipz.mpg.de/assembly.html>)下载碎米荠全基因组数据^[19],通过 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载 SOD 的隐马氏模型文件(PF00080、PF00081 和 PF02777),并以该文件为搜索条件,利用 HMMER 3.0 中的 Hmsearch 程序对碎米荠蛋白质序列进行搜索($E < 1 \times 10^{-5}$),并去除重复,然后通过 NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/stuctu/cdd/wrpsb.cgi>)和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行鉴定和筛选,最终得到碎米荠 SOD 家族蛋白质序列。根据碎米荠基因组注释文件信息,获得 SOD 基因在染色体上的位置分布信息,并利用 Map Chart 绘制碎米荠 SOD 基因在染色体上的定位图。最后,利用 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/)分析碎米荠 SOD 的分子量、氨基酸数量和等电点。

1.3 系统发育关系和分类

从 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>)和 RGAP 数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)分别下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)的 SOD 氨基酸序列,利用 Clustal W 对碎米荠、拟南芥和水稻的 SOD 氨基酸序列进行比对,并用 MEGA 7.0 软件通过相邻连接法(NJ)构建系统进化树,设置重复次数为 1 000,提高进化分支树结果的可靠性。

1.4 基因结构和基序组成

利用在线网站 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析碎米荠 *SOD* 基因家族成员的基因结构; 利用在线软件 MEME (<http://memesuite.org/>) 分析碎米荠 *SOD* 氨基酸序列中的保守基序, 设置 motif 为 10; 利用 Clustal W 对碎米荠 *SOD* 氨基酸序列进行比对, 并用 MEGA 7.0 软件相邻接法(NJ)构建系统进化树, 设置重复次数为 1 000。最后利用 TBtools 绘制碎米荠 *SOD* 基因家族成员的系统进化树、基因组成和基因结构的组合图。

1.5 顺式作用元件分析

提取碎米荠 *SOD* 基因编码序列上游 1.5 kb 文件, 提交到 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对顺式作用元件进行识别, 并利用在线网站 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制碎米荠 *SOD* 基因家族顺式作用元件图^[20]。

1.6 *SOD* 基因表达分析

取碎米荠根、茎、叶冷冻样本各 50 mg, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳

和 Nanodrop 2000 检测 RNA 质量, 以确保总 RNA 的完整性和浓度。参照 SuperscriptIII first strand cDNA synthesis Kit (天根生化科技有限公司, 北京)说明书进行 cDNA 第一链合成, 置于 -20 °C 保存备用。

利用 Primer Premier 3.0 进行荧光定量 PCR 引物设计(表 1), 引物由睿博兴科生物技术有限公司广州分公司合成。以 *GADPH* 为内参基因, 采用 Super-Real PreMix Plus (SYBR Green) PCR Kit (天根生化科技有限公司, 北京)进行实时荧光定量 PCR。扩增体系(20 μ L): 2 \times SuperReal PreMix Plus 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。反应程序: 95 °C 预变性 10 min; 然后 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共 45 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行数据分析, 并用 Graph Pad Prism 8 绘制柱状图。

1.7 *SOD* 的二级、三级结构预测

利用在线网站 SOMPA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 分别对碎米荠 *SOD* 蛋白序列进行二级、三级结构预测。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	Tm (°C)	产物长度 Production length (bp)
CARHR008750-F	GTGGATCTATTGACTCTTGGGTGC	61.7	546
CARHR008750-R	CCGTGAGAAAGGTGAAAGATTACC	61.5	
CARHR194970-F	CGGTGATCTGTCTCTATAGGCATCA	61.6	585
CARHR194970-R	AACACCTGAAAACAAGCCTCATCC	61.8	
CARHR121080-F	GGCTTTCACCTCGTAATAAGTCGTC	61.7	577
CARHR121080-R	ACAACAGAGTTAGGACCAGTCAGAG	61.7	
CARHR012800-F	CGGTCTCTCAATTTCTCCTCCTCT	61.8	591
CARHR012800-R	GGGGAAGATCCAAGTATCCTCACAA	61.9	
CARHR232490-F	GTCGGAATAACCACTTAAGTCGGTG	61.6	550
CARHR232490-R	CATTGATCCCAGAAGAAGTCTGGG	61.9	
CARHR085500-F	GATTCATCACCAGAAGCATCACCAG	61.9	562
CARHR085500-R	AATTGAGTGGTTCACATGACCTGC	61.8	
CARHR190230-F	GAAGAAGCTCTCTTAGGTCTCGAGG	61.9	564
CARHR190230-R	GTTCCTCAGGTGATGCAAGTACAAG	61.8	
CARHR256990-F	ACTTCTCACCATTGATACCTGGGAG	61.9	571
CARHR256990-R	CATCTAGACCGCAAAGGAAGAAC	61.9	
CARHR166500-F	TTCGGATCCTTAGAGGGATTGATCC	61.5	520
CARHR166500-R	ATACCTGTGGATAGTAGGCATGCTC	61.8	
CARHR120080-F	CTTCAGCCTCTAATTTGCGTTTCGAG	61.7	220
CARHR120080-R	TCACAGCGTTGGGAGTCTTTACTA	61.5	
<i>GADPH</i> -F	TTCCTTTGAGGTTAGGGAGCACTAG	61.8	514
<i>GADPH</i> -R	GATGCTGATGTCAAACCTTCTGGAG	61.9	

