

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.60810

蒋思思, 周俊琴, 卢梦琪, 袁军. 油茶自、异交雌蕊 CAT 活性及相关基因克隆表达分析[J]. 植物科学学报, 2022, 40(6): 810-819
Jiang SS, Zhou JQ, Lu MQ, Yuan J. CAT activity and related gene expression in the pistil of self- and cross-pollinated *Camellia oleifera* Abel.[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(6): 810-819

油茶自、异交雌蕊 CAT 活性及相关基因克隆表达分析

蒋思思, 周俊琴, 卢梦琪, 袁军*

(中南林业科技大学, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙 410004)

摘要: 油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 具有后期自交不亲和 (LSI) 特性, 严重阻碍了油茶杂交育种的亲本选择和品种配置。为研究过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 在油茶自交不亲和中的作用, 本文对油茶自、异交授粉后雌蕊中的 CAT 活性进行了测定, 并克隆得到 3 个 CAT 基因, 命名为 *CoCAT1*~*CoCAT3*。结果显示, 其 CDS 分别为 1479、1287 和 1479 bp, 编码 492、428 和 492 个氨基酸。多序列比对结果表明, 其编码产物在 C 末端均含有典型的三肽序列。系统进化分析发现, *CoCAT2*、*CoCAT3* 与 *NtCAT3* 亲缘关系最近, *CoCAT1* 与 *CsCAT1* 亲缘关系最近。基因表达模式分析结果显示, 3 个基因在授粉 72 h 后的自交雌蕊中表达量最大, 在授粉 36、84 h 自交雌蕊中的表达量显著高于异交。自、异花授粉均引起油茶雌蕊内 CAT 活性的上升, 但幅度不同, 推测油茶 CAT 可能参与油茶自交不亲和的响应机制。

关键词: 油茶; 自交不亲和; 过氧化氢酶; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)06-0810-10

CAT activity and related gene expression in the pistil of self- and cross-pollinated *Camellia oleifera* Abel.

Jiang Si-Si, Zhou Jun-Qin, Lu Meng-Qi, Yuan Jun*

(Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest Trees, Ministry of Education, Key Lab of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: *Camellia oleifera* Abel. shows late-acting self-incompatibility (LSI) characteristics, which seriously hinder parental selection and cultivar arrangement during cross breeding. To study the role of catalase (CAT) in the self-incompatibility of *C. oleifera*, CAT activities in the pistils after self- and cross-pollination were determined. Three CAT genes (*CoCAT1*, *CoCAT2*, and *CoCAT3*) were cloned by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), with coding sequences (CDSs) of 1479, 1287, and 1479 bp, encoding 492, 428, and 492 amino acids, respectively. Multiple sequence alignment showed that their coding products contained typical tripeptide sequences at the C-terminal. Phylogenetic analysis showed that *CoCAT2* and *CoCAT3* were most closely related to *NtCAT3*, and *CoCAT1* was most closely related to *CsCAT1*. Expression pattern analysis indicated that the expression levels of the three

收稿日期: 2022-06-18, 修回日期: 2022-08-02。

基金项目: 湖南省重点研发计划 (2020NK2050); 国家自然科学基金 (31730016); 湖南省教育厅科学研究项目 (21B0274); 中南林业科技大学引进人才科研启动基金 (2021YJ018); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20220709); 中南林业科技大学研究生科技创新基金 (CX202202006)。

This work was supported by grants from the Key Research and Development Program of Hunan Province (2020NK2050), National Natural Science Foundation of China (31730016), Scientific Research Project Youth Project of Hunan Provincial Department of Education (21B0274), Foundation Project for Introducing Talents into Scientific Research of Central South University of Forestry and Technology (2021YJ018), Hunan Provincial Innovation Foundation for Postgraduate (CX20220709), and Scientific Innovation Fund for Post-graduates of Central South University of Forestry and Technology (CX202202006)。

作者简介: 蒋思思 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为经济林栽培育种 (E-mail: jiangsisi0321@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: yuanjun@csuft.edu.cn)。

genes were highest in the self-pollinated pistils 72 h after pollination, and expression levels in the self-pollinated pistils at 36 and 84 h were significantly higher than those in the cross-pollinated pistils. Thus, self-pollination and cross-pollination increased CAT activity in the pistils of *C. oleifera*, but at different magnitudes. This study indicated that CAT maybe involved in the response mechanism of self-incompatibility in *C. oleifera*.

Key words: *Camellia oleifera*; Self-incompatibility; Catalase; Gene cloning; Expression pattern

油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 是享有“东方橄榄油”美誉的木本油料树种, 主要栽植于中国南方的丘陵地区^[1]。在生产中, 油茶普遍存在花多果少、座果率低的现象^[2, 3]。进一步研究发现油茶属于自交不亲和 (Self-incompatibility, SI) 树种, 这可能是导致油茶结实率低的重要原因之一^[4-6]。根据《全国油茶主推品种目录》, 全国主推油茶品种达 146 个, 生产上要求选用花期相遇、成熟期相近的 3~5 个品种进行配置, 但哪些品种可以相互配置, 如何配置还不清楚。要为生产提供可靠的配置信息和技术, 研究油茶品种亲和性成为解决这一问题的关键。

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 属血红蛋白酶类, 是生物体中普遍存在的一种细胞质抗氧化酶, 与超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD)、抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate peroxidase, ASP) 一起被称为酶保护系, 其主要功能是催化 H_2O_2 分解为 O_2 和 H_2O ^[7-9]。CAT 广泛存在于生物体内, 如植物体内的叶绿体、线粒体、内质网及动物的肝和红细胞中^[10]; 在植物防御、胁迫应答、控制细胞的氧化还原平衡和延缓衰老等方面具有重要作用^[11]。

植物 CATs 由一个小的基因家族编码, 现已从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[12]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[13]、玉米 (*Zea mays* L.)^[14]、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)^[15]、冬枣 (*Ziziphus jujuba* Mill. cv. Dongzao)^[16] 等植物中鉴定了 CATs 基因, 对其生理功能也有一定的研究。有研究发现 CAT、POD 和 SOD 活性在自花授粉植物的花柱内上升幅度明显低于异花授粉^[17], 表明花柱内保护酶活性与自交不亲和性可能存在一定的关系。王保成等^[18]发现芸芥 (*Eruca sativa* Mill.) 自交亲和性与 SOD、POD 及 CAT 等 3 种保护酶有一定关系, 保护酶活性的变化可能与亲和基

