

牡丹 *PoCCS1* 基因的克隆与表达分析

唐 欣¹,周天华¹,鲁仪增²,张 利^{1*},范志斌¹,李志祺¹,袁思怡¹

(1. 菏泽学院 农业与生物工程学院,山东 菏泽 274015;2. 山东省林草种质资源中心,山东 济南 250102)

摘 要:铜/锌超氧化物歧化酶铜伴侣基因(copper chaperone for superoxide dismutase,CCS)负责将铜离子转运至 Cu/Zn-SOD,从而激活 SOD 酶活性,参与植物活性氧清除,在植物抗逆中发挥重要作用。研究旨在克隆牡丹 *PoCCS1* 基因,并对基因序列特征、组织表达模式、盐胁迫和干旱胁迫下的表达模式、不同牡丹品种氧化胁迫下的表达模式进行分析,为深入研究 *PoCCS1* 在牡丹非生物胁迫响应中的功能奠定基础。利用 RT-PCR 技术克隆‘凤丹’*PoCCS1* 基因(GenBank 登录号: MZ574405),利用生物信息学方法分析 *PoCCS1* 序列特征,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析 *PoCCS1* 的表达模式。结果表明,*PoCCS1* 基因编码区全长为 996 bp,编码蛋白含 331 个氨基酸,相对分子量为 34.98 ku,包含植物 CCS 蛋白的 3 个典型结构域,进化分析表明 *PoCCS1* 与多种植物的 CCS 同源性较高,且与葡萄 *VvCCS* 亲缘关系最近;*PoCCS1* 在‘凤丹’的根、茎和叶中表达水平相近,‘凤丹’盐胁迫 8 h 后,*PoCCS1* 在叶片和根中的表达受到显著诱导,干旱胁迫 8 h 后,*PoCCS1* 在叶片中的表达下调,根中表达无显著变化;4 个抗氧化能力不同的牡丹品种‘鲁荷红’‘凤丹’‘香玉’和‘乌云集盛’氧化胁迫处理后 *PoCCS1* 表达模式差异显著,随处理时间增加,在抗氧化能力强的‘乌云集盛’和‘香玉’中 *PoCCS1* 的表达显著上调并在处理 4 h 后保持较高水平,在抗氧化能力较弱的‘凤丹’中表达稳定,在抗氧化能力最弱的‘鲁荷红’中先升后降并在处理 4 h 后显著下调。综上,*PoCCS1* 基因编码蛋白具有植物 CCS 的完整典型结构,可能参与牡丹响应盐胁迫和干旱胁迫,并可能与不同牡丹品种抗氧化能力差异相关。

关键词:牡丹;*PoCCS1*;克隆;非生物胁迫;表达分析

中图分类号:S685.11

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2023)02-0084-08

Cloning and Expression Analysis of *PoCCS1* Gene in Tree Peony

TANG Xin¹,ZHOU Tian-hua¹,LU Yi-zeng²,ZHANG Li^{1*},FAN Zhi-bin¹,LI Zhi-qi¹,YUAN Si-yi¹

(1. College of Agricultural and Biological Engineering, Heze University, Heze 274015, Shandong, China;

2. Shandong Provincial Center of Forest and Grass Germplasm Resources, Jinan 250102, Shandong, China)

Abstract: Copper (Cu) chaperone for superoxide dismutase (CCS) can activate Cu/Zn-SODs through delivering copper them, which plays important roles in reactive oxygen species scavenging and plant resistance. This study was conducted to clone *PoCCS1* gene from *Paeonia ostii* and analyze the gene sequence characteristics, tissue expression patterns, expression profiles under salt stress and drought stress, and expression patterns under oxidative stress of different peony varieties, so as to lay a foundation for further study on the function of *PoCCS1* in abiotic stress response in tree peony. *PoCCS1* gene (GenBank accession number: MZ574405) was cloned from ‘Feng Dan’ by RT-PCR, *PoCCS1* sequence characteristics were analyzed by bioinformatics, and the expression patterns of the *PoCCS1* were analyzed by real-time fluorescence quanti-

收稿日期:2022-02-28 修回日期:2022-06-07

基金项目:菏泽学院博士基金(XY16BS34);菏泽学院培育项目(XY18PY05);菏泽学院牡丹研究院培育项目(PR15);山东省高等学校青创科技支持计划(鲁教人字[2019]6号);山东省自然科学基金青年项目(ZR2020QC166)。

