



毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

宋笑龙, 孔波, 高志民, 牟少华, 李雪平

引用本文:

宋笑龙, 孔波, 高志民, 等. 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.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

云南木兰科48种野生植物资源的遗传多样性研究

Studies on Genetic Diversity of 48 Wild Species of Magnoliaceae in Yunnan

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 277–284 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4161>

拟南芥6个突变体热敏感性差异的比较分析

Comparison of Thermo-sensitivity among Six Mutants of *Arabidopsis thaliana*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 285–291 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4147>

6种园林植物耐旱性分析

Drought Tolerance of Six Garden Species

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 310–316 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4128>

种植模式对巴戟天生长的影响

Effect of Planting Pattern on the Growth of *Morinda officinalis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 163–170 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4100>

宁前胡内生真菌 *Fusarium tricinctum* 固体发酵代谢产物研究

Metabolites of *Fusarium tricinctum*, An Endophytic Fungus Isolated from Ningguo *Peucedanum praeruptorum* on Solid Fermentation

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 203–208 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4135>

毛竹 APX 家族基因鉴定和表达分析

宋笑龙, 孔波, 高志民, 牟少华, 李雪平*

(国际竹藤中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: 为了解毛竹(*Phyllostachys edulis*)抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)基因家族成员在不同组织和非生物胁迫下的表达模式, 利用生物信息学方法从毛竹基因组数据库中鉴定得到 7 条 APX 同工酶基因(*PeAPXs*), 根据亚细胞定位预测结果可分为 3 个亚类。各个基因启动子序列中存在低温、干旱以及光响应元件。毛竹 *PeAPXs* 在 7 个组织中的表达丰度不同, 具有组织特异性。qRT-PCR 结果表明, 在干旱、盐和低温胁迫下各基因的表达模式存在着较大差异, 其中 *PeAPX2* 在 3 种胁迫下均维持着较高的表达水平; 低温胁迫对 *PeAPXs* 有诱导作用, 其表达量均呈上调趋势; 干旱胁迫下, *PeAPX1* 的表达量下调, 未检测到 *PeAPX3*、*PeAPX6*、*PeAPX7* 表达; 盐胁迫下, 除 *PeAPX3* 和 *PeAPX6* 外, 其余基因表达量上调。因此, 毛竹 APX 基因可能参与到不同的非生物胁迫过程并在毛竹的生长发育阶段发挥着重要的作用。

关键词: 毛竹; 抗坏血酸过氧化物酶; 生物信息学; 基因表达

doi: 10.11926/jtsb.4155

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

SONG Xiao-long, KONG Bo, GAO Zhi-min, MU Shao-hua, LI Xue-ping*

(International Center for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration Key Open Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: In order to understand the expression patterns in different tissues and under abiotic stress of ascorbate peroxidase (APX) gene family in *Phyllostachys edulis*, seven *PeAPXs* were obtained from the genomic database of *P. edulis*. *PeAPXs* could be divided into three subfamilies, including cytoplasmic, peroxisome and chloroplast/mitochondrion types based on the predictions of subcellular localizations. There were drought, cold, and light response elements in promoter sequences of each gene, such as Box-4 and G-Box. The expressions of *PeAPXs* were different among seven tissues, showing tissue specificity. qRT-PCR revealed that there were great differences in the expression pattern of each gene under drought, salt and low temperature stress. The expression of *PeAPX2* was maintained at high level under three stresses. The expression of *PeAPXs* were induced by low temperature stress. Under drought stress, the expression of *PeAPX1* was down-regulated, while the expressions of *PeAPX3*, *PeAPX6* and *PeAPX7* were not detected. Under salt stress, all of *PeAPXs* were up-regulated except *PeAPX3* and *PeAPX5*. Therefore, *PeAPXs* may be involved in different abiotic stress processes and play an important role in the growth and development stage of *P. edulis*.

Key words: *Phyllostachys edulis*; Ascorbate peroxidase; Bioinformatics; Gene expression

毛竹(*Phyllostachys edulis*)作为一种重要的非木质资源, 广泛分布于我国长江以南地区, 其生长速

度快, 成材早, 用途广, 是我国重要的经济竹种^[1]。然而毛竹在生长发育过程中面临着各种环境问题,

收稿日期: 2019-09-19 接受日期: 2019-12-20

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFD060010202)资助

This work was supported by the Program for National Key Research and Development in the 13th Five-year (Grant No. 2018YFD060010202).

作者简介: 宋笑龙, 硕士研究生, 研究方向为林木遗传育种。E-mail: bnsongxl@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: lxp@icbr.ac.cn

如低温和干旱等, 不仅制约着毛竹的生长和分布, 也给竹产业带来巨大的损失。当植物遭受环境胁迫时, 一方面通过调节新陈代谢过程中的各种生理变化, 如渗透调节物质(脯氨酸、可溶性糖等)的积累等减少胁迫造成的伤害^[2-3]。另一方面, 通过启动内部分子适应机制, 如渗透调节物质合成基因: 果聚糖合成基因、脯氨酸合成基因、甜菜碱合成基因等; 具有解毒功能的抗氧化物质基因: 超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)基因等; 转录因子基因 NAC、MYB、ERF 等, 通过调控这些基因的表达, 增强植物对逆境的耐受能力^[4]。迄今为止, 已在毛竹中鉴定出多个基因家族, 如 MYB^[5]、WRKY^[6]、Hsf^[7]等转录因子, 并对其在胁迫环境下发挥的功能进行了初步验证。

抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)作为一种重要的抗氧化酶, 在清除胁迫条件下积累的 H₂O₂ 方面发挥着重要作用, 尤其是叶绿体中的 H₂O₂ 主要由 APX 清除^[8-9]。抗坏血酸过氧化物酶最早在菠菜(*Spinacia oleracea*)叶绿体中发现, 属于植物型血红素过氧化物酶超家族^[10-11]。根据亚细胞定位, 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^[12]。

迄今为止, 已经在多种植物中克隆出了 APX 基因, 如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[13-14]、玉米(*Zea mays*)^[15]、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)^[16]、水稻(*Oryza sativa*)^[17]、细叶金丝桃(*Hypericum gramineum*)^[18]和巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)^[19], 并对其功能进行了验证。相关转录组数据分析表明, 强光照下, 毛竹中有 6 个 APX 基因表达量上调, 可能与光胁迫响应有关^[20]。低温^[21]、干旱^[22]处理后, 毛竹 APX 活性提高, 参与过氧化氢的清除, 以减少植物受到的损伤。为了进一步研究毛竹中 APX 基因的结构、种类及在干旱、低温和盐胁迫应答中的作用, 本研究对毛竹全基因组数据库进行筛选, 鉴定毛竹中 APX 基因, 通过生物信息学分析以及在干旱、低温和盐胁迫下表达模式分析, 探讨 APX 基因在毛竹抗氧化胁迫中发挥的作用, 以期为毛竹的抗性分子育种提供理论基础和候选基因。

