

毛花猕猴桃 *AeAPX* 基因家族鉴定与表达分析

王海令, 曹家乐, 廖光联, 黄春辉, 贾东峰, 曲雪艳, 徐小彪*

(江西农业大学农学院·江西农业大学猕猴桃研究所, 南昌 330045)

摘要:【目的】鉴定并分析毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha*) 抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 基因家族, 为毛花猕猴桃抗坏血酸 (ascorbate acid, AsA) 代谢调控分子机制的探究提供参考。【方法】利用生物信息学方法对毛花猕猴桃 APX 基因家族进行鉴定和分析, 并通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证分析 *AeAPXs* 在不同果实发育期中以及套袋处理后的表达情况。【结果】毛花猕猴桃全基因组中鉴定出 29 个 *AeAPX* 基因家族成员, 随机分布在 18 条染色体上, 并出现了基因片段复制现象。大多数基因被预测定位在叶绿体中。蛋白质二级结构以 α -螺旋和不规则卷曲为主, 且有 13 个家族成员属于跨膜蛋白。*AeAPXs* 家族具有相似的基因结构, 大多数含有 4 个外显子且在上游启动子区域, 分析发现, 大量与光 (Box4、G-Box)、激素 (ABRE、TCA-element) 逆境胁迫 (MBS、ARE) 响应相关的顺式作用元件。系统进化分析表明, *AeAPXs* 基因家族可分为 3 个亚类, 共存 6 对共线性基因对。qRT-PCR 分析表明, *AeAPXs* 表达峰值存在显著差异, 与 AsA 含量呈现相同或相反的趋势。*AeAPX27* 在果实的幼果期、转色期、成熟期都具有高表达水平, 与果实抗坏血酸含量极显著相关; 推测该基因是在果实生长发育时期调控抗坏血酸的关键基因。【结论】初步鉴定并提供了毛花猕猴桃 APX 基因家族成员信息, 预测了所具有的部分功能, 为进一步研究毛花猕猴桃 APX 基因参与 AsA 代谢调控机制提供了参考。

关键词: 毛花猕猴桃; APX; 抗坏血酸; 表达分析

中图分类号: S663.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)12-2225-16

Identification and expression analysis of *AeAPX* gene family in *Actinidia eriantha*

WANG Hailing, CAO Jiale, LIAO Guanglian, HUANG Chunhui, JIA Dongfeng, QU Xueyan, XU Xiaobiao*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University/Kiwifruit Institute of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

Abstract: 【Objective】Ascorbate peroxidase (APX) is one of the important antioxidant enzymes in the active oxygen metabolism pathway of plants and animals, especially it is the key enzyme to clear H_2O_2 in chloroplast and the main enzyme of ascorbate acid (AsA) metabolism. However, knowledge about APX gene family members and their evolutionary and functional characteristics in kiwifruit is limited. Therefore, the objective of this study was to identify and analyze the ascorbate peroxidase (APX) gene family of *Actinidia eriantha*, so as to provide reference for the molecular mechanism of ascorbate acid (AsA) metabolism regulation in *A. eriantha*. 【Methods】In this study, the APXs gene family members of *A. eriantha* were identified from Kiwifruit Genome Database according the ascorbate peroxidase gene (APXs) family members protein conserved domain of *Arabidopsis thaliana*, and their physicochemical properties, evolutionary relationship, gene structure and cis-acting elements of promoter were analyzed, and the expression of the *AeAPXs* at different fruit developmental stages and after light stress was verified and analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). 【Results】The results showed that twenty-nine *AeAPX* gene members were identified from the whole genome of kiwifruit, and they were not even-

收稿日期: 2022-05-24

接受日期: 2022-08-14

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 32160692)

作者简介: 王海令, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 果树种质资源与分子生物技术。Tel: 13707574412, E-mail: hailing729@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13767008891, E-mail: xbxu@jxau.edu.cn

ly distributed on the chromosomes. They were named as *AeAPX1*~*AeAPX29* according to their positions on the chromosome from the top to bottom. Among them, the *AeAPX3* and *AeAPX4* on chromosome 4, the *AeAPX6* and *AeAPX7* on chromosome 7, the *AeAPX11* and *AeAPX12* on chromosome 10, the *AeAPX18* and *AeAPX19* on chromosome 19, the *AeAPX26* and *AeAPX27* on chromosome 28 were tandem repeats. The results of the physical and chemical properties analysis showed that the CDS of these genes were 840-1515 bp, the protein length of the *AeAPXs* ranged from 275 to 504 aa, and their isoelectric point were between 4.73-9.12, their protein molecular weights were between 30 019.12-55 354.20 ku; and their instability index ranged from 26.63 to 51.59, instability index more than 40 means unstable, except that *AeAPX3*, *AeAPX5*, *AeAPX6*, *AeAPX9*, *AeAPX12*, *AeAPX13*, *AeAPX17*, *AeAPX21*, *AeAPX22*, *AeAPX23*, *AeAPX24* and *AeAPX29* proteins are unstable proteins, other *AeAPXs* belong to stable proteins; aliphatic index ranged from 72.73-100.09, aliphatic index less than 100 means lipid soluble protein, except for *AeAPX23* protein, other *AeAPXs* proteins belong to lipolytic protein. Subcellular localization prediction analysis showed that the *AeAPXs* gene family members were 16 *APX* genes predicted to be located in the chloroplast, 5 genes were located in extracellular matrix, 4 genes were located in cytoplasm, 2 genes were located in vacuole and 2 genes were located in nucleus. The secondary structures of these protein were mainly composed of alpha helix and random coil. There were 13 gene family members belonging to the transmembrane proteins, including *AeAPX1*, *AeAPX3*, *AeAPX5*, *AeAPX6*, *AeAPX8*, *AeAPX11*, *AeAPX14*, *AeAPX18*, *AeAPX21*, *AeAPX22*, *AeAPX23*, *AeAPX26*, *AeAPX28*. The analysis of gene structure showed that the protein motifs of the *AeAPXs* family genes had obvious block identity, sequence homology and conservation, and most of them contained four exons. A large number of *cis*-acting elements related to light, hormone and stress response were found in the upstream promoter region of the *AeAPXs*. These *cis*-acting elements included optical response element Box4, G-box, GT1-motif, GATA-motif, MRE, TCT-motif and TCCC-motif; Box4 and G-box were distributed more in the gene family; abscisic acid response elements (ABRE) were involved in the ABA and drought response, drought stress response element (MBS), low temperature stress response element (LTR), anaerobic response element (ARE), defense and stress response elements (TC-rich repeats). Conserved domain analysis showed that Motif 3 and Motif 9 present in all *AeAPXs* proteins, and seven similar conserved motifs widely present in 26 *AeAPXs* family members, indicating that the amino acid sequences encoded by these 26 genes are highly conservative. The above results showed that the conserved motifs of each member of the gene family in the conserved domain were different in position and quantity, which was likely to lead to gene functional differentiation. Phylogenetic analysis showed that the *AeAPXs* gene family could be classified into three subgroups; Subgroup A, Subgroup B, Subgroup C were respectively consisting of seven, ten, twelve members of the *AeAPXs* gene family with a total of 6 co-linear gene pairs. The results of ascorbic acid content determination showed that ascorbic acid content decreased with fruit ripening. And the content of ascorbic acid decreased significantly after bagging. Gene expression analysis showed that the selected 10 genes could be divided into three categories, of which the *AeAPX3* and *AeAPX27* were grouped into one category. The *AeAPX27* had high expression levels in young fruit period, color turning period and physiological ripening period, which was significantly correlated with the content of AsA in fruit. It was the key gene for the regulation of ascorbic acid in kiwifruit. The expression of the *AeAPX3* gene was just opposite to that of the *AeAPX27*. The *AeAPX8*, *AeAPX13*, *AeAPX14*, *AeAPX22* and *AeAPX25* were grouped together, and their gene expression levels gradually decreased, which was consistent with the content of AsA. The expression levels of the *AeAPX6*, *AeAPX21* and *AeAPX24* genes were up-regulated in the three developmental

stages of fruit, which was opposite to the content of AsA. The effect of bagging on the expression of these genes was shown in Figure 8, except for the *AeAPX3* and *AeAPX13*, the expression of other genes decreased after bagging, which was consistent with the content of AsA. 【Conclusion】 A total of twenty-nine *AeAPXs* family genes in *A. eriantha* were identified in this paper, gene expression of fruits in different growth stages showed that the *AeAPX27* had high expression levels in three growth stage, which was significantly correlated with the content of ascorbic acid in the fruit. We can speculate that it would be the key gene related to fruit growth and development and regulation of ascorbic acid.

Key words: *Actinidia eriantha*; Ascorbate peroxidase; Ascorbate acid; Expression analysis

毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha*) 是隶属于猕猴桃科 (*Actinidiaceae*) 猕猴桃属 (*Actinidia*) 的多年生落叶藤本果树, 是我国特有的野生种质资源^[1], 果实中抗坏血酸 (AsA) 含量极高, AsA 是研究植物中代谢与调控的宝贵材料。AsA 是一种多功能代谢物, 在植物中广泛调控光合作用、环境诱导的氧化胁迫、机械损伤响应等生理生化过程^[2]。氧化胁迫是对植物造成伤害的主要非生物胁迫, 在长期的演化过程中植物体内形成了多种应对氧化胁迫清除氧自由基的酶, 如超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX, EC1.11.1.11)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 等。同时 SOD、APX 和 GR 也参与了 AsA-谷胱甘肽循环^[3]。其中, APX 是以 AsA 为电子供体的一种清除 H₂O₂ 的关键酶^[4], 可以催化 H₂O₂ 转化为 H₂O 和 O₂, 将 AsA 氧化为单脱氢抗坏血酸 (MDHA), 也是 AsA 代谢的主要酶类^[5]。前人的研究发现, APX 基因的表达受到光照、干旱、盐胁迫等多种逆境胁迫诱导^[6-7], 作为 AsA 氧化分解途径的关键酶, APX 基因的表达情况与 AsA 含量密切相关。

