

小麦 *TaTrxh9* 基因的序列特征及其对渗透胁迫的响应

李梦园¹, 樊亚栋², 张新宁¹, 姜玉梅², 孟凡荣¹, 李永春^{2*}

(1 河南农业大学 生命科学学院, 郑州 450002; 2 河南农业大学 农学院, 郑州 450046)

摘 要: 硫氧还蛋白是一类广泛存在于植物中的低分子量氧化还原蛋白, 在植物生长发育调控和逆境响应过程中发挥重要的调控功能。以小麦(*Triticum aestivum* L.) 品种‘中国春’和‘洛旱 2 号’为材料, 采用 RT-PCR 方法克隆了小麦硫氧还蛋白基因 *TaTrxh9*, 通过生物信息学方法分析了其染色体定位及序列特征, 并利用 qRT-PCR 技术分析了该基因对渗透胁迫的响应模式。结果显示: (1) 成功克隆到小麦 *TaTrxh9* 基因, 序列分析发现 *TaTrxh9* 基因位于第 1 染色体群的短臂上, 并将其 3 个部分同源基因命名为 *TaTrxh9-1AS*、*TaTrxh9-1BS* 和 *TaTrxh9-1DS*。(2) *TaTrxh9* 基因包含 4 个内含子, 且在内含子区域 3 个部分同源基因间序列差异较大; 3 个部分同源基因的编码区序列一致性在 98% 以上, 均编码 131 个氨基酸, 且蛋白序列完全相同; *TaTrxh9* 蛋白包含 1 个 Trx-family 保守域和 CXXC 氧化还原活性位点, 三维结构预测分析显示该蛋白可形成典型的硫氧还蛋白空间结构, 包括由 4 个 α 螺旋组成的外围框架和由 5 个反向平行的 β 折叠组成的中心轴。(3) qRT-PCR 分析显示, *TaTrxh9* 基因受干旱胁迫诱导在叶片中下调表达, 而在根系中呈先上调后下调的表达模式; 盐胁迫过程中, *TaTrxh9* 基因在叶片中无显著响应, 在根系中也仅出现短暂的诱导表达现象; 在 ABA 处理过程中, *TaTrxh9* 基因表达模式与其对干旱胁迫的响应模式类似。研究推测, *TaTrxh9* 基因对干旱胁迫的响应过程可能与 ABA 介导的基因表达调控有关。

关键词: 小麦; 硫氧还蛋白; 基因克隆; 渗透胁迫; 表达模式

中图分类号: Q785; Q786; Q789

文献标志码: A

Sequence Characteristics of *TaTrxh9* Gene and Its Response to Osmotic Stresses in Wheat

LI Mengyuan¹, FAN Yadong², ZHANG Xinning¹, JIANG Yumei²,
MENG Fanrong¹, LI Yongchun^{2*}

(1 College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2 College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Thioredoxins are a kind of low molecular weight redox proteins widely existing in plants, which play important roles in the developmental regulation and stress responding processes in plants. Two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, ‘Chinese Spring’ and ‘Luohan No. 2’, were used in this study. A thioredoxin gene *TaTrxh9* was cloned from common wheat by using RT-PCR. Bioinformatics analysis was performed to define the chromosomal localization and sequence characteristics of *TaTrxh9*, and its expres-

收稿日期: 2019-03-19; 修改稿收到日期: 2019-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(31571655); 国家重点研发计划(2017YFD0301101); 河南省自然科学基金(182300410051); 河南省留学人员科研择优资助项目

作者简介: 李梦园(1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: yuaner.lee@qq.com

* 通信作者: 李永春, 博士, 研究员, 主要从事小麦发育调控机理与技术研究。E-mail: yongchunli71@foxmail.com

sion patterns responding to osmotic stresses were detected by qRT-PCR. The results showed that: (1) *TaTrxh9* gene was successfully cloned, sequence analysis indicated that *TaTrxh9* was located on the short arms of group one chromosomes, and three homoeologues of the gene were designated as *TaTrxh9-1AS*, *TaTrxh9-1BS* and *TaTrxh9-1DS*, respectively. (2) Four introns were detected in each of *TaTrxh9* homoeologues and a large number of polymorphisms were detected in introns among homoeologues, while the coding regions of homoeologues were highly identical ($>98\%$) and encoded an identical protein sequence with the length of 131 amino acids. Characterization of *TaTrxh9* protein indicated that a TRX-family conserved domain and a CXXC redox active site was detected, and the *TaTrxh9* was predicted to have a typical spatial structure of thioredoxin, including a peripheral framework composed of 4 helices and a central axis composed of 5 antiparallel β sheets. (3) qRT-PCR analysis showed that *TaTrxh9* gene was down-regulated in leaves under drought stress, while initially increased and then declined in roots. Under salt stress, no significant response of *TaTrxh9* gene was detected in leaves and only a transient induction was observed in roots. The expression pattern of *TaTrxh9* under treatment of ABA is similar to that under the drought stress. It was speculated that the responding process of *TaTrxh9* gene to drought stress was associated with ABA-mediated regulation of gene expression.

