

吴茱萸 SOD 基因片段 克隆和 SNP 分析

吴波¹ 高丹² 潘超美³ 罗光明² 张寿文^{2*}

(1. 江西中医学院 江西省中药种质资源工程技术研究中心 江西 南昌 330004; 2. 江西中医学院 药学院 江西 南昌 330004; 3. 广州中医药大学 中药学院 广东 广州 510006)

摘要:根据 GenBank 已报道的多种植物 Cu/Zn-SOD 基因和 Mn/Fe-SOD 基因的保守区域,分别设计了两对用于克隆 10 种吴茱萸属植物 Cu/Zn-SOD 基因和 Mn/Fe-SOD 基因核心片段的简并引物。试验所得的 Cu/Zn-SOD 基因片段长度为 375 bp, Mn/Fe-SOD 基因片段长度为 429 bp,分别编码 125 个和 143 个氨基酸残基。使用 DAMBE 和 DNASTar5.0 生物统计软件对序列进行同源性比对,10 种吴茱萸属植物与其他多种植物的 Cu/Zn-SOD 基因核苷酸序列同源性大于 74%,氨基酸序列同源性大于 79%; Mn/Fe-SOD 基因的核苷酸序列同源性大于 78%,氨基酸序列同源性大于 81%。在所克隆的 Cu/Zn-SOD 基因片段中有 21 个核苷酸 SNPs 位点,导致 6 个氨基酸位点变异,多态性频率为 1SNP/17.9 bp,核苷酸和氨基酸变异度分别为 5.6% 和 4.8%;在所克隆的 Mn/Fe-SOD 基因片段中有 17 个核苷酸 SNPs 位点,导致 3 个氨基酸位点变异,多态性频率为 1SNP/25.2 bp,核苷酸和氨基酸变异度分别为 4.0% 和 2.1%。采用 Neighbour-Joining 聚类法,对 10 种吴茱萸属植物的 Cu/Zn-SOD 基因片段的核苷酸序列进行聚类分析,构建了精确遗传聚类图谱。

关键词:吴茱萸; SOD; 基因克隆; SNP

中图分类号:Q943.2 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)06-1206-06

Cloning of SOD Gene Segments and SNP Analysis in *Evodia rutaecarpa*

WU Bo¹, GAO Dan², PAN Chao-mei³, LUO Guang-ming², ZHANG Shou-wen^{2*}

(1. Chinese Medicine Germplasm Resource Engineering Technology Research Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. College of Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. College of Pharmacy, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Two pairs of degenerate primers were designed according to the two conserved regions on the amino acid sequences of Cu/Zn-SOD gene and Mn/Fe-SOD gene from kinds of plants reported in GenBank in order to clone the core fragments of these two genes in ten *Evodia rutaecarpa*'s plants. The length of Cu/Zn-SOD gene and Mn/Fe-SOD gene were 375 bp and 429 bp respectively. Every nucleotide sequence of Cu/Zn-SOD gene and Mn/Fe-SOD gene encoded 125 amino acids and 143 amino acids respectively. The biology softwares of DAMBE and DNA Star5.0 were used to analyze these sequences. The nucleotide similarity with other plants was above 74% and the amino acid similarity was above 79% at ten Cu/Zn-SOD gene fragments than other plants. The nucleotide similarity was above 78% and the amino acid similarity was above 81% in ten Mn/Fe-SOD gene fragments. Twenty-one sites of single nucleotides were discovered in the ten Cu/Zn-SOD

收稿日期:2011-08-12 修回日期:2011-10-12

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI04B04)

作者简介:吴波(1980—)男,博士生,讲师,主要从事药用植物生物技术研究,E-mail:hero220@126.com;* 通讯作者:张寿文,博士,教授。

gene fragments. Six amino acids sites transformed because of twenty-one single nucleotides variation. Seventeen variation sites of single nucleotides were discovered in the ten Mn/Fe-SOD gene fragments. Three amino acid sites transformed because of the variation of seventeen single nucleotides. According to the calculation result, the polymorphism frequencies in Cu/Zn-SOD gene and Mn/Fe-SOD gene were 1SNP/17.9 bp and 1SNP/25.2 bp, the nucleotide degrees of variation were 5.6% and 4.0%, the amino acid degrees of variation were 4.8% and 2.1%, respectively. Genetic diversity of cloned ten Cu/Zn-SOD gene fragments was analyzed by using the clustering procedure of Neighbor-Joining.