第一作者:唐 欣,博士,讲师。研究方向:植物抗逆育种。E-mail: tangxin@hezeu.edu.cn

* 通信作者:张 利,博士,讲师。研究方向:植物抗逆育种。E-mail: zhangli@hezeu.edu.cn

tative PCR (qRT-PCR). The results showed that the full length of coding region of *PoCCS1* was 996 bp, which encoded protein contained 331 amino acids. The relative molecular weight of *PoCCS1* was 34.98 ku, which contained 3 typical domains of plant CCS. Phylogenetic analysis indicated that *PoCCS1* was highly homologous with many other plants and most closely related to *VvCCS*. The expression level of *PoCCS1* was similar in the leaves, stems, and roots of 'Feng Dan'. After 8 hours under salt stress, the expression of *PoCCS1* in the leaves and roots was significantly induced. After 8 hours under drought stress, the expression of *PoCCS1* in the leaves were significantly down-regulated, while the expression in roots had no significant change. The expression patterns of *PoCCS1* under oxidative stress in four tree peony varieties 'Lu He Hong', 'Feng Dan', 'Xiang Yu' and 'Wu Yun Ji Sheng' with different antioxidant capacities were significantly different. With time of oxidative stress treatment increasing, *PoCCS1* expression in 'Xiang Yu' and 'Wu Yun Ji Sheng' with strong antioxidant capacity was significantly up-regulated, and maintained higher level after treatment for 4 h. The expression level of *PoCCS1* in 'Feng Dan' with weak antioxidant capacity was stable. The *PoCCS1* expression level in 'Lu He Hong' with the weakest antioxidant capacity increased first and then decreased, and decreased significantly after treatment for 4 h. The protein encoded by *PoCCS1* possessed the complete typical structure of plant CCS, which may be involved in the salt stress and drought stress response of tree peony, and may be related to the difference of antioxidant capacity of different peony varieties.

Key words: tree peony; *PoCCS1*; cloning; abiotic stress; expression analysis

水涝、干旱、高盐、高温和低温等多种非生物胁迫会破坏植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)代谢的平衡,使 ROS 大量积累,进而对植物形成氧化胁迫。过量的 ROS 会造成 DNA 和蛋白质损伤,破坏细胞膜的流动性和完整性,严重影响植物生长发育^[1]。为应对氧化胁迫,植物进化出了酶类和非酶类活性氧清除系统。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是酶类系统中第 1 个参与活性氧清除的酶,能够催化超氧自由基 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 和 O_2 的歧化反应, H_2O_2 则在抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX),过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)的协同作用下进一步转化为 H_2O ,从而有效保护植物免受 ROS 引起的氧化损伤^[2]。

SODs 作为一种金属辅酶,需在获得金属辅因子后才具有催化活性,按照其活性位点金属辅因子的不同,可分为 Ni-SOD, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD 和 Fe-SOD 4 种类型。植物中的 Cu/Zn-SOD 主要存在于细胞质、叶绿体和线粒体中^[3]。SOD 基因已在紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、麻风树(*Jatropha curcas*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、杉木(*Cunninghamia lanceolata*)和木薯(*Manihot esculenta*)等多种植物中被克隆,且已通过转基因证明 SOD 在植物响应氧化、干旱、高温、低温和盐胁迫等生物学过程中发挥重要作用^[4-9]。

Cu/Zn-SOD 酶(CSD)获得金属辅因子 Cu 依赖于铜/锌超氧化物歧化酶铜伴侣基因 CCS。拟南芥

包含 *CSD1*、*CSD2* 和 *CSD3* 3 个 Cu/Zn-SOD 酶基因, *CSD1* 定位于细胞质、*CSD2* 定位于叶绿体中、*CSD3* 定位于过氧化物酶体中,当仅有的一个 *AtCCS* 敲除突变后, *CSD1* 的活性降低, *CSD2* 酶活性完全丧失,在 *AtCCS* 全长突变体中表达不含叶绿体转运肽的 *AtCCS* 蛋白,只能恢复胞质中 *CSD1* 的活性;表达含叶绿体转运肽的 *AtCCS* 蛋白才能恢复叶绿体中 *CSD2* 的活性,说明 CCS 在胞质和叶绿体中的 SOD 酶活化中均发挥重要作用^[10-12]。除拟南芥外, CCS 基因已在番茄(*Solanum lycopersicum*)、马铃薯、大豆(*Glycine max*)、杨树(*Populus trichocarpa*)、香蕉(*Musa acuminata*)、巨尾桉(*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*)和猕猴桃(*Actinidia chinensis*)等多种植物中被克隆,且 CCS 基因的表达被证明响应干旱、冷、热及光等多种非生物胁迫^[13-19]。

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)是中国特产的传统名花,也是兼具药用价值、观赏价值和油用价值的重要木本粮油植物。牡丹根为肉质,忌水涝,且牡丹不同种群对高温、低温和干旱胁迫的抗性差异较大,这些非生物胁迫影响牡丹的观赏价值也限制了牡丹的栽培和应用。活性氧清除相关酶类基因在植物抵抗多种非生物胁迫过程中均发挥重要作用,研究牡丹抗氧化的分子机制,挖掘与牡丹抗氧化相关的功能基因,对牡丹抗逆的遗传改良具有重要意义。但目前为止,对牡丹抗氧化酶类相关基因的研究尚未见报道。本研究克隆了‘凤丹’牡丹(*P. ostii* ‘Feng Dan’)的 *PoCCS1*,综合分析了其基因和蛋白特征,并对其组织表达模式及在盐胁迫、干旱胁迫及不同

品种氧化胁迫下的表达模式进行了分析,为牡丹抗氧化机制的研究提供参考,并为今后牡丹抗逆的遗传改良提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

