

芹菜 APX 基因家族鉴定及其表达分析

杜佳庚,周瑾,李晓燕,张颖,伍丽梅,李梦瑶

(四川农业大学园艺学院,四川成都611130)

摘要:抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)是植物活性氧代谢中重要的抗氧化酶之一,在植物抵抗氧化胁迫方面发挥重要作用。利用生物信息学方法对芹菜基因组中的 APX 基因家族成员进行鉴定和分析,并通过实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)验证分析 AgAPXs 在高温胁迫下的表达情况,为开展芹菜 APX 基因参与高温胁迫调控机制提供依据。结果表明:芹菜基因组中共有 9 个 APX 基因,随机分布在 5 个染色体上,并出现了基因片段复制现象;大多数基因被定位在细胞质中。系统发育分析表明,AgAPX 基因家族可分为 3 个亚族,同一亚族中的成员具有相似的基因结构和基序。启动子顺式元件分析表明,大多数 AgAPX 基因含有多种与生长发育、植物激素和逆境胁迫相关的顺式元件。高温胁迫下,芹菜 APX 活性提高。qRT-PCR 分析表明,AgAPXs 在不同时间的高温处理下表达具有显著差异,并与转录组表达丰度相一致,AgAPX2、AgAPX3、AgAPX4、AgAPX5、AgAPX7 的表达量和 APX 活性具有显著相关性,推测 AgAPXs 可能参与了芹菜抵御高温的调控过程。本研究初步鉴定并提供了芹菜 APX 基因家族成员信息,为今后进一步探索芹菜 APX 基因功能提供了重要的研究基础。

关键词:芹菜;APX;系统进化;顺式元件;高温胁迫应答

中图分类号:S636.3;Q945.78 **文献标志码:**A

Identification and expression analysis of APX gene family in celery (*Apium graveolens* L.)

DU Jiageng, ZHOU Jin, LI Xiaoyan, ZHANG Ying, WU Limei, LI Mengyao
(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: Ascorbate peroxidase (APX) is one of the important antioxidant enzymes in plant reactive oxygen species metabolism and plays an important role in plant resistance to oxidative stress. In this study, bioinformatics was used to identify and analyze APX gene family members in celery genome, and the expression of AgAPXs under high temperature stress was verified and analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), which provided a basis for participation of celery APX gene in the regulation mechanism of high temperature stress. Results showed that a total of 9 APX genes were systematically identified from celery, which were randomly distributed on 5 chromosomes, and gene fragment duplication occurred. Most genes were located in the cytoplasm. Phylogenetic analysis showed that the AgAPX gene family could be divided into three subtypes, and members of each subtype shared similar gene structures and motifs. Promoter cis element analysis showed that most AgAPX genes contain a variety of cis elements related to growth and development, plant hormones and stress. Under high temperature stress, the APX activity of celery increased. qRT-PCR analysis showed that AgAPXs were differentially expressed under high temperature treatment at different times, were consistent with the transcriptome expression abundance. The expression of AgAPX2, AgAPX3, AgAPX4, AgAPX5 and AgAPX7 was significantly correlated with the activity of APX, which could be speculated that this gene was involved in the regulation of celery tolerance to high temperature. The results preliminarily identified and provided information on the members of celery APX gene family, which provided an important research basis for further research on the function of celery APX gene in the future.

收稿日期:2022-11-01

修回日期:2023-02-28

基金项目:国家自然科学基金项目(32002027);四川省自然科学基金项目(2022NSFSC1674)

作者简介:杜佳庚(2000-),男,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为蔬菜逆境分子生物学。E-mail:jiageng_du@163.com

通信作者:李梦瑶(1990-),女,湖北荆门人,副教授,主要从事蔬菜分子生物学研究。E-mail:limy@sicau.edu.cn

Keywords: *Apium graveolens* L.; APX; system evolution; cis-element; high temperature response

活性氧(ROS)是植物体内一类氧的单电子还原产物,其过量积累后,会通过攻击植物体内蛋白造成危害,还能引起细胞质膜损伤、细胞死亡及代谢障碍等不可逆的伤害^[1]。高温、干旱、盐碱等逆境环境会刺激 ROS 的产生,从而引发植物体内一系列压力反应。抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)是参与植物活性氧代谢的重要抗氧化酶,在植物生长发育过程中发挥着重要作用^[2]。APX 可催化底物过氧化氢(H_2O_2)形成 O_2 和 H_2O ,以保护植物免受 H_2O_2 过度积累造成的氧化损伤。因此,APX 在植物中的氧化还原稳态和清除 ROS 方面起着至关重要的作用^[3]。有研究表明,在转入 *TiAPX* 基因后,烟草种子萌发期 APX 活性得到增强,种子萌发期的耐热性和耐旱性也有所增加^[4]。高温胁迫下紫花苜蓿的 APX 活性相较于正常生长处理大幅度提高,且 *CytAPX* mRNA 转录量也大幅度增加^[5]。此外,高温胁迫处理后,萝卜幼苗 *RsAPX2* 的表达量显著上升,其相应的 APX 活性也有所提高^[6]。可见,APX 与植株对不同类型逆境的响应有较强的相关性。

抗坏血酸过氧化物酶是一种由多基因家族成员编码的蛋白酶,该家族根据蛋白质的亚细胞定位在植物中分为 4 类,即细胞质型、叶绿体型、线粒体型和过氧化物酶体型^[7]。目前为止,APX 基因已经在多个物种中进行了成员鉴定,如拟南芥中有 8 个 APX 基因、水稻中有 8 个 APX 基因、玉米有 8 个 APX 基因、番茄有 7 个 APX 基因,且多项研究证实这些基因广泛参与逆境应答^[8-11],但在芹菜上尚未见 APX 基因家族成员系统鉴定和功能分析的相关报道。

芹菜(*Apium graveolens* L.)也称旱芹,是伞形科芹属重要的 2 年生蔬菜作物,其营养丰富,含有较多的钙、磷、铁及维生素 A、维生素 C、维生素 P 等,对预防高血压、动脉硬化等疾病十分有益。芹菜喜冷凉,不耐高温,35℃ 以上的高温环境便会损害其生理生化代谢,导致根系无法正常生长,经济价值大幅降低^[12]。APX 在多个物种中被鉴定出参与重要的生物学重要过程,其可能也是芹菜应答高温胁迫的关键候选基因,但目前 APX 基因成员在芹菜上的研究较为有限。芹菜全基因组的测序完成成为分析芹菜 APX 家族成员提供了重要的数据基础。基于此,本研究利用生物信息学的方法鉴定芹菜 APX 基因家族成员,通过对其基因家族成员基因结构及系统进化等进行分析,同时检测基因家族成员在高温胁

迫下的表达情况,以期为研究芹菜 APX 基因(*AgAPX*)参与高温胁迫的调控机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 *AgAPX* 基因的筛选与鉴定

