

杧果*Mn-MiSOD*基因的克隆与表达模式分析

余海霞*, 罗聪*, 徐趁, 何新华**

广西大学农学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁530004

摘要: 本研究在前期研究基础上, 采用改良RACE技术和RT-PCR技术克隆了一个杧果*Mn-MiSOD*基因的全长序列。生物信息学分析显示, 该cDNA全长为794 bp, 包含一个690 bp的开放阅读框, 编码230个氨基酸, 分子量为25.67 kDa, 等电点为6.3。表达模式分析显示, 该基因在各个组织中均表达, 但在成熟叶片和果实中表达水平更高。低温胁迫、盐胁迫和PEG干旱胁迫均诱导该基因的表达。热处理、柠檬酸处理、草酸处理、1-MCP处理以及热处理+1-MCP处理上调*Mn-MiSOD*基因在果实中的表达水平。实验结果表明, *Mn-MiSOD*基因可能在杧果逆境胁迫和采后生理方面起重要作用。

关键词: 杧果; *Mn-SOD*基因; 逆境胁迫; 采后处理; 表达模式

Molecular Cloning and Expression Analysis of *Mn-MiSOD* Gene from Mango

YU Hai-Xia*, LUO Cong*, XU Chen, HE Xin-Hua**

College of Agriculture, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: A full-length cDNA sequence of *Mn-MiSOD* was cloned from mango cultivar 'SiJi' using modified RACE techniques and RT-PCR based on our previous study. Bioinformatics analysis showed that this sequence consists of 794 bp with an open reading frame of 690 bp, encoding a polypeptide of 230 amino acids with a predicted molecular mass of 25.67 kDa and theoretical isoelectric points (pI) of 6.3. Expression analysis indicated that *Mn-MiSOD* expressed in various tissues, but high expression levels were found in mature leaves and fruits. The expression of *Mn-MiSOD* could be induced by low temperature, salt and PEG stress. We also found that the post-harvest treatment with heat water, citric acid, oxalic acid, 1-MCP and heat water+1-MCP could up-regulate *Mn-MiSOD* gene expression in mango fruit. The experimental results showed that the *Mn-MiSOD* gene may play important roles in adversity stress and post-harvest physiology in mango.

Key words: *Mangifera indica* (mango); manganese superoxide dismutase gene; stress; expression pattern

植物在生长发育过程中, 容易遭受到生物或非生物胁迫, 比如病原物侵染、低温胁迫、高温胁迫、高盐胁迫和干旱胁迫等。这些逆境胁迫使植物产生大量的活性氧, 而这些物质的富集将严重影响细胞的功能和植物的正常生长发育, 甚至可以引起植株死亡(窦俊辉等2010)。植物在长期的进化中, 形成了一套抵御活性氧积累的抗氧化物酶系统, 其中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是植物中广泛存在的一类能够清除活性氧的一类金属酶, 它几乎参与所有植物抵御不利生长发育因素的生理生化反应(王星等2014)。

SOD广泛存在于各种植物中, 根据所含金属元素的差异主要分为三类, 分别是含有金属Mn的Mn-SOD, 主要位于线粒体中; 含有金属Cu和Zn的Cu/Zn-SOD, 主要位于叶绿体和细胞质中; 含有金属Fe的Fe-SOD, 主要位于叶绿体中, Fe-SOD是比

较原始的一类, 在高等植物中比较缺乏(Miller 2004; 窦俊辉等2010)。而在海洋生物中还发现了第四类SOD, 即Ni-SOD (Dupont等2008)。研究表明, 前三类SOD基因均与植物逆境胁迫应答有关(Gill等2015)。

目前一些物种的SOD基因被分离克隆出来, 并展开了较为深入的研究, 但尚未见杧果SOD基因的研究报道。杧果作为广泛种植于热带亚热带地区的多年生果树, 其产量与品质易受外界环境因素的影响, 这些不利的逆境因素是否与杧果SOD基因的表达有关呢, 目前尚不清楚。在前期研究中,

收稿 2015-09-01 修定 2015-12-07

资助 广西自然科学基金(2013GXNSFDA019011和2014GXNSF-BA118102)和广西高校科研项目(YB2014009)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: honest66222@163.com; Tel: 0771-3270184)。

我们利用cDNA-SCoT差异显示技术从杧果逆境样品中分离获得了一个*SOD*基因的cDNA片段, 长度为285 bp, 该片段3'端包含一个polyA尾巴(Luo等2014)。本实验将利用改良的RACE技术克隆其全长, 对序列进行生物信息学和逆境胁迫下的表达模式分析, 同时还分析了*SOD*基因在采后不同处理样品中的表达, 旨在为深入研究杧果*SOD*基因在杧果逆境胁迫和采后方面的功能奠定基础。

材料与方法

1 实验材料与处理方法

组织表达特性材料为广西大学农学院标本园8年生的‘四季杧’(*Mangifera indica* L. cv. SiJi), 采集成熟叶片、嫩叶、花、茎、40 d果、60 d果和80 d果实为材料, 保存于-80 °C冰箱用于RNA的提取。

