

DOI:10.11686/cyxb2025302

<http://cyxb.magtech.com.cn>

陈奋奇, 张金青, 禹一箭, 等. 紫花苜蓿 *AP2* 亚家族基因鉴定、生信分析及 *MsBBM* 基因克隆. 草业学报, 2026, 35(7): 117—134.

CHEN Fen-qi, ZHANG Jin-qing, YU Yi-jian, *et al.* Identification, bioinformatics analysis of *AP2* subfamily genes and *MsBBM* gene cloning in alfalfa. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(7): 117—134.

紫花苜蓿 *AP2* 亚家族基因鉴定、生信分析及 *MsBBM* 基因克隆

陈奋奇^{1,2}, 张金青^{1*}, 禹一箭¹, 李振宇¹

(1. 宁夏大学林业与草业学院, 宁夏 银川 750021; 2. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: *AP2* 亚家族转录因子属于 *AP2/ERF* 超家族, 参与调节植物生长发育的各种生物学过程。然而, 对紫花苜蓿 *AP2* 亚家族及 *BBM* 的研究未见报道。本研究基于紫花苜蓿全基因组数据, 采用 HMMER 鉴定了 10 个 *AP2* 基因, 其中仅有一个 *BBM* 基因, 对 10 个 *AP2* 成员进行生信和表达分析。结果发现, *AP2* 成员均属于不稳定、亲水的非分泌蛋白, 理化性质多样, 二、三级结构特异; 基序分析显示, *AP2* 基因具有保守性, 含有特定的结构域, 如仅 *BBM* 含有 *bbm-1* 结构域, 同时含有生长发育、植物激素响应及生物和非生物胁迫响应的顺式调控元件, 表明 *MsAP2* 成员具有调控植物生长发育和应对逆境胁迫的作用; 表达模式分析表明, *MsAP2* 在不同器官的表达具有多样性和特异性, 具有调节紫花苜蓿生长发育的潜在功能。进一步克隆 *MsBBM* 基因, 明确其编码蛋白定位于细胞核。研究结果为后续探究 *AP2* 亚家族基因在紫花苜蓿生长发育中的作用提供了参考依据, 也为揭示 *MsBBM* 基因的功能提供了研究基础。

关键词: 紫花苜蓿; *AP2* 转录因子; *BBM* 基因; 生长发育; 胁迫响应

Identification, bioinformatics analysis of *AP2* subfamily genes and *MsBBM* gene cloning in alfalfa

CHEN Fen-qi^{1,2}, ZHANG Jin-qing^{1*}, YU Yi-jian¹, LI Zhen-yu¹

1. College of Forestry and Prataculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The *AP2* subfamily transcription factors belong to the *AP2/ERF* superfamily and are involved in regulating various biological processes related to plant growth and development. However, there have been no reports to our knowledge on the *AP2* subfamily or *BBM* genes in alfalfa (*Medicago sativa*). In this study, based on whole-genome data of *M. sativa*, ten *AP2* genes were identified using HMMER, among which only one was a *BBM* gene. Bioinformatics and expression analyses were conducted on the ten *AP2* members. The results showed that all *AP2* members were unstable, hydrophilic, non-secretory proteins with diverse physicochemical properties and specific secondary and tertiary structures. Motif analysis revealed that *AP2* genes were conserved and contain characteristic domains; For instance, only the *BBM* gene possesses the *bbm-1* domain. Additionally, the promoter regions of these genes contained various *cis*-acting elements related to growth and development, plant hormone responses, and both biotic and abiotic stress responses, indicating that *MsAP2* members may play roles in regulating

收稿日期: 2025-07-17; 改回日期: 2025-09-22

基金项目: 宁夏自然科学基金(2024AAC03095)和宁夏高等学校科学研究项目(No. NYG2024-045)资助。

作者简介: 陈奋奇(1994—), 男, 甘肃平凉人, 在读博士。E-mail: 18893115958@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 18893816768@163.com

plant development and stress adaptation. Expression pattern analysis by qRT-PCR further demonstrated that *MsAP2* genes exhibit tissue-specific and diverse expression profiles, suggesting their potential functions in the growth and development of alfalfa. Further cloning of the *MsBBM* gene confirmed that its encoded protein is localized in the nucleus. These findings provide a reference for future investigations into the roles of *AP2* subfamily genes in the growth and development of alfalfa, and lay a foundation for elucidating the function of the *MsBBM* gene.