Key words: *Evodia rutaecarpa*; SOD; gene cloning; SNP

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, EC1.15.1.1)是一种广泛存在于生物体中的金属酶,具有防御氧毒性、清除体内氧自由基等作用,在植物抗氧化、抗逆等方面起着关键的防御作用^[1]。该酶根据结合的金属离子的不同,分为 Cu/Zn-SOD 和 Mn/Fe-SOD。植物在生长过程中易遭受不良生长环境因子,如干旱、涝害、高温、低温以及病原菌的影响,各种逆境胁迫会造成活性氧代谢失衡,导致植物细胞生物膜结构被破坏。SOD 是植物体内活性氧清除系统中第一个发挥作用的抗氧化酶,其在植物体内高量或超量表达能够提高植物在逆境胁迫下清除活性氧的能力^[2]。Perl 等^[3]研究表明:番茄细胞质 Cu/Zn-SOD 基因的转录产物分别在干旱和高光强胁迫下急剧积累,因此 SOD 基因在植物抗逆性中发挥着重要作用。目前,国内外学者已从橡胶树^[4]、陆地棉^[5]、杨梅^[6]等多种不同科属植物中克隆出 SOD 基因,但是在芸香科植物中还不多见,仅获得了柠檬和甜橙的 Cu/Zn-SOD 基因及沙田柚的 Mn/Fe-SOD 基因,未见芸香科吴茱萸属植物中克隆 SOD 基因的研究报道。

目前,《中华人民共和国药典》第一部规定的吴茱萸药材原植物来源主要为芸香科吴茱萸属的 3 个品种,但其变种及易混淆品种较多,遗传背景差异较大,单从植物形态上已很难区别,近年来已有学者采用 RAPD 和 AFLP 分子标记技术对其遗传多样性进行了研究^[7],但仍不能区分遗传背景差别较小的品种。利用保守基因的 SNP 可以对遗传背景差异细微的品种进行精确分类,分辨率可以达到单碱基水平。因此,采用 SNP 技术吴茱萸属植物进行遗传多样性精确分类研究具有较为重要的意义,且目前未见相关报道。

本试验克隆了 10 种吴茱萸属植物的 SOD 基因核心片段,分析了克隆所得序列,发掘了碱基变异位点和相应编码的氨基酸变异位点,阐明了该基因在不同吴茱萸属植物中的多态性,为构建吴茱萸属植物基因图谱抗逆性遗传标记、对该属植物进行精确的遗传多样性分析、植物基源鉴定、全长基因克隆以及吴茱萸属植物抗逆性分子育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

于 2011 年春季,从贵州、湖南、江西、湖北、广东 5 省的吴茱萸 GAP 种植基地采摘 10 种吴茱萸属植物的幼嫩叶片(表 1),用液氮速冷后,放入 -80 °C 超低温冰箱中备用。受体大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为 JM10(由本中心保存);克隆载体 pEASY-T1 购自北京全式金生物公司,限制性内切酶、Taq 聚合酶等购自大连宝生物公司,PCR 产物纯化试剂盒购自 Promge 公司,dNTPs、氨苄青霉素、DNA marker 等购自上海生工生物工程有限公司,其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 提取 采用改良异硫氰酸胍法提取吴茱萸幼嫩叶片总 RNA^[8],用紫外分光光度仪检测 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} ,并进行完整性电泳检测。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 所报道的杨树、棉花、油菜、柠檬等植物的 Cu/Zn-SOD 基因氨基酸的保守序列,设计 1 对简并引物。正向引物序列 WCZ1: 5' - GGWCCNACMACTGTDCTGGA - 3',反向引物序列 WCZ2: 5' - AARTCCAAYAARACCACAAGC - 3'。