1 材料和方法

1.1 材料

毛竹(*Phyllostachys edulis*)种子产自广西桂林地

区, 种植于直径 10 cm 左右的塑料培养皿中, 培养条件为 24℃光照 16 h/21℃黑暗 8 h。用 200 mmol/L NaCl、20% PEG 6000、4℃分别模拟高盐、干旱和低温胁迫, 对 3 月龄的毛竹实生苗(地上部分高约 20 cm)进行处理, 分别于处理的 0、3、6、12、24、48、72 和 120 h 取幼嫩的主根和须根以及生长状态良好的叶片, 液氮速冻后保存于-80℃冰箱中, 用于 RNA 的提取。

1.2 毛竹 APX 基因家族成员鉴定和生物信息学分析

从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载水稻 APX 氨基酸序列(OsAPX1, XP_015630498.1; OsAPX2, XP_015646556.1; OsAPX3, XP_015635863.1; OsAPX4, XP_015650808.1; OsAPX5, XP_015618477.1; OsAPX6, XP_015618175.1; OsAPX7, XP_015635863.1; OsAPX8, XP_015623105.1), 并以此为探针, 采用 BLASTp 为引擎对毛竹基因组数据库(<http://www.bamboogdb.org/>)进行检索, 获得同源序列。使用 NCBI 的 NCBI-CDD 工具以及在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对候选毛竹 APX 蛋白序列保守结构域进行分析^[23], 最终获得具有完整保守结构域的 APX 家族基因序列。利用在线软件 ExPASy (<http://expasy.org/>)对 APX 蛋白理化性质进行预测, 使用在线软件 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)及 Softberry (<http://linux-1.softberry.com/>)进行亚细胞定位预测。使用在线工具 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)对毛竹 APX 基因结构进行分析。使用在线工具 MEME 对毛竹 APX 氨基酸序列保守基序进行分析。使用 Plant CARE 软件对上游 2 000 bp 启动子序列顺式作用元件进行分析。

另外, 从拟南芥数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)、玉米数据库(<https://www.maizgedb.org/>)、JGI 数据库(<https://jgi.doe.gov/>)以及 PLAZA 数据库(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>)^[24]中下载拟南芥 (AtAPX1, At1g07890; AtAPX2, At3g09640; AtAPX3, At4g35000; AtAPX4, At4g09010; AtAPX5, At4g35970; AtAPX6, At4g32320; AtSAPX, At4g08390; AtTAPX, At1g77490)、玉米(ZmAPX1, Zm00001d047757; ZmAPX2, Zm00001d007234; ZmAPX3, Zm00001d025047; ZmAPX4, Zm00001d053223; ZmAPX5, Zm00001d023582; ZmAPX6, Zm00001d028709; ZmAPX7, Zm00001d016802)、二穗短柄草(*Brachypodium dista-*

chyon) (BdAPX1, Bradi3g45700; BdAPX2, Bradi4g41180; BdAPX3, Bradi5g10490)、番茄(*Lycopersicon esculentum*) (SIAPX1, Solyc01g 111510.2; SIAPX2, Solyc02g083620.2; SIAPX3, Soly c06g005150.2; SIAPX4, Solyc06g005160.2; SIAPX5, Solyc06g060260.2; SIAPX6, Solyc09g007270.2; SIAPX7, Solyc11g018550.2)和毛果杨(*Populus trichocarpa*) (PtAPX1, Potri.006G132200; PtAPX2, Potri.009G134100; PtAPX3, Potri.016G084800)的 APX 氨基酸序列,采用 Clustal X2 软件进行比对,再利用 MEGA 7.0 软件对 APX 氨基酸序列进行聚类分析,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。

1.3 APX 家族基因的组织表达模式

从 NCBI (登记号: SRX082501~SRX082512)的 SRA 数据库中下载毛竹 7 种组织(叶片、早花穗、晚花穗、茎、根、20 cm 高竹笋、50 cm 高竹笋)的转录组数据。为了便于统计,取表达量对数 \log_2 ,采用软件 MeV 绘制热图。

1.4 非生物胁迫下 APX 家族基因表达模式分析

采用 Trizol 法提取毛竹总 RNA,使用非酶 DNA 清除剂(天恩泽)去除基因组 DNA,取 1 μg RNA,按照反转录试剂盒(Promega)说明书反转录为 cDNA,并保存于 -20°C 冰箱中备用。

使用 Prime Primer 5.0 软件设计定量引物,采用 NCBI 的 Primer BLAST 程序验证引物的特异性,内参引物为液泡膜内嵌蛋白 41 基因(*TIP41*)^[25],引物由上海生工生物有限公司合成(表 1)。qRT-PCR 反应体系为 2 \times SYBR PCR mix 5 μL , 上、下游引物 (10 mmol/L)各 0.2 μL , cDNA 模板 0.8 μL , ddH₂O 3.8 μL , 总体系为 10 μL 。qRT-PCR 反应程序为: 94°C

1 min; 94°C 10 s, 62°C 10 s, 72°C 10 s, 45 个循环。3 次重复,4 个技术重复,在 qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Germany)实时定量 PCR 仪上进行定量分析,并用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 对结果进行分析^[26]。

2 结果和分析

2.1 毛竹 APX 基因家族成员鉴定

利用生物信息学方法,对毛竹全基因组数据库进行筛选,共鉴定得到 7 个 APX 基因家族成员,分别命名为 *PeAPX1*~*PeAPX7*。每个成员编码的蛋白质都含有血红素结合域(Heme-binding)、酶活性位点(Active-site),其中 *PeAPX6* 和 *PeAPX7* 分别存在 2 个叶绿体型 APX 特有结构域(Chloroplastic-domain) (图 1),属于叶绿体型 APX 同工酶,与亚细胞预测结果相一致(表 2)。

2.2 *PeAPXs* 结构及其编码的蛋白质理化性质分析

采用 GSDS 在线工具对 *PeAPXs* 的内含子/外显子结构进行分析,结果表明, *PeAPXs* 具有相似的基因结构,除 *PeAPX6* 和 *PeAPX7* 外, *PeAPX1*~*PeAPX5* 均含有 9 个外显子(图 2)。