芹菜蛋白序列从已公开发表的两份芹菜基因组数据(<http://apiaceae.njau.edu.cn/celerydb>^[13]和<http://celerydb.bio2db.com/>^[14])中下载,建立本地 blast 数据库。从 Pfam 数据库中(<http://pfam.xfam.org/>)下载 APX 保守结构域种子文件(PF06200),并采用 HMMER 软件从芹菜蛋白序列中搜索 APX 蛋白序列,去除重复和多余信息,采用 NCBI-CDD 和 Pfam(http://pfam.xfam.org)进行 APX 结构域的进一步确认^[15]。采用 TargetP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)和 WOLF PSORT(<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>)对 APX 进行亚细胞定位分析。通过 ExPASy 网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)对芹菜 APX 蛋白序列进行理化性质分析等。

1.2 *AgAPX* 基因家族系统进化及种间共线性分析

从拟南芥基因组网站(<https://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥的 APX 蛋白序列,从水稻基因组网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)下载水稻的 APX 蛋白序列。使用默认设置的 ClustalX(v.2.1)对 APX 氨基酸序列进行多序列联配,并利用 MEGA6.06 软件采用邻接法(NJ)构建了系统进化树,校验参数 boot strap 设置为重复 1000 次^[16]。伞形科植物的基因组序列和注释分别从胡萝卜数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)和香菜数据库(<http://cgdb.bio2db.com/>)中获得。利用 MCSanX 软件对物种之间的共线性关系进行分析,并使用 TBtools 软件对结果进行可视化。

1.3 *AgAPX* 基因家族染色体定位及顺式元件分析

芹菜基因组信息和 *AgAPXs* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子序列从芹菜基因组数据库中获得,使用 MapInspect(<http://mapinspect.software.informer.com>)软件构建 APX 家族成员的染色体位置分布图,使用 PlantCARE 网页版软件鉴定(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)顺式作用元件。

1.4 *AgAPX* 基因家族基因结构和保守基序分析

AgAPX 基因内含子和外显子的结构分析通过比对基因序列信息与编码序列信息,登录 GSDS(ht-

tp://gsds.cbi.pku.edu.cn/) 网页版软件进行绘制。利用在线网站 MEME (<http://meme-suite.org>) 对芹菜 *APX* 家族成员进行 motif 分析^[17], 输出的结构域数目最大为 15, 参数设定保守基序 (motif) 大小为 10~100 aa, 结果文件使用 TBtools 软件可视化。

1.5 转录表达丰度分析和荧光定量验证

芹菜高温胁迫的转录组测序数据由本课题组完成。采用 FPKM 值来反映 *AgAPXs* 基因在不同样品中的表达丰度, *AgAPXs* 基因表达热图使用 TBtools 构建。本试验于 2022 年 3 月于四川农业大学园艺学院实验教学基地进行, 选取芹菜热敏感型品种‘绿领黄心芹’于 20℃ 黑暗条件下催芽, 种子露白后播种至穴盘中, 当芹菜幼苗长出 2~3 片真叶时, 将健壮幼苗移栽至 10 cm 口径营养钵中, 露天常规管理。待其生长 30 d 后在 38℃ 下进行高温处理, 设置 1 个对照 CK (0 h) 和 3 个不同时间段 (4、12、24 h) 的高温胁迫处理, 处理结束后, 将植株的叶片与叶柄混合取样, 使用植物总 RNA 提取试剂盒 (深圳市艾伟迪生物科技有限公司) 提取芹菜 RNA, 使用逆转录试剂盒 (北京擎科生物科技有限公司) 将 RNA 反转获得芹菜 cDNA。qRT-PCR 采用 Bio-Rad Real-time PCR System 和 Bio-Rad CFX Manager 进行。

根据芹菜 *APX* 基因序列, 设计荧光定量引物 (表 1), 以反转录获得的 cDNA 稀释 10 倍作为模板, 荧光定量反应体系按照试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 说明书配制, 反应条件设定: 95.0℃ 预变性 1 min, 95.0℃ 10 s, 58.0℃ 15 s, 39 个循环, 所有设定保存后运行程序, 每个样品设 3 次重复。以芹菜 *AgActin* 基因作为内参, 相对定量计算公式采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta CT = CT(\text{目标基因}) - CT(\text{AgActin})$ 。

1.6 APX 活性测定

APX 活性测定参考 Nakano 等^[18] 的方法, 取新鲜叶片 0.5 g 加 5 mL 酶提取液冰浴研磨, 4℃ 下 10 000 r · min⁻¹ 离心 20 min。在 3 mL 反应液中加入 0.3 mL 酶液和 50 μL H₂O₂ 启动反应。室温条件下测定混合液在 290 nm 波长下的吸光值, 每 10 s 测定 1 次, 总共测定 1 min OD 值变化量, 以不加 H₂O₂ 作为对照。以室温下每分钟氧化 1 μmol AsA 的酶量作为 1 个酶活性单位 (U), 在测定时间内 H₂O₂ 本身对 AsA 氧化作用极小, 故忽略不计。

1.7 数据统计与分析

使用 Excel 2020 整理试验数据, 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 荧光定量中引物序列

Table 1 Primer sequences in qRT-PCR

基因名称 Gene	正向引物 Sense Primer	反向引物 Anti-sense Primer
<i>AgActin</i>	AGAAGTCTGTTCACGCCGTCTT	CGAACCCACCACTGAGCACTATGTT
<i>AgAPX1</i>	GTGCTACTGCTGTGGAGGATGC	AGCCCGTTCGGTTCCTGGTCTT
<i>AgAPX2</i>	CCCTTCACCCAGTCTGCTATG	ATAACGTCACGTCCTGCCGAAGC
<i>AgAPX3</i>	GTGGCCAGTTCCTGTGGTTAC	CTCTCTCTCTCTCTCTGTCATT
<i>AgAPX4</i>	TGTGTCTCCGTGTGATGCTTCGT	GCCTTCTACTGGTGGCTCTGA
<i>AgAPX5</i>	TGGTGTAGTTGCCCTGGAGGTT	ACCCAGATCCTCTCTGTGACA
<i>AgAPX6</i>	GCCGCTTGCTGATGCTACTT	GCCTTCTTCTGCCAGTCAAG
<i>AgAPX7</i>	GCCGCTTGCTGATGCTGAA	AACGGTCTTGTGACACGAACC
<i>AgAPX8</i>	CAGGACTGTGTCGGTTGAGGT	TCTATCTGCGTGTGCCCTTCCC
<i>AgAPX9</i>	CCGAGGATCACGTATGCAGACC	AGCAACAGCAACTCCGACAAC

2 结果与分析

2.1 *AgAPX* 基因家族成员鉴定

基于芹菜全基因组数据, 总共鉴定出 9 个芹菜 *APX* 基因, 将其命名为 *AgAPX1*~*9* (表 2)。*AgAPXs* 编码的氨基酸数目范围为 240 (*AgAPX7*)~415 (*AgAPX1*), 分子量范围为 26309.05 (*AgAPX7*)~45295.43 Da (*AgAPX1*), 等电点值范围为 5.41 (*AgAPX6*)~9.05 (*AgAPX1*)。就氨基酸组成而言, 芳香族氨基酸平均有 27 个, 脂肪族氨基酸平均有 60 个; 碱性氨基酸和酸性氨基酸平均占比分别为 14% 和 10%。所有 *AgAPX* 蛋白的 GRAVY 值为负, 表明它们都是亲水性蛋白。同时, 根据亚细胞定位分析发现大多数基因主要位于细胞质中, 还有少部分分布在线粒体和叶绿体中。

