果 树 学 报 2020,37(4):472-484
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20190339

葡萄APX基因家族的鉴定与表达分析

王 晗,刘 涛,何红红,梁国平,马宗桓,毛 娟*,陈佰鸿

(甘肃农业大学园艺学院,兰州 730070)

摘 要:【目的】当植物遭受土壤盐碱、干旱和低温等非生物逆境胁迫时,其体内产生大量活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS),影响植物正常生长发育甚至死亡。抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate Peroxidase, APX)能够有效清除逆境胁迫下产生的ROS,从而保护植物免受损害。本研究旨在葡萄全基因组中鉴定出APX基因家族成员,并探究其在非生物胁迫下的表达情况,为后续葡萄抗逆基因的挖掘和功能研究提供理论依据。**【方法】**以生长30 d的葡萄‘黑比诺’试管苗为材料,通过生物信息学方法分析该基因家族的理化性质、系统进化、启动子顺式作用元件分布、基因芯片表达情况,利用qRT-PCR分析该基因家族成员在不同逆境胁迫下表达情况。**【结果】**葡萄APX基因家族具有7个成员,其氨基酸数目分布在104~421,等电点(Isoelectric Point, pI)介于5.75~8.77。系统进化分析发现,葡萄*VvAPX*与水稻*OsAPX*同源性较高,拟南芥*AtAPX*次之。蛋白质二级结构以α-螺旋和不规则卷曲为主。亚细胞定位预测发现,*VvAPX*基因在叶绿体、线粒体和细胞质中表达较高。*VvAPXs*基因均含有A活性位点、H结合位点以及motif1保守基序。顺式作用元件分析结果发现,*VvAPXs*基因家族所有成员中均含有干旱胁迫应答元件(MYB)和抗旱元件识别位点(MYC)。基因芯片表达图谱显示,在高盐、PEG、低温处理条件下,与CK3相比7个基因均上调表达,其中*VvAPX04*较明显。qRT-PCR结果表明,*VvAPX04*在200 mmol·L^{-1} NaCl处理下与对照相比显著性上调,是对照的14.5倍,在10% PEG处理下的表达量是对照的1.5倍。*VvAPX05*在10% PEG处理下与对照相比显著性上调,是对照的1.5倍。**【结论】**初步鉴定并提供了葡萄APX基因家族成员信息,预测了所具有的部分功能,为进一步研究葡萄APX基因参与非生物逆境胁迫的机制提供参考。

关键词:葡萄;APX基因家族;逆境胁迫;表达分析

中图分类号:S663.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2020)04-0472-13

Identification and expression analysis of APX gene family in grape

WANG Han, LIU Tao, HE Honghong, LIANG Guoping, MA Zonghuan, MAO Juan*, CHEN Baihong

(*College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China*)

Abstract:【Objective】Grape is one of the oldest fruit trees in the world, native to Europe and Asia. Although the cultivation area of grape is very large and wide, grape cultivation is now facing many abiotic stresses, such as drought, low temperature, salt damage and so on. APX gene plays an important role in removing ROS (reaction oxygen species) producing under stress in plants. This experiment aims to identify APX gene family members in grape, and predict the characteristics of this gene family, so as to provide a basis for the analysis of VvAPX genes' function and the mining and utilization of resources of resistant genes to the stresses in grape.【Methods】Plantlets of 'Pinot noir' (*Vitis vinifera*) cultured in vitro, were stored in the laboratory and stem-segments with single bud were subcultured on the medium (GS+0.2 mg·L^{-1} IAA) in a growth chamber under 16 h of light/8 h of dark conditions at 25 ℃/20 ℃ for 30 d. The subcultures, which had consistent growth state and were healthy, were treated with abiotic stresses, including 10% PEG, 500 μmol·L^{-1} ABA, 200 mmol·L^{-1} NaCl and 4 ℃ low temperature and pure water as a CK. Each treatment was repeated three times. APX gene family members were searched

收稿日期:2019-08-08 接受日期:2020-02-22

基金项目:甘肃省陇原创新团队项目(LQ20180918-1);甘肃省葡萄酒产业发展专项资金(039-041006);甘肃省科技重大专项(18ZD2NA006)

作者简介:王晗,女,在读硕士研究生,研究方向为果树种质资源与分子生物学。Tel:18298408403,E-mail:1552948860@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13659425539,E-mail:maojuan@gsau.edu.cn

from the grape genome in the website. The physicochemical property, phylogenetic relationship, *cis*-acting element distribution in the 2 kb upstream region of the promoter, gene chip expression were analyzed. The expression of genes under different abiotic stresses was analyzed using qRT-PCR.【Results】Seven APX gene members in the grape had been homogenously searched, and the gene family could be divided into two sub families (Ⅰ, Ⅱ). The physicochemical property analysis showed that VvAPX02 had the longest protein sequence, CDS sequence and the largest molecular weight in all genes. In addition, VvAPX07 had the shortest protein sequence and the largest full length of genome. We find that all genes were located on 5 chromosomes of the grape, namely the 3th, the 4th, the 6th, the 8th and the 18th chromosomes, respectively. Among them, both the 4th and the 18th chromosomes had two genes, the former had *VvAPX06* and *VvAPX07*, and the latter had *VvAPX01* and *VvAPX02*. Analysis of gene structure showed that *VvAPX07* had the longest intron region beyond 14 kb. Genes from the same subgroup had similar structures, such as *VvAPX03* and *VvAPX04* in group Ⅰ, both of them had 8 exons. *VvAPX02* had 12 exons, *VvAPX01* had 11 exons, *VvAPX06* had 10 exons, *VvAPX05* had 9 exons, and *VvAPX07* had 3 exons. Besides, only *VvAPX01*, *VvAPX02*, VvAPX03 and *VvAPX05* had integrated structure. *VvAPX04* had no downstream (3’UTR), and *VvAPX06* and *VvAPX07* had no upstream (5’UTR) and downstream. Multiple sequence alignment revealed that the seven APX genes had high homology because all of them had active site A and binding site H. The conservative motif analysis showed that all APX genes in the grape had motif1, among them *VvAPX01* and *VvAPX07* only had motif1. Secondary structure analysis showed that the 7 proteins encoded by VvAPX gene family were mainly composed of alpha helix and random coil. The subcellular localization indicated that APX gene family was mainly expressed in cytoplasm, chloroplast, nucleus, mitochondria, vacuole and plasma membrane. *VvAPX03, VvAPX04, VvAPX05, VvAPX06* and *VvAPX07* were expressed in cytoplasm. *VvAPX01, VvAPX02, VvAPX05, VvAPX06* and *VvAPX07* were expressed in chloroplast. *VvAPX03* and *VvAPX06* were expressed in nucleus. *VvAPX02*, *VvAPX03*, *VvAPX04*, *VvAPX05* and *VvAPX07* were expressed in mitochondria. *VvAPX05* was the only one expressed in the vacuole. Both *VvAPX02* and *VvAPX06* were expressed in plasma membrane. The *cis*-acting element analysis showed that all VvAPX genes contained MYB and MYC, which were concerned with drought resistance. Gene chip expression analysis showed that the expression level of *VvAPX01, VvAPX03* and *VvAPX07* decreased significantly under ABA stress. Compared with the control group 3 (CK3), all of genes were up-regulated under the treatments of salt, PEG and 4 ℃, among which *VvAPX01, VvAPX04* and *VvAPX05* were more obvious than the others. Besides, the genes family expressed differently under different abiotic stresses at different time, such as *VvAPX03* was up-regulated significantly higher than those of the control group 3 (CK3), salt and PEG treatment for 24 h was up-regulated significantly higher than them under other time period. Real-time fluorescence quantitative analysis showed that the VvAPX genes family expressed distinguishingly under different abiotic stresses, including 500 μmol · L^{-1} ABA，200 mmol · L^{-1} NaCl，10% PEG and 4 ℃ low temperature, and there were significant differences in the expression levels between the treatments. It was found that the expression pattern of *VvAPX02, VvAPX03, VvAPX06* and *VvAPX07* were analogous, the expression of all of them was lower than those of the control group (CK), 500 μmol · L^{-1} ABA, 200 mmol · L^{-1} NaCl, 10%PEG and 4 ℃ stresses. The expression pattern of *VvAPX01* and *VvAPX05* were analogous, the expression of both of them was higher in the leaves under 10% PEG than those of the control group (CK). *VvAPX04* gene was distinctly up expressed, which was 14.5 times higher than that of the control group (CK).【Conclusion】The experiment preliminarily identified the APX gene family members in the grape and predicted the functions of this gene family, which

would provide references for further studies on APX gene functions in the grape.