Key words: wheat; thioredoxin; gene cloning; osmotic stress; expression pattern

干旱和高盐胁迫是制约小麦高产稳产的主要逆境因子,探讨干旱和高盐胁迫响应的分子机制对于开展小麦抗逆分子育种具有重要意义^[1]。植物在逆境胁迫响应过程中涉及到一系列的氧化还原调控,其中硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)作为一类抗氧化因子在植物抵御逆境胁迫过程中发挥重要的调节功能^[2]。Trx 蛋白是一类小分子氧化还原调控蛋白,广泛存在于动、植物和微生物中^[3];按照其序列特性和在细胞中的分布情况,植物的 Trx 蛋白分为 6 种类型,即 f、m、x、y、h 和 o 型^[4]。其中, h 型 Trx (Trxh)在细胞中的分布最为广泛,已发现不同的 Trxh 蛋白可定位于胞液^[5]、细胞核^[6]、内质网^[7]、质膜^[8]和线粒体^[9]等亚细胞结构。

植物中 Trxh 的成员较多,已从模式植物拟南芥中鉴定了 11 个 *Trxh* 基因^[10],在水稻中至少存在 10 个 *Trxh* 基因^[11]。研究发现,拟南芥的 *Trxh5* 在抵御病毒和微生物侵染过程中发挥重要功能^[12-13],水稻的 *Trxh1* 和 *Trxh4* 分别参与了高盐^[14]和低磷^[15]胁迫响应的精细调控;大麦中 *Trxh5* 参与了籽粒萌发的调控过程^[16],进一步分析显示在籽粒萌发过程中 Trxh 蛋白可以通过对二硫键的调控来提高淀粉水解酶的活性,同时增加种子储藏蛋白的可溶性,从而促进种子的萌发^[17];上述研究表明, *Trxh* 基因在植物生长发育调控和逆境胁迫响应过程中发挥重要的调控功能。在小麦中,对转反义 *Trx* 基因材料的研究表明 *Trxh9* 基因抑制表达后显著提高了小麦的抗穗发芽能力^[18]。在此基础上,本研究克隆了小麦 *Trxh9* 基因的 3 个部分同源基因,并系统分析了该基因的序列特性及其对渗透胁迫的响应,

以期探讨 Trxh 在小麦渗透胁迫响应过程中的生物学功能提供参考。

1 材料和方法

1.1 小麦材料及处理

以小麦品种‘中国春’和‘洛旱 2 号’为实验材料,选取籽粒饱满均匀的小麦种子,用 10% NaClO 表面消毒,在人工气候室内水培(条件为 16 h 光照, 8 h 黑暗,温度为 26 ℃)至一叶一心期。以 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 进行胁迫处理,模拟干旱使用 20% PEG 6000 溶液,分别剪取处理后 0、0.5、1、2、6、12、24 和 48 h 的叶片和根系组织,用于胁迫过程的表达分析。实验设 3 个生物学重复,上述所有样品均及时用液氮速冻后于 -80 ℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 及 DNA 的获得 总 RNA 的提取采用 RNAisoPlus (TaKaRa, 大连)试剂盒进行,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,同时使用 $OD_{260/280}$ 比值来评估 RNA 的浓度、纯度和完整性。cDNA 反转录采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 大连),并于 -20 ℃ 保存备用。小麦品种‘洛旱 2 号’叶片基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[19]。

1.2.2 基因克隆及序列分析 依据小麦的 cDNA 序列 AF438359 进行基因组数据库 Ensemblplants (http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index) 比对分析和染色体定位,利用参考序列通过 Primer Premier 5.0 进行引物设计(表 1),委托

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	用途 Function
cTaTrxh9-F	CCAGGCTTATCTTCTCCGTCTC	基因克隆 Gene cloning
cTaTrxh9-R	CAAGCTGGCTCTGTTCTAATTCTG	基因克隆 Gene cloning
qTaTrxh9F-A	CATTCAGCGATTCTGCCAGTGTC	A 基因组特异引物 A genome specific primer
qTaTrxh9F-B	CGATCCCAGGCCTTCAGGTAC	B 基因组特异引物 B genome specific primer
qTaTrxh9F-D	TCCGATCTCAGGCCTTCGGGTAT	D 基因组特异引物 D genome specific primer
qTaTrxh9-R	ATGACACGGCATGGCCACACA	通用引物 Common primer
TaActin-F	GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC	β-肌动蛋白基因特异引物 β-actin F gene specific primer
TaActin-R	TAGCCGTTTCCAGCTCCTGC	β-肌动蛋白基因特异引物 β-actin F gene specific primer

尚亚生物技术有限公司(郑州)合成。基因克隆使用引物为 cTaTrxh9-F 和 cTaTrxh9-R,利用 LA-Taq 高保真酶分别进行 cDNA 和基因组 DNA 片段的扩增,PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 后延伸 10 min,4 ℃ 保存。1%琼脂糖凝胶电泳(150 V,30 min)检测 PCR 产物,质量合格后回收相应的 DNA 片段,回收片段克隆至 pMD19-T 载体(TaKaRa,大连),热击法转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞后,用 A、B 和 D 基因组特异引物 qTaTrxh9F-A、qTaTrxh9F-B 和 qTaTrxh9F-D 分别和通用引物 qTaTrxh9-R 进行重组克隆鉴定,挑选阳性单克隆送尚亚生物技术有限公司(郑州)测序,得到目的片段序列。

