

引用格式:

赵高鹏, 洪双双, 范怡雯, 刘泓畅, 张泰铭, 刘青青, 张严玲, 王翠玲. 玉米铁氧还蛋白*ZmFdx5*基因的克隆及其在逆境胁迫下的表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(5): 1–9.

ZHAO G P, HONG S S, FAN Y W, LIU H C, ZHANG T M, LIU Q Q, ZHANG Y L, WANG C L. Cloning and expression analysis of the maize ferredoxin gene *ZmFdx5* under stress conditions[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(5): 1–9.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



玉米铁氧还蛋白*ZmFdx5*基因的克隆 及其在逆境胁迫下的表达分析

赵高鹏¹, 洪双双¹, 范怡雯², 刘泓畅¹, 张泰铭¹, 刘青青¹, 张严玲¹, 王翠玲^{1*}

(1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023; 2. 西安电子科技大学经济与管理学院, 陕西 西安 710071)

摘要: 为研究热带玉米(*Zea mays* L.)中铁氧还蛋白编码基因*ZmFdx5*的结构及其在玉米响应逆境胁迫过程中所起的作用, 从热带玉米自交系CML288中克隆出*ZmFdx5*基因, 对*ZmFdx5*蛋白进行生物信息学和系统进化树分析, 并对*ZmFdx5*基因在干旱和盐逆境胁迫下的表达进行分析。结果表明: *ZmFdx5*基因含有1个585 bp的开放阅读框, 共编码194个氨基酸。*ZmFdx5*蛋白包含典型的fer2超家族结构域, 属于亲水性不稳定蛋白, 不含信号肽并且是非跨膜蛋白, 主要由无规则卷曲和 α -螺旋组成。*ZmFdx5*蛋白可能与NAR1蛋白、铁硫氧还蛋白还原酶(FTRC)等蛋白具有互作关系, 且该蛋白聚集在光合型Fd组, 推测其属于玉米中的光合型Fd。玉米*ZmFdx5*蛋白在单子叶植物组中与高粱、柳枝稷等C4植物具有更近的亲缘关系。玉米*ZmFdx5*基因主要在叶片中表达, 响应干旱和盐逆境胁迫。

关键词: 玉米; *ZmFdx5*; 基因克隆; 表达模式; 逆境胁迫

中图分类号: S513

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)05-0001-09

Cloning and expression analysis of the maize ferredoxin gene *ZmFdx5* under stress conditions

ZHAO Gaopeng¹, HONG Shuangshuang¹, FAN Yiwen², LIU Hongchang¹,
ZHANG Taiming¹, LIU Qingqing¹, ZHANG Yanling¹, WANG Cuiling^{1*}

(1. Department of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. School of Economics & Management, Xidian University, Xi'an, Shaanxi 710071, China)

Abstract: To investigate the structural characteristics of the ferredoxin-encoding gene *ZmFdx5* in tropical maize(*Zea mays* L.) and elucidate its functional role in abiotic stress responses, the *ZmFdx5* gene was successfully cloned from the tropical maize inbred line CML288. Comprehensive bioinformatics analysis and phylogenetic reconstruction were performed to characterize the *ZmFdx5* protein, while its expression patterns under drought and salt stress conditions were systematically examined. The results showed that the *ZmFdx5* gene comprised a 585 bp open reading frame encoding a polypeptide of 194 amino acids. The deduced *ZmFdx5* protein contained a conserved fer2 superfamily domain and was characterized as a hydrophilic, unstable protein that lacks both a signal peptide and transmembrane domains. The protein was predominantly composed of random coils and α -helices. The *ZmFdx5* protein may functionally interact with proteins including NAR1 and ferredoxin-thioredoxin reductase(FTRC). *ZmFdx5* was located within the photosynthetic ferredoxin group, further supporting its classification as a photosynthetic-type ferredoxin in maize. Furthermore, *ZmFdx5* exhibited

收稿日期: 2024-12-06

修回日期: 2025-01-14

基金项目: 国家自然科学基金河南省联合基金项目(U2004153); 河南省科技攻关项目(232102111096); 河南省高等学校重点科研项目(23A210025)

作者简介: 赵高鹏(1999—), 男, 河南安阳人, 硕士, 主要从事作物分子育种研究, 1695956208@qq.com; *通信作者, 王翠玲, 博士, 教授, 主要从事作物分子育种研究, lywgg@126.com

a closer phylogenetic relationship with C4 monocot species such as sorghum and switchgrass. *ZmFdx5* was predominantly expressed in leaf tissues and demonstrated significant responsiveness to both drought and salinity stress conditions.

Keywords: maize; *ZmFdx5*; gene cloning; expression pattern; adversity stress

玉米(*Zea mays* L.)在整个生长期内常常会受到各种环境胁迫的影响,其中干旱和盐胁迫严重影响玉米产量。在长期的生长过程中,植物已经演化出不同的生理结构和遗传机制来应对非生物胁迫^[1-3]。植物通过对存在于逆境中的信号进行感知和转导,促进与胁迫相关的基因表达和蛋白质合成,进而引发植物生理生化的改变,这有助于减轻非生物胁迫造成的损害^[4]。

铁氧还蛋白(Fd)是一种低分子量、可溶性的、含有[2Fe-2S]簇的氧化还原中心酸性电子传递蛋白,广泛存在于各种动植物和微生物体内,在光合电子传递中起着核心作用,对CO₂和其他代谢产物的同化所需的还原力和ATP能量的形成至关重要^[5]。高等植物的Fd蛋白可分为光合型(叶型)Fd、非光合型(根型)Fd以及具有C末端延伸的FdC1和FdC2蛋白^[6]。在植物光合作用过程中,光系统II(PSII)催化水裂解反应,产生高能电子,电子通过质体醌(PQ)传递给细胞色素(Cyt)b₆f复合物,并被光系统I(PSI)接收。随后PSI将电子传递给叶绿体基质中的可溶性电子受体Fd,光合型Fd将光系统I的电子传递给Fd-NADP⁺还原酶(FNR)、亚硫酸盐还原酶、亚硝酸还原酶和谷氨酸合成酶等几种Fd依赖的同化酶,从而参与碳同化、氮同化、硫同化、叶绿素代谢、光敏色素合成、脂肪酸合成及部分植物激素的代谢过程和调节反应^[7]。

