DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.01049

杂交小麦抗坏血酸过氧化物酶基因克隆及其在种子老化中的潜在功能分析

岳洁茹^{1,2,3,**} 白建芳^{2,3,**} 张凤廷^{2,3} 郭丽萍^{2,3} 苑少华^{2,3} 李艳梅^{2,3}
张胜全^{2,3} 赵昌平^{2,3,*} 张立平^{1,2,3,*}

¹ 北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; ² 北京市农林科学院北京杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097; ³ 杂交小麦分子遗传北京市重点实验室, 北京 100097

摘要: 以 BS 型二系杂交小麦 BS1453/11GF5135 及其 BS1453 (母本)、11GF5135 (父本) 的种子为材料, 在 BS1453/11GF5135 中通过同源克隆获得抗坏血酸过氧化物酶基因 *TaAPX*。该基因包含一个 832 bp 的 ORF, 共编码 277 个氨基酸。通过进一步生信分析预测 miRNA 与 *TaAPX* 基因的互作关系, 发现 *TaAPX* 基因可能受 miR396 等抗逆及种子活力相关 miRNAs 的调控。另外通过蛋白互作预测分析, 发现 APX 蛋白主要与氧化还原相关的酶互作反应。通过对不同老化时间的父母本及杂交种的胚进行 qPCR 及酶活性分析, 发现 *TaAPX* 基因在杂交种及亲本中的表达趋势是先被诱导上调表达, 后下调表达, 但杂交种子内 *TaAPX* 基因的表达量在第 7 天才开始下降, 而亲本种子内 *TaAPX* 基因的表达量在第 5 天开始下降, 且 miR396 与 *TaAPX* 互为拮抗作用。随着老化时间的延长, 亲本种子内 APX 酶活性表现为下降趋势, 杂交种子内 APX 酶活性在第 3 天呈短暂下降趋势, 随后上升, 第 9 天开始下降, 表明在老化条件下杂交种子内 APX 酶清除体内过氧化物的能力高于亲本, 即杂交种抗老化能力高于其父母本, 且 *TaAPX* 基因对种子活力的调控是一个复杂的多因素参与的调控过程。本研究为进一步研究 BS 型杂交小麦种子活力的分子调控机理奠定了一定的基础。

关键词: BS 型杂交小麦; 人工老化; 抗坏血酸过氧化物酶; 基因克隆; 表达分析

Cloning and potential function analysis of ascorbic peroxidase gene of hybrid wheat in seed aging

YUE Jie-Ru^{1,2,3,**}, BAI Jian-Fang^{2,3,**}, ZHANG Feng-Ting^{2,3}, GUO Li-Ping^{2,3}, YUAN Shao-Hua^{2,3}, LI Yan-Mei^{2,3}, ZHANG Sheng-Quan^{2,3}, ZHAO Chang-Ping^{2,3,*}, and ZHANG Li-Ping^{1,2,3,*}

¹ College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; ² Beijing Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; ³ Municipal Key Laboratory of the Molecular Genetics of Hybrid Wheat, Beijing 100097, China

Abstract: In this study, the seeds of two-line hybrid wheat of BS-type BS1453/11GF5135 and its parents BS1453 (female parent) and 11GF5135 (male parent) were used as materials, and the ascorbate peroxidase gene (*TaAPX*) was obtained by homologous cloning in BS1453/11GF5135. The gene contains an open reading frame (ORF) of 832 bp, which encoded a total of 277 amino acids. The interaction between miRNAs and *TaAPX* was predicted by bioinformatics analysis, and the results showed that *TaAPX* may be regulated by miR396 and other miRNAs that related to stress resistance and seed viability. In addition, it was found that APX protein mainly interacted with redox-related enzymes via protein interaction prediction analysis. qPCR and enzyme activity analysis were conducted on embryos of parents and hybrid at different aging time, it was found that the expression trend of *TaAPX*

本研究由国家重点研发计划项目(2018YFD0100904), 北京市优秀人才项目和北京市农林科学院杰出科学家项目(JKZX201907)资助。This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0100904), the Beijing Excellent Talents Project, and the Outstanding Scientist Program of Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences (JKZX201907).

* 通信作者(Corresponding authors): 张立平, E-mail: lpzhang8@126.com; 赵昌平, E-mail: cp_zhao@vip.sohu.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 岳洁茹, E-mail: 1041705041@qq.com; 白建芳, E-mail: baijianfang1313@yahoo.com

Received (收稿日期): 2020-06-12; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-10-28.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201028.1416.004.html>

gene in hybrid and parents were first up-regulated and then down-regulated. However, the expression of *TaAPX* gene in hybrid seeds peaked on the seventh day, and it began to decline in parents seeds on the fifth day. There was an antagonistic effect between miR396 and *TaAPX*. With the increase of aging time, the activity of APX enzyme in parents seeds showed a downtrends, while it showed a temporary downtrends on the third day in hybrid seeds, then it increased and began to decline on the ninth day. It was suggested that the ability of APX enzyme to remove peroxides in the hybrid seeds was higher than that in the parents seeds under the aging condition, that is, the anti-aging ability of hybrid was higher than that of the parents. Moreover, the regulation of seed activity by *TaAPX* gene was a complex multi-factor regulation process. This study laid a foundation for the further research on the molecular regulation mechanism of the seed vigor of BS type hybrid wheat.

Keywords: BS type hybrid wheat; artificial aging; ascorbate peroxidase; gene cloning; expression analysis

抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)是降解过氧化氢的关键酶,能清除活性氧从而降低氧自由基的浓度,降低细胞的氧化损伤。近年来关于 APX 基因功能的研究主要集中在植物抗逆方面。例如,在非生物胁迫条件下,水稻、白桦中 APX 基因表达上调^[1-2]。在低温条件下,甘蔗体内的 *ScAPX1* 基因表达量上升^[3],且抗寒能力高的甘蔗内 *ScAPX1* 酶活性高于抗寒能力低的甘蔗;在高温条件下,转大麦 APX 基因的拟南芥叶片正常,而非转基因拟南芥的叶片出现大量枯黄^[4];在盐胁迫下,胞质超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和胞质抗坏血酸过氧化物酶(APX)双基因过表达的拟南芥植株与野生型及单基因型相比表现更好,生物量积累和纤维素含量更高^[5];在高盐、PEG、低温处理条件下,葡萄体内 7 个 APX 基因均呈现不同程度的上调表达来提高葡萄的抗逆性^[6]。水稻类囊体 APX 酶在干旱胁迫下能够使叶绿体内的 H_2O_2 和参与几个重要代谢途径的基本蛋白的积累保持稳态,从而可以更好地进行光合作用,使植株正常生长^[7]。种子活力是指种子迅速整齐萌发的发芽潜力、生长潜势和生产潜力,是种子质量的重要指标和种用价值的重要组成部分,其高低由遗传因素、种子发育期间的环境条件及种子贮藏条件 3 个方面决定^[8]。二系杂交小麦是目前小麦杂种优势利用的主要途径之一,BS 型不育系是光温敏二系杂交小麦的代表类型之一,具有不育度高、易恢复、制种性状好等特性,是北京杂交小麦品种京麦 6 号、京麦 7 号、京麦 8 号、京麦 9 号的不育系来源^[9]。目前人工老化处理是研究种子活力最常用的一种方法,并且针对二系小麦杂交种在种子活力方面已经有一定的研究,如 BNS 型小麦杂交种在不同老化处理下种子发芽率、发芽势等发芽指标以及 POD 酶活性均随着老化时间的延长而降低,但相同处理条件下各项指标高于常规小麦,表明杂交种的抗老化能力明显高于常规小麦品种^[10]。BS 型杂交小麦是由 BS 型不育系和恢复系杂交产生

的京麦系列杂交种,是不同于 BNS 型杂交小麦的一种二系杂交小麦,它们具有不同的遗传背景。目前尚未有关于 *TaAPX* 基因对 BS 型杂交小麦种子活力调控方面的研究。

因此,本研究拟利用 BS 型杂交小麦及其父母本种子为研究材料,通过对其克隆 *TaAPX* 基因,并通过生物信息学手段分析该基因的核酸及蛋白序列特征,预测与 *TaAPX* 基因互作的 miRNAs 及与其互作的相关蛋白,分析该基因的分子结构及功能,并运用实时荧光定量 PCR (fluorescent quantitative real-time PCR, qPCR) 技术,验证该基因对 BS 型杂交小麦种子活力调控方面的功能,结合种子不同老化时间 APX 酶活性变化,初步探讨 *TaAPX* 基因对 BS 型杂交小麦和常规种在老化过程中的调控方式及它们之间的区别,结合预测的 miRNAs 的功能及 APX 蛋白与其他蛋白互作的预测,为更深入研究 *TaAPX* 基因在 BS 型杂交小麦种子活力中的调控方式奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

本研究以一个杂交小麦组合 BS1453 (母本)、11GF5135 (父本)、BS1453/11GF5135 (杂交种)的种子为材料,由北京市农林科学院/北京杂交小麦工程技术研究中心提供。APX 酶活测定试剂盒购于北京索莱宝公司;RNA 提取试剂购于北京化工厂;TRIzol 试剂购自(Invitrogen, USA);培养基所用试剂和氨苄青霉素均购自中国区西格玛公司(北京);酶切试剂 Smart buffer、*Bam*H I 均购于 BioLabs;10×EasyTaq buffer 购于全式金;凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;反转录试剂盒和荧光定量试剂盒均购于 TaKaRa (Japan)。

1.2 方法

1.2.1 人工老化处理 参照宋松泉等^[11]的方法人工加速老化小麦,将 BS1453 (母本)、11GF5135 (父本)、BS1453/11GF5135 (杂交种)种子置于高温(41℃)、

高湿(相对湿度为 90%)的老化箱中老化处理, 时间分别为 0、3、5、7 和 9 d。处理完毕后, 取出种子在室温下通风晾干至初始重量备用。

1.2.2 种子形态观察及老化对种子发芽的影响

对杂交种及亲本进行种子外表饱满度形态观察, 通过室内发芽纸发芽试验对老化 0、5 d 的 BS1453/11GF5135 及 BS1453、11GF5135 种子发芽情况进行观察, 发芽第 4 天统计发芽率、根长、芽长。发芽试验设置 3 次生物学重复, 每个重复 50 粒种子。

1.2.3 酶活性的测定 用索莱宝 APX 酶活性测定试剂盒测定不同老化时间下 BS1453/11GF5135 及 BS1453、11GF5135 种子中的 APX 酶活性, 分别进行 3 次生物学重复。

1.3 APX 基因克隆与序列分析

以拟南芥 APX3 蛋白序列(GenBank 登录号为 AT4G350001)为探针, 对小麦蛋白数据库进行本地 BLAST, 获得小麦 APX 基因(ID: 100125717)。提取小麦 APX 的 CDS 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计 CDS 全长克隆引物, 由金维智(北京)合成(表 1)。以 BS1453/11GF5135 种子的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系 20 μ L: 2 $\times$ Easy Taq SuperMix 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol L⁻¹)各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 6 μ L, 扩增程序: 94 5 min; 94 30 s, 71 45 s, 72 1 min, 42 个循环; 72 10 min。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带, 连接到 16318hGFP 载体上, 连接产物转入 DH5 α 感受态细胞, 经菌落 PCR 验证后, 各挑选 7 个阳性克隆子进行测序, 测序和引物合成均由金维智(北京)公司完成。

1.4 生物信息学分析

利用在线分析工具 ExPASy ProtParam 分析

TaAPX 基因编码蛋白的理化性质; 利用 ProtScale 分析 *TaAPX* 基因编码蛋白的亲疏水性; 利用 SignalP 4.1 Server 分析 *TaAPX* 基因编码的蛋白是否为信号肽蛋白; 利用 TargetP 1.1 Server 对 *TaAPX* 基因编码蛋白的亚细胞定位进行分析。*TaAPX* 蛋白的二级结构和三级结构分别利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 进行预测; 利用 NCBI 蛋白比对工具预测 *TaAPX* 蛋白的保守结构域; 利用 DNAMAN (ver.6.0)软件将 *TaAPX* 基因编码的蛋白与其他物种的 APX 基因编码的蛋白进行多序列比对; 采用 MEGA 6.0 软件, 依照邻位归并法(NJ)构建系统进化树; 利用 PsRNATarget 在线网站 (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis>) 预测与 *TaAPX* 基因互作的 miRNAs; 利用在线蛋白互作预测网站 STRING 预测可能与 *TaAPX* 蛋白互作的蛋白。

