

大豆谷胱甘肽还原酶基因的 扩增及连作胁迫应答

韩 蓓¹, 李 晨², 庞园园¹, 方淑梅¹, 梁喜龙²

(1. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:利用数据库 Phytozome 获得大豆谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR) 基因 4 个成员的编码序列 (Coding sequence, CDS) 序列, 以大豆叶片和根中 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增获得 *Glyma10g03740* 和 *Glyma02g16010* 基因, 二者大小均为 1 638 bp, 基因结构相似; 获得 *Glyma16g27210* 和 *Glyma02g08180* 基因, 二者结构相似, 基因大小均为 1 506 bp。系统进化分析显示, *Glyma10g03740*/*Glyma02g16010* 和 *Glyma16g27210*/*Glyma02g08180* 蛋白聚类于不同分支, 但分别都与豇豆、尖叶菜豆和芸豆亲缘关系最近。4 个成员的结构域相同, 均含有 FAD/NAD-binding_dom 结构域和 Pyr_nucl-dis_OxRdtase_dimer 结构域。三级结构显示 *Glyma16g27210* 和 *Glyma02g08180* 构象相似, *Glyma10g03740* 和 *Glyma02g16010* 构象相似, 4 个蛋白均以二聚体结构存在, 互作蛋白完全相同, 包括 2 个硫氧还蛋白还原酶和 8 个硫氧还蛋白。RT-qPCR 方法分析 *GRs* 基因对连作逆境的响应, 结果显示, 在连作胁迫下, 敏感品种 HF55 的 *GRs* 基因表达在根中启动较早 (出苗后 15 d 内), 而叶片中启动较晚, 出苗后 45 d 时表达仍呈上升趋势; 对于抗性品种 KX8, 根和叶片中 *GRs* 基因各成员均在出苗后 15~45 d 表达量达到最高, 30 d 时根中 *GRs* 基因总表达量增加达 19.03 倍, 叶片中 *GRs* 基因总表达量增加 2.50 倍。

关键词:大豆; 谷胱甘肽还原酶; 连作逆境; 基因扩增; 基因表达

中图分类号:S561.1; S344.4; Q786 **文献标志码:**A

Amplification of glutathione reductase gene and its response to continuous cropping stress in soybean

HAN Bei¹, LI Chen², PANG Yuanyuan¹, FANG Shumei¹, LIANG Xilong²

(1. College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;
2. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: The CDS of four *GR* genes were obtained in the soybean database Phytozome. The *GR* genes were cloned by RT-PCR using RNA from leaf and root as templates, respectively. The sizes of *Glyma10g03740* and *Glyma02g16010* were both 1 638 bp, indicating similar gene structures. The gene structures of *Glyma16g27210* and *Glyma02g08180* were similar with 1 506 bp. Phylogenetic analysis showed that *Glyma10g03740*/*Glyma02g16010* and *Glyma16g27210*/*Glyma02g08180* were clustered in different branches, while they were all closely related to *Vigna unguiculata*, *Phaseolus acutifolius* and *Phaseolus vulgaris*, respectively. The four *GRs* had the same domains with FAD/NAD binding_dom and Pyr_Nucl dis_OxRdtase_Dimer. The tertiary structure showed that the conformations of *Glyma16g27210* and *Glyma02g08180* were similar, while those of *Glyma10g03740* and *Glyma02g16010* exhibited similarity as well. All four *GRs* existed in homodimers, with identical interacting proteins, including two thioredoxin reductases and eight thioredoxins. The RT-qPCR method was used to analyze the response of *GRs* to continuous cropping stress. The results showed that under continuous cropping stress, the *GRs* expression of sensitive variety HF55 was initiated earlier in roots, within 15 days after emergence, but it was activated later in leaves. The expression still

收稿日期:2023-09-23

修回日期:2024-02-26

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(201910223012);国家自然科学基金项目(31201163)

作者简介:韩蓓(1998-),女,内蒙古呼伦贝尔人,硕士研究生,研究方向为植物逆境与化学调控。E-mail:634711737@qq.com

通信作者:方淑梅(1977-),女,黑龙江密山人,副教授,主要从事植物抗逆调控及基因功能研究。E-mail:fangshumei520@126.com

梁喜龙(1976-),男,黑龙江安达人,教授,主要从事植物化学调控与抗逆研究。E-mail:xilongliang@126.com

showed an upward trend at 45 days after emergence. In the resistant variety KX8, the expression of GRs in roots and leaves reached their highest levels between 15 days and 45 days after emergence. At 30 days, the total expression of GRs in roots and leaves increased by 19.03 times and 2.50 times, respectively.

