

猕猴桃 *POD* 基因的克隆和表达分析

陈义挺¹, 赖瑞联¹, 冯新¹, 高敏霞¹, 程春振², 陈文光¹, 吴如健^{1*}

(1. 福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013; 2. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

摘要: 为了解猕猴桃 *POD* 基因的表达调控功能, 采用 RT-PCR 技术从‘米良 1 号’猕猴桃(*Actinidia deliciosa* ‘Miliang-1’)克隆了 2 个 *POD* 家族成员基因(*AdPOD27* 和 *AdPOD64*)。结果表明, *AdPOD27* 和 *AdPOD64* 开放阅读框分别为 984 和 957 bp, 预测分别编码 327 和 318 个氨基酸, GenBank 登录号分别为 MF774100 和 MF774101。AdPOD27 和 AdPOD64 为亲水性碱性蛋白, 属于植物亚铁红素依赖 III 型 *POD* 超家族成员, 含有信号肽、跨膜螺旋结构和磷酸化位点, 亚细胞定位预测分别定位于线粒体和细胞外。qRT-PCR 结果表明, *AdPOD27* 在脱落酸(ABA)和 4℃ 处理时表达量急剧上升, 而 *AdPOD64* 只在 ABA 处理时表达量显著提高。此外, *AdPOD27* 表达量与 *POD* 活性、*AdPOD64* 表达量均存在显著相关性。因此, *AdPOD27* 和 *AdPOD64* 可能在猕猴桃果实软化、低温响应和 ABA 诱导等过程中发挥重要的调控功能。

关键词: 猕猴桃; 过氧化物酶; 果实软化; 低温; 脱落酸

doi: 10.11926/jtsb.3919

Cloning and Expression Analysis of *POD* Genes in Kiwifruit

CHEN Yi-ting¹, LAI Rui-lian¹, FENG Xin¹, GAO Min-xia¹, CHENG Chun-zhen², CHEN Wen-guan, WU Ru-jian^{1*}

(1. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To understand the regulation function of peroxidase genes in kiwifruit, two members of *POD* gene family (*AdPOD27* and *AdPOD64*) were cloned from *Actinidia deliciosa* ‘Miliang-1’ by using reverse transcription PCR, the bioinformations of AdPOD27 and AdPOD64 were analyzed, and the correlation between their expression and *POD* activity were also studied. The results showed that the length of open read frame of *AdPOD27* and *AdPOD64* was 984 and 957 bp, encoding 327 and 318 amino acids, respectively, which GenBank accession No. were MF774100 and MF774101. AdPOD27 and AdPOD64 were hydrophilic and alkaline proteins belonging to class III of the plant heme-dependent peroxidase superfamily. The two proteins had signal peptide, transmembrane structure and phosphorylation sites. AdPOD27 and AdPOD64 located in mitochondrion and extracellular region, respectively. qRT-PCR analysis showed that the expression of *AdPOD27* was up-regulated greatly treated with abscisic acid (ABA) and under 4℃, while *AdPOD64* expression only enhanced treated with ABA. Moreover, the *AdPOD27* expression had significant correlations with *POD* activity and *AdPOD64* expression. Therefore, *AdPOD27* and *AdPOD64* would be involved in fruit softening, low temperature response and ABA induction of *A. deliciosa*.

收稿日期: 2018-04-04 接受日期: 2018-07-02

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2017J01044, 2018J05051); 福建省农业科学院博士科研启动基金项目(DC2017-2); 福建省农业科学院科技创新团队项目(STIT2017-3-6); 福建省公益类科研院所基本科研专项(2015R1014-3)资助

This work was supported by the Natural Science Foundation in Fujian (Grant No. 2017J01044, 2018J05051), the Doctoral Research Starting Fund of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No. DC2017-2), the Project for Science and Technology Innovation Group of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No. STIT2017-3-6), the Project for Basic Science and Technology of Public Welfare Scientific Research Institution in Fujian Province (Grant No. 2015R1014-3).

作者简介: 陈义挺(1972~), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为果树生物技术与遗传资源。E-mail: chyiting@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wurujian@126.com

Key words: Kiwifruit; Peroxidase; Fruit softening; Low temperature; Abscisic acid

猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)是猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属落叶藤本果树,果实中富含维生素 C、亚麻酸、氨基酸和微量元素等,被认为是 20 世纪野生果树驯化最成功的果种之一^[1]。然而,猕猴桃果实耐贮性差,采后易软化腐烂,严重影响猕猴桃可食性和商品价值,如何延长猕猴桃贮藏保鲜期成为猕猴桃产业发展亟待解决的难题^[2]。

过氧化物酶(peroxidase, POD)是由单一肽链与卟啉组成的一种血红素蛋白,能够以铁卟啉为辅基,以 H₂O₂ 为电子受体催化底物氧化,在植物体内发挥抗氧化作用。POD 是多基因家族编码的同工酶,功能广泛且丰富多样,在植物生长、发育和衰老过程中,POD 活性水平均有强烈变化^[3-4]。此外,POD 还参与植物激素调控、活性氧代谢、抗病虫、耐干旱胁迫等生理过程,是植物响应逆境胁迫的关键酶之一。过表达过氧化物酶基因明显提高番茄对苯酚胁迫的耐受性^[5];POD 基因能够响应缺硼胁迫改变柑桔砧木中木质素含量^[6];POD 活性会影响温州蜜柑贮藏过程中果皮和果肉中的枯水发生,进而影响果实采后衰老^[7]。

