



邱涛涛,苏鸿飞,王瑜,等. 绿豆 *GPX* 基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):453-461.

QIU Taotao, SU Hongfei, WANG Yu, et al. Identification of the *GPX* gene family in *Vigna radiata* and its response to abiotic stress [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(3): 453-461.

绿豆 *GPX* 基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应

邱涛涛¹, 苏鸿飞¹, 王瑜¹, 张禾佳¹, 胡慧欣¹, 阮诗婷¹, 袁星星^{2*}, 谢彦杰^{1*}

(1.南京农业大学生命科学学院,江苏南京 210095;2.江苏省农业科学院经济作物研究所,江苏南京 210014)

摘要: [目的] 本文利用生物信息学方法从绿豆基因组中筛选谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, *GPX*) 基因家族成员,并探究其组织表达模式及其对若干胁迫的响应。[方法] 利用生物信息学的方法对绿豆 *GPX* 家族的等电点、相对分子质量、共线性、上游顺式作用元件等进行分析,通过转录组测序和 RT-qPCR 进一步分析绿豆 *GPX* 基因家族的组织表达模式以及在不同逆境胁迫和激素作用下的表达水平。[结果] 从绿豆基因组中筛选出 8 个 *GPX* 基因,其不均匀分布于 1/2/3/5/10 号染色体上。基因结构及基序分析结果显示,8 个 *GPX* 的基因结构类似,均含有 6 个内含子区域,并且大部分 *GPX* 成员都具有 UTR 区。转录组以及 RT-qPCR 分析结果表明,多个 *GPX* 家族成员均能响应多种逆境胁迫。组织表达分析结果显示,不同 *GPX* 家族成员在不同组织中呈特异性表达;*GPX* 家族整体在绿豆中表达丰度较低,但表达量能被各种胁迫强烈诱导。[结论] 绿豆 *GPX* 基因家族响应多种非生物胁迫,不同 *GPX* 成员响应的胁迫类型不同。

关键词: 绿豆; *GPX* 基因家族; 非生物胁迫; 基因表达

中图分类号: Q946.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)03-0453-09

Identification of the *GPX* gene family in *Vigna radiata* and its response to abiotic stress

QIU Taotao¹, SU Hongfei¹, WANG Yu¹, ZHANG Hejia¹, HU Huixin¹,
RUAN Shiting¹, YUAN Xingxing^{2*}, XIE Yanjie^{1*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Cash Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: [Objectives] This research used bioinformatics methods to screen and identify the *GPX* gene family in *Vigna radiata* (mung bean), and to explore its expression pattern and function in abiotic stress. [Methods] The isoelectric point, molecular weight, collinearity and *cis*-acting elements of the *GPX* gene family in mung bean were analyzed by bioinformatics methods. The expression patterns of the *GPX* gene family in mung bean and its expression levels under different abiotic stresses, and hormones were further analyzed by transcriptome data. Transcriptome sequencing and RT-qPCR were used to further analyze the tissue expression patterns and the expression levels of *GPX* gene family in *V. radiata* under different stress and hormones. [Results] Total of 8 *GPX* genes were identified in mung bean genome, which were unevenly distributed on chromosome 1/2/3/5/10. According to the gene structure and motif analysis, the eight *GPX* genes had similar structures, all containing six intronic regions, and most of the *GPX* members had UTR regions. Transcriptome and RT-qPCR analysis showed that multiple *GPX* members were able to respond to a variety of stress. Based on the expression of *GPX* in different tissues, different *GPX* members were specifically expressed in different tissues. *GPX* expression in mung bean was low and might be strongly induced under stress. [Conclusions] The *GPX* gene family of mung bean responded to a variety of abiotic stresses, and different *GPX* members responded to different types of stress.

Keywords: mung bean; *GPX* gene family; abiotic stress; gene expression

植物在生长发育的过程中会遭受到多种非生物胁迫的影响,导致植物活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累。一定浓度的 ROS 能够作为信号分子激活植物的抗逆信号转导,提高植物的抗逆能力,而过高浓度 ROS 会导致植物体内氧化还原平衡失调,对细胞产生毒害作用^[1-2]。GPX 是一种非血红素过氧化物酶,它能够以谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 或硫氧还蛋白 (thioredoxin reductase, TRX) 为还原剂,催化过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂)、有机过氧化氢氧化物以及脂质过氧化物还原生成水或相应的醇,从而维持

收稿日期: 2023-05-12

基金项目: 江苏省基础研究计划杰出青年基金项目 (BK20220084); 江苏省基础研究计划青年基金项目 (BK20200282)

* 通信作者: 谢彦杰, 教授, 研究方向为植物氧化还原信号转导, E-mail: yjxie@njau.edu.cn; 袁星星, 研究员, 研究方向为食用豆抗病虫新基因挖掘和新种质创制, E-mail: yxx@jaas.ac.cn。

植物体内 ROS 的平衡,保护细胞免受过高浓度 ROS 带来的毒害作用^[3-4]。

目前已经知道,几乎所有的真核生物基因组都含有 GPX 家族的编码基因。根据其器官分布、亚细胞定位以及活性保守位点等差异,GPX 在哺乳动物中共被分为 8 大类(GPX1—GPX8),其中 GPX1 以同源四聚体形式存在^[5]。根据 GPX 家族成员的蛋白质一级结构及进化关系推测,GPX1/2/3/5/6 可能源于同一个含有硒代半胱氨酸的祖先,它的结构可能与 GPX1 相似,且以四聚体的形式存在;而 GPX4/7/8 则可能是单体^[6-7]。植物中的 GPX 研究起步较晚。Criqui 等^[8]从烟草中分离鉴定到了第 1 个植物来源的 GPX,而后陆续在拟南芥^[9]、水稻^[10]、番茄^[11]等植物中发现了 GPX 同源基因。与动物 GPX 不同的是,植物 GPX 蛋白的活性位点为半胱氨酸(Cys),而动物中多为硒代半胱氨酸(seCys),这也可能是植物中 GPX 相比于动物中 GPX 活性更低的原因^[12]。大多数植物来源的 GPX 与动物 GPX4 高度同源。除了杨树 PtGPX5 通过疏水作用形成同源二聚体外,植物中已报道的 GPX 都以单体形式存在^[13-14]。

