

# 橡胶树硫氧还蛋白基因 *HbTRXo2* 克隆、表达及功能分析

杨娜<sup>1,2</sup>, 吴双<sup>1,3</sup>, 逯锐琳<sup>1</sup>, 何其光<sup>1</sup>, 胡义钰<sup>1</sup>, 朱春梅<sup>2</sup>, 王真辉<sup>1</sup>, 刘辉<sup>1\*</sup>

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南海口 571101; 2. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099; 3. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228

**摘要:** 硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 作为氧化还原调节蛋白在植物抵御非生物逆境胁迫中发挥重要作用。本研究采用 RT-PCR 从橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 中克隆了硫氧还蛋白基因 *HbTRXo2*, 该基因编码区长 594 bp, 编码 197 个氨基酸。预测 *HbTRXo2* 蛋白的分子量为 21.90 kDa, 理论等电点为 7.59。蛋白保守结构域和系统进化分析结果显示, *HbTRXo2* 含有 TRX 保守结构域, 与其他植物 o 型硫氧还蛋白聚在一起, 表明该蛋白属于 o 型硫氧还蛋白。实时荧光定量 PCR 分析表明, *HbTRXo2* 基因在橡胶树根、树皮、胶乳、成熟叶、衰老叶、新梢、雌花和雄花组织中均表达, 其中在胶乳中的表达量显著高于其他组织。同健康橡胶树相比, 割面干涸橡胶树树皮和胶乳中 *HbTRXo2* 的表达量显著降低。在低温、聚乙二醇 (PEG) 诱导的干旱以及过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 和甲基紫精 (MV) 诱导的氧化胁迫处理下, *HbTRXo2* 基因的表达显著上调, 表明该基因参与了橡胶树对非生物胁迫的应答。为了研究 *HbTRXo2* 在抗逆中的功能, 本研究构建其酵母表达载体, 并转入酿酒酵母 INVSc1 菌株中, 获得重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*)。比较重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和转空载体对照酵母 INVSc1 (pYES2) 在  $H_2O_2$ 、PEG 和低温胁迫处理后的存活差异。结果显示, 重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 在 PEG 和  $H_2O_2$  处理后的存活率明显高于对照酵母, 而在低温胁迫处理后的存活率明显低于对照酵母, 表明转 *HbTRXo2* 基因提高了重组酵母对干旱和氧化胁迫的抗性, 但降低了对低温胁迫的抗性。以上研究结果证明, *HbTRXo2* 在橡胶树产排胶和抗逆过程中起着重要作用。本研究为进一步解析 *HbTRXo2* 在橡胶树中的生物学功能提供重要的参考依据。

**关键词:** 硫氧还蛋白; 橡胶树; 基因表达; 酵母表达; 抗氧化性; 非生物逆境胁迫

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

## Cloning, Expression and Functional Analysis of the Thioredoxin Gene *HbTRXo2* in *Hevea brasiliensis*

YANG Na<sup>1,2</sup>, WU Shuang<sup>1,3</sup>, LU Ruilin<sup>1</sup>, HE Qiguang<sup>1</sup>, HU Yiyu<sup>1</sup>, ZHU Chunmei<sup>2</sup>, WANG Zhenhui<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1\*</sup>

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China; 2. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665099, China; 3. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

**Abstract:** Thioredoxin (TRX), a redox regulatory protein, plays an important role in plant resistance to abiotic stress. In this study, *HbTRXo2*, a thioredoxin gene, was cloned from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) using RT-PCR. *HbTRXo2* contained a coding region of 594 bp encoding a protein of 197 amino acids. The predicted molecular weight and isoelectric point of *HbTRXo2* was 21.90 kDa and 7.59, respectively. The conserved domain and phylogenetic analysis showed that *HbTRXo2* had a conserved TRX domain and was clustered with other plant o-type thioredoxin, suggesting that *HbTRXo2*

收稿日期 2024-03-27; 修回日期 2024-04-02

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2024XDNY232); 国家自然科学基金面上项目 (No. 32371922); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630022023008)。

作者简介 杨娜 (2003—), 女, 本科生, 研究方向: 植物分子生物学。\*通信作者 (Corresponding author): 刘辉 (LIU Hui), E-mail: liuhui@catas.cn。

belonged to o-type thioredoxin. Quantitative real-time PCR indicated that *HbTRXo2* gene was expressed in root, bark, latex, mature leaf, senescent leaf, new shoot, female flower and male flower tissues of rubber tree, with significantly higher expression level in latex than in other tissues. Compared with the healthy rubber trees, the expression of *HbTRXo2* in the bark and latex of tapping panel dryness trees was significantly reduced. Under cold, polyethylene glycol (PEG)-induced drought, and oxidative stress induced by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and methyl violet (MV), the expression of *HbTRXo2* gene was significantly up-regulated, indicating the involvement of *HbTRXo2* in response to abiotic stress in rubber tree. To explore the function of *HbTRXo2* in stress resistance, its yeast expression vector was constructed and transferred into *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 to obtain the recombinant yeast INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*). The survival differences between the recombinant yeast INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) and the control yeast INVSC1 (pYES2) transformed with pYES2 empty vector after  $H_2O_2$ , PEG, and low temperature stress treatments were compared, and the results showed that the survival rate of INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) was significantly higher than that of INVSC1 (pYES2) after PEG and  $H_2O_2$  treatments, while the survival rate of INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) was significantly lower than that of INVSC1 (pYES2) after low temperature stress treatment, indicating that the recombinant yeast transformed with *HbTRXo2* gene improved the resistance to drought and oxidative stresses, but decreased the resistance to low temperature stress. The results demonstrate that *HbTRXo2* plays an important role in latex production and latex flow, as well as abiotic stress resistance in rubber tree. The study would provide important references for further elucidating the biological function of *HbTRXo2* in rubber trees.

**Keywords:** thioredoxin; rubber tree; gene expression; yeast expression; antioxidation; abiotic stress

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.001

硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 是生物体内广泛存在的一种高度保守、酸性、热稳定的小分子蛋白质<sup>[1-3]</sup>。硫氧还蛋白含有保守的氧化还原活性位点, 其核心序列通常为 C (G/P) PC (Cys-Gly/Pro-Pro-Cys), 极少数为 C (G/P) PS (Trp-Cys-Gly/Pro-Pro-Ser)<sup>[4-5]</sup>。硫氧还蛋白与硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TR)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 一起构成硫氧还蛋白系统<sup>[6-7]</sup>。硫氧还蛋白系统是机体重要的抗氧化系统, 在清除活性氧、维持细胞内的氧化还原稳态平衡中发挥着重要作用<sup>[6-8]</sup>。

植物硫氧还蛋白基因家族成员众多, 如水稻 (*Oryza sativa*) 基因组中含有 30 个 *TRX* 基因<sup>[9]</sup>, 甜橙 (*Citrus sinensis*) 基因组中含有 22 个 *TRX* 基因<sup>[10]</sup>。根据氨基酸序列差异, 植物硫氧还蛋白家族基因被划分为 7 种类型: f、h、m、o、x、y 和 z<sup>[1, 11]</sup>。大多数植物仅含有 1 个 o 型 *TRX* 基因, 如杨树和水稻。少数植物含有 2 个 o 型 *TRX* 基因, 如拟南芥<sup>[5]</sup>。拟南芥 *AtTRXo1* 已被证实定位于线粒体, 而 *AtTRXo2* 的亚细胞定位目前仍不清楚<sup>[12]</sup>。李宇佳<sup>[13]</sup>研究发现, 在拟南芥中超量表达 *AtTRXo1* 提高了转基因株系在盐胁迫下的发芽率, 促进了转基因植株在盐胁迫下的生长。同野生型相比, 盐胁迫下拟南芥 *AtTRXo1* 突变体种子发芽更快<sup>[14]</sup>, 植株叶片失水速率降低, 气孔关闭增加, 还原型抗坏血酸、 $H_2O_2$ 、NO 水平以及过氧化氢酶活性升高<sup>[15-16]</sup>。此外, *AtTRXo1* 通过与

