

引用格式: 齐佩运, 谢雨煊, 许采妮, 等. 牡丹 *PsTRX1* 基因在高温胁迫响应中的表达特性及功能分析[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(5): 1014–1024. QI Peiyun, XIE Yuxuan, XU Caini, *et al.* Expression characteristics and functional analysis of *PsTRX1* gene in *Paeonia suffruticosa* in response to high temperature stress[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(5): 1014–1024.

牡丹 *PsTRX1* 基因在高温胁迫响应中的 表达特性及功能分析

齐佩运, 谢雨煊, 许采妮, 王千千, 朱向涛, 陈霞

(浙江农林大学 园艺科学学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】研究牡丹 *Paeonia suffruticosa* *PsTRX1* 基因在高温胁迫后在不同组织中的表达特征及在高温胁迫应答过程中的功能。【方法】①对牡丹 *PsTRX1* 基因进行多序列对比及系统发育树分析; ②对牡丹 *PsTRX1* 基因进行亚细胞定位分析; ③以高温处理的牡丹为材料进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析, 测定 *PsTRX1* 基因在牡丹高温处理后的表达量; ④在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中异源过表达 *PsTRX1* 基因, 对过表达和野生型植株进行高温处理, 结合表型分析和生理指标测定, 明确 *PsTRX1* 基因在高温胁迫响应中的作用。【结果】①系统发育树表明: 牡丹 *PsTRX1* 蛋白属于硫氧还蛋白家族。多序列对比结果显示: *PsTRX1* 蛋白序列包含 1 个硫氧还蛋白保守结构域和 1 个 WCGPC 基序; ②亚细胞定位结果显示: 牡丹 *PsTRX1* 蛋白定位于叶绿体中; ③RT-qPCR 结果显示: 高温胁迫后, *PsTRX1* 基因在茎、叶和叶柄中快速响应热胁迫, 表明 *PsTRX1* 基因的表达受热处理诱导; ④在高温胁迫下, *PsTRX1* 基因过表达株系相比于野生型植株, 表现为生长状态更佳, 叶绿素质量分数更高, 丙二醛 (MDA) 和过氧化氢 (H_2O_2) 质量摩尔浓度较低, 同时抗氧化酶 [超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)] 活性显著增强 ($P < 0.05$), 叶绿素荧光值的下降幅度也明显减小。【结论】*PsTRX1* 基因正向调控植物耐热性。图 8 表 2 参 35

关键词: 牡丹; 高温胁迫; *PsTRX1* 基因; 表达模式分析; 过表达

中图分类号: S68

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2025)05-1014-11

Expression characteristics and functional analysis of *PsTRX1* gene in *Paeonia suffruticosa* in response to high temperature stress

QI Peiyun, XIE Yuxuan, XU Caini, WANG Qianqian, ZHU Xiangtao, CHEN Xia

(College of Horticulture Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the expression patterns of the *PsTRX1* gene in various tissues of *Paeonia suffruticosa* (peony) under heat stress and its function in response to high temperature stress. [Method] (1) Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of the *PsTRX1* gene in *P. suffruticosa* were conducted. (2) Subcellular localization of the *PsTRX1* gene was experimentally determined. (3) RT-qPCR was performed on *P. suffruticosa* treated with high temperature to quantify the expression dynamics of *PsTRX1* under heat stress. (4) Heterologous overexpression of *PsTRX1* in *Arabidopsis thaliana* was carried out, and high temperature treatment was applied to both overexpressed and wild-type (WT) plants. Through phenotypic analysis and physiological index measurement, the role of *PsTRX1* in response to high-temperature stress was clarified. [Result] (1) The phylogenetic tree revealed that the *PsTRX1* protein of *P. suffruticosa* belonged to

收稿日期: 2025-08-25; 修回日期: 2025-10-05

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (32372742)

作者简介: 齐佩运 (ORCID: 0009-0001-1791-391X), 从事植物耐热机制方面的研究。E-mail: 2023614022034@stu.zafu.edu.cn。通信作者: 陈霞 (ORCID: 0000-0002-9815-5419), 副教授, 博士, 从事热带作物、园林植物种质资源及遗传改良研究。E-mail: cx2912@zafu.edu.cn

the thioredoxin family. Multiple sequence alignment results showed that the *PsTRX1* protein sequence contained one conserved thioredoxin domain and one WCGPC motif. (2) Subcellular localization results demonstrated that the *PsTRX1* protein was localized in the chloroplasts. (3) RT-qPCR analysis indicated that under high-temperature stress, the *PsTRX1* gene rapidly responded to the heat stress in stems, leaves, and petioles, indicating that the expression of the *PsTRX1* gene was induced by the heat treatment. (4) Under high temperature stress, compared with WT plants, the overexpressed *PsTRX1* gene lines exhibited better growth conditions, higher chlorophyll content, lower contents of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2), significantly enhanced activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD). The decrease in chlorophyll fluorescence value was also significantly reduced. [Conclusion] The *PsTRX1* gene positively regulates heat tolerance of plants. [Ch, 8 fig. 2 tab. 35 ref.]

Key words: *Paeonia suffruticosa*; high temperature stress; *PsTRX1* gene; expression pattern analysis; overexpression

高温是影响植物生长的重要环境因子, 高温胁迫可以对植物的生长发育造成不可弥补的损害^[1]。牡丹 *Paeonia suffruticosa* 属于芍药科 *Paeoniaceae* 芍药属 *Paeonia* 多年生落叶灌木。作为中国传统名花, 牡丹不仅具有深厚的文化底蕴, 还具有极高的观赏价值和经济价值。牡丹在长期栽培过程中形成了中原牡丹品种群、西北牡丹品种群、西南牡丹品种群和江南牡丹品种群^[2]。江南牡丹品种群具有较强的耐热耐湿能力, 但江南地区长期高温的气候会导致牡丹叶片发生卷曲萎蔫, 致使江南牡丹品种群病虫害增多, 观赏品质下降^[2]。‘凤丹’ *P. suffruticosa* ‘Feng Dan’ 为江南牡丹品种群的主要品种之一, 具有突出耐热性, 但其耐热机制仍不清楚。因此, 选取‘凤丹’作为研究对象, 解析其在高温胁迫下的响应机制, 对于增强牡丹在江南地区的栽培适应性及拓展其景观应用具有重要的理论意义。