2.2 *AgAPX* 基因的系统发育和聚类分析

为了分析芹菜中 *APX* 基因家族的进化关系, 选择了两种模式植物拟南芥和水稻的 *APX* 基因进行系统发育分析。系统发育树分析显示 (图 1), 25 个 *APX* 基因分为 I、II 和 III 共 3 个亚族, I 亚族所含有的 *APX* 基因数目最多 (12 个), 其中芹菜 3 个、水稻 4 个、拟南芥 5 个; *APX* 基因家族成员最少的是 III 亚族 (5 个), 包含 2 个芹菜、2 个水稻和 1 个拟南芥 *APX* 基因; 而 II 亚族分别含有 4 个芹菜、2 个水稻和 2 个拟南芥 *APX* 基因。此外, 从进化树可以发现, *AgAPX4* 和 *AgAPX5* 聚为一支, *AgAPX6* 和 *AgAPX7* 聚为一支, 显示出较短的进化距离。与水稻和玉米的 *APX* 基因相比, 芹菜的 *APX* 基因在系统发育上与水稻的亲缘关系更近, 这表明 *AgAPX* 和 *OsAPX* 之间存在功能相似性。

表 2 芹菜 APX 基因家族成员基本信息

Table 2 Basic information of APX gene family members in celery

基因名称 Gene	Locus ID_1	Locus ID_2	氨基酸 数目 Amino acids	脂肪 族氨 基酸 Aliphatic I, L, V	芳香 族氨 基酸 Aromatics F, W, Y	碱性氨 基酸 Positive amino acids	酸性 氨基酸 Negative amino acids	等电点 pI	氨基酸 大小 Molecular weight /Da	亚细胞定位 Subcellular localization WoLF PSORT /TargetP	蛋白疏水性 预测 Proteingrand average hydrophobicity (GRAVY)
<i>AgAPX1</i>	Agr15838	Ag3G01076.1	415	69	36	48	55	9.05	45295.43	chlo/-	-0.413
<i>AgAPX2</i>	Agr22072	Ag1G01694.1	346	73	27	37	39	5.71	37771.00	chlo/-	-0.234
<i>AgAPX3</i>	Agr05352	Ag7G01910.1	321	78	37	38	34	8.74	35046.42	extr/-	-0.095
<i>AgAPX4</i>	Agr27054	Ag6G02306.1	250	52	21	30	35	6.06	27630.54	cyto/mito	-0.351
<i>AgAPX5</i>	Agr18688	Ag11G04265.1	250	50	22	28	35	5.64	27523.31	cyto/mito	-0.360
<i>AgAPX6</i>	Agr40290	AgUnG01618.1	250	50	23	28	37	5.41	27725.46	cyto/mito	-0.378
<i>AgAPX7</i>	Agr38012	Ag11G03242.1	240	52	20	29	30	6.60	26309.05	cyto/-	-0.318
<i>AgAPX8</i>	Agr28389	Ag7G01815.1	287	62	26	38	37	7.74	31654.11	cyto/mito	-0.301
<i>AgAPX9</i>	Agr17929	Ag3G01502.1	280	57	28	34	38	6.09	31280.18	cyto/-	-0.454
平均值 Average			293	60	27	34	38	6.78	32248.39		-0.323

注: Locus ID_1 数据来源于 <http://apiaceae.njau.edu.cn/celerydb>; Locus ID_2 数据来源于 <http://celerydb.bio2db.com/>; chlo 表示叶绿体; extr 表示细胞外基质; cyto 表示细胞质; mito 表示线粒体; - 表示任何其他位置。

Note: Locus ID_1 data from <http://apiaceae.njau.edu.cn/celerydb>; Locus ID_2 data from <http://celerydb.bio2db.com/>; Chlo means chloroplast; Extr means extracellular matrix; Cyto means cytoplasm; Mito means mitochondria; - means any other location.

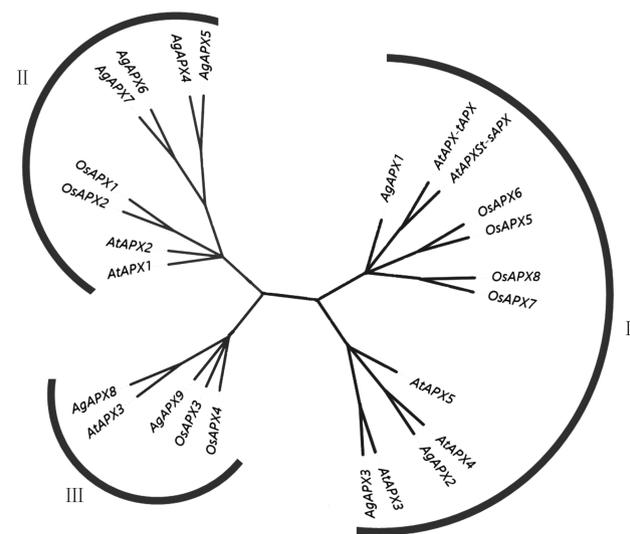


图 1 芹菜 *AgAPX*、拟南芥 *AtAPX* 和 水稻 *OsAPX* 基因系统进化树分析

Fig.1 Analysis of homology and collinearity among *AgAPX*, *AtAPX* and *OsAPX*

2.3 *AgAPX* 基因家族基因结构及保守基序分析

基因结构分析显示(图 2), 序列相似性更高的 *AgAPXs* 在结构上更相似, 如属于 II 亚族的 *AgAPX4* 和 *AgAPX5* 在基因编码区域长度相似, 结构也相似; 同时与 I 亚族相比, II 和 III 亚族中 *AgAPXs* 的基因结构更为保守。所有 *AgAPX* 基因都包含了 Motif 2, 7 个 *AgAPX* 基因具有基序 Motif 3、Motif 4、Motif 7。位于同一亚族的 *AgAPX* 基因包含相似的基序, 例如

同属于 II 亚族的 *AgAPX4*、*AgAPX5*、*AgAPX6*、*AgAPX7* 都具有 Motif 6、Motif 2、Motif 1、Motif 3、Motif 5、Motif 7、Motif 4、Motif 11。外显子-内含子分析表明, 序列相似性更高的 *AgAPXs* 显示出相似数量的外显子和内含子, 例如 *AgAPX4*、*AgAPX5* 和 *AgAPX6* 都包含数量相等的 9 个内含子。*AgAPX7* 和 *AgAPX9* 所包含的内含子最少(6 个); *AgAPX1* 含有的内含子数量最多(11 个)。

