DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00071

甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因的克隆及菌核病菌诱导表达

杨鸯鸯 李 云** 丁 勇 徐春雷 张成桂 刘 英 甘 莉*

华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070

摘 要: 依据拟南芥、芥菜型油菜和白菜已知超氧化物歧化酶(SOD)保守序列设计引物, 用同源序列法和 RT-RACE 技术克隆甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因, 经序列分析和基因片段拼接, 得到 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因的全长 cDNA, 分别为 756 bp (GenBank 登录号 AY970822)和 1 037 bp (GenBank 登录号 EF634058)。以 cDNA 序列设计引物, 获得 1 322 bp 的 Cu/ZnSOD 基因组 DNA (GenBank 登录号 DQ431853)和 1 659 bp 的 FeSOD 基因组 DNA (GenBank 登录号 EF634057)。生物信息学分析表明, Cu/ZnSOD 基因 ORF 框长 459 bp, 编码 152 个氨基酸残基的蛋白质, 在基因组序列结构上具有 7 个外显子和 6 个内含子。而 FeSOD 基因 ORF 框长 792 bp, 编码 263 个氨基酸残基的蛋白质, 在基因组序列结构上具有 8 个外显子和 7 个内含子。二者外显子和内含子交接处完全符合 GT/AG 规则。利用获得的 Cu/ZnSOD 的 cDNA 片段作探针, 对菌核病菌诱导甘蓝型油菜叶片的 mRNA 进行 Northern blot 分析, 结果显示在同一品种(系)中菌核病菌诱导后 Cu/ZnSOD mRNA 表达量比诱导前升高, 抗(耐)型油菜 Cu/ZnSOD mRNA 表达量明显高于感病型。油菜叶片 SOD 酶活性分析结果也获得了完全一致的结果。以上结果表明, 甘蓝型油菜 SOD 基因与菌核病抗性相关。

关键词: Cu/Zn-超氧化物歧化酶; Fe-超氧化物歧化酶; 甘蓝型油菜; 菌核病菌; 基因表达分析

Cloning of Cu/Zn-Superoxide Dismutase of *Brassica napus* and Its Induced Expression by *Sclerotinia sclerotiorum*

YANY Yang-Yang, LI Yun**, DING Yong, XU Chun-Lei, ZHANG Cheng-Gui, LIU Ying, and GAN Li*

College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Using primers designed from conserved homologous sequences of the genes for superoxide dismutase (SOD) among *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, and *B. rapa* ssp. *pekinensis*, Cu/ZnSOD and FeSOD genes in *B. napus* were cloned via the methods of homology-based candidate gene and RACE-PCR. After cloning and sequencing, the full lengths of cDNA of Cu/ZnSOD and FeSOD genes (accession no. AY970822 and EF634058 in GenBank) were 756 and 1 037 bp, respectively. Their corresponding genomic sequences were 1 322 bp for Cu/ZnSOD gene and 1 659 bp for FeSOD gene with accession nos. DQ431853 and EF634057 in GenBank, respectively. Bioinformatic analyses showed that the ORF of Cu/ZnSOD gene with 459 bp contained six introns with seven exons and a polyA tail and could express a protein of 152 amino acids; and the one of FeSOD gene with 792 bp contained seven introns with eight exons and could determine a protein of 263 amino acids. With cDNA of Cu/ZnSOD gene as a probe, Northern blot analysis showed that its mRNA expression in *B. napus* cultivars increased after the infection by *Sclerotinia sclerotiorum*, the expression amount in resistant or tolerant varieties was higher than that in sensitive ones. The same trend was observed for the SOD activity in leaves. These results suggested that SOD genes were related with the resistance to the disease.

Keywords: Cu/ZnSOD; FeSOD; *Brassica napus*; *Sclerotinia sclerotiorum*; Gene expression analysis

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)在生物界广泛存在, 按活性中心所含金属离子不同, 可分为 Cu/ZnSOD、MnSOD 和 FeSOD 3 种类型。序

列比对分析表明不同植物间的 Cu/ZnSOD 氨基酸具有高度同源性, MnSOD 氨基酸同源性在 70%以上, 而 FeSOD 氨基酸同源性约为 60%, 低于 MnSOD^[1]。

本研究由国家自然科学基金资助项目(30170600), 湖北省自然科学基金项目(2001ABD113)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 甘莉, E-mail: ganli@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87287376; Fax: 027-87287376

第一作者联系方式: E-mail: yangyang401@126.com(杨鸯鸯); leeyun307@webmail.hzau.edu.cn(李云) **共同第一作者

Received(收稿日期): 2008-04-20; Accepted(接受日期): 2008-06-15.