近几年来植物中 GPX 蛋白的相关研究较少,且研究方向多数集中于 GPX 与氧化还原以及 GPX 调控植物生长发育等方面。Yang 等^[15]研究表明,过表达菊花 *GPX1* 可以减少低温条件下活性氧(ROS)的积累,提高转基因菊花的抗寒性,此外,低温处理会降低菊花 GPX1 在 220 位赖氨酸的巴豆酰化水平。Rattanawong 等^[16]发现 ROS 对于水稻受精卵生长发育至关重要,受精卵和早期胚胎在 ROS 产生受到抑制后表现出发育停滞,*OsGPX1/3* 在此过程中起着重要作用。Lee 等^[17]发现人参皂苷 RE 通过上调 *GPX4* 减轻 6-羟多巴胺诱导的氧化应激。

GPX 在植物响应各类非生物胁迫的过程中也起着重要作用^[18]。Passaia 等^[19]通过构建 *AtGPX1-8* 的单突变体对拟南芥 GPX 家族的功能进行了初步探究,结果发现拟南芥 *gpx* 突变体的茎叶大小均与野生型相似,或仅有微小差异,而 *gpx* 突变体的根生长表型却发生明显变化。例如,*atgpx1/4/6/7/8* 突变体的侧根密度高于野生型,而 *atgpx2/3* 的侧根密度则显著低于野生型,这也暗示 AtGPX 介导的氧化还原控制在控制根形态中的重要性。Miao 等^[20]研究表明,拟南芥 AtGPX3 通过维持 H₂O₂ 的氧化还原稳态来传递氧化还原信号。同时,AtGPX3 与 ABA 信号转导中的关键蛋白 ABA INSENSITIVE1/2 (ABI1/2) 发生互作,激活质膜 Ca²⁺ 和 K⁺ 通道诱导的气孔关闭,从而参与 ABA 和干旱胁迫信号路径。在水稻中,*OsGPX3* 参与抗氧化防护、氧化还原稳态调节和 ABA 信号转导^[21]。Zhou 等^[22]报道 *OsGPX1* 能够通过乙酰化进入细胞核,并且通过自身所形成的二硫键将氧化信号传递给 *OsbZIP68* (basic region/leucine Zipper 68),进而转录调控下游一系列靶基因,实现渗透胁迫下的氧化还原信号传递。

绿豆是我国种植的主要食用豆类之一,在南亚、东亚及东南亚都有广泛种植,因其丰富的营养价值、独特的风味广受欢迎。近年来,由于世界气候逐步恶劣,极端天气频繁出现,由此所带来的冷害、高温、干旱等非生物胁迫对于作物产量的影响也愈来愈大,因此研究植物如何应对非生物胁迫以及如何提高植物对于非生物胁迫的抗性是有必要的。本研究从绿豆基因组中挖掘了绿豆 GPX 编码基因,研究其组织表达特异性以及在不同的胁迫和激素处理下的表达水平变化规律,为绿豆优质品种的选育提供思路,并且为深入研究绿豆 GPX 基因家族的生物学调控功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料和处理方法

绿豆品种‘苏绿一号’(*Vigna radiata*)由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。挑选饱满健康的绿豆种子,用 5% (体积分数) 的次氯酸钠消毒 30 min,灭菌水清洗干净后转移至垫有湿滤纸的培养皿中萌发,发芽 4 d 后将其转移至 1/2 Hoagland 营养液培养。整个培养过程在 25 ℃、光/暗培养时间 16 h/8 h、光照度 8 000 lx 的温室中进行。

将培养 10 d 后的绿豆幼苗用 PEG6000 (20%) 处理 24 h 模拟渗透胁迫;放置于 4 ℃ 培养箱中处理 24 h 模拟冷胁迫;用含有 100 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液处理模拟盐胁迫。在含有 100 μmol·L⁻¹ ABA、100 μmol·L⁻¹ 赤霉素 GA3 或 100 μmol·L⁻¹ MeJA 的 1/2 Hoagland 营养液中处理 24 h 模拟不同的激素处理。

1.2 绿豆 GPX 基因家族成员的鉴定

绿豆基因组数据及其蛋白数据均由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。从 Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) 网站上下载 GPX 结构域 (PF00255),通过 HMMER3.0 对‘苏绿一号’蛋白数据库进行筛

选,e-value 设置为 1×10^{-10} ,而后通过 SMART(<https://smart.embl.de/>)对候选成员蛋白结构进行第2次筛选,将通过2次筛选的候选成员作为绿豆 GPX 基因家族成员。

1.3 绿豆 GPX 基因家族系统进化树构建

利用 ClustalW 对绿豆 GPX 基因家族成员进行多序列比对,然后使用 MEGA X 软件通过邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育进化树,自展值(bootstrap)设置为 1 000。

1.4 绿豆 GPX 基因的染色体定位及其理化性质分析

利用 TBtools 软件和绿豆基因组数据、蛋白数据以及注释文件等,对绿豆 GPX 基因家族的 8 个基因进行染色体定位,并且利用 EXPASY(https://web.expasy.org/compute_pi/)对绿豆 GPX 蛋白的基础理化性质进行分析。

1.5 绿豆 GPX 基因家族结构及基序分析

根据现有的绿豆基因组注释信息,从绿豆基因组中检索 GPX 基因序列,以研究绿豆 GPX 基因家族的内含子、外显子结构。使用 MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)对绿豆 GPX 蛋白序列进行预测分析并利用 TBtools 进行可视化处理。

1.6 绿豆 GPX 基因家族顺式作用元件及共线性分析

通过现有的绿豆基因组数据及其注释文件,利用 TBtools 软件提取绿豆 GPX 基因家族成员上游 2 000 bp 的启动子序列,并在 PlantCARE 上进行预测分析。对于共线性分析,使用 TBtools 的 MScanX 对绿豆 GPX 基因家族及拟南芥进行分析并将结果进行可视化处理。