硫氧还蛋白 (TRX) 是介导细胞活性氧 (ROS) 控制的主要相关蛋白之一, 由瑞典科学家在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 体内首次发现并提取, 具有保守的 WC[G/P]PC 基序。该基序参与靶蛋白的硫醇/二硫化物交换, 可以还原目标底物以直接调节靶蛋白的活性^[3-5]。TRX 可以与抗氧化酶结合, 以氧化还原依赖性方式, 帮助维持细胞中的全局氧化还原环境, 防止细胞内活性氧过量积累的氧化损伤并参与细胞内信号通路^[6-7]。根据序列相似性、细胞内定位和分子功能, 典型 TRX 家族被分为 7 种类型: f、m、h、o、x、y 和 z, 位于叶绿体、线粒体和胞质溶胶等亚细胞区室中^[8]。研究发现: TRX 蛋白在非生物胁迫应答中起重要作用。*AtTrxh3* 不仅具有氧化还原功能, 还可以提高过表达拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的耐热性^[9]。大麦 *Hordeum vulgare* *Trxs* 基因可以使大麦抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT) 等抗氧化酶活性增强, 缓解根系蛋白质和膜脂的氧化损伤, 提高大麦对铝胁迫的抗性^[10]。辣椒 *Capsicum annuum* *CaTRXh* 家族成员通过形成蛋白质复合物, 在细胞中响应高温应激并发挥保护作用^[6]。拟南芥中的 TRX 及其同源蛋白可通过控制体内各种光合作用相关蛋白的氧化还原状态来协调叶绿体功能^[11]。核氧还蛋白最初在玉米 *Zea mays* 细胞核中被发现并命名, 番茄 *Lycopersicon esculentum* 中的核氧还蛋白是热应激耐受性的正调节因子, 它分别通过提高抗氧化能力和诱导 *HSP* 等热响应基因来保护细胞免受热应激诱导的氧化损伤和蛋白质变性^[12-13]。尽管 TRX 基因在多种植物中参与非生物胁迫过程, 但是 TRX 基因在牡丹耐热性中的功能尚未见报道。

因此, 本研究以‘凤丹’高温胁迫转录组筛选获得的关键 *PsTRX1* 基因为研究对象, 构建了 *PsTRX1* 转基因拟南芥株系, 通过潮霉素筛选获得 T_3 代纯合的阳性 *PsTRX1* 转基因拟南芥, 通过表型观察、生理指标检测及抗氧化酶活性分析, 系统探究 *PsTRX1* 在植物耐热性中的调控作用, 为牡丹在江南高温高湿环境下的栽培应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的牡丹品种‘凤丹’来自浙江农林大学暨阳学院实习实训基地。将试验组植株置于 40 °C

高温条件下处理,培养环境设置为:相对湿度70%,光照强度8 000 lx,光周期14 h(光照)/10 h(黑暗)。分别于高温处理的0、6、12、24和48 h进行取样,采集根、茎、叶、叶柄等部位,经液氮速冻后置于-80 ℃超低温冰箱中保存。

本研究使用的拟南芥为哥伦比亚野生型,用于过表达,烟草为本氏烟草 *Nicotiana benthamiana*,用于亚细胞定位。过表达拟南芥和亚细胞定位载体为 PHB-X-YFP,由浙江中医药大学周伟教授团队惠赠。大肠埃希菌 DH5 α 、农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 购自上海唯地生物公司。

1.2 方法

1.2.1 *PsTRX1* 基因生物信息学分析 使用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库进行蛋白序列对比,获取相关同源序列后,通过 MEGA 11.0 软件将 *PsTRX1* 蛋白序列与得到的同源序列采用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树,自展值 (bootstrap) 设置为 1 000 次,评估其进化关系。进一步利用 DNAMAN 9.0 软件进行多序列对比及同源性分析,同时利用 NCBI-CD 网站 [NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)] 对蛋白的保守结构域进行功能分析与鉴定。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的获得 使用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441) 提取样本 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳 (条件:400 mA,180 V,8 min) 确认条带清晰、无降解后,使用 Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒 (AG11707) 将 RNA 反转录为 cDNA。具体参考试剂说明书。

1.2.3 *PsTRX1* 基因克隆与 PHB-*PsTRX1*-YFP 载体构建 使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒 (C112-02) 将带有 *Bam*HI 和 *Bcl*II 酶切位点和部分 PHB-X-YFP 序列的 *PsTRX1* 基因片段与载体大片段按比例进行同源重组构建 PHB-*PsTRX1*-YFP 表达载体,反应条件为 37 ℃ 30 min。将重组质粒转入农杆菌 GV3101 感受态细胞,保存于-80 ℃。

1.2.4 亚细胞定位 将 PHB-*PsTRX1*-YFP 融合表达载体和空载体质粒的农杆菌各取 200 μ L,接种至 200 mL 含有利福平 (Rif) 和卡那霉素 (Kana) 的 LB 液体培养液中,于 28 ℃,200 $r \cdot min^{-1}$ 摇菌 12~16 h;收集菌体沉淀,使用侵染液重悬至 600 nm 处吸光度为 0.6,于 28 ℃ 静置 2 h;选取生长 28 d,叶片嫩绿且完全展开的本氏烟草,将菌液注射进叶片进行瞬时表达,每个处理重复 3 片。将注射过的烟草黑暗处理 24 h,置于正常光照环境下培养 48 h 后制片,使用激光共聚焦显微镜观察黄色荧光蛋白 (YFP) 荧光信号,分析 *PsTRX1* 蛋白的亚细胞定位。

1.2.5 牡丹 *PsTRX1* 基因表达分析 使用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,以 40 ℃ 高温处理 0、6、12、24、48 h 的‘风丹’根、茎、叶、叶柄部位的 cDNA 为模板,使用 2 $\times$ Q3 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒,以 *PsUbiquitin* 为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 *PsTRX1* 基因的相对表达量。聚合酶链式反应运行程序:50 ℃ 2 min;95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。

1.2.6 *PsTRX1* 转基因拟南芥种子的获得 利用花序侵染法转化拟南芥。试验前剪去拟南芥的种荚,每个花序浸泡 30 s。侵染完植株侧倒放置,保鲜膜包裹,室温下黑暗处理 24 h 后正常培养,7 d 后进行第 2 次侵染,步骤同上。待侵染的拟南芥植株种子成熟时,混合收种标记为 T₀,去除杂质置于适宜环境保存。

将 T₀ 种子消毒,播于含有 20 mg $\cdot$ L⁻¹ 潮霉素和 30 g $\cdot$ L⁻¹ 蔗糖的 1/2 MS 抗性培养基上,置于光周期 16 h 光照/8 h 黑暗,23 ℃ 条件下培养 7 d 后,将生根并健壮生长的 T₁ 代幼苗移植到土壤中,期间提取转基因苗的 DNA 为模板,使用 PHB-F/R 引物 (表 1) 进行阳性鉴定,得到目标条带的即为 T₁ 代阳性株系并标记。收取 T₁ 代阳性株系的种子,播于筛选培养基,种子正常生长得到的苗为 T₂ 代 (分离比 3:1),分株收集 T₂ 代种子并标记。用同样的方式筛选至 T₃ 代即获得纯合转基因拟南芥株系。