植物中 APX 可分为 4 种类型: 细胞质型、叶绿体型、线粒体型和过氧化物酶体型^[8]。目前为止, APX 基因已经在多个物种中进行了成员鉴定, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*) 等^[9-14], 研究表明拟南芥 APXs 家族含有 8 个基因, 其中有 3 个 (*APX1*、*APX2* 和 *APX6*) 位于细胞质, 2 个 (*sAPX*、*tAPX*) 位于叶绿体, 3 个 (*APX3*、*APX4*、*APX5*) 位于过氧化物酶体^[15]; 水稻 APXs 基因家族含有 8 个成员, 2 个在细胞质、2 个在过氧化物酶体、3 个在叶绿体、1 个在线粒体^[16]。但在毛花猕猴桃上未见 APX 基因家族成员鉴定的报道。据此, 笔者在本

研究中利用生物信息学的方法鉴定毛花猕猴桃 APX 基因家族成员, 对其基因家族成员基因结构及系统进化等进行分析, 同时对基因家族成员在果实不同发育时期和套袋处理之后的表达情况进行检测, 以期为毛花猕猴桃 AsA 代谢调控机制研究奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料和处理

选取江西省奉新县农业农村局猕猴桃种质资源圃内生长健壮、无病虫害感染的毛花猕猴桃赣绿 1 号为试验材料。选取 6 株树体大小、生长势相似, 均匀接受阳光的成熟植株随机分成 3 组 (重复), 每组两株。在盛花 30 d 后, 每株树选取来自不同方位的大约 120 个果实使用外黄内黑单层纸袋进行套袋处理, 不套袋作为对照。套袋处理参考 Liao 等^[17]的方法。采集幼果期 (盛花后 25 d)、转色期 (盛花后 125 d)、采摘期 (盛花后 165 d) 果实, 取中果皮并将中果皮切碎后用液氮处理, 储存于 -80 °C 超低温条件下备用。

1.2 APX 基因家族成员的鉴定

从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org>) 下载过氧化物酶蛋白的隐马尔可夫模型文件, 利用 TBtools 软件^[18]在毛花猕猴桃品种华特猕猴桃基因组蛋白序列中进行搜索, 获取毛花猕猴桃 APX 基因家族成员的候选序列。同时以拟南芥 APX 基因家族成员蛋白序列为探针, 在猕猴桃基因组数据库中进行 blastp, 获取同源性较高的序列, 并作为毛花猕猴桃 APX 基因家族成员的候选序列。上述两种方法共同鉴定出的序列进行下一步分析。以是否含有 APX 基因家族特有保守域 (PF00141) 为标准, 进一步在 Pfam 数据库进行验证。确定毛花猕猴桃 APX 基因家族成员后, 在 ProtProm (<http://web.expasy.org/protparam/>) 网站中测定毛花猕猴桃 APX 蛋白的分子质量、等电点等理化性质^[19]。此外, 从 NCBI (<https://www.ncbi>

nlm.nih.gov)上分别下载拟南芥、棉花 APXs 蛋白的氨基酸序列用于后续的序列比对。

1.3 进化分析

利用 Clustal X 将拟南芥、棉花、毛花猕猴桃 APXs 基因家族的氨基酸序列进行多序列比对,然后用 MEGA X 软件中的比邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,参数使用默认值,Bootstrap 值设置为 1000 次。利用 TBtools 软件^[18]进行染色体共线性分析。

1.4 基因结构、保守域及 motif 分析

利用 MEME 在线网站(<http://meme-suite.org/tools/meme>)对毛花猕猴桃 APXs 蛋白的 motifs 进行识别, motifs 的最大设置值为 10^[20]。使用 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)在线软件分析毛花猕猴桃 APXs 基因家族的基因结构^[21]。通过 WoLF PSORT (<http://wolf-psort.org>)网站来进行亚细胞定位预测。

1.5 顺式作用元件分析

用 TBtools 软件^[18]提取 *AeAPXs* 基因转录起始位点上游 2000 bp 的序列,然后利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

在线网站进行顺式作用元件分析^[22]。

1.6 跨膜分析及蛋白二级结构预测

使用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件预测 *AeAPXs* 基因家族成员的跨膜结构。利用 NPSA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)来进行 *AeAPXs* 基因家族成员的蛋白质二级结构分析^[23]。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析

用北京擎科生物科技有限公司的多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。用北京聚合美生物科技有限公司 M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover 进行 cDNA 第一链的合成。通过 Primer Premier 5 软件设计荧光定量引物,引物由北京擎科生物科技有限公司进行引物合成(表 1)。选择 *Actin* 作为内参基因。反应体系为 2× Realtime Super mix 10 μL, 正、反引物浓度为 10 nmol·L⁻¹, cDNA 1.0 μL, ddH₂O 8 μL。设置 3 个生物学重复。PCR 仪型号为 CFX96™ Real-Time System。qRT-PCR 反应程序为:95 °C 1 min, 95 °C 10 s, 60 °C 5 s, 72 °C 12 s, 40 个循环。基因的相对表达量采用 2^{-ΔΔCT} 计算^[24]。

表 1 qRT-PCR 定量引物设计

Table 1 Primers for qRT-PCR

基因名称 Gene name	上游引物(5' - 3') Forward primer (5' - 3')	下游引物(5' - 3') Reverse primer (5' - 3')
<i>AeAPX3</i>	ACCGTCAGGGTCTTTTCACTTC	CGCTCAACTGGCTCATCTTTAT
<i>AeAPX6</i>	GGGAGGCATCTGAGTTTGACA	CAAAGGAACTGGGAGTGAACC
<i>AeAPX8</i>	CCCTATGGGAAGTGAAGTTGG	CGGAAGACGATTGAGAAGCA
<i>AeAPX13</i>	GGCTATGCTCTTGCCGACCTA	AAGTTCACGCAGCGACCCA
<i>AeAPX14</i>	CCACTCCACGACTGCTTTG	CCAACCTCGGTCCTCAAGAAT
<i>AeAPX21</i>	CGTGCGACGGGTGAAAGTT	CGCACCAGAATCGGATGACA
<i>AeAPX22</i>	CGCCTTCCAGATGCCAAAC	CCTCTCCGACTCCTTATTCA
<i>AeAPX24</i>	ACTGCTTTGTTGAGGGATGTGA	CGGCTTCTACTGCTTGTTTTGC
<i>AeAPX25</i>	GTCCAGGGATGTGATTCTTCG	GGGTCGCTATGGCAAGAATGT
<i>AeAPX27</i>	ACTTACTCTTGGACGAAGGGAC	AGATGAGATTGCTGAGGTCGG
<i>Actin</i>	GTGCTCAGTGGTGGTTCAA	GACGCTGTATTCTCTCAG

1.8 抗坏血酸含量的测定和数据分析

根据 Liao 等^[25]的方法,通过 2,6-二氯酚酚滴定法测定 AsA 含量。使用 Excel 2019 整理试验数据并采用 IBM SPSS Statistics 22 进行差异显著性分析;用 TBtools 制图软件绘制基因表达热图。

2 结果与分析

2.1 毛花猕猴桃 APX 基因家族成员鉴定

利用生物信息学方法,对猕猴桃全基因组数据库进行筛选,通过对候选基因保守结构域分析,共鉴定出 29 个 *AeAPXs* 基因家族成员,根据它们在染色体上的分布,依次命名为 *AeAPX1*~*AeAPX29*。从表 2 可见, *AeAPXs* 的编码区在 840 (*AeAPX7*)~1515 bp (*AeAPX13*)之间。基因全长在 1362(*AeAPX9*)~10 391 bp

表2 毛花猕猴桃 *APX* 基因家族成员信息
Table 2 *APX* gene family members information of *A. eriantha*

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	染色体定位 Scaffold location	CDS长度 Length of CDS/bp	基因组全长 Full length of genomic/bp	氨基酸数目 Amino acid number/aa	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>AeAPX1</i>	DTZ79_01g03630	Chr01:5406155...5410057(+)	1044	3903	347	Chloroplast
<i>AeAPX2</i>	DTZ79_02g06840	Chr02:6659571...6663684(+)	894	4114	297	Chloroplast
<i>AeAPX3</i>	DTZ79_04g06420	Chr04:7436535...7439936(-)	1068	3402	355	Extracellular
<i>AeAPX4</i>	DTZ79_04g07140	Chr04:8940181...8945213(-)	990	5033	329	Chloroplast
<i>AeAPX5</i>	DTZ79_05g11500	Chr05:21272693...21274857(-)	927	2165	308	Cytoplasm
<i>AeAPX6</i>	DTZ79_07g00590	Chr07:614212...622720(+)	921	8509	306	Cytoplasm
<i>AeAPX7</i>	DTZ79_07g01790	Chr07:1826334...1829176(+)	840	2843	279	Chloroplast
<i>AeAPX8</i>	DTZ79_07g09270	Chr07:11017471...11019659(-)	1179	2189	392	Chloroplast
<i>AeAPX9</i>	DTZ79_07g11200	Chr07:17663960...17665321(+)	945	1362	314	Chloroplast
<i>AeAPX10</i>	DTZ79_09g09600	Chr09:14174727...14181632(-)	1005	6906	334	Chloroplast
<i>AeAPX11</i>	DTZ79_10g11260	Chr10:21657778...21659988(-)	1023	2211	340	Extracellular
<i>AeAPX12</i>	DTZ79_10g11670	Chr10:22096742...22100862(+)	960	4121	319	Vacuolar
<i>AeAPX13</i>	DTZ79_13g01900	Chr13:1640106...1645822(+)	1515	5717	504	Cytoplasm
<i>AeAPX14</i>	DTZ79_13g10130	Chr13:10893604...10896439(-)	978	2836	325	Chloroplast
<i>AeAPX15</i>	DTZ79_14g00200	Chr14:322107...323930(+)	897	1824	299	Nucleus
<i>AeAPX16</i>	DTZ79_15g02370	Chr15:3179530...3182563(+)	891	3034	296	Chloroplast
<i>AeAPX17</i>	DTZ79_18g07660	Chr18:15931297...15932678(-)	975	1382	324	Extracellular
<i>AeAPX18</i>	DTZ79_19g01390	Chr19:7574129...7576300(+)	987	2172	328	Chloroplast
<i>AeAPX19</i>	DTZ79_19g03570	Chr19:11318692...11322399(-)	966	3708	321	Vacuolar
<i>AeAPX20</i>	DTZ79_20g09140	Chr20:14012423...14014829(+)	948	2407	315	Extracellular
<i>AeAPX21</i>	DTZ79_21g08460	Chr21:10697567...10707957(-)	1296	10 391	431	Chloroplast
<i>AeAPX22</i>	DTZ79_21g12410	Chr21:18374496...18378915(+)	870	4420	289	Cytoplasm
<i>AeAPX23</i>	DTZ79_25g07980	Chr25:17510785...17514872(+)	1020	4088	339	Extracellular
<i>AeAPX24</i>	DTZ79_27g00450	Chr27:491079...493386(-)	972	2308	323	Chloroplast
<i>AeAPX25</i>	DTZ79_27g05370	Chr27:5708616...5711917(-)	984	3302	327	Chloroplast
<i>AeAPX26</i>	DTZ79_28g05580	Chr28:9039938...9042412(+)	1020	2475	339	Chloroplast
<i>AeAPX27</i>	DTZ79_28g05600	Chr28:9070731...9075738(+)	948	5008	315	Chloroplast
<i>AeAPX28</i>	DTZ79_28g12520	Chr28:18634039...18637726(+)	987	3688	328	Chloroplast
<i>AeAPX29</i>	DTZ79_29g12390	Chr29:20712431...20715661(+)	1155	3231	384	Nucleus