1.5 *TaAPX* 基因表达模式的分析

设计 *TaAPX* 基因特异性引物 APX-F 和 APX-R 并进行 qPCR 扩增(表 1), 反应程序: 95 30 s, 95 5 s, 60 30 s, 45 个循环; 95 15 s, 60 1 min, 95 15 s; 60 时收集荧光信号, 设置 3 次生物学重复。基因表达量采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析, 选用 18S rRNA 作为 qPCR 内参基因^[12], 计算杂交小麦及其父母本在不同老化时间下 *TaAPX* 基因的相对表达量。

1.6 miRNA 与靶基因 qPCR 验证

利用 miRNA 的提取试剂盒(康为世纪, CW0627S)提取 miRNA, 并进行 cDNA 合成。miRNA qPCR 分析使用 miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒(康为世纪, CW2142)进行。应用程序: 95 30 s, 95 5 s, 60 30 s, 45 个循环。3 次生物学重复, U6snRNA 作为 miRNA qPCR 分析的内参, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行表达定量分析。

表 1 *TaAPX* 基因克隆及 qPCR 引物序列

Table 1 Gene cloning of *TaAPX* gene and primers of qPCR used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature ()	引物用途 Primer purpose
APX-F	TATCTCTAGAGGATCCATGGCGGCTCCGGT	71.37	扩增基因引物序列
APX-R	TGCTCACCATGGATCCTTACTTGCTCCTCTTGGAAGCCTCG	72.27	Amplified gene primer sequences
APX-qF	CAACCGTTGAGTTTCATCCCTG	57.8	荧光定量 PCR 引物序列
APX-qR	TGGTGCGCCTTTCTTAGCAT	60	RT-qPCR primer sequences
18S rRNA-qF	CGCGCTACGGCTTTGACCTA	56	内参引物序列
18S rRNA-qR	CGGCAGATTCCCACGCGTTACG	58	Internal reference primer sequences
miR396-qF	CGGTCTTCCACAGCTTTCTT	75	荧光定量 PCR 引物序列
miR396-qR	GTGCAGGGTCCGAGGT	76	RT-qPCR primer sequences
U6snRNA-qF	CAAGGATGACACGCAAATTCG	80	内参引物序列
U6snRNA-qR	GTGCAGGGTCCGAGGT	82.5	Internal reference primer sequences

2 结果与分析

2.1 种子形态观察及老化对种子发芽的影响

本研究中以光温敏雄性不育系 BS1453 (母本), 常规种 11GF5135 (父本) 及杂交种 BS1453/11GF5135 为研究对象, 通过对种子外观进行观察, 发现母本 BS1453 种皮皱瘪, 不饱满, 种皮颜色偏红; 父本种皮颜色为白色, 种子比较饱满; 杂交种 BS1453/11GF5135 种子饱满, 种皮颜色较父本深 (图 1)。发芽率统计发现, 杂交种老化前后的发芽率分别为 90% 和 35%, 父本老化前后的发芽率分别为 85% 和 25%, 母本老化前后的发芽率分别为 82% 和 28%, 表明杂交种的发芽率高于其亲本。用发芽纸进行室内发芽实验, 在发芽第四天统计根长和芽长 (图 2-A), 发现老化前后杂交种和父母本的发芽率差异极显著 ($P < 0.01$), 根长差异显著 ($P < 0.05$) (图 2-B)。

2.2 小麦 APX 基因的鉴定和序列分析

为了进一步研究杂交种高活力的机理, 以种子活力相关的小麦 APX 基因为目的基因, 以 BS1453/11GF5135 种子的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 得到一条约 850 bp 左右的明亮条带 (图 3), 与预期长度一致。切胶回收并测序, 测序结果显示, *TaAPX* 基因包含一个长度为 832 bp 的开放阅读框, 编码 277 个氨基酸。通过氨基酸序列多重比对分析后进一步发现, 杂交小麦 APX 基因所编码蛋白的氨基酸序列与小麦 A、B 和 D 基因组上的序列相同, 与普通小麦、大麦、粗山羊草的相似性达到 90% 以上 (图 4), 并且杂交种和父母本之间不存在序列变异 (图 5)。

2.3 *TaAPX* 基因编码蛋白的特征分析

运用 ExPASy ProtParam 对 TaAPX 蛋白进行理化性质分析, 结果表明 TaAPX 蛋白的分子式为

$C_{1342}H_{2127}N_{375}O_{402}S_5$, 原子总数为 4251, 相对分子质量为 30.1 kD, 理论等电点 (pI) 为 6.67, 由 20 种氨基酸组成, 其中 Ala 和 Leu 含量最高分别为 12.6% 和 10.5%, 酸性氨基酸 (Asp+Glu) 为 13.7%, 碱性氨基酸 (Arg+Lys) 为 13.4%, 不稳定系数为 29.86, 脂肪指数为 88.48, 总平均疏水性为 -0.241, 表明该蛋白是一个稳定亲水的中性蛋白。TaAPX 蛋白的亚细胞定位及信号肽预测结果表明, TaAPX 定位于细胞质且为非信号肽蛋白, 该蛋白由 α -螺旋 (41.58%), β -折叠 (7.22%), 无规则卷曲 (40.89%), 延伸链 (10.31%) 组成。其三级结构主要由螺旋和卷曲组成 (图 6-A)。利用 NCBI 进一步对 TaAPX 蛋白进行保守结构域分析发现, TaAPX 蛋白具有典型的 APX 蛋白保守结构域, 隶属于 PLN02608 超家族。利用 NetPhos 对 TaAPX 蛋白进行磷酸化位点分析, 结果表明该蛋白的氨基酸序列上存在 18 个潜在的磷酸化位点, 包括 9 个丝氨酸 (Ser)、4 个苏氨酸 (Thr) 和 5 个酪氨酸 (Tyr) 位点 (图 6-B)。PROSITE scan 数据库检测到的 TaAPX 蛋白序列中存在 3 个位点, 其中功能位点位于第 40 个氨基酸, 其他位点分别位于第 36、162 个氨基酸, TaAPX 蛋白过氧化物酶区域在 31~258 氨基酸之间。