已有研究表明,POD 在猕猴桃采后贮藏和保鲜过程中发挥重要作用。Zolfaghari 等^[8]认为,低温下猕猴桃 POD 活性均提高,长时间冷藏于(1±1)℃,相对湿度(80±5)%有利于维持猕猴桃最佳品质。猕猴桃花后不同时间采收的果实中 POD 活性也存在显著差异^[9]。在猕猴桃采后贮藏效果影响因素研究中,一氧化氮、1-甲基环丙烯、氮气、硫化氢和萜烯素等均能上调猕猴桃果肉中 POD 活性,维持风味品质和较高的抗病能力,减少果实冷藏冷害,延缓果实衰老,但也可能引起部分品种果心木质化^[10-17];而草酸能够显著抑制猕猴桃果肉中 POD 等木质素合成相关酶的活性,减轻因木质化引起的果实品质劣变^[18]。此外,微波、高压和热处理也会影响猕猴桃果汁和果酱中 POD 活性,从而改变其贮藏效果^[19-20]。

低温贮藏是延长猕猴桃果实货架期的有效途径,而脱落酸(abscisic acid, ABA)在猕猴桃后熟衰老过程中能够促进水解酶活性增强,参与猕猴桃果实成熟过程的软化启动^[21]。目前,猕猴桃 POD 相关研究主要集中在 POD 活性改变对果实贮藏、衰老和品质等生理方面影响,其分子机理尚不明确。低温和 ABA 作为目前已知的猕猴桃软化两个重要相

关因素,其在软化过程中与 POD 的相互作用关系及其调控机制也未见报道。而在前期研究中,通过高通量转录组测序发现,POD27 和 POD64 在猕猴桃不同贮藏处理组中存在明显的转录水平差异。鉴于此,试验以‘米良 1 号’猕猴桃为材料,对猕猴桃基因组中预测的这 2 个 POD 基因家族成员进行验证和生物信息学分析,同时研究了猕猴桃贮藏软化、低温和 ABA 处理下 POD 活性和 POD 表达模式的相关性,以期为猕猴桃 POD 基因的调控功能研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用‘米良 1 号’猕猴桃(*Actinidia deliciosa* ‘Miliang-1’)采自福建省农业科学院果树研究所建宁猕猴桃基地。2017 年 9 月份,采集大小相近,成熟度一致,无病虫害和机械损伤的果实,参考陈义挺等^[22]的方法进行处理,将猕猴桃随机分为 6 组(编号 1~6),每组 10 个果实,组 1 为 25℃ 不贮藏(对照),组 2 为 25℃ 中贮藏 1 周,组 3~5 分别为 4℃ 下贮藏 1、2 和 3 周,组 6 为 50 mg L⁻¹ 的 ABA 浸泡 2 min 后于 25℃ 中贮藏 1 周。每处理重复 3 次,经液氮速冻后保存于-80℃ 超低温冰箱中用于 POD 活性测定和 RNA 提取。

1.2 POD 活性测定

根据 POD 催化 H₂O₂ 氧化特定底物,在 470 nm 有特征光吸收的原理,采用植物过氧化物酶试剂盒(购自苏州科铭生物技术有限公司)测定猕猴桃的 POD 活性。

1.3 RNA 提取和 cDNA 逆转录

采用植物多糖多酚试剂盒 RNAPrep pure Plant Kit 提取猕猴桃总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计进行质量和浓度检测合格后进行等量混合,利用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录 cDNA 用于 PCR 扩增,同时采用 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal; TransGen Biotech, Beijing)逆转录 cDNA

用于 qRT-PCR 试验。

1.4 基因克隆

从已公布的猕猴桃基因组数据库 (Kiwifruit Genome Database, <http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/kiwi/home.cgi>) 中搜索并下载猕猴桃 *POD27* 和 *POD64* 基因可能序列 (Gene ID: Achn356831 和 Achn132211), 设计引物 (表 1) 进行 ORF 全长扩增。PCR 扩增体系为: $2 \times \text{TransTaq}^{\text{®}}$ HiFi PCR SuperMix $12.5 \mu\text{L}$, cDNA 模板 50 ng , 上下游引物各 $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$, 补足高压

ddH_2O 至终体积 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为: 95°C 预变性 5 min , 95°C 变性 30 s , TM 退火 30 s , 72°C 延伸 1 min , 35 次循环后再 72°C 延伸 8 min 。PCR 产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切割预期目的条带采用 *EasyPure*[®] Quick Gel Extraction Kit 回收, 根据试剂盒说明书采用 *pEASY*[®]-T5 Zero Cloning Kit 连接目的片段和载体, 转化到 *Trans1*-T1 感受态细胞中涂板, 37°C 暗下培养 12 h 后挑取单克隆子进行 PCR 检测, 选取阳性克隆子送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

表 1 基因克隆、qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers used in cloning and qRT-PCR of genes

	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	大小 Size (bp)
RT-PCR	POD27-F	CATGGCTACTTCAAAGCTCTCT	989
	POD27-R	GGCCTTAGTGGTTAACCTTAGTAC	
	POD64-F	ATGGCTGCTGCTAGGTCTC	960
	POD64-R	GGGCTACCGAACCACTCTAC	
qRT-PCR	POD27-qF	CTTGCTAATGGTCATGGCTTG	185
	POD27-qR	GAGTCCAACAACACAGACCGT	196
	POD64-qF	GGAATGTGCCCAAAGGAAG	
	POD64-qR	GCAAATCCGAGAGTGTGACC	126
	ACTB-qF	GTGCTCAGTGGTGGTTCAA	
	ACTB-qR	GACGCTGTATTTCTCTCAG	