因的调控有关。苹果 (*Malus pumila* Mill.) 自交亲和品种在自花授粉 0~48 h 后, 花柱中 3 个保护酶的活性相对稳定, 花粉管能够正常生长; 而自交不亲和品种自花授粉 24~72 h 后花粉管停止生长, 花柱中 3 个酶的活性变化较大^[19]。

本课题组前期构建了油茶自、异交雌蕊转录组数据库^[20], 获得了 3 个特异表达的 CoCATs 基因。本研究对这 3 个基因进行了分离克隆和表达分析, 研究结果旨在为油茶自交不亲和调控机制研究奠定基础, 并为油茶分子生物学研究提供基因元件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究选用国家审定的油茶主栽品种‘华硕’^[21]和‘华金’^[22]为实验材料, 两个品种均种植于湖南省长沙市望城县东城镇油茶试验基地。于晴朗天气下, 采摘‘华硕’和‘华金’露白期的花苞, 用镊子捋下花药, 室温下干燥, 花药散粉后收集花粉。以‘华硕’为母本进行人工控制授粉, 授粉组合分别为: 自交 (Self-pollination, SP): ‘华硕’×‘华硕’; 异交 (Cross-pollination, CP): ‘华硕’×‘华金’。取授粉 2、12、24、36、48、60、72、84、96 h 后等 9 个时间段共 18 个样品 (SP 2~96 h、CP 2~96 h) 的雌蕊, 立即用液氮速冻, -80℃保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 CAT 酶活性测定

CAT 酶活性采用紫外吸收法测定^[23]。称取 0.2 g 雌蕊置于预冷研钵中, 加 5 mL pH 值 7.0 的磷酸缓冲液, 研磨至匀浆后, 倒入 15 mL 离心管中, 冷冻离心 20 min (10 000 g), 保留上清液。采用紫外吸收法在紫外分光光度计上测定 A_{240} , 每个样品 3 次重复。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

油茶雌蕊总 RNA 提取参照 RNA 提取试剂盒

(TaKaRa, 日本)操作说明书。于-80℃保存备用, 采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 进行 cDNA第一链的合成, 得到的 cDNA 用于基因克隆。

1. 2. 3 油茶 *CoCATs* 基因的克隆

分析油茶自交和异交雌蕊转录组数据库, 筛选得到 3 个差异表达且具有全长 CDS 的 *CAT* 家族基因, 分别命名为 *CoCAT1*、*CoCAT2* 和 *CoCAT3*。参考全长 CDS 序列, 使用 Primer 5.0 软件^[24]设计特异性全长扩增引物 *CoCAT1*-F/R、*CoCAT2*-F/R 和 *CoCAT3*-F/R (表 1), 由长沙擎科生物公司合成。以 cDNA 为模板, 使用 TaKaRa 公司的高保真 HS 酶进行特异性扩增, 扩增体系及程序参考操作说明书。

扩增产物回收后分别连接到 pMD18-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5α, PCR 检测后挑选阳性菌液, 送至长沙擎科生物公司测序。

表 1 引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'-3')	用途 Application
CoCAT1-F	ATGGATCCTCACAAGTATCGCCCA	<i>CoCAT</i> 基因克隆
CoCAT1-R	TCAAATGCTTGGCCTCATGTTGAG	
CoCAT2-F	ATGCAAGGGGGGCCAGTGCCAA	
CoCAT2-R	TCAAATGCTAGGCCTCACGTTCAGG	
CoCAT3-F	ATGGATCCATACAAGTACCGTCCT	
CoCAT3-R	TCAAATGCTTGGTCTCACGTTCA	
CoCAT1-QF	CCCGTCATTGTTAGGTT	实时定量 RT-PCR
CoCAT1-QR	ATGGGACTTAGGGTTGG	
CoCAT2-QF	CCCAAAGTCTCACATCC	
CoCAT2-QR	GGCTTCATCGTCCAACA	
CoCAT3-QF	ATGATGTGGGTGTTCCG	
CoCAT3-QR	TTCACTCCGCAGGTAGGT	
GAPDH-F	CTACTGGAGTTTTCACCGA	内参基因
GAPDH-R	TAAGACCCTCAACAATGCC	

1. 2. 4 生物信息学分析

利用 NCBI ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对 3 个 *CoCATs* 基因的全长 cDNA 序列进行分析, 分别利用 Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) 分析 *CoCATs* 蛋白基本理化性质和预测蛋白结构域, 分别采用在线工具 PROSITE

SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html) 和 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 进行蛋白基元和磷酸化位点分析, 利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析亲/疏水性, 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL 在线工具分析其二级结构和三级结构, 使用 TMHMM Server 2.0 和 SignalP 6.0 网站预测蛋白跨膜结构及信号肽, 通过 PSORT II (<https://www.genscript.com/tools/psort>) 和 STRING (<https://string-db.org/>) 进行亚细胞定位和蛋白互作预测, 利用 Jalview 和 MEGA 11.0.10 软件进行序列比对和系统进化树构建。

1. 2. 5 实时荧光定量 PCR

为了检测 *CoCATs* 基因在油茶自交、异交授粉雌蕊中的表达模式, 分别设计实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative RT-PCR, qPCR) 引物, 以油茶管家基因 *GAPDH* 为内参 (表 1) 进行检测, 每个反应设置 3 次重复。qPCR 采用荧光染料 SYBR 在 CFX96 Touch Real-time PCR (伯乐, 美国) 反应系统上进行。相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[25]。

2 结果与分析

2. 1 自交和异交授粉后雌蕊内 *CAT* 活性变化

油茶自交和异交授粉后雌蕊内 *CAT* 活性变化如图 1 所示。自花授粉后 24~60 h 和 84~96 h 油茶雌蕊的 *CAT* 酶活性急剧上升, 60 h 达到高峰, 为 $29.61 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW} \cdot \text{min}^{-1}$, 60~72 h 迅速下降。异花授粉后 *CAT* 活性变化幅度较小, 在 48 h 之前呈下降趋势, 之后先上升后下降, 并在 72 h 达到最大值, 为 $12.06 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW} \cdot \text{min}^{-1}$ 。总体而言, 在授粉后 24~72 h, 自花授粉雌蕊内 *CAT* 活性高于异花授粉。