根据 GenBank 所报道的拟南芥、桃、豌豆、柚等植物的 Mn/Fe-SOD 基因氨基酸的保守序列,设计一对简并引物。正向引物序列 WMF1: 5' - CAGAACAYCAYCARACNTAYGT - 3',反向引物序列 WMF2: 5'

表 1 供试材料名称和来源
Tab.1 The name of test materials and their sources

序号 No.	供试品种 Test cultivars	名称 Name	来源 Source
1	吴茱萸	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth.	贵州余庆
2	石虎(未嫁接)	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	贵州余庆
3	石虎(嫁接)	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	贵州余庆
4	疏毛吴茱萸	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>bodinieri</i> (Dode) Huang	贵州铜仁
5	疏毛吴茱萸	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>bodinieri</i> (Dode) Huang	贵州铜仁
6	石虎(未嫁接)	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	江西樟树
7	石虎(未嫁接)	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	江西新干
8	石虎(未嫁接)	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	湖南新晃
9	石虎(未嫁接)	<i>E. rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	湖北阳新
10	楝叶吴茱萸	<i>Evodia meliifolia</i> Benth	广东从化

- RTARTANGCRTGYTCCCA - 3' 所设计引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2.3 总 RNA 反转录成 cDNA 参照 Invitrogene 公司的 M-MLV 逆转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA。

1.2.4 吴茱萸属植物 Cu/Zn-SOD 和 Mn/Fe-SOD 基因片段克隆 PCR 反应体系均为 50 μL, 其中 10 × Reaction buffer 5 μL、Mg²⁺ 3.75 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 4.5 μL、正向引物 (10 μmol/L) 1 μL、反向引物 (10 μmol/L) 1 μL、cDNA 7.5 μL、Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.75 μL、ddH₂O 26.5 μL。Cu/Zn-SOD 基因片段克隆 PCR 反应程序为: 94 °C 5 min 94 °C 1 min 45 °C 1 min 72 °C 1 min 扩增 35 个循环后 72 °C 10 min 4 °C 保存扩增产物; Mn/Fe-SOD 基因片段克隆 PCR 反应程序为: 94 °C 5 min 94 °C 1 min 50 °C 1 min 72 °C 1 min 扩增 35 个循环后 72 °C 7 min 4 °C 保存扩增产物。PCR 产物经 12 g/L 的琼脂糖电泳后, 切下目的片段, 经回收纯化后与 pEASY-T1 载体连接, 转化到 JM109 大肠杆菌中, 在 LB 平板上筛选阳性克隆, 然后随机挑选经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切确认的重组质粒, 送北京全式金生物公司测序。用 DAMBE 和 DNASTar 5.0 生物软件对测序结果进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 克隆产物分析

2.1.1 Cu/Zn-SOD 基因克隆产物分析 经过 PCR 扩增后分别得到约 375 bp 的特异性条带 (图 1), 对应表 1 的样品序号 从左至右依次命名为 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10。经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 在 375 bp 处出现了单一的目的条带, 因此证实了 10 个片段均为目的片段 (图 2)。

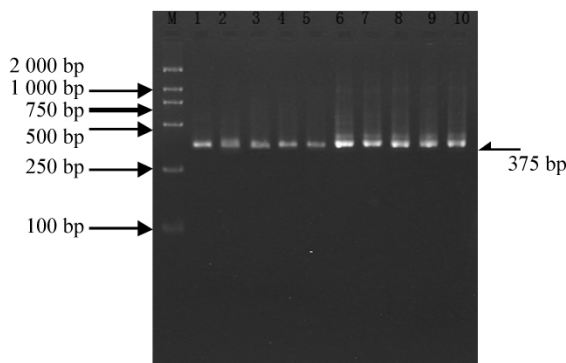


图 1 吴茱萸 Cu/Zn-SOD 基因片段的 PCR 产物电泳结果 (Marker 为 2 000 bp Marker)