2.4 *TaAPX* 基因编码蛋白的进化树分析

为进一步了解 *TaAPX* 基因的生物学功能, 采用 MEGA6.0 软件构建了植物 APX 蛋白氨基酸序列的系统进化树 (图 7)。将二系小麦杂交种 APX 蛋白序列与小麦 (*Triticum aestivum* L.)、粗山羊草 (*Aegilops tauschii*)、玉米 (*Zea mays* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)、高粱 (*Sorghum bicolor* L.) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 7 个物种的 APX 蛋白序列进行进化分析, 结果发现该蛋白序列与粗山羊草 (*Aegilops tauschii*) 的蛋白序列相似性为 95.19%, 与印度小麦 Raj3765 (Indian wheat cv. Raj 3765)

图 1 亲本及杂交种籽粒形态

Fig. 1 Grain morphology of parents and hybrids

图 2 人工老化前后种子萌发表现和发芽统计
Fig. 2 Seed germination phenotype and germination statistics before and after artificial aging
A: 老化处理和未老化处理的杂交种及父母本种子的萌发表型。B: 人工老化处理对杂交种及父母本的发芽率、根长、芽长的影响。发芽率在($P < 0.01$)时差异极显著, 用**表示; 根长在($P < 0.05$)时差异显著, 用*表示; 芽长差异不显著。0~5 d: 老化处理的天数。
A: germination phenotypes of artificially aged and untreated seeds of hybrid and parents. B: effects of artificial aging on germination rate, root length and shoot length of hybrids and parents. ** and * indicate significant differences at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively. 0~5 d: Day(s) of aging treatment.

图 3 *TaAPX* 基因的扩增产物
Fig. 3 Amplification products of *TaAPX* gene
M: DL2000; 1: BS1453 扩增产物; 2: 11GF5135 扩增产物; 3: BS1453/11GF5135 扩增产物。
M: DL2000 DNA marker; 1: amplified product of BS1453; 2: amplified product of 11GF5135; 3: amplified product of BS1453/11GF5135.

(*TaAPX*-AGG23553.1)的蛋白序列相似性为 94.5%, 与硬粒圆锥小麦(*TaAPX*-VAI74770.1)的蛋白序列相似性为 94.16%, 与普通小麦(*TaAPX*-ABQ53157.1)的蛋白序列相似性为 92.78%, 与大麦(*HvAPX*-AXF50251.1)的蛋白序列相似性为 92.44%, 与拟南芥(*AtAPX*-OAO98886.1)的蛋白序列相似性为 73.54%, 与玉米(*ZmAPX*-ACO90192.1)的蛋白序列相似性为 55%, 与高粱(*SbAPX*-002463451.1)的蛋白序列相似性为 57.41%, 与水稻(*OsAPX*-015630498.1)的蛋白序列相似性为 56.79%, 表明, 二系小麦杂交种与小麦野生亲缘种粗山羊草(*Aegilops tauschii*)的亲缘关系最近, 都属于 PLN02608 超家族, 具有保守的结构域。

图 4 TaAPX 氨基酸多序列比分析

Fig. 4 Multiple alignment analysis of TaAPX amino acid sequences

2.5 TaAPX 基因与 miRNA 互作的预测分析及与 TaAPX 蛋白互作蛋白的预测分析

前期研究发现 miRNA 对植物种子活力有一定的调控功能, 本研究通过预测与 TaAPX 基因互作的 miRNAs (图 8-A), 结果发现与 TaAPX 互作的已知的 miRNAs 主要包括拟南芥 (aly-miR396b-3p)、(ath-miR396b-3p)、茛苳 (bra-miR396-3p)、大豆

(gma-miR396b-3p)、(gma-miR396k-3p)、蒺藜状苜蓿 (mtr-miR396a-3p)、刺菜蓟 (cca-miR396a-3p)、杨树 (ptc-miR396e-3p), 其非配对能 UPE (unpaired energy 非配对能值越低, 蛋白和 miRNA 互作性越强) 值为 15.82; 水稻 (osa-miR444a-3p.2、osa-miR444d.2、osa-miR444e、osa-miR444f)、大麦 (hvu-miR444b)、蔗糖 (ssp-miR444a、ssp-miR444b.2) 二穗短柄草