ABA 受体 PYR1 (pyrabactin resistance 1) 互作参与 ABA 信号调控<sup>[17]</sup>。对豌豆 o 型 *TRX* 基因 *PsTRXo1* 的研究发现, 在烟草 BY-2 细胞中超量表达 *PsTRXo1* 提高了过氧化氢酶活性以及自噬相关基因和蛋白的表达, 降低了  $H_2O_2$  和 NO 含量, 维持了谷胱甘肽的氧化还原状态, 增强了转基因细胞对氧化胁迫的抗性<sup>[18-19]</sup>。目前, 对 o 型 *TRX* 基因的研究还不深入, 除 *AtTRXo1* 和 *PsTRXo1* 外, 未见有关其他植物 o 型 *TRX* 基因功能研究的报道。

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 作为一种重要的热带经济林木, 是重要工业原料天然橡胶的主要来源。我国橡胶树种植面积约 113.33 万  $hm^2$ , 分布在海南、云南和广东等地区, 年产天然橡胶约 80 万  $t$ <sup>[20]</sup>。低温、干旱和台风是影响我国橡胶树生长、发育和产量的 3 种主要气象灾害<sup>[21]</sup>。此外, 我国橡胶树割面干涸 (tapping panel dryness, TPD, 国内常称为死皮) 发生率高, 导致严重减产。为了探究 o 型 *TRX* 基因在橡胶树割面干涸和非生物胁迫应答中的作用, 本研究克隆橡胶树 *HbTRXo2* 基因, 分析其表达特性, 并利用酵母表达系统鉴定该基因在非生物胁迫 (氧化、低温和干旱) 抗性中的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用橡胶树品种为热研 7-33-97。树皮、胶乳、成熟叶、衰老叶、新梢、雌花和雄花

等组织样品采自中国热带农业科学院试验场六队种植的热研 7-33-97 健康植株 (树龄 16 年)。同时, 在相同树位, 选择割线 70% 左右不排胶的割面干涸橡胶树, 采集胶乳和树皮样品。根组织样品采自热研 7-33-97 组培苗。样品采集后液氮速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 用于总 RNA 提取。取移栽培养 8 个月的健康热研 7-33-97 组培苗用于各种非生物胁迫处理。

## 1.2 方法

1.2.1 非生物胁迫处理 低温 ( $4^{\circ}\text{C}$ )、聚乙二醇 (PEG) 诱导的干旱胁迫、甲基紫精 (MV) 和过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 诱导的氧化胁迫处理参照李双江等<sup>[22]</sup>的方法。PEG 采用的是 PEG6000, 处理浓度为 30%。MV 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理浓度分别为  $200\ \mu\text{mol/L}$ 、 $20\ \text{mmol/L}$ 。均在处理 0、3、6、12、24、48 h 时, 采集叶片样品。每个处理 3 次生物学重复, 每重复 3 株植株。样品采集后置于液氮速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 用于总 RNA 提取。

1.2.2 总 RNA 提取和反转录 采用植物通用提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 提取树皮、新梢、雄花、雌花、成熟叶、衰老叶和根的总 RNA, 采用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取胶乳总 RNA。RNA 经质量检测后, 采用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) 反转录合成 cDNA。具体操作方法参照相应试剂盒说明书。

1.2.3 *HbTRXo2* 基因的克隆 将拟南芥 *AtTRXo1* 基因序列 (NM\_129053.6) 在橡胶树 HeveaDB 数据库 (<http://hevea.catas.cn/home/index>) 中进行比对, 获得橡胶树的同源基因 scaffold0032\_237207, 将其命名为 *HbTRXo2*。根据 scaffold0032\_237207 序列, 利用 Primer3web (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>) 在线软件设计扩增完整编码区的引物, 并在正、反向引物 5' 端分别加上 *Kpn* I、*Xba* I 酶切位点和保护碱基, 以便于后续构建酵母表达载体。正向引物序列: 5'-TAGGTACCGGTACGACCGAACTGCATC-3', 反向引物序列: 5'-GCTCTAGATTAGTCTTCCCATAGAGTTCTTC-3'。PCR 扩增目标基因, 反应体系:  $2.5\ \mu\text{L}$  TransStart FastPfu DNA Polymerase  $1\ \mu\text{L}$ 、 $5\times$  TransStart FastPfu Buffer  $10\ \mu\text{L}$ 、 $2.5\ \text{mmol/L}$  dNTPs  $4\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{mol/L}$  正/反向引物各  $1.5\ \mu\text{L}$ 、胶乳 cDNA  $3\ \mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O  $29\ \mu\text{L}$ 。扩增程序:  $95^{\circ}\text{C}$  3 min;  $95^{\circ}\text{C}$

$20\ \text{s}$ ,  $56^{\circ}\text{C}$   $20\ \text{s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$   $45\ \text{s}$ , 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$   $10\ \text{min}$ 。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并采用 Gel Extraction Kit (OMEGA) 回收纯化目标片段。纯化片段连接到 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector (北京全式金生物技术有限公司), 转化 Trans1-T1 Phage Resistant 大肠杆菌感受态细胞, 挑取阳性单克隆送至海南楠山生物技术有限公司测序。

1.2.4 生物学信息分析 使用 SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/>) 在线数据库中的 FGENESH 工具预测基因编码区及其编码的氨基酸序列; 使用 Compute pI/Mw ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) 在线软件分析蛋白的分子量和等电点; 使用 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线软件预测 *HbTRXo2* 蛋白的保守结构域; 从 NCBI 数据下载其他植物的硫氧还蛋白序列, 使用 MEGA-X 软件中的邻接法 (neighbor-joining) 构建系统进化树, bootstrap 参数设置为 1000<sup>[23]</sup>。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 利用在线工具 Primer3web 设计 *HbTRXo2* 的 qRT-PCR 特异引物, 正向引物序列: 5'-GCAGATGTTGGACGCTTGAA-3', 反向引物序列: 5'-ACCCACTGTCATTCCATCACT-3'。内参基因使用 *HbUBC4* (正向引物序列: 5'-TCACCCTGAACCTGATAGCC-3', 反向引物序列: 5'-TTTCTTTGGTGACGCTGCAA-3')<sup>[24]</sup>。qRT-PCR 试剂采用 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus), 反应体系和反应条件参照试剂说明书, 检测采用 CFX96 型荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad)。基因相对表达量的计算采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[25]</sup>。采用 WPS office 软件进行数据处理与制图, 使用 SAS 8.1 软件分析差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