1.7 绿豆 GPX 蛋白磷酸化修饰的预测分析

将绿豆 GPX 蛋白序列提交至 GPS6.0(<http://gps.biocuckoo.cn/index.php>)并进行蛋白修饰的预测分析,阈值选择“高”。

1.8 绿豆 GPX 基因家族表达谱分析

对处理后的绿豆幼苗取样并送至广州基迪奥生物技术有限公司进行转录组测序,根据所得到的转录组数据将 Count 转化为 FPKM 值,再利用基迪奥(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/getsoft>)的热图工具进行表达热图的绘制,利用 Z-score 进行归一化处理并绘制热图。为了更直观地观察组织特异性表达谱,计算各组织 FPKM 的 $\log_2(\text{foldchange})$ 值,并绘图。

1.9 绿豆 GPX 基因 RT-qPCR 分析

使用 TRizol 对绿豆根部总 RNA 进行提取,使用 SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa)进行反转录并得到 cDNA,最后使用 cDNA 对 8 个 GPX 进行 RT-qPCR。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 绿豆 GPX 基因家族成员的鉴定及其理化性质分析

经过筛选从‘苏绿一号’中并鉴定出 8 个 GPX 家族基因,再依据它们的基因登录号将其分别命名为 GPX1—GPX8(表 1)。分析发现,8 个 GPX 不均匀地分布于 1、2、3、5 和 10 号染色体上,其中 1 号染色体上存在 3 个 GPX,10 号染色体存在 2 个 GPX,而 2、3、5 号染色体上均只含有 1 个 GPX(图 1)。通过基本理化性质分析发现,编码绿豆 GPX 家族成员可能的氨基酸数为 170~263,预测相对分子质量为 19 031~29 796。

表 1 绿豆 GPX 基因基本信息及其编码蛋白的理化性质

Table 1 Basic information of GPX gene and physicochemical properties of its encoded protein in *Vigna radiata*

基因名称 Gene name	基因登录号 Gene ID	染色体位置 Chromosome position	氨基酸残基数 Number of amino acid residues	相对分子质量 Relative molecular weight	等电点 pI	蛋白质疏水性 GRAVY
<i>VrGPX1</i>	EVM0003792	10	180	20 194	5.43	-0.439
<i>VrGPX2</i>	EVM0006272	1	171	19 473	4.98	-0.485
<i>VrGPX3</i>	EVM0007343	1	236	26 028	8.99	-0.281
<i>VrGPX4</i>	EVM0007687	10	170	19 097	5.11	-0.352
<i>VrGPX5</i>	EVM0022712	3	170	19 049	9.71	-0.329
<i>VrGPX6</i>	EVM0026713	2	170	19 031	9.44	-0.461
<i>VrGPX7</i>	EVM0032892	5	263	29 796	9.75	-0.329
<i>VrGPX8</i>	EVM0033862	1	198	22 580	6.61	-0.189

其中,相对分子质量最大的是 GPX7,最小的是 GPX6。绿豆 GPX 家族成员编码蛋白的等电点为 5.11~9.75,推断该家族中既存在酸性蛋白也存在碱性蛋白。蛋白质疏水性为-0.189~-0.485,显示绿豆 GPX 蛋白是一类亲水蛋白。

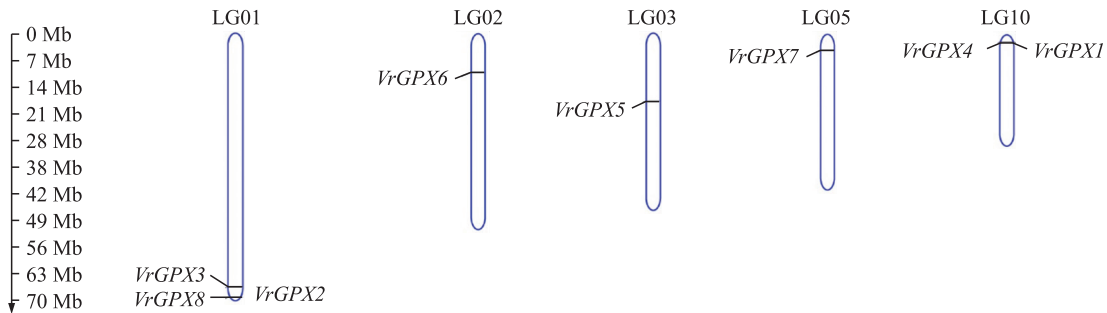


图1 GPX 基因在绿豆染色体上的定位分布

Fig. 1 Location and distribution of GPX genes on chromosomes of *V. radiata*

2.2 系统发育进化分析

系统发育进化树结果显示,拟南芥、水稻和绿豆 GPX 家族分为 5 个亚家族(图 2)。其中进化树主要出现了 2 个亚支, I—IV 亚家族位于一个亚支,而 V 亚家族则位于另一个亚支。除 V 亚家族外,3 个物种的 GPX 分布较为平均。其中,GPX5 和 GPX6 同属 III 亚家族,GPX1 和 GPX3 同属 IV 亚家族,它们亲缘关系非常近,因此推测可能在绿豆中的功能也较类似。另外, V 亚家族与其他 4 个亚家族差异较大,且其中不包含水稻 GPX,这可能是在物种进化中形成的一类特殊 GPX 蛋白,推测在绿豆和拟南芥中具有特殊功能。

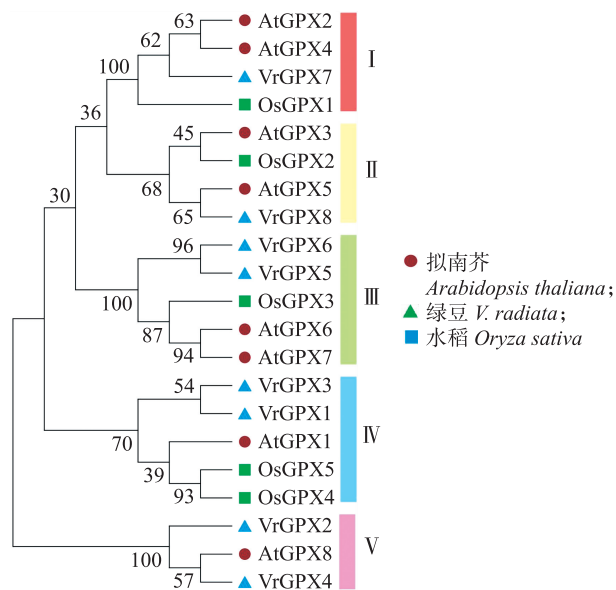


图2 绿豆、水稻和拟南芥 GPX 家族的系统进化树

Fig. 2 Integrated phylogenetic tree of GPX among *V. radiata*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*