2. 2 油茶 *CoCATs* 基因克隆

以油茶 cDNA 为模板, 用相应引物进行 PCR 扩增, 得到了预期大小的 PCR 产物 (图 2)。对其进行回收、测序后, 得到 *CoCAT1*、*CoCAT2* 和 *CoCAT3* 基因, 其序列长度分别为 1479、1287 和 1479 bp, 分别编码 492、428 和 492 个氨基酸 (aa)。

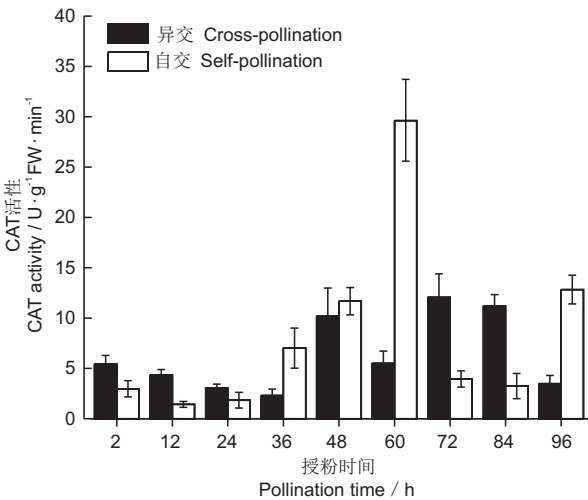
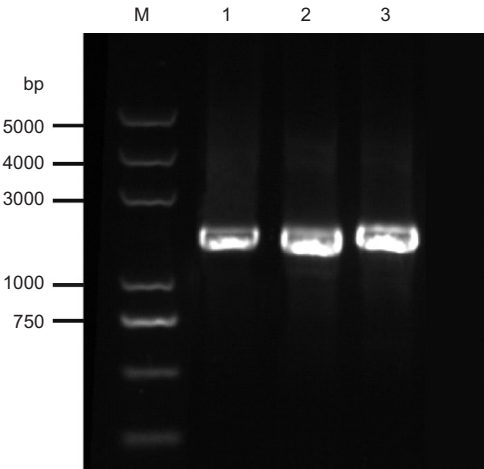


图1 油茶自交和异交授粉后雌蕊内 CAT 活性变化
Fig. 1 Changes in CAT activities in self-and cross-pollinated *Camellia oleifera* pistils



M: DL5000 DNA Marker; 1: *CoCAT1*; 2: *CoCAT2*; 3: *CoCAT3*.

图2 油茶 *CoCATs* 基因扩增产物电泳图
Fig. 2 Amplified products of *CoCAT* genes in *Camellia oleifera*

2.3 生物信息学分析

2.3.1 *CoCATs* 基因编码蛋白的理化性质

利用 Protparam 在线软件对 *CoCATs* 基因编码蛋白进行理化性质分析, 结果见附表 1¹⁾。3 个蛋白均偏酸性, *CoCAT1*、*CoCAT2* 为稳定性蛋白, *CoCAT3* 为不稳定性蛋白。*CoCAT1* ~ *CoCAT3* 的正电残基 (Arg + Lys) 分别为 57、50 和 58, 负电残基 (Asp + Glu) 分别为 61、55 和 61。根据疏水系数, 3 个蛋白均为亲水性蛋白。

CoCAT1 和 *CoCAT3* 疏水性最大值均为 2.700, 位于第 326 位 aa, 疏水性最小值均为 -2.678, 位于第 427 位 aa; *CoCAT2* 疏水性分析中最大峰值位于第 262 位 aa, 对应峰值 2.677; 亲水性分析中最大峰值位于第 363 位 aa, 对应峰值 -2.678(附图 1²⁾: A)。

蛋白磷酸化位点预测结果显示, *CoCAT1* 蛋白存在 22 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点、12 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点及 7 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点; *CoCAT2* 具有 11 个 Ser 磷酸化位点、9 个 Thr 磷酸化位点、5 个 Tyr 磷酸化位点; *CoCAT3* 存在 21 个 Ser 磷酸化位点, 10 个 Thr 磷酸化位点, 5 个 Tyr 磷酸化位点(附图 1)。推测 *CoCATs* 蛋白被这 3 种氨基酸激酶磷酸化且激活, 最终调控基因表达。

2.3.2 蛋白二级结构、三级结构特性分析

蛋白质二级结构预测结果表明, 3 个蛋白主要由无规则卷曲、α-螺旋、伸展链和 β-折叠组成, 但其比例和分布存在差异(附表 2³⁾)。无规则卷曲所占比例最高, 为 46.73%~51.53%; 其次是 α-螺旋, 占 26.42%~28.27%; 占比最低的是 β-折叠, 为 7.11%~8.64%。

以枯草芽胞杆菌 (*Bacillus pumilus* (Ehrenberg) Cohn) 过氧化氢酶 (PDB No.: 4qol.1) A 链为模板^[26], 对 3 个蛋白进行三维结构建模(附图 2⁴⁾)。结果显示, *CoCAT1* ~ *CoCAT3* 蛋白与模板蛋白的序列相似性分别为 51.46%、49.17% 和 52.09%。

2.3.3 *CoCATs* 蛋白结构域及定位分析

InterProScan 分析结果显示, 3 个基因的编码产物均为 CAT 家族成员, 都包含 CAT 核心结构域、活性位点和血红素结合位点。PROSITE SCAN 分析表明, *CoCATs* 蛋白含有数目不等的基元, 包括 N-糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、酪氨酸激酶磷酸化位点、N 豆蔻酰化位点 (N-myristoylation site) 和酰胺化位点等(附表 3⁵⁾)。对蛋白保守结构域进行预测, 发现 3 个 *CoCATs* 蛋白均含有 PLN02609 超家族结构域, 位置分别在 1~492、10~428 和 1~462。

1~5) 如需查阅附件内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

跨膜结构及信号肽预测结果表明, 3 个 Co-CATs 蛋白均不存在跨膜结构, 也不含信号肽。PSORT 预测显示, 3 个蛋白定位在细胞质中的可能性最高, 分别为 39.1%、43.5%和 39.1%, 定位于线粒体的几率最低, 分别为 26.1%、21.7%和 21.7%, 定位于细胞核的概率均为 34.8%。CoCAT3 还可能定位于内质网, 其可能性为 4.3%。