SOD 是活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除系统发挥重要作用的抗氧化酶,在保护细胞免受氧化损伤过程中具有十分重要的作用^[2]。研究证明,SOD 可减轻由于除草剂引起的光氧化压力(photooxidative stress)^[3]。在用转基因紫花苜蓿的研究中发现 SOD 既能增强植物的抗寒性,又能减轻植物的光氧化压力^[4]。在拟南芥中,发现有 7 种 SOD,其中 3 个是 Cu/ZnSOD,3 个是 FeSOD 的,另外 1 个是 MnSOD,这些翻译产物在细胞内不同逆境下的有不同的调控作用^[5]。Baek 等^[6]得到了小麦的 MnSOD 基因组序列,结构分析发现小麦在冷胁迫下其 3 种 MnSOD 的表达量是不同的。Liu 等^[7]在芥菜型油菜中克隆到 2 个 Cu/ZnSOD 的 cDNA 片段。

国内用 SOD 防治烟草气候斑点病^[8]的效果极为显著;烟草接种马铃薯 Y 病毒(PVY)后 2~4 d 内 SOD 活性没有明显变化,随后才显著升高,至第 8 天达峰值,而 14 d 后开始降低^[9]。国外对 SOD 与小麦斑点病^[10]、黄瓜霜霉病^[11],国内就 SOD 与小麦白粉病^[12]、玉米纹枯病^[13]及大豆细菌性斑点病^[14]之间的关系也进行了深入的研究,结果显示凡感染病害的,其植株体内 SOD 活性都有所增强。

菌核病(Sclerotinia stem rot)是由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起的一种严重的真菌病害。在芸薹属(*Brassica*)中,有 48 个成员可被核盘菌寄生,其中包括油料作物、蔬菜、花卉和它们的一些野生种^[15]。油菜菌核病是世界性的主要病害,是油菜抗病育种的重点和难点。本研究进行甘蓝型油菜(*Brassica napus*) Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因克隆,了解甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 基因的结构和菌核病菌诱导前后甘蓝型油菜抗病和感病品种(系)SOD 基因表达差异,探讨甘蓝型油菜 SOD 基因在菌核病菌侵染下的抗病机制,为油菜抗菌核病育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为华中农业大学油菜室提供的甘蓝型油菜抗(耐)菌核病品种(系)中油-821、宁 RS-1 和中 R-888 以及感病品种(系)宁油 7 号、皖油早和矮架早^[16]。油菜菌核病菌采自华中农业大学油菜试验田甘蓝型油菜病株,经 PDA 培养基扩大培养作为供试菌源。

1.2 苗期抗性鉴定与取样

取田间自然生长的 6~7 叶期油菜中下部健壮的成熟叶片,每种材料取 12 株,每株取 1 片,重复 3~4

次。采用离体叶菌丝琼脂块接种法^[17],接种 48 h 后测量病斑(垂直方向测量 2 次,取平均值),取样。

1.3 用同源序列法和 RACE 技术扩增 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因

依据拟南芥^[5]、芥菜型油菜^[7]、白菜^[18]等已知过氧化物歧化酶(SOD)保守序列设计特异引物(表 1),由北京奥科生物技术有限责任公司合成引物。

用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收 PCR 扩增产物,按 A/T 克隆载体试剂盒说明书 A/T 克隆,经菌落 PCR 和酶切鉴定后,送北京三博远志生物技术有限公司测序,获得 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因的 cDNA 序列。根据拼接的 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 的 cDNA 全长序列设计引物,以中油 821 基因组 DNA 为模板,扩增 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 的基因组 DNA。

