



研究报告
Article Report

花生 Cu/Zn-SOD 基因(*AhCSD1*)克隆及品种间等位多态性分析

张秀荣[✉], 刘凤珍[✉], 于元杰[✉], 张昆[✉], 万勇善[✉]

山东农业大学农学院作物生物学国家重点实验室, 山东省作物生物学重点实验室, 泰安, 271018

✉ 通讯作者: yswan@sdau.edu.cn; liufz@sdau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 11 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0011

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

张秀荣等, 2013, 花生 Cu/Zn-SOD 基因(*AhCSD1*)克隆及品种间等位多态性分析, 分子植物育种(online), 11(11): 1068-1081 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0011)

引用格式(英文):

Zhang et al., 2013, Cloning and Allelic Polymorphism Analysis of Cu/Zn-SOD Gene (*AhCSD1*) in Peanut (*Arachis hypogaea* L.), Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(11): 1068-1081 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0011)

摘要 为明确花生 Cu/Zn-SOD 基因(*AhCSD1*)结构及不同基因型种质间遗传多态性, 本研究利用同源克隆技术从花生栽培种和花生区组二倍体野生种中获得 *AhCSD1*, 并进行生物信息学分析。山花 9 号 *AhCSD1* 序列分析结果表明, 两条 cDNA 序列 *rShCSD1-1* 和 *rShCSD1-2* 同源性 98.18%, 编码区存在 10 个 SNP; 对应核 DNA 序列 *gShCSD1-1* 与 *gShCSD1-2* 同源性 97.08%, 共存在 64 个差异位点, 其中 27 个 SNP, 两条序列具有 3 个限制性酶识别位点的差异; 两条序列均含有 8 个外显子和 7 个内含子。4 个栽培品种的 *rCSD1-2* 与 *gCSD1-2* 序列分别一致; *rCSD1-1* 与 *gCSD1-1* 序列同源性分别为 99.68% 和 99.70%; 编码区存在 6 个 SNP, 引起对应氨基酸序列的第 53、第 75、第 147 位残基变异。与野生种序列比对结果显示山花 9 号 *gShCSD1-2* 与 B 组 *A. ipaensis* 的 *gAipCSD1* 同源性 100%, *gShCSD1-1* 与 A 组 *A. duranensis* 和 *A. kuhlmannii* 的 *gAduCSD1* 和 *gAkuCSD1* 同源性分别为 99.89% 和 99.48%; 分子进化分析结果表明 *gCSD1-1* 与 *gCSD1-2* 分别来自栽培种的 A、B 两个染色体组; *A. ipaensis* 为栽培种花生 B 染色体组供体; *A. duranensis* 和栽培种花生的亲缘关系比 *A. kuhlmannii* 更近。研究结果为揭示 *AhCSD1* 基因结构差异、转录水平与抗旱性的相关性, 明确不同花生品种的抗旱机制提供重要参考。

关键词 花生; Cu/Zn-SOD 基因; 序列分析; 抗旱性

Cloning and Allelic Polymorphism Analysis of Cu/Zn-SOD Gene (*AhCSD1*) in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

Zhang Xiurong[✉], Liu Fengzhen[✉], Yu Yuanjie[✉], Zhang Kun[✉], Wan Yongshan[✉]

State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Key Laboratory of Crop Biology, Agronomy College of Shandong Agricultural University, Tai'an, 271018, P.R. China

✉ Corresponding authors, yswan@sdau.edu.cn; liufz@sdau.edu.cn; ✉ Authors

Abstract To reveal the structure and genetic polymorphism of peanut Cu/Zn-SOD gene (*AhCSD1*) from different genotypes, we obtained *AhCSD1* from peanut cultivars and diploid wild species with the method of homologous cloning. Bioinformatics analysis showed the two cDNA sequences of *AhCSD1* in Shanhua 9, labeled as *rShCSD1-1* and *rShCSD1-2*, were 98.18% identical with 10 SNP sites, which were all located in the open reading frame(ORF). The corresponding genomic DNA sequences, named as *gShCSD1-1* and *gShCSD1-2*, were 97.08% identical with 64 differences in total, 27 of which were SNP sites. Three different recognition sites of restrictive enzyme were found, in addition. Sequences analysis showed the two *AhCSD1* both contained 8 exons

收稿日期: 2013 年 04 月 21 日

接受日期: 2013 年 04 月 23 日

发表日期: 2013 年 05 月 22 日

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31201167)、国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-14)、十二五农村领域国家科技计划项目(2011BAD35B04)、山东省花生良种产业化工程项目和山东省现代农业产业技术体系花生创新团队建设项目共同资助



and 7 introns. The sequences of *rCSD1-2* and *gCSD1-2* in the 4 cultivars were completely identical, while 99.68% and 99.70% homologous as to *rCSD1-1* and *gCSD1-2*, respectively. The 6 SNP in the coding region of the 4 varieties caused the number 53, 75, and 147 differences of the corresponding amino acid sequences. Alignment showed *gShCSD1-2* was 100% identical with *gAipCSD1* from *A. ipaensis* and *gShCSD1-1* was 99.89% and 99.48% identical with *gAduCSD1* and *gAkuCSD1* from *A. duranensis* and *A. kuhlmannii*, respectively. Molecular evolutionary analysis displayed *gCSD1-1* and *gCSD1-2* came respectively from A- and B-genome of cultivated peanut, and *A. ipaensis* was the donor of B- genome. Compared with *A. kuhlmannii*, *A. duranensis* had a closer relationship with peanut cultivars. The present study provided important basis for exploring the correlation between gene structure and transcriptional level of *AhCSD1* and drought tolerance, and also for revealing the molecular mechanism of drought resistance in different peanut varieties.

Keywords Peanut; Cu/Zn-SOD gene; Sequence analysis; Drought resistance

研究背景

植物正常生长时活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除处于动态平衡状态,但在高温、干旱、盐渍以及病虫害等逆境条件下,ROS 过度积累引起细胞膜脂过氧化反应,进而导致 DNA、蛋白质及其它细胞组分损伤,严重时致使植物死亡(Apel and Hirt, 2004)。在长期进化过程中,植物形成了由超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等组成的酶促抗氧化防护系统,对清除胁迫条件下积累的 ROS,减轻或避免 ROS 对细胞的伤害起到重要作用(尹永强等, 2007)。

SOD (Superoxide Dismutase, EC 1.15.1.1)作为抵御活性氧介导的氧化损伤的第一道防线,是保护酶体系中的关键酶。在高等植物中 SOD 可根据其辅基部位结合的不同金属离子主要分为 Mn-SOD、Fe-SOD 和 Cu/Zn-SOD 三类,其中 Cu/Zn-SOD 主要位于细胞质和叶绿体(Huang et al., 2012)。花生 SOD 同工酶有 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 两种,且 Cu/Zn-SOD 活性更稳定,在遭遇环境剧烈变化时能够快速提高酶活性以保护植物免受 ROS 伤害,是花生 SOD 活性的最主要组成部分(武宝环, 1989)。目前, Cu/Zn-SOD 相关基因已从多种植物得到分离克隆和表达分析,并应用于提高植物的抗逆性。