Keywords: soybean; glutathione reductase; continuous cropping stress; gene amplification; gene expression

植物细胞在代谢过程中会产生多种活性氧(ROS)如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 等。正常生长条件下,ROS 维持在较低水平,不会对细胞造成伤害,但当植物处于逆境状态时,ROS 含量便会增加,如不及时清除将会导致蛋白质、核酸等生物大分子氧化受损,严重时导致细胞死亡,引起植株衰老和枯萎。谷胱甘肽(GSH)是维持活性氧自由基动态平衡及细胞正常代谢的重要分子,在植物逆境防御中具有多重作用,如抵抗 ROS 和甲基乙二醛对细胞的破坏,保护膜蛋白功能,降低 DNA 损伤几率,参与氧化还原反应等^[1-3]。另外,GSH 在应激状态下还可促进蛋白质的 S-谷胱甘肽化修饰而调节靶蛋白功能,具有增强植物免疫力的作用^[4-6]。大量研究显示,在干旱、低温、盐碱、重金属等胁迫下,植物体内源 GSH 含量及 GSH/GSSG(氧化型谷胱甘肽)比值增加,一定程度上可缓解和保护细胞免受伤害^[7-8]。外源施用 GSH 可增强水稻、小麦、番茄、大豆等多种作物对淹水、重金属、低温、高盐等胁迫的耐受能力^[9-15],进一步证实了 GSH 对于植物正常生长发育和抗逆性的重要作用。

细胞内 GSH 水平高低主要取决于其合成、利用、降解过程以及 GSH 和 GSSG 之间的相互转化。谷胱甘肽还原酶(GR)可在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)存在下催化氧化型谷胱甘肽 GSSG 转变为 GSH,从而保持谷胱甘肽功能分子的还原状态。已有不少试验证实了 GR 活性与逆境胁迫防御之间的关系^[16-17]。例如,Pál 等^[18]和 Nazar 等^[19]在研究不同植物盐胁迫耐受相关物质时发现,植物暴露于水杨酸环境会增加氮和硫的同化作用,GSH 含量增加,同时 GR 活性增高,从而增加植物光合作用等生理过程。Kopriva 等^[20]和 Jiang 等^[21]发现脱落酸处理会使植物中 GSH 水平和 GR 活性增加。GR 基因过表达增加植物耐盐性,进一步证实 GR 活性在增强植物抵抗逆境胁迫中的重要作用^[22]。

迄今为止,植物 GSH 的作用及 GR 基因的胁迫应答研究主要针对某一种胁迫展开,而对于其与植物应对“综合逆境”的关系,尤其是与连作综合逆境(主要包括生物障碍、植物化感自毒作用、土壤理化性状劣变与营养失衡等)的关系鲜见报道,在一定

程度上制约了对该类基因的有效利用。本研究基于实验室前期大豆甲基化组测序数据筛选获得连作胁迫下发生差异甲基化的 GR 基因 *Glyma02g08180*^[23],进一步在大豆数据库 Phytozome 搜索获得 4 个大豆 GR 基因成员,对其进行生物信息学分析、基因扩增及在连作胁迫下的表达,该结果可为进一步研究 GR 基因在应对连作胁迫综合逆境中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 大豆 GRs 基因获取及生物信息学分析

利用 Phytozome 数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>)搜索,获取大豆 GRs 蛋白和基因序列,根据基因定位信息确定 GRs 基因各成员在染色体上的具体位置,利用 MapChart 2.2 软件,按照基因和染色体长度的相对比例进行绘制;在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库获取同源蛋白,然后利用 MEGA 4.0 软件中的 ClustalX 进行氨基酸序列比对分析,采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)绘制系统进化树;基因结构分析利用在线软件 GSDS2.0(<http://gsds.gao-lab.org/>)进行^[24];结构域预测利用 InterPro Scan(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/>)软件,进一步利用 Dog 2.0 软件绘图;利用在线软件 I-TASSER-MTD(<https://zhanggroup.org/I-TASSER-MTD/>)^[25]进行 GRs 蛋白三级结构预测,获取 3D 模型及相关信息;蛋白质互作预测利用 STRING(<http://www.string-db.org>)在线软件进行,分别输入各成员的氨基酸序列,物种选择 *Glycine max*,所有互作蛋白来源(Active interaction sources)均经过试验验证,最低得分设置为中等置信度 0.40。

1.2 供试材料

供试大豆品种为‘合丰 55’(HF55,连作敏感品种^[23])和‘抗线 8 号’(KX8,耐连作品种),由黑龙江八一农垦大学大豆遗传育种实验室提供。连作土为黑龙江省安达市大豆连作一年土壤,近缘大豆玉米轮作土壤为对照。试验采用盆(直径 25 cm,高 20 cm)栽方法,每盆定量装土 2 L,在黑龙江八一农垦大学盆栽场进行。每品种分别在连作和非连作土壤种植 4 盆,每盆留苗 3 株,分别于出苗后 15、30、45

d 收取大豆根和叶片样品,液氮速冻后 -80°C 保存。

1.3 RNA 提取及反转录

提取 RNA 采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (Sangon Biotech) 进行。去除残留基因组 DNA 过程:在 RNase free PCR 管中加入总 RNA 1 μg , DNase I 1 μL , $10\times$ Reaction buffer with MgCl_2 1 μL , RNase free ddH_2O 至 10 μL , 用移液器轻轻吹打混匀, 42°C 温浴 15 min。反转录过程:在冰浴 Nuclease-free PCR 管中加入 Random Primer p (dN)⁶ (100 pmol) 1 μL , dNTP Mix (0.5 mmol \cdot L⁻¹ final concentration) 1 μL , Rnase-free ddH_2O 定容至 14.5 μL , 轻轻混匀后离心 3~5 s, 在 65°C 温浴 5 min 后, 冰浴 2 min, 离心 3~5 s; 冰浴环境下再加入 $5\times$ RT buffer 4 μL , Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor (20 U) 0.5 μL , Maxima Reverse Transcriptase (200 U) 1 μL , 轻轻混匀后离心 3~5 s, 在 PCR 仪上进行反转录反应。反应条件如下: 25°C 10 min, 50°C 30 min, 85°C 5 min, 反应结束后 -20°C 保存, 用于基因扩增及荧光定量试验。