Key words: alfalfa; *AP2* transcription factor; *BBM* gene; growth and development; stress response

作为最大的转录因子家族之一, *AP2/ERF* 超家族广泛存在于植物中, 该家族成员至少含有一个约由 70 个氨基酸构成的 *AP2* 结构域^[1]。根据结构域种类和数量, *AP2/ERF* 超家族一般分为 5 个亚族: *APETALA2* 蛋白 (*APETALA2*, *AP2*)、乙烯响应因子 (ethylene responsive factor, *ERF*)、与 *ABI3/VP1* 相关 (related to *ABI3/VP1*, *RAV*)、脱水响应元件结合蛋白 (dehydration responsive element binding-protein, *DREB*) 和独立型亚族 (*Soloist*)^[2], 其中 *AP2* 亚家族含有 2 个保守的 *AP2* 结构域, 分别为 *AP2-R1* 和 *AP2-R2*^[3]。 *AP2* 亚家族蛋白可分为前模体区域、*AP2-R1*、连接区域、*AP2-R2* 和后模体区域 5 部分。一般情况下, 前模体区域包含 *euANT2* (*NNWLGFSLSPH*)、*euANT3* (*PKLEDFLGG*)、*bbm-1* (*SIGLSMIKTWLRNQP*)、*euANT5* (*LSLSMS*) 和 *euANT4* (*PRKSIDTFGQR*) 5 个保守域; 后模体区域包含 *euANT6* (*ILESSSLPIGGGAARKLKD*)、*bbm-2* (*RGWCKQEQD*)、*bbm-3* (*THNFFQP*)、*bbm-4* (*SNSVYNG*) 和 *bbm-5* (*RNLYYLSQGS*) 5 个保守基序, 其中 *bbm-1* 是 *BBM-like* 基因的特有基序^[4]。当 *AP2* 蛋白后模体区域包含 *microRNA172* 结合位点时归类为 *euAP2* 基因, 不包含时则为 *ANT* 亚组, *ANT* 亚组根据前结构域的长度及是否含有 3 个保守基序 (*euANT2/3/4*) 分为 *euANT* 和 *baseANT* 族^[5]。 *AP2* 家族基因可通过响应乙烯、赤霉素、脱落酸、细胞分裂素和生长素^[6], 直接或间接参与种子发育、花和果实的形态建成等植物生长发育的多个进程^[7-8]; 此外, *AP2* 基因在植物应对高盐、干旱、低温等非生物胁迫及病害等生物胁迫方面 also 具有重要功能^[9-11]。如水稻 (*Oryza sativa*) *AP2* 基因 *FZP* 在营养生长期通过抑制生长促进因子 *OsMADS57* 的表达抑制腋芽生长^[12]; 草莓 (*Fragaria × ananassa*) *FaTINY2* 基因可以增强转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 对盐和冷胁迫的耐受性^[13]。