2. 3. 4 CATs 蛋白互作预测

选用模式植物拟南芥对 CATs 互作蛋白进行预测。结果如图 3 所示, 共有 20 个蛋白与 CATs 存在互作关系。该蛋白互作网络图共有 23 个节点,

146 条边, 平均节点度为 12.7, PPI 富集 P 值 < $1.0E-16$ 。GO 及 KEGG 富集分析表明, CATs 互作网络蛋白参与细胞氧化解毒代谢、氧化还原及活性氧代谢过程, 主要在细胞质中发挥作用, 且具有调控抗氧化活性、氧化还原活性及催化活性分子功能(附表 4¹⁾)。CATs 共参与 8 个 KEGG 通路, 其中与 HPR、GOX2、AGT、ACX1、ACX5、PKT3、PKT4、PKT5、APPX1、APPX3、GR、GPX2 等 12 个蛋白参与代谢过程, 与 HPR、GOX2、AGT、ACX1、ACX5 等 5 个蛋白参与碳代谢过程。互作蛋白信息见附表 5²⁾。

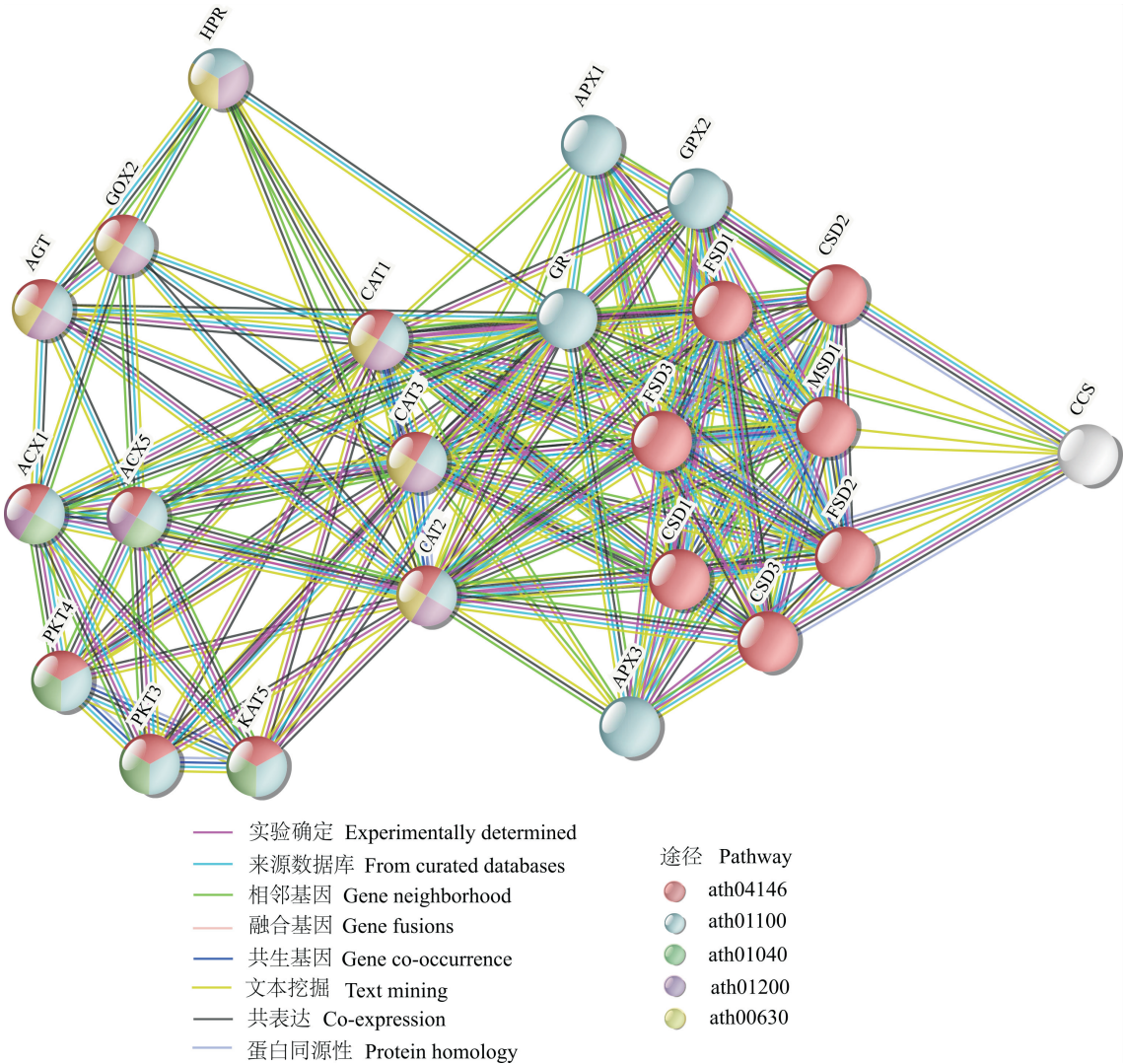
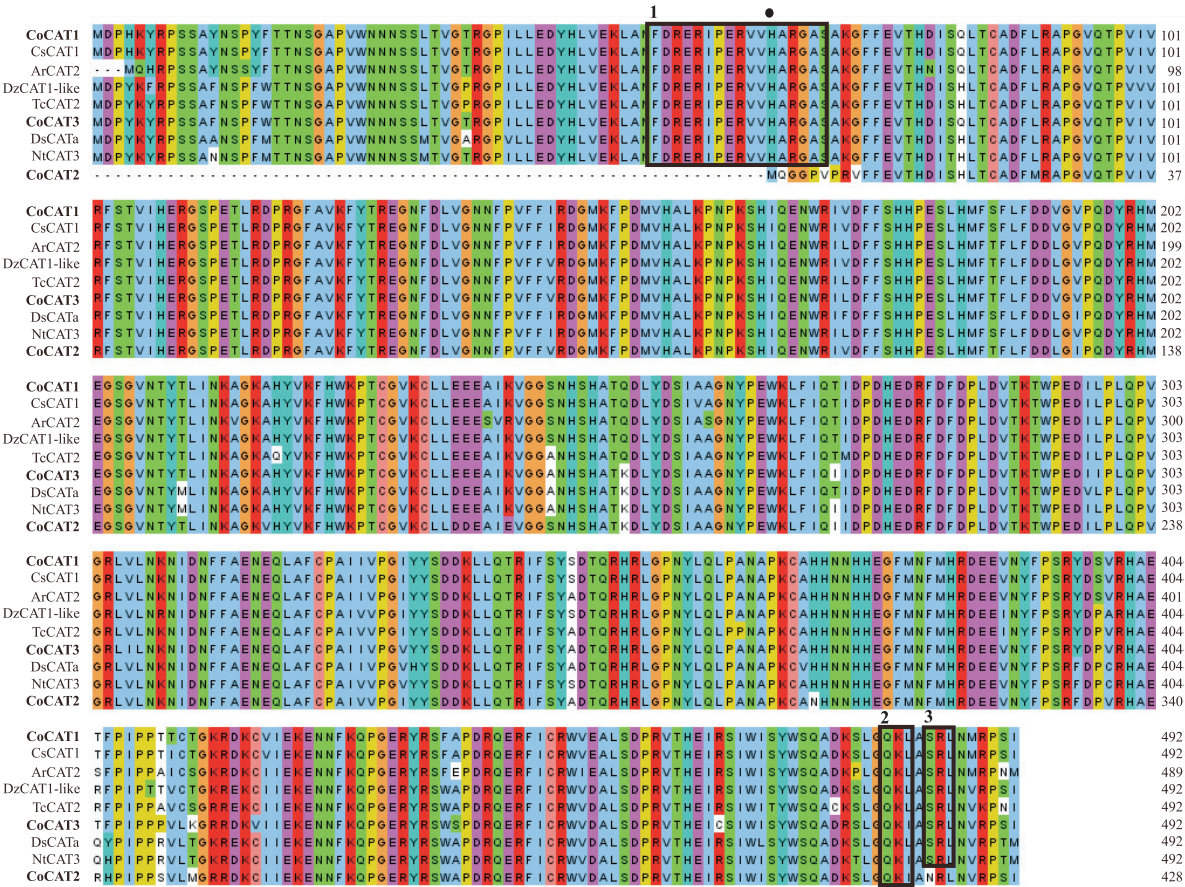