逆境材料为1年生‘四季杧’嫁接盆栽苗, 砧木为‘海南土杧’。设定以下3种处理。NaCl处理: 配制300 mmol·L⁻¹ NaCl溶液, 直接浇灌杧果苗, 直到盆土充分吸收水分为止; PEG模拟干旱处理: 配制30%的PEG 6000溶液, 直接浇灌杧果苗, 直到盆土充分吸收水分为止; 4 °C低温处理: 将苗移到人工气候箱中进行4 °C低温处理, 光照强度为108 μmol·m⁻²·s⁻¹, 日照长度为12 h。每个处理5株苗, 处理后0、24、48和72 h分别采集叶片和茎段为材料, 保存于-80 °C冰箱中用于RNA的提取。

果实采后处理材料为‘台农一号’杧果, 挑选大小和色泽一致成熟度约八成熟的杧果, 进行5种处理: (1)对照(清水处理); (2)热处理: 将杧果果实浸泡于52 °C热水中10 min; (3)柠檬酸处理: 将杧果果实浸泡于10 mmol·L⁻¹柠檬酸浸中10 min; (4)草酸处理: 将杧果果实浸泡于5 mmol·L⁻¹草酸溶液中10 min; (5)热处理+1-MCP: 热处理后将果实晾干后继续用1 μL·L⁻¹ 1-MCP密闭处理12 h; 每个处理果实20个, 重复3次。处理后样品置于保鲜袋, 轻系袋口, 储存于20 °C恒温保存箱中。处理后24 h开始收集样品, 以后每隔3 d收集一次, 共收集样品6次, 时间跨越16 d, 将样品保存于-80 °C冰箱用于RNA的提取。

本实验中使用的生化试剂购自南宁恒因生物科技有限公司, PCR相关耗材与试剂购自上海生工。

2 总RNA提取与cDNA合成

杧果不同处理和不同组织器官样品总RNA的

提取采用热硼酸法(Wan和Wilkins 1994)。总RNA的质量采用紫外分光光度计和1.2%的琼脂糖凝胶电泳分别测定其浓度和完整性。

cDNA第一链合成采用M-MLV逆转录酶, 引物用AUP1, 第一链合成参照逆转录酶使用说明书进行, 逆转录完成后用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测其效果。

3 杧果*Mn-MiSOD*基因全长的克隆

在实验室前期研究中, 已经获得了杧果*SOD*基因的3'末端, 只需克隆基因的5'末端序列即可获得全长。*SOD*基因5'末端的克隆采用本实验室改良的RACE技术, 实验方法完全参照罗聪等(2011)的方法。在获得基因的5'末端序列后通过拼接获得其全长, 然后设计一对能够扩增*SOD*完整开放阅读框的引物验证拼接序列的正确性。杧果*SOD*基因全长序列克隆PCR反应体系为25 μL, 其中10×buffer 2.5 μL、10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.5 μL、10 μmol·L⁻¹上下游引物各1 μL、Dream Taq 0.15 μL、cDNA模板1 μL, 补双蒸水至总体积25 μL。PCR反应程序为: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s; 54 °C退火30 s; 72 °C延伸60 s; 共35个循环; 最后72 °C再延伸6 min。PCR产物经1.6%琼脂糖凝胶电泳检测, 对大小符合预期的条带进行切胶回收, 而后将目的片段连接到pMD18-T载体上, 转化大肠杆菌感受态细胞, 通过涂含氨苄青霉素的LB固体平板, 37 °C培养16 h, 而后通过蓝白斑筛选和菌落PCR验证, 送阳性克隆子由上海生工公司测序。本实验所用引物见表1。

4 杧果*Mn-MiSOD*基因进化树及蛋白序列分析

用BoXM 2.6软件对克隆获得的序列进行拼接和氨基酸序列推导。杧果*SOD*基因同源性和结构域的预测和分析利用NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站的Blast检索工具。蛋白质分子量和等电点的预测利用在线工具ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)。信号肽预测用SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。跨膜结构域预测采用TMPred工具(http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)。利用ClustalX 2.0对多物种*SOD*蛋白序列进行多重比较分析, 用MEGA 4.0软件中的邻位相连法构建杧果*Mn-MiSOD*蛋白与其他物种*SOD*蛋白的系统进化树。

表1 引物序列信息

Table 1 The sequences information of primers

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
AUP1	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC(T)18	逆转录引物
AP长	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGGG	5'端克隆引物
AP短	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'端克隆引物
5SOD d2	TTTCAAATAATCCGGTCTCACATTC	5'端克隆引物
5SOD d1	TGCTCCCAAACATCTATGCCAAGC	5'端克隆引物
5SODd0	CTTCCAGAAAATTGAGTGGTTGACA	5'端克隆引物
SODu	ATGGCACTTCTCTCTCACGTGAC	开放阅读框克隆引物
SODd	TCAGGGGCATCTTTCTCAIAC	开放阅读框克隆引物
qSODu	GAAGCACCACCAGACTTACATTAC	荧光定量引物
qSODd	ACCTCCGCCGTGAACTTG	荧光定量引物
qActin1u	CCCAAGGCTAACAGAGAGAAGATG	内参引物
qActin1d	ATCACCAGAATCCAGCACAATACC	内参引物
sSODu	TTGCTTGGCATAGATGTTTGGG	半定量引物
sSODd	CCTCAAACCAATCTTAAATAAAAAC	半定量引物
sActin1u	GTTTCC CAGTATTGTGGGTAGG	半定量内参引物
sActin1d	AGATCTTTCCATATCATCCAGTT	半定量内参引物