2.4 *AgAPX* 的染色体定位分析

在 9 个芹菜 *APX* 基因中, 8 个基因在 5 条染色体上呈现不均匀分布, 另外 1 个位于未组装到染色体的重叠群上; 其余染色体不含芹菜 *APX* 基因(图 3)。染色体 01 和 06 均只含有 1 个芹菜 *APX* 基因, 染色体 03、07、11 均含有 2 个 *APX* 基因。其中 *AgAPX1*、*AgAPX7*、*AgAPX9* 位于染色体前端, 其他 *APX* 基因位于染色体后端, *AgAPX8*、*AgAPX3* 同时位于 7 号染色体后端。为了探讨 *AgAPXs* 基因在进化中受到了何种选择, 使用 K_a/K_s Calculator 软件计算了非同义突变频率(K_a)与同义突变频率(K_s)比值(表 3)。前人研究表明如果 $K_a/K_s > 1$, 则认为有正选择效应; 如果 $K_a/K_s = 1$, 则认为存在中性选择; 如果 $K_a/K_s < 1$, 则认为有纯化选择作用^[9]。本研究发现(表 3), 芹菜 *APX* 基因家族中的 4 对基因的 K_a/K_s 值介于 0~0.4, 说明这些基因在进化过程中受到了较强的纯化选择作用, 表明这些基因对可能有相同的功能。

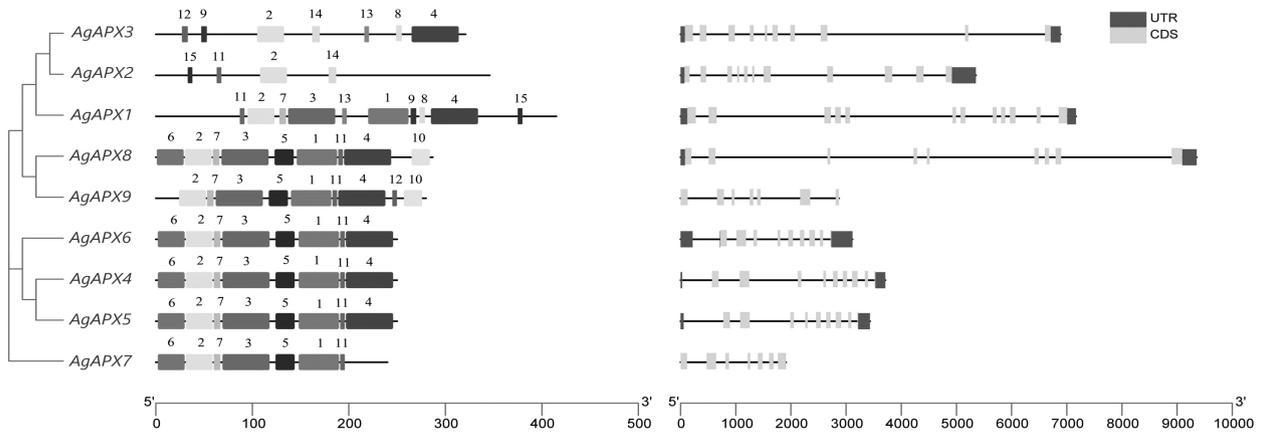


图 2 芹菜 APX 基因家族基因结构及保守基序

Fig.2 Gene structure and conserved motif of celery APX gene family

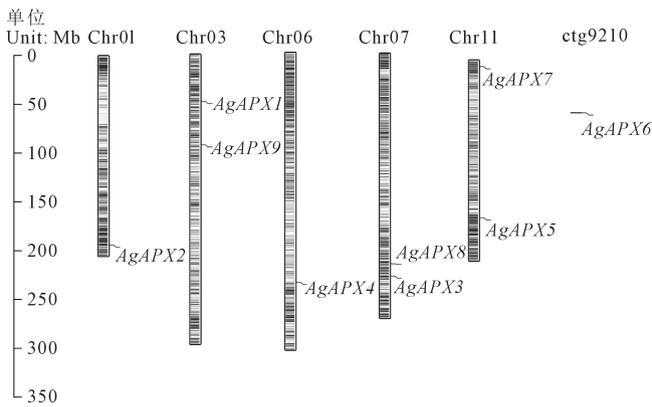


图 3 芹菜 APX 基因家族染色体定位

Fig.3 Chromosome localization of APX gene family in celery

表 3 *AgAPX* 中旁系同源基因对 K_a 和 K_s 值Table 3 K_a and K_s values of paralogous gene pairs of *AgAPX*

序列 1 Seq_1	序列 2 Seq_2	非同义 突变率 K_a	同义突 变率 K_s	突变率 比值 K_a/K_s	重复类型 Duplicate type
<i>AgAPX1</i>	<i>AgAPX3</i>	0.8081616	3.048368699	0.265112813	Segmental
<i>AgAPX2</i>	<i>AgAPX3</i>	0.846700215	2.470016606	0.342791305	Segmental
<i>AgAPX8</i>	<i>AgAPX9</i>	0.105470193	0.802850380	0.131369674	Segmental
<i>AgAPX4</i>	<i>AgAPX5</i>	0.090753397	0.753151953	0.120498124	Segmental

2.5 启动子顺式元件分析

启动子顺式元件作为转录因子结合位点发挥作用,并在植物生长发育、植物响应激素处理和非生物胁迫的转录调节中发挥重要作用^[19]。本研究分析了翻译起始位点 2 000 bp 上游序列(启动子区域)中的顺式调控元件,鉴定了响应植物生长发育、非生物胁迫和植物激素相关的顺式元件,以探索基因的调控机制。如图 4 所示,APX 基因家族中有大量与逆境响应相关的元件,出现频次最多的是 MYB (逆境胁迫)27 次、MYC (非生物胁迫)23 次和 ARE

(厌氧反应)18 次,表明 *AgAPXs* 基因在植物遭受逆境时具有重要作用。除与逆境相关的顺式响应元件外,参与植物生长发育的元件 AE-box、TCT-motif、BOX 4、GA-box 在 APX 基因家族中含量最多,其中除了 *AgAPX5*,其他 APX 基因都含有 BOX 4 启动原件,8 个基因共包括 25 个元件。激素相关元件中,共 21 个乙烯响应元件(ERE)、18 个 ABA 响应元件(ABRE)、6 水杨酸响应元件(TCA-element)和 3 个赤霉素响应元件(TATC-box)在 *AgAPXs* 基因中出现。鉴定结果表明 APX 基因家族在植物生长发育过程中,尤其是在在响应非生物胁迫方面发挥着尤为重要的作用。