1.5 生物信息学分析

采用在线软件进行 *POD* 生物信息学分析, 基本理化性质 (ExPASy, <http://web.expasy.org/protparam/>), 信号肽 (SignalP 4.1 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 亚细胞定位 (PSORT Prediction, <https://psort.hgc.jp/form.html>), 跨膜结构 (TMPred, http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), 磷酸化位点 (NetPhos 3.1 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), 保守结构域 (NCBI conserved domain search, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 结合位点 (PROSITE, <http://www.expasy.ch/prosite>), 卷曲螺旋结构 (COILS, http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html), 蛋白质二级结构 (PSIPRED, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), 蛋白质三维结构 (SWISS-MODEL, <https://swissmodel.expasy.org/>)。

1.6 qRT-PCR 分析

以猕猴桃 *ACTB* 为内参基因进行 qRT-PCR 试验。将各 cDNA 样品等体积混样, 随后按 10^{-1} 、 30^{-1} 、 90^{-1} 和 270^{-1} 进行梯度稀释用于绘制标准曲线, 根据

扩增效率筛选适宜的退火温度检测不同样品中基因的相对表达量。采用 Eppendorf Realplex⁴ 荧光定量 PCR 仪设置 qRT-PCR 扩增程序: 94°C 预变性 30 s ; 94°C 变性 10 s , TM 退火 15 s , 72°C 延伸 10 s , 循环 40 次; 94°C 15 s , 60°C 15 s , 再以 $0.11^\circ\text{C s}^{-1}$ 的速度升温至 94°C 保持 15 s , 绘制融解曲线。qRT-PCR 反应体系为 $2 \times \text{TransStart}^{\text{®}}$ Top Green qPCR SuperMix $10 \mu\text{L}$, Passive Reference Dye ($50 \times$) $0.4 \mu\text{L}$, 上下游引物 (表 1) 各 $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$, 模板 $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。采用 Excel 2003 和 SPSS 19.0 进行数据统计、差异显著性分析和相关性分析。

2 结果和分析

2.1 *POD* 活性

与对照相比, 25°C 和 ABA 处理的猕猴桃贮藏 1 周后 *POD* 活性显著提高 ($P < 0.01$), 此时猕猴桃硬度急剧下降, 可溶性固形物含量上升, 果实软化^[21], 可见 *POD* 参与了猕猴桃软化过程, 并且 *POD* 活性可能受 ABA 影响 (图 1)。而低温贮藏过程中, 4°C 贮藏 1 周后 *POD* 活性明显提高, 随后急剧下降, 3

周后重新上升恢复到对照水平($P>0.01$), 说明猕猴桃 POD 活性能够响应低温诱导, 在猕猴桃抗冷早期发挥重要作用。可见, POD 可能在猕猴桃贮藏软化、ABA 诱导和低温响应过程中发挥调控作用。

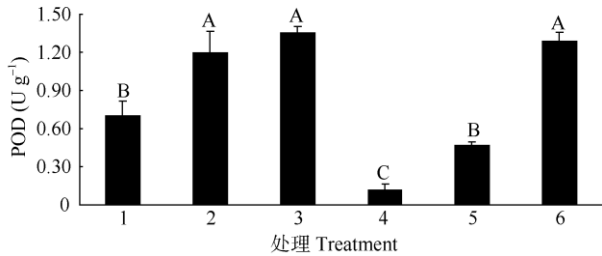


图1 猕猴桃 POD 活性变化。1: 25℃贮藏 0 周; 2: 25℃贮藏 1 周; 3~5: 4℃贮藏 1、2 和 3 周; 6: 50 mg L⁻¹ ABA 浸泡 2 min 后 25℃贮藏 1 周。柱上不同字母表示差异极显著($P<0.01$)。

Fig.1 Change in POD activity of kiwifruit. 1: Storage in 25°C for 0 week; 2: Storage in 25°C for 1 week; 3-5: Storage in 4°C for 1, 2 and 3 weeks, respectively; 6: Storage in 25°C for 1 week after treated with 50 mg L⁻¹ ABA for 2 min. Different capital letters upon column indicated significant difference at 0.01 level.

2.2 POD 基因克隆

根据猕猴桃基因组数据库对 *POD27* 和 *POD64* 序列进行验证, 分别获得长度为 984 和 957 bp 的 ORF 序列, 预测分别编码 327 和 318 个氨基酸, 起始密码子均为 ATG, 终止密码子分别为 TAA 和 TAG

(图 2, 3)。*POD27* 和 *POD64* 与‘红阳’猕猴桃(*A. chinensis* ‘Hongyang’)基因组相应 CDS 序列(GenBank 登录号: Achn356831 和 Achn132211)的相似性分别达到 99.39%和 99.16%, 而 *POD27* 和 *POD64* 间的核苷酸和预测蛋白序列的相似性分别为 49.45%和 40.00%。通过 NCBI 比对, 猕猴桃 *POD27* 与烟草(*Nicotiana attenuata*)和杨树(*Populus trichocarpa*)的 *POD27* 相似性分别为 74%和 73%, *POD64* 与葡萄(*Vitis vinifera*)和向日葵(*Helianthus annuus*)的 *POD64* 相似性分别为 82%和 79%, 表明所获得的序列为猕猴桃相应基因, 分别命名为 *AdPOD27* 和 *AdPOD64*, GenBank 登录号分别为 MF774100 和 MF774101。