用3年生‘凤丹’苗栽植于菏泽学院院内,在生长季选取6株生长状态良好,长势一致的植株分别采集顶端第3片叶、当年生茎和成熟根,每2株混样作为1个生物学重复,用于*PoCCS1*基因的组织定量分析。‘凤丹’幼苗生长于16 h光照/8 h黑暗,温度24℃的培养室,用于胁迫处理。幼苗在1/2 MS液体培养基培养1周后,分别用150 mmol/L的NaCl和20%的PEG6000分别处理2 h和8 h,每个时间点处理12株,每个生物学重复取4株混样(共3个生物学重复),分别取根和叶片。所有采集的植物材料均于采摘后用液氮速冻保存。

选取3年生‘鲁荷红’‘香玉’‘乌云集盛’和‘凤丹’4个牡丹品种的上部第3枝条的顶端3片叶,用4 mmol/L的甲基紫晶进行氧化胁迫处理,分别处理0、2 h和4 h,每个处理设置3个生物学重复。处理结束后进行取材,并速冻于液氮中备用。

1.2 总RNA的提取和*PoCCS1*基因的克隆

总RNA提取和第1链cDNA的合成分别采用艾德莱EASYspin Plus植物RNA快速提取试剂盒(RN38)和TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒(PCR1802),基因组DNA清除采用RNase-Free DNase Set试剂盒(QIAGEN, 79254),方法参见试剂盒使用说明。

参考‘凤丹’转录组数据设计*PoCCS1*基因特异扩增引物(表1)。以‘凤丹’的cDNA为模板,扩增*PoCCS1*基因的编码区序列,并连接至pLB-Simple Vector载体后进行测序。

1.3 *PoCCS1*基因生物信息学分析

*PoCCS1*蛋白保守基序的分析采用在线的MEME (Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation)程序(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)。蛋白等电点(pI)和分子量分析采用ExPASy (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)的ProtParam工具。蛋白质二级结构利用SCOPMA工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_atomat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)进行预测,跨膜结构预测采用UCL-CSBioinformatics (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>)。蛋白保守结构域预测采用Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/>)。亚细胞定位预测采用

WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)。N端定位序列预测分析采用Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/Tools/Predotar>)。蛋白多序列比对采用ClustalX2 (version 2.1)。Neighbour-Joining (NJ)进化树用MEGA7.0.26构建,bootstrap分析值为1 000^[20]。

1.4 *PoCCS1*基因表达模式分析

以测序的*PoCCS1*基因CDS为参考序列,采用Primer3在线软件(<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计定量引物(表1)。采用德国JENA实时荧光定量PCR仪qTOWER 2.2进行实时荧光定量(qRT-PCR)分析。选择牡丹微管蛋白基因(*PoTubulin*)作为内参基因来计算*PoCCS1*基因的相对表达量。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列	引物用途
PoCCS1F	ATGGCCTTCCTCAAGTCACT	<i>PoCCS1</i> 扩增
PoCCS1R	TCAAACCTTGCTGATCACAAA	
qRT-PoCCS1F	CCTGGAAACATGGCTGGTC	<i>PoCCS1</i> 表达分析
qRT-PoCCS1R	GCCATTTTCCCCAGCTTCAA	
qRT-PoTubF1	TTGTGACATTCTCTCTCG	内参扩增
qRT-PoTubR1	CATCCATACCTTCTCCAG	

2 结果与分析

2.1 牡丹*PoCCS1*基因克隆及序列分析

参考牡丹转录组数据,设计牡丹*PoCCS1*基因扩增引物,以‘凤丹’cDNA为模板进行PCR扩增。琼脂糖凝胶电泳检测表明所获扩增片段长度接近1 000 bp,测序结果表明所克隆片段长度为996 bp,与目标基因一致(图1)。序列分析表明,*PoCCS1*基因编码区编码331个氨基酸,理论分子量为34.98 ku,理论等电点为5.42,不稳定性指数为29.11,总平均疏水指数为-0.017,说明*PoCCS1*为亲水的稳定蛋白。基因序列如图2所示。

2.2 *PoCCS1*蛋白结构特征及系统进化分析

二级结构分析表明,*PoCCS1*蛋白包含无规则卷曲(random coil)44.71%, α -螺旋(α -helix)30.51%,延伸链(extend strand)17.52%和 β 转角(β -turn)7.25%4种结构(图3A)。WoLF PSORT亚细胞定位预测分析表明,*PoCCS1*最可能定位于叶绿体中,Predotar预测分析也表明*PoCCS1*的N端存在叶绿体定位序列。跨膜区结构预测表明,*PoCCS1*N端的第1到第187个氨基酸位于胞外,第203到第331个氨基酸位于胞质,第188到第202个氨基酸为跨膜区(图3B)。

为分析 *PoCCS1* 的系统进化,用牡丹和其他 25 种植物的 CCS 蛋白构建进化树(图 4)。分析结果表明 CCS 可分为 3 个大的分支:藻类、藓类和蕨类分支,单子叶植物分支和双子叶植物分支。双子叶植物中属于虎耳草目的牡丹 *PoCCS1* 与葡萄目的葡萄(*Vitis vinifera*)进化关系最近,其次为蔷薇目的枣(*Ziziphus jujuba*)、桃(*Prunus persica*)、梅花(*Prunus mume*),金虎尾目的橡胶树(*Hevea brasiliensis*)、毛白杨(*Populus tomentosa*),桃金娘目的桉树(*Eucalyptus grandis*),之后为其他草本双子叶植物。进化分析结果表明 CCS 的进化关系与各物种的分子系统分类地位相符,具有明显的种属特征。