蛋白质理化性质分析结果表明, *PeAPXs* 蛋白质有 250~479 氨基酸,理论等电点为 5.20~8.93,相对分子质量为 27.26~52.51 kDa。总平均亲水性 GRAVY 均为负值,说明 7 种 *PeAPXs* 均为疏水性蛋白。除 *PeAPX1* 和 *PeAPX4* 外,其他 *PeAPXs* 的蛋白不稳定系数均大于 40,为不稳定蛋白。亚细胞定位预测结果表明, *PeAPX1*、*PeAPX2* 和 *PeAPX5* 定位于胞质中, *PeAPX3* 和 *PeAPX4* 定位于过氧化物酶体中, *PeAPX6* 和 *PeAPX7* 定位于叶绿体/线粒体中(表 2)。

表 1 qRT-PCR 定量引物设计

Table 1 Primers for qRT-PCR

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5'~3')	下游引物 Reverse primer (5'~3')
<i>PeAPX1</i>	CCTACGCCGATCTCTACCAG	CCGAAGACTTGCCTTAGGTG
<i>PeAPX2</i>	GACTTCCAACCCCTTGTATCTTT	CCGCAGCATATTTCTCCAC
<i>PeAPX3</i>	TCCTGGAAGGAGGGATTCTT	CGAGCTTTCCCCAGAGTATG
<i>PeAPX4</i>	CTAAGGAGCCTCTGAAGTTTG	CGTACAGGTAGCCCACGATA
<i>PeAPX5</i>	ACCCTCTGACATTTGACAACCTCTT	ATCCGCAGCATATTTCTCCAC
<i>PeAPX6</i>	GGGGAGCAAGAGGAGTTACC	GTCTCCCCAACACAACACTGCT
<i>PeAPX7</i>	AAGGTGGTGGTTCGGTGAGG	GGCAGTGGGTTGTCTTGAGG
<i>PeTIP41</i>	AAAATCATTGTAGCCATTGTCCG	ACTAAATTAAGCCAGCGGGAGTG

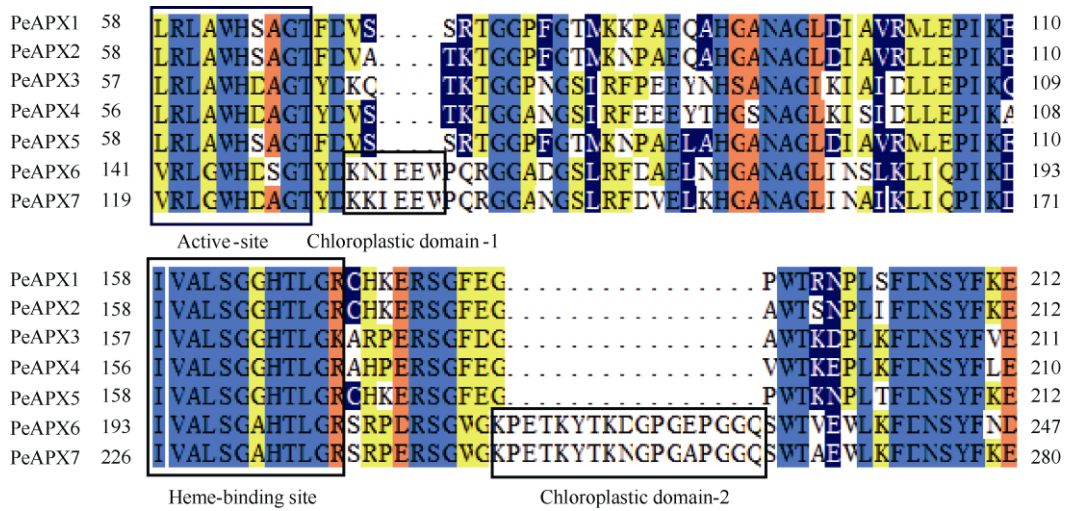


图 1 PeAPXs 的氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignments of PeAPXs

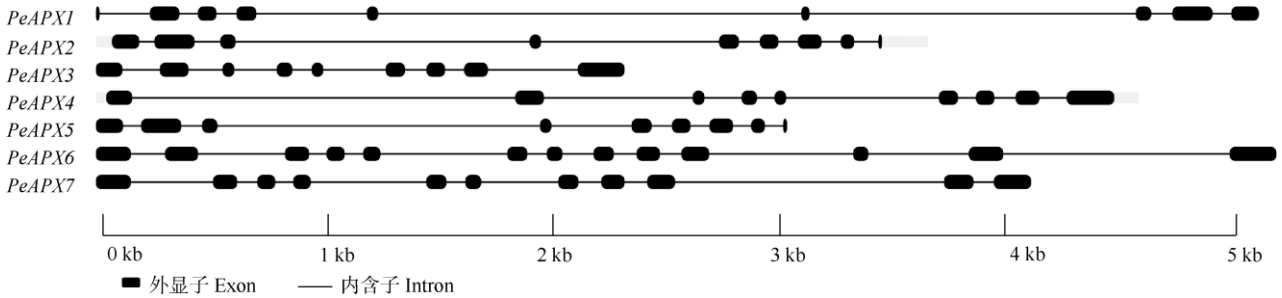


图 2 PeAPXs 基因的结构

Fig. 2 Gene structures of PeAPXs

表 2 PeAPXs 蛋白理化性质分析和亚细胞定位预测

Table 2 Physical and chemical properties, and subcellular localization of PeAPXs

基因 Gene	基因 ID Gene identifier	氨基酸 Amino acid	分子量 Molecular weight (kDa)	不稳定系数 Instability index	等电点 PI	脂肪指数 Aliphatic index	亲水性 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular location
PeAPX1	PH01000033G1800	250	27.38	40.76	5.84	75.80	-0.434	胞质 Cytoplasm
PeAPX2	PH01001658G0060	250	27.26	36.56	5.48	72.32	-0.403	胞质 Cytoplasm
PeAPX3	PH01001942G0260	291	32.25	45.67	6.67	81.20	-0.364	过氧化物酶体 Peroxisome
PeAPX4	PH01001490G0340	291	31.88	38.36	7.03	87.53	-0.288	过氧化物酶体 Peroxisome
PeAPX5	PH01001010G0010	250	27.34	41.59	5.56	75.80	-0.429	胞质 Cytoplasm
PeAPX6	PH01002051G0210	479	52.51	51.11	5.20	67.35	-0.665	叶绿体/线粒体 Chloroplast/Mitochondrion
PeAPX7	PH01000825G0410	388	43.11	46.00	8.93	66.83	-0.541	叶绿体/线粒体 Chloroplast/Mitochondrion