(*AeAPX21*)之间,编码氨基酸数在279~504 aa之间。*AeAPXs*基因家族成员分别有16个*APX*基因定位在叶绿体,5个定位在细胞外基质,4个定位在细胞质,2个定位在液泡,2个定位在细胞核。

2.2 *AeAPXs*家族成员蛋白理化性质分析

蛋白质理化性质分析结果(表3)表明,其理论等电点在4.73~9.12之间,且*AeAPX24*最小,*AeAPX1*和*AeAPX27*最大。相对分子质量为30 019.12~55 354.20 ku。除了*AeAPX3*、*AeAPX5*、*AeAPX6*、*AeAPX9*、*AeAPX12*、*AeAPX13*、*AeAPX17*、*AeAPX21*、*AeAPX22*、*AeAPX23*、*AeAPX24*、*AeAPX29*蛋白为不稳定蛋白外,其他*AeAPXs*均属于稳定蛋白。*AeAPX10*、*AeAPX19*、*AeAPX24*、*AeAPX26*、

*AeAPX28*蛋白为亲水性蛋白;除了*AeAPX23*蛋白外,其他*AeAPXs*蛋白均属于脂溶蛋白。

2.3 *AeAPXs*基因家族成员的跨膜分析以及蛋白结构预测

对29个*APX*基因家族成员的氨基酸序列进行跨膜区预测,结果(表4,图1)表明,只有*AeAPX1*、*AeAPX3*、*AeAPX5*、*AeAPX6*、*AeAPX8*、*AeAPX11*、*AeAPX14*、*AeAPX18*、*AeAPX21*、*AeAPX22*、*AeAPX23*、*AeAPX26*、*AeAPX28*这13个基因编码的蛋白质各含有1个跨膜区,均属于跨膜蛋白。

*AeAPXs*基因家族编码蛋白质的二级结构(表5),主要有 α -螺旋(Alpha helix)占34.74%~43.14%、 β -转角(Beta turn)占4.36%~8.55%、不规则卷曲

表 3 AeAPXs 蛋白理化性质分析

Table 3 Physical and chemical properties of AeAPXs

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	理论等电点 pI	相对分子质量 Molecular weight/ku	不稳定指数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	总平均亲水性 Grand average of hydropathicity
<i>AeAPX1</i>	DTZ79_01g03630	9.12	38 786.68	30.15	87.38	-0.195
<i>AeAPX2</i>	DTZ79_02g06840	8.63	31 052.76	34.35	76.26	-0.143
<i>AeAPX3</i>	DTZ79_04g06420	6.23	38 817.38	41.67	92.34	-0.026
<i>AeAPX4</i>	DTZ79_04g07140	5.90	35 680.53	33.68	90.09	-0.153
<i>AeAPX5</i>	DTZ79_05g11500	5.85	33 923.62	41.45	74.12	-0.207
<i>AeAPX6</i>	DTZ79_07g00590	8.72	34 475.55	40.91	91.50	-0.274
<i>AeAPX7</i>	DTZ79_07g01790	5.97	30 019.12	32.99	84.59	-0.119
<i>AeAPX8</i>	DTZ79_07g09270	6.95	43 518.84	34.55	88.04	-0.165
<i>AeAPX9</i>	DTZ79_07g11200	8.62	33 794.13	40.21	85.83	-0.110
<i>AeAPX10</i>	DTZ79_09g09600	7.96	36 961.25	37.25	87.28	0.021
<i>AeAPX11</i>	DTZ79_10g11260	8.35	36 834.16	38.42	85.21	-0.093
<i>AeAPX12</i>	DTZ79_10g11670	8.28	34 531.53	51.59	86.30	-0.113
<i>AeAPX13</i>	DTZ79_13g01900	5.21	55 354.20	45.80	93.79	-0.066
<i>AeAPX14</i>	DTZ79_13g10130	8.92	34 748.59	35.05	85.51	-0.018
<i>AeAPX15</i>	DTZ79_14g00200	7.68	33 601.33	39.88	82.11	-0.321
<i>AeAPX16</i>	DTZ79_15g02370	5.93	31 432.32	29.00	82.80	-0.098
<i>AeAPX17</i>	DTZ79_18g07660	5.66	35 365.11	40.59	84.66	-0.122
<i>AeAPX18</i>	DTZ79_19g01390	6.52	36 065.19	33.74	82.07	-0.057
<i>AeAPX19</i>	DTZ79_19g03570	4.89	34 308.89	37.24	91.68	0.082
<i>AeAPX20</i>	DTZ79_20g09140	8.58	34 282.34	32.26	86.38	-0.048
<i>AeAPX21</i>	DTZ79_21g08460	8.18	46 968.27	46.20	79.81	-0.403
<i>AeAPX22</i>	DTZ79_21g12410	6.47	31 836.35	43.17	88.10	-0.255
<i>AeAPX23</i>	DTZ79_25g07980	5.93	38 095.48	50.49	100.09	-0.125
<i>AeAPX24</i>	DTZ79_27g00450	4.73	34 674.20	41.00	78.27	0.012
<i>AeAPX25</i>	DTZ79_27g05370	8.79	35 545.46	28.10	80.58	-0.065
<i>AeAPX26</i>	DTZ79_28g05580	5.53	36 338.00	26.63	85.75	0.041
<i>AeAPX27</i>	DTZ79_28g05600	9.12	34 349.71	30.02	72.73	-0.342
<i>AeAPX28</i>	DTZ79_28g12520	6.43	35 294.30	37.73	87.74	0.073
<i>AeAPX29</i>	DTZ79_29g12390	5.19	42 018.15	44.07	78.54	-0.219

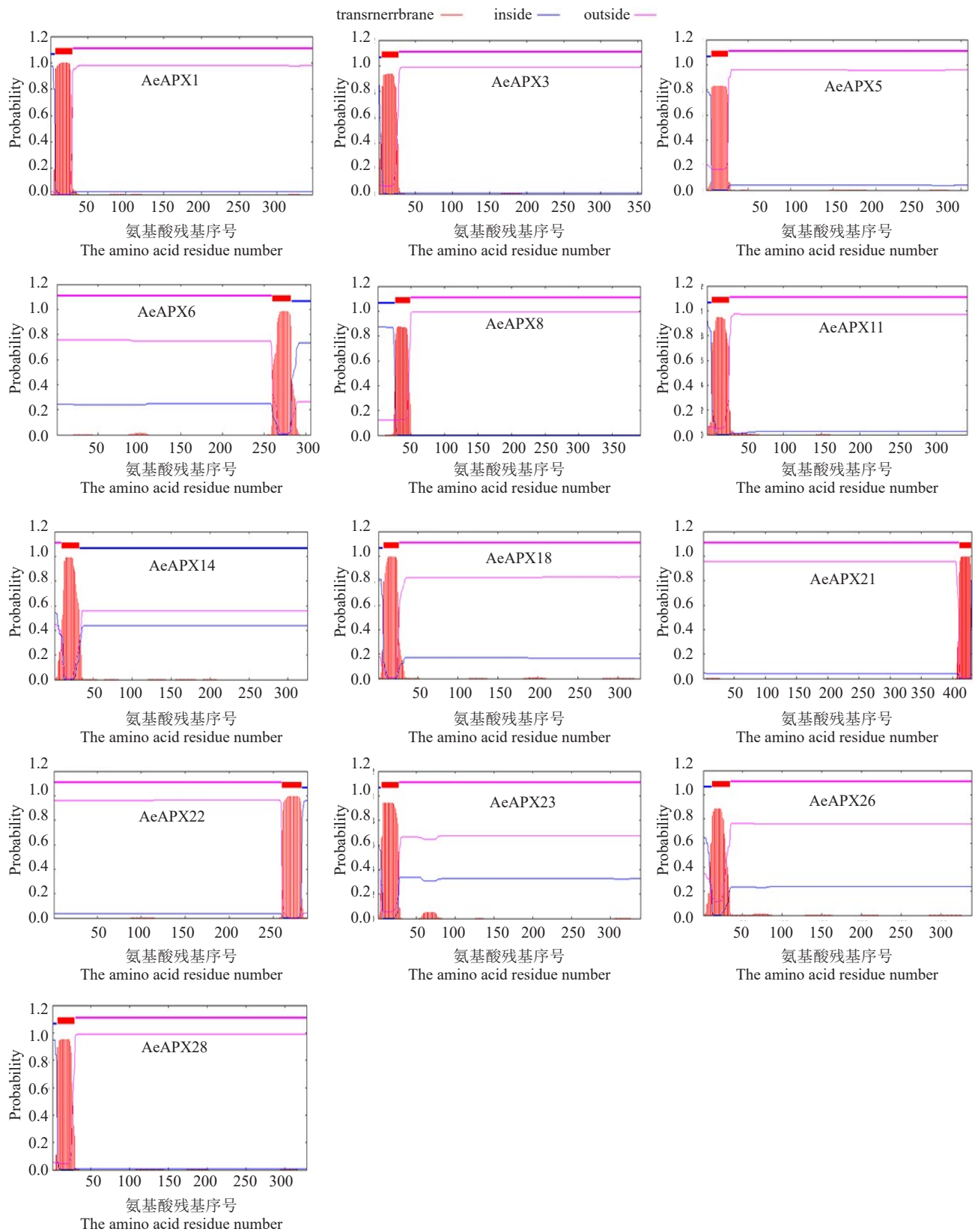
注:总平均亲水性为负值表示亲水性,正值表示疏水性;不稳定指数大于 40 为不稳定蛋白;脂溶指数小于 100 为脂溶蛋白。

Note: Value of grand average of hydropathicity being negative means hydrophobicity, while positive means hydrophobicity; instability index more than 40 means unstable; aliphatic index less than 100 means lipid soluble protein.