1.2.6 转 *HbTRXo2* 基因酵母 使用 Plasmid Mini Kit I (OMEGA) 提取上述测序正确单克隆和酵母表达载体 pYES2 的质粒, 进行 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切。1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 采用 Gel Extraction Kit (OMEGA) 回收纯化目标片段。使用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 (Thermo Scientific) 将回收的 *HbTRXo2* 基因与 pYES2 载体连接, 获得重组载体 pYES2-*HbTRXo2*。采用热激法将连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 并涂于含氨苄青霉素  $100\ \text{mg/L}$  的 LB 固体平板上,  $37^{\circ}\text{C}$  培养过夜。选取单克隆进行菌落 PCR 检测, 引物采用 pYES2

载体正向引物 (5'-CCCGGATCGGACTACTAGC-3') 和扩增 *HbTRXo2* 基因的反向引物。使用 Plasmid Mini Kit I (OMEGA) 提取 PCP 检测正确单克隆的质粒, 参照 pYES2 载体说明书 (Invitrogen) 制备酿酒酵母菌株 INVSc1 感受态细胞。采用醋酸锂转化法将 pYES2-*HbTRXo2* 和 pYES2 载体质粒分别转入感受态细胞中, 并涂于 SC-Ura 固体选择培养基 [DO Supplement-Ura (Clontech) 0.78 g/L、无氨基酵母氮源 6.7 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂粉 20 g/L] 上, 30 °C 倒置培养 3 d。选取 3 个单克隆摇菌, 采用酵母质粒提取试剂盒 (OMEGA) 提取质粒。采用 pYES2 载体正向引物加 *HbTRXo2* 基因反向引物或 pYES2 载体反向引物 (5'-ATTAAAGCCTTCGAGCGTCC-3') 进行 PCR 检测, 获得重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSc1 (pYES2)。

**1.2.7 重组酵母中 *HbTRXo2* 的表达检测** 将获得的重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSc1 (pYES2) 划线于 SC-Ura 固体选择培养基上, 30 °C 倒置培养 2 d。挑单克隆接种于 2 mL SC-Ura 液体选择培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 测量其 OD<sub>600</sub> 值。取一定量的培养液, 离心收集菌体, 然后用 SC-Ura 液体诱导培养基 [DO Supplement-Ura (Clontech) 0.78 g/L、无氨基酵母氮源 6.7 g/L、半乳糖 20 g/L] 重悬菌体, 并调整 OD<sub>600</sub>=0.2。取 10 mL, 30 °C, 200 r/min 诱导培养 24 h。参照酵母总 RNA 快速提取试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 提取重组酵母和对照酵母总 RNA。使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) 反转录合成 cDNA。以酿酒酵母 *Actin* 基因 (正向引物序列: 5'-AGTTGCCCCAGAAGAA CACC-3'; 反向引物序列: 5'-TACCGGCAGATTC CAAACCC-3') 作为内参基因确定每个模板 cDNA 的加入量, 再使用 *HbTRXo2* 基因引物对模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: EasyTaq DNA Polymerase (北京全式金生物技术有限公司) 0.5 μL、Buffer 2.5 μL、dNTPs 2 μL、正/反向引物各 0.5 μL、cDNA 模板 1~3 μL, 补 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25 μL。反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.8 非生物胁迫处理** 取重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSc1 (pYES2) 划线培养的单克隆, 参照上述 1.2.7 中的方法先选择培养 24 h 再诱导培养 24 h。取一定量的培养液, 离心收集菌体, 然后用无菌水重悬菌体, 并调整 OD<sub>600</sub>=2.0。氧化胁迫处理组: 取调整好的菌液 0.5 mL, 加入 20 mmol/L 或 30 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 0.5 mL 混匀; 干旱胁迫处理组: 取菌液 0.5 mL, 4000 r/min 离心 2 min, 去上清液 0.25 mL 后加入 40% 的 PEG6000 溶液 0.75 mL 混匀; 将以上各处理组置于 30 °C、160 r/min 摇床中处理。低温处理组: 取菌液 0.5 mL, 加入 0.5 mL 无菌水, 混匀后置于 -20 °C 冰箱中。每 12 h 取出解冻后再放入 -20 °C 冰箱中处理。氧化胁迫处理 0 (对照) 和 1 d, 干旱和低温处理 0 (对照)、5、7 d, 用无菌水将处理后的菌液进行 5 倍的梯度稀释。取不同稀释倍数的菌液各 5 μL 分别点样在 SC-Ura 固体选择培养基上, 每处理 3 次重复。30 °C 倒置培养 3 d, 观察比较菌落的生长差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *HbTRXo2* 基因的克隆与序列分析

采用 RT-PCR 从橡胶树胶乳中克隆了 *HbTRXo2* 基因, 测序结果显示, 克隆片段的大小为 683 bp。基因预测表明, *HbTRXo2* 基因编码区长度为 594 bp, 编码 197 个氨基酸。蛋白理化性质预测表明, *HbTRXo2* 蛋白的分子量为 21.90 kDa, 理论等电点为 7.59。保守结构域分析显示 (图 1), *HbTRXo2* 蛋白含有 TRX 保守结构域 (pfam00085), 位于第 88~192 位氨基酸, 其氧化还原活性位点核心序列为 CGPC, 位于第 119~122 位氨基酸, 表明该蛋白属于硫氧还蛋白家族的成员。

### 2.2 *HbTRXo2* 蛋白的系统进化分析

从 NCBI 数据库下载不同类型的植物硫氧还蛋白, 与 *HbTRXo2* 蛋白一起构建系统进化树, 结果如图 2 所示。这些硫氧还蛋白可分为 7 类: m、f、h、o、x、y 和 z。*HbTRXo2* 与其他植物 o 型硫氧还蛋白聚在一类, 故其属于 o 型硫氧还蛋白。o 型硫氧还蛋白又分为 2 个亚组: I 和 II。亚组 I 为单子叶植物的 o 型硫氧还蛋白, 包括水稻 OsTRXo1、玉米 ZmTRXo1 和小麦 TaTRXo; 亚组 II 为双子叶植物的 o 型硫氧还蛋白, 包括橡胶树 *HbTRXo2*、木薯 MeTRXo2、麻风树 JcTRXo1、

GCAAGACAAATCAGATATTGATAGAGAGAATGAGGAAATTTGTTGATTCGACGAATTTTGATCGCCGTGGTGAATCAATATCTGTTCAATTCGTTCTACGCTCTATGAAT  
M R E I C L I R R I F D R R G G I N I C S I R S F S R L Y E  
CCCCAATTTCAACACCCATCATTGTCTCATCCACCCCAATTTCTCCATTCCTTTGAAATCATCGTTCTGCGATGTTTCTCCATTCTGCCACTACAAGACTTCACTTATCAACCCCTT  
S P I S T P I I V S S P P N S S I P L K S S F C D V S S I P A T T R L H L S N P  
CTCTGCAATTTCAAGAACTCTTGTCTGTCGCCAGTTTCATCCAATATTACTTATCAAGTCAGAAGAAGTTCAATGGCTCAATGAAAAATATCAAGAGAAGTCTCTCCAGCAA  
S L Q F Q R T L C S S P G S S N I I L I K S E E E F N G S M K N I Q E K S L P A  
TATTCTATTCTACTGCTGCATGGTGTGGACCTGCAAGTTTATATCTCTTACTTGCAGAGCTAAGTGAGAAATACCCATCATGTTTACAACCTTATAAGATTGACATTGACCAGGATGGCC  
I F Y F T A A W C G P C K F I S P I L A E L S E K Y P H V T T Y K I D I D Q D G  
TTGGAAGCTTATTGAGTAGATTATATTACTGCTGTGCCAATCTTCATTCTTTGAAAATGGCAAAAACGCGCTGAAATTTGTTGGTCAGATGTTGGACGCTTGAAGGACACAATGG  
L G S L L S R L Y I T A V P T L H F F E N G K N A A E I V G A D V G R L K D T M  
AAGAATCTATGGGAAGGACTAA  
E E L Y G K D ▲

下划线部分为 TRX 保守结构域，星号标出的为氧化还原活性位点核心序列。

The conserved domain of TRX were underlined, and its redox active sites were marked with the asterisks.