2 结果和分析

2.1 碎米荠 SOD 家族成员

通过 HMMER3.0 中的 Hmsearch 程序对碎米荠氨基酸序列进行搜索,同时利用 NCBI-CDD 和 SMART 进行蛋白结构域鉴定,剔除了不含保守结构域的氨基酸序列,并手动去除重复的氨基酸序列和不完整的氨基酸序列,最终鉴定出 10 个碎米荠 SOD 基因家族成员,不均匀地分布在 7 条染色体上,

其中在 1、4 和 6 号染色体上各有 2 个,而 3、5、7 和 8 号染色体上各有 1 个(图 1)。

对碎米荠 SOD 家族成员进行氨基酸序列和结构分析表明(表 2),有 4 个 ChSOD (CARHR008750、CARHR121080、CARHR085500 和 CARHR256990)分布在染色体正义链上,其余 6 个分布在反义链上;氨基酸序列长度为 57 (CARHR120080)~324 (CARHR012800);蛋白质分子量为 6 419.41~34 659.01 kDa;等电点在 4.92~9.60,且酸性蛋白较多。

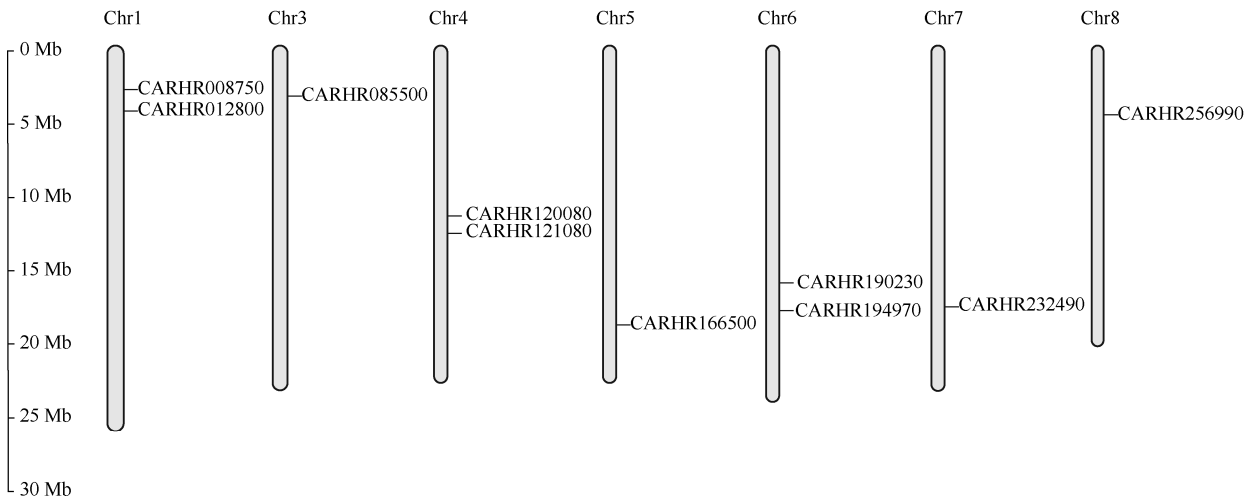


图 1 碎米荠 SOD 基因的染色体分布

Fig. 1 Chromosome location of *ChSOD* genes

表 2 碎米荠 SOD 基因及其编码蛋白信息

Table 2 *ChSOD* genes and information of their encoding proteins

序号 No.	基因 ID Gene ID	染色体定位 Chromosome location	核苷酸链 DNA strand	氨基酸数量 Number of amino acid	等电点 PI	分子量 Molecular weight (kDa)
1	CARHR008750	1	正义链 Plus	154	5.64	15 178.86
2	CARHR194970	6	反义链 Minus	167	6.74	17 084.05
3	CARHR121080	4	正义链 Plus	216	6.70	21 852.50
4	CARHR012800	1	反义链 Minus	324	5.61	33 870.45
5	CARHR232490	7	反义链 Minus	273	9.20	30 738.19
6	CARHR085500	3	正义链 Plus	234	7.82	25 548.98
7	CARHR190230	6	反义链 Minus	267	7.70	30 411.49
8	CARHR256990	8	正义链 Plus	310	4.92	34 659.01
9	CARHR166500	5	反义链 Minus	227	6.21	24 987.30
10	CARHR120080	4	反义链 Minus	57	9.60	6 419.41

2.2 系统发育分析

通过 Clustal W 对碎米荠 10 个 SOD 的氨基酸序列进行比对,结果表明(图 2),SOD 的氨基酸序列间同源性较高,且主要集中在 C 端,该区域可能是 SOD 蛋白行使功能的关键区域。

用 MEGA 7.0 对碎米荠、拟南芥和水稻 SOD 家族成员的系统进化关系进行了比较,并构建了系统发育进化树。结果表明(图 3),相较于水稻,碎米荠与拟南芥的 SOD 蛋白质具有相似的结构而聚在一起,说明碎米荠与拟南芥同源性较高,可通过分析