5 杧果*Mn-MiSOD*基因表达模式分析

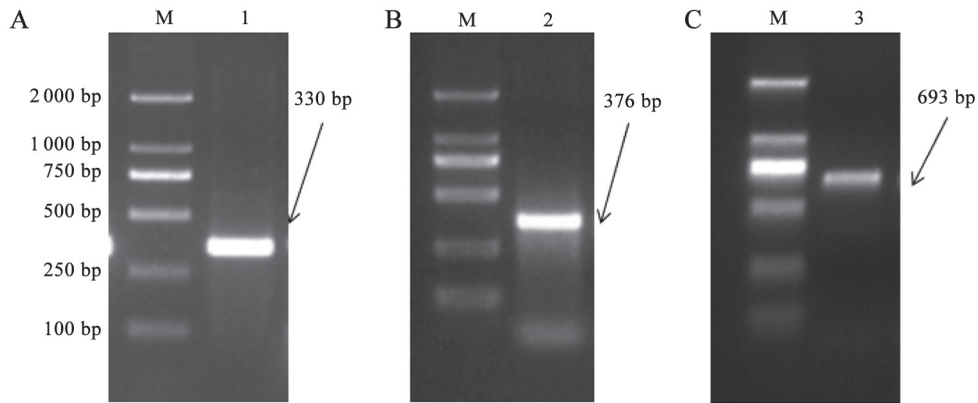
*Mn-MiSOD*基因组织表达特性采用半定量RT-PCR方式进行检测。分别提取不同组织样品的总RNA, 逆转录成cDNA后, 通过紫外分光光度计测定其浓度, 而后将各个样品配制成 $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 作为半定量RT-PCR的模板。以杧果*Actin1*基因(GenBank登录号JF737036)为内参基因(Luo等2013)。半定量PCR反应体系与克隆体系一致。PCR反应程序为: 95°C 预变性3 min; 95°C 变性30 s; 56°C 退火30 s; 72°C 延伸30 s; 共27个循环(内参为30个循环); 72°C 延伸6 min。取 $8 \mu\text{L}$ PCR产物加 $2 \mu\text{L}$ 上样缓冲液(已加核酸染料), 混匀后用1.8%琼脂糖凝胶电泳检测。半定量同时进行3次重复实验。PCR仪型号为美国ABI公司的2720型。

采用实时荧光定量技术对*Mn-MiSOD*基因在杧果逆境处理和采后不同处理下的表达模式进行检测, 分析方法采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法(Livak和Schmittgen 2001)。以杧果内参基因为*Actin1*, GenBank登录号为JF737036 (Luo等2013), 所用引物详见表1。实时荧光定量PCR仪用ABI 7500, 操作步骤和程序参照《ABI 7300/7500实时定量PCR仪相对定量实验入门指南》, 荧光定量反应体系参照试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq II (TaKaRa)说明书进行, 每个样品重复3次。

实验结果

1 *Mn-MiSOD*基因全长的克隆

根据本实验室改良的5'末端RACE技术方法, 设计2条巢式下游特异引物, 第1轮PCR采用降落PCR技术用特异引物5SODd2与AP长进行扩增, 然后将PCR产物稀释40倍后采用巢式PCR技术用引物5SODd1与AP短进行第2轮扩增。经过2轮PCR扩增成功获得一条清晰的条带, 长约350 bp (图1-A), 对获得的片段进行凝胶回收、克隆和测序, 获得一条长330 bp的片段。通过与原序列进行拼接和分析, 发现拼接后的序列依然是片段, 离完整的5'末端还差约270 bp。因此在获得片段的基础上, 继续设计一条下游特异引物5SODd0, 以第二轮PCR产物稀释40倍后为模板, 以引物5SODd0与AP短进行第3轮PCR扩增。电泳结果显示, 又成功获得一条长度约400 bp的片段(图1-B), 对获得的片段进行凝胶回收、克隆和测序, 成功获得长度为376 bp的片段。序列拼接显示, 成功获得杧果*Mn-MiSOD*基因的完整5'末端序列, 包含起始密码子ATG。根据拼接的全长序列, 设计一对能够扩增完整开放阅读框的基因特异引物SODu和SODd, 对拼接序列进行验证, PCR扩增结果显示获得一条长约为700 bp的单一一条带(图1-C)。经过克隆测序获得长度为693 bp的基因序列, 序列分析显示与先期获得的拼接序列完全一致。

图1 杧果*Mn-MiSOD*基因PCR扩增电泳图谱Fig.1 Amplified electrophoresis of PCR products of *Mn-MiSOD* in mango

A: 第一轮5' PCR扩增; B: 第二轮5' PCR扩增; C: 开放阅读框PCR扩增; M: DL2000 Marker.