2.3 GPX 蛋白和基因结构及 motif 分析

对绿豆 GPX 蛋白序列的基序(motif)分析可知(图 3),绿豆 GPX 家族成员所编码蛋白中共存在 16 种 motif,其中的 motif 1/2/3 是所有的绿豆 GPX 共有的 3 个基序,这与拟南芥及水稻中 GPX 家族基序数相似(除 AtGPX6),并且除绿豆 GPX1/4 以外,其余绿豆 GPX 都具有 motif 4 这一基序。此外,根据之前所划分的亚家族来看, I 亚家族中所有成员均具有 motif 9,这个结构是其他亚家族成员所不具备的, III 亚家族除 AtGPX6 外,其他 GPX 成员均由 motif 1/2/3/4 所组成,推测 III 亚家族的 GPX 可能具有相似功能。motif 20 则仅在 AtGPX4/5 中被发现,为拟南芥所独有的一类 motif。基因结构分析的结果显示,8 个绿豆 GPX 成员的内含子数量均为 6 个。除 GPX5 和 GPX3 之外,其余 GPX 成员都含有 5'及 3'UTR 区,这与拟南芥和水稻大多数 GPX 家族成员的情况类似。

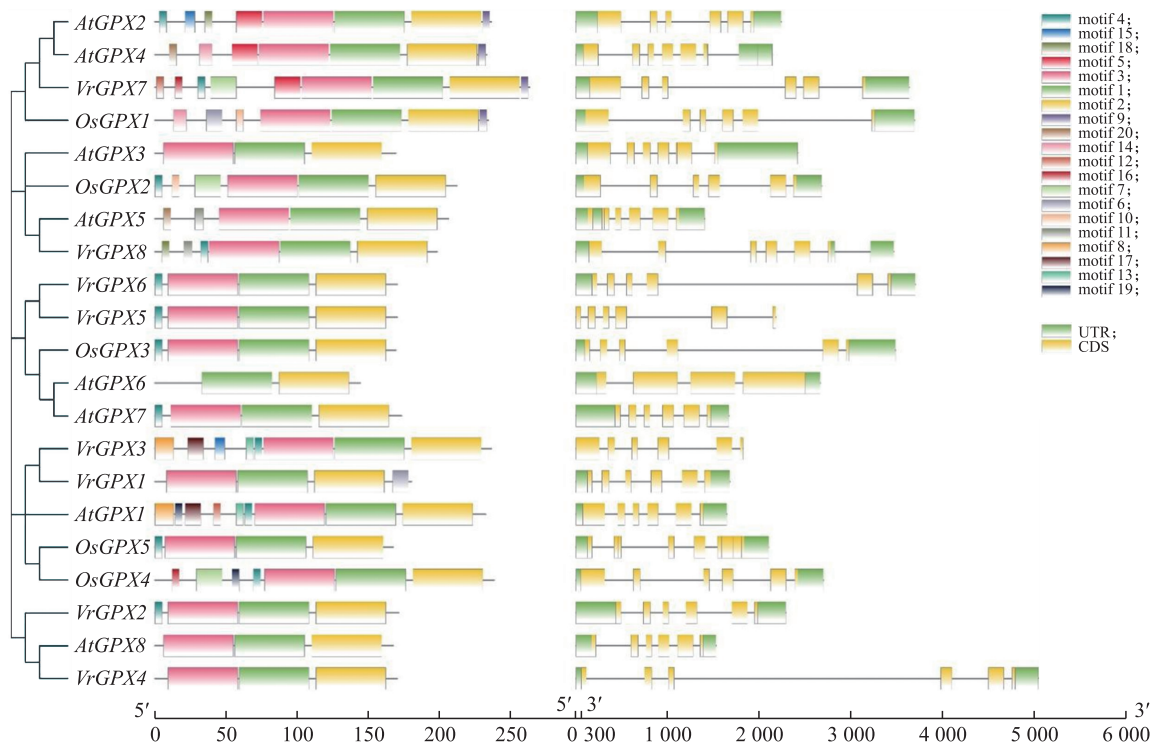


图 3 绿豆、水稻和拟南芥 *GPX* 基因结构及其所编码蛋白的基序

Fig. 3 Structure of *GPX* gene among *V. radiata*, *O. sativa* and *A. thaliana* and motif of its encoded protein

2.4 绿豆 *GPX* 基因家族共线性分析

共线性分析(图 4)后发现共有 10 对基因存在共线性关系,分别为 *VrGPX3* 与 *AtGPX6/8*、*VrGPX6* 与 *AtGPX4/5*、*VrGPX5* 与 *AtGPX4/5*、*VrGPX7* 与 *AtGPX4/7*、*VrGPX4* 与 *AtGPX6/8*。共线性关系说明其结构功能相似,可能由同一个祖先进化而来。

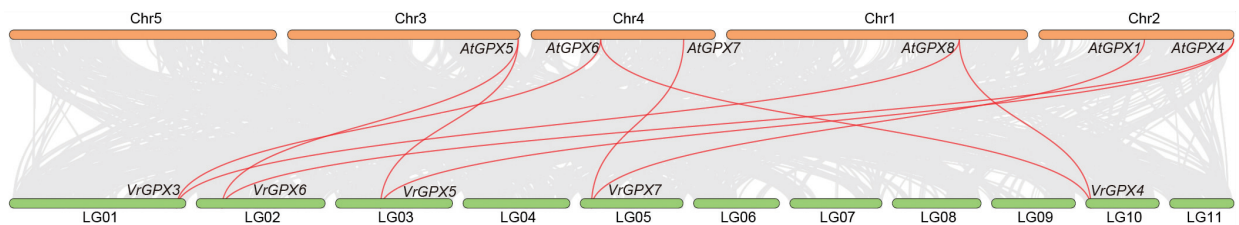


图 4 绿豆和拟南芥 *GPX* 基因间共线性关系

Fig. 4 The collinearity analysis of *GPX* genes between *V. radiata* and *A. thaliana*