蛋白结构域和基序组成分析表明:各进化分支

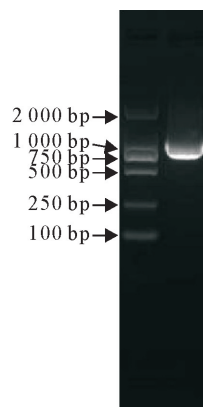


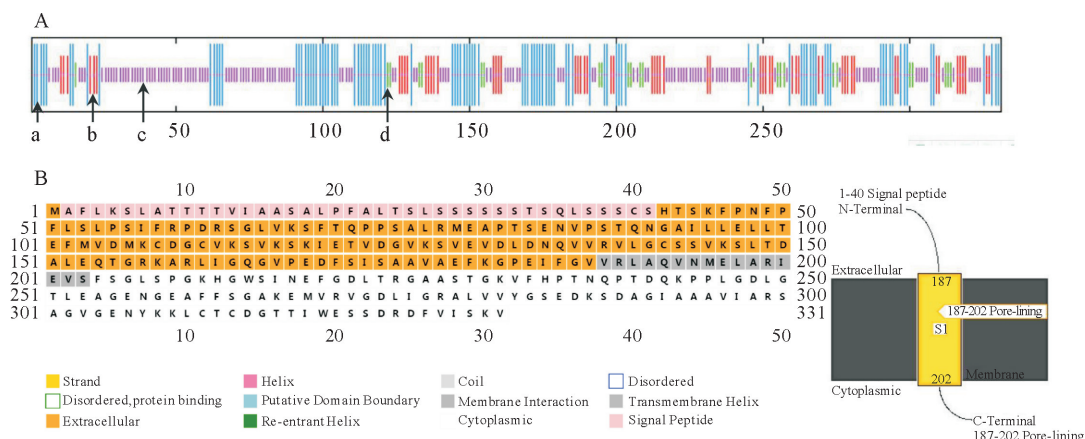
图 1 *PoCCS1* 基因扩增产物电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis detection of amplified product of *PoCCS1*

1	ATGGCCTTCCTCAAGTCACTGGCCACGACCACAACAGTCATAGCAGCCTCTGCACTCCCTTTTGCTTTGACATCT
1	M A F L K S L A T T T T V I A A S A L P F A L T S
76	CTATCATCTTCTTCTTCTTCTTCTCAATATCATCTTCTCTGTTCTCATACCTCCAAATCCCGAACTCCCA
26	L S S S S S S T S Q L S S S C S H T S K F P N F P
151	TTTCTTTTATTACCATCGATTTTCAGACCAGATCGCTCTGGTCTTGTCAAAAGTTTCACTCAGCCACCTCTGCT
51	F L S L P S I F R P D R S G L V K S F T Q P P S A
226	CTTCGTATGGAGGCCCGACATCCGAGAACGTGCCATCCACTCAGAACGGCGCCATCTTACTAGAGTTACTGACA
76	L R M E A P T S E N V P S T Q N G A I L L E L L T
301	GAGTTTATGGTTGACATGAAGTGTGATGGTGTGTTAAGTCTGTCAAGAGTAAGATAGAACTGTTGACGGTGTG
101	E F M V D M K C D G C V K S V K S K I E T V D G V
376	AAGAGTGTGAAGTGGACTTGGACAACCAAGTAGTGAGGGTCTTGGTGTCTTCTGTGAAATCACTGACTGAT
126	K S V E V D L D N Q V V R V L G C S S V K S L T D
451	GCTTTGGAGCAGACGGGTCGAAAAGCAAGATTGATTGGTCAAGGGGTTCTTGAAGATTTCTCAATTTCCGGTCT
151	A L E Q T G R K A R L I G Q G V P E D F S I S A A
526	GTTCCCGAGTTCAAAGTCTGAGATATTTGGGGTGGTTCGCTTGGCACAGTGAACATGGAATTGGCTAGGATT
176	V A E F K G P E I F G V V R L A Q V N M E L A R I
601	GAAGTTAGCTTCACTGGCTTGTACCTGGAAAACATGGCTGGTCTATAAATGAATTTGGTGACCTGACTAGAGGT
201	E V S F S G L S P G K H G W S I N E F G D L T R G
676	GCAGCGAGTACTGGCAAAGTTTTCATCCAAACCAACCCACTGATCAAAAGCCGCCATGGGAGACCTGGGA
226	A A S T G K V F H P T N Q P T D Q K P P L G D L G
751	ACACTTGAAGCTGGGGAATGGCGAGGCTTTCTTTCCGGTGCTAAAGAGATGGTAAGAGTGGGTGATCTGATC
251	T L E A G E N G E A F F S G A K E M V R V G D L I
826	GGACGAGCGTTAGTGGTGTACGGAAGTGAAGATAAATCAGATGCAGGGATAGCGGCTGCTGTGATTGCTAGAAGT
276	G R A L V V Y G S E D K S D A G I A A A V I A R S
901	GCAGGGTGGAGAGAATTATAAAAAGTTGTGCACATGTGATGGAACCACTATATGGGAATCGAGTGATAGGGAT
301	A G V G E N Y K K L C T C D G T T I W E S S D R D
976	TTTGTGATCAGCAAGGTTTGA
326	F V I S K V *