表 4 毛花猕猴桃 13 种 APX 膜蛋白跨膜区

Table 4 Transmembrane region of 13 APX membrane proteins in *A. eriantha*

膜蛋白 Membrane protein	N 端位置 Position of N terminal	跨膜区 Transmembrane domain	C 端位置 Position of C terminal	长度 Length/aa
<i>AeAPX1</i>	12	GLGLLFLPLLAVFALGSWWFVVV	34	23
<i>AeAPX3</i>	7	ALLSLFCLTSLLLVISLLLSSY	29	23
<i>AeAPX5</i>	12	LGAILVMEIIVMSGTRFGAV	31	20
<i>AeAPX6</i>	265	AILAQSAFGVAVAAAVVLTLYLY	287	23
<i>AeAPX8</i>	32	LSLFLLLLSLSDIAAVSAVLPFF	54	23
<i>AeAPX11</i>	7	AFLKVLSSLMVVVFLFPTLSLAF	29	23
<i>AeAPX14</i>	15	SMLAFVLFLLVLLVGSSAQLSA	37	23
<i>AeAPX18</i>	13	YLTIFIFSLVIFLYPFAN	30	18
<i>AeAPX21</i>	416	YFLNIHVIIVLAILTYLLG	435	20
<i>AeAPX22</i>	265	TILAQSAVGAVATAVLLSYFY	287	23
<i>AeAPX23</i>	10	PILLIVLILIFHGLGSYSGLVVL	32	23
<i>AeAPX26</i>	15	FCFSVVFLFVFLGISSAQLSSNY	37	23
<i>AeAPX28</i>	12	FNGFYFFIALLMSCMAVRAQLSA	34	23



红色阴影部分代表跨膜区域,当跨膜区域穿过内部和外部时,可以将其识别为跨膜蛋白。

The red shaded area represents the transmembrane region, which can be identified as a transmembrane protein when it runs through the inside and outside.

图1 *AeAPXs* 基因家族膜蛋白跨膜区预测

Fig. 1 Predicted transmembrane domains of APXs protein in *A. eriantha*

表 5 毛花猕猴桃 APX 蛋白二级结构分析

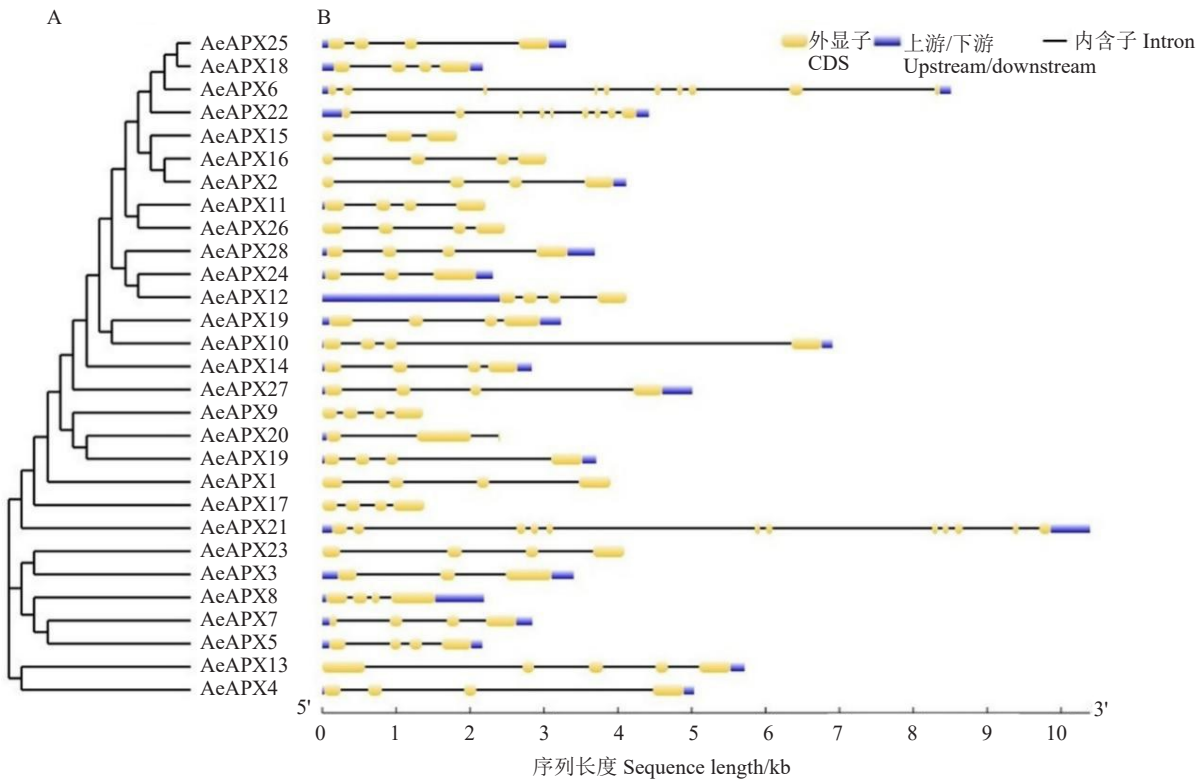
Table 5 The secondary structure analysis of APX protein sequence in *A. eriantha*

蛋白 Protein	占比Proportion/%				蛋白 Protein	占比Proportion/%			
	α -螺旋 Alpha helix	β -转角 Beta turn	不规则卷曲 Random coil	延伸链 Extended strand		α -螺旋 Alpha helix	β -转角 Beta turn	不规则卷曲 Random coil	延伸链 Extended strand
AeAPX1	38.04	5.48	38.33	18.16	AeAPX16	40.54	5.07	39.86	14.53
AeAPX2	40.07	6.06	40.74	13.13	AeAPX17	39.51	5.56	38.58	16.36
AeAPX3	41.97	5.35	39.72	12.96	AeAPX18	37.80	4.88	41.46	15.85
AeAPX4	40.43	5.47	38.60	15.50	AeAPX19	35.20	4.36	41.12	19.31
AeAPX5	34.74	6.17	40.91	18.18	AeAPX20	40.63	4.76	37.14	17.46
AeAPX6	43.14	8.50	38.24	10.13	AeAPX21	38.28	6.03	46.40	9.28
AeAPX7	41.94	5.38	40.14	12.54	AeAPX22	41.52	6.57	41.52	10.38
AeAPX8	35.97	7.14	38.52	18.37	AeAPX23	34.81	8.55	40.12	16.52
AeAPX9	41.08	5.10	40.45	13.38	AeAPX24	37.77	4.02	40.87	17.34
AeAPX10	42.22	5.09	39.52	13.17	AeAPX25	38.53	6.12	39.45	15.90
AeAPX11	36.47	8.24	39.12	16.18	AeAPX26	39.23	6.49	41.00	13.27
AeAPX12	43.26	5.33	38.56	12.85	AeAPX27	39.68	6.98	39.68	13.65
AeAPX13	27.38	7.94	44.44	20.24	AeAPX28	43.60	5.18	38.41	12.80
AeAPX14	40.00	6.15	40.00	13.85	AeAPX29	32.03	7.29	43.49	17.72
AeAPX15	38.80	5.02	39.80	16.39					

(Random coil)占37.14%~41.52%、延伸链(Extended strand)占9.28%~20.24%, α -螺旋与不规则卷曲所占比例相差不大,但是远高于 β -转角和延伸链所占比例。