1.2.7 高温胁迫下牡丹 *PsTRX1* 过表达拟南芥株系表型测定 将 *PsTRX1* 转基因 T₃ 代拟南芥种子消毒,播于种子筛选培养基上,培养 14 d 后移栽至栽培基质中,置于人工气候箱培养至植株抽薹前,40 ℃ 高温处理 2 d。处理前后分别拍照并取样,样品保存于-80 ℃超低温冰箱。

1.2.8 高温胁迫下牡丹 *PsTRX1* 过表达拟南芥株系叶绿素测定 称取新鲜叶片 0.02 g,剪细后放入 10 mL 试管中,加入 10 mL *V*(无水乙醇):*V*(丙酮) 为 1:1 的混合液,室温下黑暗浸泡 2~3 d,浸泡至叶片呈无色或白色,最后用无水乙醇定容至 10 mL。取 96 孔板,吸取待测液加入,测定各处理组的叶绿素浸提液在波长 663 和 645 nm 处的吸光度 [*D*(663)] 和 [*D*(645)],每个处理重复 3 次。计算公式如下:叶绿素

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences		
引物	序列(5'→3')	用途
<i>Ubiquitin</i> -F	GACCTATACCAAGCCGAAG	内参
<i>Ubiquitin</i> -R	CGTTCCAGCACCACAATC	内参
<i>PsTRX1</i> -dl-F	ATCCATCACTGCAACCTCCG	RT-qPCR
<i>PsTRX1</i> -dl-R	ACCTCTCTACGACTACCGAT	RT-qPCR
PHB- <i>PsTRX1</i> -F	CTCAAGCTTGGATCCATGGCCACTGTACTAGAATCCTTAGTT	克隆
PHB- <i>PsTRX1</i> -R	GCCCTTGCTCACCATACTAGTCAAGAATTTCTCTATACAGGTGGTCAA	克隆
PHB-F	GTGATATCTCCACTGACGTAAGGG	阳性鉴定
PHB-R	ACCCTGAAGTTCATCTGCACCA	阳性鉴定

a 质量分数 = $[12.7D(663) - 2.69D(645)] \times [V / (1\,000 \times m)]$; 叶绿素 b 质量分数 = $[22.9D(645) - 4.68D(663)] \times [V / (1\,000 \times m)]$; 叶绿素总质量分数 = 叶绿素 a 质量分数 + 叶绿素 b 质量分数。其中: $D(645)$ 、 $D(663)$ 分别为波长 645、663 nm 下的吸光度; V 为待测液的体积 (mL); m 为叶片鲜质量 (g) 或叶面积 (cm²)。

1.2.9 高温胁迫下牡丹 *PsTRX1* 过表达拟南芥株系生理生化指标测定 过氧化氢 (H₂O₂)、丙二醛 (MDA) 质量摩尔浓度, 过氧化氢酶、过氧化物酶 (POD) 与超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均采用苏州格锐思生物有限公司试剂盒进行测定。步骤参考说明书。

1.2.10 高温胁迫下牡丹 *PsTRX1* 过表达拟南芥株系叶绿素荧光的测定 使用多功能植物效率分析仪 M-PEA 测定高温胁迫处理 0 和 2 d 的野生型和转基因株系的即时荧光 (PF)、延迟荧光 (DF) 和调制反射 (MR) 动力学曲线, 测定前对叶片进行 20~30 min 黑暗处理, 每组转基因株系选取 3 片大小相近的叶片作为重复, 使用叶绿素荧光动力学曲线 (JIP-test) 分析相关的叶绿素荧光参数。曲线中最小荧光 (F_0) 至最大荧光 (F_m) 的积分面积的物理含义是关闭植物所有反应中心所需能量的量度, 反映了使还原侧电子受体 (QA) 完全被还原, 即变成初级电子受体 (QA⁻) 所需要的能量。电子从 QA⁻ 进入电子传递链越多, 则到达 F_m 所需要的时间就越长, F_0 至 F_m 的积分面积也越大。反之, 当植物受到损伤时, F_0 至 F_m 的积分面积也越小。

1.3 数据处理

使用 SPSS 25.0 对数据进行单因素方差分析及方差检验, 并借助 GraphPad Prism 9.0 进行数据整理与绘图。

2 结果与分析

2.1 牡丹 *PsTRX1* 生物信息学分析

通过 Blast 分析比对 *PsTRX1* 蛋白序列的同源序列, 将比对的蛋白采用邻接法构建系统进化树, 自展值设定为 1 000。结果显示: *PsTRX1* 蛋白与木姜叶柯 *Lithocarpus litseifolius* 和番石榴 *Psidium guajava* 的 *TRX1* 蛋白亲缘关系最近, 同源性最高 (图 1)。

为进一步分析其保守结构域, 利用 DNAMAN 9.0 将该基因的蛋白序列与木姜叶柯、番石榴、皂皮树 *Quillaja saponaria*、翅芝麻 *Sesamum alatum*、中华猕猴桃 *Actinidia chinensis*、杨梅 *Morella rubra*、向日葵 *Helianthus annuus*、紫花风铃木 *Handroanthus impetiginosus* 及大花五桠果 *Dillenia turbinata* 的 *TRX* 蛋白序列进行多序列对比, 并根据 NCBI 网站的 CD-Search 分析其保守结构域和保守基序。结果显示: *PsTRX1* 蛋白序列含有 1 个特征性的 WCGPC 基序和 1 个典型的硫氧还蛋白结构域 (图 2)。

2.2 牡丹 *PsTRX1* 基因启动子顺式作用元件分析

从牡丹基因组中获得牡丹 *PsTRX1* 基因转录起始位点上游的 2 000 bp 基因序列, 并作为其启动子序列。在 PlantCARE 在线工具中分析了 *PsTRX1* 基因启动子的顺式元件。由表 2 可知: *PsTRX1* 基因的启动子富含胁迫相关元件。