Baby Boom (*BBM*) 基因是植物细胞全能型的主要调节因子, 与 *PLT2* 在促进胚胎发育及胚乳增殖方面存在功能冗余^[14]。相较于其他 *AP2* 基因, *BBM* 的研究较少, 但已证明 *BBM* 在植物胚胎发育、细胞增殖、愈伤组织生长等方面起着重要作用^[15]。研究发现, *OsBBM1* 基因受各种植物激素诱导, 具有调控水稻根和胚发育的作用, 且主要在愈伤、胚、茎和根尖分生组织等具备高度分化能力的组织器官内表达^[16]。当前, *BBM* 的功能主要在于调控植物体细胞发育、诱导孤雌生殖及提高转化率方面, 如 *BBM* 通过调控生长素合成基因 *YUC3* 和 *YUC8* 介导拟南芥体胚发生^[17]; 鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*) *BBM* 过表达促进了体细胞胚胎发生及胚性愈伤组织诱导, 而 *CRISPR/Cas9* 介导的 *BBM* 敲除则降低了体细胞胚胎发生率^[18]; 异位表达 *BBM1* 或 *BBM4* 均能成功诱导水稻孤雌生殖^[19]; 异位表达 *MdBBM1* 基因, 促进了细胞分裂, 并显著提高了转基因苹果 (*Malus domestica*) 植株的转化率^[20]。在拟南芥、油菜 (*Brassica campestris*) 和番茄 (*Solanum lycopersicum*) 卵细胞中异位表达 *BBM* 可绕过受精作用直接进行胚胎发生, 故 *BBM* 基因可用于双子叶植物的无性胚工程^[14]。另有研究发现, 降低 *TaBBMs* 的表达可促进籽粒细胞生长, 导致小麦 (*Triticum aestivum*) 籽粒增大, 粒重提高, 表明 *BBM* 是小麦籽粒大小和粒重的负调控因子^[21]。由此可见, *BBM* 基因主要调控植物的生长发育过程。

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是世界范围内最重要、最具经济价值的多年生豆科牧草, 由于蛋白质含量高和营养成分丰富、饲喂价值高、适口性好等特征, 被誉为“牧草之王”。随着基因组的测序完成和公布^[22], 紫花苜蓿多个基因家族成员已被鉴定, 如 Jin 等^[23] 鉴定到 159 个 *MsAP2/ERF* 成员, 并对其在盐、干旱和低温胁迫下的表达模式进行了分析。同样地, 温小月等^[24] 分析了 13 个响应干旱胁迫和一氧化氮 (nitric oxide, *NO*) 的 *MsAP2/ERF* 家族基因, 并表明 *MsERF07* 蛋白定位在细胞核与细胞膜中, 为后续研究紫花苜蓿 *MsERF07* 基因响应干旱胁迫的分子机制提供了研究基础。然而, 紫花苜蓿 *AP2* 转录因子在生长发育中的潜在功能及 *BBM* 基因的相关研究未见

报道。因此,本研究利用紫花苜蓿基因组,准确鉴定 *MsAP2* 基因成员,分析其在不同组织器官中的表达水平,并对 *MsBBM* 基因进行克隆和亚细胞定位(图 1),以为揭示 AP2 基因参与调控紫花苜蓿生长发育的分子机制提供研究基础。