1.4 基因扩增

为扩增完整的 GRs 基因, 引物均设计在目的基因的两端。引物序列信息如表 1 所示。将 cDNA 样品稀释 10 倍作为模板。反应总体积 10 μL , 包括 Taq Master Mix 5 μL , 引物 F (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和引物 R (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , 模板 cDNA 1 μL , ddH_2O 3.2 μL 。PCR 条件为 95°C 3 min, 然后 95°C 15 s, 55°C 15 s, 72°C 30s, 循环 35 次后 72°C 5 min。

表 1 GRs 基因扩增引物信息

Table 1 Primer information for GRs gene cloning

基因名称 Gene name	引物序列 5'→3' Primer sequences 5'→3'	扩增长度/bp Length
<i>Glyma10g03740</i>	F: ATGGCGACATCGCTCTCCGTT R: TTAACCCCTGCTGCAGTTTTTGC	1638
<i>Glyma02g16010</i>	F: ATGGCGACGTCGCTCTCTGTTT R: TTAACCCCTGCTGCAGCTTTTG	1638
<i>Glyma16g27210</i>	F: ATGGCTAGGAAGATGCTTATCGAT R: TTACAAATTGGTCTTGGGTTTGAC	1506
<i>Glyma02g08180</i>	F: ATGGCTAGGAAGATGCTTATCGAC R: TTACAAATTGGTCTTGGGTTTGG	1506

1.5 荧光定量试验

由于 *Glyma10g03740* 与 *Glyma02g16010* 的 CDS 序列相似性高达 96.76%, *Glyma16g27210* 与 *Glyma02g08180* 的 CDS 序列相似性高达 96.75%, 不存在各自特异性序列, 无法针对单个基因设计引物进行特异性扩增。因此本试验测定的是 *Glyma10g03740*

与 *Glyma02g16010* 表达量之和, *Glyma16g27210* 与 *Glyma02g08180* 表达量之和。为避免两基因之间扩增效率出现差异, 引物均分别设计在两基因的序列相同区, 引物序列信息如表 2 所示, 内参基因为肌动蛋白基因 *Actin*。将 cDNA 样品稀释 5 倍作为模板。反应总体积 10 μL , 包括 SybrGreen qPCR Master Mix 5 μL , 引物 F (10 μM) 和引物 R (10 μM) 各 0.2 μL , 模板 cDNA 1 μL , ddH_2O 3.6 μL 。PCR 条件为 95°C 3 min, 然后 95°C 15 s, 60°C 30 s 循环 45 次。相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的值^[26] 表示, 其中 $\Delta Ct = (Ct_{\text{测定基因}} - Ct_{\text{内参基因}})$, $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{连作胁迫}} - \Delta Ct_{\text{非连作胁迫}})$, Ct 为反应管内的荧光信号到达设定域值时所经历的循环数。

2 结果与分析

2.1 大豆 GRs 基因结构及染色体定位

在大豆 phytozome 数据库中搜索, 确定谷胱甘肽还原酶成员 4 个, 信息如表 3 所示。基因名称分别表示为 *Glyma10g03740*、*Glyma02g16010*、*Glyma16g27210* 和 *Glyma02g08180*, 分别位于 10 号、2 号、16 号和 2 号染色体, 在染色体上的相对位置如图 1A (见 64 页) 所示。基因结构和氨基酸多序列比对如图 1B、C (见 64 页) 所示, *Glyma10g03740* 基因和 *Glyma02g16010* 基因均含有 10 个外显子, 9 个内含子, 且内含子较小, 编码序列 (CDS) 相似性为 96.76%, 蛋白质氨基酸序列的相似性为 97.43%; *Glyma16g27210* 基因和 *Glyma02g08180* 基因均含有 16 个外显子, 15 个内含子, 且内含子很大, CDS 相似性为 96.75%, 蛋白质氨基酸序列的相似性为 96.61%。4 个 GRs 蛋白氨基酸序列相似性为 73.37%, 均具有保守的吡啶核苷酸二硫化物氧化还原酶活性位点 (图 1C)。

2.2 大豆 GRs 蛋白系统进化分析

以单子叶植物玉米和水稻为外群构建系统进化树, 如图 2 所示。大豆的 4 个 GRs 蛋白成员中, *Glyma10g03740* 和 *Glyma02g16010* 聚为一类, *Glyma16g27210* 和 *Glyma02g08180* 聚为一类, 分别与其他植物 GRs 蛋白不同成员聚类为两个分支。两个分支中的大豆 GRs 蛋白均与豇豆、尖叶菜豆和芸豆亲缘关系最近。*Glyma10g03740*/*Glyma02g16010* 与豇豆、尖叶菜豆和芸豆的序列相似性达 94.15%, *Glyma16g27210*/*Glyma02g08180* 与豇豆、尖叶菜豆和芸豆的序列相似性达 95.18%。以上结果表明所列物种 GRs 蛋白成员在单、双子叶植物中均进化为两个分支存在, 其序列在豇豆、尖叶菜豆和芸豆等豆科作物中高度保守。