SOD 活性是花生重要的抗旱性成分(王小纯等, 2002; 姜慧芳和任小平, 2004),不同花生品种应对干旱胁迫时 SOD 活性变化差异显著(张智猛等, 2013)。以往研究多集中于干旱胁迫下 SOD 活性变化分析,而对其相关基因水平的研究报道较少。本研究以花生 Cu/Zn-SOD 基因 cDNA 序列(GenBank: DQ097721)为基础,从花生栽培品种与二倍体野生种 *A. duranensis*、*A. kuhlmannii* 和 *A. ipaensis* 中克隆细胞质 Cu/Zn-SOD 基因(*AhCSD1*),分析其分子生物学特征,明确该基因分子起源,为进一步探究 *AhCSD1* 基因响应干旱胁迫以及不同品种间 SOD 活

性差异的分子机理提供依据。

1 结果与分析

1.1 花生 *AhCSD1* 的克隆

对参考序列(DQ097721)分析表明,该 cDNA 序列与拟南芥细胞质 Cu/Zn-SOD 基因(*CSD1*)编码区源性达 78%,推导的氨基酸序列源性高达 81.6%,无明显跨膜结构与信号肽,且活性位点高度保守,故确定该序列为花生细胞质 Cu/Zn-SOD 基因 cDNA 序列。通过搜索花生 EST 数据库将该序列向 3'端延伸,在终止密码子下游具有 poly(A)加尾信号。

以栽培品种山花 9 号、ICG6848、农大 818 和荔浦大花生 cDNA 为模板,用引物 CSD1-F: GCTTCTTCCCTTCTCAGTCAA 和 CSD1-R: CACGCGAAAAGCATGATAATC 进行 PCR 扩增,产物经电泳检测获得 550 bp 左右特异性条带,与预期大小相符(图 1A); 4 个品种扩增产物回收后经测序均获得 2 个 *AhCSD1* 基因,分别命名(表 1)。以栽培品种和二倍体野生种基因组 DNA 为模板,引物 CSD1-F/R 进行 PCR 扩增,电泳结果显示特异性条带长度约

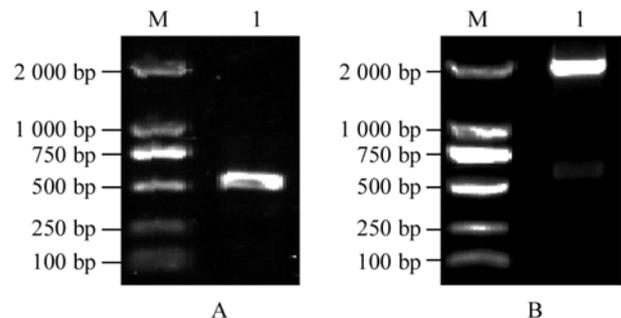


图 1 花生 *AhCSD1* 基因 PCR 扩增电泳结果
注: A: 以 cDNA 为模板扩增结果; B: 以 DNA 为模板扩增结果; M: DL2000 marker
Figure 1 Agarose gel electrophoresis pattern of *AhCSD1* amplification in *Arachis*
Note: A: Amplification using cDNA template; B: Amplification using DNA template; M: DL2000 marker

2 100 bp (图 1B); 测序结果表明栽培种分别获得两条同源序列, 分别命名(表 1)。野生种 *A.duranensis*、*A.kuhlmannii* 和 *A.ipaensis* 各获得一条序列, 分别命名为 *gAduCSD1*、*gAkuCSD1* 和 *gAipCSD1*。

1.2 山花 9 号 *AhCSD1* 序列分析

1.2.1 cDNA 序列分析

由山花 9 号获得的 *rShCSD1-1* 和 *rShCSD1-2* 长度均为 550 bp, 最大开放阅读框(open reading frame, ORF)位于 51~509 bp, 编码 152 个氨基酸残基(aa); 两条序列同源率为 98.18%, 共存在 10 个变异位点, 且均位于编码区, 其中 7 个为单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点, A-G、T-C 转换和 A-C 颠换位点数分别是 2 个、4 个和 1 个; 与参考序列同源率分别为 98.00% 和 99.82%; ATG 起始密码子附近符合 Kozak 规则 (AXXATGG)(图 2)。

1.2.2 DNA 序列分析

由山花 9 号获得的两条 DNA 序列 *gShCSD1-1* 和 *gShCSD1-2* 长度分别为 2 169 bp 和 2 185 bp, 序列同源率 97.08%; 全序列共存在 64 个差异位点, 其中有 27 个 SNP, 占总变异位点的 42.19%, 转换、颠换、缺失位点数分别为 14 个、12 个和 1 个(图 2)。

Splign 分析表明两条序列均含有 8 个外显子和 7 个内含子, *rShCSD1-1* 和 *rShCSD1-2* 分别与 *gShCSD1-1* 和 *gShCSD1-2* 外显子部分一致(图 2), 外显子平均长度均为 68 bp; 内含子平均长度分别为 232 bp 和 234 bp, 内含子 I 最大, 长度均为 470 bp, 内含子 II 最小, 长度均为 105 bp; 两序列在内含子

VI和VII区域多态性位点丰富, 除 16 个 SNP 外, 分别具有短序列缺失; 所有内含子的剪切方式均符合 GT/AG 规则(图 2)。

限制性酶切位点分析发现 *gShCSD1-1* 特有 *Xmn* I 的识别位点, *gShCSD1-2* 特有 *Bam*H I 和 *Spe* I 两种限制性酶的识别位点(图 3); 且两条序列间差异引起了 *Aha*III (TTT/AAA)、*Bcl* I (T/GATCA)、*Bsi* I (C/TCGTG)、*Dra* I (TTT/AAA)、*Nsi* I (ATGCA/T)和 *Ssp* I (AAT/ATT)六种限制性酶识别位点数目变化。

1.2.3 推导的氨基酸序列分析

由 *rShCSD1-1* 和 *rShCSD1-2* 推导的氨基酸序列, 分别命名为 *ShCSD1-1* 和 *ShCSD1-2*, 长度均为 152 aa, 富含甘氨酸(Gly), 分别占氨基酸组成的 17.8%和 18.4%; 两条序列同源率 97.37%, 存在 4 个氨基酸差异(图 4), 与参考序列推导的氨基酸序列同源率分别为 96.71%和 99.34%。

生物信息学预测结果显示 *ShCSD1-1* 和 *ShCSD1-2* 理论分子量(MW)和等电点(pI)分别为 15.1 kDa、5.67 和 15.2 kDa、5.46。*ShCSD1-1* 二级结构含 α 螺旋 3.29%, 延伸串 34.21%, β 转角 9.21%, 不规则卷曲 53.29%; *ShCSD1-2* 含 α 螺旋 5.26%, 延伸串 33.55%, β 转角 10.53%, 不规则卷曲 50.66%; 两条序列均无明显跨膜结构, 为非分泌蛋白; 亚细胞定位预测表明 *ShCSD1-1* 和 *ShCSD1-2* 均最可能定位于细胞质, 总体分值分别为 8.7 和 8.1。