2.3 PeAPXs 家族的聚类分析

系统发育进化树显示 PeAPXs 可分为 3 个亚类, 其中 PeAPX1、PeAPX2、PeAPX5 聚为亚类 A, PeAPX3 和 PeAPX4 聚为亚类 B, PeAPX6 和 PeAPX7 聚为亚类 C。从亲缘关系来看, 毛竹 PeAPXs 与单子叶植物水稻、二穗短柄草的亲缘关系较近, 与双

子叶植物拟南芥、马铃薯、杨树的亲缘关系较远 (图 3)。

通过 MEME 软件构建 PeAPXs 保守区域基序分析图(图 4), 结果表明, 毛竹 PeAPXs 序列中含有 7 个基序, 分别为 Motif 1~Motif 7。Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4、Motif 5 和 Motif 7 存在于所有

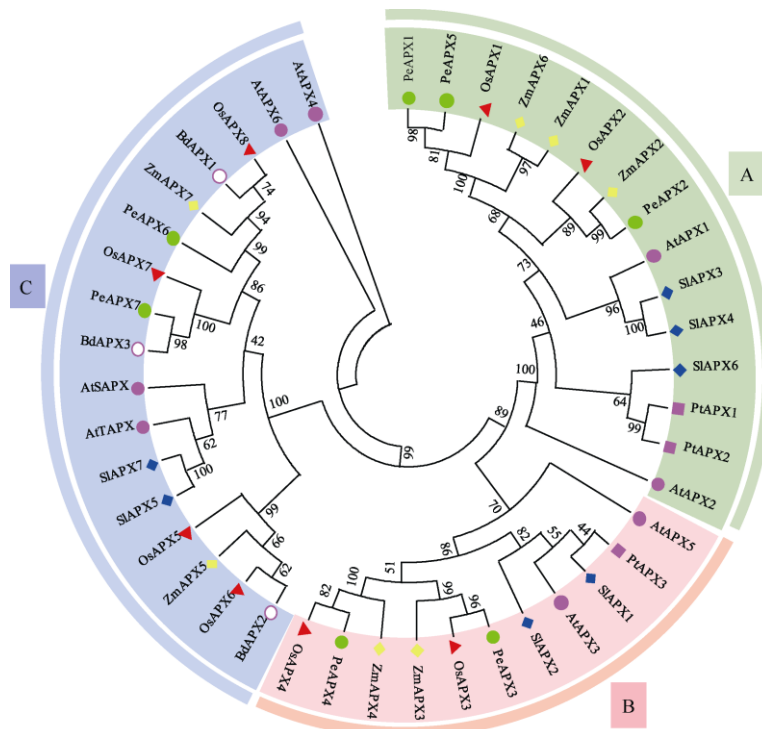


图 3 基于植物 APXs 氨基酸序列构建的系统进化树。Pe: 毛竹; Os: 水稻; At: 拟南芥; Pt: 毛果杨; Bd: 二穗短柄草; Sl: 番茄。

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of APXs in plants. Pe: *Phyllostachys edulis*; Os: *Oryza sativa*; At: *Arabidopsis thaliana*; Pt: *Populus trichocarpa*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Sl: *Lycopersicon esculentum*.

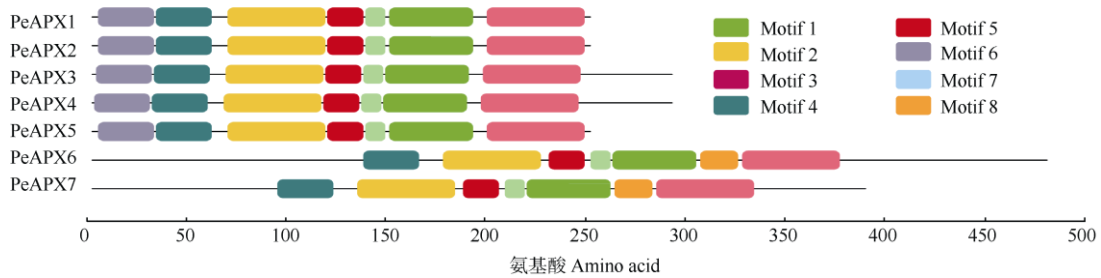


图 4 PeAPXs 的保守基序分布

Fig. 4 Distribution of conserved motifs in PeAPXs

PeAPXs 中; Motif 6 只存在于 A 与 B 类中, Motif 8 只存在于 C 类中。氨基酸序列比对结果表明, Pe-APX1~PeAPX6 氨基酸序列相似, 其基序种类、位置和长度也基本一致。同样的, PeAPX7 和 PeAPX8 具有相似的保守基序。

2.4 PeAPXs 上游启动子元件鉴定

为预测 PeAPXs 功能, 对各基因转录起始位点上游 2 000 bp 的启动子序列进行分析, 结果表明, 毛竹每个 PeAPX 的启动子均存在低温、干旱等非生物胁迫响应元件, 同时有大量光响应元件如 G-

Box、Box-4 和 TCT-motif 等(图 5), 与转录组数据分析一致。

2.5 PeAPXs 表达模式分析

2.5.1 组织表达

采用软件 MeV 绘制 PeAPXs 在 7 个组织中的表达量热图(图 6), 结果表明, 7 个 PeAPXs 在不同组织的表达丰度存在差异, 其中 PeAPX1 和 PeAPX5 在 7 个组织的表达丰度均较高; PeAPX6 在叶片和花穗的表达量较高而在根和笋的表达量较低; PeAPX7 在根和笋的表达量较高, 在叶片和花穗的表达量较

	光 Light			低温 Cold	干旱 Drought		
	Box-4	G-Box	TCT motif		LTR	MBS	MYB
<i>PeAPX1</i>	1	7	2	0	1	3	6
<i>PeAPX2</i>	1	3	1	0	1	3	1
<i>PeAPX3</i>	2	0	0	0	0	3	0
<i>PeAPX4</i>	0	7	0	1	1	0	1
<i>PeAPX5</i>	0	7	1	3	0	7	3
<i>PeAPX6</i>	0	7	3	0	1	12	5
<i>PeAPX7</i>	1	1	0	1	1	2	0

图 5 *PeAPXs* 上游启动子序列中的响应元件数。格子中的数字代表顺式作用元件数量。

Fig. 5 Number of *cis*-acting elements in promoter regions of *PeAPXs*. The data in blocks represent the number of *cis*-elements.