2.4 基因结构和保守域分析

采用GSDS 2.0在线工具对 *AeAPXs* 的内含子/外显子结构进行分析,结果(图2)表明,*AeAPXs* 具有



A. *AeAPXs* 家族系统进化树; B. *AeAPXs* 家族基因结构分布。

A. Phylogenetic tree of *APX* family in *A. eriantha*; B. Structure distribution of *AeAPX* family in *A. eriantha*.

图 2 *AeAPXs* 基因家族结构

Fig. 2 Structure of *APX* gene family in *A. eriantha*

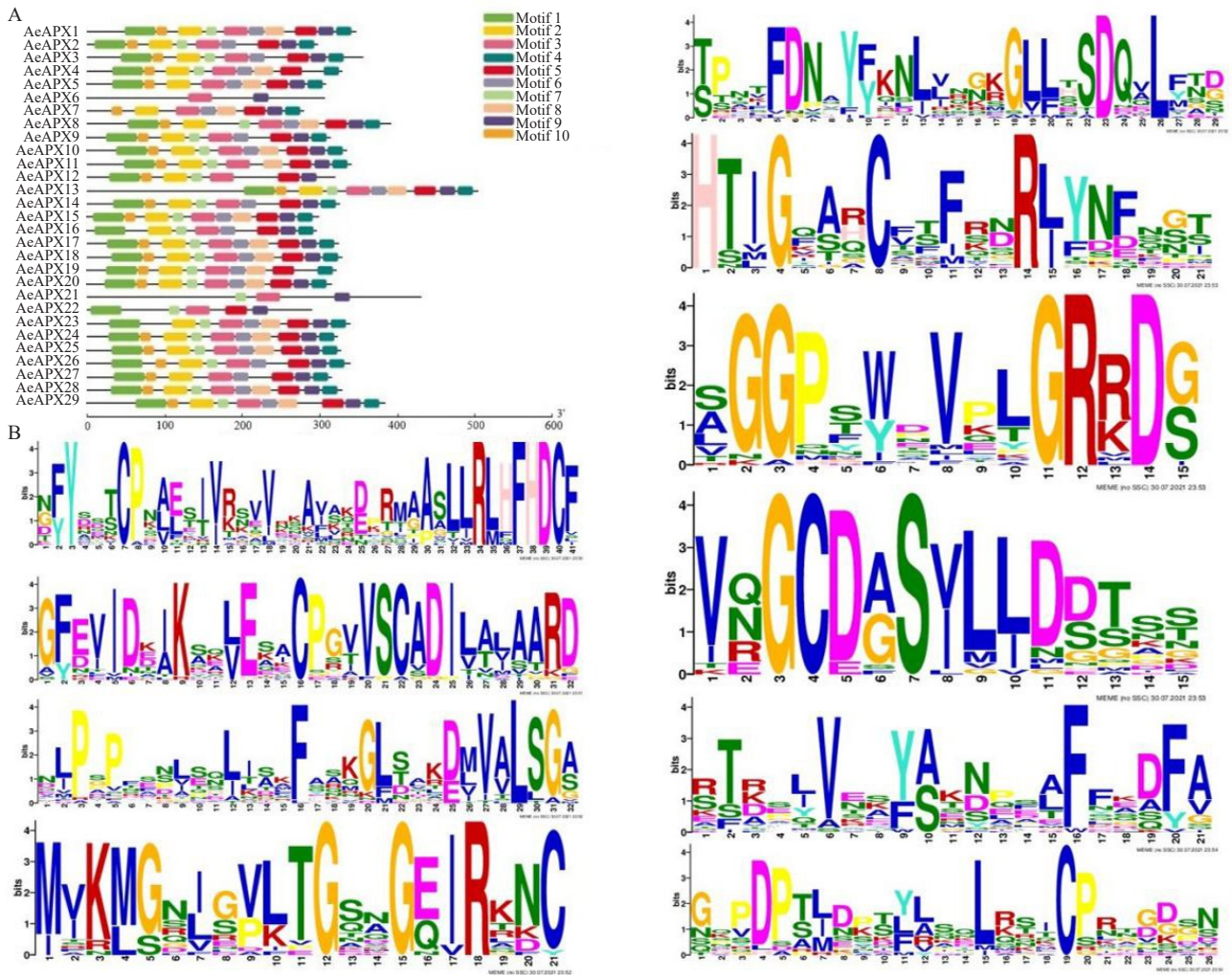
相似的基因结构,外显子数分布为 2~12 个。除了 *AeAPX6*、*AeAPX21*、*AeAPX22* 分别含有 10、12、9 个外显子数外,其余 *AeAPXs* 家族成员的外显子数为 2~5 个,但大多数含有 4 个外显子。

通过 MEME 软件构建 *AeAPXs* 保守区域基序分析图(图 3),结果表明,毛花猕猴桃 *AeAPXs* 序列中含有 10 个基序,分别为 Motif 1~Motif 10。其中 Motif 3 和 Motif 9 存在于所有 *AeAPXs* 蛋白中,除 Motif 3 和 Motif 9 之外,*AeAPX21*、*AeAPX22* 蛋白还含有 Motif 1、Motif 5、Motif 7 这 3 个基序;其余 26 个 *AeAPXs* 家族成员含有 7 个相似的 Motif 基序,整体上看这 26 个基因编码的氨基酸序列保守性较强。

以上结果显示,保守域中各基因家族成员的基序位置不同,数量不同,很可能导致基因功能分化。

2.5 进化分析

为了探究 *APX* 基因家族的进化关系,利用毛花猕猴桃、拟南芥、棉花 *APXs* 基因家族的蛋白序列构建了系统进化树。结果(图 4)表明,该基因家族可分为 3 个亚类。A 亚类由 7 个 *AeAPXs* 基因家族成员组成;其中 *AeAPX6* 与拟南芥 *AtAPX3* 和棉花 *GhAPX4* 的同源性为 100%,*AeAPX22* 与 *AtAPX5* 的同源性为 98%。B 亚类由 10 个 *AeAPXs* 基因家族成员组成。C 亚类由 12 个 *AeAPXs* 基因家族成员组成;其中 *AeAPX15* 和棉花 *GhAPX6* 的同源性为

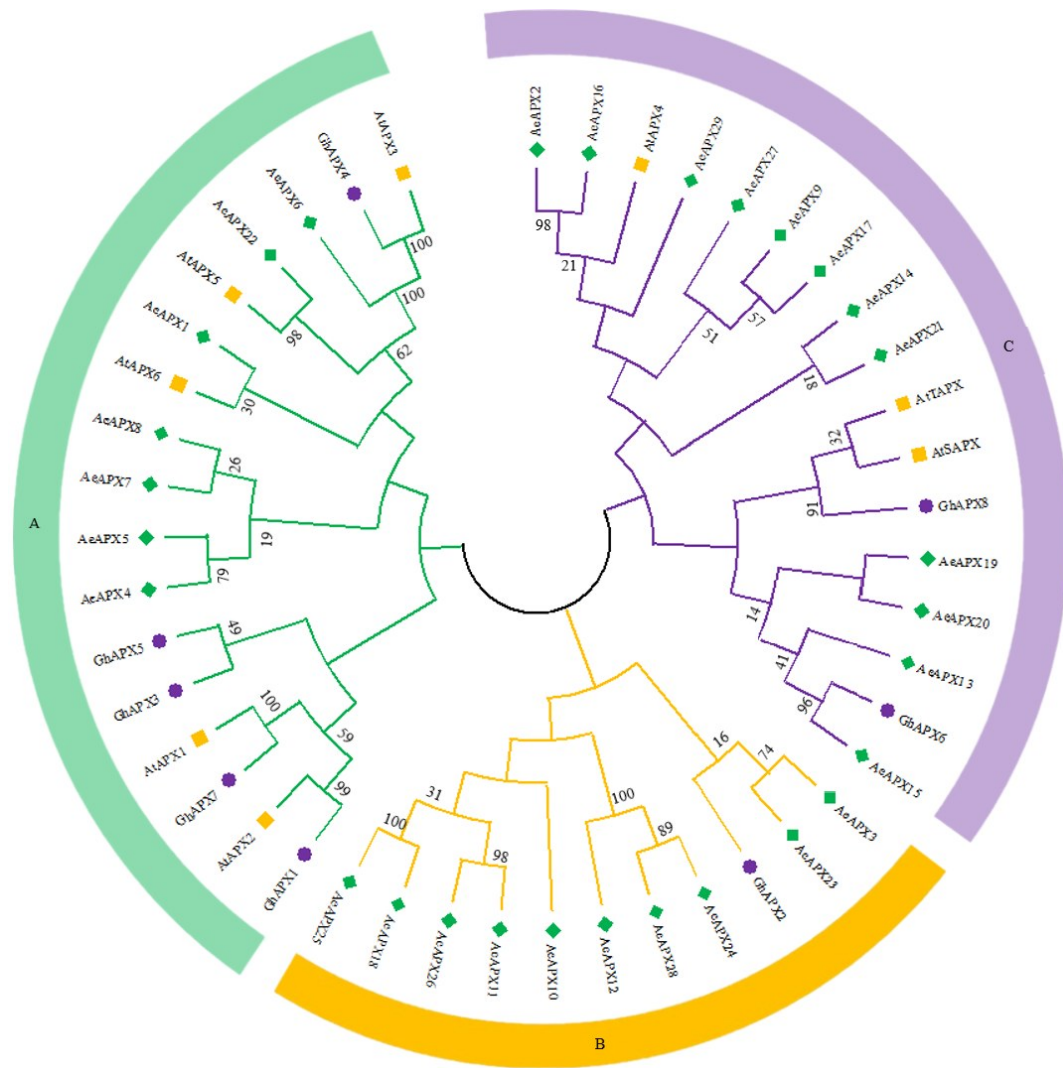


A. *AeAPXs* 蛋白序列的保守基序;B. 保守结构域的序列保守性。

A. Conserved motifs of *AeAPX* protein sequences were analyzed; B. The conservation of the sequences for each conserved domain was also presented.

图 3 *AeAPXs* 基因家族基序分析

Fig. 3 Motif analysis of *APX* gene family in *A. eriantha*



At. 拟南芥; Gh. 棉花; Ae. 毛花猕猴桃。

At. Arabidopsis thaliana; *Gh. Gossypium hirsutum*; *Ae. A. eriantha*.

图 4 毛花猕猴桃与其他植物 APX 蛋白的系统进化关系

Fig. 4 Phylogenetic relationship of APX protein between *A. eriantha* and other plants

96%。以上分析表明, APX 基因家族的不同成员间在进化上有一定差异, 是一个具有功能多样性的大家族, 进化树中的不同分支也预示着该家族蛋白具有多种功能。

2.6 顺式作用元件、染色体共线性分析

从 PlantCARE 在线网站中预测 *AeAPXs* 基因家族成员上游 2000 bp 序列, 这些序列除了具有典型的核心启动子 TATA-Box 外, 还具有光响应、激素响应及逆境响应等元件。如图 5 所示, 与光响应相关的顺式响应元件主要有 Box4、G-Box、GT1-motif、GA-TA-motif、MRE、TCT-motif、TCCC-motif; 其中 Box4 和 G-Box 在基因家族中分布较多。一共有 5 种激素相关的顺式响应元件, 包括 ABA (ABRE)、GA3

(TATC-box)、MeJA (TGACG-motif、CGTCA-motif)、SA (TCA-element)、Auxin (TGA-element)。除此之外, 基因家族中还有与逆境响应相关的元件, 主要是与干旱诱导 (MBS)、厌氧反应 (ARE)、低温条件 (LTR)、抵御逆境胁迫 (TC-rich repeats) 相关的顺式作用元件。

为了进一步解析毛花猕猴桃 APX 家族基因的进化关系, 基于猕猴桃基因组注释信息, 对 APX 家族基因进行了染色体定位分析和物种内共线性分析。染色体定位分析结果 (图 6) 表明, *AeAPXs* 基因家族成员不均匀分布在 18 条染色体上, 分别定位于 1 号和 2 号染色体 (*AeAPX1*、*AeAPX2*)、4 号染色体 (*AeAPX3* 和 *AeAPX4*)、5 号和 7 号染色体 (*AeAPX5* 和