图 2 *PoCCS1* 编码区核苷酸序列及编码氨基酸序列

Fig. 2 Coding region nucleotide sequences and putative amino acid sequence of *PoCCS1*



注: A. 二级结构预测, a、b、c、d 分别代表 α -螺旋、延伸链、无规卷曲和 β -转角; B. 跨膜结构预测。

图 3 *PoCCS1* 蛋白二级结构和跨膜区预测

Fig. 3 The prediction of secondary structure and transmembrane structure of *PoCCS1*

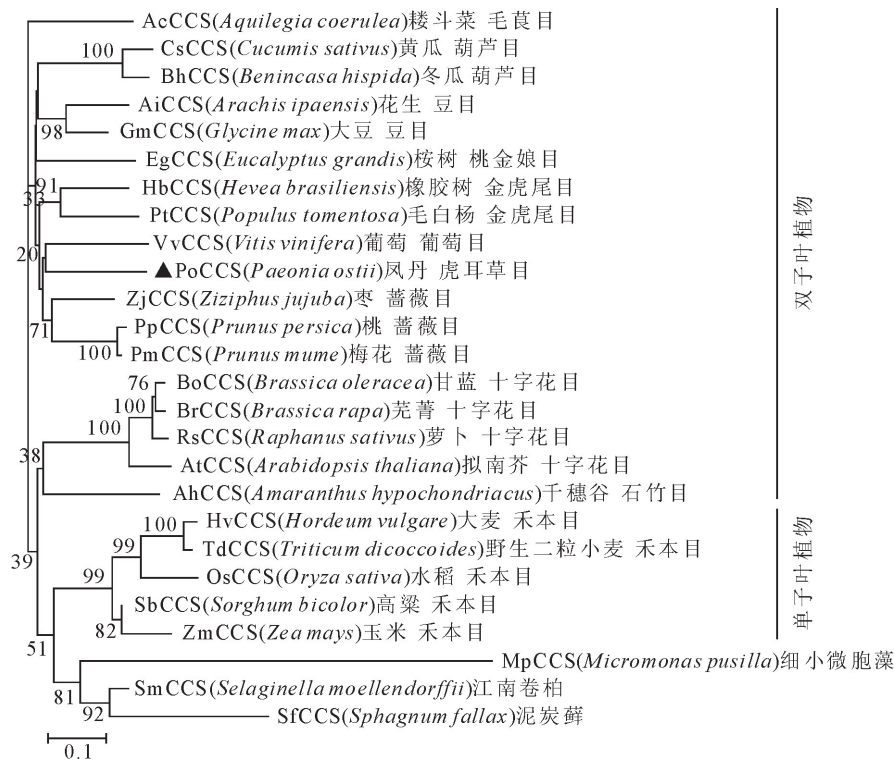


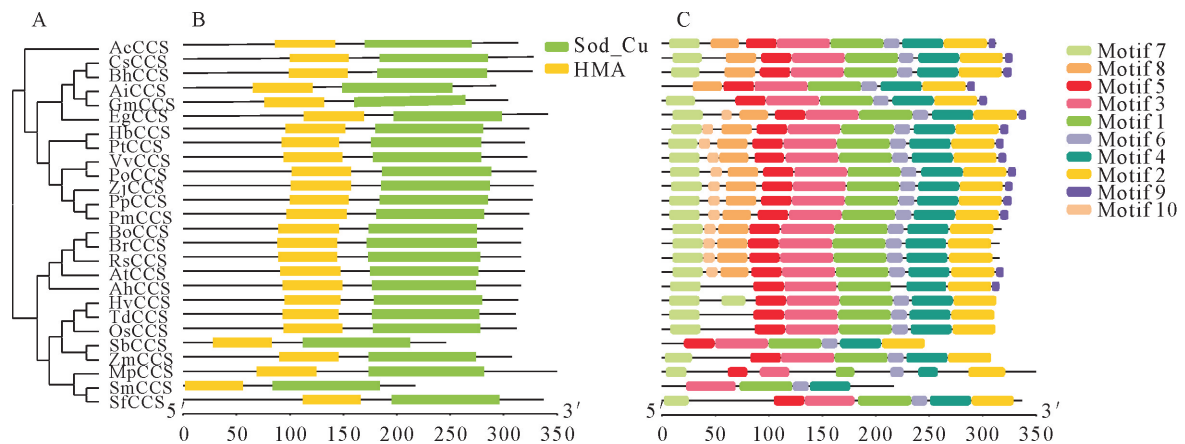
图 4 牡丹与其他植物 CCS 蛋白系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CCS proteins from peony and other plants

CCS 结构域构成保守,均具有 Sod_Cu 和 HMA 结构域(图 5A);各物种中除具有 Motif1、Motif3、Motif4、Motif6 保守基序外,不同进化分支 CCS 的基序组成则具有显著的种属特性,双子叶植物分支中各成员均具有 Motif9,而双子叶植物分支中与 PoCCS1 进化关系较近的木本植物葡萄、枣、桃、梅花、橡胶树、毛白杨和桉树还均具有 Motif10(图 5B)。