表 2 荧光定量 PCR 引物信息

Table 2 Primer information for fluorescence quantitative PCR

基因名称 Gene name	引物序列 5'→3' Primer sequences 5'→3'	扩增长度/bp Length
<i>Glyma10g03740/Glyma02g16010</i>	F: TATTTTGAACAATGCTGGGGTCA R: AATCAAGGGCAGCATCTGAATCTA	185
<i>Glyma16g27210/Glyma02g08180</i>	F: AACGTGTGTTATTCGTGGTTGTG R: ATCCGCTTGTAAAGTCCATTTAATC	186
<i>Actin</i>	F: GGTGTTCTATCTTGGCATC R: CTTTCGCTCAATAACCCTA	139

表 3 大豆 GRs 蛋白成员信息

Table 3 Information of GRs protein member in soybean

NCBI 检索号 NCBI accession number	Phytozome 基因别名 Gene alias in phytozome	位置 Location	氨基酸数目 AA number
XP_003536837.1	<i>Glyma10g03740</i>	Chr10:2807234..2812723reverse	545
NP_001238006.2	<i>Glyma02g16010</i>	Chr02:14645359..14650975 forward	545
XP_006599444.1	<i>Glyma16g27210</i>	Chr16:31591570..31606167 reverse	501
XP_003518318.1	<i>Glyma02g08180</i>	Chr02:6473402..6488550 reverse	501

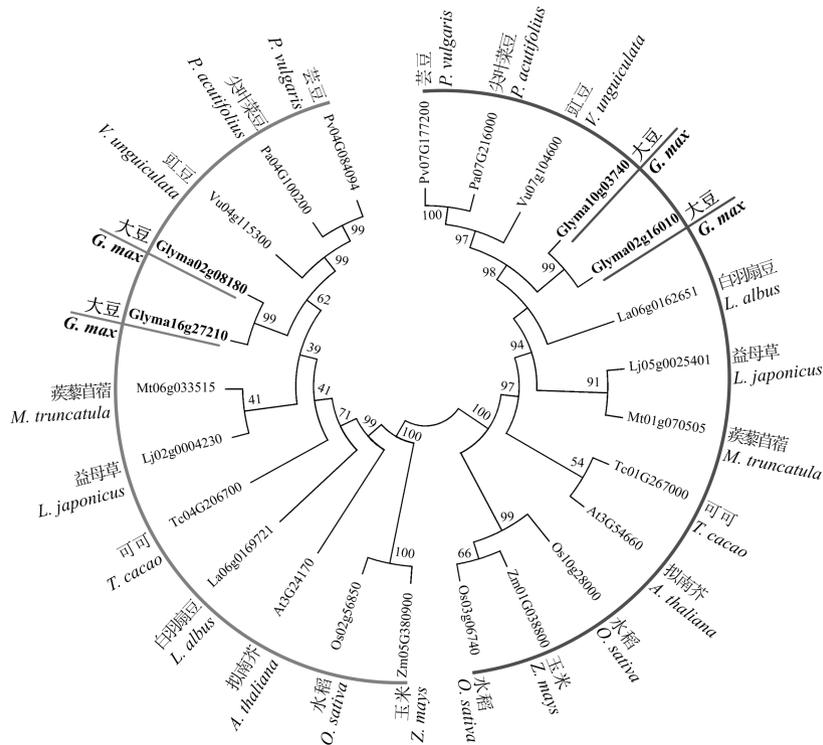


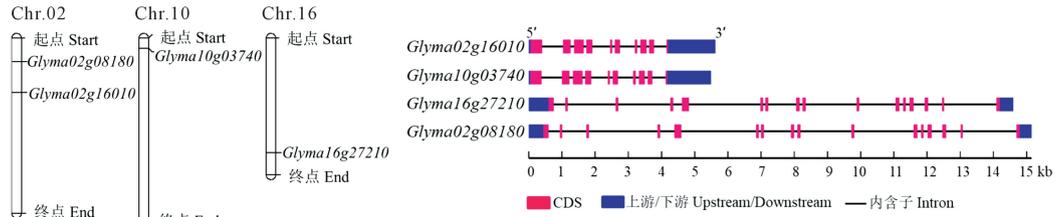
图 2 大豆 GRs 蛋白的系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of GRs in soybean

2.3 大豆 GRs 蛋白的结构域及三级结构分析

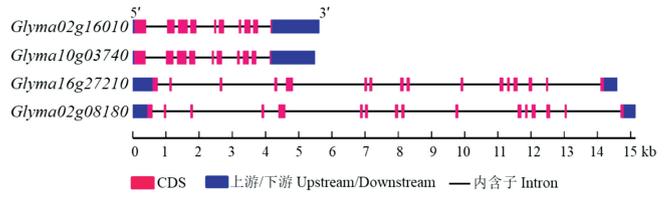
如图 3 所示,大豆 GRs 蛋白 4 个成员的结构域相同,均含有 FAD/NAD-binding_dom 结构域和 Pyr_nucl-dis_OxRdtase_dimer 结构域。其中 FAD/NAD-binding_dom 结构域为 FAD 和 NAD(P)H 的结合域,与催化功能有关;Pyr_nucl-dis_OxRdtase_dimer 为二聚化结构域,可使蛋白质聚合成二聚体。进一步利用 I-TASSER-MTD 预测三级结构,结果如表 4