Key words: Grape; APX gene family; Stress of adversity; Expression analysis

植物细胞在逆境条件下会产生较多的ROS等含氧原子或原子团，如超氧自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧($^1O_2$)，ROS可通过蛋白氧化和脂质过氧化作用损伤DNA、细胞膜、细胞器膜以及其他细胞成分，使植物体发生许多不良的生理反应，严重时可导致植物体死亡[1-5]。而在正常条件下其体内ROS的产生和消失处于动态平衡状态[6-7]。因此，植物为了在氧化胁迫下也能正常生长，其自身通过进化形成了一套防御系统来清除活性氧，包括酶促和非酶促两个清除系统，其中抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate Peroxidase, APX)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase，GSH-Px)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)构成酶促清除系统；抗坏血酸(Ascorbic Acid，AsA)、类黄酮(Flavonoids)和谷胱甘肽(Glutataione)等构成非酶促清除系统[8-9]。

最早发现APX是一种以抗坏血酸为电子供体的过氧化物酶，它催化AsA与H_2O_2反应使H_2O_2分解：$2AsA+H_2O_2\rightarrow 2MD\text{-}AsA$(单脱氢抗坏血酸)$+2H_2O$，该酶是一种血红蛋白，包含原卟啉IX，在叶绿体的基质中大量表达，在降低甚至避免逆境胁迫下活性氧过量积累对细胞产生的伤害过程中具有很大作用，且能够有效地清除植物体内天然的有毒活性氧H_2O_2，是植物细胞中极其重要的一种抗氧化剂[10-16]。在近几年的研究中，作为清除过氧化物的关键酶，抗坏血酸过氧化物酶已成为植物耐逆性研究中的重要内容[17]。

目前，APX基因已在多个物种中进行了成员鉴定、功能验证以及部分转基因的研究，如橡胶树(*Hevea brasiliensis*)[7]、枸杞(*Lycium chinense*)[14]、番茄(*Solanum lycopersicum*)[18]、烟草(*Nicotiana tabacum*)[19]、玉米(*Zea mays*)[20]、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)[21]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)[22-23]和水稻(*Oryza sativa*)[24]等植物。此外，前人研究发现，APX基因的表达受到光照、干旱、盐胁迫等多种逆境胁迫诱导[25-26]。在橡胶树中，从全基因组序列鉴定出8个*HbAPXs*，其中一个基因(*HbAPX*)在大肠杆菌和酵母中过量表达后显著提高宿主细胞对逆境胁迫的耐受力[7]。在枸杞中，*LcAPX*基因的表达与成熟叶的生长密切相关，且其在PEG(聚乙二醇)、NaCl处理下的表达较高，说明该基因在枸杞抗旱和抗盐的过程中起到一定的作用[14]。在番茄中，定量分析发现*LetAPX*基因在叶片中的表达量最高[18]。在烟草中，发现转APX基因烟草表现出较强的抗寒性[19]。在拟南芥中，高强度的光照会使APX2基因表达水平明显升高，脱落酸(Abscisic Acid，ABA)也可诱导该基因的表达[27]。在水稻中，APX基因在高温条件下的活性也明显提升[28]。在大豆中，缺少APX1酶的大豆比正常植株更耐低温[29]。

目前，葡萄中对APX基因家族的研究还未见报道，因此，笔者利用生物学信息探究葡萄APX基因家族的成员、结构以及系统进化情况，通过对基因芯片数据进行分析以及分析基因在非生物胁迫下的表达情况，探究APX基因家族在逆境胁迫中的功能，并进一步在基因水平上为葡萄的遗传改良奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

试验于2018年10月—2019年5月在甘肃农业大学园艺学院果树生理与生物技术开放实验室进行。试验材料为‘黑比诺’葡萄(*Vitis vinifera* ‘Pinot noir’)试管苗，保存于该实验室。前期采用单芽茎段进行接种，基本培养基为：GS液体培养基，添加0.2 mg·L^{-1} IAA，采用纸桥法进行固定，pH：5.8~6.0，温度25 ℃/20 ℃(光照/黑暗)，光周期16 h/8 h(光照/黑暗)。培养30 d后，挑选生长状况一致且无污染的葡萄试管苗作为试验材料进行处理。处理方式为小心倒出原培养基，再重新分别倒入50 mL含10% PEG、500 μmol·L^{-1} ABA、200 mmol·L^{-1} NaCl的GS液体培养基，同时采用培养箱进行4 ℃低温处理，正常生长的植株作为对照，每组处理设置3组生物学重复，其中对照与PEG、ABA、NaCl处理的时长为24 h，4 ℃低温条件下处理时长为20 h。

1.2 葡萄APX基因家族成员的鉴定

利用拟南芥和水稻APX基因ID，分别从拟南芥基因组网站(http://www.arabidopsis.org/)和水稻基因组网站(http://rice.plantbiology.msu.edu/)获取每个

基因的CDS序列，然后在葡萄基因组网站(http://www.genoscope.cns.fr/)中同源搜索葡萄APX基因，保存已知序列基因登录号下的CDS长度、氨基酸数目、cDNA长度和基因全长。根据APX基因家族所具有的特定结构区域(注册号：PF00141.23)，去除其中结构域不完整或者缺失的序列片段。利用DNAMAN软件进行多重比对。使用ExPASy(https://web.expasy.org/protparam/)在线软件的ProtParam工具获取每个基因的等电点和分子质量等基本信息。

1.3　葡萄APX基因家族成员生物信息学分析

使用ClustalX程序将葡萄、水稻和拟南芥APX基因的氨基酸序列转化为fasta格式，并用MEGA 5.0软件构建葡萄、拟南芥和水稻APX基因家族系统发育树；使用GSDS 2.0(http://gsds.cbi.pku.edu.cn/)在线软件分析葡萄APX基因家族的基因结构。使用MEME(http://meme-suite.org/tools/meme)进行motif序列分析；使用WoLF PSORT(http://www.genscript.com/wolf-psort.html)进行亚细胞定位预测；使用在线网站PLACE(http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan)分析葡萄APX基因家族起始密码子上游2 kb的碱基片段顺式作用元件分布情况。

1.4　葡萄APX基因家族基因芯片表达模式分析

搜索NCBI提供的GEO数据库，登录号分别是GSE31662和GSE31594。根据葡萄APX基因家族7个成员的序列号，检索出具有相同序列的Affymetrix GeneChip16K下的基因ID，然后获取葡萄APX基因在各种非生物胁迫(包括：ABA、NaCl、PEG和4 ℃低温)下的RNA Seq基因表达量，利用R语言绘制热图。