2.3 POD 生物信息学分析

生物信息学分析表明, *AdPOD27* 和 *AdPOD64* 的基本理化性质存在一定差异(表 2), 二者均为亲水性碱性蛋白, 但 *AdPOD27* 属于稳定蛋白, 而 *AdPOD64* 属于不稳定蛋白; *AdPOD27* 中亮氨酸(Leu)含量最多, 达到 9.8%, 其次是赖氨酸(Lys)和丙氨酸(Ala), 分别为 8.3%和 8.0%, 而 *AdPOD64* 中丝氨酸(Ser)含量最多, 达到 11.3%, 其次是 Leu 和 Ala, 均为 10.1%。亚细胞定位表明, *AdPOD27* 和 *AdPOD64* 可能分别定位于线粒体和细胞外, 二者分别于氨基酸序列 5’端第 1~26 位和第 1~24 位氨基酸含有信号肽。保守结构域和结合位点预测表明,

```

1  ATGGCTACTTCAAAGCTCTCTATATGTCTCTTATTTCGAAATGATTTTTCTTGCTTTTGTTCACCTTGCTAGTGGTCATGGCTTGAAA
   M A T S K L S I C L L F E M I F L A F V F N L A S G H G L K
91  AACGGGTTTTACAAGAAACATGCCCTAATGCTGAGGCCATGTC AAGAAAACCATACATGAAGTCATCTCAGTGGCACCAAGTCTTGCT
   N G F Y K P N K T C P N A E A I Y K K T I H E V I S V A P S L A
181  GGCCCTTTGTTGAGAATGCACTTCCATGATTGTTTTGTTAGAGTTGTGACGGGCTGTGTTGTTGGACTCCCCAACTCGTCAAGCAGAA
   G P L L R M H F H D C F V R G C D G S V L L D S P T R Q A E
271  AAAGATGCAATCCCAAATTAACCCTTAGAGGGCTCCAGATTATCGATAAGGTCAAGGCCGATTGGAAAAAGAGTGTCCCGGAGTTGTT
   K D A I P N L T L R G L Q I I D K V K A A L E K E C P G V V
361  TCTTGTGCTGACACCTTAGCCATTATAGCTAGGGACGTGACATATGAGGTCATGGGGCCATTCTGGGAAAGTTGAAACCGGGCGTAGAGAT
   S C A D T L A I I A R D V T Y E V M G P F W E V E T G R R D
451  GGGAAAGTGTGATTGCCAACGAGGCATTAATCAACCTACCACCACCTTTTGCAAACATAAGCGCTTTAAAAACCACATTTGCTCTAAAG
   G K V S I A N E A L I N L P P P F A N I S A L K T T F A L K
541  GGTCTAAGTGTGAAAGACCTAGTTGTGTTATCAGGTGGTCACACAATCGGAATTTCTCATTGTTCTTCTTCAACACCCGCTCTACAAC
   G L S V K D L V V L S G G H T I G I S H C S S F N T R L Y N
631  TTCACCGGCAAGGGTGACACCGATCCCACGTTGGATCCCACTACTATAAAGACTGAAGCTAAAATGCAAGCCCGCAGACCAGAACTCG
   F T G K G D T D P T L D P N Y I K R L K L K C K P A D Q N S
721  ATGTGGAGATGGATCCGGGAGCTTCAAGACCTTTGACCACTACTACCGCTCGTGGCTAAAAGAAGAGGGCTTTTCAATCAGAT
   I V E M D P G S F K T F D Q H Y Y T L V A K R R G L F Q S D
811  GCTGCCCTACTTGATGATAGTGAGACAAAAGGCCTATGTGAAAGCTCATGCTAATAGCCATGGATCTACTTCTTCAAGGACTTCGGTGT
   A A L L D D S E T K A Y V K A H A N S H G S T F F K D F G V
901  TCTATGATTAACATGGGTAGAATTGGAGTCTTACGGGTAAGGATGGTGAAGTCAGAAAAGTTGTACTAAGGTTAACCACCTAA
   S M I N M G R I G V L T G K D G E V R K V C T K V N H *