图 1 *HbTRXo2* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of *HbTRXo2* gene and its encoded amino acid sequence

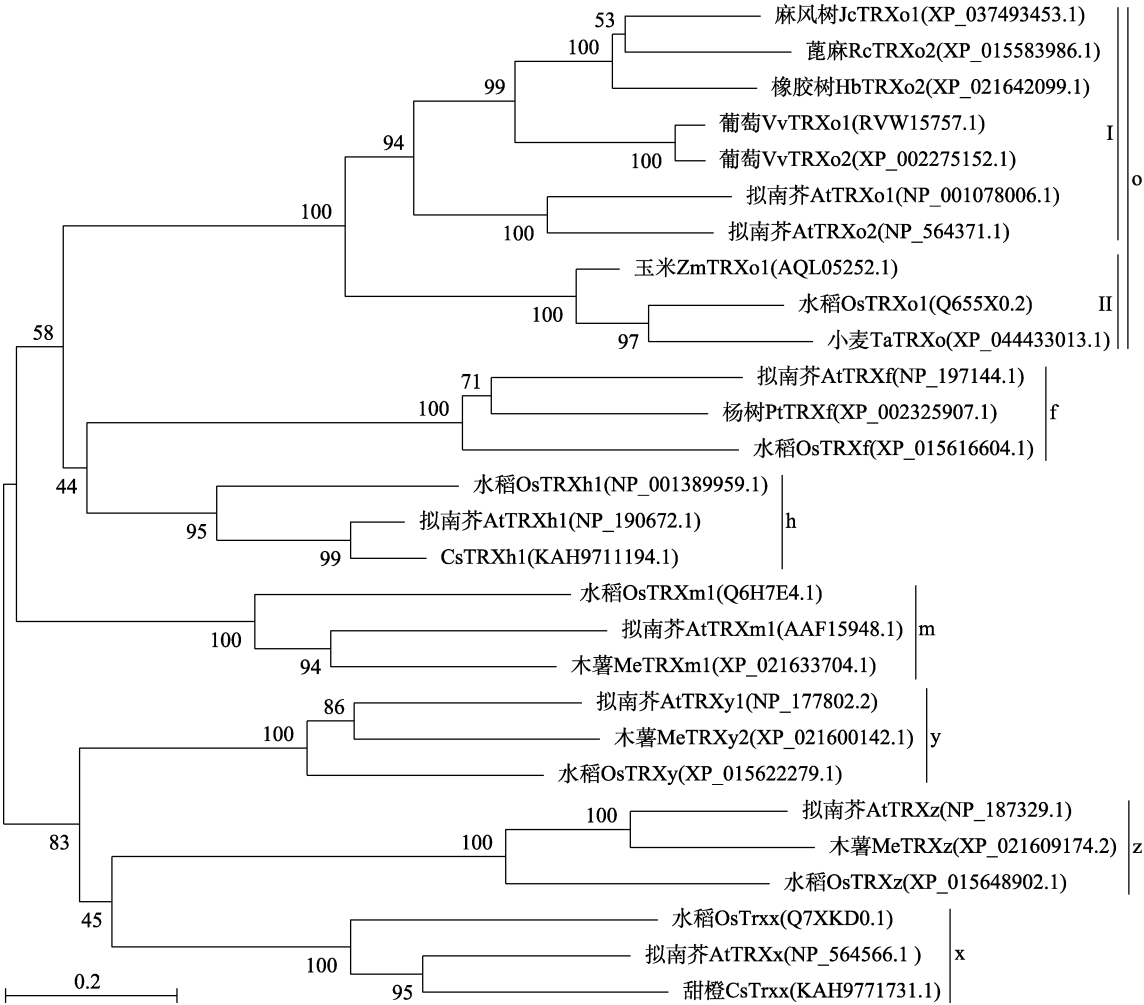


图 2 *HbTRXo2* 和其他植物硫氧还蛋白的系统进化树

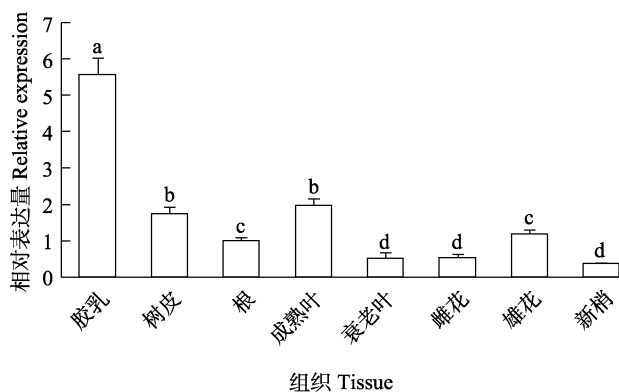
Fig. 2 Phylogenetic tree of *HbTRXo2* and other plant thioredoxins

蓖麻 RcTRXo2、拟南芥 AtTRXo1 和 AtTRXo2、葡萄 VvTRXo1 和 VvTRXo2。*HbTRXo2* 与木薯 MeTRXo2 近缘关系最近，氨基酸序列一致性为 83%，其次是麻风树 JcTRXo1 和蓖麻 RcTRXo2，氨基酸序列一致性分别为 70%和 65%。

2.3 *HbTRXo2* 基因的组织表达特性

采用 qRT-PCR 检测 *HbTRXo2* 基因在橡胶树各组织中的表达特性,结果如图 3 所示。*HbTRXo2*

基因在橡胶树根、树皮、胶乳、成熟叶、衰老叶、新梢、雌花和雄花中均表达，但表达量存在显著差异。胶乳中 *HbTRXo2* 基因的表达量最高，显著高于其他组织；成熟叶与树皮中的表达量次之，约为胶乳中表达量的 1/3；新梢中的表达量最低，不足胶乳的 1/10。同健康橡胶树相比，割面干涸橡胶树树皮和胶乳中 *HbTRXo2* 基因的表达显著降低（图 4）。