表 1 供试花生栽培品种及 *AhCSD1* 基因 cDNA、氨基酸序列命名

Table 1 Tested peanut cultivars and the corresponding cDNA and amino acid sequence label of *AhCSD1*

亚种	类型	品种名	cDNA 序列名	DNA 序列名	氨基酸序列名
Subspecies	Type	Accession	cDNA sequence label	DNA sequence label	Amino acid sequence label
疏枝亚种 <i>spp. fastigiata</i>	中间型	山花 9 号	<i>rShCSD1-1, -2</i>	<i>gShCSD1-1, -2</i>	ShCSD1-1, -2
	irregular type	Shanhua 9			
	多粒型 var. <i>fastigiata</i>	ICG6848	<i>rIgCSD1-1, -2</i>	<i>gIgCSD1-1, -2</i>	IgCSD1-1, -2
密枝亚种 <i>spp. hypogaea</i>	普通型	农大 818	<i>rNdCSD1-1, -2</i>	<i>gNdCSD1-1, -2</i>	NdCSD1-1, -2
	var. <i>hypogaea</i>	Nongda 818			
	龙生型 var. <i>hirsuta</i>	荔浦大花生 Lipudahuasheng	<i>rLpCSD1-1, -2</i>	<i>gLpCSD1-1, -2</i>	LpCSD1-1, -2



<i>gShCSD1-1</i>	<u>GCTTCTTTCCCTTCTCAGTCAAGGGGTTCCTGAGGTAACATACCTCCTATTTTCATTTTCTCTACGCTC</u>	70
<i>gShCSD1-2</i>	-----	70
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	70
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	70
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	70
<i>gAduCSD1</i>	-----	70
<i>gAkuCSD1</i>	-----	70
<i>gAipCSD1</i>	-----	70
<i>gShCSD1-1</i>	ACTGACATTCATTTCTTCAATCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTGGTAGTTTTTTG	140
<i>gShCSD1-2</i>	-----	140
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	140
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	140
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	140
<i>gAduCSD1</i>	-----	140
<i>gAkuCSD1</i>	-----	140
<i>gAipCSD1</i>	-----	140
<i>gShCSD1-1</i>	TTTTTCTTATTGTTCTCACTGAATCTCGCTTTTTTGCTGTTTTTCTTCGATTCATCATATCCGAATACC	210
<i>gShCSD1-2</i>	-----	210
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	210
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	210
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	210
<i>gAduCSD1</i>	-----	210
<i>gAkuCSD1</i>	-----	210
<i>gAipCSD1</i>	-----	210
<i>gShCSD1-1</i>	TCTGTACGCTATTAATGGACCGATCAACTCAACTGGCAGCTAATTTAAGTTGATAATCAACTAATTGAAT	280
<i>gShCSD1-2</i>	-----	280
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	280
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	280
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	280
<i>gAduCSD1</i>	-----	280
<i>gAkuCSD1</i>	-----	280
<i>gAipCSD1</i>	-----	280
<i>gShCSD1-1</i>	TCCGTCGCTTGTGTTTTTTTTTTTCATTTAACTTGAGTGATTTAACATATTACTTCATGATTTTGATTTT	350
<i>gShCSD1-2</i>	-----	350
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	350
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	350
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	350
<i>gAduCSD1</i>	-----	350
<i>gAkuCSD1</i>	-----	350
<i>gAipCSD1</i>	-----	350
<i>gShCSD1-1</i>	TGATTTTTTAGGTTTTAGAATCGCTATGTAAATTTGTTAGTCTCTTTAGTTATTGATGATCGATTTAGCT	420
<i>gShCSD1-2</i>	-----	420
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	420
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	420
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	420
<i>gAduCSD1</i>	-----	420
<i>gAkuCSD1</i>	-----	420
<i>gAipCSD1</i>	-----	420

I

<i>gShCSD1-1</i>	<u>TTTTTAGGCAGCTGTTAGTTTTTTCTAAATCTGAAATGAATTATTTTTTATTTTATTTGTTTAATTAATT</u>	490
<i>gShCSD1-2</i>	-----	490
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	490
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	490
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	490
<i>gAduCSD1</i>	-----	490
<i>gAkuCSD1</i>	-----	490
<i>gAipCSD1</i>	-----	490
<i>gShCSD1-1</i>	<u>AATTAATTTTTTCAGATCACAACTGAAAAATG</u> GTGAAGGCTGTGGCAGTTCTTAGCAGCAGTGAGGGTGT	560
<i>gShCSD1-2</i>	-----	560
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	560
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	560
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	560
<i>gAduCSD1</i>	-----	560
<i>gAkuCSD1</i>	-----	560
<i>gAipCSD1</i>	-----	560
<i>gShCSD1-1</i>	<u>CAGTGGA</u> ACTATTTCTCTCTCAGGAAGGAAATG TAAGTTTCCAATTAGCGGAATATTTCTGTTTCTG	630
<i>gShCSD1-2</i>	t-----caa-----	630
<i>gIgCSD1-1</i>	-----gc-----	630
<i>gNdCSD1-1</i>	-----c-----	630
<i>gLpCSD1-1</i>	-----c-----	630
<i>gAduCSD1</i>	-----	630
<i>gAkuCSD1</i>	-----ca-----g-----t-----	630
<i>gAipCSD1</i>	t-----caa-----	630
<i>gShCSD1-1</i>	<u>TTTGCTTGTA</u> CTTACTATAAAAAGTTTGCAATCAAATGAATTGTTATTATTGTGAATTATTGTTGTATAGG	700
<i>gShCSD1-2</i>	-----	700
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	700
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	700
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	700
<i>gAduCSD1</i>	-----	700
<i>gAkuCSD1</i>	-----	700
<i>gAipCSD1</i>	-----	700
<i>gShCSD1-1</i>	<u>TCCAACCACTGTGACTG</u> GAAATCTTGCTGGCCTTAAGCCTGGTCTTCATGGGTTCCATGTCCATGCCCTT	770
<i>gShCSD1-2</i>	-----	770
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	770
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	770
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	770
<i>gAduCSD1</i>	-----	770
<i>gAkuCSD1</i>	-----	770
<i>gAipCSD1</i>	-----	770
<i>gShCSD1-1</i>	<u>GGAGACACCACAAATGGTTG</u> CACTGTCAACTGGTATGCCCGTTACCCATTATAATGAGTTCGAACTGATTG	840
<i>gShCSD1-2</i>	-----c-----	840
<i>gIgCSD1-1</i>	-----c-----	840
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	840
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	840
<i>gAduCSD1</i>	-----c-----	840
<i>gAkuCSD1</i>	-----c-----g-----	840
<i>gAipCSD1</i>	-----c-----	840