2.6 芹菜、胡萝卜和香菜的共线性分析

为深入研究 *AgAPX* 基因家族成员之间的遗传相关性,对芹菜、胡萝卜和香菜的共线性关系进行了共线性分析。如图 5 所示,*AgAPX* 基因与同科植物胡萝卜、香菜都有 7 个同源基因,并且在胡萝卜和香菜的 5 条染色体上都存在共线性关系。3 个物种中,除 *AgAPX1* 和 *AgAPX7* 外,位于芹菜不同染色体上的 *AgAPX* 基因与胡萝卜、香菜的 APX 基因都存在共线性关系。例如,芹菜 11 号染色体上的 *AgAPX5* 分别与 3 个 *DcAPX*、1 个 *CsAPX* 基因共线性。芹菜与胡萝卜、香菜基因组之间都有 7 对共线 APX 基因,表明 *DcAPX*、*CsAPX* 和 *AgAPX* 存在片段重复,大部分 APX 基因同源。以上结果说明同属于伞形科作物的胡萝卜、芹菜、香菜基因组具有大量的保守区域及同源基因对,在该基因进化的过程中存在基因复制,且进化过程中非常保守。

2.7 *AgAPX* 基因在高温胁迫中的转录表达分析

为探究 *AgAPX* 基因家族不同成员在高温胁迫下的潜在功能,基于不同高温胁迫时间的转录组数

		AgAPX1	AgAPX2	AgAPX3	AgAPX4	AgAPX5	AgAPX6	AgAPX7	AgAPX8	AgAPX9	总计 Total	
非生物和生物胁迫 Abiotic and biotic stress	AE-box	3	0	0	0	2	1	2	1	0	9	
	TCT-motif	1	0	2	0	1	1	1	1	1	8	
	Box 4	4	2	7	2	0	4	1	1	4	25	
	GA-motif	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3	
	G-box	2	0	1	0	2	0	2	1	1	9	
	I-box	0	0	0	0	1	1	1	0	1	4	
	l-box	1	0	0	0	1	3	0	0	1	6	
	MRE	1	0	0	2	2	0	0	0	0	5	
	TCCC-motif	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	
	ATC-motif	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
	GTGGC-motif	0	0	2	0	1	0	0	0	0	3	
	Spl	1	0	0	0	0	1	0	1	0	3	
	chs-CMA2a	2	0	1	0	0	0	0	0	0	3	
	chs-CMA1a	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	
	AT1-motif	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
	ABRE	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
	AuxRR-core	1	0	1	0	1	0	1	0	3	7	
	激素响应 Hormone responsive	TGACG-motif	2	1	3	1	4	1	2	2	2	18
		CGTCA-motif	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
ERE		0	0	0	2	0	0	0	1	0	3	
P-box		0	0	0	2	0	0	0	1	0	3	
TATC-box		1	0	6	0	0	5	2	2	5	21	
TCA-element		0	1	0	1	1	0	0	0	2	5	
TATC-box		0	1	0	0	0	0	0	2	0	3	
TATC-box		0	2	1	0	2	0	0	0	0	5	
GARE-motif		0	1	0	0	0	0	0	2	0	3	
ARE		0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	
植物生长发育 Plant growth and development		DRE core	1	2	1	1	1	0	4	2	0	12
	Letter	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
	MBS	0	1	0	1	0	0	0	2	0	4	
	STRE	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	
	TC-rich repeats	1	1	0	2	0	1	1	0	0	6	
	Wbox	1	2	0	1	0	0	1	2	0	7	
	Wbox	3	1	2	4	3	2	0	3	0	18	
	WUN-motif	1	1	1	2	0	2	0	1	0	8	
	MYB	2	4	2	1	5	2	6	2	3	27	
	MYC	3	0	1	2	3	3	3	6	2	23	

注:图中颜色深浅表示数量的多少,颜色浅表示含有数量少或无,颜色深表示数量多。

Note: The depth of color in the figure represents the amount, with lighter colors indicating a smaller or zero quantity, and darker colors indicating a larger quantity.

图 4 *AgAPX* 基因启动子顺式作用元件图

Fig.4 Analysis of cis-acting regulatory elements in *AgAPX* promoter

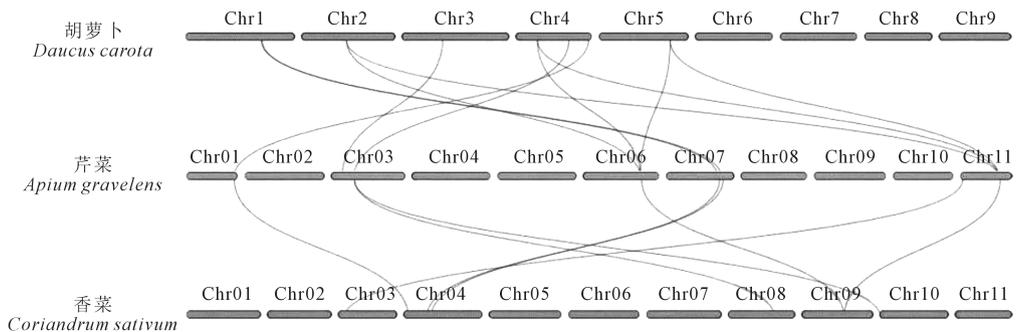


图 5 芹菜、胡萝卜和香菜的共线性分析

Fig.5 Collinearity analysis of celery, carrot and coriander

据分析了 *APX* 基因家族的表达模式(图 6)。结果显示, *AgAPX* 基因家族的 9 个基因均检测到相关表达水平。这 9 个基因可分为 3 类, *AgAPX2*、*AgAPX3*、*AgAPX5*、*AgAPX7* 单独聚为一类,他们在无高温胁迫条件下都具有高表达水平,随着高温胁迫时间的延长,其表达量开始下降; *AgAPX4* 基因的表达量与这

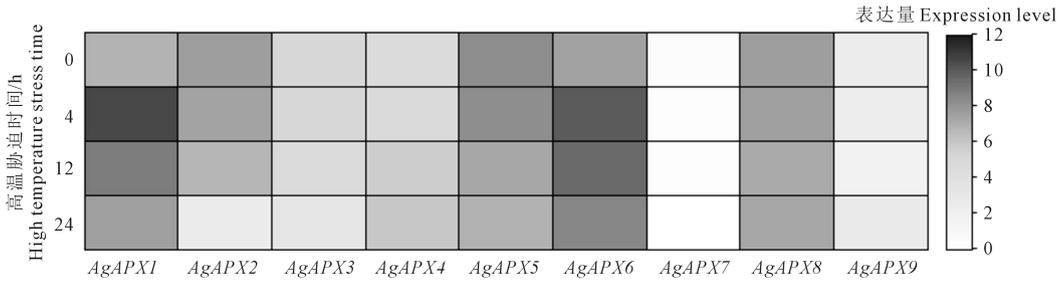
4 个基因的表达量呈相反变化趋势,即,在无高温胁迫时,其表达量较低,随着高温胁迫时间的加长, *AgAPX4* 基因的表达量开始增加,并且在响应高温方面具有特殊性质; *AgAPX* 基因家族成员的基因表达量则随高温胁迫时间增加而发生相应变化,说明 *AgAPX* 基因家族成员广泛参与了芹菜响应高温胁迫