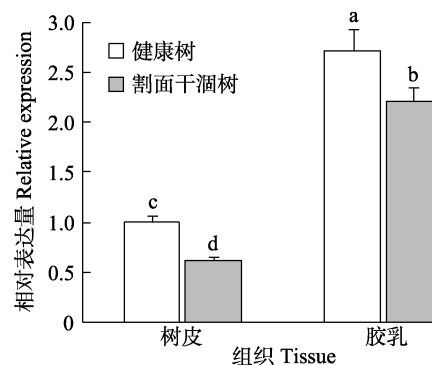


不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 3 *HbTRXo2* 在橡胶树各组织中的表达

Fig. 3 Expression of *HbTRXo2* in various tissues of *H. brasiliensis*



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

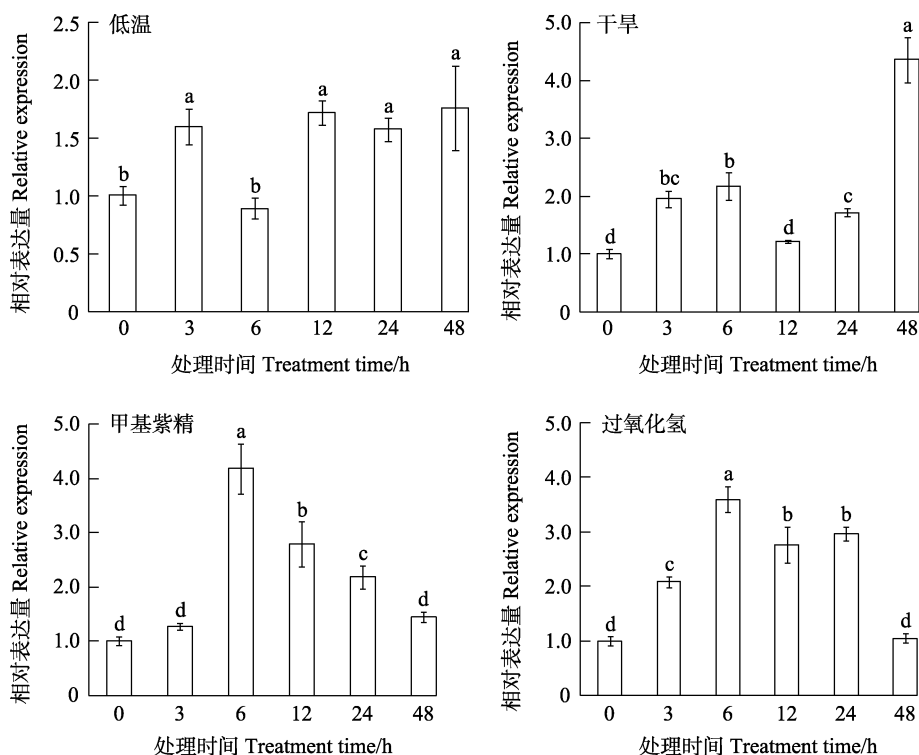
图 4 *HbTRXo2* 在健康与割面干涸橡胶树胶乳和树皮中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *HbTRXo2* in latex and bark of healthy and TPD rubber trees

## 2.4 *HbTRXo2* 的表达受非生物逆境胁迫诱导

采用 qRT-PCR 检测 *HbTRXo2* 基因在低温、干旱以及氧化胁迫下的表达变化, 结果如图 5 所示。低温胁迫处理显著上调了 *HbTRXo2* 基因的表达, 在处理 3、12、24、48 h 时, *HbTRXo2* 的表达约为处理前的 1.6 倍。PEG 诱导的干旱胁迫处理也上调了 *HbTRXo2* 基因的表达, 在处理 3、6、

24、48 h 时, *HbTRXo2* 的表达显著高于处理前。其中, 处理 48 h 时 *HbTRXo2* 的表达量最高, 为处理前的 4.4 倍。在  $H_2O_2$  和 MV 诱导的氧化胁迫下, *HbTRXo2* 基因的表达变化趋势相似, 均呈先升高后下降趋势。在处理 6 h 时, 表达量升高至最大值, 此后逐渐下降, 在处理 48 h 时, 基本下降至正常水平。以上结果表明, *HbTRXo2* 基因的



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 5 不同非生物逆境胁迫下 *HbTRXo2* 基因的表达变化

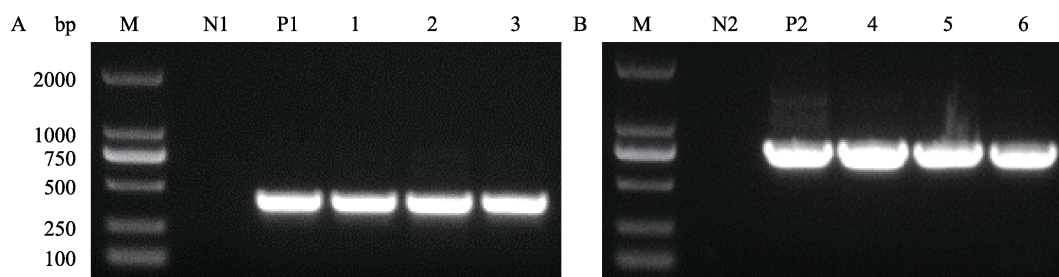
Fig. 5 Expression changes of *HbTRXo2* gene under different abiotic stresses

表达受低温、干旱和氧化胁迫的诱导。

## 2.5 *HbTRXo2* 基因在抗逆中的功能鉴定

**2.5.1 转 *HbTRXo2* 基因酵母的分子检测** 通过酶切连接的方法构建 *HbTRXo2* 基因的酵母表达载体 pYES2-*HbTRXo2*。采用醋酸锂转化法将空载体 pYES2 和 pYES2-*HbTRXo2* 质粒分别转入酿酒酵母菌株 INVSc1。挑取对照酵母 INVSc1 (pYES2) 和重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 单克隆各 3 个, 抽提质粒 DNA, 经 PCR 检测, 3

个转空载体 pYES2 的对照酵母质粒 DNA 扩增出与阳性对照 (pYES2 质粒 DNA) 大小一致的条带, 且符合预期长度 (图 6A), 3 个转 pYES2-*HbTRXo2* 的重组酵母质粒 DNA 扩增出与阳性对照 (pYES2-*HbTRXo2* 质粒 DNA) 大小一致的条带, 且符合预期长度 (图 6B)。以上结果表明, 空载体 pYES2 和 pYES2-*HbTRXo2* 成功转入对照酵母 INVSc1 (pYES2) 和重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*)。



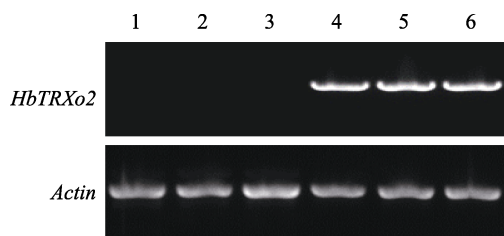
M: DL2000 DNA marker; N1、N2: 未加模板的阴性对照; P1、P2: 质粒阳性对照; 1~3: pYES2 转化酵母单克隆; 4~6: pYES2-*HbTRXo2* 转化酵母单克隆。

M: DL2000 DNA marker; N1 and N2: Negative control without template; P1 and P2: Plasmid positive control; 1~3: pYES2 transformed yeast monoclonal; 4~6: pYES2-*HbTRXo2* transformed yeast monoclonal.

图 6 INVSc1 (pYES2) (A) 和重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) (B) 的 PCR 检测

Fig. 6 PCR detection of INVSc1 (pYES2) (A) and recombinant yeast INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) (B)

为明确 *HbTRXo2* 基因是否在重组酵母中表达, 采用半定量 RT-PCR 检测 *HbTRXo2* 基因在重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSc1 (pYES2) 中的表达情况。如图 7 所示, 经半乳糖诱导 24 h 后, 重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 中可检测到外源基因 *HbTRXo2* 的表达, 而对照酵母 INVSc1 (pYES2) 中检测不到外源基因 *HbTRXo2* 的表达, 这表明 *HbTRXo2* 基因转入酵母并成功表达。



1~3: 对照酵母 INVSc1 (pYES2); 4~6: 重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*)。

1~3: Control yeast INVSc1 (pYES2); 4~6: Recombinant yeast INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*).