1.4 生物信息学数据库及生物软件

1.4.1 生物信息学数据库 美国国家生物信息技术中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)提供并维护的 Blast 数据库,EST 数据库,用 ORFFinder 预测可能的开放阅读框,Align two sequences (bl2seq) 进行比对分析。用 Softberry (<http://www.softberry.com>)中的 Gene Finding 工具,对基因组 DNA 序列进行基因预测。

1.4.2 生物软件 用生物信息学序列比对软件 Vector NTI Suite8.0 软件进行不同物种间同源基因的核苷酸序列比对,EST 片段的拼接,以及绘制系统发育树。用 Primer Premier5.0 和 Oligo6 生物学软件设计引物。基于同源建模的预测方法,应用 Swiss-model(<http://swissmodel.expasy.org/>)的蛋白质模型运算服务器,进行蛋白质的三维结构预测。

1.5 过氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

参照李合生等^[19]的方法,称取 0.5 g 鲜样总共加 0.05 mol L⁻¹ pH 7.8 磷酸缓冲液 5 mL 于冰浴上碾磨,4℃,1 500 × g 下离心 15 min,上清液为酶液。取 5 只小烧杯(A、B、C、D、E),在 A、B、C 烧杯中分加 0.1 mL 酶液、130 mmol L⁻¹ Met 溶液 0.6 mL、750 μmol L⁻¹ NBT 溶液 0.6 mL、100 μmol L⁻¹ EDTA-Na₂ 溶液 0.6 mL、20 μmol L⁻¹ 核黄素 0.6 mL、0.05 mol L⁻¹ pH 7.8 磷酸缓冲液 3 mL 及 0.5 mL 蒸馏水,在 D、E 中杯不加酶液,而以 0.05 mol L⁻¹ pH 7.8 磷酸缓冲液 0.1 mL 代替。对 A、B、C、D 烧杯在 80 μmol m⁻² s⁻¹ 光源下照光 10 min, E 杯放在黑暗中做空白对照,于 560 nm 波长下测定吸光值(OD 值),以抑制 NBT 光化还原的 50%为一个酶活单位。

表 1 甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因 PCR 扩增引物
Table 1 Primers for PCR of Cu/ZnSOD and FeSOD genes in *B. napu*

引物名称 Primer	引物序列 Sequence(5 -3)
Cu/ZnSOD-U	CCCTGAGATCACAAAGGATATAC
Cu/ZnSOD-L	TTAGCCCTGAAGACCAATAATAC
Adaptor-LC3	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC
LC3-T17	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Cu/ZnSOD 3'Race-1	ACTGCCACCTTCACAATCAC
Cu/ZnSOD 3'Race-2	AGGCCATGAACTCAGCTTGTCTAC
Cu/ZnSOD 5'Race-RT	CAACAGCCCTTCCTACAATA
Cu/ZnSOD 5'Race-1	GAAGATAGTCCCCTTAACACCCT
Cu/ZnSOD 5'Race-2	CTCCAGCATGACGATTAGCATCC
Cu/ZnSODGE-U	CCCTGAGATCACAAAGGATATACAA
Cu/ZnSODGE-L	CCAAAAGCAATGAGCCACTAAG
FeSOD-U	AGTGCATTGGGGAAAACACC
FeSOD-L	AAGCCAGACCCATCCAGAAC
Adaptor	CTGAACAAGAGGCACCACAC
Adaptor-T17	CTGAACAAGAGGCACCACACTTTTTTTTTTTTTTTTTT
FeSOD 3'Race-1	GAGCTTATCAAGGCCACATACAAC
FeSOD 3'Race-2	CCTTTGCCTGAGTTCAACTACGC
FeSOD 5'Race-U	ATGGCTTCTTGTTTGTGAC
FeSOD 5'Race-L	ATTCCCGTTGTTGTATGTG
FeSODGE-U	ATGGCTTCTTGTTTGTGAC
FeSODGE-L	CTTCTTGTTTGGAACCTCTG

1.6 Northern blot 分析

用随机引物制备放射性标记的 DNA 探针。RNA 上样量为 30 μg。杂交前用 6×SSC 将膜浸湿, 预杂交 2~3 h, 42 ℃ 杂交 16~20 h。放射自显影。利用 Quantity One 软件对杂交结果进行定量分析。