```

图 2 *AdPOD27* 序列和推测的氨基酸序列。下划线和阴影分别表示保守结构域和血红素结合位点, 下同。

Fig. 2 cDNA sequence of *AdPOD27* and putative amino acid sequence. Underline and shaded area indicated conserved domain and heme binding site respectively. The same is following figure.

```

1  ATGGCTGCTGCTAGGTCTCTTGCATTGGCTTTGTCAGTCTTTTCTTCAATCTCCACACTTGTGAACACACTGAGCACAAATTACTAT
   M A A A R S L A L A L S L L L L S I S T L V N T L S T N Y Y
91  GACCAAACTTGCCCAAGGCAGAGTCAAGTATTACGAGTGTGTGAAGAAAGCGATGTCAAATGACAAAACAGTTCAGCTGCCCTACTC
   D Q T C P K A E S V I T S V V K K A M S N D K T V P A A L L
181 CGAATGCACTTCCACGATTGCTTTATTAGAGGGTGTGGCGCTTCGGTCTACTAAATCAACTAGCAAGAACCAGGCTGAAAAAGACGGA
   R M H F H D C F I R G C G A S V L L N S T S K N Q A E K D G
271 CCTCCAATATTTCTTACATGCATTTTATGTCATTGACAATGCAAAGAAAGAAGTCGAGGCTATGTGCCCGGTGTGTTTCTTGTGCC
   P P N I S L H A F Y V I D N A K K E V E A M C P G V V S C A
361 GACATCTTGGCTCTGGCTGCAAAGGATGCAGTTGCTCTGCTGAGGACCAACTTGAATGTGCCCAAAGGAAGAAAGATGGGAGAATT
   D I L A L A A K D A V A L S G G P T W N V P K G R K D G R I
451 TCGAAGGCTATTGATACCAGACAATTACCAGCTCCAACCTTCAACATTTCACTCCAGCAGAGCTTTCCAGAGAGGTCTTTCTATG
   S K A I D T R Q L P A P T F N I S Q L Q Q S F S Q R G L S M
541 GATGACTTAGTGGCACTCTCAGGAGTCCACTCTCGGATTGCCATTGTTTCATCTTCCAAAACAGGATCTACAACCTCAACACCCAA
   D D L V A L S G G H T L G F A H C S S F Q N R I Y N F N T Q
631 ACCAATATGGACCCGTCGATGCAGCATTGTTTGCAGACAGTCTAAGAAGCGTTTGTCCGATCCACAACAGGTGAAGAATGCGGGTGCC
   T N M D P S M Q H S F A D S L R S V C P I H N K V K N A G A
721 ACCTTGACTCAACTTCGACTACGTTTCGACAACGCATACTACAAGCTACTTCTGCAAGGAAAAGCATCTTCTCTTCCAGACCAAGCGCTG
   T L D S T S T T F D N A Y Y K L L L O G K S I F S S D Q A L
811 CTCAATATTGCAAGGACTAAAGATTTGGTTTCAAAATTTGCTACTTCTCAAGAAGAGTTTGAAGAGGCTTTTGTCAAGTCCGATCAAG
   L N I A R T K D L V S K F A T S Q E E F E E A F V K S V I K
901 ATGAGTAGTATCACTGGTGGCCAAGAGGTTAGGCTCAATTGTAGGGTGGTTTCGGTAG
   M S S I T G G Q E V R L N C R V Y R *
    
```

图 3 *AdPOD64* 序列和推测的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA sequence of *AdPOD64* and putative amino acid sequence

AdPOD27 和 *AdPOD64* 蛋白均属于植物亚铁红素依赖 III 型过氧化物酶超家族成员，主要参与细胞间隙和液泡的过氧化氢分解、生长素代谢、木质素合成和胁迫响应等(图 2, 3)。TMpred 分析表明, *AdPOD27* 含有 4 个由内向外和由外向内的跨膜螺旋结构以及 28 个磷酸化位点, *AdPOD64* 含有 4 个由内向外和 2 个由外向内的跨膜螺旋结构, 磷酸化位点个数为 38。二级结构预测表明, *AdPOD27* 中 α -螺旋和 β -折叠分别占 45.9% 和 4.6%, 而 *AdPOD64* 中二者含量分别为 47.8% 和 2.5%。SWISS-MODEL 预测表明, *AdPOD27* 和 *AdPOD64* 与棕榈(*Trachycarpus fortunei*, PDB: 4usc.1.A) 的相似度分别达到 45.12% 和 46.44%, 以此为模型预测 2 个猕猴桃 *POD* 的三维结构(图 4)。

2.4 *POD* 表达模式分析

从图 5 可见, 25°C 贮藏 1 周后猕猴桃 *AdPOD27* 的表达量是对照的 1.5 倍, 而 *AdPOD64* 的表达量未

出现显著变化, 说明 *AdPOD27* 可能参与猕猴桃果实软化过程, 而 *AdPOD64* 的调控作用较不明显。ABA 处理后, *AdPOD27* 和 *AdPOD64* 的表达量急剧上升, 分别为对照的 419 和 23 倍, 说明二者均能够响应 ABA 诱导, 尤其是 *AdPOD27*。猕猴桃果实在 4°C 处理 1 周后, *AdPOD27* 的表达量明显上调, 为对照的 98 倍, 随后下降, 在低温贮藏后期的调控也不明显, 而 *AdPOD64* 的表达量几乎不发生改变。此外, 在所有处理中, *AdPOD27* 的表达量均高于 *AdPOD64*, 可见, *AdPOD27* 可能在猕猴桃果实软化、低温响应和 ABA 诱导等过程中比 *AdPOD64* 发挥更全面的调控功能。

2.5 相关性分析

采用 SPSS19.0 进行 Pearson 相关性分析, 结果表明, 猕猴桃经不同处理, *AdPOD27* 的表达量与 *POD* 活性呈显著正相关($r=0.533, P=0.023<0.05$),

表 2 *AdPOD27* 和 *AdPOD64* 的基本理化性质

Table 2 Physicochemical properties of *AdPOD27* and *AdPOD64*

	分子量 Molecular weight (kD)	分子式 Formula	原子总数 Number of atoms	等电点 pI	脂肪系数 Aliphatic index	不稳定系数 Instability index	总亲水性 GRAVY
<i>AdPOD27</i>	35 746.39	C ₁₅₉₈ H ₂₅₄₇ N ₄₃₃ O ₄₆₃ S ₁₆	5 057	8.85	90.06	28.26	-0.035
<i>AdPOD64</i>	34 451.39	C ₁₅₀₈ H ₂₄₂₈ N ₄₂₄ O ₄₆₅ S ₁₆	4 841	8.96	86.86	44.58	-0.088