Fig.1 PCR product of Cu/Zn-SOD gene fragments from *Evodia rutaecarpa*

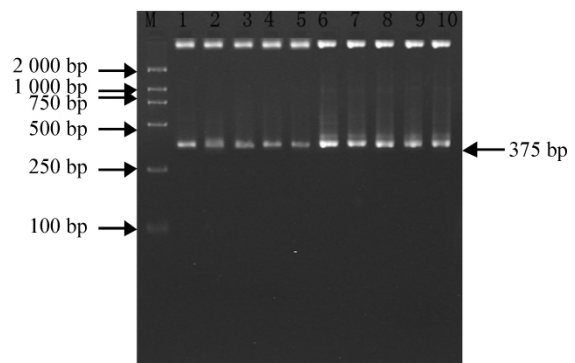


图 2 吴茱萸 Cu/Zn-SOD 基因片段重组质粒的酶切电泳检测结果 (Marker 为 2 000 bp Marker)

Fig.2 Detection by *EcoR*I and *Hind*III digestion for recombinant plasmid from *Evodia rutaecarpa* Cu/Zn-SOD gene fragments

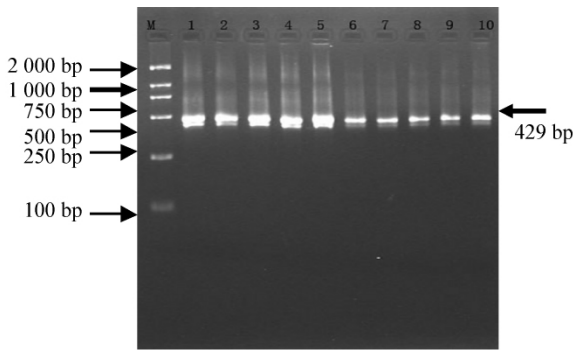


图 3 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因片段的 PCR 产物电泳结果(Marker 为 2 000 bp Marker)

Fig. 3 PCR product of Mn/Fe-SOD gene fragments from *Evodia rutaecarpa*

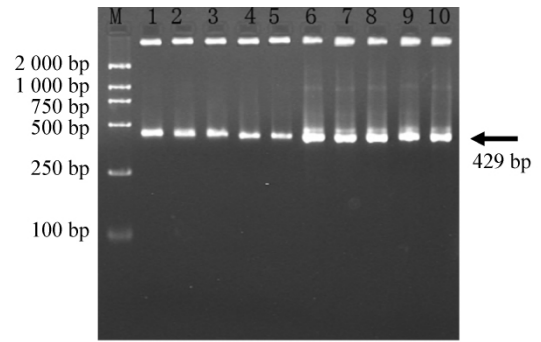


图 4 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因片段重组质粒的酶切电泳检测结果(Marker 为 2 000 bp Marker)

Fig. 4 Detection by *EcoRI* and *Hind III* digestion for recombinant plasmid from *Evodia rutaecarpa* Mn/Fe-SOD gene fragments

2.1.2 Mn/Fe-SOD 基因克隆产物分析 经过 PCR 扩增后分别得到约 430 bp 的特异性条带(图 3), 对应表 1 的样品序号, 从左至右依次命名为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10。经过 *EcoRI* 和 *Hind III* 双酶切后, 在 429 bp 处出现了单一的目的条带, 证实了 10 个片段均为目的片段(图 4)。

2.2 序列分析

2.2.1 Cu/Zn-SOD 基因片段序列分析 测序结果显示: 本试验克隆所得的 10 个吴茱萸属植物 Cu/Zn-SOD 基因片段的核苷酸序列长度均为 375 bp, 编码 125 个氨基酸, 序列均已成功提交 GenBank, 登录号为: JN651508—JN651517。把 10 个克隆所得序列与 GenBank 数据库里其他植物的 Cu/Zn-SOD 基因核苷酸和氨基酸序列分别进行比对, 其核苷酸同源性均在 74% 以上, 氨基酸同源性均在 79% 以上, 与芸香科柑橘属植物——柠檬——同源性高达 92%。