1.2.3 生物信息学分析 DNA 和蛋白序列比对采用 Snapgene 软件进行,顺式作用元件分析通过 PlantCARE 软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线分析。通过 NCBI 数据库 Blastx 分析确定基因的编码框,利用 NCBI 数据库的保守域数据库 CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 进行结构域分析,使用 ExPASy(http://web.expasy.org/compute_pi/) 在线分析蛋白质特性分析,利用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析蛋白的磷酸化位点,利用 SWISS MODEL (<https://www.swiss-model.expasy.org/>) 进行蛋白质高级结构的预测分析。

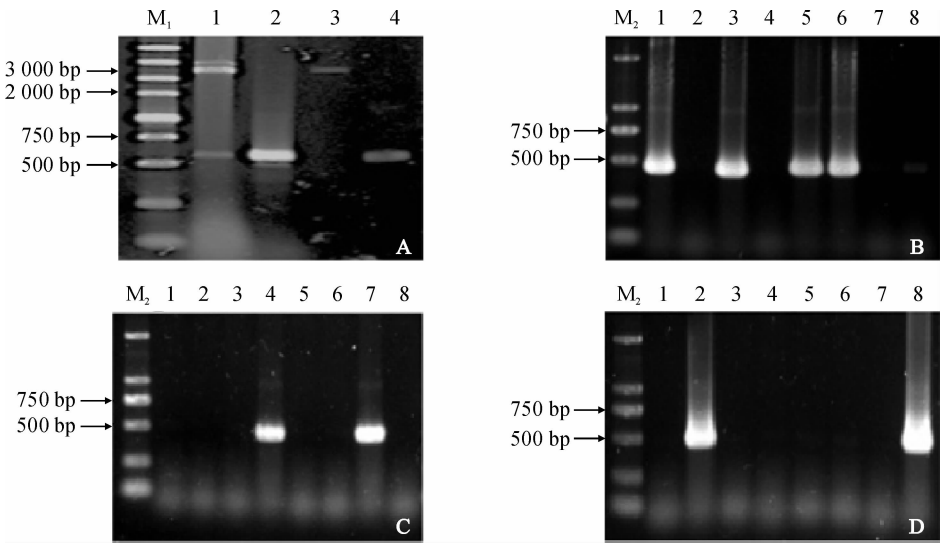
1.2.4 基因表达模式分析 根据小麦 *TaTrxh9* 序列设计 qRT-PCR 引物(表 1),表达分析引物为 A、B 和 D 基因组特异引物 qTaTrxh9F-A、qTaTrxh9F-B 和 qTaTrxh9F-D 分别和通用引物 qTaTrxh9-R 进

行组合,以 β-肌动蛋白基因小麦 *Actin*(GenBank 登录号为 AB181991)作为内参基因,引物由尚亚生物技术有限公司(郑州)合成。实时定量采用 Trans-Start Top Green qPCRSuperMix(全式金,北京)试剂盒,仪器为 Bio-Rad CFX Connect™。反应体系为 20 μL,包括 cDNA 模板 1 μL,2×qPCRSuper-Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,ddH₂O 8.2 μL。PCR 程序为:94 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 5 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,40 个循环;*TaTrxh9* 的相对表达量计算采用 2^{-ΔΔC_t} 法。实验设 3 个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 *TaTrxh9* 基因的克隆及序列分析

利用‘中国春’小麦硫氧还蛋白基因序列 AF438359 进行 NCBI 数据库 Blastx 分析显示,该基因编码蛋白和拟南芥的硫氧还蛋白 Trxh9(NP_187483)序列一致性高达 65%,因此将小麦中该基因命名为 *TaTrxh9*。通过在小麦基因组数据库的比对分析发现,*TaTrxh9* 位于第 1 染色体群的短臂上,将该基因的 3 个部分同源基因命名为 *TaTrxh9*-1AS、*TaTrxh9*-1BS 和 *TaTrxh9*-1DS。以小麦品种‘洛旱 2 号’基因组 DNA 和 cDNA 为模板,利用引物 cTaTrxh9-F 和 cTaTrxh9-R 进行 PCR 扩增获得了该基因的基因组 DNA(gDNA)和 cDNA 片段,分子量大小分别约为 2 400 bp 和 580 bp 的条带(图 1,A);将目的片段回收后连接到 T 载体,并转化大肠杆菌感受态细胞;挑取重组克隆,分别用 A、B 和 D 基因组特异引物 qTaTrxh9-F-A、qTaTrxh9-F-B 和 qTaTrxh9-F-D 与通用引物 cTaTrxh9-R 组合进行重组克隆的 PCR 鉴定(图 1,B~D),将鉴定出的包含 A、B 和 D 基因组对应片段



A. *TaTrxh9* 基因的 cDNA 和 gDNA 片段克隆(M₁. DL5000;1. gDNA 扩增产物;2. cDNA 片段的扩增产物;3. gDNA 片段的回收产物;4. cDNA 片段的回收产物);B. 包含 A 基因组片段的重组克隆鉴定;C. 包含 B 基因组片段的重组克隆鉴定;D. 包含 D 基因组片段的重组克隆鉴定;(B、C、D;M₂. DL2000;1~8. 重组克隆)