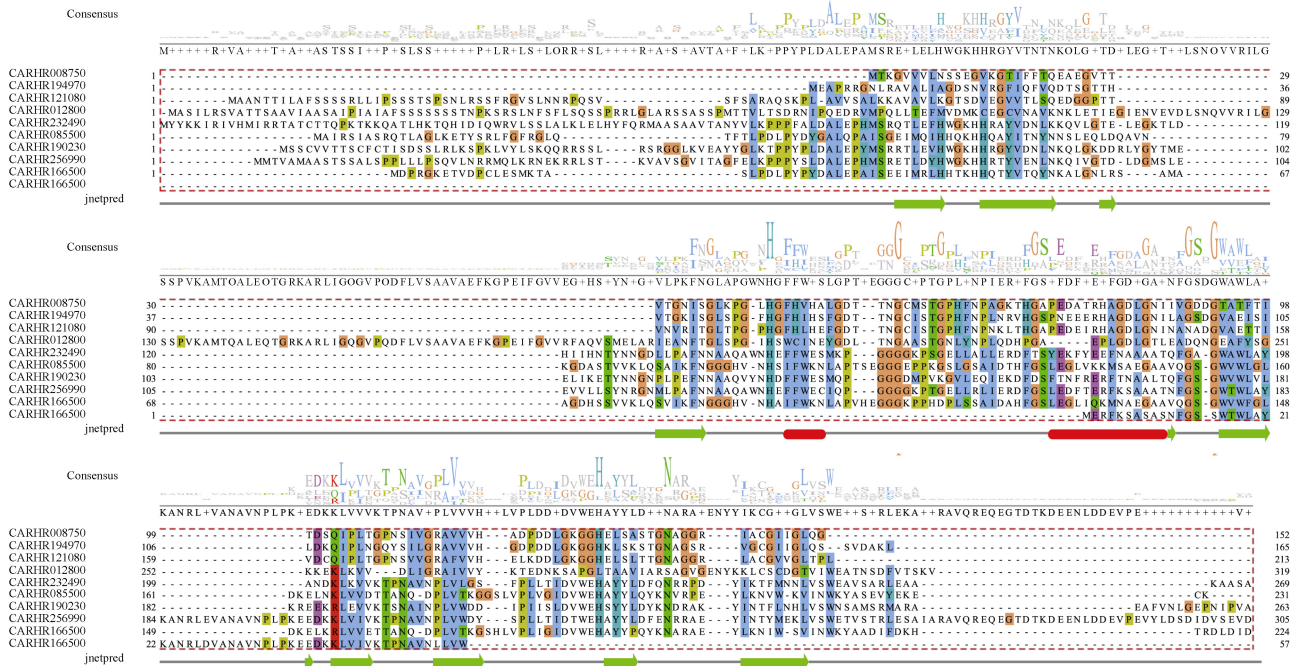


图2 ChSOD 蛋白功能域的多序列比对。Consensus: 保守程度;jnetpred: 预测结果;红色: α 螺旋;绿色: β 折叠。

Fig. 2 Multiple alignment of functional domains of ChSOD. Consensus: Degree of conservation; jnetpred: Prediction result; Red: α -Helix; Green: β -Folding.

拟南芥相应同源序列来推测碎米荠基因的功能;此外,进化树还表明,Cu/Zn-SOD 起源于同一分支,而 Mn-SOD、Fe-SOD 起源于另一分支,表明碎米荠 Mn-SOD 和 Fe-SOD 也可能起源于同一祖先。

2.3 SOD 基因结构和基序组成

基因结构分析表明,ChSODs 含有2~9个外显子,其中 CARHR256990 含有9个外显子,而 CARHR120080 仅有2个外显子(图4)。而对 ChSOD 进行保守基序分析表明,同一亚族内的 SOD 保守基序的种类与数量大体相同,而不同亚族内的 SOD 保守基序的种类和数量差异较大,Motif 3、Motif 5 仅出现在 Fe-SOD/Mn-SOD (CARHR012800、CARHR194970、CARHR008750 和 CARHR121080)分支中,而其余8种 Motif 只存在于 Cu/Zn-SOD (CARHR256990、CARHR120080、CARHR190230、CARHR232490、CARHR085500 和 CARHR166500)分支中。

2.4 ChSODs 启动子顺式作用元件分析

为了进一步研究 ChSODs 在非生物胁迫响应中的潜在机制,提取 ChSODs 起始位点上游 1.5 kb 序列,提交到 Plant CAR 检测顺式作用元件,包括 ABA 响应元件、干旱诱导响应元件(MBS)、低温响应元件(LTR)、防御和应激反应元件(TC-rich)和创伤响应

元件(WUN-motif)。从图5可见,ChSODs 含有2~11个顺式作用元件,其中 CARHR008750、CARHR012800 和 CARHR194970 仅有2个顺式作用元件,而 CARHR166500 有11个顺式作用元件。此外,有6个 ChSODs 基因具有 ABA 响应元件,5个基因具有 LTR 响应元件,5个基因具有 TC-rich 响应元件,4个基因具有 WUN-motif 响应元件和4个基因具有 MBS 响应元件。因此,推测在响应非生物胁迫时,ChSODs 对 ABA 和低温胁迫响应更敏感^[20]。

2.5 ChSODs 表达分析

基因的组织表达与功能密切相关,从图6可见,ChSODs 在碎米荠根、茎和叶中均有表达,以叶中的表达量最高,其次为茎和根。另外,CARHR085500 在叶和茎中的表达量最高(分别为根的8和5倍),其次为 CARHR256990 (分别为根的5和3倍)。