II



<i>gShCSD1-1</i>	TAAACCTGTAGTTTTTCGGTTGAAATAATATTGAAACTTTTCATCATGTGAGATAGTATTGAAATGCTTAATT	910
<i>gShCSD1-2</i>	-----	910
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	910
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	907
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	907
<i>gAduCSD1</i>	-----g-----	910
<i>gAkuCSD1</i>	-----c-----g-----	910
<i>gAipCSD1</i>	-----	910
<i>gShCSD1-1</i>	TCTATGCTTTTTTATATTCTAGGACCGCATTTCAATCCTAACCAACAAGGAGCATGGTGCCCTGAAGGTG	980
<i>gShCSD1-2</i>	-----a-----	980
<i>gIgCSD1-1</i>	-----a-----	980
<i>gNdCSD1-1</i>	-----a-----	977
<i>gLpCSD1-1</i>	-----a-----	977
<i>gAduCSD1</i>	-----g-----a-----	980
<i>gAkuCSD1</i>	-----c-----g-----a-----	980
<i>gAipCSD1</i>	-----a-----	980
<i>gShCSD1-1</i>	AGAACCGCCATGCTGGTGATTTAGGAAATGTTAATGTTGGAGATGATGGTATGACTTTGTTCTTTAGTA	1 050
<i>gShCSD1-2</i>	-----	1 050
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 050
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 047
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 047
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 050
<i>gAkuCSD1</i>	-----	1 050
<i>gAipCSD1</i>	-----	1 050
<i>gShCSD1-1</i>	CCCTTCTTATCAAGTTTAGTTGTTGGTTCCTTTTGCTTTACATGCATTTCTCTATTTGACTTAGCAITTT	1 120
<i>gShCSD1-2</i>	-----a-----g-----c-----g-----	1 120
<i>gIgCSD1-1</i>	-----c-----a-----	1 120
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 117
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 117
<i>gAduCSD1</i>	-----c-----a-----g-----	1 120
<i>gAkuCSD1</i>	-----c-----a-----a-----c-----g-----	1 120
<i>gAipCSD1</i>	-----a-----g-----c-----g-----	1 120
<i>gShCSD1-1</i>	GACATGCTTGTGGTCTTTGTTCTAAAATTGGTTTCTTTTCATTGTGCTTCAGGAACTGTTAGCTTCTCC	1 190
<i>gShCSD1-2</i>	-----	1 190
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 190
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 186
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 186
<i>gAduCSD1</i>	t-----g-----	1 190
<i>gAkuCSD1</i>	-----g-----a-----	1 190
<i>gAipCSD1</i>	-----	1 190
<i>gShCSD1-1</i>	ATTTCCGACAGTCAGGTATGCTATTCATCTCCTAGTTTAACGTGATTGTGTTGGACATGATCATGTTAAG	1 260
<i>gShCSD1-2</i>	-----	1 260
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 260
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 256
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 256
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 260
<i>gAkuCSD1</i>	-----	1 260
<i>gAipCSD1</i>	-----	1 260

<i>gShCSD1-1</i>	AGAGTGATTAACCTCTTTAAATAAGTGGTCTCTTATTAAAACATGTAGGACTCAATTTGAATAATTGTGCC	1 330
<i>gShCSD1-2</i>	-----	1 330
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 330
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 326
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 326
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 330
<i>gAkuCSD1</i>	-----	1 330
<i>gAipCSD1</i>	-----	1 330
<i>gShCSD1-1</i>	CATTTCTCTCTCTTTTGTCAATTATGCTTTAGATATAAACATAAAAACATAAGAGGGTCCTGACTTGCAAGT	1 400
<i>gShCSD1-2</i>	-----a-----	1 400
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 400
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 496
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 496
<i>gAduCSD1</i>	-----g--a-----	1 400
<i>gAkuCSD1</i>	-----a-----	1 400
<i>gAipCSD1</i>	-----a-----	1 400
<i>gShCSD1-1</i>	TTCAGTTTTTGATTAGTTGTGTAATATTCGCAGATCCCTCTTAGCGGACCAAACCTCCATTGTCCGGAAGGG	1 470
<i>gShCSD1-2</i>	-----t-----t-----	1 470
<i>gIgCSD1-1</i>	-----t-----t-----	1 470
<i>gNdCSD1-1</i>	-----t-----	1 466
<i>gLpCSD1-1</i>	-----t-----	1 466
<i>gAduCSD1</i>	-----t-----t-----	1 470
<i>gAkuCSD1</i>	-----t-----t-----	1 470
<i>gAipCSD1</i>	-----t-----t-----	1 470
<i>gShCSD1-1</i>	CTGTTGTGTCCATGCTGATCCTGATGATCTTGGGAAAGGTATTCACCAATAATCTATTTCTTATTTGGT	1 540
<i>gShCSD1-2</i>	-----	1 540
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 540
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 536
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 536
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 540
<i>gAkuCSD1</i>	-----	1 540
<i>gAipCSD1</i>	-----	1 540
<i>gShCSD1-1</i>	GGTATCTCCTTCATTGATAATCCATTTAGTACCGTCCTACATGTTGTTTCATGCGTAAATGAAATATTTT	1 610
<i>gShCSD1-2</i>	-----c-----t-----a-----g-----	1 610
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 610
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 606
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 606
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 610
<i>gAkuCSD1</i>	-----c-----t-----	1 610
<i>gAipCSD1</i>	-----c-----t-----a-----g-----	1 610
<i>gShCSD1-1</i>	GATTCACTTCTTTTTTTT.....GCAAATGCTTTCTATGTATTGTGGCCG.....ACAACCTT	1 662
<i>gShCSD1-2</i>	-----ttttttttttt-----	1 674
<i>gIgCSD1-1</i>	-----tt.....	1 664
<i>gNdCSD1-1</i>	-----ttt.....	1 661
<i>gLpCSD1-1</i>	-----ttt.....	1 661
<i>gAduCSD1</i>	-----.....tgcccg-----	1 668
<i>gAkuCSD1</i>	-----.....	1 662
<i>gAipCSD1</i>	-----ttttttttttt-----	1 674