图 1 小麦 *TaTrxh9* 基因的克隆

Fig. A. Cloning of cDNA and gDNA fragments of *TaTrxh9* gene(M₁. DL5000. 1. Product of gDNA amplification; 2. Product of cDNA amplification; 3. gDNA fragments recovered; 4. cDNA fragments recovered). Fig. B, Fig. C and Fig. D showed the identification of recombinant clones harboring A, B and D genome specific fragments, respectively (Fig. B, Fig. C, Fig. D;M₂. DL2000; 1—8. Recombinant clones)

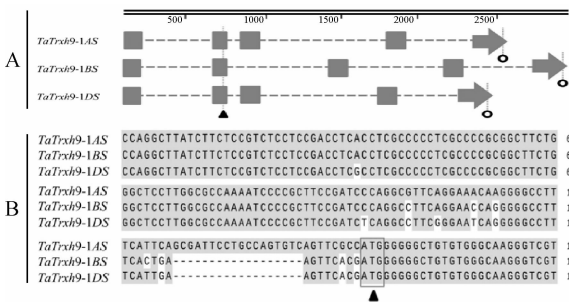
Fig. 1 Cloning of the *TaTrxh9* gene in wheat

的克隆进行测序,并将该基因 3 个部分同源序列并提交 GenBank 数据库(序列号为 MK497250、MK497251 和 MK497252)。

通过对 *TaTrxh9* 的基因组 DNA 和 cDNA 序列的比对分析发现,*TaTrxh9* 基因包含 4 个内含子(图 2, A);*TaTrxh9*-1AS、*TaTrxh9*-1BS 和 *TaTrxh9*-1DS 的序列比对显示,内含子区域差异较大,存在大量的 SNP 和 InDel 多态性差异,特别是在第 2 内含子区域 *TaTrxh9*-1BS 存在一个 597 bp 大片段插入。在 5'-UTR 区域 *TaTrxh9*-1AS 和另 2 个部分同源基因的差异较大,且在起始密码子上游 8 bp 处存在 18 bp 的插入(图 2,B);不过,在编码区 3 个部分同源基因间序列高度一致,*TaTrxh9*-1BS 和 *TaTrxh9*-1DS 与 *TaTrxh9*-1AS 的序列一致性分别为 98.5%和 99.2%,而且由于密码子简并性使得 3 个部分同源基因编码的氨基酸序列完全一致,均可编码 131 个氨基酸。

2.2 *TaTrxh9* 的蛋白特性分析

蛋白序列分析显示,*TaTrxh9* 包含 131 个氨基酸,分子量约为 14.5 kD,等电点为 4.83。通过 NCBI 的 CD-search 分析显示,*TaTrxh9* 包含 1 个 Trx-family 保守域,位于第 30~125 位氨基酸,并且具有



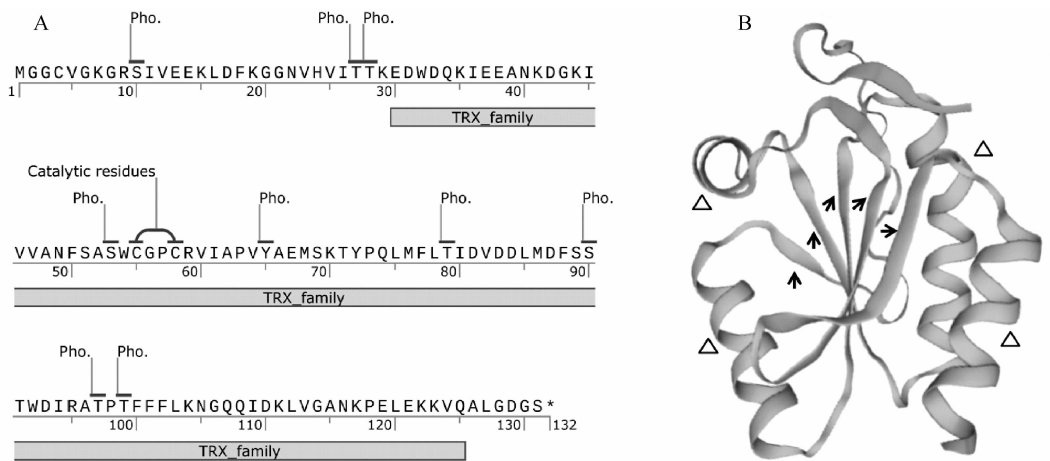
A. *TaTrxh9* 的 3 个部分同源基因序列特征分析;B. *TaTrxh9* 基因 5'-UTR 区域 3 个部分同源基因间的序列比对;黑三角表示起始密码子位置,黑色圆圈指示终止密码子位置

图 2 *TaTrxh9* 的基因组结构及序列分析

A. Structures of three homoeologues of *TaTrxh9*; B. Sequence alignment of 5' UTR among three homoeologues of *TaTrxh9*; The black triangle indicates the site of initiation codon and the black circle indicates the termination codon