经过序列拼接获得杧果*Mn-MiSOD*基因序列长度为794 bp, 起始密码子ATG位于43 bp处, 终止子TAG位于732 bp处, 开放阅读框长度为690 bp, 编码230个氨基酸, 分子量为25.67 kDa, 等电点为6.30 (图2)。含量最高的氨基酸是Leu (11.30%), 其次是Gly (8.70%), 最少是Cys (0.43%), 不含Sec和Pyl, 分子式为 $C_{1160}H_{1794}N_{308}O_{341}S_5$ 。

2 *Mn-MiSOD*基因生物信息学分析

利用TMpred预测杧果Mn-MiSOD蛋白在第181位到199位之间存在一个跨膜结构域, SignalP 4.0预测显示Mn-MiSOD蛋白不含信号肽。保守结构域分析显示, 杧果MiSOD在29~110个氨基酸之间含有一个Sod_Fe_N结构域, 在120~225个氨基酸之间含有一个Sod_Fe_C结构域, 以上两结构均属

```

1  ATCCTTCGGATAATCTCTAGAACTCGCCGCTCTCTTTCCGCGATCGCATTCTCTCACGTGACCAGGAAAACCCCTAACCGAATCCGTC
    M A L L S H V T R K T L T E S V
91  CGCCTTGGATTGACGTCGCACGTCCTGGACTTCAGTCCCTCAGTTGCTGATCTCCCTATGATTATGGCGCTTTGGAGCCAGCGATT
    R L G L T S H V R G L Q S F T L P D L P Y D Y G A L E P A I
181 AGCGGTGAGATTATGCAGTTGCATCACCAGAAGCACCACCAGACTTACATTACTAATTACAACAAGGCACTTGAGCAGCTCGACCAAGCC
    S G E I M Q L H H Q K H H Q T Y I T N Y N K A L E Q L D Q A
271 ATGAACAAAGGCGACGCTTCTACTATTGTCAAGTTGCAAAGTGCCATCAAGTTCAACGGGGGGTGCATGTCAACCACTCAATTTCTGG
    M N K G D A S T I V K L Q S A I K F N G G G H V N H S I F W
361 AAGAATCTGACTCCTATTAATGAAGGAGGGGGAGCCACAAAGGTTCCCTTGGTTGGGCAATTGACACAAATTATGGCTCTTTGGAA
    K N L T P I N E G G G E P P K G S L G W A I D T N Y G S L E
451 GCGTTGATACAAAAGATGACTGCTGAGGGTGCAGCTTTACAGGGCTCTGGATGGGTGTGGCTTGGTGTGGACAAGGACTCAAAGAAGCTT
    A L I Q K M T A E G A A L Q G S G W V W L G V D K D S K K L
541 GTGGTTGAAACCACTGCAAATCAGGATCCACTGGTAACTAAAGGCCAAGTTTGGTTCCTTGGCTTGGCATAGATGTTTGGGAGCATGCA
    V V E T T A N Q D P L V T K G P S L V P L L G I D V W E H A
631 TACTATTTACAGTACAAGAATGTGAGACCGGATTATTTGAAAAACATTTGGGAAGTGATCAACTGGAAGTATGCCAATGATGTGTATGAG
    Y Y L Q Y K N V R P D Y L K N I W E V I N W K Y A N D V Y E
721 AAAGAATGCCCTGAGCAACGGGCGAGTTTATTAAGATTGGTTGAGCTGTGCACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    K E C P *

```

图2 杧果*Mn-MiSOD*基因核苷酸序列及其推导氨基酸序列Fig.2 The complete cDNA sequence of *Mn-MiSOD* and its predicted amino acid sequence

于PLN02471多结构域,属于Mn-SOD基因家族。

Blast同源性分析显示, 杧果*Mn-MiSOD*基因与同为Mn-SOD类的基因的同源性较高, 核苷酸序列和氨基酸序列与其他物种Mn-SOD类SOD基因相似性分别介于81%~91%和72%~90%之间。下载与杧果*Mn-MiSOD*基因有同源性的不同物种SOD蛋白的氨基酸序列以及Fe-SOD和Cu/Zn类SOD蛋白, 利用软件MEGA 4.0构建系统进化树。进化树分析

显示, 不同类型的SOD蛋白被分为三大类, 第I类均属于Mn-SOD类蛋白, 杧果Mn-MiSOD聚类到第I类, 与可可(*Theobroma cacao*, XM_007011278)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*, DQ088820)和龙眼(*Dimocarpus longan*, HM773388)聚类到一起, 说明其亲缘关系较近(图3)。第二大类为Fe-SOD类蛋白, 第三类为Cu/Zn-SOD类蛋白。三类SOD蛋白界限清晰, 其中Mn-SOD类蛋白与Fe-SOD类蛋白亲缘关系较近(图3)。