研究表明,Fd是细胞器对多种环境刺激进行整合以及与其他细胞器进行信号交流所必需的蛋白^[8],参与多种生理生化过程,在植物发育过程中发挥着重要的作用,特别是在活性氧(ROS)代谢途径中具有关键的调控作用^[9]。ROS是分子氧还原后生成的化学性质活泼的氧代谢产物及其衍生物的总称,是氧化还原反应的副产物,少量的ROS可以作为第二信使参与多种细胞信号通路的调节过程,但ROS产生过多则会引起细胞毒害效应。干旱、盐胁迫、重金属等非生物胁迫会使植物细胞中的ROS水平急剧变化^[10-11]。

源自甜椒(*Capsicum frutescens*)的类植物铁氧

还蛋白,可提升植物抵御多种生物和非生物胁迫的能力^[12]。在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中沉默Fd基因后,在光胁迫的条件下,叶片中的ROS含量增加,叶片黄化^[13]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,*AtFd2*的缺失导致ROS在叶绿体中积累,这可能是过量的电子从PSI转移到O₂导致的^[14]。在长日照与短日照培养条件下,*AtFd2*敲除突变体(*AtFd2-KO*)植株的出花期相较于野生型提前^[15]。*OsFd1*是水稻中主要的光合碳同化电子传递蛋白,将来自光系统I的电子提供给铁氧还蛋白-NADP⁺还原酶。*Fd1*的缺失破坏了光合电子传递,影响水稻的碳同化,导致突变体失绿,在三叶期死亡,一些依赖Fd的基因的表达水平也随之发生变化。*OsFd3*主要在水稻根部表达,受硝酸盐和铵的诱导^[16]。*OsFd4*有助于增强氧化应激抗性,但会削弱水稻对白叶枯病菌的防卫应答。*OsFd4*敲除突变体在关键农艺性状和稻瘟病抗性方面不存在缺陷,且植株对白叶枯病的抗性增强,但相较于野生型,其对过氧化氢(H₂O₂)处理更敏感^[17]。

在C4作物玉米中,*ZmFd1*和*ZmFd2*分别在叶肉细胞和束鞘细胞中表达,二者的表达可以由光诱导,在叶中表达量高,*ZmFd1*和*ZmFd2*均属于光合型铁氧还蛋白^[7];而*ZmFd3*、*ZmFd4*和*ZmFd6*优先在根中表达,三者编码的蛋白均属于非光合型铁氧还蛋白^[18]。*ZmFdVI*在根中表达并被硝酸盐迅速诱导,表明其在硝酸盐同化中发挥作用^[19]。通过抑制*ZmFd3*基因的表达,可以提高作物对病毒的抗病性^[20]。前人对FdC蛋白进行研究发现,FdC具有C末端延伸,与Fd具有高度相似性,且FdC2相对于FdC1具有更长的C末端延伸区域^[21]。*ZmFdC2*基因在玉米叶肉和束鞘细胞中均有表达,*ZmFdC2*突变导致幼苗死亡。与野生型植株相比,*AtFdC1*突变体的生长发育没有发生明显变化。*OsFdC2*突变体表现出叶片发黄、开花延迟等症状,暗示FdC2可能在玉米发育过程中发挥重要作用^[22]。

越来越多的研究表明Fd在对抗多种生物及非生物胁迫的生理过程中发挥重要作用,然而,目前

有关Fd参与玉米逆境胁迫响应的生理生化作用以及分子机制的研究相对较少。本研究从热带玉米自交系CML288中克隆出*ZmFdx5*基因,对其进行生物信息学分析,初步探索*ZmFdx5*基因的功能及其在不同组织中的表达特征,并研究*ZmFdx5*基因在盐胁迫和干旱胁迫等非生物胁迫下的表达情况,以期为深入研究*ZmFdx5*基因参与逆境胁迫响应的分子机制提供参考,为抗逆分子育种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料及逆境处理方法

选取籽粒饱满、大小均匀的热带抗逆性玉米自交系CML288种子,于人工气候室水培种植。用2%次氯酸钠(NaClO)消毒30 min,再用去离子水清洗3次,每次1 min,待种子表面的残留物彻底冲洗干净后,将种子浸泡于蒸馏水中,使其充分吸收水分12 h;将吸过水的玉米种子置于底部铺有湿润滤纸的培养皿上,放入25 °C的培养箱中,在黑暗条件下催芽,待种子芽长约0.5 cm时(24 h),将其移入培育箱中,在光照培养室中育苗;光照强度设置为光照处理9 h,黑暗处理15 h。于每日8:00开始光照,温度设置为(28±2) °C。待玉米幼苗生长至两叶一心时,挑选出生长均匀的玉米幼苗,去除胚乳后,移入霍格兰营养液中并培养至三叶一心期,选取长势一致的玉米幼苗,分别获取根、茎、叶组织,每个处理均设置3个生物学重复,经过液氮速冻后保存于-80 °C冰箱中,用于组织特异性表达分析。

参考文献[23–24]并结合本研究前期预实验结果,取三叶一心期生长良好且长势相同的幼苗进行处理,选取浓度为300 mmol·L⁻¹的NaCl溶液和20%的PEG 6 000溶液进行盐胁迫和干旱胁迫处理,于每日10:00开始进行处理,取样时间设为0、6、12、24、48 h,取样部位为叶片,每个处理均设置3个生物学重复,用液氮冷冻并置于-80 °C超低温冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取及cDNA合成

用TRIzol法提取不同处理的玉米CML288的总RNA,采用HiScript® III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒进行反转录,获得cDNA第一链,用于玉米*ZmFdx5*基因的克隆。运用Evo M-MLV

RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR Ver.2试剂盒将RNA反转录为cDNA,之后将其作为qRT-PCR模板,分别检测*ZmFdx5*基因在不同组织及逆境胁迫下的表达情况。