Fig. 2 Genomic structures and sequence analysis *TaTrxh9* gene

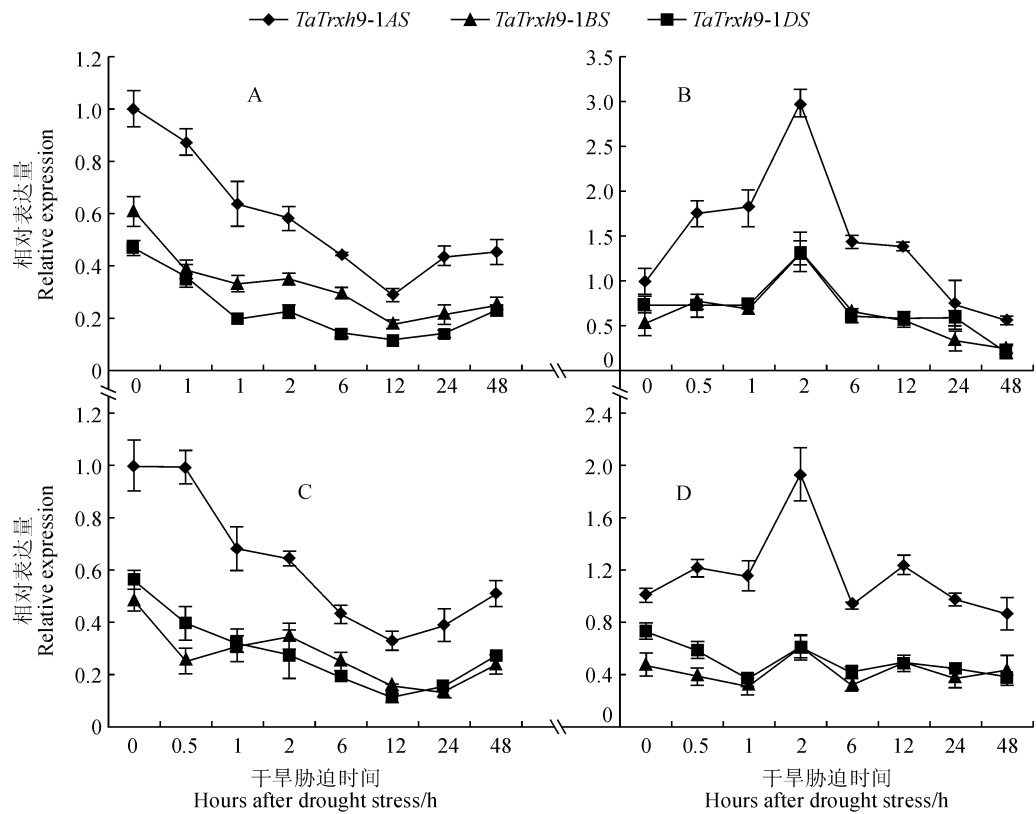
CXXC 活性位点(图 3,A)。利用在线网站 NetPhos 2.0 Server 预测 *TaTrxh9* 编码蛋白的磷酸化位点。利用 NetPhos 3.1a 进行的磷酸化位点分析显示,*TaTrxh9* 蛋白具有 9 个磷酸化位点,其中包括 3 个丝氨酸(S)位点、5 个苏氨酸(T)位点和 1 个酪氨酸



A. TaTrxh9 的氨基酸序列特性分析;B. TaTrxh9 的空间结构分析;三角表示 α 螺旋,箭头表示 β 折叠
图 3 TaTrxh9 蛋白特性分析

A. Amino acid sequence analysis of TaTrxh9; B. Structural model of TaTrxh9 protein;
Triangles and arrows indicate α helices and β sheets, respectively

Fig. 3 Characteristics of TaTrxh9 protein



A. ‘中国春’叶片;B. ‘中国春’根系;C. ‘洛旱 2 号’叶片;D. ‘洛旱 2 号’根系。下同

图 4 小麦 TaTrxh9 在干旱(20% PEG 溶液)胁迫过程中的表达模式

A. Leaves of Chinese Spring;B. Roots of Chinese Spring;C. Leaves of Luohan No. 2;D. Roots of Luohan No. 2. The same as below

Fig. 4 Expression patterns of TaTrxh9 in wheat under drought (solution of 20% PEG) stress

(Y)位点。蛋白质三级结构预测分析显示(图 3, B),TaTrxh9 蛋白可形成典型的硫氧还蛋白三维结构,其中外围是由 4 个 α 螺旋组成的框架,中心是 5 个反向平行的 β 折叠交叉堆积。

2.3 干旱胁迫过程中 TaTrxh9 的表达模式

在干旱胁迫条件下,分析了‘中国春’(图 4, A、B)和‘洛旱 2 号’(图 4, C、D)2 个品种中 TaTrxh9 的表达模式。在叶片中,TaTrxh9 的 3 个部分同源

基因均受胁迫诱导而下调表达,且在 2 个品种中的表达趋势基本一致,在胁迫 12 h 的表达量降低到最低(图 4,A、C)。在根系中,该基因呈现出先升高后下降的胁迫响应模式,且在‘中国春’的根系中 3 个部分同源基因具有相似的表达模式(图 4,B),而在‘洛旱 2 号’根系中 *TaTrxh9*-1BS 和 *TaTrxh9*-1DS 对干旱胁迫无明显响应(图 4,D)。从整体表达趋势来看, *TaTrxh9* 基因在叶片和根系中表现出不同的干旱胁迫响应模式,预示着其在叶片和根系中通过不同的调节途径参与胁迫响应。另外,在 3 个部分同源基因中 *TaTrxh9*-1AS 的表达水平较其他 2 个高,推测 *TaTrxh9*-1AS 在干旱胁迫响应过程中发挥重要功能。