低；而 *PeAPX2* 在 7 个组织中的表达丰度均较低。

2.5.2 非生物胁迫下的表达模式

20% PEG 6000 处理后，毛竹 *PeAPXs* 呈现两种表达模式，*PeAPX2*、*PeAPX4* 和 *PeAPX5* 表达量大致呈先上升后下降趋势，而 *PeAPX1* 表达量呈现下调趋势，未检测到 *PeAPX3*、*PeAPX6* 和 *PeAPX7* 的表达。*PeAPX2* 在叶片和根中的表达量分别在处理

后的 48 和 72 h 达到最高，为对照的 16.7 和 21.8 倍，叶片和根中 *PeAPX4* 和 *PeAPX5* 表达量在处理 48 h 达到峰值，叶片的 *PeAPX4* 和 *PeAPX5* 表达量分别为对照的 22.3 和 22.7 倍，根中 *PeAPX4* 和 *PeAPX5* 表达量分别为对照的 12.3 和 13.4 倍(图 7)。

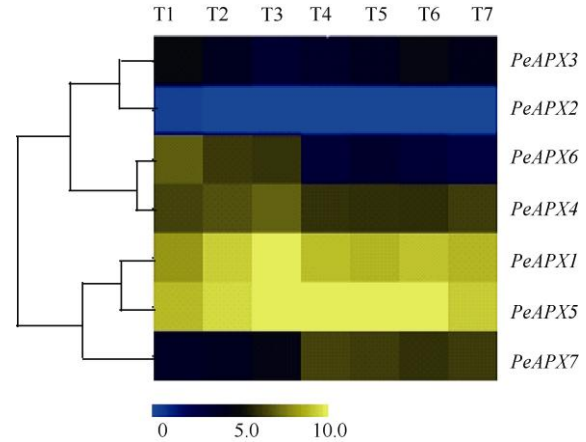


图 6 *PeAPXs* 在毛竹不同组织中的表达。T1: 叶; T2: 早期花穗; T3: 晚期花穗; T4: 茎; T5: 根; T6: 20 cm 笋; T7: 50 cm 笋。

Fig. 6 Expression of *PeAPXs* in different tissues. T1: Leaf; T2: Panicle at early stage; T3: Panicle at late stage; T4: Rhizome; T5: Root; T6: 20 cm shoot; T7: 50 cm shoot.

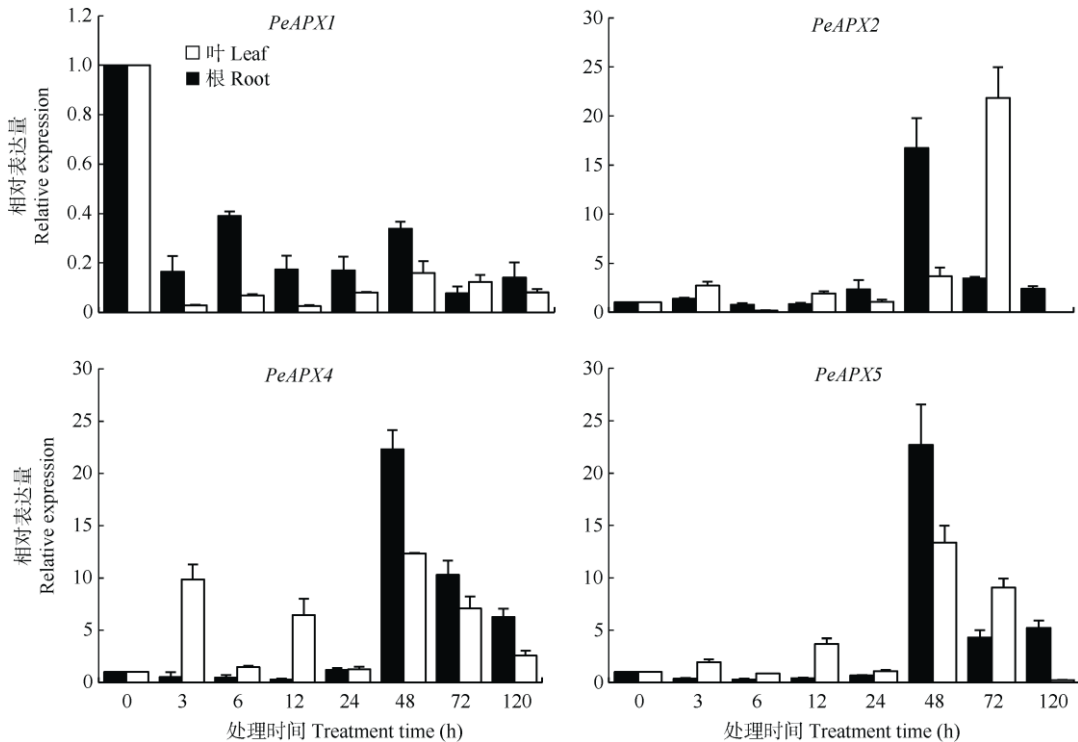


图 7 干旱胁迫下毛竹根和叶中 *PeAPXs* 表达模式

Fig. 7 Expression pattern of *PeAPXs* in leaves and roots under drought stress

200 mmol/L NaCl 处理后, 6 个 *PeAPXs* 基因在叶片中的表达量均呈现上调趋势, 未检测到 *PeAPX3* 的表达。其中, *PeAPX1*、*PeAPX2*、*PeAPX5* 的表达量均在处理后的 48 h 达到最高, 分别是对照的 23.3、15.9 和 5.6 倍。*PeAPX4*、*PeAPX6* 和 *PeAPX7*

的表达量在处理后的 72 h 达到最高, 分别为对照的 9.3、2.9 和 4.0 倍。毛竹根中, *PeAPX5* 和 *PeAPX7* 表达量呈现下调趋势, *PeAPX1*、*PeAPX4* 和 *PeAPX6* 的表达量均在处理后的 48 h 达到最高, *PeAPX2* 的表达量在处理后的 6 h 达到最高(图 8)。