1.5　葡萄APX基因家族的实时定量分析

RNA提取采用植物提取试剂盒RNAplant-RTR2303(中科瑞泰生物技术有限公司，北京)并按操作说明书进行。引物设计及后期引物合成均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成(表1)。cDNA合成采用Prime Script RT reagent Kit(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa)并参照说明书进行，定量PCR仪为Light Cycler® 96 Real-Time PCR System(Roche)。用上述设计好的引物进行PCR扩增反应，其中 *18s-rRNA* 作为内参基因[30]，扩增总体系为20 μL，包括上下游引物各1 μL，cDNA 1.5 μL，ddH_2O 6.5 μL，TB Green-II 10 μL。反应程序为：95 ℃变性30 s；95 ℃变性10 s；60 ℃退火30 s；72 ℃延伸30 s；共40个循环，试验进行3次生物学重复。

1.6　试验数据统计与分析

使用Excel 2010整理试验数据，并用Origin 9.0绘图，采用SPSS 20统计分析单因素ANOVA的Duncan比较差异的显著水平。

表1　葡萄APX基因家族的实时荧光定量引物

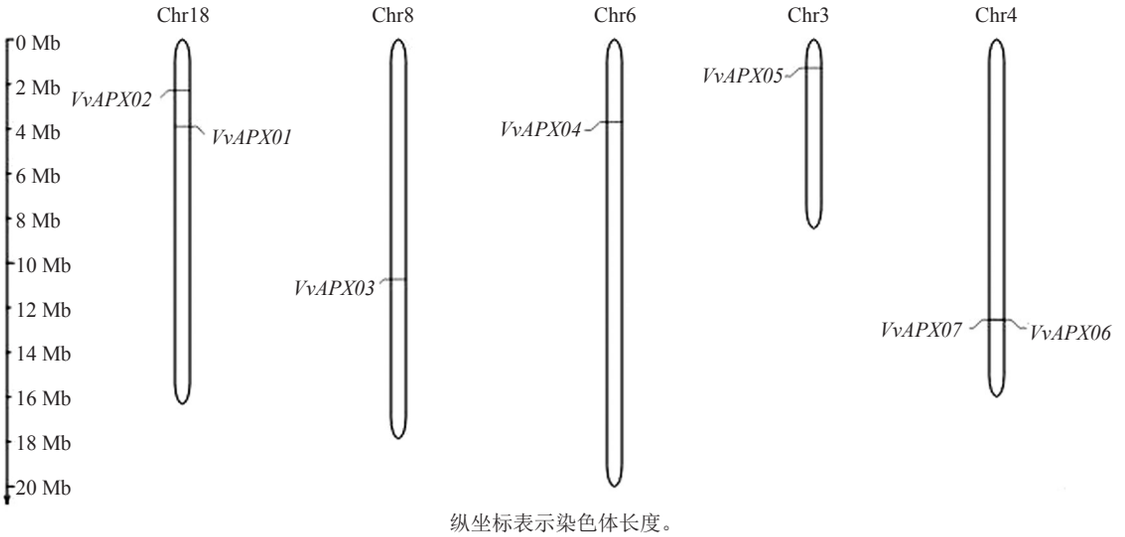
Table 1　Real-time fluorescence quantitative primers of APX gene family in grape

基因 Gene	实时荧光定量上游引物 Forward primer for qRT-PCR	实时荧光定量下游引物 Reverse primer for qRT-PCR
VvAPX01	5’- TGACACTCAGGAGCCAGATCC-3’	5’- GGCCTCACTTGCCAACTGATCTG-3’
VvAPX02	5’- CTCTCACCTCCTCCACCGTCAG-3’	5’- CGTCATGCCATCCTAGGCGAAC-3’
VvAPX03	5’- GCTGTCAGGCTATTGGAACCGATC-3’	5’- GCATTAGGCAAGCGACCTTCTGG-3’
VvAPX04	5’- TGGCTGGAGTTGTTGCTGTTGAG-3’	5’- GCTACGATGTCCTTGTCGCTGAG-3’
VvAPX05	5’- GCTCTCATCGCCTCCAAGAACTG-3’	5’- TCAGTCCTGATCGAGCCGTTAGG-3’
VvAPX06	5’- CAGCACCAACTCCAGCACCAC-3’	5’- TAGGAGCACGGAGGTATCTACGAG-3’
VvAPX07	5’- ACAAAGACAGGGGGCCCAA-3’	5’- GCAAGCTGGTAAAGGTCAGCA-3’
18s-rRNA	5’-CTTTGCCGCTTGCTCTGATG-3’	5’-TGCTGCCTTCCTTGGTTGTG-3’

2　结果与分析

2.1　葡萄APX基因家族染色体定位及蛋白理化性质分析

通过同源比对检索鉴定出7个葡萄APX基因，分别命名为 *VvAPX01*~*VvAPX07*。染色体定位(图1)发现：该基因家族7个成员分布在5条染色体上，分别是Chr3、Chr4、Chr6、Chr8和Chr18。其中 *VvAPX01* 和 *VvAPX02* 位于Chr18，*VvAPX03* 位于Chr8，*VvAPX04* 位于Chr6，*VvAPX05* 位于Chr3，*VvAPX06* 和 *VvAPX07* 位于Chr4且两者相距较近。



纵坐标表示染色体长度。

Vertical coordinates is the length of the chromosome.

图1 葡萄APX基因家族染色体定位

Fig. 1 The chromosome location of APX gene family in grape

VvAPX 基因家族成员蛋白理化性质分析(表2)表明,其氨基酸数目主要集中在 104~421,且 VvAPX02 最长,VvAPX07 最短。VvAPX02 的分子质量最大,为 45 504.61 Da,VvAPX07 的分子质量最小,为 11 516.20 Da。等电点介于 5.75~8.77,VvAPX03 最小,VvAPX06 最大。

表2 葡萄APX基因家族蛋白理化性质

Table 2 The physicochemical property of protein of APX gene family in grape

蛋白 Protein	基因登录号 Gene accession No.	CDS长度 Length of CDS/bp	基因全长 Full length of genomic/bp	分子质量 Molecular masst/Da	等电点 Isoelectric point	氨基酸数目 Amino acid number	cDNA长度 Length of cDNA/bp
VvAPX01	GSVIVT00015185001	1 035	6 503	37 487.45	6.65	344	1 285
VvAPX02	GSVIVT00015409001	1 266	11 170	45 504.61	7.67	421	1 574
VvAPX03	GSVIVT00023072001	739	2 898	27 137.92	5.75	245	1 687
VvAPX04	GSVIVT00024455001	741	5 046	27 152.99	5.86	246	1 174
VvAPX05	GSVIVT00036111001	870	6 848	31 769.25	7.72	289	1 272
VvAPX06	GSVIVT00036747001	924	2 453	34 004.61	8.77	307	924
VvAPX07	GSVIVT00036749001	315	14 324	11 516.20	8.49	104	315

2.2 葡萄APX基因家族的系统进化与基因结构分析

为了探究 APX 基因家族的进化关系,利用葡萄、拟南芥及水稻 APX 基因家族的蛋白序列构建了系统进化树。结果(图2)表明,该基因家族可分为两个亚族,第Ⅰ亚族包括 VvAPX05、VvAPX06、VvAPX07、OsAK070842、OsAY382617、AT4G35000、AT4G35970、AT1G07890、OsD45423、OsA13053297、VvAPX03 和 VvAPX04,第Ⅱ亚族包括 VvAPX05、OsAK081107、OsAB114856、OsAB114855、AT1G77490、VvAPX01、AT4G0901、AT4G32320、AT1G04290 和 AT5G63980,这与葡萄 APX 蛋白序列单独聚类形成的进化树一致(图3),只分为两个亚族(Ⅰ、Ⅱ)。