2.4 盐胁迫过程中 *TaTrxh9* 的表达模式

盐胁迫条件下, *TaTrxh9* 基因在所检测 2 个品种的叶片中出现了表达轻微波动现象,但是差异不大(图 5,A、C),推测该基因在叶片中的表达不受盐胁迫的调控。但是在‘中国春’根系中该基因在胁迫处理 0.5 h 时迅速上调表达,特别是 *TaTrxh9*-1AS 的表达量上调了 2.5 倍(图 5,B)。而在‘洛旱 2 号’根系中该基因的诱导表达启动较晚,在胁迫处理 6

h 时才出现上调表达(图 5,D);不过,3 个部分同源基因表现出一致的诱导表达模式,且上调幅度较‘中国春’大。整体来看, *TaTrxh9* 仅在根系对盐胁迫有短暂的响应,且‘中国春’的响应较‘洛旱 2 号’要快速一些。

2.5 植物激素 ABA 处理条件下 *TaTrxh9* 的表达模式

在所检测 2 个品种的叶片中,受植物激素 ABA 的诱导 *TaTrxh9* 基因均表现出下调表达的趋势(图 6,A、C),这和干旱胁迫过程中的表达模式相似(图 4,A、C);在‘中国春’根系中,受 ABA 的诱导 *TaTrxh9* 基因在处理 0.5 h 时即迅速上调表达,处理 2.0 h 时达到最高值,之后表达量逐渐下降(图 6,B);在‘洛旱 2 号’根系中, *TaTrxh9* 基因也表现出先升高后降低的表达模式,不过在处理 2.0 h 之后其表达水平便迅速下降(图 6,D)。从表达模式来看, *TaTrxh9* 基因在干旱胁迫和 ABA 处理过程中的表达模式非常相似,由此推测,该基因对于干旱胁迫的响应可能与 ABA 参与的基因表达调控有关。

3 讨论

植物在逆境胁迫过程中,往往会伴随着活性氧

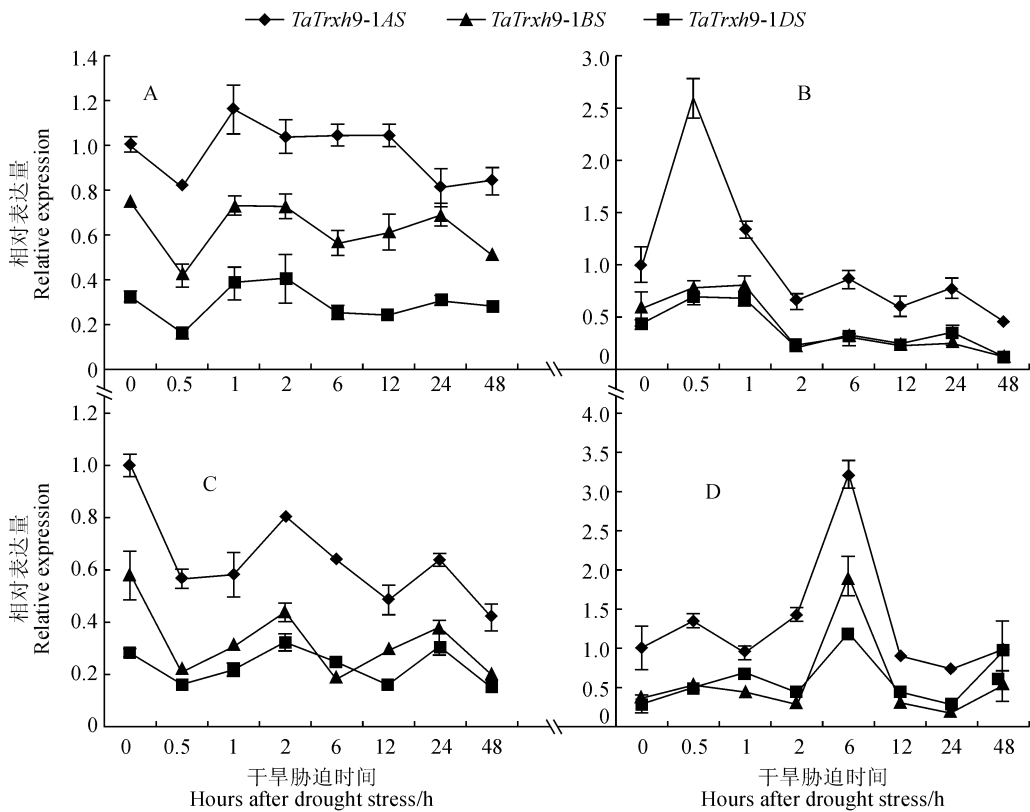


图 5 小麦 *TaTrxh9* 在盐(150 mmol · L⁻¹ NaCl)胁迫过程中的表达模式
Fig. 5 Expression patterns of *TaTrxh9* in wheat under salt (150 mmol · L⁻¹ NaCl) stress