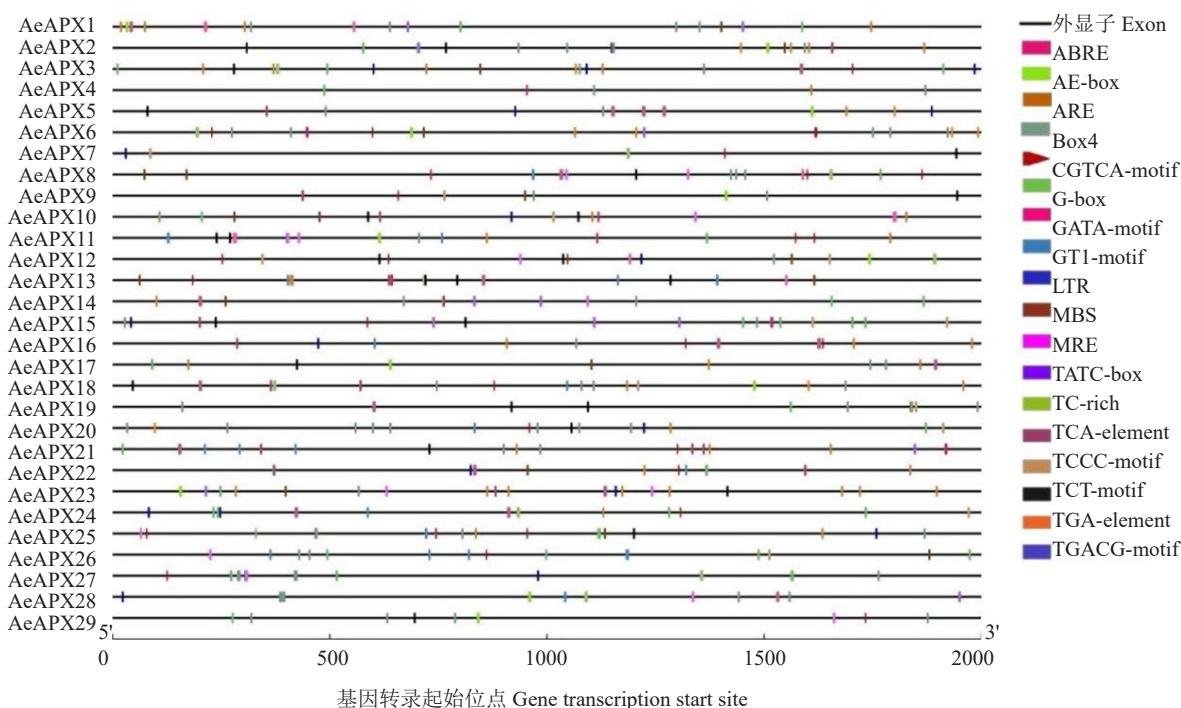


图 5 *AeAPXs* 基因家族上游启动子系列中的响应元件数

Fig. 5 Number of cis-acting elements in promoter regions of *AeAPXs*

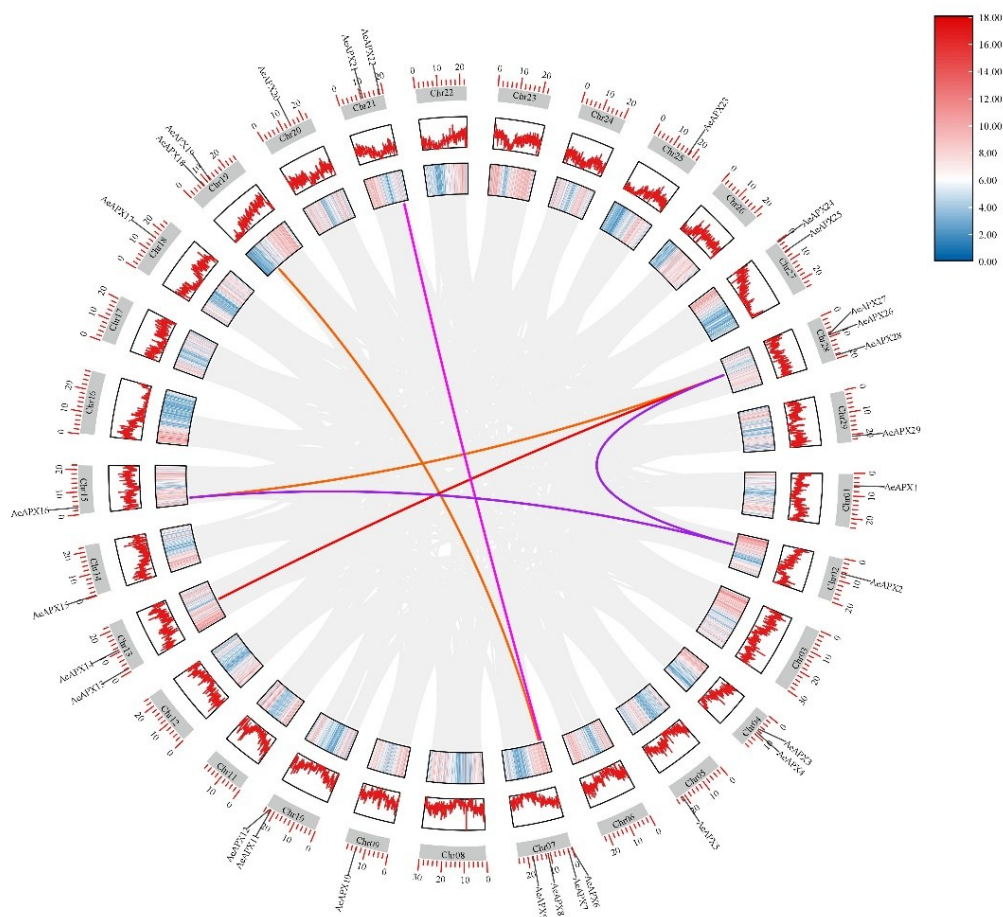


图 6 染色体共线性分析

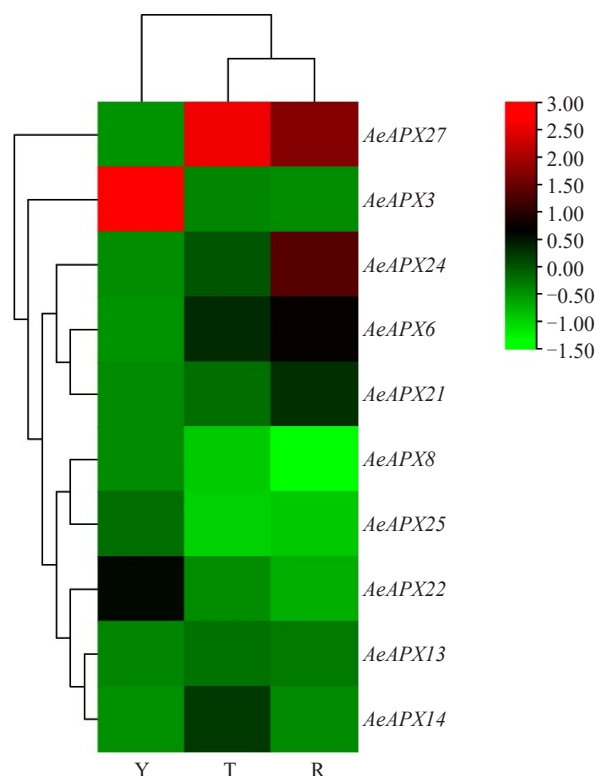
Fig. 6 Chromosome collinearity analysis

AeAPX6、*AeAPX7*、*AeAPX8*、*AeAPX9*)、9号和10号染色体(*AeAPX10*和*AeAPX11*、*AeAPX12*)、13号染色体(*AeAPX13*、*AeAPX14*)、14号和15号染色体(*AeAPX15*和*AeAPX16*)、18号和20号染色体(*AeAPX17*和*AeAPX20*)、19号染色体(*AeAPX18*、*AeAPX19*)、21号染色体(*AeAPX21*和*AeAPX22*)、25号和29号染色体(*AeAPX23*、*AeAPX29*)、27号染色体(*AeAPX24*、*AeAPX25*)、28号染色体(*AeAPX26*、*AeAPX27*、*AeAPX28*)。同时,物种内共线性分析观察到29个基因中含有*AeAPX2*和*AeAPX16*、*AeAPX2*和*AeAPX26*、*AeAPX6*和*AeAPX22*、*AeAPX7*和*AeAPX18*、*AeAPX14*和*AeAPX26*、*AeAPX16*和*AeAPX26*这6个片段重复事件,说明在该基因进化的过程中存在基因复制。29个*AeAPXs*基因家族成员中一共存在6对共线性基因对。共线性结果表明,这些基因在进化上高度同源,且在进化过程中非常保守。

2.7 果实不同发育阶段和套袋处理的基因表达分析

基于课题组现有的转录组数据分析,发现仅有*AeAPX3*、*AeAPX6*、*AeAPX8*、*AeAPX13*、*AeAPX14*、*AeAPX21*、*AeAPX22*、*AeAPX24*、*AeAPX25*、*AeAPX27*这10个基因家族成员在毛花猕猴桃果实发育过程中能检测到表达量,因此选取这些基因进行qRT-PCR分析。结果(图7)表明,这10个基因可分为3类,其中*AeAPX3*、*AeAPX27*单独聚为一类,*AeAPX27*在果实的幼果期、转色期、成熟期都具有高表达水平,而抗坏血酸含量随着果实的成熟逐渐下降^[26],这表明*AeAPX27*基因的表达与果实抗坏血酸含量极显著相关,是毛花猕猴桃果实抗坏血酸正调控的关键基因。而*AeAPX3*基因的表达量刚好与*AeAPX27*的表达量呈相反趋势。*AeAPX8*、*AeAPX13*、*AeAPX14*、*AeAPX22*、*AeAPX25*聚为一类,它们的基因表达水平为逐渐降低,与AsA含量一致。*AeAPX6*、*AeAPX21*、*AeAPX24*这3个基因在果实的3个发育时期表达水平上调,与AsA含量呈相反趋势。因此,笔者推测*AeAPX27*这一个基因可能参与调控果实生长发育期间AsA的代谢。