2.6 ChSOD 蛋白的二级、三级结构预测

利用 SOMPA 预测可知,在 ChSOD 家族成员的蛋白质二级结构中, α -螺旋、无规则卷曲和延伸链较高,而 β -转角较低。其中多数蛋白质的 α -螺旋占 25.08%~54.55%,无规则卷曲为 29.82%~56.36%,延伸链为 11.69%~32.89%,而 β -转角绝大多数低于 10%。因此,预测在 ChSOD 蛋白二级结

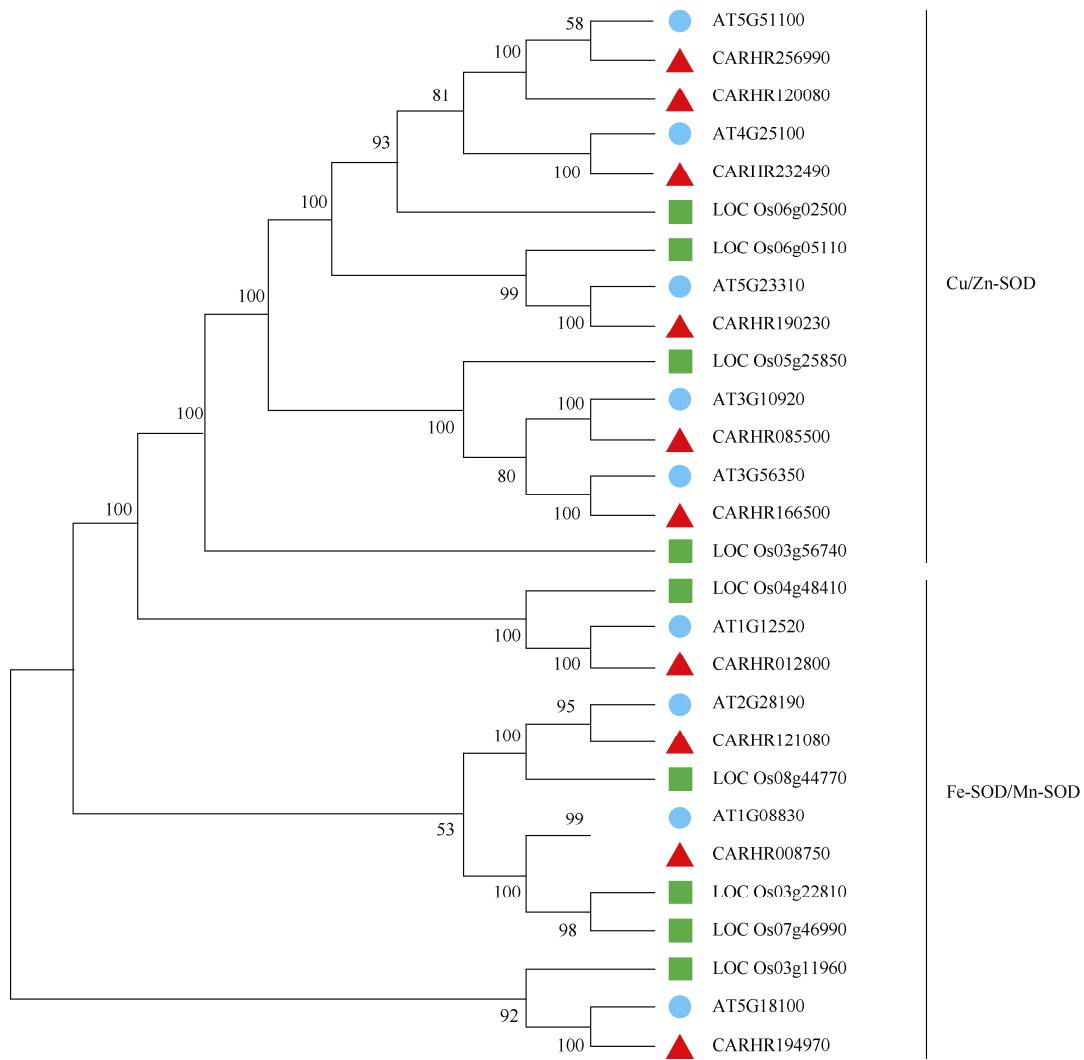


图 3 碎米荠(▲)、拟南芥(●)和水稻(■)中 SOD 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of SOD in *Cardamine hirsuta* (▲), *Arabidopsis thaliana* (●) and *Oryza sativa* (■)