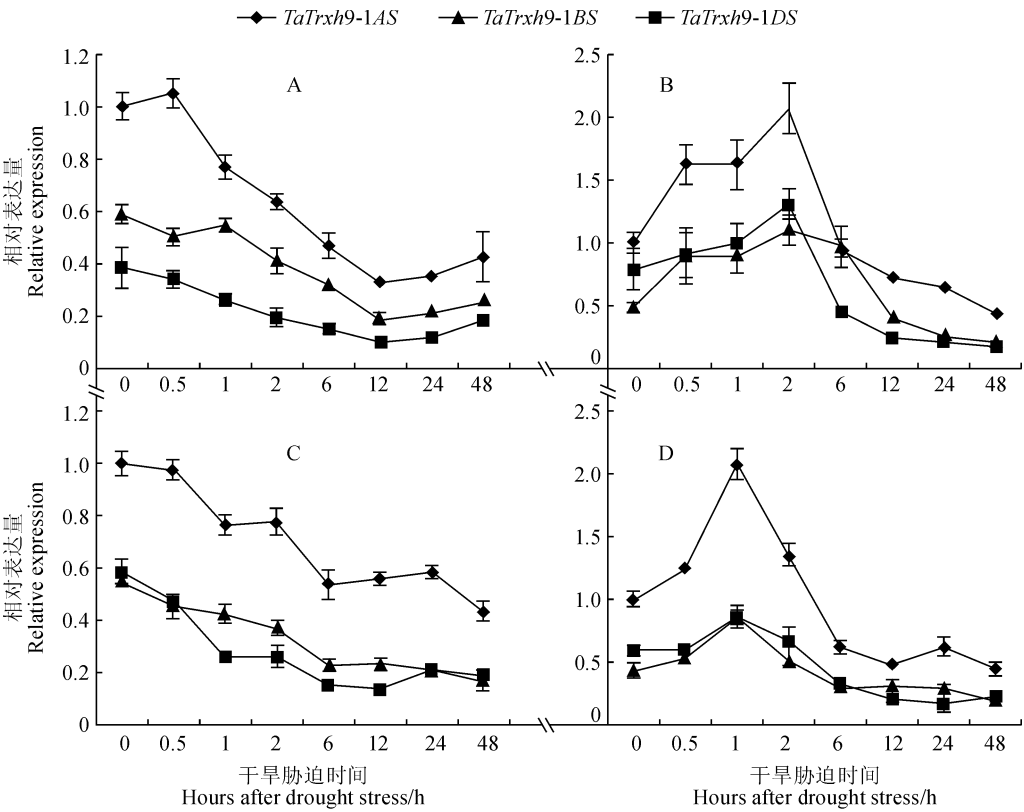


图 6 小麦 *TaTrxh9* 在 ABA(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理过程中的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *TaTrxh9* in wheat under treatment of ABA(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

(reactive oxygen species, ROS)的大量积累,进而导致氧化还原状态的失衡和植物生长发育的异常^[2]。因此,有效调节和维持细胞良好的氧化还原状态是植物抵御逆境胁迫的重要生化调控途径。研究发现,在众多的氧化还原调控蛋白中,硫氧还蛋白是一类参与植物生长发育调控和逆境胁迫响应中的重要氧化还原调控蛋白^[20]。本研究中,小麦硫氧还蛋白基因 *TaTrxh9* 在叶片中受干旱胁迫和 ABA 的诱导而下调表达,但对盐胁迫无响应。进一步对该基因起始密码子上游 1 500 bp 区域内的顺式作用元件分析显示,上游调控区包含有多个 ABA 响应元件(GCCGCGTGGC 和 GACGCGTGTC)和光响应元件(ACGTGGA 和 GCCACGTGGA),这些顺式作用元件可能与 *TaTrxh9* 基因响应干旱胁迫的转录调控有关。另外,*TaTrxh9* 基因在叶片和根系中表现出不同的干旱胁迫响应模式,预示着其在叶片和根系中通过不同的调节途径参与胁迫响应。

H 型硫氧还蛋白(Trxh)是一类成员最多,且在细胞中分布最为广泛的 Trx 蛋白^[5];按照氨基酸序列的特征,可以将植物的 Trxh 蛋白分为 3 个亚类(I、II 和 III)。目前,模式植物拟南芥中鉴定了 11

个编码 h 型的 Trx 蛋白的基因,其中 AtTrxh1 (At3g51030)、AtTrxh3 (At5g42980)、AtTrxh4 (At1g19730)和 AtTrxh5 (At1g45145)属于第 I 亚类,AtTrxh2 (At5g39950)、AtTrxh7 (At1g59730)和 AtTrxh8 (At1g69880)属于第 II 亚类,AtTrxh9 (At3g08710), AtCxxC2 (At3G56420)、AtCxxS1 (At2g40790) 和 AtCxxS2 (At1g11530)属于第 III 亚类^[11]。本研究中报道的小麦硫氧还蛋白 *TaTrxh9* 和拟南芥的 AtTrxh9 氨基酸序列一致性最高(65%),属于 Trxh 的第 III 亚类。氨基酸序列分析显示,*TaTrxh9* 蛋白包含完整的 Trx-family 保守域和 CXXC 活性位点,三维结构预测分析也显示该蛋白可形成经典的硫氧还蛋白空间结构,说明小麦的 *TaTrxh9* 具有正常的氧化还原调控功能。