图 7 半定量 RT-PCR 检测 *HbTRXo2* 基因在重组酵母中的表达

Fig. 7 Semi-quantitative RT-PCR detection of *HbTRXo2* gene expression in recombinant yeast

**2.5.2 表达 *HbTRXo2* 提高了重组酵母的抗氧化性** 为明确 *HbTRXo2* 基因在氧化胁迫应答中的作用, 比较了重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSc1 (pYES2) 在 0、10、20 mmol/L  $H_2O_2$  处理 20 h 后的存活差异, 结果如图 8 所示。对照组 (无  $H_2O_2$  处理, CK) 中, 各梯度稀释浓度下重组酵母和对照酵母生长状况基本一致, 菌斑数无明显差异, 表明酵母中表达 *HbTRXo2* 基因对其正常生长无明显影响。同对照组相比,  $H_2O_2$  处理组中酵母菌斑数明显减少, 表明  $H_2O_2$  处理导致酵母细胞死亡。10、20 mmol/L  $H_2O_2$  处理组中, 各梯度稀释下重组酵母的菌斑数显著多于对照酵母, 这表明转 *HbTRXo2* 基因酵母在  $H_2O_2$  诱导的氧化胁迫下的死亡率降低, 表达 *HbTRXo2* 提高了重组酵母对氧化胁迫的抗性。

**2.5.3 表达 *HbTRXo2* 提高了重组酵母的抗旱性** 比较重组酵母 INVSc1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSc1 (pYES2) 在 PEG 诱导的干旱胁迫处理后的存活差异, 结果如图 9 所示。对照组中, 各梯度稀释浓度下重组酵母与对照酵母的生长状况基本一致, 无明显差异。30% PEG 处理诱导了酵母细胞死亡, 但在处理 5 d 和 7 d 中, 重组

酵母在  $5^{-2}$ 、 $5^{-3}$ 、 $5^{-4}$  稀释下的菌斑数明显多于对照酵母。以上结果表明, 转 *HbTRXo2* 基因酵母在 PEG 诱导的干旱胁迫下的死亡率降低, 表达 *HbTRXo2* 提高了重组酵母对于干旱胁迫的抗性。

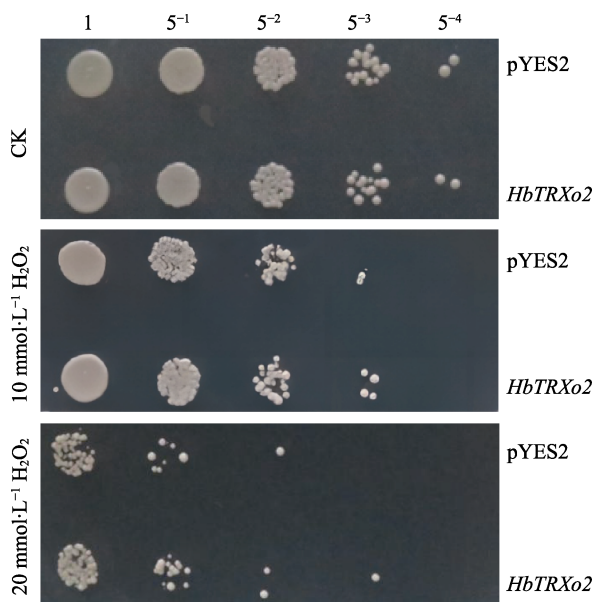


图 8  $H_2O_2$  诱导的氧化胁迫处理后, 重组酵母 INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSC1 (pYES2) 的存活差异

Fig. 8 Differences in survival between recombinant yeast INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) and control yeast INVSC1 (pYES2) after  $H_2O_2$ -induced oxidative stress treatment

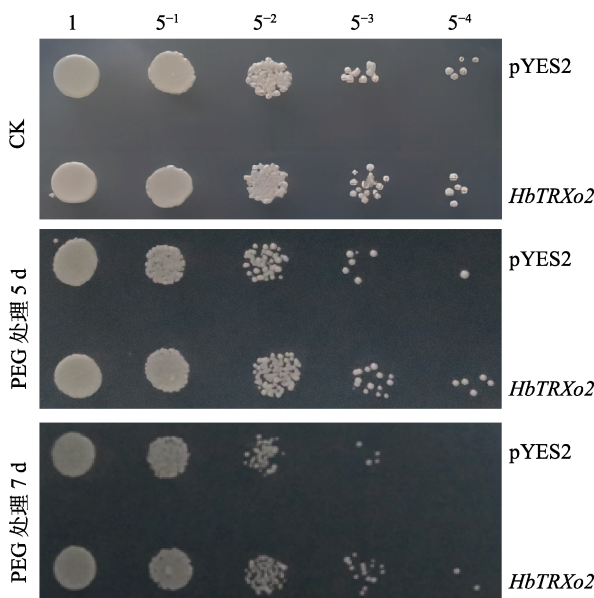


图 9 PEG 诱导的干旱胁迫处理后, 重组酵母 INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSC1 (pYES2) 的存活差异

Fig. 9 Differences in survival between recombinant yeast INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) and control yeast INVSC1 (pYES2) after PEG-induced drought stress treatment

2.5.4 表达 *HbTRXo2* 降低了重组酵母的抗寒性 比较重组酵母 INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSC1 (pYES2) 在低温胁迫处理后的存活差异, 结果如图 10 所示。对照组中, 各梯度稀释浓度下重组酵母与对照酵母的生长状况基本一致, 无明显差异。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  处理 5 d, 重组酵母在  $5^{-1}$ 、 $5^{-2}$ 、 $5^{-3}$  稀释下的菌斑数明显少于对照酵母。处理 7 d 时, 在无稀释条件下, 重组酵母的菌斑数量明显少于对照酵母; 在浓度为  $5^{-1}$  时, 对照酵母仍有少量菌斑生长, 而重组酵母无菌斑生长。以上结果表明, 转 *HbTRXo2* 基因酵母在低温胁迫下的死亡率增加, 表达 *HbTRXo2* 降低了重组酵母的抗寒性。

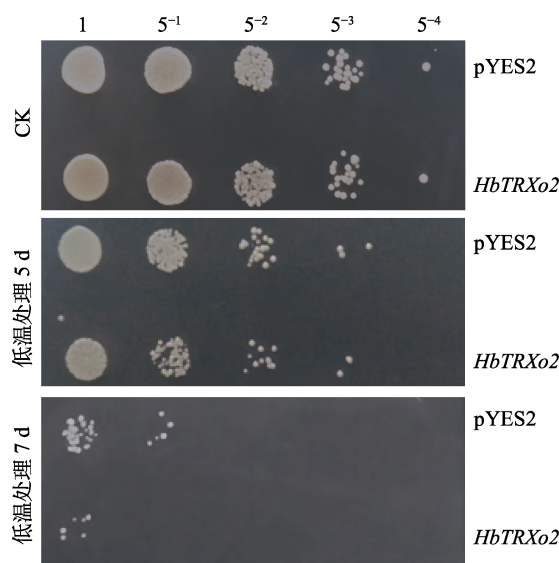


图 10 低温胁迫处理后, 重组酵母 INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) 和对照酵母 INVSC1 (pYES2) 的存活差异

Fig. 10 Differences in survival between recombinant yeast INVSC1 (pYES2-*HbTRXo2*) and control yeast INVSC1 (pYES2) after low-temperature stress treatment