1.2.2 *ZmFdx5*基因的克隆

以玉米参考基因组B73序列(Zm00001eb260150)为参考序列,使用Primer Premier 5软件设计获得特异性引物,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。用反转录得到的玉米全基因组cDNA作为模板进行*ZmFdx5*基因的cDNA扩增。PCR反应程序为:94 °C预变性2 min,98 °C变性10 s,53 °C退火30 s,68 °C延伸1 min,35个循环。PCR反应结束后,将扩增产物置于4 °C保存。电泳检测PCR产物并回收目的条带,将其连接到pCE3BluntVector克隆载体上,提取质粒进行后续测序。将符合要求的产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析

使用DNAMAN软件对*ZmFdx5*蛋白序列进行比对分析,使用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)网站预测蛋白序列的氨基酸数量、蛋白分子式等;使用在线软件CDD-search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)分析蛋白的保守结构域;使用TMHMM 2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对跨膜结构域进行预测;使用SignalP 5.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)进行信号肽分析。利用STRING 12.0软件(<https://cn.string-db.org/>)预测蛋白相互作用关系,保留可信度大于0.400的蛋白,隐藏与*ZmFdx5*无相互作用的蛋白。在SOPMA(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=/NPSA/npsa_sopma.html)网站预测*ZmFdx5*蛋白的二级结构;借助SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)开展同源建模以预测*ZmFdx5*蛋白的三级结构。使用MEGA-11软件构建系统发育树。

1.2.4 玉米*ZmFdx5*基因表达模式分析

分别提取玉米自交系CML288植株不同部位(根、茎、叶)以及正常处理、盐胁迫和干旱胁迫处理(0、6、12、24、48 h)的植株叶部RNA,以不同样本的RNA模板反转录获得的cDNA作为qRT-PCR

模板。使用Primer Premier 5软件设计qRT-PCR所需引物,内参基因为*Actin*,所用引物见表1。

表1 PCR引物

Table 1 PCR primers		
引物名称	引物序列(5'—3')	用途
<i>ZmFdx5</i> -F	CTTTTGAATGGGTGGACG	基因克隆
<i>ZmFdx5</i> -R	GCACAGCCAGTATTGAGACAT	
q- <i>ZmFdx5</i> -F	TTTTGAATGGGTGGACGAA	qRT-PCR
q- <i>ZmFdx5</i> -R	TGCGGGTAATGGCTGGA	
<i>Actin</i> -F	TGCTATCCAGGCTGTTCT	qRT-PCR
<i>Actin</i> -R	CATTAGGTGGTCGGTGAG	

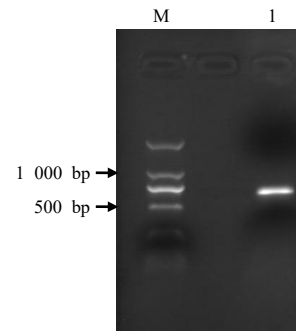
按照SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit试剂盒说明书配制反应体系,每个处理设置3个生物学重复和3次技术重复,并以无菌水为模板作阴性对照。使用的荧光定量PCR仪型号为CFX96,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 玉米*ZmFdx5*基因的克隆与序列分析结果

以*ZmFdx5*-F和*ZmFdx5*-R为扩增引物,以玉米自交系CML288叶片cDNA为模板进行PCR扩增。琼脂糖凝胶电泳结果(图1)表明,*ZmFdx5*基因扩增产物的

序列长度为500~1 000 bp。序列分析结果(图2)表明,该基因CDS序列长度为585 bp,编码194个氨基酸,与B73参考序列相比仅有10个碱基差异,一致性达98.29%。利用DNAMAN软件对玉米Fd家族蛋白进行序列比对发现,*ZmFdx5*蛋白相较于其他蛋白在N端多出约50个氨基酸,*ZmFdc*蛋白与*ZmFdx*蛋白具有高度相似性,与*ZmFdx*蛋白序列相比,*ZmFdc1*、*ZmFdc2*具有更长的C末端延伸区域,*ZmFdx5*蛋白与家族其他蛋白氨基酸序列一致性较高,尤其在[2Fe-2S]簇结合位点附近保守性更高(图3)。



M为DL 2000 Marker,泳道1为*ZmFdx5*基因PCR产物。

图1 *ZmFdx5*基因PCR产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of the PCR product of *ZmFdx5*

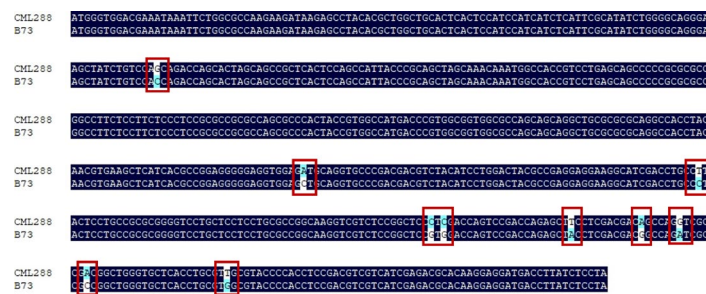
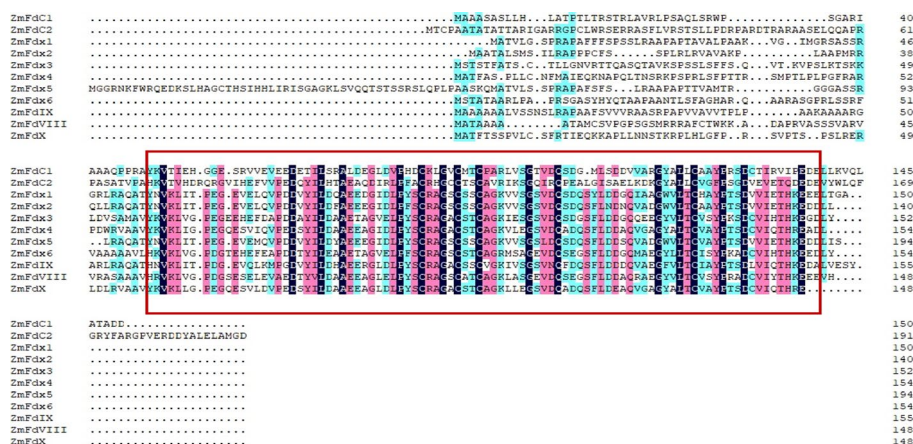