为进一步分析 CCSs 中各结构域氨基酸组成的

保守性,对 PoCCS1 和与其进化关系较近的 VvCCS、ZjCCS、PpCCS、PmCCS、PtCCS、HbCCS 和 EgCCS 进行了多序列比对分析,结果表明,8 个 CCS 蛋白均包含 N 端结构域、中间结构域和 C 端结构域 3 个 CCS 典型结构域,其中 N 端结构域对应 HMA 结构域,中间结构域对应 Sod_Cu 结构域,N 端结构域和 C 端结构分别包含金属结合位点 Mx-CxxC 和 CxC(图 6)。



注: A. CCS 系统进化树; B. 保守结构域分析; C. 基序分析。

图 5 PoCCS1 与其他植物 CCS 蛋白保守结构域和基序

Fig. 5 Conserved domains and motifs of PoCCS1 and CCS proteins of other plants

2.3 PoCCS1 基因表达模式分析

采用 qRT-PCR 对 PoCCS1 在‘风丹’中的组织表达模式和盐胁迫及干旱胁迫下的表达模式进行分

析,结果表明:PoCCS1 在根、茎和叶中均表达,且表达水平无显著差异(图 7A);盐胁迫下,PoCCS1 在处理 8h 后的叶片和根中的表达均受到显著诱导,



注:▼分别标记 MxCxxC 和 CxC 位点。

图 6 *PoCCS1* 与其他植物 CCS 蛋白序列比对

Fig. 6 Multiple alignment of *PoCCS1* and CCS proteins of other plants

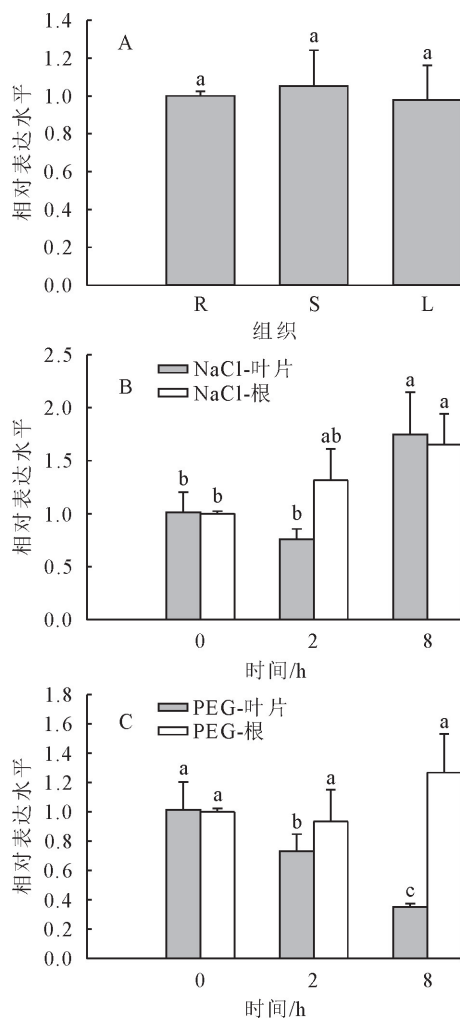
表达上调(图 7B);PEG 处理下,*PoCCS1* 在处理 2 h 和 8 h 后的叶片中表达依次显著下调,根中的表达则未出现显著变化(图 7C)。

不同牡丹品种的抗氧化能力呈现出显著差异,在氧化胁迫 4 h 后,‘乌云集盛’、‘香玉’、‘凤丹’、‘鲁荷红’的受损伤程度依次增大(图 8A)。定量分析表明 *PoCCS1* 的表达模式在 4 个品种中差异显著,随氧化胁迫时间增加‘鲁荷红’、‘香玉’、‘乌云集盛’中 *PoCCS1* 表达先升后降,‘鲁荷红’在处理 4 h 时下降幅度最大,‘香玉’和‘乌云集盛’则下降不明显;而‘凤丹’中先降后升,表达变化不显著。氧化胁迫 4 h 后 *PoCCS1* 的表达量‘乌云集盛’>‘香玉’>‘凤丹’>‘鲁荷红’(图 8B)。

3 结论与讨论

本研究成功克隆的牡丹超氧化物歧化酶铜分子伴侣基因 *PoCCS1* 具有植物 CCS 的典型结构特征,其组织表达表现出物种特异性,表达受盐胁迫显著诱导,并在抗氧化能力不同的牡丹品种的氧化胁迫响应中呈现不同表达模式,说明 *PoCCS1* 可能在牡丹响应非生物胁迫中发挥作用,并与不同品种抗氧化能力相关。

本研究以‘凤丹’cDNA 为材料成功克隆到 1 个牡丹 CCS 基因,并将其命名为 *PoCCS1*。生信分析表明 *PoCCS1* 为亲水的稳定蛋白,系统进化分析表明 CCS 蛋白进化关系具有高度的种属特征,说明其