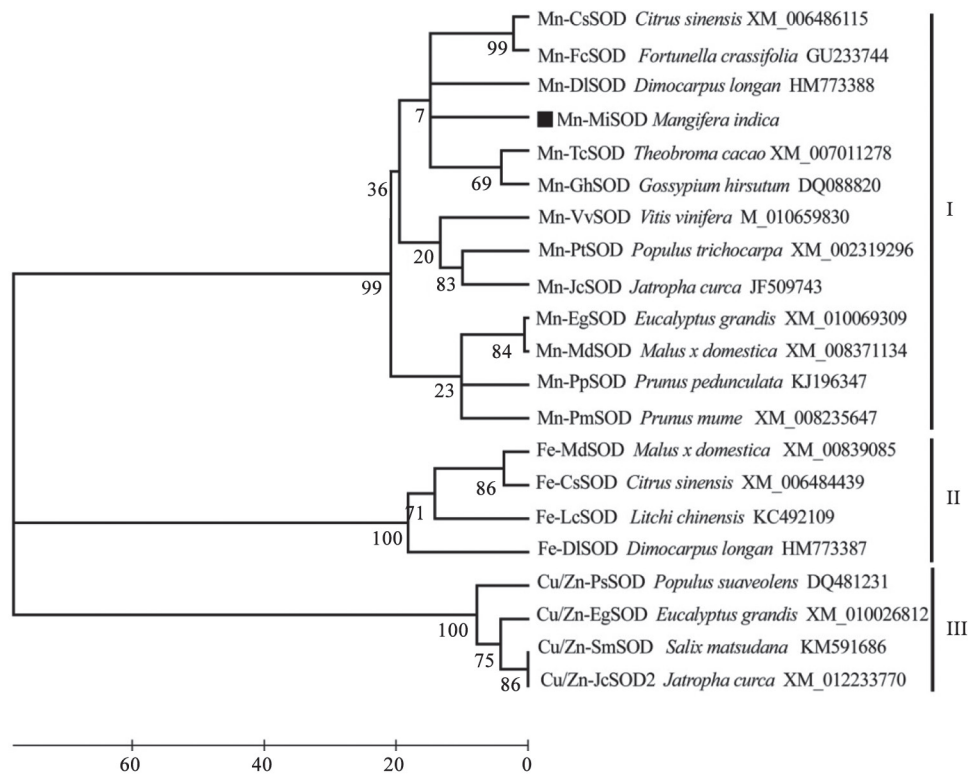


图3 杧果Mn-MiSOD蛋白系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of Mn-MiSOD protein of mango

3 *Mn-MiSOD*基因组织表达特性分析

利用半定量RT-PCR法对*Mn-MiSOD*基因的组织表达特性进行分析。结果显示, 在不同组织器官中, *Mn-MiSOD*基因均表达, 但存在差异。*Mn-MiSOD*基因在成熟叶片中具有较高的表达水平; 而在嫩叶、花和茎中表达水平较低; 在发育中的果实中具有较高的表达水平, 并且随着果实的不断发育, 其表达水平逐渐上升, 在即将成熟的果实中具有很高的表达水平(图4)。

4 *Mn-MiSOD*基因在逆境胁迫下的表达特性分析

利用实时荧光定量技术对*Mn-MiSOD*基因在

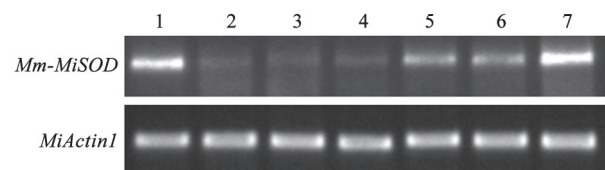


图4 杧果*Mn-MiSOD*基因组织表达特性分析

Fig.4 The expression patterns of mango *Mn-MiSOD* gene in different organs

1: 成熟叶; 2: 嫩叶; 3: 花; 4: 茎; 5: 40 d果; 6: 60 d果; 7: 80 d果。

逆境胁迫下的表达特性进行分析, 结果见图5。4℃低温胁迫下, 叶片中*Mn-MiSOD*基因的表达水

平显著下降, 处理24 h的表达水平最低, 是处理前的0.02倍, 处理48和72 h的表达水平虽然有一些上升, 但依然显著低于处理前; 而茎中, *Mn-MiSOD*基因在胁迫24 h后表达水平明显下降到最低, 只有处理前的0.19倍, 而后开始缓慢上升, 72 h后*Mn-MiSOD*基因的表达水平为处理前的1.91倍。

NaCl胁迫下, 叶片中*Mn-MiSOD*基因的表达水平呈现先下降后上升再下降的过程, 胁迫48 h的表达水平达到最高水平, 是处理前2.26倍; 最低

值出现在胁迫72 h时, 是处理前的0.03倍; 而茎中*Mn-MiSOD*基因的表达水平随着处理时间的推移持续下降, 胁迫72 h的表达水平下降到最低, 是处理前的0.44倍。

PEG胁迫下, 叶片中*Mn-MiSOD*基因的表达量都分别高于未处理的1.63、1.32和1.29倍; 而茎中, *Mn-MiSOD*基因表达是先下降后上升再下降, 在胁迫48 h时达到表达高峰, 比未处理的高3.4倍, 最低值出现在胁迫24 h, 是未处理的0.74倍。