所示,4 个 GRs 成员的模板建模分数值均大于 0.5,表明预测模型具有正确的拓扑结构;4 个蛋白均主要以 α-螺旋、β-折叠和无规卷曲构成,Glyma10g03740 和 Glyma02g16010 三级结构非常相似,Glyma16g27210 和 Glyma02g08180 三级结构非常相似,FAD/NAD-binding_dom 结构域和 Pyr_nucl-dis_OxRdtase_dimer 结构域在空间上均形成独立的折叠区,各自发挥功能。

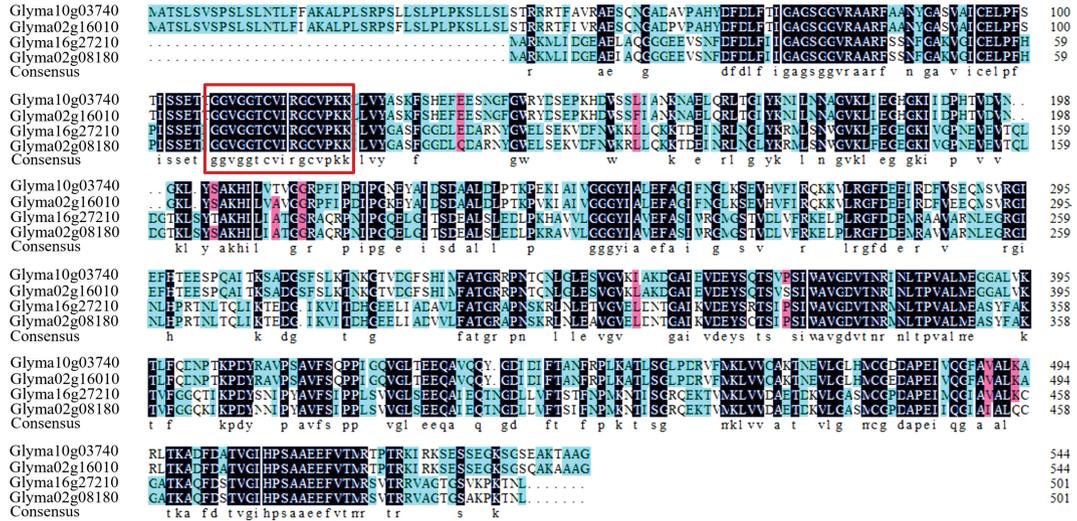


(A) 大豆GRs基因染色体定位

Soybean GRs genes chromosomal localization



(B) GRs基因结构 GRs genes structure



(C) GRs蛋白序列比对 GRs proteins sequence alignment

注: C图红色框内为保守的吡啶核苷酸二硫化物氧化还原酶活性位点。

Note: Red box in figure C showing conserved pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase active sites.

图 1 大豆 GRs 基因染色体定位、GRs 基因结构及 GRs 蛋白序列比对

Fig.1 Chromosomal localization of soybean GRs genes, GRs genes structure and multiple sequence alignment of GRs proteins

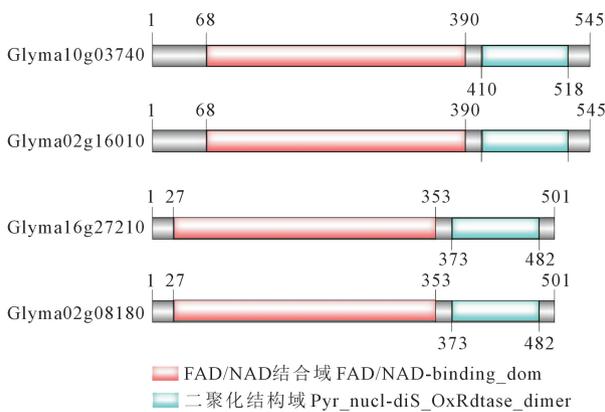


图 3 大豆 GRs 的功能结构域示意图

Fig.3 Functional domain diagram of GRs in soybean

2.4 大豆 GRs 蛋白的互作蛋白分析

如图 4 所示,大豆 4 个 GRs 蛋白的互作蛋白完全相同,共有 10 个,其中 2 个(Glyma02g33070.1 和 Glyma10g13190.1)注释为硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin Reductase, TrxR),与所预测蛋白的互作得分均为 0.671,二者之间也有互作,得分为 0.682。其

他互作蛋白得分均为 0.558,通过数据库 SoyKB (<https://soykb.org>) 搜索显示均为硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)。

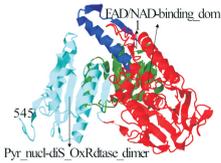
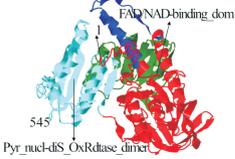
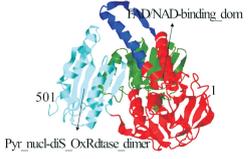
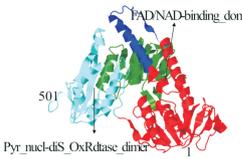
2.5 大豆 GRs 基因扩增

以大豆叶片和根组织的 cDNA 为模板,利用 DNA 聚合酶分别进行 *Glyma10g03740* (1 638 bp)、*Glyma02g16010* (1 638 bp)、*Glyma16g27210* (1 506 bp) 和 *Glyma02g08180* (1 506 bp) 基因扩增。电泳结果如图 5 所示,均与预期大小一致,表明基因扩增成功。