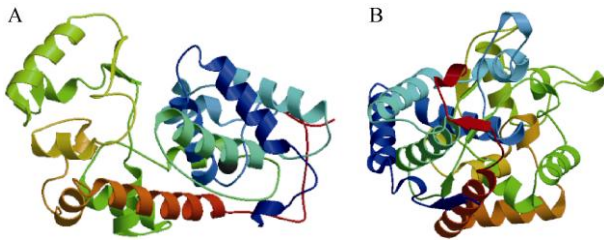


图 4 AdPOD27 (A) 和 AdPOD64 (B) 的三维结构预测

Fig. 4 Predicted three-dimensional structures of AdPOD27 (A) and AdPOD64 (B)

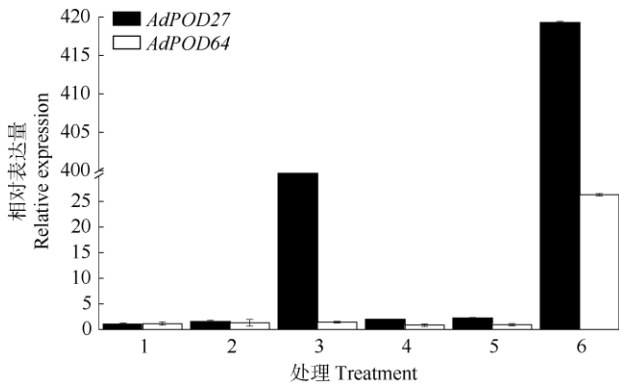


图 5 AdPOD27 和 AdPOD64 的表达模式

Fig. 5 Expression pattern of AdPOD27 and AdPOD64

而 AdPOD27 与 AdPOD64 的表达量呈极显著正相关 ($r=0.947$, $P=0<0.01$)。此外, AdPOD64 的表达量与 POD 活性也存在正相关关系, 但不显著 ($r=0.430$, $P=0.075>0.05$)。可见, 在猕猴桃果实软化、低温响应和 ABA 诱导过程中, AdPOD27 和 AdPOD64 可能相互影响, 而 AdPOD27 可能通过上调和下调表达影响 POD 活性, 从而起到更重要的调控作用。

3 讨论

大量研究表明, POD 在 ABA 介导的非生物胁迫响应过程中具有重要调控功能。外源喷施 ABA 能够提高水稻 (*Oryza sativa*) 幼苗的 POD 活性, 增强其清除自由基的能力从而获得更高的抗寒能力^[23]; 叶片或者根系外施 ABA 能够增强 POD 等抗氧化酶活性, 维持植物膜系统和光合器官的稳定性, 降低超氧阴离子和过氧化氢含量, 延缓膜脂丙二醛含量增加, 显著提高猕猴桃、姜 (*Zingiber officinale*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 和豌豆 (*Pisum sativum*) 等植物抗干旱能力^[24-27]; ABA 处理还导致小麦胚胎超氧自由基、过氧化氢和氧化应激指标提高, 从而诱导

部分 POD 同工酶活性增强^[28]。此外, 对番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、甘蔗 (*Saccharum spp.*) 和柃柳 (*Tamarix hispida*) 等的研究也表明, ABA 能够诱导 POD 上调表达^[29-31]。本试验中, ABA 处理的 AdPOD27 和 AdPOD64 表达量大幅度提高, 说明这 2 个成员参与了 ABA 介导的非生物胁迫响应过程, 然而与 25℃ 处理相比, POD 活性整体水平并没有显著变化, 表明仍有其他 POD 同工酶参与了该过程, 结果也预示着 POD 同工酶不同成员可能存在特异的调控功能。

低温贮藏是猕猴桃延缓果实软化, 延长货架期的有效手段, 然而果实低温贮藏过程中冷害常常导致果面皱缩, 果肉水渍化^[32]。而果实采后抗冷性与抗氧化性酶活性呈显著正相关性, 通过低温锻炼或逐步降温保存可以显著增强 POD 等抗氧化酶活性, 清除丙二醛、过氧化氢和超氧阴离子等从而明显提高果实的耐冷性^[33-34]。然而, POD 家族转录调节模式和功能丰富多样甚至在部分物种间完全相反, 胡椒 (*Capsicum annuum*) 的 CanPOD 并不参与冷胁迫过程, 低温敏感性的威廉蕉 (*Musa sp.*) 低温处理后 POD 活性甚至下调^[35]。本试验中, 低温处理早期 AdPOD27 表达量和 POD 活性整体水平大幅度上调, 而 AdPOD64 表达量并未发生显著变化, 进一步验证并非所有 POD 家族成员都能响应低温诱导。此外, 处理中后期 AdPOD27 表达量和 POD 活性均下降, 与王允等^[26]的研究结果相似。因此, POD 同工酶参与了猕猴桃低温贮藏早期的抗冷作用, 然而这种响应机制只在部分家族成员中发挥调控。

本研究中, 25℃ 室温贮藏软化过程中, POD 活性也显著提高, 但只有 AdPOD27 略微上调表达。可见, 这一过程可能存在于这 2 个成员以外的其他 POD 同工酶编码基因发生了转录水平改变。此外, 试验中所有处理的 AdPOD27 表达量均高于 AdPOD64, 说明 AdPOD27 可能在猕猴桃果实软化、低温响应和 ABA 诱导等过程中发挥比 AdPOD64 更为重要的调控功能。