TaAPX-BS1453/11GF5135	ATGGGGCTCCGGTGGTGGACGGCCAGTACCTTCGGCAGGTCACAGGGGGGGCGGGGGCCCTGGGGCCCTATGGCTTCAGGGAATGGCCCCCATATGCTTCGGCTGGCATGGCAGATCTGGCAGTATGATGTAACACAAGA	150
TaAPX-BS1453	ATGGGGCTCCGGTGGTGGACGGCCAGTACCTTCGGCAGGTCACAGGGGGGGCGGGGGCCCTGGGGCCCTATGGCTTCAGGGAATGGCCCCCATATGCTTCGGCTGGCATGGCAGATCTGGCAGTATGATGTAACACAAGA	150
TaAPX-11GF5135	ATGGGGCTCCGGTGGTGGACGGCCAGTACCTTCGGCAGGTCACAGGGGGGGCGGGGGCCCTGGGGCCCTATGGCTTCAGGGAATGGCCCCCATATGCTTCGGCTGGCATGGCAGATCTGGCAGTATGATGTAACACAAGA	150
Consensus	ATGGGGCTCCGGTGGTGGACGGCCAGTACCTTCGGCAGGTCACAGGGGGGGCGGGGGCCCTGGGGCCCTATGGCTTCAGGGAATGGCCCCCATATGCTTCGGCTGGCATGGCAGATCTGGCAGTATGATGTAACACAAGA	
TaAPX-BS1453/11GF5135	ACGGTCTGGCAGAAATGCTTAAATAGATACGAGGAAGATACACCAATGGTCAAAAGCTGGCTTAAATAATGCTATGATCTCTTCAGGCCATTTAAAGCGAAGATTCAAAAGTTACATATGCAGACCTTTATCAGCTTCCTGGAGTA	300
TaAPX-BS1453	ACGGTCTGGCAGAAATGCTTAAATAGATACGAGGAAGATACACCAATGGTCAAAAGCTGGCTTAAATAATGCTATGATCTCTTCAGGCCATTTAAAGCGAAGATTCAAAAGTTACATATGCAGACCTTTATCAGCTTCCTGGAGTA	300
TaAPX-11GF5135	ACGGTCTGGCAGAAATGCTTAAATAGATACGAGGAAGATACACCAATGGTCAAAAGCTGGCTTAAATAATGCTATGATCTCTTCAGGCCATTTAAAGCGAAGATTCAAAAGTTACATATGCAGACCTTTATCAGCTTCCTGGAGTA	300
Consensus	ACGGTCTGGCAGAAATGCTTAAATAGATACGAGGAAGATACACCAATGGTCAAAAGCTGGCTTAAATAATGCTATGATCTCTTCAGGCCATTTAAAGCGAAGATTCAAAAGTTACATATGCAGACCTTTATCAGCTTCCTGGAGTA	
TaAPX-BS1453/11GF5135	actgggtggcgcaaatgggttcaatagatagcgggaagatcacccatgggttcaaatgtgtgttaanaattgctatgatctctggagccattaaagcggaagatccaanaggttacaatgcagacctttatcagcttgcgtggagta	450
TaAPX-BS1453	actgggtggcgcaaatgggttcaatagatagcgggaagatcacccatgggttcaaatgtgtgttaanaattgctatgatctctggagccattaaagcggaagatccaanaggttacaatgcagacctttatcagcttgcgtggagta	450
TaAPX-11GF5135	actgggtggcgcaaatgggttcaatagatagcgggaagatcacccatgggttcaaatgtgtgttaanaattgctatgatctctggagccattaaagcggaagatccaanaggttacaatgcagacctttatcagcttgcgtggagta	450
Consensus	actgggtggcgcaaatgggttcaatagatagcgggaagatcacccatgggttcaaatgtgtgttaanaattgctatgatctctggagccattaaagcggaagatccaanaggttacaatgcagacctttatcagcttgcgtggagta	
TaAPX-BS1453/11GF5135	AAAGATTTTATAGCACTACGGGGGTCACATCTTCACTTCGGAAGAGCTGATTCGTCAGTTTCTCCCGTGAAGGGCGCTTCTCTAAGCTTGAAGAAAGGGCCACCACATTCAGGGACATTTTTTGAATGGGTAAACAGAG	600
TaAPX-BS1453	AAAGATTTTATAGCACTACGGGGGTCACATCTTCACTTCGGAAGAGCTGATTCGTCAGTTTCTCCCGTGAAGGGCGCTTCTCTAAGCTTGAAGAAAGGGCCACCACATTCAGGGACATTTTTTGAATGGGTAAACAGAG	600
TaAPX-11GF5135	AAAGATTTTATAGCACTACGGGGGTCACATCTTCACTTCGGAAGAGCTGATTCGTCAGTTTCTCCCGTGAAGGGCGCTTCTCTAAGCTTGAAGAAAGGGCCACCACATTCAGGGACATTTTTTGAATGGGTAAACAGAG	600
Consensus	AAAGATTTTATAGCACTACGGGGGTCACATCTTCACTTCGGAAGAGCTGATTCGTCAGTTTCTCCCGTGAAGGGCGCTTCTCTAAGCTTGAAGAAAGGGCCACCACATTCAGGGACATTTTTTGAATGGGTAAACAGAG	
TaAPX-BS1453/11GF5135	aaagattttagactacactatctggggccatagctctgggaagggcactctgaaaggttgggtttagcgggtgcatggaactgctgactctctgaagtttgacaactcactttcttgagctactgaanaggggaatcagagggtctctctg	750
TaAPX-BS1453	aaagattttagactacactatctggggccatagctctgggaagggcactctgaaaggttgggtttagcgggtgcatggaactgctgactctctgaagtttgacaactcactttcttgagctactgaanaggggaatcagagggtctctctg	750
TaAPX-11GF5135	aaagattttagactacactatctggggccatagctctgggaagggcactctgaaaggttgggtttagcgggtgcatggaactgctgactctctgaagtttgacaactcactttcttgagctactgaanaggggaatcagagggtctctctg	750
Consensus	aaagattttagactacactatctggggccatagctctgggaagggcactctgaaaggttgggtttagcgggtgcatggaactgctgactctctgaagtttgacaactcactttcttgagctactgaanaggggaatcagagggtctctctg	
TaAPX-BS1453/11GF5135	CTAGCTTCACAAAATACAGATCTTAACTCTCTCTGCTACCTCCACAGAGTTCAGTGGGGTAGCAGTTTCGGCAGCTCTA	831
TaAPX-BS1453	CTAGCTTCACAAAATACAGATCTTAACTCTCTCTGCTACCTCCACAGAGTTCAGTGGGGTAGCAGTTTCGGCAGCTCTA	831
TaAPX-11GF5135	CTAGCTTCACAAAATACAGATCTTAACTCTCTCTGCTACCTCCACAGAGTTCAGTGGGGTAGCAGTTTCGGCAGCTCTA	831
Consensus	CTAGCTTCACAAAATACAGATCTTAACTCTCTCTGCTACCTCCACAGAGTTCAGTGGGGTAGCAGTTTCGGCAGCTCTA	

图 5 父母本和杂交种 CDS 序列比对分析

Fig. 5 CDS alignment comparative analysis of parents and hybrid

图 6 TaAPX 蛋白的三级结构及磷酸化位点预测

Fig. 6 Prediction of tertiary structure and phosphorylation site of TaAPX protein

A: TaAPX 蛋白的三级结构; B: TaAPX 蛋白磷酸化位点的预测。

A: tertiary structure of TaAPX protein; B: phosphorylation site prediction of TaAPX protein.