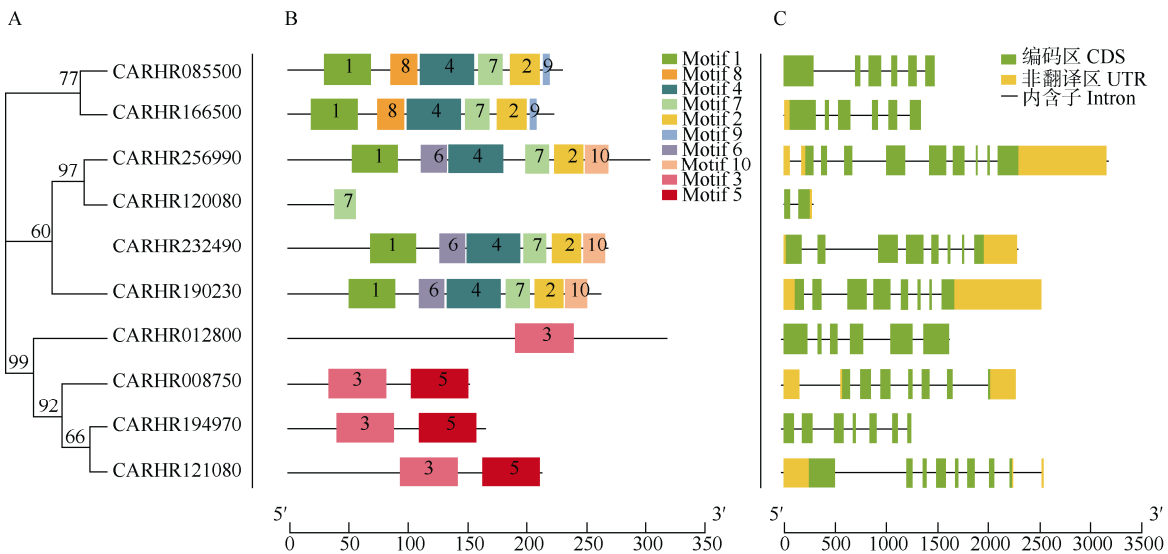


图 4 碎米荠 SOD 家族成员的系统发育关系(A)、基序(B)和基因结构(C)

Fig. 4 Phylogenetic tree (A), motif (B) and gene structure (C) of ChSOD members

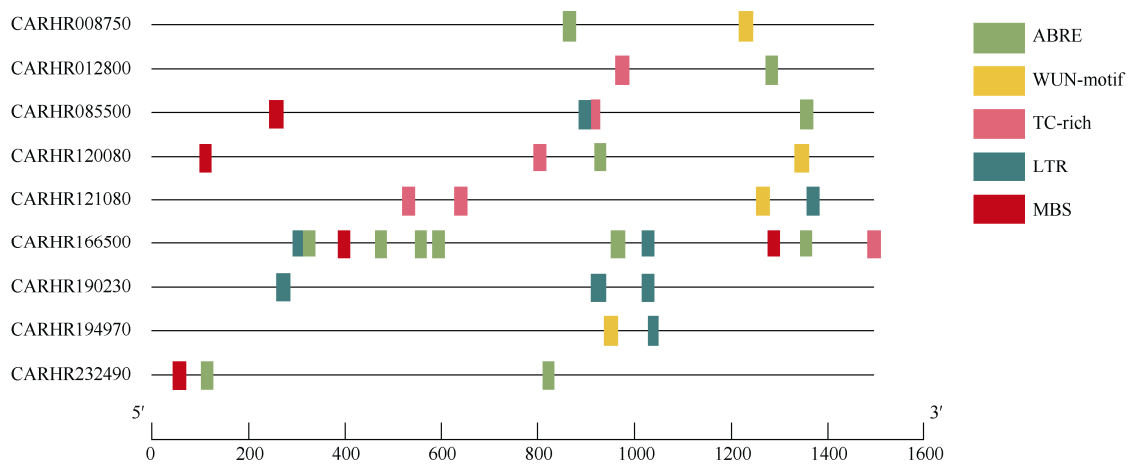


图 5 预测 *ChSOD* 启动子中的顺式元件。ABRE: ABA; LTR: 低温; MBS: 干旱; TC-rich: 应激反应; WUN-motif: 创伤。

Fig. 5 Predicted *cis*-elements in *ChSOD* promoters. ABRE: ABA; LTR: Low temperature; MBS: Drought; TC-rich: Stress; Wun-motif: Trauma.

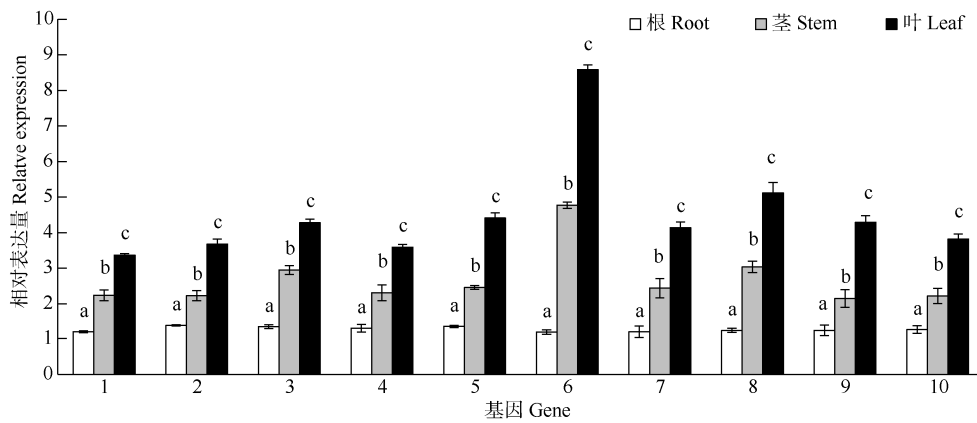


图 6 *ChSODs* 在不同组织中的表达。1~10 见表 2。n=3; 相同基因柱上不同字母表示差异显著(P<0.05)。

Fig. 6 Expression of *ChSODs* in different tissues. 1 - 10 see Table 2. n=3; Different letters upon column of the same gene indicate significant difference at 0.05 level.