2.5 绿豆 *GPX* 家族基因顺式作用元件分析

获取 *GPX* 起始密码子前 2 000 bp 作为 *GPX* 的启动子用于顺式作用元件分析(图 5)。在顺式作用元件分析中,顺式作用元件大致可分为 3 类,如生长发育相关顺式作用元件、胁迫响应相关顺式作用元件以及激素响应相关顺式作用元件。*GPX1/2/3* 启动子都含有 6~7 个 MeJA 响应元件,*GPX4* 启动子含有 6 个连续的 ABA 响应元件;*GPX5* 启动子包含 4 个低温胁迫相关顺式作用元件,这暗示 *GPX* 基因家族成员广泛参与多种胁迫和发育响应的相关信号。

2.6 绿豆 *GPX* 蛋白磷酸化修饰的预测分析

对绿豆 *GPX* 家族蛋白进行磷酸化修饰的预测(表 2)结果显示,*GPX1*—*GPX8* 均能发生磷酸化修饰。其中以酪氨酸激酶(tyrosine kinase,TK)催化酪氨酸磷酸化的概率分值较高且最为多见。除此之外,也可能存在以酪蛋白激酶 1(casein kinase 1,CK1)、AGC 蛋白激酶(protein kinase AGC,AGC)、鸟苷酸环化酶受体(receptor guanylate cyclases,RGC)和 CMGC 类蛋白激酶为激酶的磷酸化修饰。值得注意的是,这些发生修饰的氨基酸位点较为保守。例如,*GPX1* 的 50 位酪氨酸在 *GPX* 家族蛋白中高度保守,*GPX1/3/4/6/7/8* 的该位点均预测出存在 TK 催化的酪氨酸磷酸化修饰。

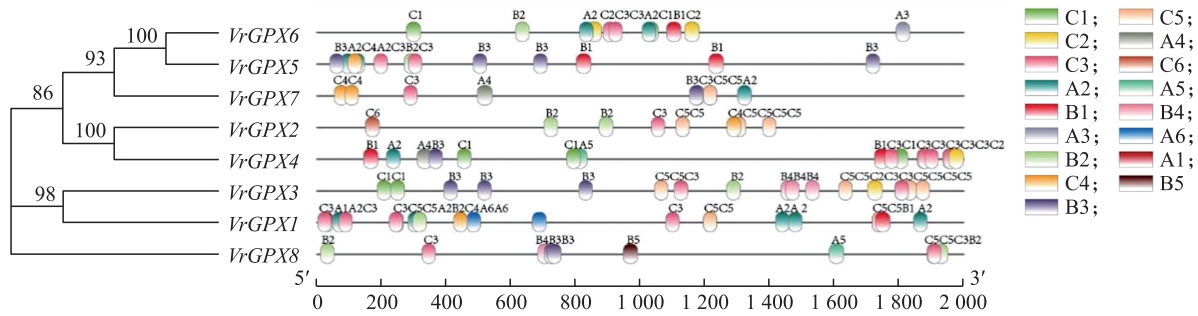


图 5 绿豆 GPX 基因启动子区域的顺式作用元件分析

Fig. 5 The *cis*-acting elements analysis of GPX promoter region in *V. radiata*

A. 生长发育相关顺式元件[A1. 启动子和增强子区的共同顺式作用元件;A2. 与分生组织表达相关的顺式作用元件;A3. MYBHv1 结合位点;A4. 富含 AT 的 DNA 结合蛋白(ATBP-1)结合位点;A5. 最大激发子介导的激活元件;A6. 参与胚乳表达的顺式作用元件];B. 低温干旱等胁迫相关顺式元件(B1. 参与防御与压力的顺式作用元件;B2. 结合 MYB 参与干旱胁迫响应顺式作用元件;B3. 厌氧诱导必需的顺式作用元件;B4. 参与低温响应调节的顺式作用元件;B5. 创伤响应元件);C. 激素响应相关顺式元件(C1. 赤霉素响应原件;C2. 参与赤霉素代谢调节的顺式作用元件;C3. 参与脱落酸响应的顺式作用元件;C4. 生长素响应相关顺式元件;C5. 参与茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件;C6. 参与赤霉素代谢调节的顺式作用元件)。

A. Growth and development related *cis* element [A1. Common *cis*-acting element in promoter and enhancer regions; A2. *cis*-acting regulatory element related to meristem expression; A3. MYBHv1 binding site; A4. Binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1); A5. Element for maximal elicitor-mediated activation; A6. *cis*-regulatory element involved in endosperm expression]; B. *cis*-acting elements related to stress such as low temperature and drought (B1. *cis*-acting element involved in defense and stress responsiveness; B2. MYB binding site involved in drought-inducibility; B3. *cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction; B4. *cis*-acting element involved in low-temperature responsiveness; B5. Wound-responsive element); C. *cis*-acting element involved in hormone (C1. Gibberellin-responsive element; C2. *cis*-acting element involved in salicylic acid responsiveness; C3. *cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness; C4. Auxin-responsive element; C5. *cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness; C6. *cis*-acting element involved in gibberellin-responsiveness).