图2 B73与CML288 *ZmFdx5*基因CDS序列对比

Fig. 2 Comparison of *ZmFdx5* CDS sequences of B73 and CML288



红色方框内为fer2超家族保守结构区域。

图3 玉米Fd蛋白家族成员序列比对

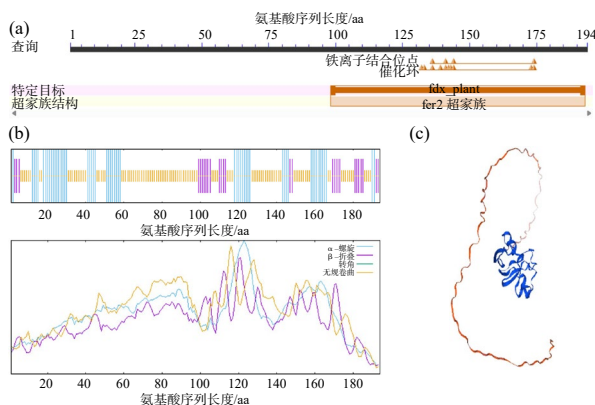
Fig. 3 Sequence alignment of Fd proteins family members in maize

2.2 玉米ZmFdx5蛋白的生物信息学分析结果

2.2.1 ZmFdx5蛋白的理化性质分析、保守结构域分析及蛋白结构预测结果

运用在线网站对ZmFdx5蛋白序列进行分析,结果表明ZmFdx5蛋白的分子式为 $C_{894}H_{1423}N_{255}O_{294}S_9$,相对分子质量为20 736.21,蛋白等电点理论值为5.8,平均亲水性系数为-0.253,不稳定系数为61.06。分析结果表明,ZmFdx5蛋白属于亲水性、不稳定蛋白。蛋白跨膜结构预测结果显示:ZmFdx5蛋白不含有跨膜结构域,主要分布于细胞膜外;同时该蛋白不存在典型的信号肽趋势,剪切位点(CS)数为0,信号肽SP(Sec/SPI)概率仅为0.000 4,表明ZmFdx5蛋白不含信号肽并且是非跨膜蛋白。

使用NCBI的保守结构域数据库(CDD-search)对ZmFdx5的氨基酸序列进行保守结构域分析。结果(图4(a)和图4(b))显示,ZmFdx5蛋白在第97~181位氨基酸之间存在一个fer2超家族结构域;其二级结构主要由无规则卷曲和 α -螺旋组成,含有少量的延伸链。使用SWISS-MODEL同源建模的方法对ZmFdx5蛋白的三级结构进行预测,结果(图4(c))表明,ZmFdx5蛋白三级结构预测模型的全局模型质量估计(GMQE)值为0.74,相似度为96.39%,主要由无规则卷曲和 α -螺旋组成,与二级结构预测结果一致。



(a) 保守结构域分析; (b) 二级结构预测; (c) 三级结构预测

图4 ZmFdx5蛋白的生物信息学分析结果

Fig. 4 Bioinformatics analysis result of ZmFdx5 protein

2.2.2 ZmFdx5蛋白相互作用预测结果

通过STRING12.0软件构建Fdx5蛋白互作网络,结果如图5所示。图5中,与Fdx5蛋白存在互作的蛋

白均为已知3D结构的蛋白;蛋白间的不同颜色连线表示不同类型的功能关联,连线长度无实际意义。由图5可见:网络互作的节点为11个、边数为21条,平均局部聚类系数0.834;ZmFdx5蛋白可能与NAR1蛋白(A0A1D6L4C0)、铁硫氧还蛋白还原酶(FTRC)、铁氧还蛋白还原酶(A0A1D6QNR8)、光系统I反应中心亚基III(PsaF/A0A096RAV0)、光系统I反应中心亚基II(PsaB/B4FAW3_MAIZE)、光系统I反应中心亚基IV-A(PsaE/B6TH55_MAIZE)等蛋白具有相互作用,且其与光系统I反应中心亚基家族的互作关系更为密切。

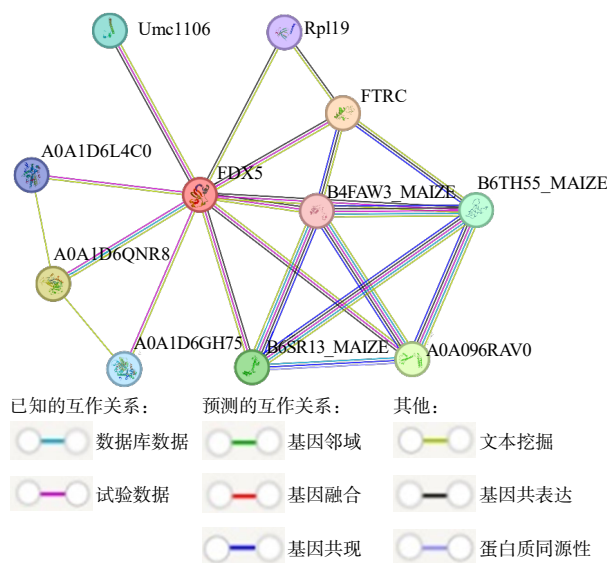


图5 ZmFdx5蛋白相互作用预测网络

Fig. 5 ZmFdx5 protein interaction prediction network

2.2.3 ZmFdx5蛋白多序列比对及系统进化树构建

利用水稻、拟南芥的Fd蛋白与ZmFdx5蛋白构建系统发育树,聚类分析结果(图6)表明,玉米ZmFd蛋白(11个)和水稻OsFd蛋白(7个)以及拟南芥AtFd

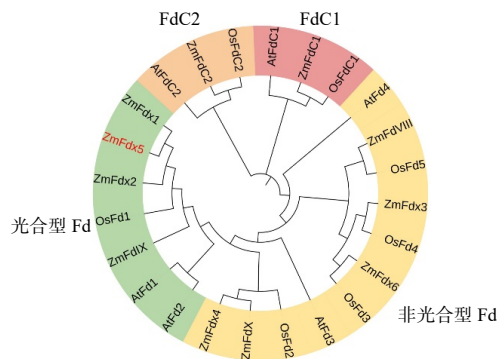


图6 玉米、水稻、拟南芥Fd蛋白系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of Fd protein in maize, rice and Arabidopsis