(bdi-miR444b) UPE 值为 22.175; 杨树(ptc-miR169aa)、木薯(mes-miR169m、mes-miR169l)、大豆(gma-miR169k、gma-miR169l-5p)、番木瓜(cpa-miR169), UPE 值为 19.968; 水稻(osa-miR167a-3p)、玉米(zma-miR-3p), UPE 值为 19.365; 二穗短柄草(bdi-miR166h-5p)、水稻(osa-miR166i-5p), UPE 值为 17.618, 其中 miR396 与 *TaAPX* 的互作性最高, *TaAPX* 基因与 miR396 的互作位置在 *TaAPX* 基因序列 552~571 碱基的位置(图 8-D), 表明 *TaAPX* 基因可能主要受 miR396 的调控。miRNA 具有发卡结构(图 8-B), 在转录调控中作为负调控因子, 通过降解靶基因达到调控基因表达的目的。

为进一步了解 *TaAPX* 基因的功能, 本研究利用 STRING 对 *TaAPX* 蛋白潜在的互作关系进行预测分析, 结果表明 APX3 可能与谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase 2, GPX2)、谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GLDH)、编码过氧化物酶体的过氧化氢酶(Catalase, CAT)、传递电子到细胞色素氧化酶复合物的电子载体蛋白(Cytc oxidase, CYTC-1、CYTC-2)催化抗坏血酸合成的还原酶

(MDHAR)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)等蛋白互作(图 8-C)。

2.6 不同老化时间下亲本和子代种子内 *TaAPX* 基因和 miR396 表达模式分析及酶活性分析

为了进一步研究不同老化时间对种子的影响, 设置 0、3、5、7 和 9 d 老化梯度, 利用 RT-qPCR 对 5 个不同时间老化处理后的杂交种和亲本种子的胚进行 *TaAPX* 基因表达模式分析, 结果发现 2 个亲本 BS1453、11GF5135 和杂交种 BS1453/11GF5135 种子内 *TaAPX* 基因的表达均呈先升后降的趋势。在亲本种子中, *TaAPX* 基因的表达量在老化第 3 天上升并达到峰值, 随后开始下降, 老化第 5 天 *TaAPX* 基因的表达量低于第 3 天, 老化第 7 天 *TaAPX* 基因的表达量低于第 5 天, 老化第 9 天的表达量达到最低(图 9-A, B); 而杂交种 BS1453/11GF5135 种子内 *TaAPX* 基因的表达量在老化 7 d 内均呈显著上升趋势, 老化第 5 天 *TaAPX* 基因的表达量达到峰值, 老化第 7 天 *TaAPX* 基因的表达量低于第 5 天, 但是仍然高于对照, 老化第 9 天降到最低(图 9-C)。

图 7 *TaAPX* 蛋白系统进化分析
Fig. 7 Phylogenetic analysis of *TaAPX*

图 8 *TaAPX* 基因与 miRNA 和蛋白的互作模型及互作位点

Fig. 8 Interaction model and site of *TaAPX* gene with miRNA and protein

A: *TaAPX* 基因与 miRNA 的互作图; B: miRNA 的发卡结构图; C: 与 *TaAPX* 蛋白互作的蛋白的网络模型; D: *TaAPX* 基因与 miR396 的互作位点。

A: interaction mapping between *TaAPX* gene and miRNA; B: the hairpin structure diagram of miRNA; C: network model of proteins interacting with *TaAPX* proteins; D: the interaction site between *TaAPX* gene and miR396.

为了进一步研究 *TaAPX* 基因在种子活力中的调控作用, 本研究在相同的老化条件下测定杂交种和父母本种子内的 APX 酶活性变化, 结果发现, 两个亲本 BS1453、11GF5135 种子内的 APX 酶活性呈下降趋势, 但是老化第 5 天的 APX 酶活性高于老化第 3 天, 随后开始下降, 老化第 9 天 APX 酶活性最低(图 10-A, B); 而杂交种种子内酶活性变化基本与 *TaAPX* 基因的表达一致。随着老化时间的延长杂交种 BS1453/11GF5135 种子内的 APX 酶活性在老化第 3 天出现短暂的下降, 第 5 天开始上升, 老化第 7 天 APX 酶活性高于第 5 天达到峰值, 老化第 9 天开始下降(图 10-C)。

为了解 miRNA 对种子活力的调控方式, 本研究对预测到的互作关系比较强烈的 miR396, 在不同老

化程度的父母本及杂交种中进行表达模式分析, 同时分析 miRNA 对靶基因 *TaAPX* 的调控关系。结果发现 miR396 与 *TaAPX* 基因表达趋势相反, 两者呈拮抗作用(图 9)。

3 讨论

人工老化前后, BS 型杂交小麦 BS1453/11GF5135 均显示出优于亲本的种子活力(图 2), 为研究种子活力相关基因 *TaAPX* 在杂交小麦中的调控功能, 本研究以 BS 型二系小麦杂交种为研究对象, 克隆 *TaAPX* 基因, 通过生物信息学分析预测与 *TaAPX* 基因互作的 miRNAs, 发现 *TaAPX* 可能与 miR396、miR444、miR169、miR167、miR166 互作, 其中互作效应最强的 miRNA 为 miR396。有报道发

图 9 不同老化时间下 *TaAPX* 基因和 miR396 在杂交种和亲本种子胚中的表达模式分析

Fig. 9 Expression pattern analysis of *TaAPX* gene and miR396 in hybrid and parental seed embryos at different aging time

A: 不同老化条件下, *TaAPX* 基因和 miR396 在父本种子胚中的表达; B: 不同老化条件下, *TaAPX* 基因和 miR396 在母本种子胚中的表达; C: 不同老化条件下, *TaAPX* 基因和 miR396 在杂交种种子胚中的表达。0~9 d: 老化处理的天数。

A: the expression of *TaAPX* gene and miR396 in embryo of male seeds, under different aging conditions; B: the expression of *TaAPX* gene and miR396 in embryo of female seeds, under different aging conditions; C: the expression of *TaAPX* gene and miR396 in embryo of hybrid seeds, under different aging conditions. 0~9 d: day(s) of aging treatment.

图 10 不同老化时间下杂交种和亲本内 APX 酶活性分析

Fig. 10 Analysis of APX enzyme activity in hybrids and parents at different aging times

A: 不同老化条件下, APX 酶活在父本种子胚中的变化; B: 不同老化条件下, APX 酶活在母本种子胚中的变化; C: 不同老化条件下, APX 酶活在杂交种种子胚中的变化。0~9 d: 老化处理的天数。

A: changes of APX enzyme activity in embryo of male seeds, under different aging conditions; B: changes of APX enzyme activity in embryo of female seeds, under different aging conditions; C: changes of APX enzyme activity in embryo of hybrid seeds, under different aging conditions. 0~9 d: day(s) of aging treatment.