表 2 绿豆 GPX 蛋白发生磷酸化修饰的预测分析

Table 2 Prediction of GPX protein phosphorylation modification in *V. radiata*

基因名称 Gene name	位置 Position	预测被磷酸化的残基 Predict phosphorylated residues	激酶 Kinase	预测肽 Peptide	分数 Score	阈值 Threshold
<i>VrGPX1</i>	7	T	CK1	MASQSNTKSSVHDF	0.377 0	0.099 6
<i>VrGPX1</i>	50	Y	TK	CGLTNSNYTELNQVY	0.996 1	0.897 0
<i>VrGPX1</i>	57	Y	TK	YTELNQVYDKYKGGK	0.968 9	0.897 0
<i>VrGPX1</i>	115	Y	TK	GDNAAPLYKFLKSSK	0.948 9	0.897 0
<i>VrGPX1</i>	149	Y	TK	DGNVVDRYAPTTSPL	0.901 0	0.897 0
<i>VrGPX2</i>	154	T	AGC	VDRYYPTTSPLSLER	0.049 1	0.047 8
<i>VrGPX3</i>	7	T	CK1	MLSSSTTRIFHITT	0.108 2	0.099 6
<i>VrGPX3</i>	73	T	CK1	RTDHTMATSSAKSVH	0.138 7	0.099 6
<i>VrGPX3</i>	178	S	CK1	KVDVNGDSADPLYKY	0.134 9	0.099 6
<i>VrGPX3</i>	118	Y	TK	CGLTNSNYTELSQLY	0.991 8	0.897 0
<i>VrGPX3</i>	183	Y	TK	GDSADPLYKYLKSSK	0.986 7	0.897 0
<i>VrGPX3</i>	217	Y	TK	EGKVVDRIYAPTTSPL	0.968 1	0.897 0
<i>VrGPX4</i>	110	S	CK1	DKIEVNGSNSAPLYK	0.164 8	0.099 6
<i>VrGPX4</i>	13	Y	TK	SKDPKSVYDFSVKDA	0.966 0	0.897 0
<i>VrGPX4</i>	51	Y	TK	CGLTNSNYTELNELY	0.987 6	0.897 0
<i>VrGPX4</i>	150	Y	TK	KGQVVGRYYPTTSPL	0.926 1	0.897 0
<i>VrGPX5</i>	8	S	CK1	MGASQSISENSIHEF	0.425 8	0.099 6
<i>VrGPX5</i>	11	S	CK1	SQSISENSIHEFTVK	0.354 1	0.099 6
<i>VrGPX5</i>	110	S	CK1	GKIRVNGSDSAPVFK	0.105 7	0.099 6
<i>VrGPX6</i>	55	T	AGC	NSNYTQLTELYSRYK	0.088 5	0.047 8
<i>VrGPX6</i>	8	S	CK1	MGAAESVSENSIHEF	0.272 3	0.099 6
<i>VrGPX6</i>	11	S	CK1	AESVSENSIHEFSVK	0.306 5	0.099 6
<i>VrGPX6</i>	155	S	RGC	KRYGPTTSPLSIEND	0.115 8	0.097 0
<i>VrGPX6</i>	51	Y	TK	CGFTNSNYTQTELY	0.957 3	0.897 0
<i>VrGPX7</i>	39	T	CMGC	AFSTTFFFTPLHDFTH	0.180 9	0.151 0
<i>VrGPX7</i>	107	Y	TK	AATEKTIYDFTVKDI	0.911 8	0.897 0
<i>VrGPX7</i>	145	Y	TK	CGLTSSNYSELSRLY	0.947 9	0.897 0
<i>VrGPX8</i>	184	S	CMGC	ERYAPTTSPLKIEKD	0.497 4	0.151 0
<i>VrGPX8</i>	184	S	RGC	ERYAPTTSPLKIEKD	0.120 3	0.097 0
<i>VrGPX8</i>	42	Y	TK	EQSSKSIYDFTVKDI	0.915 9	0.897 0
<i>VrGPX8</i>	80	Y	TK	CGLTQTNKYKELNVLY	0.967 9	0.897 0
<i>VrGPX8</i>	87	Y	TK	YKELNVLYDKYKNQG	0.938 0	0.897 0

注:TK:酪氨酸激酶 Tyrosine kinase;CK1:酪蛋白激酶 1 Casein kinase 1;AGC:AGC 蛋白激酶 Protein kinase AGC;RGC:鸟苷酸环化酶受体 Receptor guanylate cyclases;CMGC:CMGC 激酶 CMGC kinase.

2.7 绿豆 *GPX* 的组织特异性表达及不同胁迫和激素处理下的表达热图

为了探究 *GPX* 在绿豆中的表达模式,对‘苏绿一号’的根、茎、叶及根尖进行了转录组测序分析。结果(图 6-A)显示:*GPX3* 和 *GPX8* 的表达丰度在所有组织中均较高,因此推测它们具有重要的功能,但 *GPX* 家族整体表达丰度较低。*GPX* 基因家族各成员具有组织特异性表达的特点。例如:*GPX2/3* 在根中表达量较高,而在根尖中的表达量却较低;*GPX4* 仅在根尖中表达量较高,这或许代表着其在根尖生长或者根尖胁迫的感知中发挥一定作用。这说明 *GPX* 家族各成员可能在不同组织中发挥较为特异的功能。

进一步对绿豆进行不同胁迫和激素处理,再通过转录组测序比较研究 *GPX* 家族各成员的表达量变化。结果(图 6-B)显示:*GPX2/4/6* 的表达量在 PEG 导致的渗透胁迫下受到显著抑制,*GPX3/7* 则不受渗透胁迫的影响,而 *GPX8* 在渗透胁迫下表达量提高。*GPX7* 在盐胁迫处理下表达量显著提高,而其余的 *GPX* 成员无显著差异。ABA 处理不影响 *GPX3/6* 的表达量;*GPX2/4* 的表达在 ABA 处理下受到抑制,而 *GPX8* 则在 ABA 处理下受到明显诱导。在 ABA 处理下,*GPX7* 的表达量受显著抑制,这与 PEG 处理下的结果正好相反。