蛋白(6个)在系统发育树中可分为4类,分别为FdC1、FdC2、光合型Fd、非光合型Fd。ZmFdx5蛋白与ZmFdx1、ZmFdx2、OsFd1、ZmFdIX、AtFd1、AtFd2蛋白聚集在光合型Fd组,推测ZmFdx5可能是玉米中的光合型Fd。

在NCBI数据库中对ZmFdx5蛋白序列进行同源比对,筛选出粟、高粱、水稻等6个单子叶植物和陆地棉、拟南芥、大豆等6个双子叶植物,探究玉

米ZmFdx5与其他不同物种间的同源关系。系统进化分析结果(图7)显示,12个Fdx5同源蛋白聚为2个组,单子叶植物和双子叶植物各为一组,说明Fdx5基因在单子叶植物和双子叶植物分化后分别进行了独立演化。值得注意的是,在单子叶植物组中玉米ZmFdx5蛋白与高粱、柳枝稷等C4植物具有更近的亲缘关系,暗示Fdx5蛋白可能在C3和C4植物间进行了独立分化。

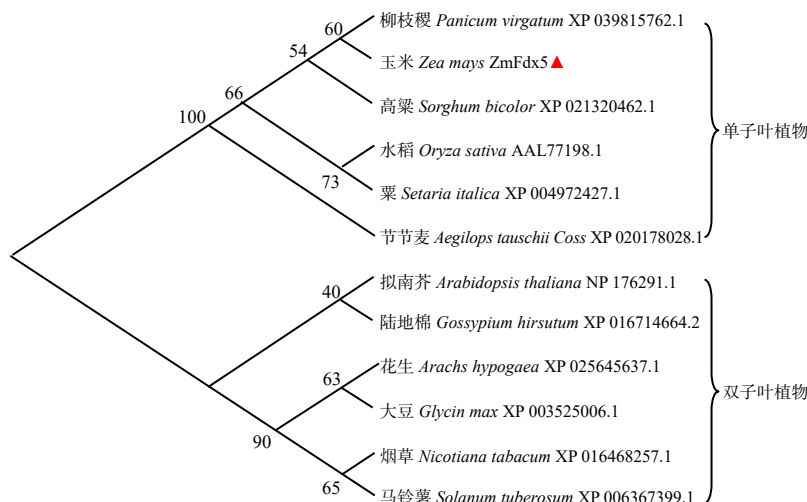


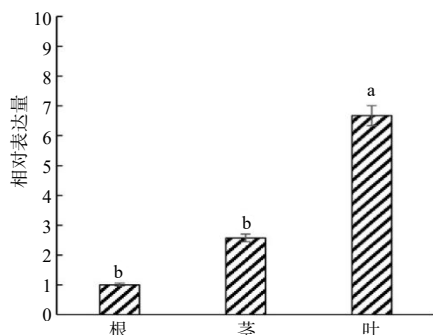
图7 ZmFdx5同源蛋白系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of ZmFdx5 homologous proteins

2.3 ZmFdx5的表达模式分析结果

2.3.1 ZmFdx5在不同组织中的表达模式分析结果

根据组织特异性表达及其参与的代谢途径的不同,植物Fd基因可分为光合型和非光合型。为了评估ZmFdx5的作用,检测其在不同组织中的相对表达量。结果(图8)表明,ZmFdx5基因在根、茎、叶中均有表达,在叶片中的相对表达量显著高于根和茎的($P<0.05$),说明ZmFdx5基因主要在叶中表达,表明ZmFdx5蛋白属于光合型Fd。



不同小写字母表示组织间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

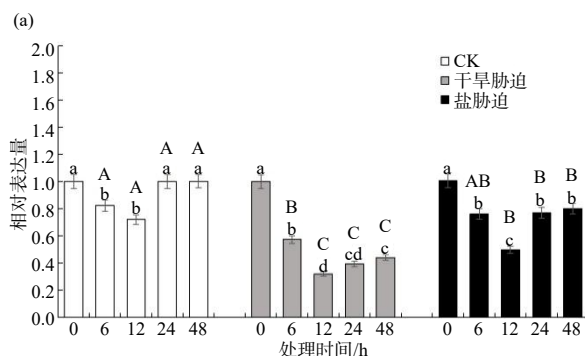
图8 ZmFdx5基因在不同组织的相对表达量

Fig. 8 Relative expression level of ZmFdx5 gene in different tissues

2.3.2 ZmFdx5在不同胁迫处理下的表达模式分析结果

为验证ZmFdx5基因是否在玉米中响应逆境胁迫,通过qRT-PCR检测分析ZmFdx5基因在不同胁迫处理下的响应情况,结果如图9所示。由图9可见:在正常条件下,ZmFdx5相对表达量在6 h和12 h均下调,而随着时间的延长,相对表达量在24 h和48 h回到正常水平,表明基因的表达可能受昼夜节律的影响。在干旱处理下,ZmFdx5相对表达量呈先下降后上升趋势,在6、12、24和48 h时与对照(0 h)相比存在显著差异($P<0.05$),且在12 h处于最低水平。在盐胁迫处理下,ZmFdx5相对表达量随着时间的延长呈先降低后回升的趋势,ZmFdx5相对表达量在12 h处于最低水平,而6、24、48 h时其相对表达量无显著变化,但与对照(0 h)相比差异显著($P<0.05$)。对同一时间、不同处理间的相对表达量进行分析,结果表明,在6 h盐胁迫处理下,ZmFdx5基因相对表达量与对照组的差异不显著,但是在12、24、48 h盐胁迫和干旱胁迫下ZmFdx5基因相对表达量均显著低于对照组(CK)的($P<0.05$)。以上研究结果表明,