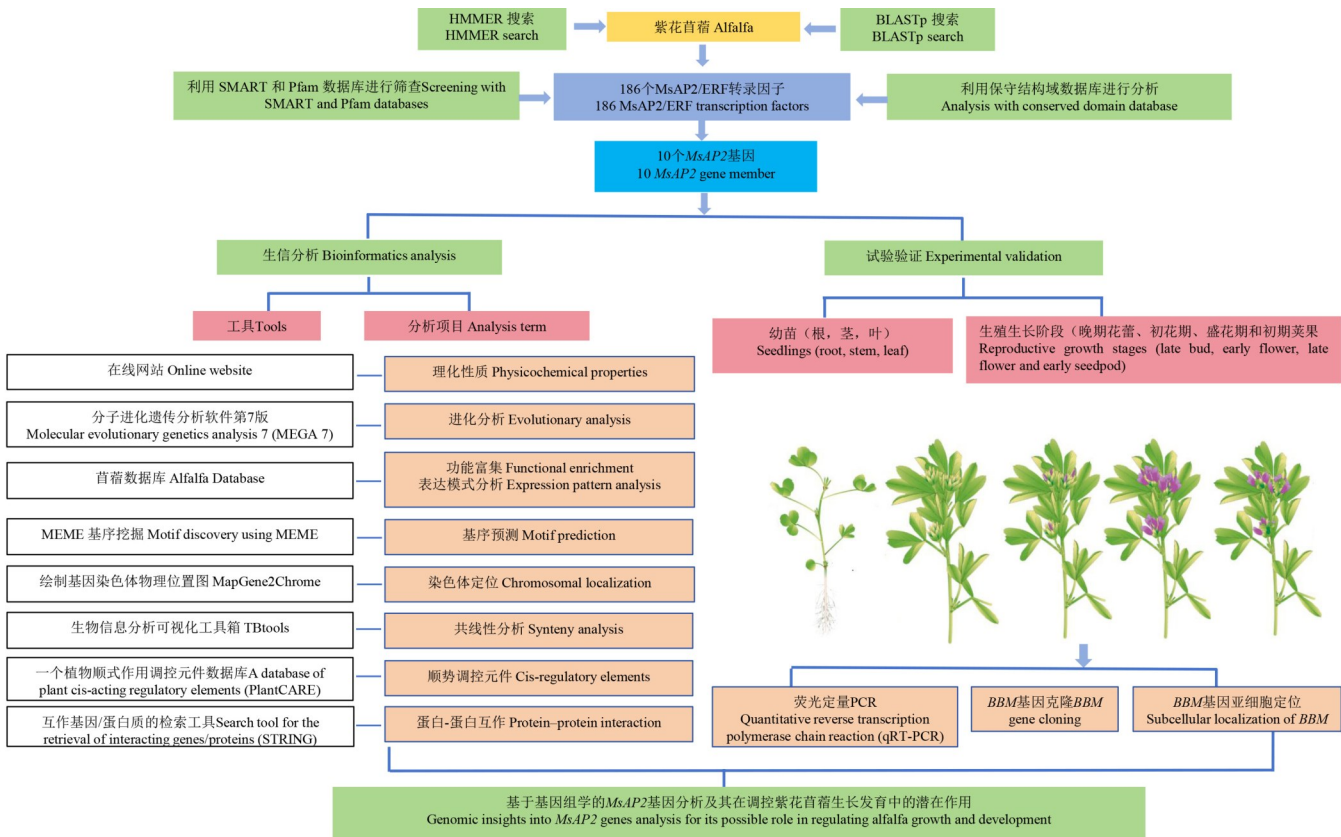


图 1 本研究技术路线
Fig. 1 Technical roadmap of this study

1 材料与方法

1.1 试验材料

以‘中苜 1 号’紫花苜蓿为试验材料,种子于 2024 年 6 月 27 日在湿润的双层滤纸中发芽 5 d 至顶端冒出第一片真叶后,将幼苗移栽至蛭石为基质的花盆中,置于宁夏大学林业与草业学院植物生长室培养。条件为 14 h 白天、温度 25 ℃,10 h 黑暗、温度 22 ℃,湿度为 50%~60%。待生长 20 d 后,采集幼苗的根、茎和叶,液氮速冻后于一 80 ℃保存。其余植株至生殖期,分别采集花芽晚期、开花早期、开花晚期和荚果早期的芽、花和荚果,保存备用。

1.2 AP2 家族成员及 *BBM* 基因的鉴定

‘中苜 1 号’紫花苜蓿基因组数据、核酸及蛋白序列从在线网站(<https://modms.lzu.edu.cn/>)下载,并用于本地数据库构建。首先从 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载 AP2/ERF 蛋白的 HMM 模型(PF00847),并使用 HMMER 3.0 软件以默认参数[期望值(expectation value, E-value)阈值为 0.001]筛选 *MsAP2*/ERF 家族基因。参照 Shu 等^[25]的分类,利用 MAGA 7.0 软件构建系统发育树,初步鉴定到紫花苜蓿的 AP2 候选基因。将其提交到 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 Conserved Domain Database(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)网站筛选具有 2 个完整 AP2 结构域蛋白序列,作为 *MsAP2* 基因成员。