2.2.2 Mn/Fe-SOD 基因片段序列分析 测序结果显示: 本试验克隆所得的 10 个吴茱萸属植物 Mn/Fe-SOD 基因片段的核苷酸序列长度均为 429 bp, 编码 143 个氨基酸, 序列均已成功提交 GenBank, 登录号为: JN657207—JN657216。把 10 个克隆所得序列与 GenBank 数据库里其他植物的 Mn/Fe-SOD 基因核苷酸和氨基酸序列分别进行比对, 其核苷酸同源性均在 78% 以上, 氨基酸同源性均在 81% 以上, 与芸香科柑橘属植物——柚——同源性高达 93% 以上。

2.3 SOD 基因片段 SNP 分析

2.3.1 Cu/Zn-SOD 基因片段 SNP 分析 利用 DNASTar5.0 生物统计软件, 对试验所得序列进行了 SNP 位点分析和比对, 查找了单核苷酸和氨基酸的变异位点。分析结果如表 2 和表 3 所示: 在 375 bp 的核苷酸序列中, 共有 21 个单核苷酸位点发生了变异, 导致了 6 个氨基酸位点变异, 多态性频率为 1SNP/17.9 bp, 其中, 由于第 47、153、185、190、209、217 位点的单核苷酸变异引起了 6 个氨基酸位点变异。

表 2 Cu/Zn-SOD 基因片段单核苷酸变异位点

Tab. 2 Variation sites of single nucleotides in the fragments of Cu/Zn-SOD gene

样品序号 No.	9	18	27	47	84	99	105	111	117	132	141	153	171	185	190	209	217	282	309	360	366
1	A	T	T	T	A	A	A	C	C	A	T	G	C	A	G	C	A	C	C	T	T
2	A	T	C	C	C	A	A	C	C	A	T	T	C	A	A	C	G	T	C	C	A
3	A	T	C	T	C	A	A	C	C	A	A	G	C	A	G	C	A	T	C	C	C
4	A	T	C	T	C	A	A	C	C	A	A	T	C	A	A	C	A	C	C	C	C
5	A	A	C	C	C	A	A	C	C	A	A	T	C	A	A	C	G	C	C	C	C
6	A	A	C	C	C	T	A	C	C	A	T	G	T	A	A	C	A	C	C	C	C
7	A	A	C	C	C	T	A	C	C	G	T	T	T	A	A	C	A	T	C	C	C
8	A	A	C	C	C	T	A	C	C	G	T	T	T	A	A	C	A	C	C	C	C
9	A	A	C	C	C	T	A	C	C	A	T	G	T	A	A	C	A	C	C	C	C
10	C	A	T	T	G	A	T	T	T	A	A	T	T	C	A	G	A	T	T	C	T

表3 Cu/Zn-SOD 基因片段氨基酸变异位点

Tab.3 Variation sites of amino acids in the fragments of Cu/Zn-SOD gene

样品序号 No.	16	51	62	64	70	73
1	L	E	N	G	T	I
2	P	D	N	S	T	V
3	L	E	N	G	T	I
4	L	D	N	S	T	I
5	P	D	N	S	T	V
6	P	E	N	S	T	I
7	P	D	N	S	T	I
8	P	D	N	S	T	I
9	P	E	N	S	T	I
10	L	D	T	S	S	I

表4 Mn/Fe-SOD 基因片段单核苷酸变异位点

Tab.4 Variation sites of single nucleotides in the fragments of Mn/Fe-SOD gene

样品序号 No.	6	9	12	18	21	55	56	73	78	81	147	263	312	387	417	423	426
1	A	C	C	T	C	T	T	A	C	G	T	A	A	G	G	C	T
2	G	C	C	C	C	T	T	G	T	G	T	G	G	G	A	C	C
3	G	C	C	C	C	T	T	G	T	G	T	G	A	G	A	C	C
4	G	C	C	T	C	T	T	G	C	T	T	A	A	G	G	C	T
5	G	C	C	T	T	T	T	G	C	T	T	A	A	G	G	C	T
6	G	T	T	T	T	T	T	G	T	G	T	G	G	G	A	C	C
7	A	T	T	T	T	T	T	G	T	T	T	G	G	G	A	C	C
8	G	T	T	T	T	T	T	G	C	G	T	G	G	G	A	C	T
9	G	T	T	T	C	T	T	G	T	G	T	G	G	G	A	C	T
10	G	T	T	C	T	G	A	G	C	T	C	G	G	T	A	A	T