参考文献

- [1] XU H H, YANG N, ZHAO J, et al. The wondrous kiwifruit: Origin, cultivation and utilization [J]. Int J Hort, 2017, 7(1): 1-6. doi: 10.5376/ijh.2017.07.0001.
- [2] CHEN Y T, CHENG C Z, LAI R L, et al. Research progress on factors influencing kiwifruit storage [J]. Fujian J Agric Sci, 2017, 32(2): 222-

227. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2017.02.023.
- 陈义挺, 程春振, 赖瑞联, 等. 猕猴桃果实贮藏影响因子研究进展 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(2): 222-227. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2017.02.023.
- [3] KASRAOUI M F, DUQUESNOY I, WINTERTON P, et al. Soluble and cell wall bound peroxidase activities are markers of flower bud development stages in lemon (*Citrus limon* L.) [J]. J Appl Bot Food Qual, 2014, 87: 1-8. doi: 10.5073/JABFQ.2014.087.001.
- [4] FRANCOZ E, RANOCHA P, NGUYEN-KIM H, et al. Roles of cell wall peroxidases in plant development [J]. Phytochemistry, 2015, 112: 15-21. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.07.020.
- [5] WEVAR O A L, AGOSTINI E, TALANO M A, et al. Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol [J]. Plant Sci, 2005, 169(6): 1102-1111. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.07.007.
- [6] XIE S. Effect of boron deficiency on lignin content and the key gene expression of lignin biosynthesis in two kinds citrus rootstocks [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014: 11-28.
- 谢诗. 缺硼对两种柑橘砧木木质素含量及其合成关键基因表达的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014: 11-28.
- [7] HAO C M. Physiological biochemical mechanism of section drying *Citrus* fruit during storage [D]. Chongqing: Southwest University, 2009: 18-34.
- 郝春梅. 柑桔贮藏期枯水的生理生化机理研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2009: 18-34.
- [8] ZOLFAGHARI M, SAHARI M A, BARZEGAR M, et al. Physico-chemical and enzymatic properties of five kiwifruit cultivars during cold storage [J]. Food Bioprocess Technol, 2010, 3(2): 239-246. doi: 10.1007/s11947-008-0114-6.
- [9] CHOU H N, NEE C C, OU A S M, et al. Characterization of the physico-chemical and antioxidant properties of Taiwanese kiwifruit (*Actinidia setosa*) [J]. Bot Stud, 2008, 49: 215-224.
- [10] ZHU S H, SUN L N, LIU M C, et al. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage [J]. J Sci Food Agric, 2008, 88(13): 2324-2331. doi: 10.1002/jsfa.3353.
- [11] WANG C H, MENG Q K, LIU X H, et al. Effect of 1-MCP treatment on ascorbic acid content and its quality, physiological of *Actinidia chinensis* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2014, 14(5): 134-141.
- 王春红, 孟泉科, 刘兴华, 等. 1-MCP 处理对猕猴桃中抗坏血酸含量及其品质、生理的影响 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(5): 134-141.
- [12] SONG L L, GAO H Y, CHEN H J, et al. Effects of short-term anoxic treatment on antioxidant ability and membrane integrity of postharvest kiwifruit during storage [J]. Food Chem, 2009, 114(4): 1216-1221. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.080.
- [13] SHEN Y G, WANG W, ZHANG W, et al. Hydrogen sulfide facilitating enhancement of antioxidant ability and maintainance of fruit quality of kiwifruits during low-temperature storage [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2015, 31(z1): 367-372. doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2015.z1.045.
- [14] SUO J T, LI H, BAN Q Y, et al. Characteristics of chilling injury-induced lignification in kiwifruit with different sensitivities to low temperatures [J]. Postharv Biol Technol, 2018, 135: 8-18. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.020.
- [15] ZHENG X L, HU B, SONG L J, et al. Changes in quality and defense resistance of kiwifruit in response to nitric oxide treatment during storage at room temperature [J]. Sci Hort, 2017, 222: 187-192. doi: 10.1016/j.scienta.2017.05.010.
- [16] DU F M, ZHANG L Y, HE L, et al. Effect of quercetin treatment on storage of kiwifruit [J]. Shaanxi J Agric Sci, 2017, 63(7): 28-32.
- 杜芳梦, 张丽媛, 何玲, 等. 槲皮素处理对猕猴桃贮藏的影响 [J]. 陕西农业科学, 2017, 63(7): 28-32.
- [17] LI H, LIANG C Q, LÜ J, et al. Effects of oxalic acid treatment on lignification and related enzymes activities in 'Huayou' kiwifruit during cold storage [J]. Acta Hort Sin, 2017, 44(6): 1085-1093. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0718.
- 李桦, 梁春强, 吕苙, 等. 草酸对冷藏'华优'猕猴桃果实木质化及相关酶活性的影响 [J]. 园艺学报, 2017, 44(6): 1085-1093. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0718.
- [18] FANG L, JIANG B, ZHANG T. Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase [J]. Food Chem, 2008, 109(4): 802-807. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.01.017.
- [19] BENLLOCH-TINOCO M, IGUAL M, RODRIGO D, et al. Comparison of microwaves and conventional thermal treatment on enzymes activity and antioxidant capacity of kiwifruit puree [J]. Innov Food Sci Emerg, 2013, 19: 166-172. doi: 10.1016/j.ifset.2013.05.007.
- [20] CHEN K S, LI F, ZHANG S L, et al. Role of abscisic acid and indole-3-acetic acid in kiwifruit ripening [J]. Acta Hort Sin, 1999, 26(2): 81-86. doi: 10.3321/j.issn:0513-353X.1999.02.003.
- 陈昆松, 李方, 张上隆, 等. ABA 和 IAA 对猕猴桃果实成熟进程的调控 [J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 81-86. doi: 10.3321/j.issn:0513-353X.1999.02.003.
- [21] CHEN Y T, LAI R L, CHENG C Z, et al. Cloning and expression of polygalacturonase gene (*AcPG*) during fruit softening of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. J Agric Biotechnol, 2017, 25(2): 205-213. doi: 10.3969/j.issn.1674-7968.2017.02.004.