<i>gShCSD1-1</i>	ATGGATATTATTTGTTATGTTGTAGGTGGGCATGAGCTTAGCAAATCCACTGGAAATGCTGGTGGCAG	1 732
<i>gShCSD1-2</i>	-----	1 744
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 734
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 731
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 731
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 738
<i>gAkuCSD1</i>	-----	1 732
<i>gAipCSD1</i>	-----	1 744
<i>gShCSD1-1</i>	AGTAGCTTGC GGTAAGCATGTTTCACCGCAGTAAATGTTTATGTTGACATTCAA AATTACAGATTTAATT	1 802
<i>gShCSD1-2</i>	-----t-----a-----	1 814
<i>gIgCSD1-1</i>	-----t-----	1 804
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 801
<i>gLpCSD1-1</i>	-----c-----	1 801
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 808
<i>gAkuCSD1</i>	-----a-----	1 802
<i>gAipCSD1</i>	-----t-----a-----	1 814
<i>gShCSD1-1</i>	TCAA.TTTCCTCCCTTTTTATTGTGAGGGAAAGGAAAGG.....AAGGTTCTCTATAACAA	1 859
<i>gShCSD1-2</i>	---a-----a-----gaaaggaaaagg---	1 884
<i>gIgCSD1-1</i>	-----gaaaggaaaagg-----	1 861
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 858
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 858
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 865
<i>gAkuCSD1</i>	-----g-----	1 858
<i>gAipCSD1</i>	---a-----a-----gaaaggaaaagg---	1 884
<i>gShCSD1-1</i>	AATGAGGGGTTTTAAAATTGAAAAGGCATGTGAAACCCCATACTTCTATCCTCCTCTTTCCTTCCCTCT	1 929
<i>gShCSD1-2</i>	-----c-----c-----t-----	1 950
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	1 931
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 928
<i>gLpCSD1-1</i>	-----VII-----	1 928
<i>gAduCSD1</i>	-----	1 935
<i>gAkuCSD1</i>	-----c-----t-----	1 928
<i>gAipCSD1</i>	-----c-----c-----t-----	1 950
<i>gShCSD1-1</i>	CCCTTTCCTTTAGACACATCTGTTATCTTTTCCTCGTGTATTCCCAAACCAACCCTCGTGTGTTGTC	1 999
<i>gShCSD1-2</i>	..---g-----a-----a-----	2 018
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	2 001
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	1 998
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	1 998
<i>gAduCSD1</i>	-----a-----	2 005
<i>gAkuCSD1</i>	-----a-----	1 998
<i>gAipCSD1</i>	..---g-----a-----a-----	2 018
<i>gShCSD1-1</i>	AGTTTGTGTTATTTCTTATAATCTGATGTCCTGTTTCAATTTCTTTATACAAGAGATTAGTGTGTTGTCT	2 069
<i>gShCSD1-2</i>	-----g-----c-----	2 085
<i>gIgCSD1-1</i>	-----	2 077
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	2 065
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	2 065
<i>gAduCSD1</i>	-----	2 075
<i>gAkuCSD1</i>	-----c-----	2 067
<i>gAipCSD1</i>	-----g-----c-----	2 085

<i>gShCSD1-1</i>	GCTAATATTGACTCTGCCATTCTCTTGTGTGTAGGGGTTATTGGTTTGCAAGGC	TAG	GATACTCCTTTC	2 139
<i>gShCSD1-2</i>	-----a-----	a-----	-----	2 155
<i>IgCSD1-1</i>	-----	a-----	-----	2 141
<i>gNdCSD1-1</i>	-----	-----	-----	2 135
<i>gLpCSD1-1</i>	-----	-----	-----	2 135
<i>gAduCSD1</i>	-----	-----	-----c--	2 145
<i>gAkuCSD1</i>	-----	-----	-----c--	2 137
<i>gAipCSD1</i>	-----a-----	a-----	-----	2 155
<i>gShCSD1-1</i>	<u>AGCCCCTGGATTATCATGCTTTTTTCGCGTG</u>			2 169
<i>gShCSD1-2</i>	-----			2 185
<i>IgCSD1-1</i>	-----			2 171
<i>gNdCSD1-1</i>	-----			2 165
<i>gLpCSD1-1</i>	-----			2 165
<i>gAduCSD1</i>	-----t-----			2 175
<i>gAkuCSD1</i>	-----t-----			2 167
<i>gAipCSD1</i>	-----			2 185

图2 花生 AhCSD1 核苷酸序列比对

注: ---标注一致序列; 灰色阴影标注山花9号两条 AhCSD1 序列 SNP 位点; 黑色阴影标注起始密码子 ATG 与终止密码子 TAG; 下划线标注外显子部分; 内含子编号 I 到 VII

Figure 2 Alignment of nucleotide sequences of AhCSD1 from peanut

Note: ---indicated the consensus sequence; SNP sites between gShCSD1-1 and gShCSD1-2 were shaded by gray; the initiation codon ATG and termination codon TAG were shaded by dark; exons were underlined; the numbers (I to VII) were the name of introns

<i>gShCSD1-1</i>	CAGTG	GAACTATTTC	CTTCTCTCAGGAAGG	590
<i>gShCSD1-2</i>	TAGTGGAACTATTCA	ATTCTCTCAGGAAGG		590
A				
<i>gShCSD1-1</i>	TAAAACATAAGA	GGGTCC	TGACTTGCAAGT	1 400
<i>gShCSD1-2</i>	TAAAACATAAGAGG	ATCCTGACTTGCAAGT		1 400
B				
<i>gShCSD1-1</i>	TACAAGAG	ATTAGT	TTTGTGCTGCTAAT	2 075
<i>gShCSD1-2</i>	TGCAAGAGACTAGT	TTGT	...CTGCTAAT	2 091
C				

图3 山花9号两条 AhCSD1 部分核苷酸序列比对

注: 黑色阴影标注 Xmn I (A)、BamH I (B) 与 Spe I (C) 可识别的核苷酸序列; 灰色阴影标注 Xmn I (A)、BamH I (B) 与 Spe I (C) 不能识别的核苷酸序列

Figure 3 Alignment of partial nucleotide sequences of AhCSD1 from Shanhua 9

Note: The recognition sites of Xmn I (A), BamH I (B), and Spe I (C) were shaded by dark; the unrecognized nucleotides of Xmn I (A), BamH I (B), and Spe I (C) were shaded by gray

通过 NCBI 的 protein blast 功能, CD-Search 工具进行蛋白质保守结构域分析, 结果表明 ShCSD1 具有典型 Cu/Zn 离子结合位点, 属于 Cu/Zn-SOD 家族。植物 Cu/Zn-SOD 是同型二聚体, 每个亚基均结

合有一个铜离子(Cu²⁺)和一个锌离子(Zn²⁺)构成酶活性中心。经分析 ShCSD1 的 Cu²⁺结合位点为 His45、His47、His62 和 His130; Zn²⁺结合位点为 His62、His70、His79 和 Asp82; 并存在 Cys56 和 Cys145 形成分子内二硫键共同维持空间结构(图 4)。

1.3 不同基因型花生 AhCSD1 遗传多态性分析

1.3.1 四个栽培品种 AhCSD1 等位差异及氨基酸序列分析

对 4 个栽培品种 AhCSD1 基因 cDNA 序列分析结果表明各品种 AhCSD1 两条 cDNA 序列长度均为 550 bp; 其中 rShCSD1-2、rIgCSD1-2、rNdCSD1-2 和 rLpCSD1-2 序列完全一致; rShCSD1-1、rIgCSD1-1、rNdCSD1-1 和 rLpCSD1-1 序列同源性 99.68%, 存在 6 个 SNP, 且均位于编码区(表 2)。由于密码子的简并性, 第 368 bp、第 386 bp、第 485 bp 处变异未引起 4 个品种对应氨基酸序列 ShCSD1-1、IgCSD1-1、NdCSD1-1 和 LpCSD1-1 的变化, 为同义突变; 第 219 bp、274 bp、489 bp 处变异分别导致品种间第 53、第 75、第 147 位氨基酸变化(图 4)。