2.3.2 Mn/Fe-SOD 基因片段 SNP 分析 利用 DNASTar5.0 生物统计软件,对试验所得序列进行了 SNP 位点分析和比对,查找了单核苷酸和氨基酸的变异位点。分析结果如表 4 和表 5 所示:在 429 bp 的核苷酸序列中,共有 17 个单核苷酸位点发生了变异,导致了 3 个氨基酸位点变异,多态性频率为 1SNP/25.2 bp,其中,由于第 55、56、73、263 位点的单核苷酸变异引起了 3 个氨基酸位点变异。

2.4 吴茱萸 SOD 基因克隆片段的遗传多样性分析

使用 DAMBE 软件,对吴茱萸 Cu/Zn-SOD 基因的遗传多样性进行统计分析,以楝叶吴茱萸为外类群,采用 Neighbour-Joining 聚类法进行聚类分析,结果表明:楝叶吴茱萸作为外类群为一类;吴茱萸单独为一类;其余样品聚类在一起,其中贵州的嫁接石虎单独为一支,说明嫁接导致了石虎的遗传背景发生了较为重大的变化。

3 讨论

(1) 根据 SOD 酶活性中心辅基结

表5 Mn/Fe-SOD 基因片段氨基酸变异位点

Tab.5 Variation sites of amino acids in the fragments of Mn/Fe-SOD gene

样品序号 No.	19	25	88
1	F	I	N
2	F	V	S
3	F	V	S
4	F	V	N
5	F	V	N
6	F	V	S
7	F	V	S
8	F	V	S
9	F	V	S
10	D	V	S

合的结合金属离子的不同,分为 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD 3 种,其中 Mn-SOD 和 Fe-SOD 具有共同的祖先^[9],与 Cu/Zn-SOD 在蛋白质

空间结构、光谱性质、分子量等方面差异很大因此同源性非常高^[10]。本试验的结果显示:吴茱萸的 Cu/Zn-SOD 基因和 Mn/Fe-SOD 基因的核苷酸同源性仅 5.9% ,氨基酸同源性仅 5.6% 。

(2) SOD 基因与其他基因相比,在进化过程中具有较高的保守性,更适合作为 SNP 的研究对象。本试验所克隆 10 种吴茱萸属植物的 Cu/Zn-SOD 和 Mn/Fe-SOD 基因核心序列的 SNP 变异位点和相对应的氨基酸变异位点,其中 Cu/Zn-SOD 基因片段的 375 bp 中有 21 个位点发生了变异,导致了 6 个氨基酸位点变异,而 Mn/Fe-SOD 基因片段的 429 bp 中仅有 17 个位点发生了变异,导致了 3 个氨基酸位点发生变异,从而揭示了 SOD 基因在吴茱萸属植物间的多态性和保守性。吴波等^[11]研究了 6 种芸香科柑橘类植物 Mn/Fe-SOD 基因,184 个核苷酸仅导致了 3 个氨基酸位点发生变异;胡根海等^[12]克隆了陆地棉叶绿体 Cu/Zn-SOD 基因,并对其表达进行了研究,结果显示 Cu/Zn-SOD 基因具有高度的保守性;纪砚耘等^[13]克隆了丹参 Cu/Zn-SOD 基因,对其进行了生物信息学分析,证实了 Cu/Zn-SOD 基因的高度保守性。因此,结合众多学者的研究结果,我们选择了采用试验所得的 Cu/Zn-SOD 基因的核苷酸序列,利用 SNP 技术,构建了 10 种吴茱萸属植物的 Cu/Zn-SOD 基因遗传多样性图谱,遗传多样性分析达到单碱基水平,10 份样品完全分开,弥补了 RAPD、AFLP 等分子标记技术分辨率较低的缺陷。SNP 技术目前已广泛应用于多种植物,尤其是近缘种植物的精确遗传多样性研究,如 Kota 等^[14]对大麦 7 个基因型进行了 SNP 研究,把它们进行了精确分类;米瑞等^[15]对 196 份小麦自主开花基因 *TaFLD* 单核苷酸多态性进行了分析,确定了各个品种的生态类型;李亚玲^[16]等利用番茄 *Mi-1* 基因的 SNP 位点,对 438 个 F₂ 群体进行了 SNP 分型。吴茱萸遗传背景差异较大,个体变异丰富,不同生态环境对其遗传特性影响较大^[17],因此,采用 SNP 技术对吴茱萸保守基因的遗传多样性进行研究,可以更加准确化和客观化其遗传多样性研究成果,对其实现更为精确分类。