### 3 讨论

硫氧还蛋白是植物体内一类重要的氧化还原调控蛋白, 在植物生长发育、生物与非生物逆境胁迫响应中发挥重要作用<sup>[1, 8, 11, 26]</sup>。植物硫氧还蛋白被分为 f、h、m、o、x、y 和 z 等 7 种类型<sup>[1, 11]</sup>, 广泛分布于几乎所有的亚细胞区室中。其中, o 型硫氧还蛋白主要存在于线粒体和细胞核中, f、m、x、y 和 z 型硫氧还蛋白主要分布于叶绿体中, 而 h 型硫氧还蛋白广泛分布于细胞质、细胞核、内质网和线粒体等中<sup>[11, 26-27]</sup>。目前, 对于细胞质和叶绿体硫氧还蛋白系统的研究较为深入, 但对

于线粒体硫氧还蛋白系统的研究较少<sup>[16, 27-28]</sup>。o 型硫氧还蛋白作为最主要的线粒体硫氧还蛋白, 对其进行深入研究将有助于增强对线粒体硫氧还蛋白系统的认识。本研究从橡胶树中克隆的 *HbTRXo2* 基因编码的蛋白含有 TRX 保守结构域 (pfam00085), 其氧化还原活性位点核心序列为 CGPC, 与其他植物 o 型硫氧还蛋白聚在一类, 说明其属于 o 型硫氧还蛋白。

ORTIZ-ESPÍN 等<sup>[14]</sup>研究发现, 拟南芥 o 型硫氧还蛋白基因 *AtTRXo1* 在根、茎、叶、花以及不同发育阶段的角果中均有表达, 但不同组织中的表达存在一定差异。为了解 *HbTRXo2* 基因的组织表达特性, 本研究检测了该基因在橡胶树根、树皮、胶乳、成熟叶、衰老叶、新梢、雌花和雄花等组织中的表达, 发现 *HbTRXo2* 在各组织中均表达, 但不同组织间存在明显差异。*HbTRXo2* 在胶乳中的表达量显著高于其他组织, 且在产量显著降低的割面干涸植株胶乳中的表达显著降低, 这与本课题组前期克隆的橡胶树 h 型硫氧还蛋白基因 *HbCXXS1* 的表达相似<sup>[29]</sup>, *HbTRXo2* 和 *HbCXXS1* 等硫氧还蛋白基因可能在维持橡胶树乳管系统的氧化还原稳态平衡中发挥重要作用。杨洪等<sup>[30]</sup>通过比较健康树和不同程度割面干涸橡胶树树皮线粒体超微结构及活性氧代谢相关基因表达差异认为, 线粒体等细胞器氧化损伤是橡胶树割面干涸发生的关键过程。本研究发现, *HbTRXo2* 在割面干涸橡胶树中的表达显著降低, 而酵母中超量表达 *HbTRXo2* 能提高对氧化胁迫的抗性。据此, 推测 *HbTRXo2* 基因表达的降低导致细胞内氧化还原稳态失衡, 活性氧过量积累损伤线粒体, 进而导致橡胶树割面干涸的发生。*HbTRXo2* 基因可能通过调节抗氧化性在橡胶树割面干涸发生过程中起着重要作用, 增强 *HbTRXo2* 基因的表达或许能降低橡胶树割面干涸的发生。

硫氧还蛋白在植物抵御非生物逆境胁迫过程中发挥着重要的生物学功能<sup>[1, 26]</sup>。荆晓妹等<sup>[31]</sup>研究发现, 在烟草中超量表达秋茄 (*Kandelia candel*) f 型硫氧还蛋白基因 *KcTrxf* 能提高转基因植株对盐胁迫的抗性。对中国野生葡萄—燕山葡萄 (*Vitis yeshanensis* Yanshan) y 型硫氧还蛋白基因 *VyTRXy* 的研究表明, 在本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 中超量表达 *VyTRXy* 可以提高转基因植株的抗旱性<sup>[32]</sup>。对拟南芥和豌豆 o 型硫氧还蛋白基因 *AtTRXo1* 和 *PsTRXo1* 的研究证实, o 型硫氧还蛋白

基因也参与了非生物逆境胁迫应答<sup>[13-14, 18-19]</sup>。拟南芥中超量表达 *AtTRXo1* 能提高抗盐性<sup>[13]</sup>, 而在烟草 BY-2 细胞中超量表达 *PsTRXo1* 能增强转基因细胞的抗氧化性<sup>[18-19]</sup>。本研究发现, 在低温、干旱和氧化胁迫下橡胶树 *HbTRXo2* 基因的表达显著上调, 表明该基因参与非生物逆境胁迫应答。为鉴定该基因在非生物逆境胁迫中的功能, 本研究构建 *HbTRXo2* 基因的酵母表达载体, 并将其转入了酿酒酵母。对转基因酵母进行 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化胁迫、PEG 诱导的干旱胁迫和低温胁迫处理发现, 转 *HbTRXo2* 基因提高了重组酵母对氧化和干旱胁迫的抗性, 但却降低了对低温的抗性。据此推测, *HbTRXo2* 基因可用于橡胶树非生物逆境胁迫抗性遗传改良, 通过基因工程手段在橡胶树中超量表达该基因可能提高植株的抗旱性, 而敲除或抑制该基因的表达可能提高植株的抗寒性, 后续还需在橡胶树体内进一步验证该推测是否正确。由于 *HbTRXo2* 基因在干旱和低温应答中的功能截然不同, 这可能会制约该基因的利用。因为在改善一种抗性的同时可能会对另一种抗性产生不利影响。造成 *HbTRXo2* 基因在干旱和低温应答中的功能差异以及如何合理利用该基因用于橡胶树非生物逆境胁迫改良仍需进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] GEIGENBERGER P, THORMÄHLEN I, DALOSO D M, FERNIE A R. The unprecedented versatility of the plant thioredoxin system[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(3): 249-262.
- [2] LUAN J, DONG J, SONG X, JIANG J, LI H. Overexpression of *Tamarix hispida* *ThTrx5* confers salt tolerance to *Arabidopsis* by activating stress response signals[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 1165.
- [3] 刘雷, 尹钧. 硫氧还蛋白的研究[J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(2): 219-225.  
LIU L, YIN J. Study on thioredoxin revisited[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2003, 34(2): 219-225. (in Chinese)
- [4] SERRATO A J, GUILLEMINOT J, MEYER Y, VIGNOLS F. AtCXXS: atypical members of the *Arabidopsis thaliana* thioredoxin h family with a remarkably high disulfide isomerase activity[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(3): 611-622.
- [5] CHIBANI K, WINGSLE G, JACQUOT J P, GELHAYE E, ROUHIER N. Comparative genomic study of the thioredoxin