ShCSD1-1	MVKAVAVLSSEGVSGTISFSQEGNGPPTVTGNLAGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
ShCSD1-2	MVKAVAVLSSEGVSGTIQFSQEGNGPPTVTGNLAGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCLSTG	60
IgCSD1-1	MVKAVAVLSSEGVSGTISFSQEGNGPPTVTGNLAGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCLSTG	60
NdCSD1-1	MVKAVAVLSSEGVSGTISFSQEGNGPPTVTGNLAGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
LpCSD1-1	MVKAVAVLSSEGVSGTISFSQEGNGPPTVTGNLAGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
At	MAKGVAVLNSSEGVGTGIIFFTQEGDGVITVSGTVSGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
Np	MVKAVAVLSSEGVSGTIIFFTQDGDAPTIVTGNVSGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
Sl	MVKAVAVLNSSEGVSGTYLFTQVGVAPTTVNGNISGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
Gm	MVKAVAVLGSSEGVGTGIIFFTQEGNGPPTVTGSLAGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCLSTG	60
Gh	MVKAVAVLGSNEGVSQVTFVFSQEGDGPPTVTGNLSGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
Os	MVKAVVLSSEIVKGTIHFVQEGDGPPTVTGSVSGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCISTG	60
Zm	MVKAVAVLAGTD-VKGTIIFFSQEGDGPPTVTGSI SGLKPGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	59
Ta	MVKAVAVLTGSEGVKGTIIFFTQEGEGPPTVTGVTGLKEGLHGFFHVALGDTTNGCMSTG	60
	* * * * * . * * * * * * * * * * . *	
ShCSD1-1	PHFNPNKKEHGAPEDENRHAGDLDGNVNVGDDGTVSFSISDSQIPLSGPNSIVGRAVVVHA	120
ShCSD1-2	PHFNPNKKEHGAPEDENRHAGDLDGNVNVGDDGTVSFSISDSQIPLSGPNSIVGRAVVVHA	120
IgCSD1-1	PHFNPNKKEHGAPEDENRHAGDLDGNVNVGDDGTVSFSISDSQIPLSGPNSIVGRAVVVHA	120
NdCSD1-1	PHFNPNKKEHGAPEDENRHAGDLDGNVNVGDDGTVSFSISDSQIPLSGPNSIVGRAVVVHA	120
LpCSD1-1	PHFNPNKKEHGAPEDENRHAGDLDGNVNVGDDGTVSFSISDSQIPLSGPNSIVGRAVVVHA	120
At	PHFNPDGKITHGAPEDANRHAGDLDGNITVGGDDGTATFTITDCQIPLTGPNSIVGRAVVVHA	120
Np	PHYNPAGKEHGAPEDVVRHAGDLDGNITVGEDGTASFTLTDKQIPLAGPQSIIGRAVVVHA	120
Sl	PHYNPAGKEHGAPEDVVRHAGDLDGNITVGEDGTASFTITDKQIPLTGPQSIIGRAVVVHA	120
Gm	AHFNPNNEHGAPEDENRHAGDLDGNVNVGDDGTVSFSITDSQIPLTGPNSIIGRAVVVHA	120
Gh	PHFNPNKKEHGAPEDENRHAGDLDGNVTAGDDGCASFSTITDKQIPLTGPNSIIGRAVVVHA	120
Ig	PHYNPAGKEHGAPEDETRHAGDLDGNVTAGEDGVANIHVVDSQIPLTGPNSIIGRAVVVHA	120
Zm	PHFNPNKKEHGAPEDEDRHAGDLDGNVTAGEDGVVNVNITDSQIPLAGPHSIIGRAVVVHA	119
Ta	PHFNPNKKEHGAPEDERHAGDLDGNVTAGVDGVASINITDCHIPLTGPNSIVARAVVVHG	120
	* * * * * . * * * * * * * * * * . * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
ShCSD1-1	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
ShCSD1-2	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
IgCSD1-1	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
NdCSD1-1	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
LpCSD1-1	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
At	DPDDLGRGGHELSLATGNAGGRVACGVIIGLQG	152
Np	DPDDLGRGGHELSKTTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
Sl	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
Gm	DSDDLGRGGHELSKTTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
Gh	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
Os	DPDDLGRGGHELSKTTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
Zm	DPDDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	151
Ta	DADDLGRGGHELSKSTGNAGGRVACGVIIGLQG	152
	* *	

图4 花生 AhCSD1 氨基酸序列分析

注: At: 拟南芥; Np: 烟草; Sl: 番茄; Gm: 大豆; Gh: 陆地棉; Os: 水稻; Zm: 玉米; Ta: 小麦; 黑色阴影标示 ShCSD1-1 和 ShCSD1-2 差异位点; 灰色阴影标示 4 个品种间 AhCSD1-1 差异位点; 边框标示金属离子结合位点

Figure 4 Amino acid sequences analysis of AhCSD1

Note: At: *Arabidopsis thaliana*; Np: *Nicotiana plumbaginifolia*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Gm: *Glycine max*; Gh: *Gossypium hirsutum*; Os: *Oryza sativa*; Zm: *Zea mays*; Ta: *Triticum aestivum*; The differences between ShCSD1-1 and ShCSD1-2 were shaded by dark; Differences of AhCSD1-1 in 4 cultivars were shaded by gray

DNA 序列分析结果表明 4 个栽培品种 *AhCSD1* 基因 *gShCSD1-2*、*gIgCSD1-2*、*gNdCSD1-2* 和 *gLpCSD1-2* 序列完全一致; *gShCSD1-1*、*gIgCSD1-1*、*gNdCSD1-1* 和 *gLpCSD1-1* 序列同源性 99.70%, 共存在 17 处等位变异(图 2)。

表 2 花生不同栽培品种 *AhCSD1* 基因编码区多态性位点

Table 2 Polymorphism site of *AhCSD1* in different cultivars

碱基位 置(bp)	<i>rShCSD1-1</i>	<i>rIgCSD1-1</i>	<i>rNdCSD1-1</i>	<i>rLpCSD1-1</i>
Site (bp)				
219	A	C	A	A
274	G	A	G	A
368	C	T	C	C
386	C	T	T	T
485	C	T	C	C
489	G	A	G	G

注: 序列名称见表 1

Note: Sequence labels were showed in table 1

1.3.2 花生栽培种与野生种 *AhCSD1* 基因序列分析

由 3 个二倍体野生种 *A.duranensis*、*A.kuhlmannii* 和 *A.ipaensis* 获得的 *AhCSD1* 的 cDNA 序列分别命名为 *rAduCSD1*、*rAkuCSD1* 和 *rAipCSD1*, 序列比对结果显示 *rShCSD1-2* 与 *rAipCSD1* 序列一致; *rShCSD1-1* 与 *rAduCSD1* 序列同源性 98.73%, 存在 7 个 SNP; *rShCSD1-1* 与 *rAkuCSD1* 序列同源性 98.00%, 共存在 11 处变异, 其中 9 个为 SNP (图 2)。