以未套袋(Control)处理作为对照,利用实时荧光定量PCR对APX基因在套袋(Treatment)处理下的表达量进行检测。采用独立样本T检验方法在 $p \leq 0.05$ 和 $p \leq 0.01$ 水平检测套袋与未套袋处理之间



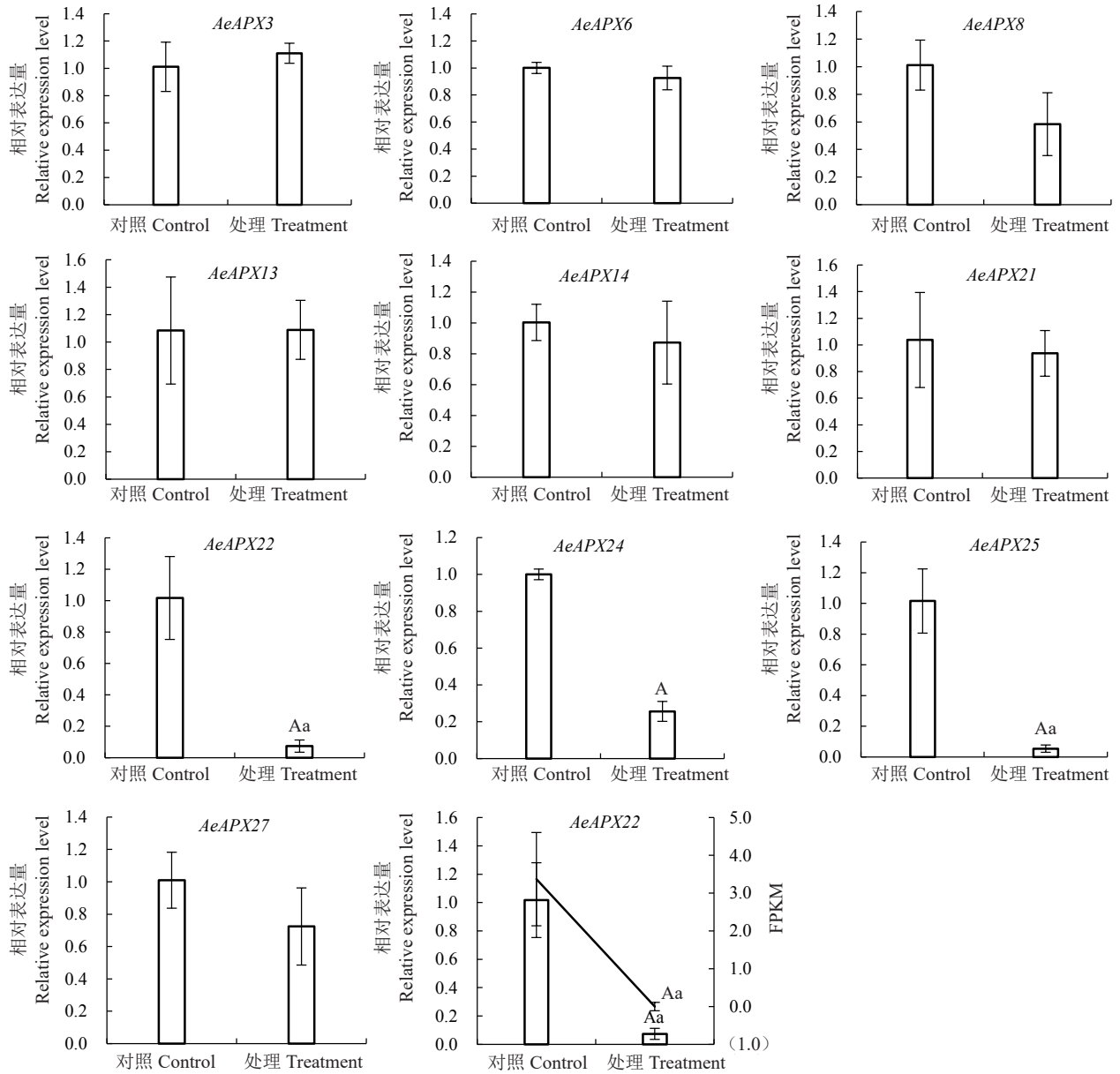
Y、T和R分别代表不同时期。Y. 幼果期;T. 转色期;R. 果实生理成熟期。

Y, T and R represent different sampling periods respectively. Y. young fruit period; T. color turning period; R. fruit physiological ripening period.

图7 *AeAPXs*基因在果实不同发育阶段的表达谱分析

Fig. 7 Expression profiling of *AeAPX* genes in different development of fruit

基因表达量的差异。如图8所示,套袋处理后*AeAPX3*、*AeAPX13*的表达量相对于对照略微升高,但都与未套袋处理没有显著性差异。*AeAPX6*、*AeAPX8*、*AeAPX14*、*AeAPX21*、*AeAPX27*的表达量下降,分别约为未套袋处理组的0.92、0.58、0.87、0.93、0.72倍,但均与未套袋处理没有显著性差异。而*AeAPX22*、*AeAPX24*、*AeAPX25*基因表达量与对照组相比有显著性下降,分别约为未套袋处理组的0.05、0.25、0.05倍,均与未套袋处理存在极显著性差异。抗坏血酸含量测定结果表明,套袋后抗坏血酸含量与对照组相比显著下降^[26],套袋后除了*AeAPX3*、*AeAPX13*这两个基因,其余基因的表达量下降,这与AsA的含量呈相同趋势。但APX作为AsA氧化分解途径的关键酶,APX基因的表达量与AsA含量密切相关。也就是说当AsA含量下降的时候APX基



小写字母和大写字母分别代表差异达到显著 ($p \leq 0.05$) 和极显著 ($p \leq 0.01$) 水平。

lowercase letters represent significant differences at $p \leq 0.05$ level, uppercase letters represent significant differences at $p \leq 0.01$ level.

图 8 *AeAPXs* 基因在套袋处理后的表达谱分析

Fig. 8 Expression profiling of *AeAPX* genes after bagging treatment

因的表达量应该上升才符合 AsA 氧化分解途径的规律。而课题组现有的转录组学数据^[27]揭示毛花猕猴桃果实套袋遮光处理之后获得调控 AsA 的差异基因为 DTZ79_21g12410, 对应本文的 *AeAPX22* 基因。通过 qRT-PCR 验证转录组数据结果显示出一致性(图 8), 均为套袋之后基因表达量下降。因此, 根据套袋后 AsA 含量和 *APX* 基因表达分析的关联性并结合转录组数据, 得出 *AeAPX22* 基因可能受到光的调控。

3 讨论

APX 是重要的氧化酶类之一, 对于维持植物体内活性氧代谢平衡有着重要的作用^[28-29]。笔者在本研究中利用生物信息学分析方法从猕猴桃基因组数据库中共获得 79 个 *AeAPX* 基因, 剔除其中结构域缺失或不完整的基因, 最终获得 29 个具有完整且只有 1 个过氧化物酶功能元件的 *APX* 基因, 分别命名为 *AeAPX1*~*AeAPX29*。在前期研究中, 从拟南芥、水

稻、玉米、番茄、巴西橡胶树等中分别鉴定出8、8、8、7、8个APX基因家族成员^[9-13]。这些基因家族成员个数相似,而毛花猕猴桃却含有29个APX基因家族成员,可能是由于猕猴桃AsA代谢途径分子机制复杂,存在更为丰富的APX基因调控机制。系统进化分析结果与基因结构及保守域分析结果一致,具有相似数量的内含子和保守基序的基因家族成员优先聚为一类,这与前人在葡萄上的研究结果一致^[30],且聚为同一类的APX基因家族成员均含有相同的保守结构域(PF00141)。结合前期转录组数据发现A、B、C亚类均由在果实发育期拥有高表达水平和低表达水平的基因组成。此外,各个亚类基因家族成员的蛋白质理化性质存在差异,在毛竹中也发现类似的情况^[31]。亚细胞定位分析发现具有相同定位的基因家族成员在系统进化树上的近缘关系并非最近,如*AeAPX1*、*AeAPX4*、*AeAPX7*、*AeAPX8*属于A亚类,而*AeAPX10*、*AeAPX18*、*AeAPX24*、*AeAPX25*属于B亚类,表明在长期进化过程中APXs的功能出现分化,在巴西橡胶树中研究发现也有此类现象^[32]。葡萄、陆地棉、中华猕猴桃红阳APXs基因家族成员中蛋白质二级结构所占比例最高的是 α -螺旋和不规则卷曲,并推测不规则卷曲主要参与构建APX的酶活性中心,构成酶的活性部位和其他蛋白质特异的功能部位^[26,30,33]。本研究得到的29个APX基因中比例最高的也是 α -螺旋和不规则卷曲,这与前人的研究结果一致。

跨膜分析显示,*AeAPX*基因家族成员中有13个基因属于跨膜蛋白,其中7个基因定位于叶绿体上,其余6个基因定位于细胞外基质、细胞质。而中华猕猴桃红阳、陆地棉APXs基因家族成员中分别也有4、5个基因属于跨膜蛋白,都分别定位于叶绿素、细胞质、细胞核中^[26,33]。由于跨膜蛋白都定位于不同的细胞器,以此推测这些跨膜蛋白的功能具有多样性,不仅能够维持植物生长发育所需要的营养物质,而且通过多细胞器的配合,能够起到保护植物免受活性氧的伤害,具有抗氧化作用。

植物在受到多种逆境胁迫后,会启动自我保护模式,主要表现在应激基因的表达,而基因的表达受到启动子或转录因子的调控,因此启动子顺式作用元件的分析对某个特定基因功能的研究有重要意义^[34]。通过对*AeAPXs*各家族成员ATG上游2000 bp的序列分析,发现各个基因家族成员含有多个光照、

激素、干旱胁迫相关的调控元件,如Box4、G-box、CGTCA-motif、ABRE、ARE等。推测由于这些顺式作用元件的存在,该基因家族多个成员均有可能参与了干旱、低温等逆境胁迫响应。在马铃薯、甜樱桃中的各基因家族启动子上游2000 bp处也发现了与光照、激素、干旱胁迫等相关的响应元件^[35-36]。