- family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*[J]. Molecular Plant, 2009, 2(2): 308-322.
- [6] 孙虎, 薛保国, 杨丽荣, 全鑫, 朱自贤, 武超, 马雪娇. 植物硫氧还蛋白系统[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(4): 748-753.
- SUN H, XUE B G, YANG L R, QUAN X, ZHU Z X, WU C, MA X J. Plant thioredoxin system[J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(4): 748-753. (in Chinese)
- [7] SCHURMANN P, JACQUOT J P. Plant thioredoxin systems revisited[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2000, 51: 371-400.
- [8] SEVILLA F, CAMEJO D, ORTIZ-ESPÍN A, CALDERÓN A, LÁZARO J J, JIMÉNEZ A. The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(10): 2945-2955.
- [9] NURUZZAMAN M, GUPTA M, ZHANG C, WANG L, XIE W, XIONG L, ZHANG Q, LIAN X. Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280(2): 139-151.
- [10] ZUO X, YANG C, YAN Y, HUANG G, LI R. Systematic analysis of the thioredoxin gene family in *Citrus sinensis*: identification, phylogenetic analysis, and gene expression patterns[J]. Plant Signaling & Behavior, 2023, 18(1): 2294426.
- [11] KANG Z, QIN T, ZHAO Z. Thioredoxins and thioredoxin reductase in chloroplasts: a review[J]. Gene, 2019, 706: 32-42.
- [12] LALOI C, RAYAPURAM N, CHARTIER Y, GRIENENBERGER J M, BONNARD G, MEYER Y. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(24): 14144-14149.
- [13] 李宇佳.  $O_1$ 型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, 2008.
- LI Y J. Functional analysis of thioredoxin gene of *Arabidopsis O\_1* under stress[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008. (in Chinese)
- [14] ORTIZ-ESPÍN A, IGLESIAS-FERNÁNDEZ R, CALDERÓN A, CARBON-ERO P, SEVILLA F, JIMÉNEZ A. Mitochondrial *AtTrxo1* is transcriptionally regulated by *AtbZIP9* and *AtAZF2* and affects seed germination under saline conditions[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(5): 1025-1038.
- [15] CALDERÓN A, SÁNCHEZ-GUERRERO A, ORTIZ-ESPÍN A, MARTÍNEZ-Z-ALCALÁ I, CAMEJO D, JIMÉNEZ A, SEVILLA F. Lack of mitochondrial thioredoxin  $o1$  is compensated by antioxidant components under salinity in *Arabidopsis thaliana* plants[J]. Physiologia Plantarum, 2018, 164(3): 251-267.
- [16] SÁNCHEZ-GUERRERO A, NADAL M, FLOREZ-SARASA I, RIBAS-CARBÓ M, VALLARINO J G, DE BRASI-VELASCO S, FERNIE A R, FLEXAS J, JIMÉNEZ A, SEVILLA F. Decreased levels of thioredoxin  $o1$  influences stomatal development and aperture but not photosynthesis under non-stress and saline conditions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3): 1063.
- [17] DE BRASI-VELASCO S, SÁNCHEZ-GUERRERO A, CASTILLO M C, VERTOMMEN D, LEÓN J, SEVILLA F, JIMÉNEZ A. Thioredoxin TRX $o1$  is involved in ABA perception via PYR1 redox regulation[J]. Redox Biology, 2023, 63: 102750.
- [18] ORTIZ-ESPÍN A, LOCATO V, CAMEJO D, SCHIERMEYER A, DE GARA L, SEVILLA F, JIMÉNEZ A. Over-expression of *Trxo1* increases the viability of tobacco BY-2 cells under  $H_2O_2$  treatment[J]. Annals of Botany, 2015, 116(4): 571-582.
- [19] DE BRASI-VELASCO S, LÓPEZ-VIDAL O, MARTÍ MC, ORTIZ-ESPÍN A, SEVILLA F, JIMÉNEZ A. Autophagy is involved in the viability of overexpressing thioredoxin  $o1$  tobacco BY-2 cells under oxidative conditions[J]. Antioxidants, 2021, 10(12): 1884.
- [20] 刘锐金, 黄华孙. “十四五”时期推动天然橡胶产业健康发展的思考[J]. 中国热带农业, 2021(4): 5-12.
- LIU R J, HUANG H S. Thoughts on promoting the healthy development of natural rubber industry during the 14th Five-Year Plan Period[J]. Chinese Tropical Agriculture, 2021(4): 5-12. (in Chinese)
- [21] 刘琰琰, 韩冬, 杨菲, 杨再强. 气象灾害对橡胶树的影响及风险评估综述[J]. 福建林业科技, 2016, 43(3): 244-252.
- LIU Y Y, HAN D, YANG F, YANG Z Q. Impacts of meteorological disasters on rubber trees and risk assessment review[J]. Fujian Forestry Science and Technology, 2016, 43(3): 244-252. (in Chinese)
- [22] 李双江, 冯成天, 胡义钰, 袁坤, 刘进平, 王真辉, 刘辉. 橡胶树 *HbDCHAR2* 基因克隆及表达分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(3): 25-32.
- LI S J, FENG C T, HU Y Y, YUAN K, LIU J P, WANG Z H, LIU H. Cloning and expression analysis of *HbDCHAR2* gene in *Hevea brasiliensis*[J]. North China Journal of Agronomy, 2021, 36(3): 25-32. (in Chinese)
- [23] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.

- [24] LI H, QIN Y, XIAO X, TANG C. Screening of valid reference genes for real-time RT-PCR data normalization in *Hevea brasiliensis* and expression validation of a sucrose transporter gene *HbSUT3*[J]. Plant Science, 2011, 181(2): 132-139.
- [25] SCHMITTGEN TD, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [26] SEVILLA F, MARTÍ M C, DE BRASI-VELASCO S, JIMÉNEZ A. Redox regulation, thioredoxins, and glutaredoxins in retrograde signalling and gene transcription[J]. Journal of Experimental Botany, 2023, 74(19): 5955-5969.
- [27] MEYER Y, BELIN C, DELORME-HINOUX V, REICHHELD J P, RI-ONDET C. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2012, 17(8): 1124-1160.
- [28] 秦童, 黄震, 康振辉. 叶绿体硫氧还蛋白系统的调节机制[J]. 植物学报, 2019, 54(1): 119-132.
- QIN T, HUANG Z, KANG Z H. Regulatory mechanisms of chloroplast thioredoxin system[J]. Acta Botanica Sinica, 2019, 54(1): 119-132. (in Chinese)
- [29] 王帅, 袁坤, 何其光, 胡义钰, 冯成天, 王真辉, 刘进平, 刘辉. 橡胶树硫氧还蛋白基因 *HbCXXS1* 的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报, 2022, 38(12): 214-222.
- WANG S, YUAN K, HE Q G, HU Y Y, FENG C T, WANG Z H, LIU J P, LIU H. Cloning and expression analysis of thioredoxin gene *HbCXXS1* from *Hevea brasiliensis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(12): 214-222. (in Chinese)
- [30] 杨洪, 王立丰, 代龙军, 郭冰冰. 死皮对橡胶树树皮线粒体超微结构及活性氧代谢的影响[J]. 植物研究, 2023, 43(1): 69-75.
- YANG H, WANG L F, DAI L J, GUO B B. Effects of tapping panel dryness on mitochondrial ultrastructure and ROS metabolism in barks of rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Bulletin of Botanical Research, 2023, 43(1): 69-75. (in Chinese)
- [31] 荆晓妹, 孙苑玲, 向敏, 钱泽勇, 郎涛, 赵瑞, 沈昕, 陈少良. 秋茄硫氧还蛋白调控活性氧平衡增强烟草耐盐机制研究[J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(6): 17-26.
- JING X S, SUN Y L, XIANG M, QIAN Z Y, LANG T, ZHAO R, SHEN X, CHEN S L. Study on mechanism of regulating active oxygen balance and enhancing salt tolerance of tobacco by *Kandelia obovata*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(6): 17-26. (in Chinese)
- [32] XIANG J, LI M, LI Y, LIU Y, WEI L, ZHENG T, WU J, YU Y, CHENG J. Overexpression of grapevine *VyTRXy* improves drought tolerance by maintaining photosynthesis and enhancing the antioxidant and osmolyte capacity of plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(22): 16388.