参考文献:

- [1] Bublly O A ,Loecheke V. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanoaster* [J]. Journal of Evolutionary Biology ,2005 ,18: 789-803.
- [2] Tsang E W ,Bowler C ,Herouart D ,et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress [J]. Plant Cell ,1991 ,3(8) : 783-792.
- [3] Perl T R ,Galun E. The tomato Cu ,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress [J]. Plant Mol Biol ,1991(17) : 745-760.
- [4] Priya P ,Venkatachalam P ,Thulaseedharan A. Molecular cloning and characterization of the rubber elongation factor gene and its promoter sequence from rubber tree(*Hevea brasiliensis*) : A gene involved in rubber biosynthesis [J]. Plant Science ,2006 ,171: 470-480.
- [5] Andreas E Voloudakis ,Philippe Marmey ,Etienne Delannoy ,et al. Molecular cloning and characterization of *Gossypium hirsutum* superoxide dismutase genes during cotton-*Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* interaction [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology ,2006 ,68: 119-127.
- [6] 王芳,董乐,戴聪杰,等. 杨梅 Cu/Zn 超氧化物歧化酶基因(MrSOD1) cDNA 的克隆及表达分析 [J]. 中国农学通报 ,2010 ,26(22) : 27-33.
- [7] 冉贵萍,黄海,黄金宝. 吴茱萸的 AFLP 指纹图谱的初步研究 [J]. 植物研究 2008 ,28(6) : 720-725.
- [8] 吴波,高丹,潘超美,等. 不同方法提取吴茱萸叶片基因组 DNA 和总 RNA 的比较 [J]. 安徽农业大学学报 ,2012 ,39(1) : 57-61.
- [9] 陈惠芳,王琦,付学池,等. 超氧化物歧化酶(SOD) 的分子生物学 [J]. 生命的化学 2003 ,23(4) : 291-293.
- [10] 张博润,谭华荣. SOD 研究进展与应用前景 [J]. 微生物学通报 ,1992 ,19(6) : 352-357.
- [11] 吴波,刘勇. 柑橘类植物 SOD 基因片段的克隆和 SNP 分析 [J]. 安徽农业科学 2010 ,38(22) : 11719-11721.
- [12] 胡根海,喻树迅,范术丽,等. 陆地棉叶绿体铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与表达 [J]. 植物生理与分子生物学学报 2007 ,33(3) : 197-204.
- [13] 纪砚耘,化文平,王喆之. 丹参铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD) 基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 陕西师范大学学报 2011 ,39(3) : 56-61.
- [14] Kota R ,Varsheny R K ,Thiel T ,et al. Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley(*Hordeum vulgare* L.) [J]. Hereditas 2001 ,135: 145-151.
- [15] 米瑞,贾继增,韩德俊. 小麦自主开花基因 *TaFLD* 单核苷酸多态性分析 [J]. 麦类作物学报 2011 ,31(1) : 9-14.
- [16] 李亚玲,李景富,康立功,等. 番茄 *Mi-1* 基因的 SNP 分型 [J]. 东北农业大学学报 2010 ,41(10) : 36-42.
- [17] 曹亮,李顺祥,魏宝阳,等. 吴茱萸 RAPD 体系构建及道地性遗传背景研究 [J]. 中草药 2010 ,41(6) : 975-978.