2.3 牡丹 *PsTRX1* 蛋白亚细胞定位

将 PHB-*TRX1*-YFP 融合载体和空载体质粒分别转化至农杆菌, 并注射进烟草叶片中进行瞬时表达。

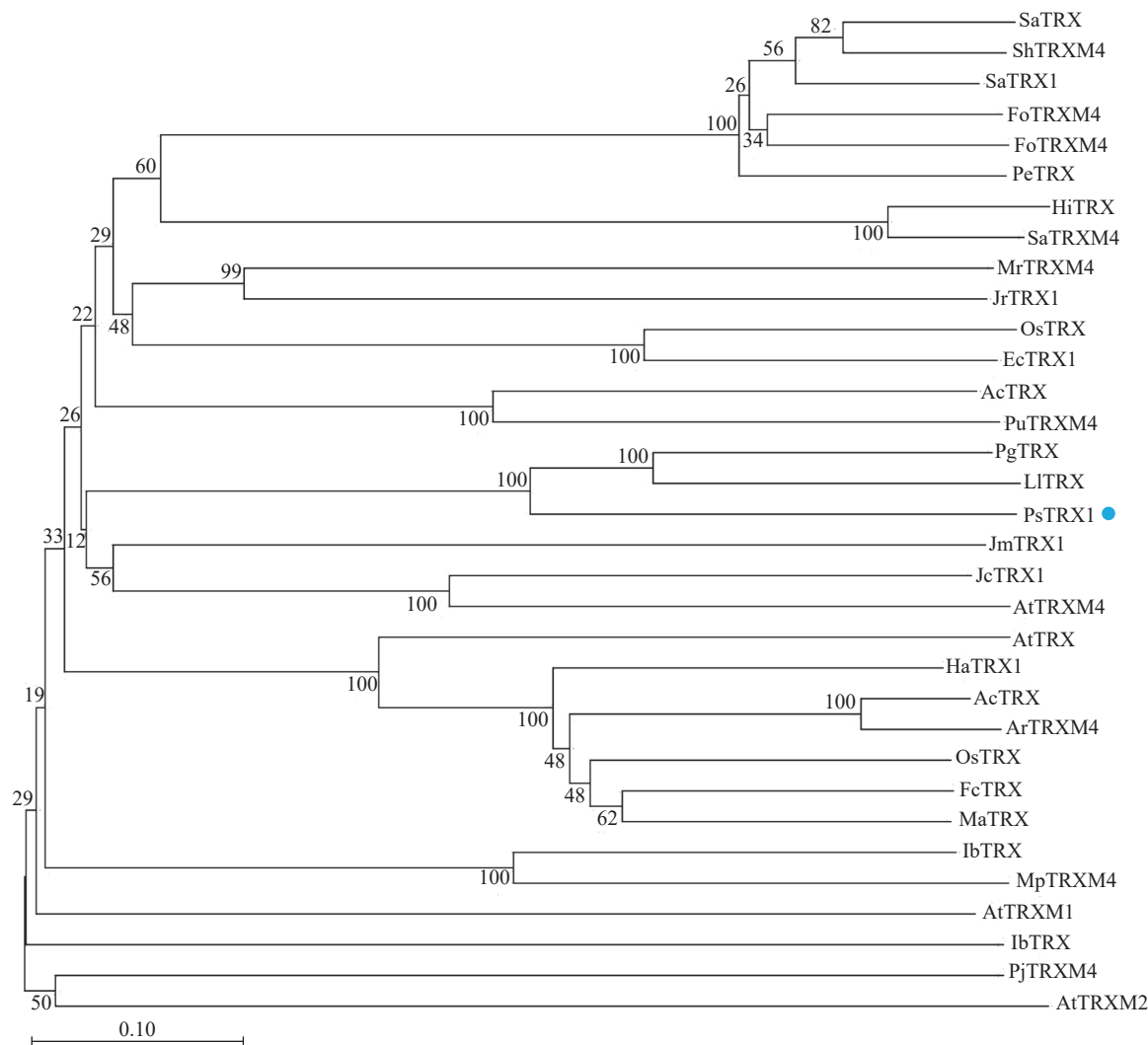


图 1 PsTRX1 进化树

Figure 1 PsTRX1 evolutionary tree

利用激光共聚焦显微镜对荧光信号进行观察。结果显示：空载体质粒转化的烟草叶片，YFP 荧光均匀分布在细胞核和细胞质中，而转 PHB-*TRX1*-YFP 融合载体的烟草叶片中，YFP 荧光信号可与叶绿体自发荧光完全共定位，表明 PsTRX1 蛋白特异性地定位于叶绿体 (图 3)。

2.4 牡丹 *PsTRX1* 基因的表达模式分析

表达模式分析发现：高温胁迫前，*PsTRX1* 基因在各组织中的表达量没有显著差异，高温胁迫 6 h 后，*PsTRX1* 基因在茎、叶和叶柄中的表达量显著升高 ($P < 0.05$)，随着热处理时间增加在叶片中的表达量显著升高 ($P < 0.05$)，24 h 达到峰值，之后便呈现下降趋势 (图 4)。表明 *PsTRX1* 基因可受热处理诱导，该基因可能在牡丹耐热过程中发挥一定的作用。

2.5 牡丹 *PsTRX1* 转基因拟南芥植株的阳性鉴定

利用潮霉素筛选阳性转基因拟南芥株系，使用 PHB-F/R 引物 (表 1) 进行阳性鉴定，获得 *PsTRX1* 转基因阳性株系 4 株。将转基因拟南芥筛选至 T₃ 代播种培养，选取其中 2 株转基因拟南芥阳性株系 (Line-1 和 Line-2) 进行试验，对野生型、过表达拟南芥株系 Line-1 和 Line-2 的 *PsTRX1* 基因的相对表达量进行 RT-qPCR 分析。过表达拟南芥株系中 *PsTRX1* 的相对表达量显著高于野生型株系 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.6 转基因拟南芥耐热性表型分析

对苗龄 28 d 的野生型及 *PsTRX1* 转基因拟南芥植株分别在 40 ℃ 下处理 2 d，观察到叶片表型存在差异。高温胁迫后，野生型叶片发黄皱缩较为明显，相比之下，转基因拟南芥生长状态更为良好，叶片颜色变化较小，叶片形状保持相对完整，表明 *PsTRX1* 正向调控拟南芥植株对高温胁迫的耐受性 (图 6)。