图 3 CATs 蛋白互作网络预测
Fig. 3 Prediction of CAT protein interaction network

2.3.5 CoCATs 氨基酸序列比对及系统进化树分析

通过 NCBI 比对发现，油茶 CoCATs 氨基酸序列与其他物种的相似性均在 89% 以上，3 个蛋白与茶 (*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.) CAT 的相似度均最高，分别为 99%、94%、99%。利用 Jalview 软件，将 CoCATs 与茶树 CsCAT1 (XP_028098144.1)、可可 (*Theobroma cacao* L.) TcCAT2 (EOY15259.1)、榴莲 (*Durio zibethinus* Murr.) DzCAT1-like (XP_022772563.1)、曼陀罗 (*Datura stramonium* L.)

DsCATa (MCD7445900.1)、山梨猕猴桃 (*Actinidia rufa* (Sieb. & Zucc.) Planch. ex Miq.) ArCAT2 (GFY87827.1)、烟草 NtCAT3 (NP_001312022.1) 等序列进行比对，发现 CoCAT1 和 CoCAT3 含有 CAT 活性部位 (FDRERIPERVVHARGAS)，其活性位点均为第 65 位 aa (His)，均具有 Ser-Arg-Leu 序列 (SRL)；CoCAT1 包含典型的 C 末端，含有保守的三肽序列 (QKL)，即过氧化物酶体蛋白识别类 PTS1 (Peroxisomal targeting signal) 基序，如图 4 所示。



1: 过氧化物酶近活性部位; 黑点为酶活性位点; 2: PST1 类基序; 3: SRL 序列。
1: Catalase proximal active site; Black dots are enzyme active sites; 2: PST1 base sequence; 3: SRL sequence.

图 4 油茶与其他物种 CATs 蛋白多重序列比对

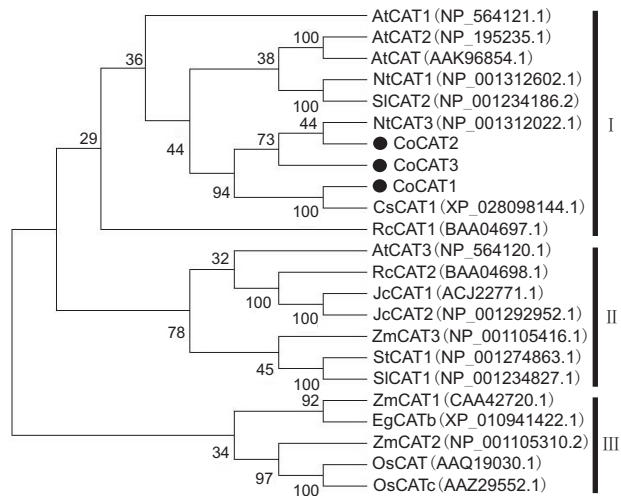
Fig. 4 Multiple sequence alignment of CAT proteins of *Camellia oleifera* and other species

本研究从 NCBI 网站下载了 20 条不同植物的 CATs 蛋白，通过 Neighbor-Joining (NJ 邻接法) 与油茶 CoCATs 构建系统进化树。结果显示，23 个蛋白被聚在 3 个大的独立进化分支中，CoCAT1、CoCAT2 和 CoCAT3 均聚在分支 I，并与烟草 NtCAT3 (NP_001312022.1)、茶 CsCAT1 (XP_028098144.1) 同聚于 1 个小的