1.7 统计分析

用 SAS 软件进行 *q* 检验法统计分析。

2 结果与分析

2.1 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 全长 cDNA 的克隆及性质预测分析

用 RT-PCR、RACE 和电子克隆技术扩增得到 756 bp 的 Cu/ZnSOD 基因 cDNA 全长(GenBank 登录号 AY970822)和 1 037 bp 的 FeSOD 基因 cDNA 全长(GenBank 登录号 EF634058)。经序列分析, Cu/ZnSOD 基因与白菜 Cu/ZnSOD(AF071112)、拟南芥 CSD1(NM100757)基因的同源性均在 90%以上。该 cDNA 序列含有 459 bp 的完整编码框, 编码一个 152 氨基酸残基的蛋白质。而 FeSOD 基因与拟南芥

(NM122237)、陆地棉(DQ088821)在核苷酸水平上有较高的一致性, 分别为 90%和 76%, ORF 长 792 bp, 编码一 263 氨基酸残基的蛋白质。

对编码蛋白的分析表明(图 1), Cu/ZnSOD 蛋白与白菜(*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)的细胞质 Cu/ZnSOD(AF071112)^[18]相比, 其保守型高达 99%, 与萝卜(*Raphanus sativus* 登录号 AF009735)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NM100757)的同源性在 90%以上, 与佛手掌(*Mesembryanthemum crystallinum*, MCU80069)、榉木(*Fagus sylvatica*, AJ586519)、荷花(*Nelumbo nucifera*, DQ227345)、甜杨(*Populus suaveolens*, DQ481231)的同源性也均在 80%以上, 表明该序列为甘蓝型油菜的 Cu/ZnSOD。

FeSOD 蛋白(图 2)与拟南芥(*A. thaliana*) FSD3 GenBank 登录号 NP197722)的同源性为 96%, 与陆地棉(*G. hirsutum*, ABA00456)、手掌参(*G. conopsea*, ABF68752)的同源性为 80%以上, 表明我们得到的序列所翻译的蛋白可能是甘蓝型油菜 FeSOD 蛋白。

图 1 不同来源 Cu/ZnSOD 氨基酸序列比较

Fig. 1 Comparison of Cu/ZnSOD amino acid sequences with different origins

划线部分表示相应的组成活性部位的氨基酸残基。

The corresponding amino acids which composed active spot were underlined.

图 2 不同来源 FeSOD 氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of FeSOD amino acid sequences with different origins

下划线部分表示相应的组成活性部位的氨基酸残基。

The corresponding amino acids composed active spot are underlined.

从 Vector NTI Suite8.0 软件构建的几种植物 SOD 系统发育树(图 3)可以看出, Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因在亲缘关系近的物种间同源性很高, 即使亲缘关系较远的物种间其同源性也是较高的。说明 SOD 基

图 3 SOD 基因物种间进化树

Fig. 3 Dendrogram of SOD gene for related species

A :Cu/ZnSOD 基因物种间进化树; B :FeSOD 基因物种间进化树。

下画线表示克隆到该物种的基因。

A: dendrogram of Cu/ZnSOD gene in some species; B: dendrogram of FeSOD gene in some species. Species underlined with the gene cloned.

因在不同物种间具有较强的保守性, 系统发育树基本上代表了它们在经典分类上的地位。

2.2 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因组 DNA 的克隆及结构预测

以克隆的 Cu/ZnSOD 和 FeSOD cDNA 序列为参照设计引物, 扩增获得 1 322 bp 的 Cu/ZnSOD 基因组 DNA(GenBank 登录号 DQ431853)和 1 659 bp 的 FeSOD 基因组 DNA (GenBank 登录号 EF634057)。用 Softberry 网站的 Gene Finding 工具进行基因结构预测, 结果显示 Cu/ZnSOD 包含 7 个外显子和 6 个内含子(图 4-A), FeSOD 为 8 个外显子和 7 个内含子。二者均有一个 polyA 结构, 外显子和内含子交接处完全符合 GT/AG 规则(图 4-B)。

2.3 蛋白质的三维结构预测

依据同源建模的预测方法, 应用 Swiss-model 构建的甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 蛋白高级结构模型(图 5), 其中 Cu/ZnSOD 蛋白结构模型有 1 个 α -螺旋和 7 个 β -折叠, 而 FeSOD 蛋白结构模型有 8 个 α -螺旋和 3 个 β -折叠。