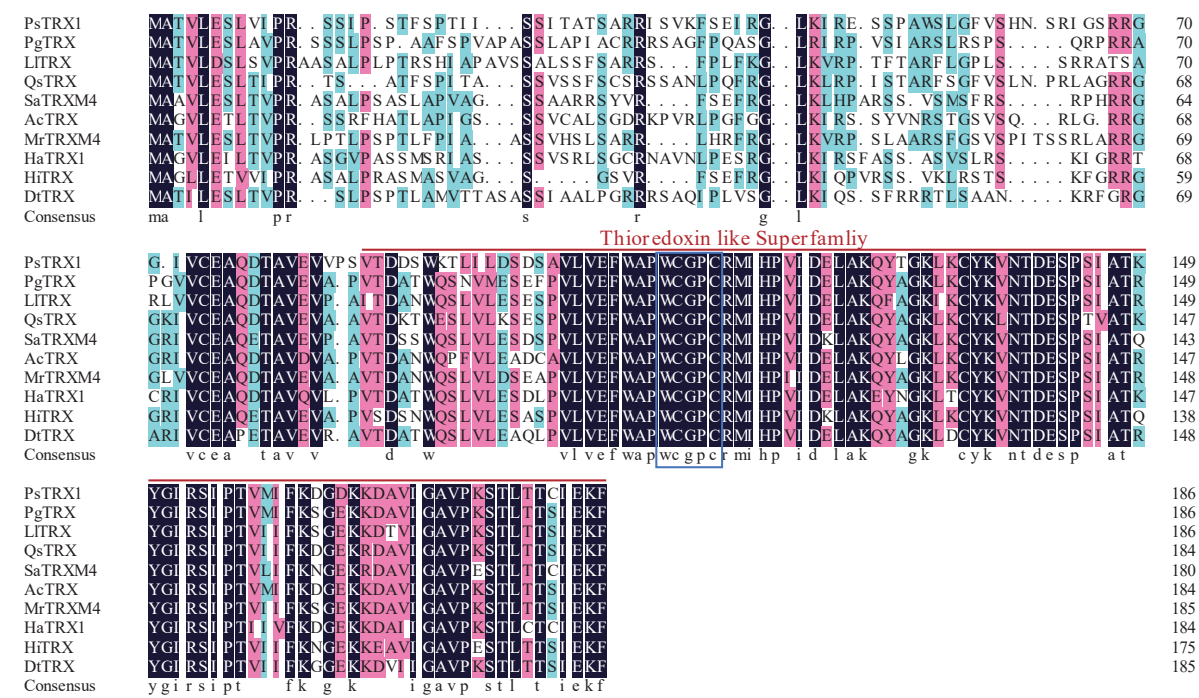


图 2 *PsTRX1* 多序列对比

Figure 2 *PsTRX1* multiple sequence alignment

表 2 牡丹 *PsTRX1* 基因启动子顺式作用元件分析

Table 2 Analysis of cis-acting elements in the promoter region of the <i>PsTRX1</i> gene of peony			
顺式作用元件名称	序列	功能	数量
ABRE	ACGTG	脱落酸响应元件	1
AAGAA-motif	GAAAGAA	脱落酸响应元件	1
circadian	CAAAGATATC	昼夜节律调节元件	1
ERE	ATTTTAAA	乙烯响应元件	2
MYC	CATTTG	转录因子MYC响应元件、干旱响应元件	2
CAAT-box	CAAT/CAAAT/CCAAT	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件	32
G-box	CACGTT	光响应元件	1
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件	1
MYB	CAACCA	参与干旱和ABA应答的元件	3
AE-box	AGAAACAA	光响应元件	1
Box4	ATTAAT	光响应元件光应答的保守DNA组成部分	1
AT-rich element	ATAGAAATCAA	富含AT的DNA结合蛋白结合位点	2
GATA-motif	GATAGGG/AAGATAAGG	光响应元件	2
I-box	AAGATAAGGCT/CCTTATCCT	光响应元件	2
TCA-element	CCATCTTTTT	水杨酸响应元件	1
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件	1
TCT-motif	TCTTAC	光响应元件	1
TCCC-motif	TCTCCCT	光响应元件	1
TATA-box	TATAAA/TATA/TATAA/TATAAGAA/TATACA/ ATATAA/ATATAT/TACAAAA	转录开始-30左右的核心启动子元素	16
MRE	AACCTAA	参与光响应的MYB结合位点	1
RY-element	CATGCATG	种子特异性调控元件	1
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	光响应元件	1
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应元件	1

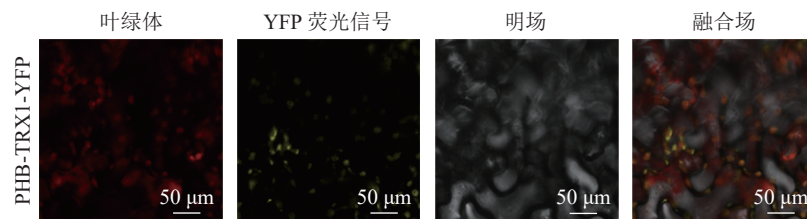
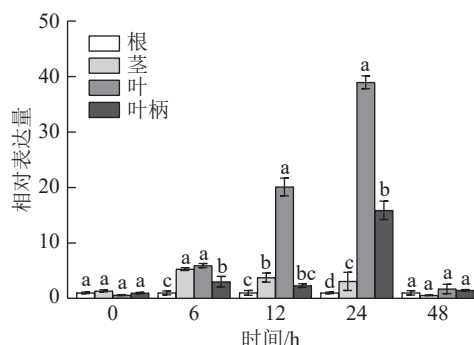
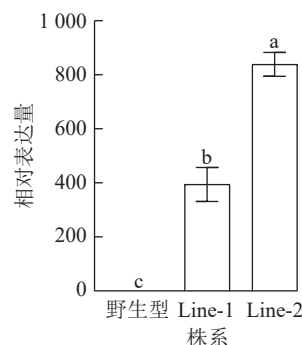


图3 PsTRX1 亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of PsTRX1



平均值±标准误, $n=6$ 。小写字母表示在同一胁迫时间下, *PsTRX1* 基因在不同部位的表达差异显著 ($P<0.05$)。

图4 高温胁迫下 *PsTRX1* 基因在各组织中的表达量变化Figure 4 Expression level changes of the *PsTRX1* gene in various tissues under high-temperature stress

平均值±标准误, $n=6$ 。小写字母表示 *PsTRX1* 基因在不同株系的表达差异显著 ($P<0.05$)。

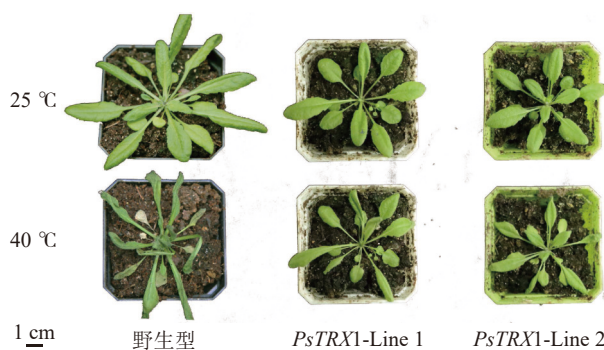
图5 *PsTRX1* 转基因拟南芥株系的基因相对表达量Figure 5 Relative gene expression levels of the *PsTRX1* transgenic *A. thaliana* lines