分支中，其中 CoCAT2、CoCAT3 与 NtCAT3 亲缘关系最近，而 CoCAT1 与 CsCAT1 亲缘关系最近 (图 5)。

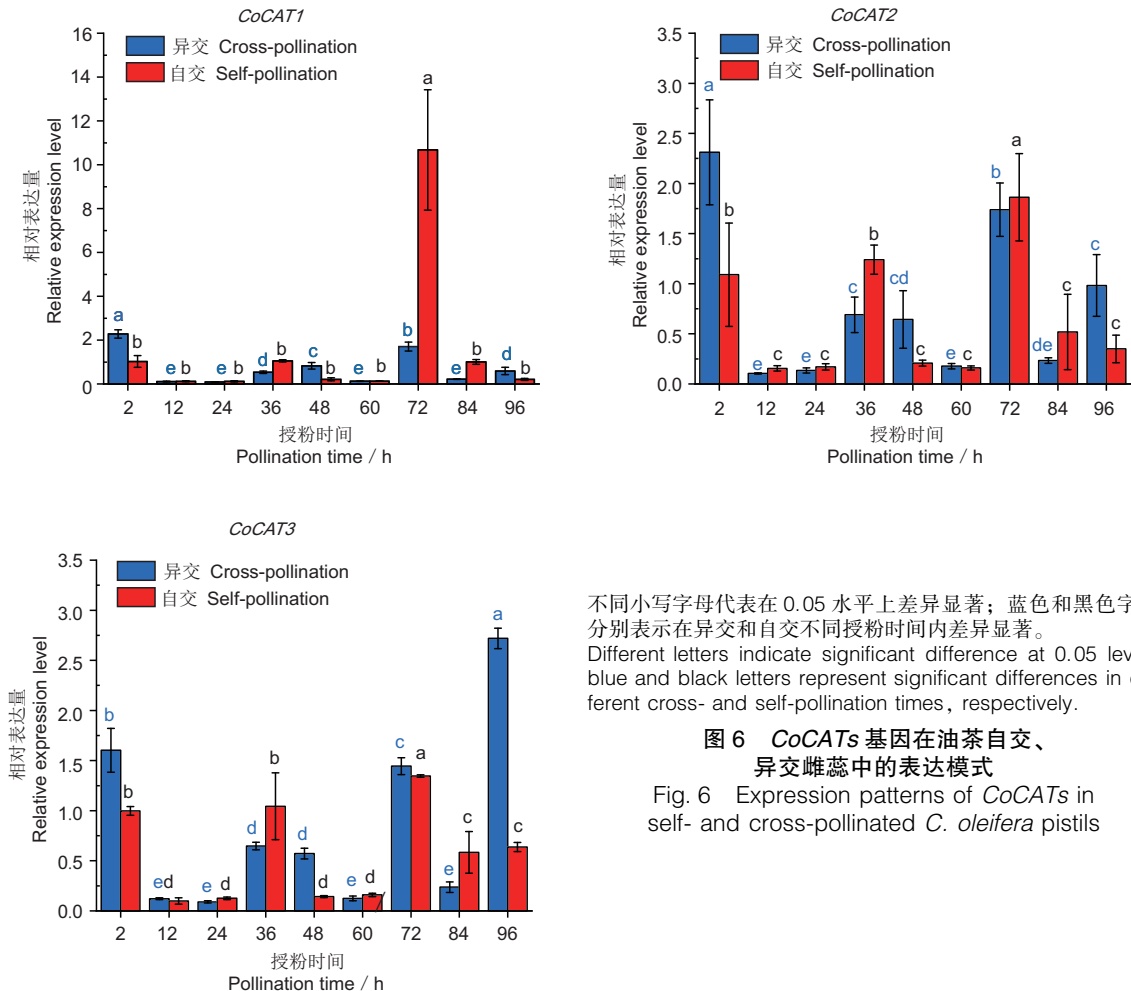
2.3.6 CoCATs 基因的表达分析

采用 qPCR 方法检测 CoCATs 基因在自交、异交授粉雌蕊中的表达情况，结果如图 6 所示。CoCAT1 在异交授粉雌蕊中的相对表达量均较低，



黑点为油茶 CoCATs 蛋白；At: 拟南芥；Cs: 茶；Nt: 烟草；Sl: 番茄；Rc: 蓖麻；Jc: 麻风树；Zm: 玉米；St: 马铃薯；Eg: 油棕；Os: 水稻。
Black dots are CoCATs; At: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; Cs: *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.; Nt: *Nicotiana tabacum* L.; Sl: *Lycopersicon esculentum* Mill.; Rc: *Ricinus communis* L.; Jc: *Jatropha curcas* L.; Zm: *Zea mays* L.; St: *Solanum tuberosum* L.; Eg: *Elaeis guineensis* Jacq.; Os: *Oryza sativa* L..

图 5 油茶与其他植物 CATs 蛋白的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of CoCATs with CAT proteins from other plant species



不同小写字母代表在 0.05 水平上差异显著；蓝色和黑色字母分别表示在异交和自交不同授粉时间内差异显著。
Different letters indicate significant difference at 0.05 level; blue and black letters represent significant differences in different cross- and self-pollination times, respectively.

图 6 CoCATs 基因在油茶自交、异交雌蕊中的表达模式
Fig. 6 Expression patterns of CoCATs in self- and cross-pollinated *C. oleifera* pistils

在自交授粉 72 h 后的雌蕊中表达量最大。CoCAT2 在异交授粉 2 h 后的雌蕊中相对表达量最高, 在自交授粉 72 h 后的雌蕊中表达量最高。在异交授粉雌蕊中, CoCAT3 的相对表达量在 96 h 时最高, 且高于自交; CoCATs 基因在 2、48、96 h 异交雌蕊中的表达量均显著高于同期自交雌蕊, 而在 36、84 h 自交雌蕊中的表达量则高于异交。

3 讨论

CAT 是一种主要的胞质抗氧化酶, 在植物器官发生、雄性不育等方面起着重要作用^[7]。花粉萌发、花粉管生长以及花粉与花柱的互作、植物自交不亲和过程均涉及 Ca^{2+} 和 ROS 信号分子^[27-29], 而 CAT、SOD 等活性氧清除酶维系着胞内 ROS 处于稳定状态^[30]。研究发现, CaM 可以通过刺激植物 CAT 的催化活性来下调植物体内的 H_2O_2 水平^[31]。熊博等^[32]发现钙能调控黄果柑 (*Citrus cul-tivar* cv. Huangguogan) 果实的 CAT 活性, 增强其清除活性氧的能力。Dat 等^[33]也发现, 反义表达 *Cat* 的转基因烟草 (*Nicotiana tabacum* L., CAT1AS), 由于 CAT 活性的降低, 导致 H_2O_2 过量积累, 从而触发细胞主动死亡。向警等^[34]发现添加不同浓度的褪黑素能够显著增强幼苗的 CAT 活性, 从而显著降低 ROS 含量。CATs 在控制 ROS 水平和植物细胞的氧化还原平衡中起着关键作用^[35]。此外, 也有研究表明, 两性花、雄花的性别分化与抗氧化酶活性相关, 两性花的发育需要更高活性的抗氧化酶参与^[36, 37]。