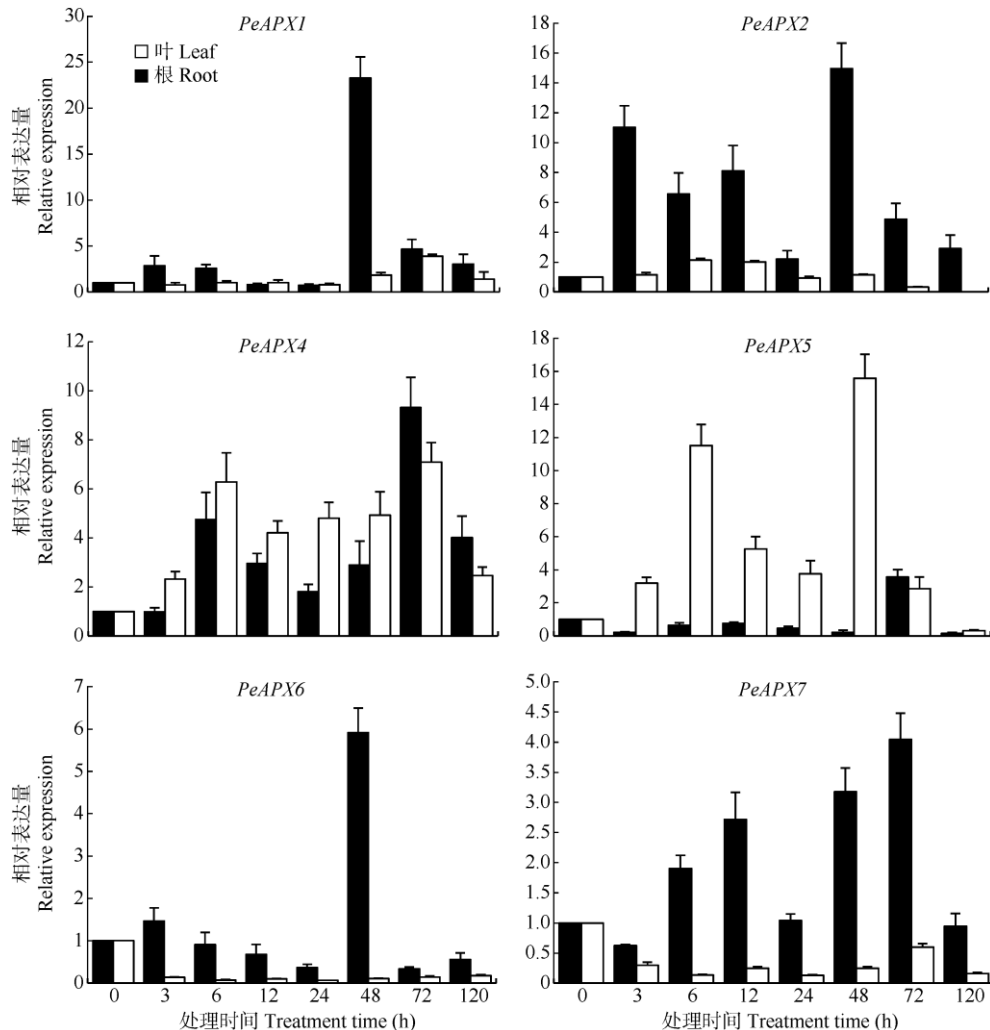


图 8 盐胁迫下毛竹叶和根中 *PeAPXs* 表达模式

Fig. 8 Expression pattern of *PeAPXs* in leaves and roots under salt stress

4℃低温处理后, 根和叶片中均检测到 7 个 *PeAPXs* 的表达, 且呈现上调趋势。叶片中 *PeAPX1*、*PeAPX2*、*PeAPX6* 的表达量在处理后的 12 h 达到最大, 其中 *PeAPX1* 和 *PeAPX2* 表达量分别是对照的 39.2 和 50.8 倍。*PeAPX3* 和 *PeAPX7* 表达量在处理后的 72 h 达到最大, 而 *PeAPX4* 和 *PeAPX5* 的表达量相比其余基因而言, 虽整体呈现上调, 但变化不大。根中 *PeAPX1* 表达量在低温处理 6 h 后达到峰值并维持在稳定状态, 而 *PeAPX2*、*PeAPX3*、*PeAPX5*

和 *PeAPX7* 表达量分别在处理后的 24、3、12 和 48 h 达到峰值, 随后下调(图 9)。

3 结论和讨论

抗坏血酸过氧化物酶基因作为植物中一个重要的活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除酶基因, 在清除生物与非生物胁迫下积累的过量过氧化氢过程中发挥重要作用。因此, 开展对毛竹中 APX