迫的应答。

2.8 qRT-PCR 验证 *APX* 基因在高温胁迫下的表达趋势

为验证芹菜 *APX* 家族基因 (*AgAPX1* ~ *AgAPX9*) 在高温胁迫下的应答模式,采用 qRT-PCR 鉴定了这 9 个基因在高温胁迫状态下的表达水平。如图 7 所示,*APX* 家族成员对于高温处理都有一定程度的响应;*AgAPX4* 基因在高温处理后,表达水平持续增加(图 7D);*AgAPX2*、*AgAPX3*、*AgAPX5*、*AgAPX7* 基因

在高温处理后,表达水平持续减少(图 7B、C、E、G);*AgAPX1* 和 *AgAPX6* 基因在高温处理后 4 h 时高表达,随着处理时间的增加,在 12 h 时表达有所下调(图 7A、F);*AgAPX8* 和 *AgAPX9* 在处理 4 h 和 12 h 后表达量持续下降,但到处理 24 h 时,表达量开始增加(图 7H、I)。同转录组数据比较,荧光定量验证结果与转录表达丰度表现出较好的一致性,进一步表明 *APX* 基因家族可能参与了高温胁迫的应答。

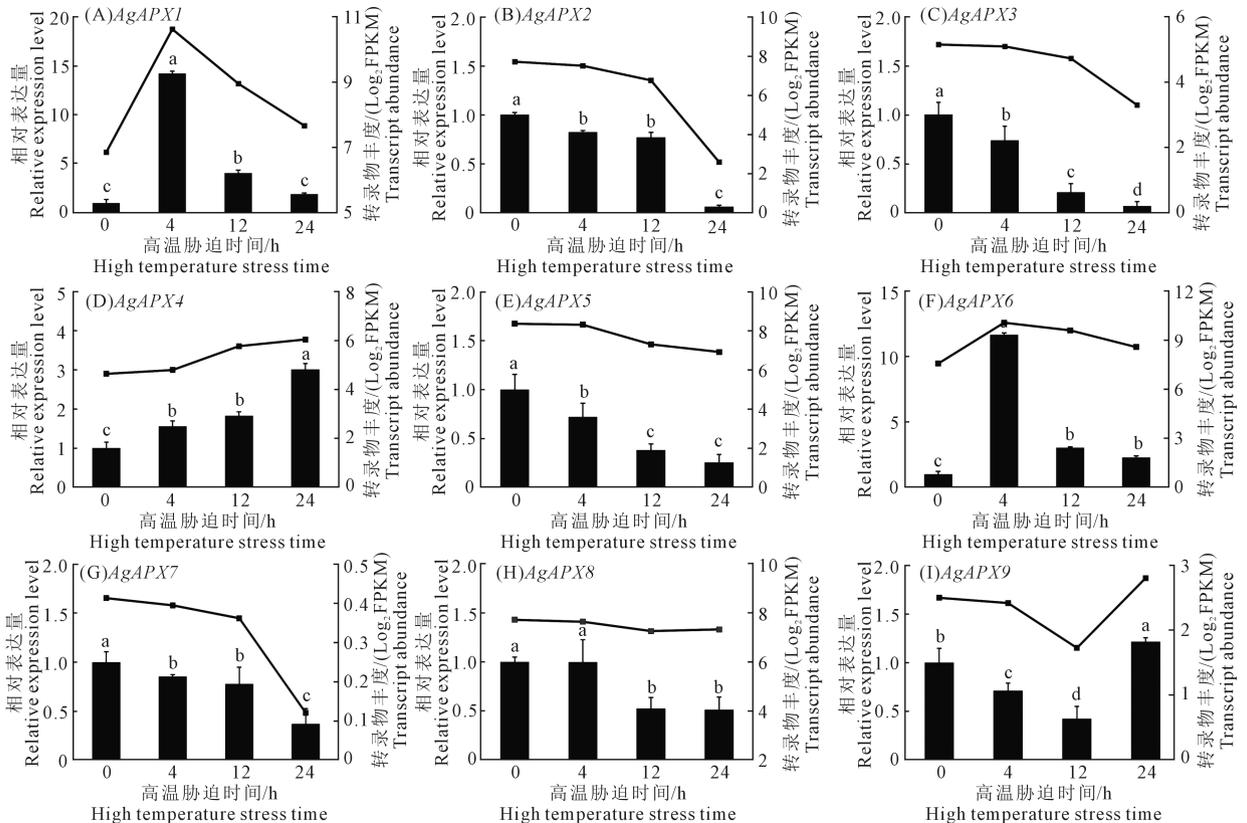


注:基因转录表达水平采用 Log_2 FPKM 表示。颜色越深表示表达量越高,颜色越浅表示表达量越低。

Note: The expression level of gene transcription was expressed using Log_2 FPKM. The darker the color, the higher the expression level, while the lighter the color, the lower the expression level.

图 6 *AgAPXs* 基因在不同时期高温胁迫下的表达谱分析

Fig.6 Expression profile analysis of *AgAPXs* genes under high temperature stress at different stages



注:柱状部分为基因相对表达量,折线部分为转录丰度。柱状图中不同字母表示在 0.05 水平上差异显著,下同。

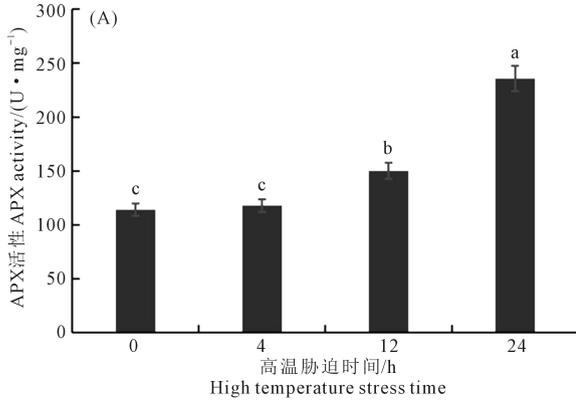
Note: The columnar part is the relative expression of genes, and the broken part is the transcription abundance. Different letters on the bar chart indicate significant differences at the 0.05 level. The same below.

图 7 *AgAPXs* 基因在不同时期高温胁迫下的相对表达量

Fig.7 Relative expression levels of *AgAPXs* genes under high temperature stress at different stages

2.9 高温胁迫下芹菜 APX 活性的变化及与 *AgAPXs* 基因的相关性

由图 8A 可知,与 0 h 相比,高温处理 4 h 的 APX 活性变化并不显著。高温处理 12 h 和 24 h, APX 活性分别达到 $150 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $235.71 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 分别较对照增加了 31.42% 和 106.51%, 表明在高温胁迫下,芹菜可以通过增加 APX 活性来维持体内较



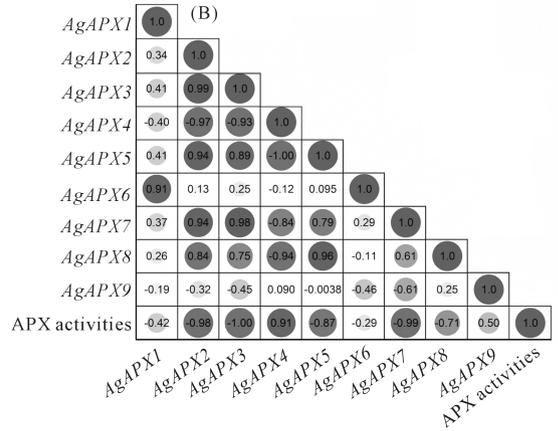
注:(A)为 APX 活性在不同时期高温胁迫下的变化;(B)为 *AgAPXs* 基因表达量与 APX 活性之间的相关性分析,图中数字表示两者的相关系数。

Note: (A) represents the changes in APX activity under high temperature stress at different stages; (B) represents the correlation analysis between *AgAPXs* gene and APX activity, and the numbers in the figure represent the correlation coefficients between *AgAPXs* expression level and APX activity.