利用山花 9 号 *AhCSD1* 两条核苷酸序列与 3 个二倍体野生种序列构建分子进化树, 结果显示 *gShCSD1-1* 与 A 组野生种 *A.duranensis* 的序列 *gAduCSD1* 聚在一起, 又与 A 组野生种 *A.kuhlmannii* 的序列 *gAkuCSD1* 聚为一组; *gShCSD1-2* 与 B 组野生种 *A.ipaensis* 的序列 *gAipCSD1* 聚在一起(图 5)。序列比对结果表明 *gShCSD1-2* 与 *gAipCSD1* 完全一致; *gShCSD1-1* 与 *gAduCSD1* 和 *gAkuCSD1* 同源性分别为 99.89% 和 99.48%。因此, *gShCSD1-1* 和 *gShCSD1-2* 分别来自山花 9 号 A、B 两个染色体组。野生种 *A.ipaensis* 为栽培种花生 B 染色体组供体, A 染色体组野生种 *A.duranensis* 与栽培种花生亲缘关系比 *A.kuhlmannii* 更近。

1.4 花生 *AhCSD1* 与其他植物细胞质 Cu/Zn-SOD 序列分析

氨基酸序列比对分析结果表明, 山花 9 号

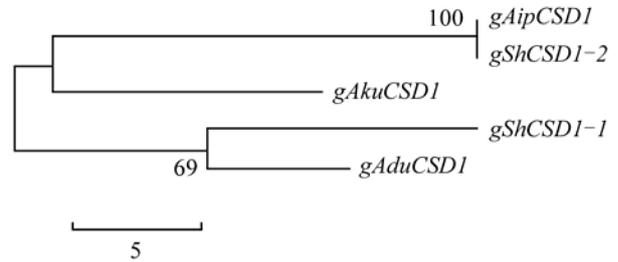


图 5 花生 *AhCSD1* 分子进化分析

注: 序列名称见表 1

Figure 5 Molecular evolution analysis of *AhCSD1* in *Arachis*
Note: Sequence labels were showed in table 1

ShCSD1-1 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_001-077494)、烟草(*Nicotiana plumbaginifolia*, CAA39444.1)、番茄(*Solanum lycopersicum*, AAA34194.1)、大豆(*Glycine max*, NP_001235298.1)、棉花(*Gossypium hirsutum*, ABA00453.1)、水稻(*Oryza sativa*, AAA33917.1)、玉米(*Zea mays*, NP_001105335.1)、小麦(*Triticum aestivum*, ACO90194.1) 细胞质 Cu/Zn-SOD 序列同源性分别达 81%、83%、82%、90%、88%、79%、82%、79%; Cu²⁺和 Zn²⁺结合位点高度保守(图 4), 说明不同来源的细胞质 Cu/Zn-SOD 可能起源于共同祖先, 在进化中相当保守。

聚类分析结果显示来自花生四个栽培种的 *ShCSD1-1*、*IgCSD1-1*、*NdCSD1-1* 和 *LpCSD1-1* 聚为一簇, 又与 *ShCSD1-2* 聚为一组, 和 大豆聚在一起; 单子叶植物水稻、玉米和小麦聚为一组, 与植物分类系统对应一致(图 6)。

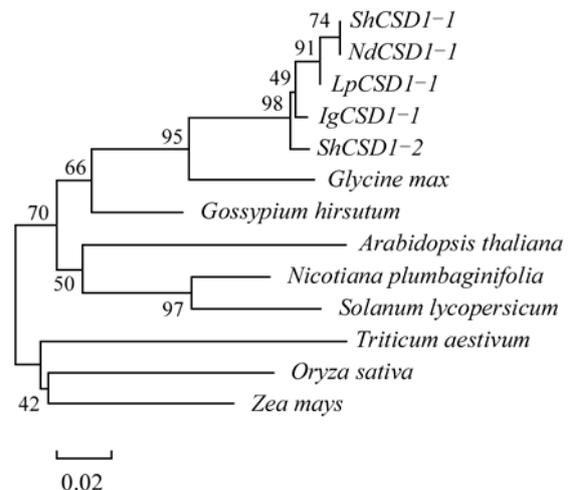


图 6 植物细胞质 Cu/Zn-SOD 聚类分析

注: 花生序列名称见表 1

Figure 6 Cluster analysis of plant cytoplasm Cu/Zn-SOD

Note: Sequence labels of peanut were showed in table 1



2 讨论

花生是重要的油料和经济作物, 干旱导致的氧化损伤是影响花生生产量和质量的首要限制因子, 因此选育抗旱良种尤为重要。以往研究表明 SOD 活性与抗旱性密切相关, 在干旱胁迫下不同抗旱性品种间 SOD 活性变化差异显著(张智猛等, 2013)。花生 SOD 有 Mn-SOD 和 Cu/Zn-SOD 两种, Chen 等(2013)人分离的花生类胚素蛋白 AhGLP2 有类似 Mn-SOD 的活性响应胁迫, 其编码基因同时也上调表达。花生 Cu/Zn-SOD 活性占 SOD 总活性 80% 以上, 且比 Mn-SOD 更稳定, 对花生 Cu/Zn-SOD 的研究为揭示其响应干旱胁迫及其对花生抗旱性的贡献具有重要意义。

基因型决定了其抗旱性状对胁迫反应的敏感程度(Girdthai et al., 2010), 干旱条件下花生不同品种 SOD 活性变化的显著差异可能与其相关基因结构密切相关。本研究对 4 个栽培品种细胞质 Cu/Zn-SOD 基因分析结果表明编码区存在等位变异(表 2), 并引起相应氨基酸残基的变化(图 4), 这些差异可能导致蛋白空间构型变化进而影响 SOD 活性水平。赵士诚等(2008)对玉米在胁迫下抗氧化酶活性及其基因表达分析结果显示 SOD 活性主要受基因转录水平调控。

花生野生种比栽培种具有更强的环境适应和逆境耐受能力, 野生种中丰富的抗性基因是栽培种花生不可替代的宝贵资源, 因此, 探究花生属种间亲缘关系一直以来都受到了研究者的广泛关注。栽培种花生(AABB)为异源四倍体, 目前较一致的观点是 *A.duranensis*(AA)和 *A.ipaensis*(BB)为栽培种的祖先种(Moretzsohn et al., 2013)。本研究对花生栽培种和野生种 *AhCSD1* 序列分析结果显示山花 9 号 *gShCSD1-1* 和 *gShCSD1-2* 分别来自栽培种 A、B 两个染色体组, 并证明了 *A.ipaensis* 为栽培种花生 B 染色体组供体, *gShCSD1-1* 与来自 *A.duranensis* 的序列 *gAduCSD1* 同源性为 99.89%。

花生 SOD 活性与抗旱性密切相关, 抗旱型品种具有更高的 SOD 活性。然而前人的研究多集中于干旱胁迫下花生不同品种在不同生育期 SOD 活性的动态变化, 而对其相关基因及其转录水平研究较少。因此, 本研究对花生细胞质 Cu/Zn-SOD 基因分子起源、品种间等位基因差异的研究为探究其基因结构差异、转录水平与抗旱性的相关性, 明确不同花生品种的抗旱分子机理以及加快花生抗旱育