2.6 大豆 GRs 基因对连作胁迫的响应

本研究通过 RT-qPCR 方法检测 GRs 基因在敏感品种 HF55 和抗性品种 KX8 的叶片及根组织中的相对表达量,内参基因为 *Actin*,结果如图 6 所示,连作胁迫下 GRs 基因 *Glyma10g03740*/*Glyma02g16010* 和 *Glyma16g27210*/*Glyma02g08180* 在两品种的叶片和根组织中均显示一致的变化趋势。对于敏感品种 HF55, GRs 基因在根中的表达量在出苗后 15 d 时开始下降,而在叶片中出苗后 45 d 时表达仍呈上

表 4 大豆 GRs 蛋白三级结构及相关信息
Table 4 Tertiary structure models and relative information of GRs in soybean

蛋白质名称 Protein name	模板建模分数 eTM-score	均方根偏差 eRMSD (Å)	P 值 ^[27] P value	三级结构 3D structure
Glyma10g03740	0.68±0.12	8.2±4.4	0.75	
Glyma02g16010	0.64±0.13	8.9±4.6	0.56	
Glyma16g27210	0.75±0.11	6.8±4.0	0.48	
Glyma02g08180	0.79±0.09	6.1±3.8	0.5	

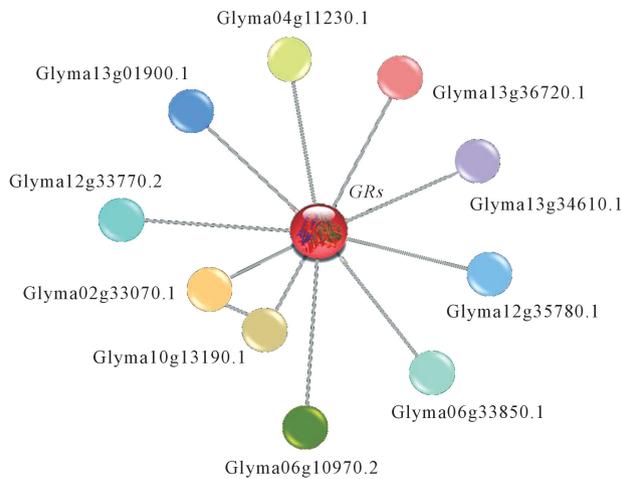
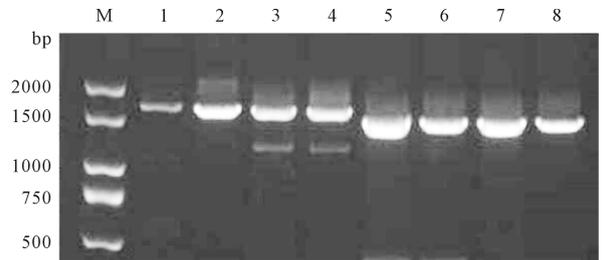


图 4 大豆 GRs 互作蛋白分析

Fig.4 Interaction protein prediction of soybean GRs

升趋势,此时 *Glyma10g03740*/*Glyma02g16010* 表达量升高 6.93 倍, *Glyma16g27210*/*Glyma02g08180* 表达量升高 2.49 倍,二者之间具有显著性差异。对于抗性品种 KX8,根和叶片中 GRs 基因均在出苗后 30 d 表达量最高,根中 *Glyma10g03740*/*Glyma02g16010* 表达量升高 12.58 倍, *Glyma16g27210*/*Glyma02g08180* 表达量升高 6.45 倍,二者之间具有显著性差异,而叶



注:M:DNA 分子量标准;1,2:*Glyma10g03740* 叶片、根;3,4:*Glyma02g16010* 叶片、根;5,6:*Glyma16g27210* 叶片、根;7,8:*Glyma02g08180* 叶片、根。

Note: M: Marker; 1/2: *Glyma10g03740* leaf/root; 3/4: *Glyma02g16010* leaf/root; 5/6: *Glyma16g27210* leaf/root; 7/8: *Glyma02g08180* leaf/root.

图 5 大豆 GRs 基因的 PCR 扩增

Fig.5 PCR amplification of GRs genes in soybean

片中表达量相对较低,仅分别升高 1.40 倍和 1.14 倍;另外在 30 d 和 45 d 时,根中 GRs 基因总表达量分别增加 19.03 倍和 8.74 倍,分别是叶片中 GRs 基因总表达量的 7.61 倍和 8.49 倍,差异均达显著水平。两品种之间进行比较,抗性品种 KX8 根中 GRs 基因最高总表达量(30 d,19.03 倍)是 HF55 根中(15 d,2.82 倍)的 6.75 倍。以上结果表明抗性品种的 GRs