为进一步了解葡萄 APX 基因家族的基因结构特性,对 APX 转录因子的 7 个成员进行基因结构分析,结果如图 3 所示,第Ⅰ亚族中 *VvAPX03* 和 *VvAPX04* 外显子数目相同,有 8 个,而 *VvAPX04* 不具有基因下游序列,*VvAPX05* 和 *VvAPX06* 外显子数目接近,*VvAPX06* 和 *VvAPX07* 均没有上下游非编码区,二者具有相似性,且 *VvAPX07* 具有一段大于 14 kb 的内含子区域。第Ⅱ亚族包含 *VvAPX01* 和 *VvAPX02* 基因,二者基因结构完整,且 *VvAPX02*

图2　葡萄(●)、拟南芥(○)与水稻(△)APX基因系统进化树

Fig. 2　The unrooted phylogenetic tree of APX gene in grape (●), Arabidopsis (○) and rice (△)

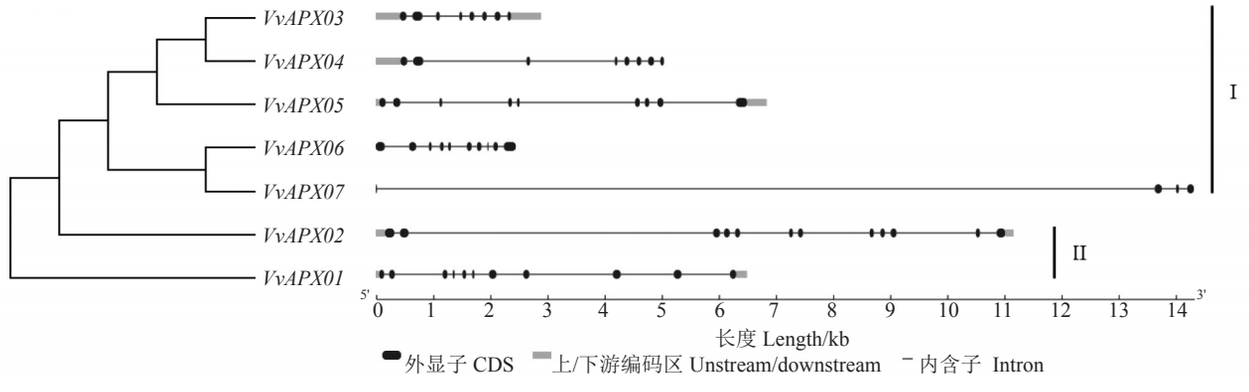


图3　葡萄APX基因家族基因结构

Fig. 3　The structure of APX gene family in grape

外显子数目最高，有 12 个。

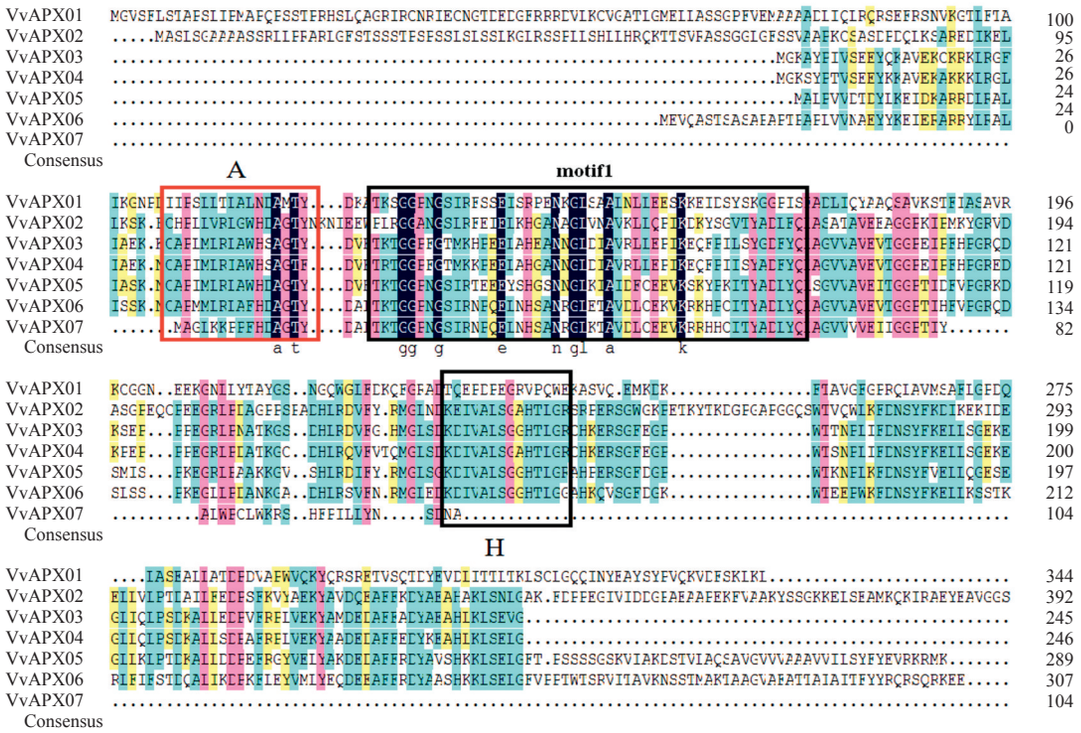
2.3　葡萄APX基因家族的多序列比对及motif序列分析

对葡萄 APX 基因家族的 7 个蛋白序列进行比对分析发现(图 4)，VvAPX 蛋白序列都包含两个保守的区域：A 和 H，其中 A(CHPILVRLGWHDAG-TYN)是 APX 的活性位点，H(KEIVALSGAHTLG)位于 APX 的中间区域，是该酶与血红素的结合位点，对 APX 的活性具有极其重要的作用，此外，保守基序 motif1 具有较高的保守性。

葡萄 APX 基因家族最重要的 motif 是 motif1，它在所有成员中均有出现，位于活性位点 A 与 H 中间(图 4、图 5-A)。第Ⅰ亚族中，除 *VvAPX07* 之外，其余基因均包含 5 个 motif。第Ⅱ亚族中，*VvAPX02* 只包含 motif1、motif2、motif3 和 motif4。结合图 4 与图 5 发现，该基因家族所具有的 H 位点中，*VvAPX01* 和 *VvAPX07* 的多序列不完整，且 *VvAPX01* 和 *VvAPX07* 中只存在 motif1。

2.4　葡萄APX基因家族的二级结构分析

葡萄 APX 基因家族编码蛋白质的二级结构(表 3)主要有 α-螺旋(Alpha helix)占 34.62%~48.84%、β-转角(Beta turn)占 1.74%~7.76%、不规则卷曲(Ran-



A，H. 保定区域。A，H. Conservative area.