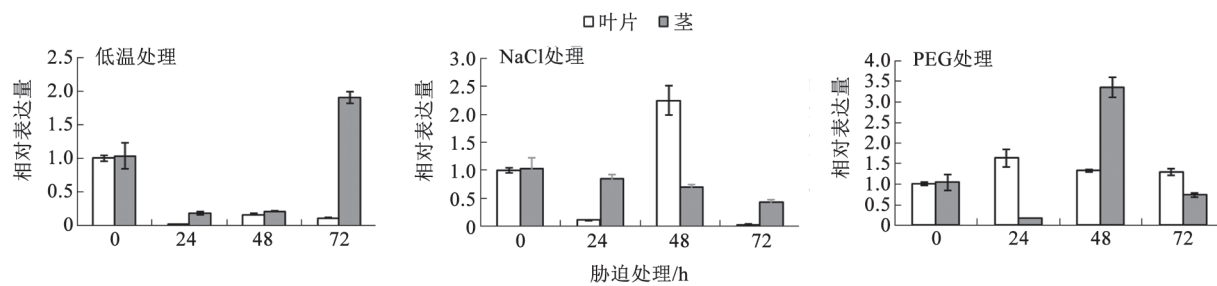


图5 逆境胁迫下杧果*Mn-MiSOD*基因表达分析

Fig.5 Expression analysis of *Mn-MiSOD* under stress treatments

5 *Mn-MiSOD*基因在采后杧果果实不同处理下的表达特性分析

利用不同方法处理杧果果实, 延长其保鲜期。实验结果表明, 处理16 d, 清水处理样品颜色最黄, 果实软化程度最高, 病害程度也最重; 而柠檬酸、草酸处理和热处理3种方式储存效果差异不大, 均好于清水处理; 热处理+1-MCP处理效果则最好(罗聪2012)。

利用荧光定量技术对杧果采后不同处理方式和处理后不同时间样品中*Mn-MiSOD*基因的表达模式进行分析。实验结果(图6)显示, 清水处理(对照)的杧果*Mn-MiSOD*基因在处理后的表达水平即可上升, 并且在整个处理期间表达水平均高于处理前, 在第4天时表达水平是处理前的1.96倍, 第7天时是处理前的6.0倍, 而后有所下降, 在第10天时是处理前的3.82倍, 之后表达水平又开始上升, 在13

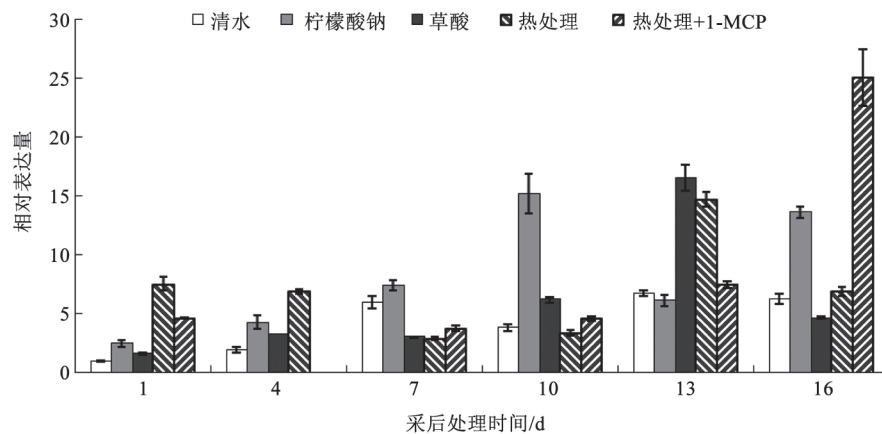


图6 不同处理对杧果果实*Mn-MiSOD*基因表达模式的影响

Fig.6 Effects of different treatments on expression pattern of *Mn-MiSOD* gene in mango fruits

d时表达水平达到最高峰是处理前的6.76倍,在16d时有所下降,是处理前的6.29倍。随着处理时间的推移,柠檬酸处理的表达模式呈现先上升后下降再上升的过程,相对于对照,柠檬酸处理明显提高*Mn-MiSOD*基因的表达水平,其表达高峰出现在处理后第10天,比处理第1天高6.2倍。草酸处理的*Mn-MiSOD*基因表达水平先上升后有些下降然后再上升到最高峰最后再下降,最高峰出现在第13天,表达水平是处理第1天的10.28倍。热处理的*Mn-MiSOD*基因在处理后的第1天出现很高的表达水平,在第4天时依然维持很高的表达水平,在第7天时表达水平有所下降,而后开始持续上升,在第13天时出现表达高峰,是处理第1天的1.95倍。热处理+1-MCP处理的*Mn-MiSOD*基因在处理后的第1天表达被显著上调,而后急剧下降,在第4天时*Mn-MiSOD*基因表达水平极低,而后开始逐步回升,在第16天时出现表达高峰,是处理第1天的5.4倍。

不同处理同一时间表达模式比较分析,处理后第1天,热处理*Mn-MiSOD*基因的表达水平最高,是对照的7.54倍,其次是热处理+1-MCP处理,是对照的4.64倍,草酸和柠檬酸钠处理*Mn-MiSOD*基因的表达水平均高于对照清水处理。第4天,热处理*MiSOD*基因的表达水平依然最高,而热处理+1-MCP处理却最低,只有对照清水处理的0.005倍,而其他两组处理*Mn-MiSOD*基因的表达水平依然高于对照。第7天,柠檬酸钠处理*Mn-MiSOD*基因的表达水平最高,而草酸、热处理和热处理+1-MCP的表达水平却都低于对照。第10天,依然是柠檬酸钠处理的表达水平最高,是对照的3.99倍,而热处理的表达水平略低于对照。第13天,对照、草酸和热处理均达到表达最高峰,但草酸和热处理的表达水平分别高于对照的2.45和2.18倍,热处理+1-MCP的表达水平略高于对照,而柠檬酸钠处理却相反。第16天,热处理+1-MCP的表达水平达到峰值,是对照的3.98倍,柠檬酸处理也维持很高的表达水平,是对照的2.17倍,其次是热处理略高于对照,而草酸处理的表达水平则低于对照。