图 8 高温胁迫下芹菜 APX 活性的变化与 *AgAPXs* 表达量的相关性分析

Fig.8 Correlation analysis between the change of APX activity and the expression of *AgAPXs* gene in celery under high temperature stress

低的 H_2O_2 浓度,进而缓解高温胁迫对自身造成的损伤。由图 8B 可知,*AgAPX4* 表达量和 APX 活性呈显著正相关,*AgAPX2*、*AgAPX3*、*AgAPX5*、*AgAPX7* 表达量和 APX 活性呈显著负相关,说明这些基因的表达可以调节 APX 的活性,进而调控芹菜植株在高温下的应答机制。



3 讨论

APX 是植物体中重要的氧化酶,在多种非生物胁迫(如干旱、高温、高盐和重金属胁迫)的响应中发挥着重要作用^[20]。前人已经从水稻、玉米、拟南芥、番茄等植物中分别鉴定出 7~8 个 APX 基因家族成员^[6-9];本研究在芹菜中鉴定出了 9 个 APX 基因家族成员,基因数量和上述物种相似,可能是由于 APX 基因在这些物种中有着相似的功能,并且执行着相近的 APX 基因调控机制。前人对葡萄 APX 基因家族的研究发现,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 *VvAPX3* 和 *VvAPX4*,含有相同外显子数目并且 motif 在分布顺序上具有一定的保守性^[21]。本研究发现,芹菜 APX 基因家族中也出现了类似的现象,如 *AgAPX4* 和 *AgAPX5* 被分为同一亚族,它们之间具有数量相同的内含子,motif 在分布顺序上具有极强的保守性(图 1、2)。

结合前期转录组数据(图 6)发现, I、II 和 III 亚族均由在高温胁迫下具有高表达水平和低表达水平的基因组成。此外,各个亚族基因家族成员的氨

基酸性质存在差异,同一亚族的成员在各类氨基酸数目、氨基酸大小和亚细胞定位性质上具有相似性,不同亚族成员间差异较大(表 2),在毛竹中也得出类似的研究结果^[22]。本研究通过染色体定位分析发现,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 *AgAPX3* 和 *AgAPX8* 都位于 07 染色体上(图 3),但是分别属于 2 个亚族(图 1),这可能是由于在长期进化过程中 *AgAPXs* 的功能出现了分化^[23]。

植物在受到逆境胁迫后,会启动自我保护模式,主要表现为应激基因的表达,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^[24]。本研究通过对 *AgAPXs* 各家族成员启动子上游 2000 bp 的序列分析,发现各基因家族成员含有多个光照、激素、高温、干旱胁迫相关的调控元件,如 Box4、G-box、CGTCA-motif、ABRE、ARE 等,这些顺式作用元件的存在表明该基因家族多个成员均可能参与了干旱、高温等逆境胁迫响应。在毛果杨中的 APX 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^[25]。

高温是一种会严重影响植物生长发育的非生物环境胁迫^[18], *APX* 基因在高温胁迫下的表达水平变化是目前研究的重点。高温胁迫可能会改变由 ROS 积累介导的生化途径和生理反应^[26]。前人研究表明, *APX* 基因家族成员转录水平的快速提高会维持细胞质中 *APX* 的高活性, 以保护细胞成分免受 ROS 诱导的非生物胁迫应激氧化损伤^[13]。在高温胁迫诱导下, 拟南芥的 *APX* 基因表达量出现显著变化, 其中 *AtAPX1*、*AtAPX2* 和 *AtAPX6* 受热胁迫诱导表达明显^[27]。水稻在逆境胁迫条件下的 *APX* 同工酶表达量增加, 并且 *APX* 活性明显提升^[28]。本研究利用 qRT-PCR 技术检测了 9 个 *AgAPX* 基因在高温胁迫下的表达水平, 发现这些基因在高温胁迫下均有表达, 表明芹菜基因家族 3 个亚族 *APX I*、*APX II* 和 *APX III* 均能响应高温胁迫, 其中 *AgAPX2*、*AgAPX3*、*AgAPX4*、*AgAPX5* 和 *AgAPX7* 基因在高温胁迫下表达量相对于正常条件显著升高或降低; 同时 *APX* 活性在高温胁迫下明显增强, 并且和 *AgAPX2*、*AgAPX3*、*AgAPX4*、*AgAPX5*、*AgAPX7* 的表达具有显著相关性, 说明他们可能通过调控 *APX* 活性参与了对高温胁迫的应答。由于在芹菜上对 *APX* 基因成员的研究较为有限, 这些基因可能是今后研究芹菜响应高温胁迫等非生物胁迫的重要候选基因。

4 结 论

芹菜有 9 个 *APX* 基因家族成员, 分布于 5 条染色体上, 其在进化过程中具有较高的保守性, 且启动子序列中含有大量与逆境响应相关的顺式元件。高温胁迫后, 芹菜 *AgAPXs* 基因表达量出现显著变化, *APX* 活性也显著提高, 表明 *AgAPXs* 在高温胁迫应答中发挥重要作用, 为进一步深入研究 *AgAPXs* 基因在非生物胁迫下的功能提供参考依据。

参 考 文 献:

[1] DAVLETOVA S, RIZHSKY L, LIANG H J, et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 268-281.

[2] MISHRA P, BHOOMIKA K, DUBEY R S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive *indica* rice (*Oryza sativa* L.) seedlings [J]. *Protoplasma*, 2013, 250(1): 3-19.

[3] MARUTA T, SAWA Y, SHIGEOKA S, et al. Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2016, 57(7): 1377-1386.

[4] SUN W H, DUAN M, LI F, et al. Overexpression of tomato tAPX

gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress [J]. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(4): 614-620.

[5] 赵雁, 车伟光, 毕玉芬. 高温胁迫下‘德钦’紫花苜蓿 APX 活性和转录水平分析 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(7): 1611-1615.

ZHAO Y, CHE W G, BI Y F. Analysis of APX activity and transcription level in *Medicago sativa* L. ‘Deqin’ under heat stress [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(7): 1611-1615.

[6] 周娜, 郑阳, 陆景伟, 等. 高温胁迫对萝卜幼苗生长及相关基因表达的影响 [J]. *西北植物学报*, 2022, 42(7): 1161-1168.