*ZmFdx5*基因响应干旱和盐胁迫。



不同小写字母表示同一处理、不同时间下的差异有统计学意义($P < 0.05$);
不同大写字母表示同一时间、不同处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图9 *ZmFdx5*基因的表达模式分析

Fig. 9 Expression pattern analysis of *ZmFdx5* gene

3 讨论

3.1 *ZmFdx5*为光合型Fd蛋白

铁氧还蛋白(Fd蛋白)作为电子传递体,在生物体内参与多种还原反应。根据Fd的氧化还原电势和功能差异可将其分为光合型(叶)和非光合型(根)。与非光合型Fd相比,光合型Fd的氧化还原电势较低,主要存在于植物光合组织(叶)中,光合型Fd接收PSI的光合电子,并将这些电子提供给下游与Fd相关的酶,参与代谢过程。非光合型Fd的氧化还原电势较高,主要存在于植物非光合组织(根)中,根型铁氧还蛋白-NADP⁺还原酶(FNR)从NADPH(还原型辅酶II)收集电子,非光合型Fd从根型FNR接收电子,再将电子转运给Fd依赖的酶来参与非光合组织的代谢过程^[25]。

为了预测玉米Fdx5的光合类型,对玉米、水稻和拟南芥的Fd蛋白进行系统发育树分析,结果表明,*ZmFdx5*与玉米中的*ZmFdx1*、*ZmFdx2*,拟南芥中的*AtFd1*、*AtFd2*以及水稻中的*OsFd1*聚集在光合型Fd组,因此,推测*ZmFdx5*可能是玉米中的光合型Fd。前人研究发现,光合型Fd主要在叶片中表达。例如,在拟南芥中光合型Fd1与Fd2主要在叶片中表达^[26];水稻光合型Fd蛋白的编码基因*OsFd1*的转录水平在光合组织中最高,其主要在叶片中表达,在其他部位的表达量较低。*OsFdC2*在叶片、叶鞘、幼穗和茎中均有表达,但在叶片中的表达量高于其他器官中的表达量,*OsFdC2*表达量约为*OsFd1*的15%^[27]。*OsFd4*在非光合组织中的表达量最高,其主要在水稻根部表达,在叶片和穗中的表达较

低^[17]。玉米*Fd1*和*Fd2*受光诱导,主要在叶片中表达^[7],qRT-PCR试验结果表明,*ZmFdx5*基因主要在叶片中表达,进一步验证了*ZmFdx5*蛋白在玉米中属于光合型Fd蛋白。

3.2 *ZmFdx5*互作蛋白预测

蛋白质在生物体内发挥着重要的生理功能,许多蛋白质需要与其他蛋白质或分子形成复合物,通过蛋白互作发挥其生理功能^[28]。通过对Fdx5蛋白的互作网络进行预测发现,该蛋白可能与NAR1蛋白(A0A1D6L4C0)、铁硫氧还蛋白还原酶(FTRC)、铁氧还蛋白还原酶(A0A1D6QNR8)、光系统I反应中心亚基III(PsaF/A0A096RAV0)、光系统I反应中心亚基II(PsaB/B4FAW3_MAIZE)、光系统I反应中心亚基IV-A(PsaE/B6TH55_MAIZE)等蛋白存在互作关系。NAR1蛋白含有铁硫(Fe-S)簇,作为辅助蛋白可能与Fd蛋白存在互作,在光合作用、氧化还原反应和基因组稳定性等方面具有重要作用^[29]。FTRC与Fd之间的互作主要通过电子传递实现。在光合作用的光反应阶段,PSI产生的电子通过Fd传递给FTRC,再由FTRC传递给Trx或其他需要电子的受体^[30]。这一过程是光合作用中能量转换和物质合成的关键步骤之一。有研究表明,*ZmFd1*与*ZmFTRA1*、*ZmFd2*与*ZmFTRB*具有互作关系,表明Fd蛋白与下游受体具有相互作用^[22]。Fd7通过氧化还原途径在集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803抵御过氧化氢和逆境胁迫中发挥着重要作用^[31]。光系统I反应中心亚基是构成PSI的核心部分,主要负责将光能转化为化学能,并促进电子从质体蓝素或细胞色素c6传递到Fd^[32]。前人通过酵母杂交试验发现,*ZmFdC2*与PSI反应中心亚基*ZmPsaD2*和*ZmPsaC*存在相互作用^[22],表明光系统I反应中心亚基在维持反应中心的结构稳定性、促进电子传递以及与其他蛋白复合物的相互作用中发挥着重要作用^[33]。*OsFd4*可以直接与*OsFd1*相互作用,敲除*OsFd4*基因会导致*OsFd1*表达量上调,表明*OsFd4*与*OsFd1*共同调控水稻对胁迫的防卫^[17]。根据上述结果可知,*ZmFdx5*基因可能在复杂的氧化还原途径中具有重要作用,且*ZmFdx5*蛋白可能与其家族蛋白成员产生互作,从而影响植物的光合作用以及生长发育。