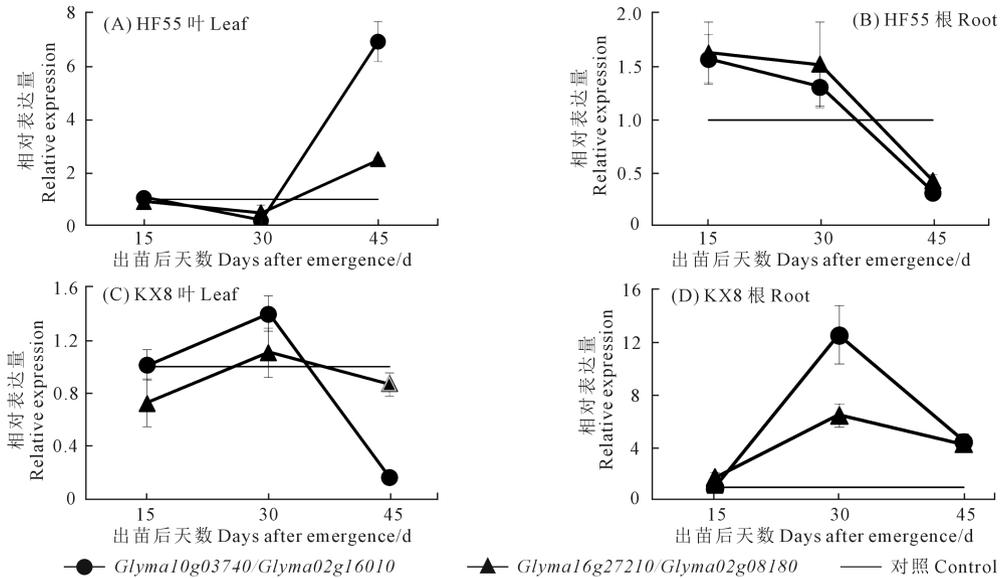


图 6 连作胁迫对不同品种大豆 GRs 基因表达的影响

Fig.6 Effects of continuous cropping stress on the expression of GRs genes in different soybean varieties

基因在根系中表达量明显高于敏感品种,且 *Glyma10g03740/Glyma02g16010* 表达占优势,根组织中 GRs 蛋白高水平对促进大豆抗(耐)连作可能具有更积极作用。

3 讨论

作物出苗、生长发育到成熟、衰老过程总会受到多种环境胁迫影响,成为作物产量的主要限制因素。环境胁迫会诱导细胞中 ROS 过度产生和累积,引起蛋白质、核酸和脂类等大分子物质氧化,导致细胞损伤。植物在不断进化过程中产生了可以清除 ROS 的抗氧化物质及抗氧化酶,使自身能够更好地适应胁迫环境^[28]。GR 和 GSH 是抗坏血酸谷胱甘肽(AsA-GSH)途径的重要组分,其对细胞清除 ROS、维持生物分子还原态具有重要作用^[1,8]。对玉米、小麦、水稻、黄瓜、番茄等多种作物的研究均显示 GRs 基因在不同类型胁迫下表达水平提高^[17,29]。而且拟南芥、烟草的转基因试验也表明 GRs 基因增加了植物对氧化胁迫的抗性^[22,30-31],证明 GRs 酶活性与植物逆境防御密切相关。

本研究在大豆数据库中直接搜索确定 4 个 GRs,将其基因及蛋白序列进行比较分析显示,*Glyma10g03740* 和 *Glyma02g16010* 基因结构相似,在进化树中同处于一个分支,*Glyma16g27210* 和 *Glyma02g08180* 基因结构相似,在进化树中同处于另一个分支。大豆 4 个 GRs 成员的结构域相同,均含有 FAD/NAD-binding_dom 结构域和 Pyr_nucl-dis_OxRdtase_dimer 结构域。FAD/NAD-binding_dom

结构域为 FAD 和 NAD(P)H 的结合域,发挥催化活性^[32];Pyr_nucl-dis_OxRdtase_dimer 为二聚化结构域,使 GR 蛋白聚合形成二聚体^[33-34]。三级结构预测结果证实了 4 个蛋白均以二聚体结构存在,*Glyma16g27210* 和 *Glyma02g08180* 构象相似,*Glyma10g03740* 和 *Glyma02g16010* 构象相似,但 4 个成员的活性位点是相同的(图 1C),均属于吡啶核苷酸二硫化物氧化还原酶,这与 Trivedi 等^[29]报道的拟南芥和水稻的 GRs 结构相同。大豆中 4 个 GRs 成员的互作蛋白完全相同,包括 2 个硫氧还蛋白还原酶(TrxR)和 8 个硫氧还蛋白(Trx)。TrxR 与 GR 活性相似,其可催化 Trx 保持还原态,进而通过调节多种酶或蛋白的巯基氧化还原状态参与 H₂O₂清除、DNA 合成、基因转录及信号转导等过程^[35-36]。互作蛋白的预测结果表明大豆中 GRs 发挥作用时会与 Trx 及 TrxR 相互协调,共同参与体内多种代谢过程。

4 个 GRs 成员的互作蛋白完全相同表明他们在细胞内发挥完全相同的作用,因此他们在细胞内总表达量的变化对于植物细胞内抗氧化物质 GSH 含量或 GSH/GSSG 比值具有重要指示意义。本研究分析连作胁迫下不同抗性品种叶片和根组织中 GRs 基因总表达量,与内参基因 *Actin* 相比,抗性品种 KX8 根中 4 个 GRs 基因总表达量显著高于叶片中,也显著高于敏感品种 HF55,可能因为 KX8 根系细胞在连作胁迫下,能够通过大量表达 GRs 酶而维持 GSH 的还原态,从而快速及时清除产生的 ROS,保护细胞免受损伤,这可能也是该品种耐受连作综合逆境的原因之一。然而本研究中由于取样时间设置在出苗后