图4 葡萄APX基因家族多序列比对

Fig. 4 The multiple alignment of sequence of APX gene family in grape

A. 葡萄 APX 基因家族 motif 分析；B. MEME 预测的 5 个保守位点 LOGO 图。

A. APX gene family motif analysis in grape; B. LOGO of 5 conserved motif by MEME.

图5 葡萄APX基因家族motif保守基序分析

Fig. 5 The conservative motif analysis of APX gene family in grape

dom coil)占 39.10%~46.53%，且 α-螺旋与不规则卷曲所占比例相差不大，但是远高于 β-转角所占比例。

2.5 葡萄APX基因家族的亚细胞定位预测

亚细胞定位预测(表 4)表明，葡萄 APX 基因家族所有成员中，*VvAPX01* 只有在叶绿体中表达，且表达程度较高；除 *VvAPX01* 和 *VvAPX02* 在细胞质中未表达外，其余 5 个基因均有不同程度的表达；只有 *VvAPX03* 和 *VvAPX04* 未在叶绿体中表达；在细胞核中只有 *VvAPX03* 和 *VvAPX06* 基因表达；除 *VvAPX01* 和 *VvAPX06* 在线粒体中未表达外，其余 5 个基因均

表3　葡萄APX蛋白二级结构分析

Table 3　The secondary structure of APX protein sequence in grape

蛋白 Protein	占比 Proportion/%		
	α-螺旋 Alpha helix	β-转角 Beta turn	不规则卷曲 Random coil
VvAPX01	48.84	1.74	40.99
VvAPX02	37.29	6.18	45.61
VvAPX03	36.33	7.76	46.53
VvAPX04	41.06	6.91	41.87
VvAPX05	39.79	7.61	39.10
VvAPX06	38.44	5.21	42.02
VvAPX07	34.62	7.69	41.35

有不同程度的表达；在液泡中，只有 *VvAPX05* 表达，在细胞膜中只有 *VvAPX02* 和 *VvAPX06* 表达。

2.6　葡萄APX基因家族的顺势作用元件分析

以确定 VvAPX 家族启动子区域的顺式作用元件为目的，在该基因家族起始密码子上游 2 kb 碱基序列中搜索与胁迫响应相关的元件。通过 PLACE 在线软件分析预测得到 6 个非生物胁迫作用元件，即 ABA 响应元件(ABRE)、脱水应答元件(DRE/CRT)、乙烯应答元件(ERE)、干旱胁迫应答元件(MYB)、抗旱元件识别位点(MYC)、MYB 结合位点诱导干旱(MBS)在各基因的分布情况(表 5)。葡萄

表4　葡萄APX基因家族亚细胞定位预测

Table 4　Subcellular location prediction of APX gene family in grape

基因 Gene	细胞质 Cytoplasm	叶绿体 Chloroplast	细胞核 Nucleus	线粒体 Mitochondria	液泡 Vacuole	细胞膜 Plasma membrane
VvAPX01	0	13	0	0	0	0
VvAPX02	0	5	0	7	0	1
VvAPX03	5.5	0	1	6	0	0
VvAPX04	8	0	0	6	0	0
VvAPX05	5	1	0	3	1	0
VvAPX06	2	2	6	0	0	3
VvAPX07	8	1	0	4	0	0

表5　VvAPX基因家族上游2 kb区域顺式作用元件的分布

Table 5　Putative cis-elements existed in the 2 kb upstream region of VvAPX gene family

基因 Gene	ABA响应元件 ABRE	脱水应答元件 DRE/CRT	乙烯应答元件ERE	干旱胁迫应答元件 MYB	抗旱元件识别位点 MYC	MYB结合位点诱导干旱 MBS
VvAPX01	1	0	1	6	6	1
VvAPX02	1	0	3	19	4	5
VvAPX03	0	0	0	9	8	0
VvAPX04	5	1	4	13	2	2
VvAPX05	0	0	4	12	5	1
VvAPX06	3	0	1	8	4	2
VvAPX07	1	0	3	11	4	0

APX 基因家族所有成员中均含有 MYB 和 MYC；除 *VvAPX03* 和 *VvAPX04* 中没有预测到 ABRE 外，其余基因均包含此结构；只有 *VvAPX04* 包含 DRE/CRT；除 *VvAPX03* 没有 ERE 之外，其余均有；MBS 顺式作用元件除 *VvAPX03* 和 *VvAPX07* 外，其余基因均包含。

2.7　葡萄APX基因家族的基因芯片表达分析

通过绘制基因芯片图谱(图 6)发现，经 ABA 处理 3 d 和 10 d 后，与对照 CK1、CK2(0 d 采样)相比，*VvAPX01*、*VvAPX03* 和 *VvAPX07* 基因的表达量均明显下调，*VvAPX02* 经 ABA 处理 10 d 后相比 CK2 表达量下调，其他基因表达量变化不明显。当在高盐、PEG、低温处理条件下，与 CK3(0 d 采样)相比 7 个基因均有不同程度上调表达，其中 *VvAPX01*、*VvAPX04*、*VvAPX05* 表达量明显上调。此外，该基因家族在不同时间的逆境胁迫处理下的表达量不同。*VvAPX03* 基因在 24 h 高盐胁迫和 PEG 处理下表达量明显高于 CK3，且为最大值，*VvAPX02* 和 *VvAPX05* 在高盐和 PEG 处理 24 h 之后的表达量明显高于 CK3，*VvAPX01* 在 1 h 高盐胁迫和 1 h PEG