3.3 Fd蛋白参与逆境胁迫响应

铁氧还蛋白(Fd蛋白)是卡尔文循环及细胞内

ROS水平调控的关键蛋白,非生物胁迫会导致细胞内活性氧(ROS)的积累,影响细胞的光合作用、呼吸作用等代谢过程,破坏植物细胞的正常生理功能,导致细胞内氧化还原状态的失衡^[34]。这种失衡会直接影响铁氧还蛋白的活性,从而影响铁氧还蛋白的表达水平。近年来,越来越多的铁氧还蛋白基因被发现,而不同种类的铁氧还蛋白因受逆境胁迫的影响,其表达模式也有所不同^[35]。CECCOLI等^[36]将蓝藻(*Cyanobacteria*)中的*pAnFd*基因导入烟草后,发现在遭受冷害等逆境时,*pAnFd*基因表达量显著降低。在文心兰(*Oncidium hybridum*)中,随着时间的延长,*OnFd*基因在重度盐胁迫和干旱胁迫处理下的表达量呈上升趋势,而其在IAA、SA、ABA等激素处理下的表达量则呈下降的趋势^[37]。LEHTIMÄKI等^[38]研究发现,在干旱胁迫下拟南芥*Fd*基因家族整体的转录水平降低,但*Fd1*基因的表达量升高。LIU等^[39]对长期高光强度下拟南芥*Fd*基因的表达进行了研究,发现*AtFd1*基因表达水平在48 h显著上升后呈下降趋势,而*AtFd2*基因的表达水平呈下降趋势。目前,已在玉米中鉴定出光合型铁氧还蛋白编码基因*ZmFd1*与*ZmFd2*以及非光合型铁氧还蛋白编码基因*ZmFd3*、*ZmFd4*与*ZmFdVI*。*ZmFd1*和*ZmFd2*主要在叶中表达,响应光的诱导^[7];*ZmFd3*、*ZmFd4*、*ZmFdVI*主要在根中表达,其中,*ZmFdVI*基因在硝酸盐胁迫下的表达量显著降低,而在光照强度下,*ZmFdVI*基因在叶片中不响应光的诱导^[19]。目前,有关*ZmFdx5*基因响应逆境胁迫的研究较少。为此,本文作者分别对重度盐胁迫和干旱胁迫以及不同处理时间下的*ZmFdx5*基因的表达模式进行分析,发现*ZmFdx5*基因在盐胁迫和干旱胁迫下的表达量均显著降低,与*pAnFd*、*OnFd*、*AtFd2*、*ZmFdVI*等基因在响应逆境胁迫下的表达情况一致,这表明该基因参与玉米对非生物胁迫的应答,为解析玉米抗逆机制提供了参考。本试验主要在重度盐胁迫和干旱胁迫下对*ZmFdx5*基因进行研究,未涵盖不同强度的胁迫条件,无法明确*ZmFdx5*基因表达与胁迫强度的关系,难以确定其响应阈值。后续将探索*ZmFdx5*基因在不同生长阶段、不同组织以及不同胁迫强度等条件下的表达情况,以便深入探究*ZmFdx5*基因逆境胁迫的分子机制。

4 结论

本研究从热带玉米自交系CML288中克隆出*ZmFdx5*基因,发现该基因含有1个585 bp的开放阅读框,共编码194个氨基酸,具有特有的保守结构域,不含跨膜域,无信号肽;*ZmFdx5*蛋白为亲水性不稳定蛋白,属于光合型铁氧还蛋白,可能与NAR1蛋白(A0A1D6L4C0)、铁硫氧还蛋白还原酶(FTRC)、铁氧还蛋白还原酶(A0A1D6QNR8)以及光系统I反应中心亚基III、II、IV-A等蛋白具有相互作用。玉米*ZmFdx5*基因主要在叶片中表达,且在盐胁迫和干旱胁迫条件下其表达量相较于对照组明显降低。

参考文献:

- [1] FITYUSHIN M A, KOCHIEVA E Z, SHCHENNIKOVA A V. *ZmDREB2.9* gene in maize(*Zea mays* L.): genome-wide identification, characterization, expression, and stress response[J]. *Plants*, 2022, 11(22): 3060.
- [2] HÜTSCH B W, JUNG S, SCHUBERT S. Comparison of salt and drought-stress effects on maize growth and yield formation with regard to acid invertase activity in the kernels[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2015, 201(5): 353–367.
- [3] RADIĆ V, BALALIĆ I, JAČIMOVIĆ G, et al. Impact of drought and salt stress on seed germination and seedling growth of maize hybrids[J]. *Genetika*, 2019, 51(2): 743–756.
- [4] LI P C, CAO W, FANG H M, et al. Transcriptomic profiling of the maize(*Zea mays* L.) leaf response to abiotic stresses at the seedling stage[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 290.
- [5] HE L, LI M, CHEN D D, et al. Rice ferredoxins localize to chloroplasts/plastids and may function in different tissues[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2021, 16(9): 1926813.
- [6] GUAN X Q, CHEN S, VOON C P, et al. FdC1 and leaf-type ferredoxins channel electrons from photosystem I to different downstream electron acceptors[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 410.
- [7] GOSS T, HANKE G. The end of the line: can ferredoxin and ferredoxin NADP(H) oxidoreductase determine the fate of photosynthetic electrons?[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2014, 15(4): 385–393.
- [8] WANG M, RUI L, YAN H J, et al. The major leaf ferredoxin Fd2 regulates plant innate immunity in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(6): 1377–1390.