注:不同小写字母分别表示茎、叶片和根相比,处理组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。A.不同组织 R、S、L 分别代表根、茎、叶;B. NaCl 处理后在叶片和根中的表达;C. PEG 处理后在叶片和根中的表达。

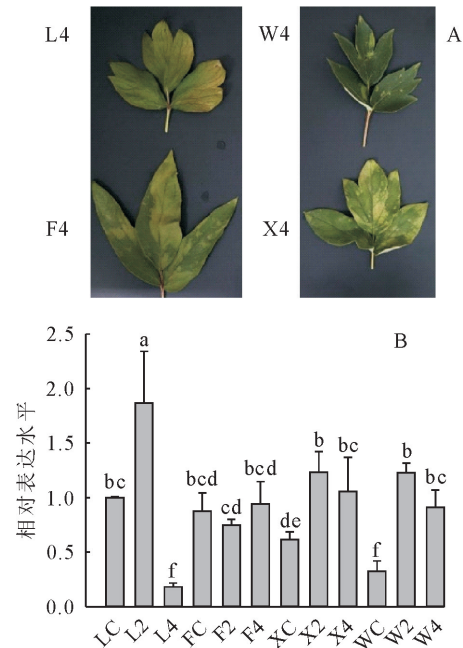
图 7 *PoCCS1* 在‘凤丹’不同组织中及盐胁迫和干旱胁迫下的表达模式

Fig. 7 The expression patterns of *PoCCS1* in different tissues and under salt stress and drought stress

进化保守。*PoCCS1* 与进化关系最近的葡萄、枣、桃、梅花、橡胶树、毛白杨和桉树的 CCS 蛋白在基序和结构域组成上高度保守,均具有含铜离子结合位点 $MxCxxC$ 的 N 端结构域,与靶蛋白 CSD 的 Sod_Cu 结构域高度同源的中间结构域和包含铜离子结合位点 CxC 的 C 端结构域。3 个结构域在 CCS 将铜离子传递给 CSD,并将其激活的过程中均发挥重要作用。*PoCCS1* 具有完整结构域,说明其可能具有捕获铜离子,准确传递给 $Cu/Zn-SOD$ 并激活其活性的功能^[10,21-22]。

香蕉 *MaCCS*、拟南芥 *AtCCS* 均被证明定位于叶绿体或细胞质^[10,11,17]。*MaCCS* 和 *AtCCS* 基因均可通过不同的转录起始位点产生 2 种转录本,当以第 2 个起始位点转录时,缺少叶绿体定位序列,*AtCCS* 定位于细胞质只能恢复 *AtCCS* 突变体胞质

和过氧化物酶体中 CSD 酶的活性,而以第 1 起始位点转录时,则可恢复 *AtCCS* 突变体胞质,过氧化物酶体和叶绿体中 3 个 CSD 酶的活性^[10]。亚细胞定位预测表明 *PoCCS1* 具有叶绿体定位序列,最可能定位于叶绿体,这说明 *PoCCS1* 可能具有同时为胞质和叶绿体中的 CSD 输送铜离子的功能。



注:不同小写字母表示处理组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。LC、L2、L4 代表‘鲁荷红’对照、处理 2 h、4 h,FC、F2、F4 代表‘凤丹’对照、处理 2 h、4 h,XC、X2、X4 代表‘香玉’对照、处理 2 h、4 h,WC、W2、W4 代表‘乌云集盛’对照、处理 2 h、4 h。A. 4 个牡丹品种氧化胁迫 4 h 后叶片的表型;B. 4 个牡丹品种氧化胁迫 2 h 和 4 h 后 *PoCCS1* 表达变化。

图 8 不同牡丹品种氧化胁迫下的表型和 *PoCCS1* 表达模式

Fig. 8 The phenotype and *PoCCS1* expression patterns of different peony varieties under oxidative stress

已有研究表明,CCS 基因在不同物种中组织表达模式有差异:猕猴桃 *MaCCS* 基因在叶片中表达量最高,其次为茎,在根中表达量最低^[19],*OsCCS* 基因在叶片中表达最高,根中表达量较低,茎和穗中表达量最低^[23]。在香蕉中也呈现出叶片中表达量高于假茎,高于根中表达量的表达模式^[17]。*AtCCS* 基因则在茎和花中高表达,在叶片中的表达量极低^[10]。这些研究说明,CCS 基因在不同物种中具有多种组织表达模式。*PoCCS1* 在牡丹的叶、茎和根中均表达,且表达水平无显著差异,这与已有研究不同,说明 *PoCCS1* 在牡丹各组织中可能均发挥重要作用。

拟南芥 *AtCCS* 的表达随铜离子浓度升高受到显著诱导^[11];香蕉 *MaCCS* 基因在热和干旱胁迫后表达显著上调,还受 ABA 和 IAA 的诱导^[17]; *OsCCS* 在水稻受热胁迫 5 h 后表达显著上调^[23];结缕