2.4 甘蓝型油菜苗期抗菌核病菌鉴定

采用离体叶片菌丝琼脂块接种法对甘蓝型油菜苗期抗菌核病菌的菌斑分析表明, 感病品种(系)(皖油早、矮架早和宁油 7 号)在接种菌核病菌 48 h 后菌斑平均直径(cm)显著大于抗(耐)菌核病菌的品种(系)(中 R888 和宁 RS-1)($P<0.05$), 中抗品种中油 821 的感染菌斑直径界于抗(耐)与感病品种(系)之间(表 2)。

2.5 菌核病菌诱导 Cu/ZnSOD 基因上调表达

依据获得的 cDNA 序列制备 487 bp 的 Cu/ZnSOD 探针, 对菌核病菌诱导的甘蓝型油菜 mRNA 进行 Northern blot 杂交分析表明(图 6 和图 7), 抗(耐)菌核病菌品种(中 R-888 和宁 RS-1))中 Cu/ZnSOD 基

图 4 甘蓝型油菜 SOD 基因组结构图

Fig. 4 Genomic structure of *Brassica napu* SOD

A : 甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 基因组结构图; B : 甘蓝型油菜 FeSOD 基因组结构图。

A: genomic structure of *Brassica napus* Cu/ZnSOD; B: genomic structure of *Brassica napus* FeSOD.

图 5 甘蓝型油菜 SOD 蛋白三维结构预测图
Fig. 5 3D structure prediction of *Brassica napu* SOD protein

A : 甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 蛋白三维结构预测图; B : 甘蓝型油菜 FeSOD 蛋白三维结构预测图。
A: 3D structure prediction of *Brassica napu* Cu/ZnSOD protein, B: 3D structure prediction of *Brassica napu* FeSOD protein.

表 2 甘蓝型油菜苗期接菌后病斑形成的比较
Table 2 Comparison of disease spots from rapeseed cultivars with *S. sclerotiorum* in seedling stage

甘蓝型油菜品种(系) Rapeseed cultivar(line)	病斑平均直径 Average diameter of disease spots(cm)
皖油早 Wanyouzao	1.86(0.73) a
矮架早 Aijiazao	1.83(0.67) a
宁油 7 号 Ningyou 7	2.28(0.43) a
中油 821 Zhongyou 821	1.31(0.30) b
中 R888 Zhong R888	1.14(0.41) b
宁 RS-1 Ning RS-1	1.02(0.31) b

标以不同字母的值在 0.05 水平上差异显著。括号中数值是标准差。

Values followed by a different letter are significantly different at the 0.05 probability level. The value in bracket is standard deviation.

图 6 油菜菌核病菌对 Cu/ZnSOD 基因表达水平的影响
Fig. 6 Results of northern blotting before(A) and after(B) inoculation with *S. sclerotiorum*

A : 菌核病菌诱导前 Cu/ZnSOD 的基因表达水平; B : 菌核病菌诱导后 Cu/ZnSOD 的基因表达水平; 1 : 皖油早; 2 : 宁油 7 号; 3 : 矮架早; 4 : 中油 821; 5 : 中 R-888; 6 : 宁 RS-1。
A: expression of Cu/ZnSOD gene before inoculation with *S. sclerotiorum*; B: expression of Cu/ZnSOD gene after inoculation with *S. sclerotiorum*. 1: Wanyouzao; 2: Ningyou 7; 3: Aijiazao; 4: Zhongyou 821; 5: Zhong R888; 6: Ning RS-1.

图 7 图 6-A 和 B 中 Northern 杂交结果的定量分析
Fig. 7 Average gray value from Northern blotting in Fig. 6-A and B

1 : 皖油早; 2 : 宁油 7 号; 3 : 矮架早; 4 : 中油 821; 5 : 中 R-888; 6 : 宁 RS-1。
1: Wanyouzao; 2: Ningyou-7; 3: Aijiazao; 4: Zhongyou821; 5: ZhongR888; 6: NingRS-1.