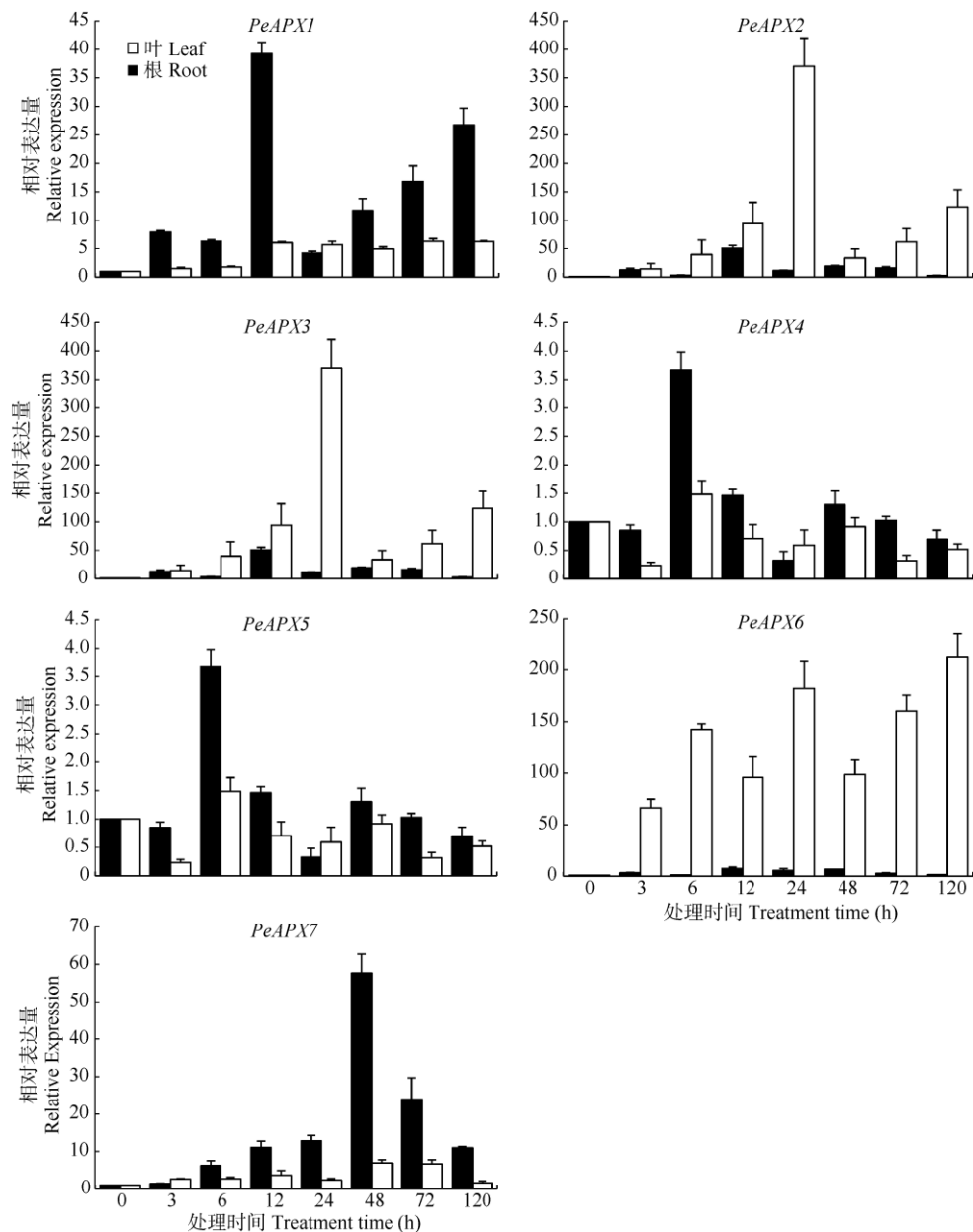


图9 低温胁迫下毛竹叶和根中 *PeAPXs* 表达模式

Fig. 9 Expression pattern of *PeAPXs* in leaves and roots under cold stress

基因的鉴定及表达模式分析研究, 对于揭示其在胁迫条件下发挥的作用和提高毛竹耐胁迫能力具有重要的参考价值。本研究中, 我们对毛竹全基因组进行分析, 共鉴定得到 7 个毛竹 APX 家族基因, 分别属于 3 个亚家族, 各个亚家族成员基因结构、蛋白质理化性质存在差异。氨基酸序列分析表明, 同一亚类 *PeAPXs* 具有相似的保守结构域, 且保守基序的种类和位置基本一致。亚细胞定位预测表明, *PeAPX6* 和 *PeAPX7* 定位在叶绿体或线粒体中, 氨基酸序列分析表明, 他们均具有叶绿体型 APX 特

有的结构域, 因此仍需进一步验证 *PeAPX6* 和 *PeAPX7* 的具体定位。

本研究采用 qRT-PCR 对毛竹根和叶中 *PeAPXs* 在干旱、低温和盐胁迫下的表达模式进行了研究。在 3 种非生物胁迫下, *PeAPXs* 的表达模式存在差异, 大多数 *PeAPXs* 呈上调表达, 尤其是 *PeAPX2* 维持着较高的表达水平, 表明 *PeAPXs* 可能在毛竹的非生物胁迫反应中发挥重要作用, 这与前人的研究结果一致^[27-31]。然而, 有些基因在胁迫下表达量呈现下调趋势, 如盐胁迫下, 毛竹根中 *PeAPX1*、*PeAPX2*、

PeAPX3、*PeAPX5*、*PeAPX6* 和 *PeAPX7* 表达量变化不大, 甚至出现下调, 推测可能是这几个基因在胁迫后表达受到抑制, ROS 由其他基因或者通过其他途径来清除。另外, 个别基因在不同胁迫下的表达模式不同, *PeAPX6* 在低温胁迫中表达量显著上调而在干旱胁迫中不表达或者下调, 推测 *PeAPXs* 基因在不同的胁迫中发挥不同的功能。有研究也报道了类似的结果, 菠菜(*Spinacia oleracea*)的 *cAPX* 在强光和紫外光下表达量上调, 在干旱、盐胁迫下转录水平没有变化; 而 *mAPX*、*sAPX* 和 *tAPX* 的转录水平在 ABA、干旱、强光和盐处理下, 未发生变化^[32]。此外, 3 种非生物胁迫下, *PeAPX* 家族成员在不同组织中的表达模式也存在差异, 盐胁迫下, 毛竹根中 *PeAPX1*、*PeAPX2*、*PeAPX3*、*PeAPX5*、*PeAPX6* 和 *PeAPX7* 表达量变化不大, 甚至出现下调, 而叶片中 6 个 *PeAPX* 基因表达量呈现上调趋势。盐胁迫下 *PeAPX3* 不表达, 干旱胁迫下, *PeAPX3*、*PeAPX6* 和 *PeAPX7* 不表达, 推测可能是胁迫抑制了这几个基因的表达。可见, 4 个毛竹 *PeAPX* 基因(*PeAPX1*、*PeAPX2*、*PeAPX4* 和 *PeAPX5*)均参与了 3 种非生物胁迫响应, 但对胁迫的应激反应不同, 植物体内 ROS 的清除是一个复杂的过程, 需要通过多种途径实现。毛竹 7 种组织的转录组数据分析表明, *PeAPX1*、*PeAPX2* 和 *PeAPX5* 在毛竹叶片和根中的表达丰度较高, 同时定量分析结果表明他们均参与干旱、低温、盐胁迫响应, 因此我们推测这 3 个基因能快速响应非生物胁迫。