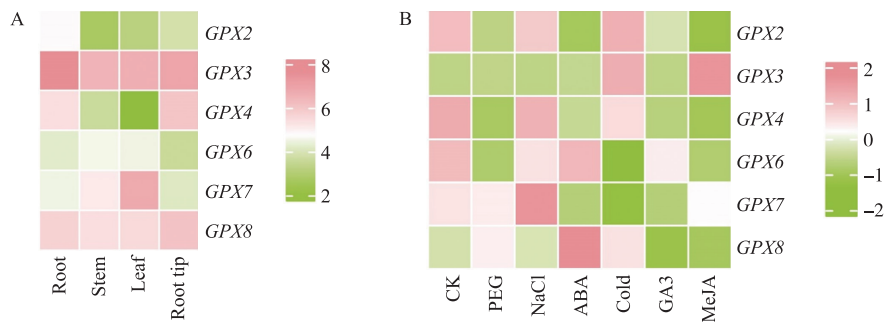


图 6 *VrGPX* 在不同组织(A)和不同处理(B)中的表达量

Fig. 6 Expression levels of *VrGPX* in different tissues(A) and treatments(B)

图 A 中的比例尺代表进行 $\log_2(\text{foldchange})$ 后的 FPKM 值;图 B 中的比例尺代表进行 Z-score 横向归一化后的 FPKM 值。

Scale bar in picture A represents FPKM values after $\log_2(\text{foldchange})$; Scale bar in picture B represents FPKM values after Z-score row normalization. CK: 对照组 Control group; PEG: 聚乙二醇处理组 PEG treatment group; NaCl: 氯化钠处理组 NaCl treatment group; ABA: 脱落酸处理组 ABA treatment group; Cold: 冷处理组 Cold treatment group; GA3: 赤霉素处理组 Gibberellin treatment group; MeJA: 茉莉酸甲酯处理组 Methyl jasmonate treatment group. 下同 The same as follows.

2.8 *GPX* 在不同胁迫和激素下的 RT-qPCR 分析

通过 RT-qPCR 对转录组数据进行验证。结果(图 7)表明,RT-qPCR 分析结果和转录组数据基本一致,其中,*GPX2/4/6* 在盐胁迫、渗透胁迫和 ABA 处理下的表达量均被极显著抑制。然而,*GPX3/7* 表达量受渗透胁迫、盐胁迫和 ABA 诱导,*GPX8* 的表达仅在渗透胁迫和 ABA 处理下稍有诱导。

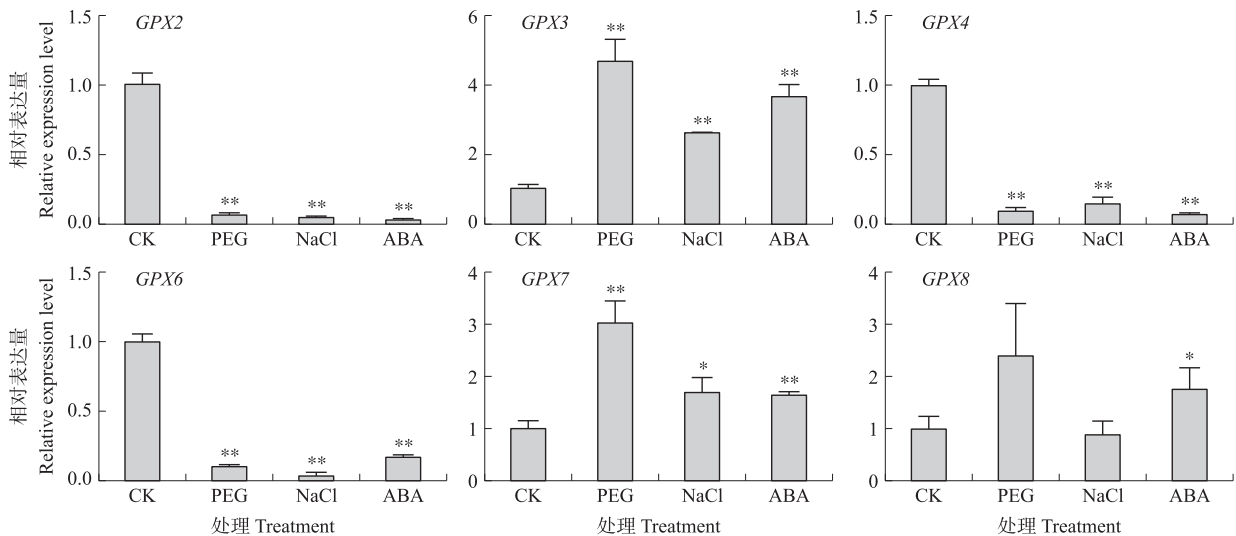


图 7 *GPX* 在不同胁迫处理下的 RT-qPCR 表达分析

Fig. 7 RT-qPCR expression analysis of *GPX* under different stress treatments

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

本研究在绿豆基因组中共挖掘到 8 个 *GPX* 基因家族成员,并将其依次命名为 *GPX1—GPX8*。由于 *GPX* 家族功能研究的结果主要集中于模式植物水稻和拟南芥中,因此本研究中仅参考了水稻和拟南芥的研究结果并构建绿豆 *GPX* 家族的蛋白系统发育进化树,以期为绿豆 *GPX* 蛋白功能推测提供一定参考。本研究中,同源性较高 *GPX* 家族成员的表达模式存在明显差异,这也说明 *GPX* 基因表达模式与其蛋白系统发育进化无关。此外对绿豆 *GPX* 蛋白翻译后修饰进行预测,发现 *GPX1—GPX8* 均预测能够发生磷酸化修饰,且部分修饰位点存在保守性,因此推测 *GPX* 特定位点磷酸化可能对其蛋白功能或活性有着重要影响。本研究还对泛素化修饰及依赖于组蛋白乙酰转移酶 1 的乙酰化修饰进行预测,结果显示 *GPX* 蛋白不发生这 2 类修饰。