构中, α -螺旋、无规则卷曲起主要作用(表 3)。

SWISS-MODEL 对 ChSOD 家族成员的蛋白三级结构进行预测, ChSOD 蛋白均含有 α -螺旋、 β -

折叠、无规则卷曲等空间构象, 但结构具有差异性; 另外, 各 ChSOD 蛋白含有的螺旋-转角-螺旋(HTH)数目存在差异(图 7)。

表 3 ChSOD 蛋白二级结构

Table 3 Secondary structure of ChSOD

序号 No.	基因 ID Gene ID	α -螺旋 α -Helix		β -转角 β -Turn		无规则卷曲 Random coil		延伸链 Extended chain	
		数量 Number	%	数量 Number	%	数量 Number	%	数量 Number	%
1	CARHR008750	4	2.63	15	9.87	83	54.61	50	32.89
2	CARHR194970	9	5.45	12	7.27	93	56.36	51	30.91
3	CARHR121080	19	8.92	21	9.86	106	49.77	67	31.46
4	CARHR012800	80	25.08	26	8.15	129	40.44	84	26.33
5	CARHR232490	129	47.96	8	2.97	89	33.09	43	15.99
6	CARHR085500	126	54.55	9	3.90	69	29.87	27	11.69
7	CARHR190230	105	39.92	13	4.94	90	34.22	55	20.91
8	CARHR256990	142	46.56	12	3.93	115	37.70	36	11.80
9	CARHR166500	104	46.43	12	5.36	76	33.93	32	14.29
10	CARHR120080	16	28.07	9	15.79	17	29.82	15	26.32

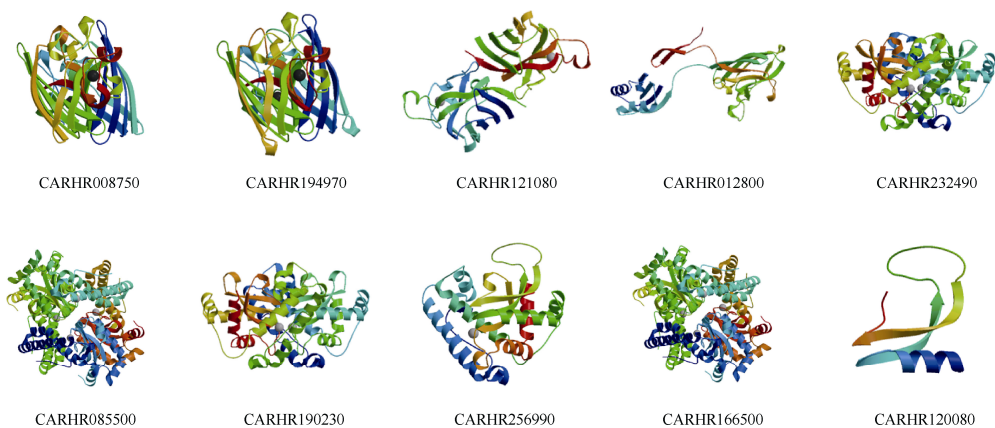


图 7 ChSOD 蛋白的三级结构

Fig. 7 Tertiary structure of ChSOD

3 结论和讨论

SOD 是植物体内清除氧自由基的关键酶,其活性与植物生长发育和抗逆性等密切相关^[3-5]。近年来,随着全基因组分析技术的发展,已对许多植物的 SOD 家族成员进行了分析,并证明其参与调控植物的多重生理过程,如玉米(*Zea mays*)^[21]、拟南芥^[22]、水稻^[23]、油菜(*Brassica napus*)^[24]等。随着基因组学的发展和碎米荠全基因组测序的完成,为解析碎米荠 SOD 基因家族成员的功能提供了理论和技术支持。

本研究中,通过生物信息学方法共鉴定出了 10 个碎米荠 *ChSOD* 基因,其结构简单,且大多编码亲水性蛋白,表明碎米荠 *ChSOD* 基因结构较稳定,基因在进行复制时较难发生可变剪切,功能相对稳定。根据 SOD 蛋白活性中心金属辅因子的类型,可将其分为 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD 和 Fe-SOD,其中,组成型表达的 Cu/Zn-SOD 和 Fe-SOD 含量较稳定,既参与清除代谢过程中产生的 ROS,也参与植物抗逆性形成;Mn-SOD 的表达极易受外界影响,在清除逆境胁迫产生的大量 ROS 中发挥着重要作用^[25]。研究表明,Cu/Zn-SOD 对植物的多种抗逆性尤为重要,如抗寒、抗旱、耐盐碱等^[24,26-27]。碎米荠 10 个 *ChSOD* 基因中,有 6 个芥 *ChSOD* 基因鉴定为 Cu/Zn-SOD 基因,说明碎米荠抗逆性与 SOD 密切相关,且 Cu/Zn-SOD 可能发挥主导作用。

前人根据 SOD 蛋白的结构同源性推测,不同物种的 Mn-SOD 和 Fe-SOD 蛋白可能起源于同一祖先——光合细菌^[28-29]。刘家林等^[23]证实了水稻 Mn-SOD 和 Fe-SOD 可能起源于同一祖先。对碎米荠 SOD