草(*Zoysia japonica*) *ZjCCS* 基因表达受盐胁迫诱导显著,而受干旱胁迫影响较小^[24]。这些研究表明,*CCS* 基因在不同植物响应多种非生物胁迫中发挥作用,且响应方式不同。*PoCCS1* 在‘凤丹’根和叶片中的表达受盐胁迫显著诱导;在根中的表达受干旱胁迫诱导不明显,而在叶片中表达下调。在抗氧化能力不同4个牡丹品种‘鲁荷红’‘凤丹’‘香玉’和‘乌云集盛’中,氧化胁迫处理后 *PoCCS1* 的响应模式不同:在抗氧化能力强的‘乌云集盛’和‘香玉’中,*PoCCS1* 表达显著上调,表达水平更高;在抗氧化能力较弱的‘凤丹’中 *PoCCS1* 表达稳定;而在抗氧化能力最弱的‘鲁荷红’中,*PoCCS1* 表达显著下调,这表明 *PoCCS1* 可能参与牡丹抗氧化胁迫响应,并与不同品种的抗氧化能力相关。

参考文献:

- [1] KARUPPANAPANDIAN T, MOON J C, KIM C, *et al.* Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms [J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, 5(6): 709-725.
- [2] ALSCHER R G, ERTURK N, HEATH L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1331-1341.
- [3] WANG W, XIA M X, CHEN J, *et al.* Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81(5): 465-480.
- [4] KIM M D, KIM Y H, KWON S Y, *et al.* Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the *CuZnSOD*, *APX* and *NDPK2* genes [J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 140(2): 153-162.
- [5] LIN K H, SEI S C, SU Y H, *et al.* Overexpression of the *Arabidopsis* and winter squash superoxide dismutase genes enhances chilling tolerance via ABA-sensitive transcriptional regulation in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, 14(12): e1685728.
- [6] LIU Z B, ZHANG W J, GONG X D, *et al.* A Cu/Zn superoxide dismutase from *Jatropha curcas* enhances salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 2086-2098.
- [7] MCKERSIE B D, CHEN Y, DE BEUS M, *et al.* Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(4): 1155-1163.
- [8] XU J, DUAN X, YANG J, *et al.* Coupled expression of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase in cassava improves tolerance against cold and drought stresses [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(6): e24525.
- [9] 饶丽莎, 许珊珊, 黄田盛, 等. 杉木 *Cu/Zn-SOD* 基因克隆、序列特征及组织特异性表达 [J]. *西北林学院学报*, 2018, 33(2): 75-82.
- [10] CHU C C, LEE W C, GUO W Y, *et al.* A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 425-436.
- [11] ABDEL-GHANY S E, BURKHEAD J L, GOGOLIN K A, *et al.* AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7 [J]. *Febs Letters*, 2005, 579(11): 2307-2312.
- [12] HUANG C H, KUO W Y, WEISS C, *et al.* Copper chaperone-dependent and-independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(2): 737-746.
- [13] ZHU H, SHIPP E, SANCHEZ R J, *et al.* Cobalt (2+) binding to human and tomato copper chaperone for superoxide dismutase: implications for the metal ion transfer mechanism [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(18): 5413-5421.
- [14] TRINDADE L M, HORVATH B M, BERGERVOET M J, *et al.* Isolation of a gene encoding a copper chaperone for the copper/zinc superoxide dismutase and characterization of its promoter in potato [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(2): 618-629.
- [15] SAGASTI S, BERNAL M, SANCHEZ D, *et al.* Regulation of the chloroplastic copper chaperone (CCS) and cupro zinc superoxide dismutase (CSD2) by alternative splicing and copper excess in *Glycine max* [J]. *Functional Plant Biology*, 2013, 41(2): 144-155.
- [16] MOLINA-RUEDA J J, TSAI C J, KIRBY E G. The *Populus* superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (GS1a) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56421.
- [17] FENG X, CHEN F, LIU W, *et al.* Molecular characterization of MaCCS, a novel copper chaperone gene involved in abiotic and hormonal stress responses in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 441.
- [18] 赵艳玲, 姚婕. 巨尾桉铜分子伴侣 *EmCCS* 基因的克隆及表达分析 [J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2017, 38(3): 374-378.
- [19] 陈义挺, 冯新, 赖瑞联, 等. 猕猴桃 *AdCCS1* 基因的克隆及其表达调控 [J]. *园艺学报*, 2018, 45(12): 2371-2382.
- [20] 杨海峰, 薄高峰, 于兴旺, 等. 沙柳 *SpsNAC042* 基因克隆及逆境表达分析 [J]. *西北林学院学报*, 2021, 36(5): 11-17.
- [21] YANG H F, BO G F, YU X W, *et al.* Cloning of *SpsNAC042* and its expression analysis under stress in *Salix psammophila* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2021, 36(5): 11-17. (in Chinese)
- [22] LAMB A L, TORRES A S, O'HALLORAN T V, *et al.* Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone [J]. *Nature Structural Biology*, 2001, 8(9): 751-755.
- [23] SCHMIDT P J, KUNST C, CULOTTA V C. Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in vivo: role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(43): 33771-33776.
- [24] 谢旻, 骆鹰, 张超, 等. 水稻铜/锌超氧化物歧化酶铜伴侣基因克隆与表达分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(7): 2940-2946.
- [25] 樊波, 孙鑫博, 张胤冰, 等. 结缕草 *ZjCCS* 基因的克隆与表达分析 [J]. *草地学报*, 2016, 24(2): 447-452.