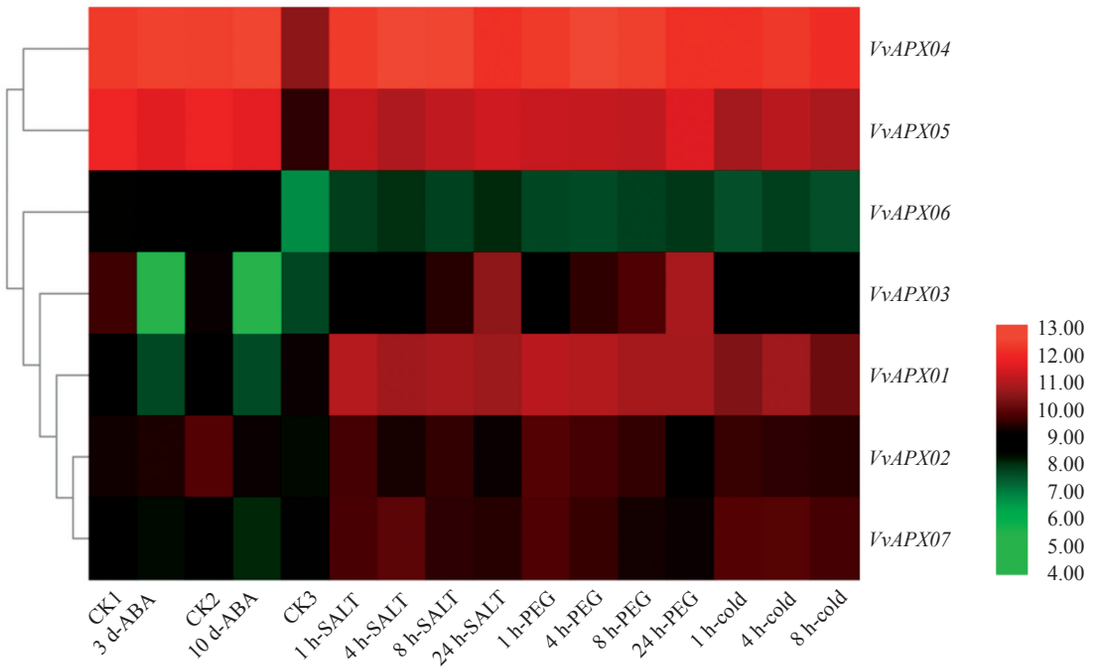


图6 葡萄APX基因家族表达谱

Fig. 6 The expression profile of APX gene family in grape

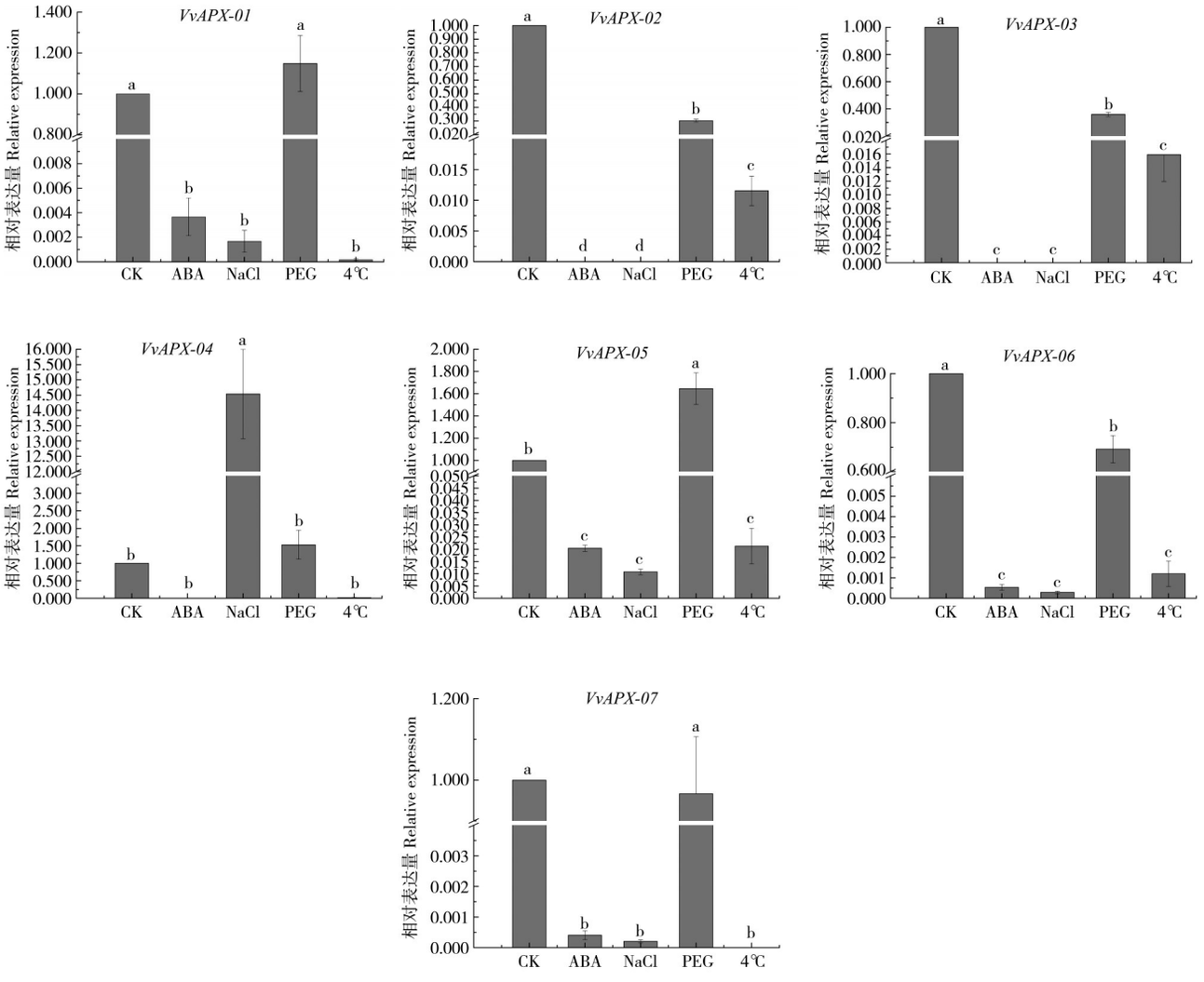
处理下表达量明显高于CK3，而在其他处理时段下的表达量相对较低。

2.8 葡萄APX基因家族的实时荧光定量分析

qRT-PCR结果表明，当VvAPX基因家族受200 mmol·L^{-1} NaCl、500 μmol·L^{-1} ABA、10% PEG和4 ℃低温的诱导时，各处理间部分基因的相对表达量具有显著性差异，而其他基因表达差异性较低（图7）。在受到10% PEG处理时，*VvAPX01*、*VvAPX04*和*VvAPX05*呈上调表达，其中*VvAPX05*显著性较高，*VvAPX04*表达不具有显著性；而*VvAPX02*、*VvAPX03*、*VvAPX06*表达量均显著性下调，*VvAPX07*下调表达不明显。在200 mmol·L^{-1} NaCl处理条件下，*VvAPX04*基因的表达量与对照相比极显著上调，是对照的14.5倍，其余基因表达量均显著性下调。在500 μmol·L^{-1} ABA处理下，除*VvAPX04*未显著下调之外，其余基因表达量均显著下调。经4 ℃处理之后，除*VvAPX04*未呈显著性外，其余基因表达量均显著下调。

3 讨 论

目前，已在多种植物中进行了APX基因的鉴定与克隆，如拟南芥[22-23]、番茄[18]、枸杞[14]、香蕉[31]、枣树[32]等植物。笔者利用生物信息学分析方法，从葡萄基因组数据库中共获得30个VvAPX基因，剔除其中结构域缺失或不完整的基因，最终获得7个具有完整功能元件的葡萄APX基因，分别命名为*VvAPX01*~*VvAPX07*，系统进化分析将其归为2个亚族，发现成员关系较近的基因结构相似；晁金泉等[7]将橡胶树中HbAPX基因家族的8个基因归为2个亚族，且每个成员至少含有4个内含子；而刘娜等[21]将陆地棉中14个GhAPX基因分为3个亚族，且预测不同分支的蛋白具有多种功能。多序列比对发现，VvAPX基因家族包含两个特殊区域，分别是A(CHPILVRLGWHDAGTYN)区域活性位点和H(KEIVALSGAHTLG)区域与血红素结合的位点，且H区域与APX基因的活性高低密切相关，这与段明等[18]在番茄研究中发现的结构域类似，因此，笔者猜测葡萄在进化过程中仍保留着APX基因家族所具有的基本功能。但是，刘娜等[21]研究发现陆地棉APX基因家族14个成员具有多个保守结构域，分别是抗坏血酸结合位点、血红素结合位点、K离子结合位点、底物结合区以及与其他物种相同的保守结构域，这与本试验结果有一定差异。基因结构及motif分析表明，葡萄APX基因家族聚类关系较近的基因具有相似的基因结构，如第Ⅰ亚族中的*VvAPX03*和*VvAPX04*，含有相同外显子数目。同时



不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

Different small letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

图7　不同胁迫处理下葡萄APX基因家族的表达

Fig. 7　The expression of APX gene family under different treatment in grape

motif在分布顺序上具有一定的保守性，每个基因中都含有motif1，且 *VvAPX01* 和 *VvAPX07* 中仅含有motif1，因此，笔者猜测motif1是决定该基因家族功能的关键motif。二级结构预测发现，VvAPX基因家族成员中α-螺旋和不规则卷曲所占比例最高，这与刘娜等[21]在陆地棉中的研究结果一致。

前人研究表明，APX基因主要定位在细胞质、叶绿体、线粒体、过氧化物酶体中，且不同定位的APX具有不同的功能，如定位于叶绿体中的APX主要用于保护光和系统免受活性氧危害，而定位于线粒体中的APX主要用于清除脂肪酸β氧化产生的过氧化氢[33-35]。不同物种中APX基因在细胞中的定位和数量不同。在拟南芥中，8个APX基因定位在不同的细胞器中，其中APX4是一种类囊体腔蛋白[22-24,36-38]。在水稻中，8个 *OsAPX* 基因，分别定位在细胞质、过氧化物体、叶绿体和线粒体中，其中 *OsAPX5* 同时定位于线粒体与叶绿体中[39-41]。本试验亚细胞定位预测结果可将VvAPX基因家族7个成员分为细胞质型(*VvAPX04*、*VvAPX05* 和 *VvAPX07*)、叶绿体型(*VvAPX01* 和 *VvAPX06*)、线粒体型(*VvAPX02* 和 *VvAPX03*)和无过氧化物体型。其中定位在叶绿体中 *VvAPX01* 的基因芯片表达谱表明其在盐害、PEG及4 ℃低温处理下相比CK3表达量上调，预测在受到非生物逆境胁迫时，该基因具有调控叶绿体光和系统并清除产生的活性氧的作用。qRT-PCR结果表明同时定位于细胞质和线