蛋白进行预测,显示 Cu/Zn-SOD 归于一支,而 Mn-SOD 和 Fe-SOD 归于另一分支,表明在碎米荠中,Mn-SOD 和 Fe-SOD 蛋白也可能起源于同一祖先。而不同 SOD 家族成员间的理化性质的差异性可能与产生旁系同源基因,形成新的生物学功能,以更好地适应环境^[30]。与水稻相比,碎米荠的 *ChSOD* 与拟南芥的 *AtSOD* 亲缘关系更近,可能与同属于双子叶植物有关,据此,可通过拟南芥 *AtSOD* 功能来推测碎米荠 *ChSOD* 基因的功能。基因在组织中的表达量与功能密切相关,*ChSOD* 在叶中的高表达可能与叶片活跃的光合作用有关。CARHR085500 和 CARHR256690 在碎米荠叶和茎中表达量较高,这与前人^[31]报道 Cu/ZnSOD 转录产物主要集中于根和茎的结果一致。此外,高等植物的基因表达主要在转录水平上进行调控,且受多种顺式作用元件和反式作用因子的相互调节。对 *ChSOD* 启动子顺式作用元件预测表明,碎米荠 SOD 启动子中含有 ABA、干旱、低温、防御、应激和创伤等非生物胁迫响应元件,且含有 ABA 和低温响应元件的基因较多,推测 *ChSOD* 在响应非生物胁迫时,可能对 ABA 和低温胁迫响应更敏感。这有助于了解基因调控模式,对深入了解碎米荠的生长机制及其外界环境的调控模式具有重要意义。

在碎米荠全基因组中,共鉴定出 10 个 SOD 基因,分布在 7 条染色体上;*ChSOD* 蛋白的分子量与氨基酸数目成正比,且多数为酸性蛋白;*ChSOD* 基因含有 2~11 个外显子。碎米荠 SOD 基因包含 6 个 Cu/Zn-SOD、3 个 Fe-SOD 和 1 个 Mn-SOD,可分为 2 个亚家族,位于同一亚族的 SOD 基因具有相似的保守基序和基因结构。碎米荠 *ChSOD* 与拟南芥

AtSOD 的同源性较高。qRT-PCR 分析表明, *ChSODs* 在碎米荠根、茎和叶中均有表达, 以叶中的表达量最高。CARHR085500 在碎米荠叶和茎中的表达量最高, 其次为 CARHR256690。在响应非生物胁迫时, *ChSODs* 对 ABA 和低温胁迫响应较敏感。ChSOD 蛋白质的二级、三级结构中, 以 α -螺旋和无规则卷曲比例较高, 可能起主导作用, 但不同 ChSOD 蛋白质的空间构象和螺旋-转角-螺旋(HTH)存在差异。

参考文献

- [1] LEE S H, AHSAN N, LEE K W, et al. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164(12): 1626–1638. doi: 10.1016/j.jplph.2007.01.003.
- [2] MIURA C, SUGAWARA K, NERIYA Y, et al. Functional characterization and gene expression profiling of superoxide dismutase from plant pathogenic phytoplasma [J]. *Gene*, 2012, 510(2): 107–112. doi: 10.1016/j.gene.2012.09.001.
- [3] RIZHSKY L, LIANG H J, MITTLER R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38921–38925. doi: 10.1074/jbc.M304987200.
- [4] GUO L H, WU X L, GONG M. Roles of glutathione reductase and superoxide dismutase in heat-shock-induced cross adaptation in maize seedlings [J]. *Plant Physiol Commun*, 2005, 41(4): 429–432.
郭丽红, 吴晓岚, 龚明. 谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶在玉米幼苗热激诱导的交叉适应中的作用 [J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(4): 429–432.
- [5] BOWLER C, VAN MONTAGN M, INZE D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83–116. doi: 10.1146/annurev.pp.43.060192.000503.
- [6] DONG L, HE Y Z, WANG Y L, et al. Research progress on application of superoxide dismutase (SOD) [J]. *J Agric Sci Technol*, 2013, 15(5): 53–58. doi: 10.3969/j.issn.1008-0864.2013.05.08.
董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展 [J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(5): 53–58. doi: 10.3969/j.issn.1008-0864.2013.05.08.
- [7] ABREU I A, CABELLI D E. Superoxide dismutases: A review of the metal-associated mechanistic variations [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(2): 263–274. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.11.005.
- [8] WANG P, DUAN W J, WANG Y K, et al. Cloning and expression analysis of a Cupro-Zinc superoxide dismutase gene from wheat photo-thermosensitive genic male sterile line BS366 [J]. *J Plant Genet Resour*, 2017, 18(5): 939–951. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2017.05.017.
王鹏, 段文静, 王玉昆, 等. 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 [J]. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(5): 939–951. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2017.05.017.
- [9] ZHOU C Z, ZHU C, FU H F, et al. Genome-wide investigation of superoxide dismutase (SOD) gene family and their regulatory miRNAs reveal the involvement in abiotic stress and hormone response in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223609. doi: 10.1371/journal.pone.0223609.
- [10] XU J, DUAN X G, YANG J, et al. Coupled expression of Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in cassava improves tolerance against cold and drought stresses [J]. *Plant Signal Behav*, 2013, 8(6): e24525. doi: 10.4161/psb.24525.
- [11] YAN H, LI Q, PARK S C, et al. Overexpression of *CuZnSOD* and *APX* enhance salt stress tolerance in sweet potato [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 109: 20–27. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.09.003.
- [12] FAIZE M, BURGOS L, FAIZE L, et al. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(8): 2599–2613. doi: 10.1093/jxb/erq432.
- [13] VAN CAMP W, CAPIAU K, VAN MONTAGU M, et al. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112(4): 1703–1714. doi: 10.1104/pp.112.4.1703.
- [14] MCKERSIE B D, MURNAGHAN J, JONES K S, et al. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic Alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122(4): 1427–1438. doi: 10.1104/PP.122.4.1427.
- [15] DUPONT C L, NEUPANE K, SHEARER J, et al. Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases [J]. *Environ Microbiol*, 2008, 10(7): 1831–1843. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01604.x.
- [16] TSANG E W T, BOWLER C, HÉROUART D, et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(8): 783–792. doi: 10.2307/3869272.
- [17] XIANG J Q, LI Y J, YANG Y K, et al. Research status of *Cardamine* [J]. *J Hubei Univ Natl (Nat Sci)*, 2011, 29(4): 440–443. doi: 10.3969/j.issn.1008-8423.2011.04.022.
向极钎, 李亚杰, 杨永康, 等. 碎米荠的研究现状 [J]. *湖北民族学院学报(自然科学版)*, 2011, 29(4): 440–443. doi: 10.3969/j.issn.1008-8423.2011.04.022.
- [18] WU M R, MOU D, WEN L M, et al. Study on selenium resistance of