ZHOU N, ZHENG Y, LU J W, et al. Effect of high temperature stress on growth and expression levels of related genes in radish seedling [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(7): 1161-1168.

[7] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1305-1319.

[8] 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.

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

[10] LIU Y J, YUAN Y, LIU Y Y, et al. Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(2): 183-192.

[11] NAJAMI N, JANDA T, BARRIAH W, et al. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 279(2): 171-182.

[12] LI M Y, ZHOU J, DU J G, et al. Comparative physiological and transcriptomic analyses of improved heat stress tolerance in celery (*Apium graveolens* L.) caused by exogenous melatonin [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11382.

[13] LI M Y, FENG K, HOU X L, et al. The genome sequence of celery (*Apium graveolens* L.), an important leaf vegetable crop rich in apigenin in the Apiaceae family [J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 9.

[14] PEI Q Y, LI N, BAI Y, et al. Comparative analysis of the TCP gene family in celery, coriander and carrot (family Apiaceae) [J]. *Vegetable Research*, 2021, 1: 5.

[15] FINN R D, TATE J, MISTRY J, et al. The Pfam protein families database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(S1): 281-288.

[16] TONG X L, WANG Z Y, MA B Q, et al. Structure and expression analysis of the sucrose synthase gene family in apple [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(4): 847-856.

[17] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S2): 202-208.

[18] 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.

[19] KWONG S, WOODS A E, MIRTSCHIN P J, et al. The recruitment of blood coagulation factor X into snake venom gland as a toxin: the role of promoter cis-elements in its expression [J]. *Thrombosis and*

- Haemostasis, 2009, 102(3): 469-478.
- [20] STOROZHENKO S, DEPAUW P, VAN MONTAGU M, et al. The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter[J]. Plant Physiology, 1998, 118(3): 1005-1014.
- [21] 王晗, 刘涛, 何红红, 等. 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 H, LIU T, HE H H, et al. Identification and expression analysis of APX gene family in grape[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(4): 472-484.
- [22] 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.
- SONG X L, KONG B, GAO Z M, et al. Identification and expression analysis of the APX gene family in *Phyllostachys edulis*[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2020, 28(3): 255-264.
- [23] 王海令, 曹家乐, 廖光联, 等. 毛花猕猴桃 AeAPX 基因家族鉴定与表达分析[J]. 果树学报, 2022, 39(12): 2225-2240.
- WANG H L, CAO J L, LIAO G L, et al. Identification and expression analysis of AeAPX gene family in *Actinidia eriantha* [J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(12): 2225-2240.
- [24] HADIARTO T, TRAN L S P. Progress studies of drought-responsive genes in rice[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(3): 297-310.
- [25] LENG X, WANG H Z, ZHANG S, et al. Identification and characterization of the APX gene family and its expression pattern under phytohormone treatment and abiotic stress in populus trichocarpa[J]. Genes, 2021, 12(3): 334.
- [26] 祁伟亮, 孙万仓, 马骊. 活性氧参与调控植物生长发育和胁迫应激响应机理的研究进展[J]. 干旱地区农业研究, 2021, 39(3): 69-81, 193.
- QI W L, SUN W C, MA L. Research progress of reactive oxygen species involved in regulating plant growth and development and the mechanisms of stress response[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2021, 39(3): 69-81, 193.
- [27] 李泽琴, 李锦涛, 邴杰, 等. 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 Z Q, LI J T, BING J, et al. 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.
- [28] 鲁振强. 水稻 APX 与 CAT 同工酶的功能特性及其与盐胁迫关系的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.
- LU Z Q. The studies on function and characterization of APX and CAT isoenzymes from rice and their relationship with salinity stresses [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2005.

(上接第 16 页)

- [16] 肖继兵, 刘志, 辛宗绪, 等. 基于主成分分析和隶属函数的谷子全生育期耐旱性鉴定[J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(6): 34-44.
- XIAO J B, LIU Z, XIN Z X, et al. Identification of drought tolerance in foxtail millet during its entire growth period based on principal component analysis and membership function [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2022, 40(6): 34-44.
- [17] URBAN O, HLAVÁČOVÁ M, KLEM K, et al. Combined effects of drought and high temperature on photosynthetic characteristics in four winter wheat genotypes [J]. Field Crops Research, 2018, 223: 137-149.
- [18] LIU E K, MEI X R, YAN C R, et al. Effects of water stress on photosynthetic characteristics, dry matter translocation and WUE in two winter wheat genotypes [J]. Agricultural Water Management, 2016, 167: 75-85.
- [19] 张鑫, 孔祥, 李勇, 等. 外源 ABA 对干旱条件下小麦冠层温度及光合同化物积累与分配的调控效应[J]. 麦类作物学报, 2019, 39(9): 1080-1094.
- ZHANG X, KONG X, LI Y, et al. Effect of exogenous ABA on the canopy temperature and accumulation and distribution of photoassimilates in wheat under drought conditions [J]. Journal of Triticeae Crops, 2019, 39(9): 1080-1094.
- [20] 张鑫. 外源 ABA 对花后干旱胁迫下小麦光能利用及同化物转运的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- ZHANG X. Effects of exogenous ABA on the radiation utilization and photoassimilates transportation in wheat under drought stress during post anthesis [D]. Tian: Shandong Agricultural University, 2019.
- [21] BLUM A, SHPILER L, GOLAN G, et al. Yield stability and canopy temperature of wheat genotypes under drought-stress[J]. Field Crops Research, 1989, 22(4): 289-296.
- [22] 丁彤彤, 李朴芳, 曹丽, 等. 干旱胁迫下不同基因型小麦干物质转运对产量形成的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2021, 39(6): 62-72.
- DING T T, LI P F, CAO L, et al. Effects of dry matter translocation on yield formation of wheat with different genotypes under drought stress[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2021, 39(6): 62-72.
- [23] SEMENOV M A, STRATONOVITCH P, ALGHABARI F, et al. Adapting wheat in Europe for climate change[J]. Journal of Cereal Science, 2014, 59(3): 245-256.
- [24] 李威. 拔节期干旱胁迫对冬小麦光合特性、生长发育及产量影响研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
- LI W. Effects of drought stress on photosynthesis, growth and yield of winter wheat at jointing stage [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019.
- [25] 张继波, 薛晓萍, 李楠, 等. 干旱胁迫对冬小麦水分关键期的生理特性和物质生产影响[J]. 沙漠与绿洲气象, 2019, 13(3): 124-130.
- ZHANG J B, XUE X P, LI N, et al. Effects of drought stress on physiological characteristics and dry matter production of winter wheat during water critical period[J]. Desert and Oasis Meteorology, 2019, 13(3): 124-130.
- [26] 陈斐, 王润元, 王鹤龄, 等. 干旱胁迫下春小麦干物质积累和分配及其模拟[J]. 干旱区研究, 2017, 34(6): 1418-1425.
- CHEN F, WANG R Y, WANG H L, et al. Dry matter accumulation and distribution of spring wheat under drought stress[J]. Arid Zone Research, 2017, 34(6): 1418-1425.