果实的不同发育时期APX的作用机制也是研究的重点之一。研究表明,植物APX基因的表达是由胁迫诱导的。研究结果表明,*AeAPX27*在幼果期、转色期、成熟期都高表达,可能是受到温度变化的影响,因此高表达APX是为了保护植物抵抗高温、低温胁迫^[37-39]。APX也是AsA代谢途径中的关键基因^[40],*AeAPX8*、*AeAPX13*、*AeAPX14*、*AeAPX22*、*AeAPX25*的基因表达量与AsA含量的变化一致,表明这些基因可能参与AsA的循环,但*AeAPX27*是调控果实AsA代谢最关键的一个基因。*AeAPX6*、*AeAPX21*、*AeAPX24*的基因表达水平与AsA含量的变化趋势相反。Liao等^[26]研究套袋对果实AsA含量积累的影响相对于对照组下降,与抗坏血酸合成途径相关基因*DHAR*、*GalUR*、*GalLDH*表达量均显著低于对照,因此,推测*DHAR*、*GalUR*、*GalLDH*基因的差异表达是造成套袋和对照组间AsA含量积累差异的关键。套袋之后*AeAPX22*、*AeAPX24*、*AeAPX25*基因表达量极显著下降,AsA含量也下降;这说明*AeAPX22*基因可能受到光的调控而表达量下降,而AsA含量同时下降的原因可能是其他合成代谢通路的基因在套袋之后受到影响,从而影响AsA的合成。目前为止,毛花猕猴桃APX基因家族成员的信息还没有相关报道,本研究结果可为毛花猕猴桃AsA代谢调控机制奠定理论基础。

4 结 论

从猕猴桃基因组中鉴定*AeAPX*基因家族并进行生物信息学分析。同时,对*AeAPX*基因家族在果实不同发育阶段和套袋处理之后的表达量进行了分析,筛选出候选基因DTZ79_21g12410和DTZ79_28g05600,为进一步展开基因功能研究提供依据。

参考文献 References:

- [1] LIAO G L, XU X B, HUANG C H, ZHONG M, JIA D F. Resource evaluation and novel germplasm mining of *Actinidia chinensis* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 282: 110037.
- [2] LORENCE A, CHEVONE B I, MENDES P, NESSLER C L.

- Myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(3): 1200-1205.
- [3] 李娜, 陆海. 植物抗坏血酸过氧化物酶基因家族研究进展[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2011, 30(2): 97-101.
LI Na, LU Hai. Research progress in ascorbate peroxidase gene family in plants[J]. *Journal of Chengdu University (Natural Science Edition)*, 2011, 30(2): 97-101.
- [4] 陈花, 吴俊林, 李晓军. 叶绿体中活性氧的产生和清除机制[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(10): 1979-1981.
CHEN Hua, WU Junlin, LI Xiaojun. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008, 8(10): 1979-1981.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] YABUTA Y, MARUTA T, YOSHIMURA K, ISHIKAWA T, SHIGEOKA S. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress[J]. *Plant Cell Physiology*, 2004, 45(11): 1586-1594.
- [8] 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.
- [9] 李泽琴, 李锦涛, 邴杰, 张根发. 拟南芥 APX 家族基因在植物生长发育与非生物逆境胁迫响应中的作用分析[J]. 遗传, 2019, 41(6): 534-547.
LI Zeqin, LI Jintao, BING Jie, ZHANG Genfa. The role analysis of APX gene family in the growth and developmental processes and in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Hereditas*, 2019, 41(6): 534-547.
- [10] 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.
- [11] LIU Y J, YUAN Y, LIU Y Y, LIU Y, FU J J, ZHENG J, WANG G Y. Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(2): 183-192.
- [12] NAJAMI N, JANDA T, BARRIAH W, KAYAM G, TAL M, GUY M, VOLOKITA M. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2008, 279(2): 171-182.
- [13] CHAO J Q, ZHANG S X, CHEN Y Y, TIAN W M. Cloning, heterologous expression and characterization of ascorbate peroxidase (*APX*) gene in laticifer cells of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 97: 331-338.
- [14] TAO C C, JIN X, ZHU L P, XIE Q L, WANG X C, LI H B. Genome-wide investigation and expression profiling of *APX* gene family in *Gossypium hirsutum* provide new insights in redox homeostasis maintenance during different fiber development stages[J]. *Molecular Genetic and Genomics*, 2018, 293(3): 685-697.
- [15] PANCHUK I I, VOLKOV R A, SCHÖFFL 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.
- [16] 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.
- [17] LIAO G L, LI Z Y, HUANG C H, ZHONG M, TAO J J, QU X Y, CHEN L, XU X B. Genetic diversity of inner quality and SSR association analysis of wild kiwifruit (*Actinidia eriantha*) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2019b, 248: 241-247.
- [18] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [19] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, SANCHEZ J C, WILLIAMS K L, APPEL R D, HOCHSTRASSER D F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1999, 112: 531-552.
- [20] BAILEY T L, WILLIAMS N, MISLEH C, LI W W. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: W369-W373.
- [21] HU B, JIN J P, GUO A Y, ZHANG H, LUO J C, GAO G. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [22] ROMBAUTS S, DÉHAIS P, VAN MONTAGU M, ROUZÉ P. PlantCARE, a plant *cis*-acting regulatory element database[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(1): 295-296.
- [23] COMBET C, BLANCHET C, GEOURJON C, DELÉAGE G. NPS@: Network protein sequence analysis[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(3): 147-150.
- [24] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(7): research0034. <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>

- [25] LIAO G L, HE Y Q, LI X S, ZHONG M, HUANG C H, YI S Y, LIU Q, XU X B. Effects of bagging on fruit flavor quality and related gene expression of AsA synthesis in *Actinidia eriantha*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256: 108511.
- [26] LIAO G L, LIU Q, LI Y Q, ZHONG M, HUANG C H, JIA D F, XU X B. Identification and expression profiling analysis of ascorbate peroxidase gene family in *Actinidia chinensis* (Hongyang)[J]. *Journal of Plant Research*, 2020, 133(5): 715-726.
- [27] LIU Q, LI Y Q, LIAO G L, XU X B, JIA D F, ZHONG M, WANG H L, YE B. Transcriptome and metabolome reveal AsA regulatory network between metabolites and genes after fruit shading by bagging in kiwifruit (*Actinidia eriantha*)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 302: 111184.
- [28] PANDEY S, FARTYAL D, AGARWAL A, SHUKLA T, JAMES D, KAUL T, NEGI Y K, ARORA S, REDDY M K. Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 581.
- [29] 王亦学, 杜建中, 郝曜山, 张欢欢, 王晓清, 孙毅. 过量表达 *GhAPX* 基因提高中林美荷杨耐盐性[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(7): 2579-2583.
WANG Yixue, DU Jianzhong, HAO Yaoshan, ZHANG Huanhuan, WANG Xiaoqing, SUN Yi. Overexpression of *GhAPX* gene in the improvement of salt tolerance in *Populus* sp.[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(7): 2579-2583.
- [30] 王晗, 刘涛, 何红红, 梁国平, 马宗桓, 毛娟, 陈伯鸿. 葡萄 *APX* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. *果树学报*, 2020, 37(4): 472-484.
WANG Han, LIU Tao, HE Honghong, LIANG Guoping, MA Zonghuan, MAO Juan, CHEN Baihong. Identification and expression analysis of *APX* gene family in grape[J]. *Journal of Fruit Science*, 2020, 37(4): 472-484.
- [31] 宋笑龙, 孔波, 高志民, 牟少华, 李雪平. 毛竹 *APX* 家族基因鉴定和表达分析[J]. *热带亚热带植物学报*, 2020, 28(3): 255-264.
SONG Xiaolong, KONG Bo, GAO Zhimin, MU Shaohua, LI Xueping. Identification and expression analysis of the *APX* gene family in *Phyllostachys edulis*[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2020, 28(3): 255-264.
- [32] 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.
- [33] 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 Xingfen, MA Zhiying. Bioinformatics analysis of the ascorbate peroxidase gene family in the *Gossypium hirsutum* L. genome[J]. *Cotton Science*, 2017, 29(1): 17-28.
- [34] HADIARTO T, TRAN L S. Progress studies of drought-responsive genes in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(3): 297-310.
- [35] 赵希胜, 张冉冉, 曾鼎宸, 吕承承, 李立芹, 鲁黎明. 马铃薯 *APX* 基因家族的生物信息学分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(12): 5669-5677.
ZHAO Xisheng, ZHANG Ranran, ZENG Dingchen, LÜ Chengcheng, LI Liqin, LU Liming. Bioinformatics analysis of *APX* gene family in potato[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5669-5677.
- [36] 侯黔东, 沈天娇, 余欢欢, 仇志浪, 文壮, 张惠敏, 吴亚维, 文晓鹏. 甜樱桃 GH3 基因家族全基因组鉴定与表达分析[J]. *园艺学报*, 2021, 48(12): 2360-2374.
HOU Qianong, SHEN Tianjiao, YU Huanhuan, QIU Zhilang, WEN Zhuang, ZHANG Huimin, WU Yawei, WEN Xiaopeng. Genome-wide identification and expression analysis of *Prunus avium* Gretchen Hagen 3 (GH3) gene family[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(12): 2360-2374.
- [37] ALMESELMANI M, DESHMUKH P S, SAIRAM R K, KUSHWAHA S R, SINGH T P. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress[J]. *Plant Science*, 2006, 171(3): 382-388.
- [38] KIM M D, KIM Y H, KWON S Y, YUN D J, KWAK S S, LEE H S. Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the *CuZnSOD*, *APX* and *NDPK2* genes[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 140(2): 153-162.
- [39] YUNGYUEN W, MA G, ZHANG L C, YAMAWAKI K, YAHATA M, OHTA S, YOSHIOKA T, KATO M. Regulation of ascorbic acid metabolism in response to different temperatures in citrus juice sacs *in vitro*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 217: 1-7.
- [40] ZHANG Y Y, LI H X, SHU W B, ZHANG C J, YE Z B. RNA interference of a mitochondrial *APX* gene improves vitamin C accumulation in tomato fruit[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 129(2): 220-226.