讨 论

*SOD*属于基因是一个多基因家族,在植物中存在多个拷贝,比如拟南芥中存在3个*Cu/Zn-SOD*、

1个*Mn-SOD*和3个*Fe-SOD* (Kliebenstein等1998)。龙眼中存在6个不同类似的*SOD*,包括3个*Cu/Zn-SOD*、2个*Fe-SOD*和1个*Mn-SOD* (Lin和Lai 2013)。杨树中存在7个*Cu/Zn-SOD*、2个*Mn-SOD*和2个*Fe-SOD* (Molina-Rueda等2013)。本研究首次从枹果中分离克隆出了一个*Mn-MiSOD*基因,序列分析显示,枹果*Mn-MiSOD*基因的核苷酸和氨基酸序列与其他物种的序列相似程度非常高,说明*SOD*基因在长期的进化中较为保守。枹果基因组中是否还存在其他类型的*SOD*基因,目前尚未见报道。

组织表达模式分析显示,银杏中*GbMn-SOD*在各个组织中均表达,但在叶片和果实中表达水平最高(程华等2009)。莲花*Mn-SOD*基因也在各个组织中表达,但在叶片中表达水平最高(Dong等2009)。杨树中两个*Mn-SOD*基因在各个组织中均表达,但*PtMSDI.1*在茎中表达水平最高,其次是叶片,*PtMSDI.2*则相反(Molina-Rueda等2013)。本研究中枹果*Mn-MiSOD*基因在多个组织中均表达,其中在成熟叶片和果实中表达水平最高。这与银杏*GbMn-SOD*的表达模式一致。以上研究表明,植物*Mn-SOD*基因可能在植物的各个组织中均表达,

逆境胁迫诱导*Mn-SOD*基因的表达,而提高*Mn-SOD*的活性可以增加植物对多种环境胁迫的抵抗能力(Baek和Skinner 2010)。激素处理、渗透压胁迫和低温胁迫处理可以不同程度提高银杏叶片中*GbMn-SOD*的表达水平(程华等2009)。杨树*PtMSDI.1*和*PtMSDI.2*在干旱胁迫下其表达水平在各个组织中均下降,而恢复供水后表达水平又回升(Molina-Rueda等2013)。低温胁迫和氧化胁迫可以显著上调荷花*NnMSDI*表达,而盐胁迫和高温胁迫抑制其表达,ABA和PEG不影响其表达(Li等2009)。将小麦的*Mn-SOD*基因转入玉米,可以提高转基因玉米*Mn-SOD*的酶活性,并减轻由逆境造成的氧化胁迫(Du等2006)。将柽柳的*Mn-SOD*基因转入杨树提高了杨树*SOD*活性和对盐的抵抗能力,而将其转入棉花则可以提高棉花对干旱的抵抗能力(Wang等2010; Zhang等2014)。本实验中,低温胁迫、盐胁迫和PEG均诱导枹果*Mn-MiSOD*基因的表达,但其在不同处理、不同时间点和不同组织部位的表达水平存在差异,说明枹果*Mn-MiSOD*基因与逆境胁迫应答有关。其中PEG胁迫下叶片中*Mn-MiSOD*基因的表达在各时间点均被上调表

达, 这与PEG渗透胁迫下杧果SOD酶活性上升的结果一致(余望2002)。

杧果不耐贮运, 而热处理(Nair等2001)、柠檬酸处理(Razzaq等2015)、草酸处理(郑小林等2007; Razzaq等2015)以及1-MCP处理(Wang等2009)均能够延长杧果的货架期。Ding等(2007)研究也发现柠檬酸和水杨酸处理可以提高低温下杧果果实中的SOD酶活性。郑小林等(2007)和Razzaq等(2015)利用草酸处理杧果发现草酸提高杧果果实中SOD酶活性。邵远志等(2009)用不同浓度的1-MCP处理‘台农一号’杧果研究发现, 处理组和对照组样品的SOD酶活性先下降, 而后逐步上升, 但处理组的SOD酶活性明显高于对照组。贾文君等(2013)用热处理、1-MCP以及两种方法结合的方式处理杧果, 发现1-MCP处理、1-MCP+热处理可以提高果实中SOD酶活性, 而热处理却稍微降低SOD酶活性。本实验中, 杧果*Mn-MiSOD*基因在热处理、柠檬酸处理、草酸处理以及热处理+1-MCP处理均明显被上调表达, 说明这些处理可以提高杧果*Mn-MiSOD*基因的表达水平。但对照中杧果*Mn-MiSOD*基因随着贮藏时间的延长表达水平上升, 而杧果SOD酶活性却随着贮藏时间的延长而降低(贾文君等2013)。这一现象可能是由于3种不同类型的SOD酶在杧果果实采后贮藏过程中的含量和功能存在差异造成的。

由以上各方面可以看出, 杧果*Mn-MiSOD*基因的表达水平受低温胁迫、盐胁迫和PEG模拟干旱胁迫的诱导以及杧果采后不同保鲜方法的调控。说明杧果*Mn-MiSOD*基因可能在杧果逆境胁迫和采后生理方面起重要调控作用。*Mn-MiSOD*基因在杧果逆境和采后贮藏过程中的作用尚不清楚, 这是我们下一步研究的方向。