因表达量明显高于感病(皖油早、矮架早和宁油 7 号)材料, 而且在所有抗和感病品种(系)中, 经菌核病菌诱导后 Cu/ZnSOD 的 mRNA 表达量上调, 这表明甘蓝型油菜 Cu/ZnSOD 基因对菌核病菌具有抗性应答效应。

2.6 Cu/ZnSOD 酶活性对菌核病菌诱导的应答作用

表 3 表明, 菌核病菌诱导前, 抗(耐)菌核病油菜品种(系)(宁 RS-1 和中 R888)的 Cu/ZnSOD 酶活性极显著高于感病品种(系)(矮架早、皖油早和宁油 7 号)($P<0.01$); 菌核病菌诱导后, 甘蓝型油菜各品种(系)的 Cu/ZnSOD 酶活性比菌核病菌诱导前都有所升高, 其中感病品种(系)上升水平极显著大于抗(耐)病品种(系)($P<0.01$)。

表 3 菌核病菌诱导前后不同品种(系)的 SOD 活性
Table 3 SOD activity of rapeseed variety after inoculation with *S. sclerotiorum*

品种(系) Variety (line)	未接种 Non inoculation (U g ⁻¹)	接种 Inoculation (U g ⁻¹)	上升 Increase rate (%)
宁 RS-1	189.40 A	238.83 A	26.10 B
Ning RS-1			
中 R888	144.69 A	182.02 A	25.80 B
Zhong R888			
中油 821	100.43 B	135.21 B	34.63 B
Zhongyou 821			
矮架早	83.81 B	143.32 B	71.01 A
Aijiazao			
皖油早	81.17 B	138.95 B	71.18 A
Wanyouzao			
宁油 7 号	85.98 B	134.08 B	55.94 A
Ningyou 7			

同列中标以不同字母的值在 0.01 水平上差异显著。

Values within a column followed by a different letter are significantly different at the 0.01 probability level.

3 讨论

甘蓝型油菜不同抗(耐)、感菌核病品种(系)在菌核病菌诱导前、后叶片 SOD 酶活性的测定结果表明, 菌核病菌诱导前, 抗(耐)菌核病品种(系)的 SOD 活性显著或极显著大于感病品种(系)的 SOD 酶活; 诱导后, 各品种(系)SOD 活性均比诱导前都有所升高, 尽管感病品种(系)上升幅度极显著大于抗(耐)病品系, 但 SOD 酶活性的绝对值仍然小于抗(耐)病品系。这些结果说明, 不但甘蓝型油菜的抗(耐)菌核病菌的机制与植株体内的 SOD 酶活性相关, 而且包括抗和感品种(系)甘蓝型油菜都会在菌核病菌侵染刺激下表现 SOD 活性上调的应答效应。

甘蓝型油菜不同抗(耐)、感材料在菌核病菌侵染前、后的 Cu/ZnSOD 基因表达也表现出与 SOD 酶活性变化的相似效应。Northern blot 分析显示, 该 Cu/ZnSOD 基因在菌核病菌诱导前、后抗(耐)病材料 mRNA 表达量明显高于感病材料; 在同种材料中, 诱导后的抗(耐)病材料与感病材料 mRNA 表达量比诱导前均有不同程度的升高。上述结果表明, 甘蓝型油菜抗(耐)菌核病菌的遗传效应和刺激诱导的抗菌核病菌应答效应不但与 SOD 的活性的上调相关, 也与 Cu/ZnSOD 基因的转录表达水平相关, 而且表观 SOD 酶活性变化的调节, 很大程度上是在转录水平上发生的。

4 结论

获得了 Cu/ZnSOD 和 FeSOD 基因的 cDNA 全长

及 1 322 bp 的 Cu/ZnSOD 基因组 DNA 和 1 659 bp 的 FeSOD 基因组 DNA。SOD 基因在不同物种间具有较强的保守性。甘蓝型油菜抗(耐)菌核病菌的遗传效应和刺激诱导的应答效应不但与 SOD 酶活性的上调相关, 也与 Cu/ZnSOD 基因的转录表达水平相关, 表观 SOD 酶活性变化的调节, 很大程度上是在转录水平上发生的。甘蓝型油菜 SOD 基因与菌核病抗性相关。

References

[1] Fink R C, Scandalios J G. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 399: 19-36