15~45 d,无法确定几个基因在敏感品种 HF55 的叶片和根组织中的最大表达量及时间,但可以确定的是 *GRs* 基因在根中表达启动较早,在出苗 15 d 前表达最高,而在叶片中启动较晚,出苗后 45 d 时表达仍呈现上升趋势。本研究结果可为进一步研究 *GRs* 基因参与连作胁迫应答机制提供参考。

4 结 论

大豆 *GRs* 的 *Glyma10g03740* 和 *Glyma02g16010* 基因结构及蛋白质结构相同,具有相同的进化来源,*Glyma16g27210* 和 *Glyma02g08180* 基因结构及蛋白质结构相同,具有相同的进化来源。4 个成员的结构域和互作蛋白均完全相同,表明它们在细胞内发挥的作用相同。*GRs* 基因在抗性品种表达量高于敏感品种,且在根组织中表达量高于叶片,表明大豆根中高 *GRs* 活性可能是大豆抗(耐)连作的原因之一。

参 考 文 献:

[1] HASANUZZAMAN M, BHUYAN M H M B, ANEE T I, et al. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(9): 384.

[2] ZECHMANN B. Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress[J]. *Plants*, 2020, 9(9): 1067.

[3] BANERJEE A, ROYCHOUDHURY A. Role of glutathione in plant abiotic stress tolerance[M]//HASANUZZAMAN M, FOTOPOULOS V, NAHAR K, et al. Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signaling and defense mechanisms. Hoboken: John Wiley & Sons Ltd, 2019: 159-172.

[4] LU C C, JIANG Y K, YUE Y Z, et al. Glutathione and neodyosmin feedback sustain plant immunity[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(3): 976-990.

[5] DORION S, OUELLET J C, RIVOAL J. Glutathione metabolism in plants under stress: beyond reactive oxygen species detoxification[J]. *Metabolites*, 2021, 11(9): 641.

[6] KALININA E, NOVICHKOVA M. Glutathione in protein redox modulation through s-glutathionylation and s-nitrosylation[J]. *Molecules*, 2021, 26(2): 435.

[7] HASANUZZAMAN M, NAHAR K, ANEE T I, et al. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, 23(2): 249-268.

[8] GILL S S, ANJUM N A, HASANUZZAMAN M, et al. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 70: 204-212.

[9] SIDDIQUI M N, MOSTOFA M G, RAHMAN M M, et al. Glutathione improves rice tolerance to submergence: insights into its physiological and biochemical mechanisms[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 325: 109-118.

[10] CAI Y, CAO F B, CHENG W D, et al. Modulation of exogenous glutathione in phytochelatin and photosynthetic performance against Cd stress in the two rice genotypes differing in Cd tolerance[J].

Biological Trace Element Research, 2011, 143(2): 1159-1173.

[11] ZHOU Y, WEN Z L, ZHANG J W, et al. Exogenous glutathione alleviates salt-induced oxidative stress in tomato seedlings by regulating glutathione metabolism, redox status, and the antioxidant system[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 220: 90-101.

[12] AKRAM S, SIDDIQUI M N, HUSSAIN B M N, et al. Exogenous glutathione modulates salinity tolerance of soybean [*Glycine max* (L.) merrill] at reproductive stage [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2017, 36(4): 877-888.

[13] LI G Z, CHEN S J, LI N Y, et al. Exogenous glutathione alleviates cadmium toxicity in wheat by influencing the absorption and translocation of cadmium[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, 107(2): 320-326.

[14] WEN K, LI X G, HUANG R, et al. Application of exogenous glutathione decreases chromium translocation and alleviates its toxicity in soybean (*Glycine max* L.)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 234: 113405.

[15] GUL N, AHMAD P, WANI T A, et al. Glutathione improves low temperature stress tolerance in pusa sheetal cultivar of *Solanum lycopersicum*[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 12548.

[16] HARSHAVARDHAN V, WUZ M, HONG C Y. Glutathione reductase and abiotic stress tolerance in plants[M]//HOSSAIN M A, MOSTOFA M G, DIAZ-VIVANCOS P, et al. Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance. Cham: Springer, 2017: 265-286.

[17] MADHU, KAUR A, TYAGI S, et al. Exploration of glutathione reductase for abiotic stress response in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2022, 41(3): 639-645.

[18] PÁL M, KOVÁCS V, SZALAI G, et al. Salicylic acid and abiotic stress responses in rice[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2014, 200(1): 1-11.

[19] NAZAR R, IQBAL N, SYEED S, et al. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(8): 807-815.

[20] KOPRIVA S. Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond[J]. *Annals of Botany*, 2006, 97(4): 479-495.

[21] JIANG M, ZHANG J. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42(11): 1265-1273.

[22] ZHAI J L, LIANG Y L, ZENG S L, et al. Overexpression of tomato glutathione reductase (S1GR) in transgenic tobacco enhances salt tolerance involving the s-nitrosylation of GR[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 196: 497-506.

[23] LIANG X L, HOU X, LI J Y, et al. High-resolution DNA methylome reveals that demethylation enhances adaptability to continuous cropping comprehensive stress in soybean[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 79.

[24] HU B, JIN J P, GUO A Y, et al. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.

[25] YANG J Y, ZHANG Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W174-W181.