粒体中的 *VvAPX04* 在受到 200 mmol·L^{-1} NaCl 处理后其表达量相比对照显著性上调，且其具有脱水应答元件(DRE/CRT)，推测该基因在清除过氧化氢等氧化物和提高葡萄耐盐性方面具有一定的作用。此外，同时定位在细胞质、线粒体和叶绿体中的 VvAPX05 受到 10% PEG 处理后与 CK 相比表达量显著性上调，这与其基因芯片表达结果一致，预测该基因在干旱胁迫下具有有效清除氧化物以及提高植物的耐旱能力。亚细胞定位结果发现，同一亚族中的基因位置也具有相似性，而晁金泉等[7]在橡胶树中研究发现，APX 基因家族系统进化分析显示具有相同亚细胞定位的基因亲缘关系之间并非最近，猜测该差异可能是由于物种不同所造成的。

当植物遭受如干旱、盐碱、低温等逆境胁迫时，其产生的胁迫信号通过信号转导转化为信号因子，同时激活相应的转录因子结合相关基因的顺式作用元件，从而启动相关基因的表达，对逆境胁迫做出应激反应[42-44]。笔者分析 VvAPX 基因家族上游 2 kb 区域启动子顺式作用元件发现，所有基因中均含有 MYB 和 MYC 转录因子元件，*VvAPX04* 基因包含 ABRE、DRE、ERE、MYB、MYC 以及 MBS 作用元件，其他基因包含其中的 3~5 个，推测该基因家族多个成员均有可能参与了抗旱的胁迫应答机制，且在其他非生物逆境胁迫的应答机制中发挥重要的作用。此外，分析基因芯片表达谱发现，该基因家族多个成员在 PEG 处理后表达量相比 CK3 呈上调趋势，预测这些基因在受到干旱胁迫时具有一定的调控作用，这与本试验中顺式作用元件分析结果相近，且与段明等[18, 45]和韩瑞丽等[19]分别在番茄和杨树中发现的研究结果类似。而任瑛等[20]通过克隆发现玉米中 APX 蛋白的表达提高了宿主菌对盐的耐受能力。李泽琴等[46]发现，拟南芥 APX 基因家族 8 个成员中 *APX1* 和 *APX6* 对高盐和干旱胁迫均有响应。

综上所述，葡萄 APX 基因家族在进化过程中具有较高的保守性，且部分 APX 基因在 ABA、PEG、盐害、低温等非生物逆境胁迫应答过程中具有重要功能，为进一步研究葡萄 APX 基因在非生物胁迫下的功能提供参考。

参考文献 References:

[1] AKBUDAK M A, FILIZ E, VATANSEVER R, KONTBAY K. Genome-wide identification and expression profiling of ascorbate peroxidase (*APX*) and glutathione peroxidase (*GPX*) genes under drought stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.)[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2018, 37(3): 925-936.

[2] ASADA K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50(1): 601-639.

[3] YAMADA S, KATSUHARA M, KELLY W B, MICHALOWSKI C B, BOHNERT H J. A family of transcripts encoding water channel protein: tissue-specific expression in the common ice plant[J]. The Plant Cell, 1995, 7(8): 1129-1142.

[4] SERRANO R, CULIAÑZ-MACIÁ F A, MORENO V. Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulating genes[J]. Scientia Horticulturae, 1998, 78(1): 261-269.

[5] DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVA E, VAN MONTAGU M, INZE D, VAN BREUSEGEM F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000, 57(5): 779-795.

[6] 张维静，陆海，杜希华 . 抗坏血酸过氧化物酶在植物抵抗氧化胁迫中的作用[J]. 山东师范大学学报(自然科学版)，2008，23(4): 113-115.
ZHANG Weijing, LU Hai, DU Xihua. The function of ascorbate peroxidases in plant resistance to oxidative stress[J]. Journal of Shandong Normal University (Natural Science Edition), 2008, 23(4): 113-115.

[7] 晁金泉，杨署光，陈月异，田维敏 . 巴西橡胶树 APX 基因家族成员的鉴定及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学，2018，37(11): 4769-4774.
CHAO Jinquan, YANG Shuguang, CHEN Yueyi, TIAN Weimin. Identification and expression of APX gene family members in *Hevea brasiliensis*[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(11): 4769-4774.

[8] 沈文飚，黄丽琴，徐朗莱 . 植物抗坏血酸过氧化物酶[J]. 生命的化学，1997，17(5): 24-26.
SHEN Wenbiao, HUANG Liqin, XU Langlai. Plant ascorbic acid peroxidase[J]. Chemistry of Life, 1997, 17(5): 24-26.

[9] 王凤华，李光远，刘宝国，郭旭彬 . 低温胁迫对茄子幼苗 APX 活性的影响及 cDNA 序列克隆研究[J]. 安徽农业科学，2008，36(13): 5272-5273.
WANG Fenghua, LI Guangyuan, LIU Baoguo, GUO Xubin. Influences of low temperature on APX of eggplant seedlings and cDNA clone of APX[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(13): 5272-5273.

[10] FOYER C H, HALLIWELL B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. Planta, 1976, 133(1): 21-25.

[11] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant and Cell Physiology, 1981, 22(5): 867-880.

[12] 孙卫红，王伟青，孟庆伟 . 植物抗坏血酸过氧化物酶的作用机制、酶学及分子特性[J]. 植物生理学通讯，2005，41(2):143-147.
SUN Weihong, WANG Weiqing, MENG Qingwei. Functional mechanism and enzymatic and molecular characteristic of ascorbate peroxidase in plants[J]. Plant Physiology Communications, 2005, 41(2): 143-147.

[13] AMIN M A. Role of dissolved oxygen reduction in improvement inhibition performance of ascorbic acid during copper corrosion in 0.50 mol/L sulphuric acid[J]. Chinese Chemical Letters, 2010, 21(3): 341-345.

[14] 乔枫，耿贵工，曾阳，金兰，谢惠春 . 枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆与表达分析[J]. 中国农业大学学报，2019，24(4): 64-72.
QIAO Feng, GENG Guigong, ZENG Yang, JIN Lan, XIE Huichun. Molecular cloning and expression patterns of LcAPX from *Lycium chinense*[J]. Journal of China Agricultural University, 2019, 24(4): 64-72.

[15] 奉斌，代其林，王劲 . 非生物胁迫下植物体内活性氧清除酶系统的研究进展[J]. 绵阳师范学院学报，2009，28(11): 50-53.
FENG Bin, DAI Qilin, WANG Jin. Studies on the scavenging enzymes of reactive oxygen species in plants under abiotic stress[J]. Journal of Mianyang Normal University, 2009, 28 (11): 50-53.

[16] MARCIA C P, MARIANA B O, PEDRO L.O Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2001, 48(2): 63-71.

[17] 陈莉，辛海波，孙向荣，尹慧，李晓昕，义鸣放 . 百合 APX 基因的克隆及转 *LlAPX* 提高拟南芥耐盐性[J]. 园艺学报，2010，37 (12): 1983-1990.
CHEN Li, XIN Haibo, SUN Xiangrong, YIN Hui, LI Xiaoxin, YI Mingfang. Molecular cloning APX from *Lilium longiforum* and overexpressing to *Arabidopsis thaliana* enhanced salt tolerance[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(12): 1983-1990.