[2] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969, 244: 6049-6055

[3] Perl A, Perl-Treves R, Galili S. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu/Zn superoxide dismutase. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 568-576

[4] McKersie B D, Murnaghan J, Jones K S, Bowley S R. Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1427-1437

[5] Kliebenstein D J, Gershenzon J, Mitchellolds T. Comparative quantitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds. *Genetics*, 2001, 159: 359-370

[6] Baek K H, Skinner D Z. Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 223-230

[7] Liu J J, Goh C J, Loh C S, Tay E B H, Pua E C. Cloning of two cDNAs encoding Cu/Zn-superoxide dismutase (accession No. X95726, X95728) of mustard (*Brassica juncea* L. Czern & Coss). *Plant Physiol*, 1998, 116: 867

[8] Chen J-Y(陈锦云), Lin X-Y(林祥永), Lan Z-B(兰志斌). The effect of superoxide dismutase on weath fleck prevention. *Fujian Agric Sci Technol* (福建农业科技), 1996, (5): 13(in Chinese)

[9] Wen C-Y(文才艺), Hao Y-H(昊元华), Li H-G(李浩戈). Changes of SOD activity and MDA in tobacco leaves infected by potato virus Y vein necrosis. *Chin Tob Sci* (中国烟草科学), 1999, (1): 12-14(in Chinese with English abstract)

[10] Wong Y P, Liu Y Q, Shi L. SOD activity of wheat varieties with different resistance to scab. *Acta Phytophysiol Sin*, 1993, 19: 353-358

[11] Yun X F, Li R X. Studies of induced resistance to downy mildew of cucumber with SOD isozyme protein in cotyledons. *Acta Phytopathol Sin*, 1997, 27: 221-224

[12] Niu L-Y(牛立元), Wang H-S(王鸿升), Shi M-W(石明旺).

- Changes of SOD and POD activities in wheat leaves infected by wheat powdery mildew and their relations to resistance. *J Henan Voction-Technical Teachers Coll* (河南职业技术学院学报), 2004, 32(4): 5–8(in Chinese with English abstract)
- [13] Li R-H(李荣花), Chen J(陈捷), Gao Z-G(高增贵), Tang B-H(唐保宏), Liu J-H(刘军华). Relations between resistance to maize sheath blight and resistant enzymes. *J Tianjin Norm Univ* (Nat Sci Edn)(天津师范大学学报·自然科学版), 2005, 25(4): 32–36(in Chinese with English abstract)
- [14] Wu J-J(吴俊江). Studies on the changes of SOD, POD activity and soluble sugar content in leaves of soybean varieties inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Heilongjiang Agric Sci* (黑龙江农业科学), 2006, (2): 32–34(in Chinese with English abstract)
- [15] Purdy L H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, disease and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology*, 1979, 69: 875–890
- [16] Gan L(甘莉), Wu X-L(伍新玲), Jin L(金良), Feng S-Q(丰胜求), Chen C-L(陈翠莲), Tang H(汤华). The establishment of sclerotinia sclerotiorum resistant near isogenic lines. *J Wuhan Univ* (Nat Sci Edn) (武汉大学学报·理学版), 2002, 48(6): 761–764(in Chinese with English abstract)
- [17] Hu B-C(胡宝成), Rimmer S R. Preliminary study of artificial inoculation for resistance (tolerance) to sclerotinia sclerotiorum in rapeseed using detached leaves. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 1989, (3): 56–58(in Chinese with English abstract)
- [18] Yoon K, Kim H, Lee W. Cloning and DNA sequencing of cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase gene from Chinese cabbage. *J Plant Biol*, 1998, 41: 68–71
- [19] Li H-S(李合生), Sui Q(孙群), Zhao S-J(赵世杰), Zhang W-H(章文华). Principles and Techniques for Plant Physiological and Biochemical Experiment(植物生理生化实验原理和技术). Beijing: Higher Education Press, 2000. pp 167–169(in Chinese)
- [20] Patel R N, Nripendra S, Shukla K K, Gundla V L, Chauhan U K. Synthesis, structure and biomimetic properties of Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) binuclear complexes: Possible models for the chemistry of Cu/Zn superoxide dismutase. *J Inorganic Biochem*, 2005, 99: 651–663