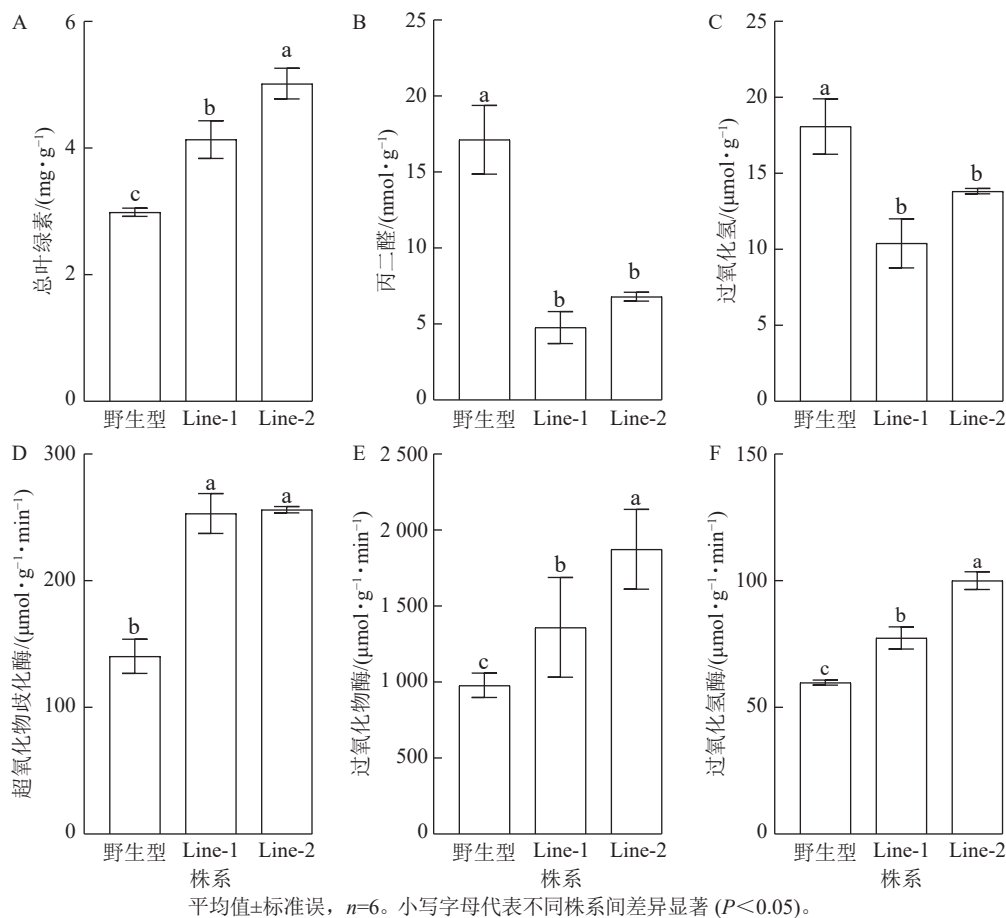
2.7 高温胁迫对转基因拟南芥生理指标的影响

高温胁迫影响植物光合作用, 导致叶绿素等色素产量减少, 因此叶绿素质量分数的变化可以反映植物的胁迫程度^[14]。结果显示: 高温胁迫 2 d 后的 *PsTRX1* 转基因拟南芥总叶绿素质量分数显著高于野生型 ($P<0.05$), 表明野生型受高温胁迫的程度较高 (图 7A)。高温胁迫后转基因拟南芥的过氧化氢与丙二醛质量摩尔浓度均显著低于野生型 ($P<0.05$), 表明高温胁迫后野生型产生了更多的活性氧, 质膜氧化程度更高 (图 7B、C)。植物依赖抗氧化酶系统产生抗氧化酶来清除活性氧, 高温胁迫后转基因拟南芥的抗氧化酶超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性均显著高于野生型 ($P<0.05$) (图 7D、E、F)。以上结果表明高温处理后, 野生型相较于转 *PsTRX1* 基因拟南芥受胁迫程度更高。

2.8 高温胁迫对转基因拟南芥叶绿素快速荧光特性的影响

高温胁迫会显著影响叶绿素的荧光响应特征。高温下转基因拟南芥的快速荧光动力学曲线如图 8 所示: 常温下 (25 °C) 的野生型和转基因拟南芥的 OJIP 曲线显示为典型的 O-J-I-P 形状, 同时在 300 μs 左右出现了新的中间步骤“K”点。此时“K”点并不明显; 高温处理后, 野生型和转基因拟南芥的 OJIP 曲线上的“K”点明显, 曲线由 O-J-I-P 形状变为 O-K-J-I-P 曲线。随着“K”点的出现, 热胁迫下叶片的叶绿素荧光强度和 P 值也急剧下降。曲线中 F_0 至 F_m 的积分面积的物理含义是关闭植物所有反应中心所需能量的量度, 反映了使 QA 完全被还原 (变成 QA⁻) 所需要的能量。电子从 QA⁻ 进入电子传递链越多, 则到达 F_m 所需要的时间就越长, F_0 至 F_m 的积分面积也越大。反之, 当植物受到损伤时, F_0 至

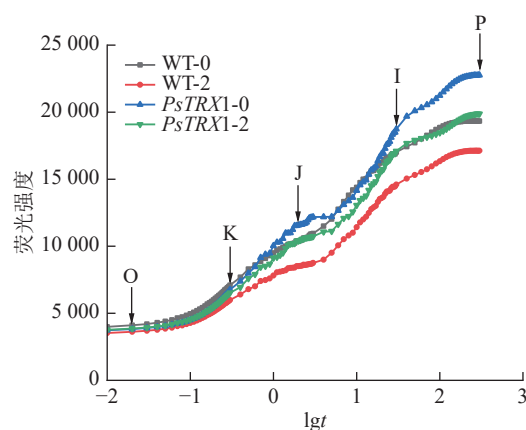
图6 40 °C 高温胁迫 2 d *PsTRX1* 转基因拟南芥表型Figure 6 Phenotype images of *PsTRX1* transgenic *A. thaliana* under 40 °C high temperature stress for 2 days

图 7 高温胁迫对 *PsTRX1* 转基因拟南芥生理指标的影响Figure 7 Influence of high-temperature stress on the physiological indicators of *PsTRX1* transgenic *A. thaliana*

F_m 的积分面积也越小。高温下野生型株系的荧光值面积大幅下降, 转基因拟南芥的荧光值面积下降幅度较小。综上所述, 野生型株系在高温胁迫下受到的损伤更重, *PsTRX1* 可能通过维持叶绿体氧化还原稳态, 从而提高耐热性。

3 讨论

活性氧是细胞正常代谢的产物, 通常以极低的含量存在于植物体内, 但在高温胁迫下植物体内的活性氧会迅速积累^[15-16]。活性氧的积累会触发植物抗氧化系统的激活, 其中 TRX 是调控氧化还原稳态的核心组分。TRX 主要在叶绿体的氧化还原系统中发挥作用, 是干旱胁迫期间抗氧化反应所必需的^[17-18]。在氧化还原系统内, 光驱动电子传递链中由光能驱动水裂解产生的还原力通过铁氧还蛋白和铁氧还肽 Trx 还原酶转移到硫氧还蛋白^[19]。本研究从‘凤丹’中克隆出了 1 个 *PsTRX1* 基因片段, 基因序列长度为 564 bp, 氨基酸为 188 个。经序列分析发现: 牡丹 *PsTRX1* 蛋白具有特征性的 WCGPC 保守基序作为活性中心。植物中的 TRX 蛋白最初是在叶绿体中发现的, TRXf、TRXm、TRXx、TRXy 主要定位于叶绿体中^[20]。本研究亚细胞定位结果显示: *PsTRX1* 定位于叶绿体中。推测 *PsTRX1* 基因可能在叶绿体氧化还原系统中发挥作用, 从而调节植物高温胁迫过程。