现, 这些 miRNA 与植物抗逆相关, 如在大豆中 miR396 家族调控 *GmGRF* 家族基因, 在高温胁迫下大豆中 *Gma-miR396* 在叶片中上调表达, 而在根中下调表达, 有利于抵抗高温胁迫^[13]; 在高温胁迫下, 将大豆 *gma-miR169c* 基因转入拟南芥发现拟南芥叶片加快萎蔫, 根生长减慢等症状, 表明 *gma-miR169c* 在高温胁迫下起负调控作用^[14]; 在盐胁迫条件下, 将黄瓜 miR166 基因转入拟南芥使拟南芥发芽率、根长等各项指标都比野生型高, 过表达 miR166 可以使拟南芥更好地抵抗高温胁迫^[15]。miRNA 主要是通过靶基因的负调控来进一步调控生理生化反应^[16]。有研究表明 miRNA 通过与靶基因互作, 对种子发育及活力有一定的调控作用^[17]。在水稻 ZR02 种子内 *osa-miR164c* 的下调和 *osamiR168a* 的上调有利于维持种子活力, 且 *osa-miR164c* 和 *osa-miR168a* 通过调节细胞膜的完整性来影响种子活力; miR167A 作为一个母体效应基因参与胚胎及种子发育, 当种皮的基因型为 *mir167a+/+* 和 *mir167a+/-* 时, 胚胎正常发育, 不会影响种子的发育, 当种皮的基因型为 *mir167a-/-* 时, 胚胎发育出现缺陷, 从而影响种子的发育^[18]。本研究中发现, miR396 在 3 个品种中, 表达量与 APX 基因随着老化时间的变化而呈相反的趋势(图 9), 表明 miR396 可能是通过负调控 APX 发挥功能。因此, 这些预测的 miRNA 可能通过调控 *TaAPX* 基因来提高植物的抗逆能力以及杂交种的种子活力, 其具体功能有待进一步的研究验证。

进一步的试验发现父母本和杂交种种子胚内 *TaAPX* 基因的表达量随着老化天数的增加是先上升后下降的趋势(图 9-A, B), 但是在杂交种子中 *TaAPX* 基因的表达量在 3、5 和 7 d 均高于对照, 而其父母本种子中 *TaAPX* 基因的表达量只在 3 d 高于对照, 说明杂交种子的抗老化能力要高于其亲本(图 9-C)。可能是在老化初期, 由于外界环境的变化激发了种子的抗逆应激反应, 从而激发 APX 基因的上调表达, 以保护细胞免受氧化损伤。有研究表明在 42 °C 热应激条件下, 印度小麦 Raj 3765 种子内 *TaAPX* 基因的表达量上调了 203 倍来抵抗高温胁迫^[19], 因此推测 *TaAPX* 基因在抵抗高温胁迫维持种子活力方面具有重要作用。

研究表明正常的种子内的活性氧的产生与清除之间是动态平衡的^[20], 经过老化处理的种子会破坏这种平衡, 造成细胞内 H_2O_2 的过量累积, 从而影响种子活力。但是燕麦种子随老化时间的延长, APX 活性呈先上升, 随后下降的趋势; 高阳茅种子中

APX 活性随着老化程度的加深而升高^[21]。本实验酶活性分析结果表明亲本种子随着老化天数的增加, 其 APX 酶活性总体是呈下降趋势的, 但是在杂交种中 APX 的酶活变化与这一结论正好相反, 从图中可以看出在老化 3 d 时 APX 酶活性出现短暂地下降, 但是在老化 5 d 和 7 d 呈上升趋势, 在老化 9 d 开始下降(图 10-C)。说明长时间老化处理对 BS 型小麦杂交种子内 APX 酶活的影响大于对其亲本的影响, 即老化处理会增强 APX 酶清除体内 H_2O_2 的能力, 以保护种子免受损伤。另外通过蛋白互作预测研究表明, *TaAPX* 基因对种子活力的调控作用是一个复杂的酶活反应过程, 是多种酶共同作用的结果, 具体的 APX 酶反应程序为: $2APX$ (抗坏血酸过氧化物酶) + $2AsA$ (抗坏血酸) + H_2O_2 (过氧化氢) $\rightarrow$ $2MDHA$ (单脱氢抗坏血酸) + H_2O ; GR (谷胱甘肽还原酶) 也是一种抗氧化酶, 通过 NADPH 可将 GSSG (氧化型谷胱甘肽) 还原为 GSH (还原型谷胱甘肽)^[22]; CAT 和 APX 一样作为一种抗氧化酶在维持植物细胞稳态方面具有重要作用^[23]。

4 结论

BS 型二系小麦杂交种 BS1453/11GF5135 老化前后发芽率及根长、芽长都高于亲本。研究发现 APX 酶在维持 BS 型小麦杂交种较高种子活力方面具有重要作用, 短时间的老化处理会提高 BS 型小麦的抗老化能力, 表明 BS 型小麦杂交种的抗老化能力要高于其亲本。研究通过对与 *TaAPX* 互作的 miRNA 的表达量进行分析, 发现该基因可能通过 miRNA 负调控来发挥功能。

References

- [1] Lu Z, Liu D, Liu S. Two rice cytosolic ascorbate peroxidase differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2008, 26: 1909–1917.
- [2] Wang C, Yang C P, Wang Y C. Cloning and expression analysis of an APX gene from *Betula platyphylla*. *J Northeast Agric Univ*, 2009, 37: 79–88.
- [3] 张保青, 邵敏, 黄玉新, 黄杏, 宋修鹏, 陈虎, 王盛, 谭秦亮, 杨丽涛, 李杨瑞. 甘蔗抗坏血酸过氧化物酶基因 *ScAPX1* 的克隆和表达分析. *生物技术通报*, 2019, 35: 31–37.
Zhang B Q, Shao M, Huang Y X, Huang X, Song X P, Chen H, Wang S, Tan Q L, Yang L T, Li Y R. Cloning and expression analysis of sugarcane ascorbate peroxidase gene *ScAPX1*. *Bio-technol Bull*, 2019, 35: 31–37 (in Chinese with English abstract).
- [4] Shia W M, Muramotoa Y, Uedaa A, Takabea T. Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*,