- bent camelina [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2017, 45(16): 132–134. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2017.16.034.
- 吴美儒, 牟迪, 温灵敏, 等. 弯曲碎米芥耐硒能力的研究 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(16): 132–134. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2017.16.034.
- [19] GHORBANI M M, BAGHERI H, GHOLAMI M. Genome-wide study of flowering-related MADS-box genes family in *Cardamine hirsuta* [J]. *3 Biotechnol*, 2020, 10(12): 518. doi: 10.1007/s13205-020-02521-w.
- [20] SUN Y G, CAI T R, JI X Z, et al. Genome-wide bioinformatics analysis of *bZIP* gene family in *Pyrus communis* [J]. *For Ecol Sci*, 2021, 36(1): 24–34. doi: 10.13320/j.cnki.hjfor.2021.0004.
- 孙耀国, 蔡天润, 姬行舟, 等. 西洋梨全基因组 *bZIP* 基因家族生物信息学分析 [J]. *林业与生态科学*, 2021, 36(1): 24–34. doi: 10.13320/j.cnki.hjfor.2021.0004.
- [21] DU J, ZHU Z, LI W C. 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.
- [22] GUO C M, CHEN Z M, CHEN C L. *AtADC2* enhances salt tolerance through regulating activities of superoxide dismutase and catalase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol J*, 2015, 51(7): 1067–1074. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2015.0240.
- 郭彩明, 陈宗明, 陈春丽. 精氨酸脱羧酶基因 *AtADC2* 通过调节超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性增强拟南芥耐盐性 [J]. *植物生理学报*, 2015, 51(7): 1067–1074. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2015.0240.
- [23] LIU J L, OUYANG L J, ZENG J L, et al. Genome-wide analysis of rice *SOD* gene family and expression research under stress [J]. *Mol Plant Breed*, 2018, 16(9): 2753–2760. doi: 10.13271/j.mpb.016.002753.
- 刘家林, 欧阳林娟, 曾嘉丽, 等. 水稻 *SOD* 基因家族的全基因组分析及逆境胁迫下表达研究 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(9): 2753–2760. doi: 10.13271/j.mpb.016.002753.
- [24] GUO D, SONG Y F, ZHENG Z X, et al. Effects of exogenous substances on the seeding growth and physiological characteristics of *Trollius chinensis* under salt stress [J]. *Mol Plant Breed*, 2018, 16(20): 6861–6866. doi: 10.13271/j.mpb.016.006861.
- 郭栋, 宋雅菲, 郑志新, 等. 外源物质对盐胁迫下金莲花幼苗生长及生理特性的影响 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(20): 6861–6866. doi: 10.13271/j.mpb.016.006861.
- [25] WEI J, XU C, LI K X, et al. Progress on superoxide dismutase and plant stress resistance [J]. *Plant Physiol J*, 2020, 56(12): 2571–2584. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2020.0311.
- 魏婧, 徐畅, 李可欣, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗性 [J]. *植物生理学报*, 2020, 56(12): 2571–2584. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2020.0311.
- [26] ZHANG Y, LUO X F, SHEN Y B. Dynamic changes of anti-oxidation system in new cultivars of *Robinia pseudoacacia* under gradual drought stress of soil [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2005, 22(2): 166–169. doi: 10.3969/j.issn.2095-0756.2005.02.008.
- 张怡, 罗晓芳, 沈应柏. 土壤逐渐干旱过程中刺槐新品种苗木抗氧化系统的动态变化 [J]. *浙江林学院学报*, 2005, 22(2): 166–169. doi: 10.3969/j.issn.2095-0756.2005.02.008.
- [27] SONG F N, YANG C P, LIU X M, et al. Effect of salt stress on activity of superoxide dismutase (SOD) in *Ulmus pumila* L. [J]. *J For Res*, 2006, 17(1): 13–16. doi: 10.1007/s11676-006-0003-7.
- [28] BEYER W F Jr, FRIDOVICH I. *In vivo* competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese-superoxide dismutase of *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(1): 303–308. doi: 10.1016/S0021-9258(18)52435-2.
- [29] TOUATI D. Superoxide dismutase in bacteria and pathogen protists [M]// SCANDALIOS J G. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses: Cold Spring Harbor Monograph Series*, Vol. 34. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: 447–482.
- [30] THORNTON J W, DESALLE R. Gene family evolution and homology: Genomics meets phylogenetics [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2000, 1: 41–73. doi: 10.1146/annurev.genom.1.1.41.
- [31] PERL-TREVES R, GALUN E. The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(4): 745–760. doi: 10.1007/BF00037058.