参考文献

- [1] JIANG Z H. Bamboo and Rattan in the World [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2007: 71–77.
江泽慧. 世界竹藤 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2007: 71–77.
- [2] YANG Y F, AL-BAIDHANI H H J, HARRIS J, et al. DREB/CBF expression in wheat and barley using the stress-inducible promoters of *HD-Zip I* genes: Impact on plant development, stress tolerance and yield [J]. Plant Biotechnol J, 2019. doi: 10.1111/pbi.13252.
- [3] SHAO Y R, XU J X, XUE L, et al. Effects of low temperature stress on physiological-biochemical indexes and photosynthetic characteristics of seedlings of four plant species [J]. Acta Ecol Sin, 2013, 33(14): 4237–4247. doi: 10.5846/stxb201301150100.
邵怡若, 许建新, 薛立, 等. 低温胁迫时间对 4 种幼苗生理生化及光合特性的影响 [J]. 生态学报, 2013, 33(14): 4237–4247. doi: 10.5846/stxb201301150100.
- [4] LI J. Progress on drought stress adaptation mechanisms of plant [J]. Guangdong Agric Sci, 2014, 41(19): 154–159. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.19.035.
李洁. 植物干旱胁迫适应机制研究进展 [J]. 广东农业科学, 2014, 41(19): 154–159. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.19.035.
- [5] LI L, MU S H, CHENG Z C, et al. Characterization and expression analysis of the *WRKY* gene family in moso bamboo [J]. Sci Rep, 2017, 7: 6675. doi: 10.1038/s41598-017-06701-2.
- [6] XIE L H, LI X Y, HOU D, et al. Genome-wide analysis and expression profiling of the heat shock factor gene family in *Phyllostachys edulis* during development and in response to abiotic stresses [J]. Forests, 2019, 10(2): 100. doi: 10.3390/f10020100.
- [7] HOU D, CHENG Z C, XIE L H, et al. The *R2R3MYB* gene family in *Phyllostachys edulis*: Genome-wide analysis and identification of stress or development-related *R2R3MYBs* [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 738. doi: 10.3389/fpls.2018.00738.
- [8] PANCHUK I I, ZENTGRAF U, VOLKOV R A. Expression of the *APX* gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2005, 222(5): 926–932. doi: 10.1007/s00425-005-0028-8.
- [9] CHEN H, WU J L, LI X J. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts [J]. Prog Mod Biomed, 2008, 8(10): 1979–1981, 1971.
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, 1971.
- [10] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiol, 1993, 22(5): 867–880. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- [11] LAZZAROTTO F, TEIXEIRA F K, ROSA S B, et al. Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent [J]. New Phytol, 2011, 191(1): 234–250. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03659.x.
- [12] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [J]. J Exp Bot, 2002, 53(372): 1305–1319. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1305.
- [13] 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]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 46869–46877. doi: 10.1074/jbc.M307525200.
- [14] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9(10): 490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009.
- [15] LIU Y J, YUAN Y, LIU Y Y, et al. Gene families of maize glutathione-

- ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses [J]. *J Plant Physiol*, 2012, 169(2): 183–192. doi: 10.1016/j.jplph.2011.08.018.
- [16] LIU N, WU J H, AN Y R, et al. Bioinformatics analysis of the ascorbate peroxidase gene family in the *Gossypium hirsutum* L. genome [J]. *Cott Sci*, 2017, 29(1): 17–28. doi: 10.11963/issn.1002-7807.201701003.
刘娜, 吴金华, 安亚茹, 等. 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. doi: 10.11963/issn.1002-7807.201701003.
- [17] TEIXEIRA F K, MENEZES-BENAVENTE L, ROGÉRIO M, et al. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: Inferences from the rice genome [J]. *J Mol Evol*, 2004, 59(6): 761–770. doi: 10.1007/s00239-004-2666-z.
- [18] GUAN Q J, WANG Z J, WANG X H, et al. A peroxisomal APX from *Puccinellia tenuiflora* improves the abiotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* through decreasing of H₂O₂ accumulation [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 175: 183–191. doi: 10.1016/j.jplph.2014.10.020.
- [19] CHAO J Q, ZHANG S X, CHEN Y Y, et al. Cloning, heterologous expression and characterization of ascorbate peroxidase (APX) gene in laticifer cells of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 97: 331–338. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.10.023.
- [20] ZHAO H S, LOU Y F, SUN H Y, et al. Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Phyllostachys edulis* in response to high light [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 34. doi: 10.1186/s12870-016-0720-9.
- [21] FENG F M, SHI S J, CAO Y, et al. Effects of chilling and freezing stress on the physiological metabolism and the expression of cold-related transcription factors in seedlings of *Phyllostachys heterocycla* cv. *pubescens* [J]. *J Bamboo Res*, 2014, 33(2): 29–33, 45. doi: 10.3969/j.issn.1000-6567.2014.02.006.
冯芳敏, 史世京, 曹颖, 等. 冷冻胁迫对毛竹幼苗生理代谢及抗寒相关转录因子表达的影响 [J]. *竹子研究汇刊*, 2014, 33(2): 29–33, 45. doi: 10.3969/j.issn.1000-6567.2014.02.006.
- [22] LI L, SONG S J, FANG X M, et al. Protection enzymes and lipid peroxidation in *Phyllostachys edulis* seedlings with temperature and water stresses [J]. *J Zhejiang Agric For Univ*, 2017, 34(2): 268–275. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.2017.02.010.
李黎, 宋帅杰, 方小梅, 等. 高温干旱及复水对毛竹实生苗保护酶和脂质过氧化的影响 [J]. *浙江农林大学学报*, 2017, 34(2): 268–275. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.2017.02.010.
- [23] LETUNIC I, COPLEY R R, SCHMIDT S, et al. SMART 4.0: Towards genomic data integration [J]. *Nucl Acids Res*, 2004, 32(D1): D142–D144. doi: 10.1093/nar/gkh088.
- [24] PROOST S, van BEL M, STERCK L, et al. PLAZA: A comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(12): 3718–3731. doi: 10.1105/tpc.109.071506.
- [25] WU L J. The selection of endogenous reference genes in *Phyllostachys edulis* treated with abiotic stresses for qRT-PCR analysis [D]. Hangzhou: Zhejiang Agricultural and Forestry University, 2018: 13–35.
吴林军. 非生物胁迫下毛竹 qRT-PCR 分析中内参基因的选择 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018: 13–35.
- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [27] CHEN X, ZHOU Z H, WANG R Q, et al. Effect of low temperature stress on antioxidant ability in *Ilex verticillata* leaves [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2016, 24(6): 689–695. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.06.013.
陈茜, 周之涵, 王瑞琪, 等. 低温处理对北美冬青叶片抗氧化能力的影响 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2016, 24(6): 689–695. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.06.013.
- [28] SHAFI A, GILL T, ZAHOOR I, et al. 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 [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(2): 1985–2002. doi: 10.1007/s11033-019-04648-3.
- [29] LONG Y L, ZHU B B, XU Z J, et al. Sequence analysis of APX gene in watermelon and its expression characteristic after treated with MeJA [J]. *Genom Appl Biol*, 2016, 35(8): 2125–2132. doi: 10.13417/j.gab.035.002125.
龙娅丽, 朱白婢, 徐子健, 等. 西瓜 APX 基因的序列分析及其茉莉酸甲酯诱导表达特性 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(8): 2125–2132. doi: 10.13417/j.gab.035.002125.
- [30] SHARMA P, DUBEY R S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: Role of osmolytes as enzyme protectant [J]. *J Plant Physiol*, 2005, 162(8): 854–864. doi: 10.1016/j.jplph.2004.09.011.
- [31] KOUSSEVITZKY S, SUZUKI N, HUNTINGTON S, et al. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(49): 34197–34203. doi: 10.1074/jbc.M806337200.
- [32] YOSHIMURA K, YABUTA Y, ISHIKAWA T, et al. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(1): 223–234. doi: 10.1104/pp.123.1.223.