WT-0. 野生型拟南芥高温胁迫处理 0 d; WT-2. 野生型拟南芥高温胁迫处理 2 d; *PsTRX1*-0. *PsTRX1* 转基因拟南芥高温胁迫处理 0 d; *PsTRX1*-2. *PsTRX1* 转基因拟南芥高温胁迫处理 2 d。

图 8 高温胁迫对 *PsTRX1* 转基因拟南芥 OJIP 曲线的影响Figure 8 Influence of high-temperature stress on the OJIP curve of *PsTRX1* transgenic *A. thaliana*

硫氧还蛋白调控植物的多个生物过程,同时在植物应对各种逆境胁迫时起重要作用。大麦中有15个典型 *TRX* 基因家族成员被鉴定,预测其启动子并结合大麦干旱胁迫下的转录组分析发现:该基因家族成员参与大麦干旱胁迫^[21]。粟 *Setaria italica* 中的 *NRX* 亚型 *TRX* 基因 *SiNRX1* 增强了拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性^[22]。杂交鹅掌楸 *Liriodendron hybrid* 中的 *LhTRX-h3* 基因在响应非生物胁迫时显著上调,可以提高杂交鹅掌楸的抗旱性^[23]。研究基因启动子的顺式作用元件可以了解基因的潜在功能。对 *PsTRX1* 基因的启动子顺式作用元件分析发现: *PsTRX1* 基因启动子包含多个与胁迫相关的顺式作用元件,推测其参与非生物胁迫。RT-qPCR 结果显示: *PsTRX1* 基因在高温处理后表达量升高,可能参与牡丹高温胁迫过程。

高温会增加植物细胞膜的通透性,导致膜蛋白变性和质膜分离,丙二醛质量摩尔浓度升高,同时活性氧增加,对植物造成氧化胁迫。*PsTRX1* 转基因拟南芥株系的表型分析结果和生理指标分析结果均显示:野生型植株受高温胁迫的程度更高。近年来的研究对叶绿体氧化还原系统有了新的认识,揭示了 *TRX* 蛋白的功能多样性^[24-25]。氧化还原系统能够可逆地调控靶蛋白的氧化还原状态, *TRX* 蛋白在这一过程中发挥核心作用,可以调控酶活性以应对各种胁迫。同时, *TRX* 蛋白参与光系统 I (PS I) 的氧气 (O_2) 还原,从而调节活性氧的积累^[26]。因此推测 *PsTRX1* 基因可能通过抗氧化酶系统来清除活性氧^[27-28]。同时,快速叶绿素荧光诱导动力学曲线结果也说明:野生型植株受胁迫程度更高。高温胁迫会抑制光系统 II (PS II) 的功能活性,因此高温胁迫与叶绿素紧密相关^[29]。本研究采用快速叶绿素荧光诱导动力学分析,评价高温胁迫对转 *PsTRX1* 基因拟南芥叶片光系统 II 光化学效率的影响。JIP 测试可以用于评估不同的胁迫类型,还可以区分对特定胁迫类型的特定响应,例如,可以区分基因型差异、胁迫强度差异或胁迫植物发育阶段差异的响应^[30]。快速叶绿素荧光诱导动力学曲线是指从 *O* 点到 *P* 点的荧光变化过程,主要反映了光系统 II 的电子传递池的连续还原过程^[31]。典型的快速叶绿素荧光动力学曲线包括荧光上升阶段的 *O*、*J*、*I* 和 *P* 相。相位 *O-J* 高度依赖于光,该部分荧光升高与一些光系统 II 反应中心的关闭有关。*J-I* 部分对应于次级电子受体 (QB)、质体醌 (PQ)、细胞色素 (Cyt b6f) 和质蓝素 (PC) 的还原。*I-P* 部分与光系统 I 受体侧电子转运蛋白的减少有关或与由 820 nm 透射测量确定的线性电子传输的可用性有关^[32-34]。本研究中 OJIP 荧光强度在高温处理后下降, F_0 、可变荧光 (F_v) 和 F_m 显著降低,表明胁迫会降低荧光强度。同时,拟南芥受到高温胁迫时,会出现 *K* 波段 (300 μ s),这是因为高温会抑制放氧复合体 (OEC),并阻断放氧复合体与酪氨酸之间的电子传递,在很短的时间内,叶绿素荧光强度迅速增加。换句话说,作为光系统 II 供体光抑制的特定指标,导致 *O-J-I-P* 曲线转变为 *O-K-J-I-P* 曲线^[33-35]。 F_0 和 F_m 之间的荧光诱导曲线的面积与光系统 II 还原侧电子受体 (QA) 的池大小呈正比。如果电子从反应中心到醌池的转移被阻断,这一区域将大大减少。本研究高温下各拟南芥的荧光值面积不同,与野生型植株相比,转 *PsTRX1* 基因拟南芥的荧光值面积没有显著降低,受高温胁迫的程度更低,表明 *PsTRX1* 基因可赋予植物耐热性,与得到的表型结果和生理指标结果一致。

4 结论

牡丹 *PsTRX1* 属于硫氧还蛋白家族,定位于叶绿体。牡丹 *PsTRX1* 基因受热胁迫诱导。高温胁迫后, *PsTRX1* 基因在茎、叶和叶柄中快速响应热胁迫并在叶片中的表达量持续升高,于 24 h 时达到峰值,之后便呈现下降趋势。在高温胁迫下,过表达 *PsTRX1* 基因的拟南芥比野生型植株生长状态更好,叶片皱缩程度更轻,叶绿素质量分数更高,丙二醛和过氧化氢质量摩尔浓度更低,抗氧化酶活性更高,叶绿素荧光值面积下降幅度较小。以上结果均证明牡丹 *PsTRX1* 基因正向调控拟南芥的耐热性。

5 参考文献

- [1] HATFIELD J L, PRUEGER J H. Temperature extremes: effect on plant growth and development [J]. *Weather and Climate Extremes*, 2015, 10: 4-10.
- [2] ZHAO Daqiu, XIA Xing, SU Jianghong, et al. Overexpression of herbaceous peony HSP70 confers high temperature tolerance[J/OL]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 70 [2025-07-25]. DOI: 10.1186/s12864-019-5448-0.
- [3] LAURENT T C, MOORE E C, REICHARD P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides (IV) isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* b [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964,