前人研究发现, 油茶自交不亲和反应主要发生在花柱基部接近子房处, 自花授粉花粉管在授粉 48~72 h 后停止生长, 出现扭曲、折叠等异常反应^[38]。自、异花授粉均会引起油茶雌蕊内 CAT 活性的上升, 但幅度不同, 有学者推测这是植物在长期进化过程中形成的有利于自身繁殖以及保护自身种质资源的一种有效措施^[17]。

本实验克隆了 CoCAT1~CoCAT3 基因, 其编码产物均为亲水性蛋白。3 个蛋白分别有 41、25、36 个蛋白磷酸化位点, 推测 CoCATs 可能被磷酸化激活, 在基因调控通路中发挥重要作用。序列比对发现这 3 个基因与茶 CAT 基因的相似性最高, 且编码蛋白具备 CATs 蛋白的保守结构域^[39]。3

个蛋白的三维结构和枯草芽孢杆菌 CAT A 链晶体结构类似。

本研究构建了 CATs 蛋白网络, 并进行了 GO 及 KEGG 富集分析。结果发现, CATs 与 APX1、APX3、GR、FSD ~ FSD3、GPX2、CSD1 ~ CSD3 及 MSD1 之间存在相互作用, 细胞氧化解毒代谢过程、氧化还原过程及活性氧代谢过程为显著性富集功能途径。推测 CATs 在参与油茶自交不亲和过程中, 与富集到的细胞氧化解毒代谢、氧化还原及活性氧代谢过程的蛋白成员共同发挥调控作用。系统发育分析表明, CoCATs 与同为山茶属的茶树 Cs-CAT1 的亲缘关系较近。3 个 CoCATs 基因在授粉 36、84 h 后的自交雌蕊中表达量高于异交; 前期研究发现, 自交雌蕊 CAT 活性从授粉 36 h 后急剧增加, 到 60 h 达到最大值后骤降。推测这段时间内自交雌蕊中增加了 CAT 相关基因的表达量以抵抗活性氧自由基的伤害, 在自交授粉 72 h 后雌蕊的 CAT 基因表达量显著高于其他时间段, 说明自交花粉管在到达花柱基部及子房上部过程中均受到阻碍, 推测 3 个基因编码产物可能参与了油茶自交不亲和引起的自身防御反应。但这些基因的调控机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 曹彦妮. 油茶 *FBPase* 基因和 *GAPDH* 基因的全长 cDNA 克隆及原核表达分析[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011: 1-71.
- [2] 高超, 杨瑞, 郭其强, 袁德义. 油茶柱头和花柱的显微与超微结构特征[J]. 林业科学研究, 2019, 32(1): 1-7.
Gao C, Yang R, Guo QQ, Yuan DY. Microstructure and ultrastructure characteristics of stigma and style of *Camellia oleifera*[J]. *Forest Research*, 2019, 32(1): 1-7.
- [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[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(7): 34-37.
Liao T, Yuan DY, Peng SF, Zou F. A fluorescence microscope observation on self and cross-pollination of pollen tubes in *Camellia oleifera*[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2012, 32(7): 34-37.
- [4] 高超. 油茶后期自交不亲和性的细胞学研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2017: 1-107.
- [5] Liao T, Yuan DY, Zou F, Gao C, Yang Y, et al. Self-sterility in *Camellia oleifera* may be due to the prezygotic late-acting self-incompatibility[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99639.
- [6] 廖婷. 油茶自交不亲和性初步研究[D]. 长沙: 中南林业科

- 技大学, 2013: 1–75.
- [7] Ogata M. Acatalasemia [J]. *Hum Genet*, 1991, 86(4): 331–340.
- [8] 陈卫国, 刘勇, 周冀衡. 低温胁迫对烟草膜保护酶系统的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(7): 3978–3980.
Chen WG, Liu Y, Zhou JH. Influence of low temperature stress on the membrane-protected enzyme system in tobacco [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(7): 3978–3980.
- [9] 贾晨晨. 葡萄过氧化氢酶基因在毕赤酵母中的表达及酶学特性的初级研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 1–94.
- [10] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, *et al.* Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants [J]. *EMBO J*, 1997, 16(16): 4806–4816.
- [11] 宋新华, 赵风云. 植物体内过氧化氢酶的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(31): 9824–9827.
Song XH, Zhao FY. Research progress on catalase in plants [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(31): 9824–9827.
- [12] Li J, Liu JT, Wang GQ, Cha JY, Li GN, *et al.* A chaperone function of NO CATALASE ACTIVITY1 is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(3): 908–925.
- [13] Li Q, Yang A, Zhang WH. Comparative studies on tolerance of rice genotypes differing in their tolerance to moderate salt stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2017, 17(1): 141.
- [14] Redinbaugh MG, Wadsworth GJ, Scandalios JG. Characterization of catalase transcripts and their differential expression in maize [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Struct Expression*, 1988, 951(1): 104–116.
- [15] 侯含, 王升平, 张超群, 周志成, 余祥文, 等. 烟草过氧化氢酶基因 CAT2 克隆与表达特征分析 [J]. *中国烟草科学*, 2019, 40(1): 1–8.
Hou H, Wang SP, Zhang CQ, Zhou ZC, Yu XW, *et al.* Cloning of *Catalase 2 (CAT2)* gene and study on its expression pattern in *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2019, 40(1): 1–8.
- [16] 林星谷, 孔德仓, 庞晓明, 李颖岳. 冬枣过氧化氢酶基因的克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2012, 32(6): 1086–1092.
Lin XG, Kong DC, Pang XM, Li YY. Cloning and tissue expression analysis of catalase gene in Dongzao (*Ziziphus jujuba*) [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(6): 1086–1092.
- [17] 吴能表, 徐光德, 唐于婷, 朱利泉, 王小佳. 自交不亲和和甘蓝的花粉萌发与花柱内保护酶活性变化 [J]. *西南师范大学学报 (自然科学版)*, 2004, 29(5): 848–851.
Wu NB, Xu GD, Tang YT, Zhu LQ, Wang XJ. Pollen germination and change of protective enzyme activity in style of self-incompatible *Brassica oleracea* L. [J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2004, 29(5): 848–851.
- [18] 王保成, 孙万仓, 范惠玲, 孟亚雄, 马静芳, 等. 芸芥自交亲和系与自交不亲和系 SOD、POD 和 CAT 酶活性 [J]. *中国油料作物学报*, 2006, 28(2): 162–165, 171.
Wang BC, Sun WC, Fan HL, Meng YX, Ma JF, *et al.* Studies on SOD、POD and CAT activity between self-compatible and self-incompatible lines in *Eruca sativa* Mill [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2006, 28(2): 162–165, 171.
- [19] 张雪梅, 李保国, 赵志磊, 郭素萍, 齐国辉. 苹果自花授粉花粉管生长和花柱保护酶活性与内源激素含量的关系 [J]. *林业科学*, 2009, 45(11): 20–25.
Zhang XM, Li BG, Zhao ZL, Guo SP, Qi GH. Relationship between compatibility of self-pollination and changes in protecting enzyme and hormone in different apple cultivars [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45(11): 20–25.
- [20] Zhou JQ, Lu MQ, Yu SS, Liu YY, Yang J, Tan XF. In-depth understanding of *Camellia oleifera* self-incompatibility by comparative transcriptome, proteome and metabolome [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1600.
- [21] 谭晓风, 袁德义, 袁军, 邹锋, 谢鹏, 等. 大果油茶良种‘华硕’ [J]. *林业科学*, 2011, 47(12): 184, 209.
Tan XF, Yuan DY, Yuan J, Zou F, Xie P, *et al.* An elite variety: *Camellia oleifera* ‘Huashuo’ [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2011, 47(12): 184, 209.
- [22] 袁德义, 谭晓风, 邹锋, 袁军, 谢鹏, 等. 油茶良种‘华金’ [J]. *林业科学*, 2012, 48(2): 187, 190.
Yuan DY, Tan XF, Zou F, Yuan J, Xie P, *et al.* An elite variety: *Camellia oleifera* ‘Huajin’ [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2012, 48(2): 187, 190.
- [23] 王群, 刘朝巍, 徐文娟. 紫外分光光度法测定玉米过氧化氢酶活性新进展 [J]. *中国农学通报*, 2016, 32(15): 159–165.
Wang Q, Liu CW, Xu WJ. Ultraviolet spectrophotometry measurement of catalase activity in maize [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(15): 159–165.
- [24] Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(15): 2471–2472.
- [25] Xiao XL, Ma JB, Wang JR, Wu XM, Li PB, Yao YN. Validation of suitable reference genes for gene expression analysis in the halophyte *Salicornia europaea* by real-time quantitative PCR [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 5: 788.
- [26] Loewen PC, Villanueva J, Switala J, Donald LJ, Ivancich A. Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy

- [J]. *Proteins Struct Funct Bioinf*, 2015, 83(5): 853–866.
- [27] Zafra A, Rodríguez-García MI, de Dios Alché J. Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development[J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 36.
- [28] Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, Ings J, Smirnov N, Franklin-Tong VE. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of *Papaver*[J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(1): 404–416.
- [29] Wheeler MJ, de Graaf BHH, Hadjiosif N, Perry RM, Poulter NS, *et al*. Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*[J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 992–995.
- [30] Sewelam N, Kazan K, Schenk PM. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 187.
- [31] Yang T, Poovaiah BW. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6): 4097–4102.
- [32] 熊博, 汪志辉, 廖凤玲, 范茜茜, 李立佼, 王晓晓. 钙对黄果柑果实3种抗氧化酶活性的影响[J]. *植物科学学报*, 2014, 32(2): 168–173.
- Xiong B, Wang ZH, Liao FL, Fan QQ, Li LJ, Wang XX. Effects of Calcium on the activities of three antioxidant enzymes in Huangguogan fruit[J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(2): 168–173.
- [33] Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, *et al*. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco[J]. *Plant J*, 2003, 33(4): 621–632.
- [34] 向警, 黄倩, 鞠春燕, 黄伦霄, 赵正武. 外源褪黑素对盐胁迫下水稻种子萌发与幼苗生长的影响[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(2): 393–401.
- Xiang J, Huang Q, Ju CY, Huang LX, Zhao ZW. Effect of exogenous melatonin on seed germination and seedling growth of rice under salt stress[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(2): 393–401.
- [35] 吕芳, 丁刚, 詹冬梅, 王翔宇, 吴海一. 茉莉酸甲酯对铜藻生长、抗氧化系统及岩藻黄素含量的影响[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(5): 667–675.
- Lü F, Ding G, Zhan DM, Wang XY, Wu HY. Effect of methyl jasmonate on the growth, antioxidant system and fucoxanthin content of *Sargassum horneri*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55(5): 667–675.
- [36] 黄玲, 赖佳, 韦树谷, 代顺冬, 李琼英, 等. 石刁柏两性花与雄花的抗氧化酶活性及其相关基因可变剪接的差异分析[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(8): 1231–1238.
- Huang L, Lai J, Wei SG, Dai SD, Li QY, *et al*. Differences of antioxidant enzyme activities and alternative splicing of related genes between hermaphroditic and male flower buds in asparagus[J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55(8): 1231–1238.
- [37] 范晓明, 袁德义, 李建中, 田晓明, 熊欢, 朱周俊. 锥栗花序分化发育过程中的生理生化变化[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(12): 2206–2214.
- Fan XM, Yuan DY, Li JZ, Tian XM, Xiong H, Zhu ZJ. Physiological and biochemical changes in *Castanea henryi* during the inflorescence differentiation[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(12): 2206–2214.
- [38] 高超, 袁德义, 杨亚, 王碧芳, 刘冬明, 等. 油茶自交不亲和性的解剖特征[J]. *林业科学*, 2015, 51(2): 60–68.
- Gao C, Yuan DY, Yang Y, Wang BF, Liu DM, *et al*. Anatomical characteristics of self-Incompatibility in *Camellia oleifera*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(2): 60–68.
- [39] 李欢, 陈莹, 黑小斌, 张娜, 张岗, 郭顺星. 铁皮石斛过氧化氢酶基因 *DoCAT1* 的鉴定与表达分析[J]. *中国药学杂志*, 2018, 53(17): 1447–1452.
- Li H, Chen Y, Hei XB, Zhang N, Zhang G, Guo SX. Identification and expression analysis of a catalase gene *DoCAT1* in *Dendrobium officinale*[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2018, 53(17): 1447–1452.

(责任编辑:李惠英)