GPX 基因上游区域含有大量的关于胁迫响应、激素响应以及转录因子结合的元件,这说明 *GPX* 基因家族可能是一个抗逆和生长发育相关的基因家族^[23]。通过转录组分析可知,*GPX2/3* 在 MeJA 处理下有明显响应,同时 *GPX2/3* 启动子区域都含有大量的 MeJA 响应元件,说明 MeJA 很可能通过这些响应元件抑制 *GPX2/3* 转录^[24]。*GPX4* 的表达在渗透胁迫和 ABA 处理下受到强烈抑制,同时其启动子有 6 个连续的 ABA 响应元件,因此推测 *GPX4* 在渗透胁迫下的大幅抑制很可能与 ABA 的转录调控途径有关^[25]。*GPX6* 虽然在渗透胁迫下也有响应,但是其在 ABA 处理下不被诱导表达。Zhou 等^[22] 研究表明,*OsGPX1* 能够响应渗透胁迫,但是对于盐胁迫以及 ABA 处理没有任何的响应。作为与 *OsGPX1* 表达模式极其相似的同源蛋白,推测 *GPX6* 在绿豆中也发挥相似的功能,这值得后续深入研究。此外,Gaber 等^[26] 发现敲除 *AtGPX8* 使得拟南芥在热胁迫下的生存率显著降低,热胁迫下突变体植物细胞中丙二醛含量和蛋白质氧化水平显著升高;*AtGPX8* 能够响应 ABA 处理以及甘露醇所模拟的渗透胁迫。绿豆 *GPX2/4* 与 *AtGPX8* 的亲缘关系较近,并且绿豆 *GPX2/4* 也能响应 ABA 和渗透胁迫,在这 2 种处理下的表达变化趋势也是一致的,因此猜测 *GPX2/4* 在绿豆中可能具有与 *AtGPX8* 相似的功能^[20,27]。

综上,本研究利用生物信息学的方法共筛选到 8 个绿豆 *GPX* 基因,通过转录组测序以及 RT-qPCR 对 *GPX* 的组织表达及胁迫和激素响应进行研究,研究结果为绿豆 *GPX* 基因家族的生物学功能研究提供了前期基础。然而,绿豆的基因功能研究体系还有待完善,目前很难在绿豆中构建突变体和过表达材料,因此关于绿豆 *GPX* 蛋白功能及其响应抗逆信号的分子机制与途径还需后续进一步研究。

参考文献 References:

- [1] Nadarajah K K. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(15): 5208.
- [2] Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 209–236.
- [3] Zhao L N, Zong W S, Zhang H, et al. Kidney toxicity and response of selenium containing protein-glutathione peroxidase (Gpx3) to CdTe QDs on different levels[J]. Toxicological Sciences, 2019, 168(1): 201–208.
- [4] Mittler R, Zandalinas S I, Fichman Y, et al. Reactive oxygen species signaling in plant stress responses[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23: 663–679.
- [5] Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution[J]. European Journal of Biochemistry, 1983, 133(1): 51–69.
- [6] Toppo S, Vanin S, Bosello V, et al. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2008, 10(9): 1501–1514.
- [7] Margis R, Dunand C, Teixeira F K, et al. Glutathione peroxidase family: an evolutionary overview[J]. The FEBS Journal, 2008, 275(15): 3959–3970.
- [8] Criqui M C, Jamet E, Parmentier Y, et al. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18(3): 623–627.
- [9] Sugimoto M, Sakamoto W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress[J]. Genes & Genetic Systems, 1997, 72(5): 311–316.
- [10] Li W J, Feng H, Fan J H, et al. Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1493(1/2): 225–230.
- [11] Depège N, Drevet J, Boyer N. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 253(2): 445–451.
- [12] Hazebrouck S, Camoin L, Faltin Z, et al. Substituting selenocysteine for catalytic cysteine 41 enhances enzymatic activity of plant phospholipid

- hydroperoxide glutathione peroxidase expressed in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry,2000,275(37):28715–28721.
- [13] Koh C S,Didierjean C,Navrot N,et al. Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes[J]. Journal of Molecular Biology,2007,370(3):512–529.
- [14] 乔新荣,张继英. 植物谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)研究进展[J]. 生物技术通报,2016,32(9):7–13.
Qiao X R,Zhang J Y. Research progress on GPX in plants[J]. Biotechnology Bulletin,2016,32(9):7–13(in Chinese with English abstract).
- [15] Yang X H,Lin P,Luo Y C,et al. Lysine decrotonylation of glutathione peroxidase at lysine 220 site increases glutathione peroxidase activity to resist cold stress in chrysanthemum[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2022,232:113295.
- [16] Rattanawong K,Koiso N,Toda E,et al. Regulatory functions of ROS dynamics via glutathione metabolism and glutathione peroxidase activity in developing rice zygote[J]. The Plant Journal,2021,108(4):1097–1115.
- [17] Lee G H, Lee W J, Hur J, et al. Ginsenoside Re mitigates 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress through upregulation of GPX4[J]. Molecules,2020,25(1):188.
- [18] Gill S S,Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2010,48(12):909–930.
- [19] Passaia G,Queval G,Bai J,et al. The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany,2014,65(5):1403–1413.
- [20] Miao Y C,Lv D,Wang P C,et al. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses[J]. The Plant Cell,2006,18(10):2749–2766.
- [21] Passaia G,Fonini L S,Caverzan A,et al. The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice[J]. Plant Science,2013,208:93–101.
- [22] Zhou H,Zhang F,Zhai F C,et al. Rice GLUTATHIONE PEROXIDASE1-mediated oxidation of bZIP68 positively regulates ABA-independent osmotic stress signaling[J]. Molecular Plant,2022,15(4):651–670.
- [23] Passaia G,Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells[J]. Plant Science,2015,234:22–26.
- [24] Modesti M,Petriccione M,Forniti R,et al. Methyl jasmonate and ozone affect the antioxidant system and the quality of wine grape during postharvest partial dehydration[J]. Food Research International,2018,112:369–377.
- [25] Chen K,Li G J,Bressan R A,et al. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2020,62(1):25–54.
- [26] Gaber A,Ogata T,Maruta T,et al. The involvement of *Arabidopsis* glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol[J]. Plant and Cell Physiology,2012,53(9):1596–1606.
- [27] Sui W T,Guo K Y,Li L,et al. *Arabidopsis* Ca²⁺-dependent nuclease AtCaN2 plays a negative role in plant responses to salt stress[J]. Plant Science,2019,281:213–222.

责任编辑:刘怡辰