- [9] SHIN L J, HUANG H E, CHANG H, et al. Ectopic ferredoxin I protein promotes root hair growth through induction of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(5): 434–440.
- [10] MURATA Y, MORI I C, MUNEMASA S. Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism[J]. Annual Review of Plant Biology, 2015, 66: 369–392.
- [11] CHRISTINE H FOYER G N. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub[J]. Plant Physiology, 2011, 155(1): 2–18.
- [12] GER M J, LOUH G Y, LIN Y H, et al. Ectopically expressed sweet pepper ferredoxin PFLP enhances disease resistance to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* affected by harpin and protease-mediated hypersensitive response in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(9): 892–906.
- [13] QIU Y, ZHANG Y, WANG C, et al. Cucumber mosaic virus coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1205.
- [14] VOSS I, KOELMANN M, WOJTERA J, et al. Knockout of major leaf ferredoxin reveals new redox-regulatory adaptations in *Arabidopsis thaliana*[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(3): 584–598.
- [15] 刘兵, 魏海轩, 苏建斌, 等. 拟南芥铁氧还蛋白基因缺失促进花期提前的初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2013, 52(3): 112–116, 127.
- [16] HE L, LI M, QIU Z N, et al. Primary leaf-type ferredoxin 1 participates in photosynthetic electron transport and carbon assimilation in rice[J]. The Plant Journal, 2020, 104(1): 44–58.
- [17] LU M F, CHEN J H, MENG H, et al. Rice ferredoxin OsFd4 contributes to oxidative stress tolerance but compromises defense against blight bacteria[J]. The Crop Journal, 2023, 11(6): 1937–1942.
- [18] KIMATA-ARIGA Y, FUKUTA K, MIYATA M. Role of Histidine 78 of leaf ferredoxin in the interaction with ferredoxin-NADP⁺ reductase : regulation of pH dependency and negative cooperativity with NADP(H)[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2022, 86(5): 618–623.
- [19] SAKAKIBARA H. Differential response of genes for ferredoxin and ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase to nitrate and light in maize leaves[J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160(1): 65–70.
- [20] HAO K Q, GAO X R, YANG M R, et al. A nanomaterial for the delivery of dsRNA as a strategy to alleviate viral infections in maize[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 488: 150923.
- [21] VOSS I, GOSS T, MUROZUKA E, et al. FdC1, a novel ferredoxin protein capable of alternative electron partitioning, increases in conditions of acceptor limitation at photosystem I[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(1): 50–59.
- [22] CHEN Y, ZHONG D Y, YANG X, et al. ZmFdc2 encoding a ferredoxin protein with C-terminus extension is indispensable for maize growth[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 646359.
- [23] 陈祥静, 王聪, 吕绍芝, 等. 玉米 *ZmFAR1* 基因的克隆与表达分析[J]. 玉米科学, 2023, 31(4): 24–33.
- [24] 李培培. 干旱胁迫对玉米幼苗表达谱影响[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [25] HANKE G, MULO P. Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism[J]. Plant, Cell & Environment, 2013, 36(6): 1071–1084.
- [26] TOURNAIRE M D, SCHARFF L B, KRAMER M, et al. Ferredoxin C2 is required for chlorophyll biosynthesis and accumulation of photosynthetic antennae in *Arabidopsis*[J]. Plant, Cell & Environment, 2023, 46(11): 3287–3304.
- [27] ZHAO J, QIU Z N, RUAN B P, et al. Functional inactivation of putative photosynthetic electron acceptor ferredoxin C2(FdC2) induces delayed heading date and decreased photosynthetic rate in rice[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0143361.
- [28] JI H T, DONG H S. Biological significance and topological basis of aquaporin-partnering protein-protein interactions[J]. Plant Signaling & Behavior, 2015, 10(12): e1011947.
- [29] NAKAMURA M, BUZAS D M, KATO A, et al. The role of *Arabidopsis thaliana* NAR1 a cytosolic iron-sulfur cluster assembly component, in gametophytic gene expression and oxidative stress responses in vegetative tissue[J]. The New Phytologist, 2013, 199(4): 925–935.
- [30] YOSHIDA K, YOKOCHI Y, TANAKA K, et al. The ferredoxin/thioredoxin pathway constitutes an indispensable redox-signaling cascade for light-dependent reduction of chloroplast stromal proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(12): 102650.
- [31] MARTEYN B, DOMAIN F, LEGRAIN P, et al. The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803[J]. Molecular Microbiology, 2009, 71(2): 520–532.
- [32] XU C H, ZHU Q J, CHEN J H, et al. A unique photosystem I reaction center from a chlorophyll d-containing *Cyanobacterium acaryochloris* marina[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(10): 1740–1752.

- [17] DUDJ, LIZ J, YUANJ, et al. The TaWAK2-TaNAL1-TaDST pathway regulates leaf width *via* cytokinin signaling in wheat[J]. *Science Advances*, 2024, 10(35): eadp5541.
- [18] HUANG L J, HUA K, XU R, et al. The LARGE2-APO1/APO2 regulatory module controls panicle size and grain number in rice[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(4): 1212–1228.
- [19] LI W, WU C, HU G C, et al. Characterization and fine mapping of a novel rice narrow leaf mutant *nal9*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(11): 1016–1025.
- [20] YOU J, XIAO W W, ZHOU Y, et al. The APC/C^{TAD1}-WIDE LEAF 1-NARROW LEAF 1 pathway controls leaf width in rice[J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(11): 4313–4328.
- [21] WU W Q, LI J, WANG Q, et al. Growth-regulating factor 5 (GRF5)-mediated gene regulatory network promotes leaf growth and expansion in poplar[J]. *New Phytologist*, 2021, 230(2): 612–628.
- [22] MOREL J B, GODON C, MOURRAIN P, et al. Fertile hypomorphic *ARGONAUTE (ago1)* mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(3): 629–639.
- [23] BOHMERT K, CAMUS I, BELLINI C, et al. *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development[J]. *The EMBO Journal*, 1998, 17(1): 170–180.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 罗 维

(上接第9页)

- [33] KAPOOR K, CASHMAN D J, NIENTIMP L, et al. Binding mechanisms of electron transport proteins with cyanobacterial photosystem I: an integrated computational and experimental model[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2018, 122(3): 1026–1036.
- [34] RAMAKRISHNAN M, PAPOLU P K, SATISH L, et al. Redox status of the plant cell determines epigenetic modifications under abiotic stress conditions and during developmental processes[J]. *Journal of Advanced Research*, 2022, 42: 99–116.
- [35] MENG X G, ZHANG Y Z, WANG N, et al. Genome-wide identification and characterization of the *Prunus Persica* ferredoxin gene family and its role in improving heat tolerance[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 179: 108–119.
- [36] CECCOLIR D, BLANCON E, MEDINAM, et al. Stress response of transgenic tobacco plants expressing a cyanobacterial ferredoxin in chloroplasts[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76(6): 535–544.
- [37] 吴晓佩. 文心兰离体培养优化及转化铁氧还蛋白基因研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [38] LEHTIMÄKI N, LINTALA M, ALLAHVERDIYEVA Y, et al. Drought stress-induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(12): 1018–1022.
- [39] LIU J, WANG P, LIU B, et al. A deficiency in chloroplastic ferredoxin 2 facilitates effective photosynthetic capacity during long-term high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2013, 76(5): 861–874.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 张承平