为了确定 *TaTrxh9* 基因在小麦中的序列保守性,比较了‘中国春’、‘洛旱 2 号’和‘京 841’小麦中该基因的序列一致性。结果显示,*TaTrxh9*-1AS 和 *TaTrxh9*-1DS 在 3 个品种间序列完全一致, *TaTrxh9*-1BS 除在‘中国春’中第二内含子区域有 1 个约 300 bp 的缺失(‘中国春’的 DNA 序列来自 Ensemblplants 小麦基因组数据库)外,所检测 3 个品种间 DNA 序列也完全一致。蛋白序列显示,

TaTrxh9 基因的 3 个部分同源基因所编码的氨基酸序列完全一致,推测这 3 个部分同源基因在六倍体小麦中存在功能冗余现象。不过,3 个部分同源

基因的表达水平存在一定的差异,其中 *TaTrxh9-1AS* 的表达量最高,关于 3 个部分同源基因在小麦中是否存在功能互补现象仍有待进一步研究证实。

参考文献:

[1] LI Y C, MENG F R, ZHANG C Y, *et al.* Comparative analysis of water stress-responsive transcriptomes in drought-susceptible and-tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Journal of Plant Biology*, 2012,**55**(5): 349-360.

[2] NOCTOR G, REICHHELD J P, FOYER C H. ROS-related redox regulation and signaling in plants[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2018,**80**: 3-12.

[3] BUCHANAN B B, BALMER Y. Redox regulation: a broadening horizon[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005,**56**: 187-220.

[4] GEIGENBERGER P, THORMÄHLEN I, DALOSO D M, *et al.* The unprecedented versatility of the plant thioredoxin system[J]. *Trends in Plant Science*, 2017,**22**(3): 249-262.

[5] GELHAYE E, ROUHIER N, JACQUOT J P. The thioredoxin h system of higher plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2004,**42**(4): 265-271.

[6] SERRATO A J, PÉREZ-RUIZ J M, CEJUDO F J. Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat[J]. *The Biochemical Journal* 2002,**367**(Pt 2): 491-497.

[7] MARCUS F, CHAMBERLAIN S H, CHU C, *et al.* Plant thioredoxin h: an animal-like thioredoxin occurring in multiple cell compartments[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991,**287**(1): 195-198.

[8] MENG L, WONG J H, FELDMAN L J, *et al.* A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010,**107**(8): 3 900-3 905.

[9] GELHAYE E, ROUHIER N, GÉRARD J, *et al.* A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**(40): 14 545-14 550.

[10] MEYER Y, REICHHELD J P, VIGNOLS F. Thioredoxins in Arabidopsis and other plants[J]. *Photosynthesis Research*, 2005,**86**(3): 419-433.

[11] XIE G S, KATO H, SASAKI K, *et al.* A cold-induced thioredoxin h of rice, OsTrx23, negatively regulates kinase activities of OsMPK3 and OsMPK6 *in vitro*[J]. *FEBS Letters*, 2009,**583**(17): 2 734-2 738.

[12] SWEAT T A, WOLPERT T J. Thioredoxin h5 is required for victorin sensitivity mediated by a CC-NBS-LRR gene in Arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2007,**19**(2): 673-687.

[13] PARK S C, JUNG Y J, KIM I R, *et al.* Functional characterization of thioredoxin h type 5 with antimicrobial activity from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017,**22**(2): 129-135.

[14] ZHANG C J, ZHAO B C, GE W N, *et al.* An apoplastic h-type thioredoxin is involved in the stress response through regulation of the apoplastic reactive oxygen species in rice[J]. *Plant Physiology*, 2011,**157**(4): 1 884-1 899.

[15] YING Y H, YUE W H, WANG S D, *et al.* Two h-type thioredoxins interact with the E2 ubiquitin conjugase PHO₂ to fine-tune phosphate homeostasis in rice[J]. *Plant Physiology*, 2017,**173**(1): 812-824.

[16] WONG J H, KIM Y B, REN P H, *et al.* Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**(25): 16 325-16 330.

[17] HÄGGLUND P, BJÖRNBERG O, NAVROT N, *et al.* The barley grain thioredoxin system-an update[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013,**4**: 151.

[18] LI Y C, REN J P, CHO M J, *et al.* The level of expression of thioredoxin is linked to fundamental properties and applications of wheat seeds [J]. *Molecular Plant*, 2009, **2**(3): 430-441.

[19] 徐 艳, 徐继法, 陈 磊, 等. 小麦 TILLING 突变体检测中基因组 DNA 提取方法的优化[J]. *麦类作物学报* 2017, **37**(2): 185-191.

XU Y, XU J F, CHEN L, *et al.* Optimization of genomic DNA extraction methods for mutant screen in a wheat TILLING population[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, **37**(2): 185-191.

[20] MATA-PÉREZ C, SPOEL S H. Thioredoxin-mediated redox signalling in plant immunity[J]. *Plant Science* 2019, **279**: 27-33.

(编辑:宋亚珍)