种具有重要意义。

3 材料与方法

3.1 材料

植物材料为 4 份栽培品种(表 1)和花生区组二倍体野生种 *A.duranensis*、*A.kuhlmannii* 和 *A.ipaensis*。

Plant Genomic DNA Kit、RNAprep Pure Plant Kit、Quant Script RT Kit、TIANGel Midi Purification Kit 等均购自天根生化科技有限公司; *pEASY-T1 Cloning Kit*、大肠杆菌菌株 DH5 α 、Tag 酶、dNTP 等购自北京全式金生物技术有限公司; 引物由上海生物工程有限公司合成, 测序工作由北京六合华大基因科技有限公司完成; 试验所需其它药品试剂均为国产或进口分析纯。

3.2 方法

3.2.1 DNA、RNA 提取及 cDNA 链合成

依据提取试剂盒步骤分别提取花生栽培品种与野生种幼嫩叶片 DNA、RNA。以 2 μ g RNA 为模板, Oligo(dT)为引物, 依照反转录试剂盒操作说明合成 cDNA 第一链。

3.2.2 *AhCSD1* 的 PCR 扩增及测序

以报道序列(DQ097721)为模板, 利用 Primer5.0 结合 Oligo6.0 软件设计特异性引物 CSD1-F: GCTTCTTTCCCTTCTCAGTCAA 与 CSD1-R: CACGCGAAAAAGCATGATAATC。以 cDNA 为模板, PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 7 min。以 DNA 为模板, PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 依据东金玉等(2012)试验方法回收目的片段、送样测序。

3.2.3 花生 *AhCSD1* 分子生物学特征分析

运用 DNAMAN 软件进行序列比对和翻译, 利用 MEGA(Tamura et al., 2011)软件采用采用最大简约法(Maximum Parsimony, MP)构建栽培种与野生种 *AhCSD1* 分子进化树, 邻位相连法(Neighbor-Joining, N-J)对 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列进行聚类分析, 均用 Bootstrap 1 000 评估分子树置信度。

利用 NCBI 在线工具 Salign (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/salign/salign.cgi?textpage=online&level=form>)分析基因内含子; CD-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/salign/salign.cgi?textpage=online&level=form>)

nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)分析蛋白保守结构域。蛋白质基本理化性质、二级结构、跨膜结构和亚细胞定位预测运用 ProtParam (<http://www.expasy.org/>), SOPMA (<http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和 softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)完成。

作者贡献

张秀荣、万勇善、刘凤珍是本研究的实验设计和实验研究的执行人;张秀荣完成数据分析,论文初稿的写作;于元杰、张昆参与实验设计,试验结果分析;万勇善、刘凤珍是项目的构思者和负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31201167)、国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-14)、“十二五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD35B04)、山东省花生良种产业化工程项目和山东省现代农业产业技术体系花生创新团队建设资助。作者感谢中国农业科学院油料作物研究所姜慧芳研究员提供花生二倍体野生种材料。

参考文献

- Apel K., and Hirt H., 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 373-399
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
PMid:15377225
- Chen X.P., Wang M.L., Holbrook C., Culbreath A., Liang X.Q., Brenneman T., and Guo B.Z., 2013, Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(2): 389-403
<http://dx.doi.org/10.1007/s11105-010-0237-6>
- Dong J.Y., Wan Y.S., and Liu F.Z., 2012, Sequence analysis of Δ^9 stearoyl-ACP desaturase gene(*SAD*)in Peanut, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 38(7): 1167-1177 (东金玉, 万勇善, 刘凤珍, 2012, 花生 Δ^9 硬脂酰-ACP 脱氢酶基因(*SAD*)的序列分析, *作物学报*, 38(7): 1167-1177)
- Girdthai T., Jogloy S., Vorasoot N., Akkasaeng C., Wongkaew S., Holbrook C.C., and Patanothai A., 2010, Associations between physiological traits for drought tolerance and aflatoxin contamination in peanut genotypes under terminal drought, *Plant Breeding*, 129(6): 693-699
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01738.x>
- Huang C.H., Kuo W.Y., Weiss C., and Jinn T.L., 2012, Copper chaperone-dependent and-independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 158 (2): 737-746
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.190223>
PMid:22186608 PMCID:3271763
- Jiang H.F., and Ren X.P., 2004, The effect on SOD activity and protein content in groundnut leaves by drought stress, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 30(2): 169-174 (姜慧芳, 任小平, 2004, 干旱胁迫对花生叶片SOD活性和蛋白质的影响, *作物学报*, 30(2): 169-174)
- Moretzsohn M.C., Gouvea E.G., Inglis P.W., Leal-Bertioli S.C.M., Valls J.F.M., and Bertioli D.J., 2013, A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers, *Annals of Botany*, 111(1): 113-126
<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcs237>
PMid:23131301
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S., 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731-2739
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
PMid:21546353 PMCID:3203626
- Wang X.C., Ma X.M., Tang F.S., and Zhang X.Y., 2002, Changes of several protective enzyme activities of leaves among different types of kernel of peanut after flowering, *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 38(6): 572-574 (王小纯, 马新明, 汤丰收, 张新友, 2002, 不同粒型品种花生开花后叶片中几种保护酶活性的变化, *植物生理学通讯*, 38(6): 572-574)
- Wu B.G., 1989, Characteristics and distributions of isozymes of superoxide dismutase in leaf cells of peanut and wheat, *Zhiwu Xuebao (Journal of Integrative Plant Biology)*, 31(11): 854-859 (武宝珩, 1989, 小麦和花生叶细胞内超氧化物歧化酶(SOD)同工酶的特性和分布, *植物学报*, 31(11): 854-859)
- Yin Y.Q., Hu J.B., and Deng M.J., 2007, Latest development of antioxidant system and responses to stress in plant leaves, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 23(1): 105-110 (尹永强, 胡建斌, 邓明军, 2007, 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展, *中国农学通报*, 23(1): 105-110)
- Zhang Z.M., Dai L.X., Song W.W., Ding H., Ci D.W., Kang T., Ning T.Y., and Wan S.B., 2013, Effect of drought stresses at different growth stages on peanut leaf protective enzyme activities and osmoregulation substances content,



Zuowu Xuebao (*Acta Agronomica Sinica*), 39(1): 133-141
(张智猛, 戴良香, 宋文武, 丁红, 慈敦伟, 康涛, 宁堂原, 万书波, 2013, 干旱处理对花生品种叶片保护酶活性和渗透物质含量的影响, 作物学报, 39(1): 133-141)

Zhao S.C., Sun J.W., Ma Y.Z., Wang H., Liang G.Q., and Zhou W., 2008, Effects of cadmium on reactive oxygen species

metabolism, activities and gene expressions of superoxide dismutase and catalase in maize (*Zea Mays*) seedling, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(10): 3025-3032 (赵士诚, 孙静文, 马有志, 汪洪, 梁国庆, 周卫, 2008, 镉对玉米幼苗活性氧代谢、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其基因表达的影响, 中国农业科学, 41(10): 3025-3032)