- 239: 3436–3444.
- [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] BUCHANAN B B, BALMER Y. Redox regulation: a broadening horizon [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, **56**: 187–220.
- [6] HONG Suji, HUH S U. Members of the *Capsicum annuum* *CaTrxh* family respond to high temperature and exhibit dynamic hetero/homo interactions[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, **25**(3): 1729[2025-07-25]. DOI: [10.3390/ijms25031729](https://doi.org/10.3390/ijms25031729).
- [7] ZHANG Cuijun, ZHAO Bingchun, GE Weina, *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): 1884–1899.
- [8] MEYER Y, BELIN C, DELORME-HINOUX V, *et al.* Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, **17**(8): 1124–1160.
- [9] PARK S K, JUNG Y J, LEE J R, *et al.* Heat-shock and redox-dependent functional switching of an h-type *Arabidopsis* thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone [J]. *Plant Physiology*, 2009, **150**(2): 552–561.
- [10] 李巧云, 牛洪斌, 王孟本, 等. 过量表达 *Trxs* 对铝胁迫下转基因大麦幼苗根系抗氧化酶系的影响[J]. 麦类作物学报, 2007, **27**(6): 1111–1116.
- LI Qiaoyun, NIU Hongbin, WANG Mengben, *et al.* Effects of overexpressing *Trxs* on antioxidant enzymes activities in transgenic barley seedling roots under aluminum stress [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2007, **27**(6): 1111–1116.
- [11] YOKOCHI Y, FUKUSHI Y, WAKABAYASHI K I, *et al.* Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in *Arabidopsis thaliana*[J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, **118**(51): e2114952118[2025-07-25]. DOI: [10.1073/pnas.2114952118](https://doi.org/10.1073/pnas.2114952118).
- [12] LAUGHNER B J, SEHNKE P C, FERL R J. A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily [J]. *Plant Physiology*, 1998, **118**(3): 987–996.
- [13] CHA J Y, AHN G, JEONG S Y, *et al.* Nucleoredoxin 1 positively regulates heat stress tolerance by enhancing the transcription of antioxidants and heat-shock proteins in tomato [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, **635**: 12–18.
- [14] KUMAR T A, CHARAN T B. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat [J]. *Plant Physiology*, 1998, **117**(3): 851–858.
- [15] 申惠翡, 赵冰. 杜鹃花品种耐热性评价及其生理机制研究[J]. 植物生理学报, 2018, **54**(2): 335–345.
- SHEN Huifei, ZHAO Bing. Study on evaluation of heat tolerance and its physiological mechanisms in *Rhododendron* cultivars [J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, **54**(2): 335–345.
- [16] SUZUKI N, KOUSSEVITZKY S, MITTLER R, *et al.* ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, **35**(2): 259–270.
- [17] 赵静珂. 辣椒对热胁迫的生理响应及耐热相关基因功能验证[D]. 郑州: 河南农业大学, 2024.
- ZHAO Jingke. *Physiological Response of Pepper to Heat Stress and Functional Verification of Heat Tolerance Related Gene*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2024.
- [18] BOKSZCZANIN K. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, **4**: 315[2025-07-25]. DOI: [10.3389/fpls.2013.00315](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00315).
- [19] WANG Yunlong, WANG Yihua, REN Yulong, *et al.* White panicle2 encoding thioredoxin z, regulates plastid RNA editing by interacting with multiple organellar RNA editing factors in rice [J]. *New Phytologist*, 2021, **229**(5): 2693–2706.
- [20] 夏德习. 拟南芥硫氧还蛋白基因在逆境胁迫下的功能解析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- XIA Dexi. *The Functional of Thioredoxin Henes in Arabidopsis thaliana Under Environmental Stress*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2007.
- [21] 陈虎, 高原, 孙家猛, 等. 大麦典型硫氧还蛋白 (TRX) 基因家族鉴定与生物信息学分析[J]. 作物杂志, 2025(2): 66–73.
- CHEN Hu, GAO Yuan, SUN Jiameng, *et al.* Identification and bioinformatics analysis of the typical thioredoxin (TRX) gene family in barley [J]. *Crops*, 2025(2): 66–73.
- [22] ZHANG Shuangxing, YU Yang, SONG Tianqi, *et al.* Genome-wide identification of foxtail millet's *TRX* family and a

- functional analysis of *SiNRX1* in response to drought and salt stresses in transgenic *Arabidopsis* [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 946037 [2025-07-25]. DOI: [10.3389/fpls.2022.946037](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.946037).
- [23] TONG Lu, LIN Mengyuan, ZHU Liming, *et al.* Unraveling the role of the *Liriodendron* thioredoxin (*TRX*) gene family in an abiotic stress response [J/OL]. *Plants*, 2024, **13**(12): 1674 [2025-07-25]. DOI: [10.3390/plants13121674](https://doi.org/10.3390/plants13121674).
- [24] YOSHIDA K, HISABORI T. Current insights into the redox regulation network in plant chloroplasts [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2023, **64**(7): 704–715.
- [25] SUGIYAMA T, YOSHIDA K. Diversity and distribution of thioredoxin family proteins in photosynthetic organisms [J/OL]. *Plant & Cell Physiology*, 2025: pcaf073 [2025-07-25]. DOI: [10.1093/pcp/pcaf073](https://doi.org/10.1093/pcp/pcaf073).
- [26] SELMA S. Guardians of the light: the redox regulation of the PSI during photosynthesis [J/OL]. *Plant Physiology*, 2024, **197**: kiae482 [2025-07-25]. DOI: [10.1093/plphys/kiae482](https://doi.org/10.1093/plphys/kiae482).
- [27] FUKUSHI Y, YOKOCHI Y, HISABORI T, *et al.* Overexpression of thioredoxin-like protein ACHT2 leads to negative feedback control of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Plant Research*, 2024, **137**(3): 445–453.
- [28] MALLÉN-PONCE M J, FLORENCIO F J, HUERTAS M J. Thioredoxin A regulates protein synthesis to maintain carbon and nitrogen partitioning in Cyanobacteria [J]. *Plant Physiology*, 2024, **195**(4): 2921–2936.
- [29] MURATA N, TAKAHASHI S, NISHIYAMA Y, *et al.* Photoinhibition of photosystem II under environmental stress [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2007, **1767**(6): 414–421.
- [30] RIPOLL J, BERTIN N, BIDEL L P R, *et al.* A user's view of the parameters derived from the induction curves of maximal chlorophyll a fluorescence: perspectives for analyzing stress [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, **7**: 1679 [2025-07-25]. DOI: [10.3389/fpls.2016.01679](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01679).
- [31] GOVINDJE E. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence [J/OL]. *Functional Plant Biology*, 1995, **22**(2): 131 [2025-07-25]. DOI: [10.1071/pp9950131](https://doi.org/10.1071/pp9950131).
- [32] SCHANSKER G, TÓTH S Z, STRASSER R J. Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: the qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, **1757**(7): 787–797.
- [33] KALAJI H M, JAJOO A, OUKARROUM A, *et al.* Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions [J/OL]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, **38**(4): 102 [2025-07-25]. DOI: [10.1007/s11738-016-2113-y](https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y).
- [34] ZIVCAK M, KALAJI H M, SHAO Hongbo, *et al.* Photosynthetic proton and electron transport in wheat leaves under prolonged moderate drought stress [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 2014, **137**: 107–115.
- [35] OUKARROUM A, BUSSOTTI F, GOLTSEV V, *et al.* Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, **109**: 80–88.