[18] 段明，王兴春，元旭朝 . 番茄 APX 基因的分离及表达分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版)，2016，36(5): 315-319.
DUAN Ming, WANG Xingchun, YUAN Xuchao. Isolation and expression analysis of *LeAPX* gene in tomato[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2016, 36(5): 315-319.

[19] 韩瑞丽，陆海 . 转 APX 基因烟草抗旱能力研究[J]. 成都大学学报(自然科学版)，2007，26(2): 93-96.
HAN Ruili, LU Hai, Research of transgenic tobacco of *APX* gene in drought tolerance analysis[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2007, 26(2): 93-96.

[20] 任瑛，赵美爱，郭新梅，裴玉贺，宋希云 . 玉米 APX 基因的克隆及其原核表达研究[J]. 华北农学报，2014，29(4): 49-55.
REN Ying, ZHAO Meiai, GUO Xinmei, PEI Yuhe, SONG Xiyun. Cloning and prokaryotic expression analysis of *APX* gene from maize[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2014, 29(4): 49-55.

[21] 刘娜，吴金华，安亚茹，杨君，张艳，王省芬，马峙英 . 陆地棉抗坏血酸过氧化物酶基因家族全基因组生物信息学分析[J]. 棉花学报，2017，29(1): 17-28.
LIU Na, WU Jinhua, AN Yaru, YANG Jun, ZHANG Yan, WANG Shengfen, MA Zhiying. Bioinformatics analysis of the ascorbate peroxidase gene family in the *Gossypium hirsutum* L. genome[J]. Cotton Science, 2017, 29(1): 17-28.

[22] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, MIYAGAWA Y, TAKEDA T, YABUTA Y, YOSHIMURA K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(372): 1305-1319.

[23] PANCHUK I I, VOLKOV R A, SCHOEFFL F. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2002, 129(2): 838-853.

[24] NARENDRA S, VENKATARAMANI S, SHEN G, WANG J, PASAPULA V, LIN Y, KORNYEYEV D, HOLADAY A S, ZHANG H. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(12): 3033-3042.

[25] YABUTA Y, MARUTA T, YOSHIMURA K, ISHIKAWA T, SHIGEOKA S. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress[J]. Plant and Cell Physiology, 2004, 45(11): 1586-1594.

[26] YOSHIMURA K, YABUTA Y, ISHIKAWA T, SHIGEOKA S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses[J]. Plant Physiology, 2000, 123(1): 223-234.

[27] KIM D W, SHIBATO J, AGRAWAL G K, FUJIHARA S, IWAHASHI H, KIM DU H, SHIM I S, RAKWAL R. Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecules and Cells, 2000, 24(1): 45-59.

[28] FRYER M J, BALL L, OXBOROUGH K, KARPINSKI S, MULLINEAUX P M, BAKER N R. Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves[J]. Plant Journal, 2003, 33(4): 691-705.

[29] FUNATSUKI, KUROSAKI H, MURAKAMI T, MATSUBA S, KAWAGUCHI K, YUMOTO S, SATO Y. Deficiency of a cytosolic ascorbate peroxidase associated with chilling tolerance in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(3): 494-502.

[30] 苏晓娟，樊保国，袁丽钗，崔秀娜，卢善发 . 实时荧光定量 PCR 分析中毛果杨内参基因的筛选和验证[J]. 植物学报，2013，48(5):507-518.
SU Xiaojuan, FAN Baoguo, YUAN Lichai, CUI Xiuna, LU

Shanfa. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa* [J]. Journal of Integrative, 2013, 48(5): 507-518.

[31] 王卓 . 香蕉抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆及表达分析[J]. 热带农业科学，2015，35(12): 44-49.
WANG Zhuo. Molecular cloning and expression of ascorbate peroxidase gene from banana（*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish）[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2015, 35(12): 44-49.

[32] 郝子琪，许洪仙，孟玉平，曹冬梅，曹秋芬 . 枣树抗坏血酸过氧化物酶基因 ZjAPX 生物信息学分析及植物表达载体的构建[J]. 山西农业科学，2011，39(5):400-403.
HAO Ziqi, XU Hongxian, MENG Yuping, CAO Dongmei, CAO Qiufeng. The biological information analysis and construction of plant expression vector of *Zizyphus jujuba* ascorbate peroxidase (APX) [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2011, 39(5): 400-403.

[33] KHANNA-CHOPRA R, JAJOO A, SEMWAL V K. Chloroplasts and mitochondria have multiple heat tolerant isozymes of SOD and APX in leaf and inflorescence in *Chenopodium album* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 412(4): 522-525.

[34] CAVERZAN A, BONIFACIO A, CARVALHO F E, ANDRADE C M, PASSAIA G, SCHÜNEMANN M, MARASCHIN F S, MARTINS M O, TEIXEIRA F K, RAUBER R, MARGIS R, SILVEIRA J A, MARGIS-PINHEIRO M. The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice[J]. Plant Science, 2014, 214: 74-87.

[35] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55(1): 373-399.

[36] CHEN C, LETNIK I, HACHAM Y, DOBREV P, BEN-DANIEL B H, VANKOVÁ R, AMIR R, MILLER G. ASCORBATE PEROXIDASE6 protects *Arabidopsis* desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin[J]. Plant Physiology, 2014, 166(1): 370-383.

[37] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, VAN BREUSEGEM F. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends Plant Science, 2004, 9(10): 490-498.

[38] CHEW O, WHELAN J, MILLAR A H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(47): 46869-46877.

[39] 李春宇 . 水稻 APX 基因的克隆及其对烟草的遗传转化研究[D]. 哈尔滨：黑龙江大学，2009.
LI Chunyu. The research of molecular cloning of *APX* gene in race and genetic transformation of tobacco[D]. Harbin：Heilongjiang University, 2009.

[40] RIBEIRO C W, KORBES A P, GARIGHAN J A, JARDIM-MESSEDER D, CARVALHO F E L, SOUSA R H V, CAVERZAN A, TEIXEIRA F K, SILVEIRA J A G, MARGIS-PINHEIRO M. Rice peroxisomal ascorbate peroxidase knockdown affects ROS signaling and triggers early leaf senescence[J]. Plant Science, 2017, 263: 55-65.

[41] TEIXEIRA F K, MENEZES-BENAVENTE L, GALVÃO V C, MARGIS R, MARGIS-PINHEIRO M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments[J]. Planta, 2006, 224 (2): 300-314.

[42] TEIXEIRA F K, MENEZES-BENAVENTE L, MARGIS R, MARGIS-PINHEIRO M. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome[J]. Journal of Molecular Evolution, 2004, 59(6): 761-770.

[43] HADIARTO T, TRAN L S. Progress studies of drought-responsive genes in rice[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(3): 297-310.

[44] SHINOZAKI K, SHINOZAKI K Y. Gene expression and signal transduction in water-stress response[J]. Plant Physiology, 1997, 115(2): 327-334.

[45] 段明，王兴春，元旭朝 . 番茄 APX 蛋白的表达分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版)，2016，36(6): 387-390.
DUAN Ming, WANG Xingchun, YUAN Xuchao. Expression analysis of *LeAPX* [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2016，36(6): 387-390.

[46] 李泽琴，李静晓，张根发 . 植物抗坏血酸过氧化物酶的表达调控以及对非生物胁迫的耐受作用[J]. 遗传，2013，35(1): 45-54.
LI Zeqin, LI Jingxiao, ZHANG Genfa. Expression regulation of plant ascorbate peroxidase and its tolerance to abiotic stresses [J]. Hereditas, 2013, 35(1): 45-54.