- 陈义挺, 赖瑞联, 程春振, 等. 猕猴桃果实软化过程中 *AcPG* 基因的克隆与表达 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(2): 205–213. doi: 10.3969/j.issn.1674-7968.2017.02.004.
- [22] ZHAN J H, LAN Z H. Effects of external ABA on peroxidase isozyme of rice to low temperature stress [J]. Biotechnology, 2003, 13(1): 7–9. doi: 10.3969/j.issn.1004-311X.2003.01.005.
- 詹嘉红, 蓝宗辉. 外源 ABA 对低温胁迫水稻过氧化物酶同工酶的影响 [J]. 生物技术, 2003, 13(1): 7–9. doi: 10.3969/j.issn.1004-311X.2003.01.005.
- [23] LATIF H H H. Physiological responses of *Pisum sativum* plant to exogenous ABA application under drought conditions [J]. Pak J Bot, 2014, 46(3): 973–982.
- [24] WANG Y L, MA F W, LI M J, et al. Physiological responses of kiwifruit plants to exogenous ABA under drought conditions [J]. Plant Growth Regul, 2011, 64(1): 63–74. doi: 10.1007/s10725-010-9537-y.
- [25] WANG Y, ZHANG Y, LIU C Y, et al. Effects of exogenous abscisic acid on active oxygen metabolism in ginger leaves under drought stress [J]. Acta Hort Sin, 2016, 43(3): 587–594. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0034.
- 王允, 张逸, 刘灿玉, 等. 干旱胁迫下外源 ABA 对姜叶片活性氧代谢的影响 [J]. 园艺学报, 2016, 43(3): 587–594. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0034.
- [26] LI X M, ZHANG L H, HE X Y, et al. Effects of abscisic acid on photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities of wheat seedlings exposed to UV-C [J]. Chin J Appl Ecol, 2006, 17(5): 822–826.
- 李雪梅, 张利红, 何兴元, 等. 脱落酸对 UV-C 胁迫下小麦幼苗光合特性及抗氧化酶活性的影响 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(5): 822–826.
- [27] SHARMA A D, RAKHRA G, MEHTA S, et al. Accumulation of class-III type of boiling stable peroxidases in response to plant growth hormone ABA in *Triticum aestivum* cultivars [J]. Plant Sci Today, 2014, 1(1): 3–9. doi: 10.14719/pst.2014.1.1.6.
- [28] GUO X H, JIANG J, WANG B C, et al. *ThPOD3*, a truncated polypeptide from *Tamarix hispida*, conferred drought tolerance in *Escherichia coli* [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(3): 1183–1190. doi: 10.1007/s11033-009-9484-8.
- [29] WANG C J, CHAN Y L, SHIEN C H, et al. Molecular characterization of fruit-specific class III peroxidase genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. J Plant Physiol, 2015, 177: 83–92. doi: 10.1016/j.jplph.2015.01.011.
- [30] SU Y C, WANG Z Q, LI Z, et al. Molecular cloning and functional identification of peroxidase gene *ScPOD02* in sugarcane [J]. Acta Agron Sin, 2017, 43(4): 510–521. doi: 10.3724/SPJ.1006.2017.00510.
- 苏亚春, 王竹青, 李竹, 等. 甘蔗过氧化物酶基因 *ScPOD02* 的克隆与功能鉴定 [J]. 作物学报, 2017, 43(4): 510–521. doi: 10.3724/SPJ.1006.2017.00510.
- [31] BURDON J, LALLU N, FRANCIS K, et al. The susceptibility of kiwifruit to low temperature breakdown is associated with pre-harvest temperatures and at-harvest soluble solids content [J]. Postharv Biol Technol, 2007, 43(3): 283–290. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.09.011.
- [32] YANG Q Z, RAO J P, YI S C, et al. Antioxidant enzyme activity and chilling injury during low-temperature storage of kiwifruit cv. Hongyang exposed to gradual postharvest cooling [J]. Hort Environ Biotechnol, 2012, 53(6): 505–512. doi: 10.1007/s13580-012-0101-8.
- [33] YANG Q Z, ZHANG Z K, RAO J P, et al. Low-temperature conditioning induces chilling tolerance in ‘Hayward’ kiwifruit by enhancing antioxidant enzyme activity and regulating endogenous hormones levels [J]. J Sci Food Agric, 2013, 93(15): 3691–3699. doi: 10.1002/jsfa.6195.
- [34] ZHANG Q, ZHANG J Z, CHOW W S, et al. The influence of low temperature on photosynthesis and antioxidant enzymes in sensitive banana and tolerant plantain (*Musa* sp.) cultivars [J]. Photosynthetica, 2011, 49(2): 201–208. doi: 10.1007/s11099-011-0012-4.
- [35] WANG J E, LIU K K, LI D W, et al. A novel peroxidase *CanPOD* gene of pepper is involved in defense responses to *Phytophthora capsici* infection as well as abiotic stress tolerance [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(2): 3158–3177. doi: 10.3390/ijms14023158.