参考文献

- 程华, 李琳玲, 许锋, 常杰, 王燕, 程水源(2009). 银杏锰型超氧化物歧化酶*GbMnSOD*基因的克隆与表达. 园艺学报, 36 (9): 1283~1290
- 窦俊辉, 喻树迅, 范术丽, 庞朝友, 宋美珍(2010). SOD与植物胁迫抗性. 分子植物育种, 8 (2): 359~364
- 贾文君, 李俊俊, 李文文, 李润华, 李雯(2013). 1-MCP和热处理对台农杧果贮藏品质的影响. 保鲜与加工, 13 (3): 8~11
- 罗聪(2012). 杧果SCoT分子标记与逆境和重要开花时间相关基因研究[学位论文]. 南宁: 广西大学
- 罗聪, 何新华, 陈虎, 韦泳丽, 李明娟(2011). 一种高效获取基因5'末

- 端的RACE方法. 植物生理学报, 47 (4): 409~414
- 邵远志, 陈业渊, 高爱平, 贾文君, 李雯(2009). 1-MCP对杧果果实贮藏品质及采后生理的影响. 食品科技, 34 (7): 44~47
- 王星, 刘肖飞, 周宜君, 张根发(2014). 植物SOD基因表达调控的分子机制. 中国油料作物学报, 36 (2): 275~280
- 余望(2002). 渗透胁迫对杧果叶片活性氧伤害的影响. 亚热带植物科学, 31 (1): 32~34
- 郑小林, 田世平, 李博强, 徐勇(2007). 外源草酸延缓采后杧果成熟及其生理基础的研究. 中国农业科学, 40 (8): 1767~1773
- Baek KH, Skinner DZ (2010). Molecular cloning and expression of sequence variants of manganese superoxide dismutase genes. Korean J Environ Agric, 29 (1): 77~85
- Ding ZS, Tian SP, Zheng XL, Zhou ZW, Xu Y (2007). Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. Physiol Plant, 130: 112~121
- Dong C, Li GL, Li ZQ, Zhu HL (2009). Molecular cloning and expression analysis of an *Mn-SOD* gene from *Nelumbo nucifera*. Appl Biochem Biotechnol, 158: 605~614
- Du J, Zhu Z, Li WC (2006). Over-expression of exotic superoxide dismutase gene *MnSOD* and increase in stress resistance in maize. J Plant Physiol Mol Biol, 32 (1): 57~63
- Dupont CL, Neupane K, Shearer J, Palenik B (2008). Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. Environ Microbiol, 10: 1831~1843
- Gill SS, Anjum NA, Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2015). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. Environ Sci Pollut Res, 22: 10375~10394
- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis* an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. Plant Physiol, 118: 637~650
- Li W, Qi L, Lin XD, Chen HH, Ma ZQ, Wu KQ., Huang SZ (2009). The expression of manganese superoxide dismutase gene from *Nelumbo nucifera* responds strongly to chilling and oxidative stresses. J Integr Plant Biol, 51 (3): 279~286
- Lin YL, Lai ZX (2013). Superoxide dismutase multigene family in longan somatic embryos: a comparison of *CuZn-SOD*, *Fe-SOD*, and *Mn-SOD* gene structure, splicing, phylogeny, and expression. Mol Breeding, 32: 595~615
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 25: 402~408
- Luo C, He XH, Chen H, Hu Y, Ou SJ (2013). Molecular cloning and expression analysis of four actin genes (*MiACT*) from mango. Biol Plant, 57: 238~244
- Luo C, He XH, Hu Y, Yu HX, Ou SJ, Fang ZB (2014). Oligo-dT anchored cDNA-SCoT: a novel differential display method for analyzing differential gene expression in response to several stress treatments in mango. Gene, 548 (2): 182~189
- Miller AF (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. Curr Opin Chem Biol, 8: 162~168
- Molina-Rueda JJ, Tsai CJ, Kirby EG (2013). The populus superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in

- transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a). PLoS ONE, 8 (2): e56421
- Nair S, Singh Z, Tan SC (2001). Heat treatments affect development chilling injury, respiration, ethylene production and fruit quality of mango. Acta Hort, 553: 549~550
- Razzaq K, Khan AS, Malik AU, Shahid M, Ullah S (2015). Effect of oxalic acid application on Samar Bahisht Chaunsa mango during ripening and postharvest. LWT-Food Sci Technol, 63: 152~160
- Wan CY, Wilkins TA (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of high quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Anal Biochem, 223: 7~11
- Wang BA, Wang JH, Feng XY, Lin L, Zhao YM, Jiang WB (2009). Effects of 1-MCP and exogenous ethylene on fruit ripening and antioxidants in stored mango. Plant Growth Regul, 57: 185~192
- Wang YC, Qu GZ, Li HY, Wu YJ, Wang C, Liu GF, Yang CP (2010). Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*. Mol Biol Rep, 37: 1119~1124
- Zhang DY, Yang HL, Li XS, Li HY, Wang YC (2014). Overexpression of *Tamarix albiflorum TaMnSOD* increases drought tolerance in transgenic cotton. Mol Breeding, 34: 1~11