- 2001, 273: 23–27.
- [5] Shafi A, Gill T, Zahoor I, Ahuja P S, Sreenivasulu Y, Kumar S, Singh K. Ectopic expression of SOD and *APX* genes in *Arabidopsis* alters metabolic pools and genes related to secondary cell wall cellulose biosynthesis and improve salt tolerance. *Mol Biol Rep*, 2019, 46: 1985–2002.
- [6] 王晗, 刘涛, 何红红, 梁国平, 马宗桓, 毛娟, 陈佰鸿. 葡萄 *APX* 基因家族的鉴定与表达分析. 果树学报, 2020, 37: 472–484.
Wang H, Liu T, He H H, Liang G P, Ma Z H, Mao J, Chen B H. Identification and expression analysis of *APX* gene family in grape. *J Fruit Sci*, 2020, 37: 472–484 (in Chinese with English abstract).
- [7] Cunha J R, Carvalho Fabrício E L, Lima-Neto M C, Jardim-Messeder D, Cerqueira João V A, Martins M O, Fontenele A V, Márgis-Pinheiro M, Komatsu S, Silveira Joaquim A G. Proteomic and physiological approaches reveal new insights for uncover the role of rice thylakoidal *APX* in response to drought stress. *J Proteomics*, 2019, 192: 125–136.
- [8] 舒英杰, 陶源, 王爽. 高等植物种子活力的生物学研究进展. 西北植物学报, 2013, 33: 1709–1716.
Shu Y J, Tao Y, Wang S. Advances in biological research on seed vigor of higher plants. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2013, 33: 1709–1716 (in Chinese with English abstract).
- [9] 赵昌平. 中国杂交小麦研究现状与趋势. 中国农业科技导报, 2010, 12: 5–8.
Zhao C P. Status and trends of hybrid wheat research in China. *J Agric Sci Technol*, 2010, 12: 5–8 (in Chinese with English abstract).
- [10] 张自阳, 姜小苓, 茹振钢, 李淦, 刘明久. 人工老化对杂交小麦种子生理特性和种子活力变化的影响. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 81–83.
Zhang Z Y, Jiang X L, Ru Z G, Li G, Liu M J. Effects of artificial aging on physiological characteristics and seed vigor of hybrid wheat. *Jiangsu Agric Sci*, 2013, 41(2): 81–83 (in Chinese with English abstract).
- [11] 宋松泉. 种子生物学研究指南. 北京: 科学出版社, 2005. pp 92–93 (in Chinese).
Song S Q. Guide to Seed Biology Research. Beijing: Science Press, 2005. pp 92–93 (in Chinese).
- [12] 耿晓丽, 藏新山, 王飞, 张丽媛, 田雪军, 倪中福, 姚颖垠, 胡兆荣, 辛明明, 彭惠茹, 孙其信. 小麦耐热相关转录因子基因 *TabZIP28* 的分离及功能分析. 农业生物技术学报, 2016, 24: 157.
Geng X L, Zang X S, Wang F, Zhang L Y, Tian X J, Ni Z F, Yao Y G, Hu Z R, Xin M M, Peng H R, Sun Q X. Isolation and functional analysis of wheat heat resistant transcription factor gene *TabZIP28*. *J Agric Biotechnol*, 2016, 21: 157 (in Chinese with English abstract).
- [13] 刘伟灿. 干旱胁迫下大豆 *miR396* 基因家族表达分析及功能鉴定. 吉林农业大学博士学位论文, 吉林长春, 2016.
Liu W C. Expression Analysis and Functional Identification of Soybean *miR396* Gene Family under Drought Stress. PhD Dissertation of Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [14] Yu Y H, Ni Z Y, Wang Y, Wan H N, Hu Z, Jiang Q Y, Sun X J, Zhang H. Overexpression of soybean *miR169c* confers increased drought stress sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2019, 285: 68–78.
- [15] 何小梦. *miR166* 和 *miR319* 在黄瓜响应盐胁迫中的功能分析. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2019.
He X M. Functional Analysis of *miR166* and *miR319* in Cucum Response to Salt Stress. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [16] 宋超. 水稻种子人工老化过程中抗氧化系统的变化. 中国农业科学院研究生院硕士学位论文, 北京, 2012.
Song C. Changes of Antioxidant System during Artificial Aging of Rice Seeds. MS Thesis of Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [17] 刘建军, 马俊华, 孟俊文, 王自霞, 周小梅. 玉米种子老化过程中抗氧化酶活性的变化. 山西农业科学, 2013, 41: 907–910.
Liu J J, Ma J H, Meng J W, Wang Z X, Zhou X M. Changes of antioxidant enzyme activity in maize seed aging. *J Shanxi Agric Sci*, 2013, 41: 907–910 (in Chinese with English abstract).
- [18] 周洁. *microRNA 167* 基因在母系控制胚胎和种子发育中的重要作用. 上海师范大学硕士学位论文, 上海, 2019.
Zhou J. *microRNA 167* Plays an Important Role in Maternal Control of Embryo and Seed Development. MS Thesis of Shanghai Normal University, Shanghai, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [19] Jasdeep C P, Harinder V, Koushik B, Rahul S J, Gyanendra P S. Molecular cloning and in-silico characterization of high temperature stress responsive *pAPX* gene isolated from heat tolerant Indian wheat cv. Raj 3765. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 7137.
- [20] 王爱君. 芥菜种子超干处理及老化的生理生化特性研究. 西南大学硕士学位论文, 重庆, 2011.
Wang A J. Study on Physiological and Biochemical Characteristics of Mustard Seeds Treated with Super-Drying and Aging. MS Thesis of Southwest University, Chongqing, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [21] 王玉红. 高羊茅、老芒麦、燕麦种子劣变与膜结构和透性关系的研究. 中国农业大学硕士学位论文, 北京, 2008.
Wang Y H. Study on the Relationship between Seed Deterioration and Membrane Structure and Permeability of Tall Fescue, Old Mann-Wheat and Oat. MS Thesis of China Agricultural University, Beijing, China, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [22] 杨江伟. 马铃薯干旱相关 *microRNA* 的鉴定及功能研究. 甘肃农业大学博士学位论文, 甘肃兰州, 2015.
Yang J W. Identification and Functional Study of Drought-Related *microRNA* in Potato. PhD Dissertation of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [23] 龚淑敏. 甜玉米种子活力相关 *microRNA* 的鉴定与分析. 中国计量学院硕士学位论文, 浙江杭州, 2015.
Gong S M. Identification and Analysis of *microRNA* Related to Seed Vigor of Sweet Corn. MS Thesis of China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang, China, 2015 (in Chinese with English abstract with English abstract).