利用紫花苜蓿的 AP2 基因和 5 个已知物种[拟南芥、大豆(*Glycine max*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、玉米(*Zea mays*)和水稻]的 *BBM* 基因构建系统发育树,初步确定 *MsBBM* 基因。再利用 MEME(

suite.org/)在线软件进行保守基序分析,通过BBM的特有基序bbm-1(SIGLSMIKTWLRNQP)准确鉴定*MsBBM*基因^[4]。

1.3 *MsAP2*家族成员生物信息学分析

通过在线工具ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)对*MsAP2*蛋白序列进行理化性质预测,包括氨基酸数量、分子量、理论等电点、不稳定性指数、脂肪指数及疏水性系数。亚细胞定位通过WoLF PSORT工具(<https://www.genscript.com/wolfpsort.html>)预测。利用SignalP 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0>)分析信号肽,TMHMM 2.0([http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM 2.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0))预测跨膜结构,Target P-2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-2.0>)分析导肽。借助Netphos([https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? NetPhos-3.1](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1))进行磷酸化位点分析,并采用SOPMA([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=npsa_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))和SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/interactive>)分别预测二级和三级结构。利用MapGene2Chrom V 2.0(http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)分析*AP2*基因在染色体上的位置信息,并借助TBtools软件完成基因共线性分析。通过PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)鉴定*MsAP2*基因起始位点上游2000 bp序列中的顺式调控元件,并用R语言绘图。使用STRING数据库(<https://www.string-db.org/>)预测蛋白相互作用,并通过苜蓿数据库(<https://modms.lzu.edu.cn/>)的BLASTn比对获取*MsAP2*基因在非生物胁迫和不同组织部位下的表达谱数据,并进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。

1.4 RNA提取和cDNA合成

使用RNA easy Plant Mini Kit试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取所有样本的总RNA,采用超微量紫外分光光度计(NanoPro 2010,北京鼎昊源生物技术有限公司)检测RNA浓度,并通过1%变性琼脂糖凝胶电泳验证质量。然后使用Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time, TaKaRa,日本)反转录cDNA。

1.5 *AP2*基因在不同组织的表达模式分析

利用NCBI在线工具Primer-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)设计10个*MsAP2*基因的qRT-PCR引物(表1)。以不同样本cDNA为模板,采用StepOnePlus™ Real-Time PCR System和SYBR Premix Ex Taq(Takara,日本)进行qRT-PCR分析,每个样品3次重复。反应体系为20 μ L,包含10 μ L 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus、3 μ L ddH₂O、5 μ L cDNA模板及2 μ L正反向引物。反应程序包括:95 $^{\circ}$ C预变性15 min,扩增40个循环(95 $^{\circ}$ C变性10 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s)。 *MsAP2*基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算^[26],以*MsActin*为内参基因,并以叶片的表达水平作为对照。

1.6 *BBM*基因克隆和亚细胞载体构建

根据*BBM*基因序列,利用Snapgene软件(Insightful Science,美国)设计特异性扩增引物和亚细胞定位引物,序列如表1所示。以幼苗cDNA为模板,使用PrimeSTAR Max DNA聚合酶(Takara,日本)扩增*MsBBM*的编码序列(coding sequence, CDS)区域。50 μ L反应体系为:PrimeSTAR Max Premix(2 $\times$)25 μ L,上、下游引物(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)各1.5 μ L,cDNA模板5 μ L和灭菌ddH₂O 17 μ L;反应程序为:98 $^{\circ}$ C变性10 s,55 $^{\circ}$ C退火5 s,72 $^{\circ}$ C延伸10 s,35个循环;4 $^{\circ}$ C保存。PCR扩增结束后,用1%凝胶电泳检测,切取胶块移至1.5 mL离心管,按照通用型DNA纯化回收试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)进行胶回收。按照Seamless Assembly Cloning Kit(Clonesmarter Technologies,美国)说明书,将回收的*MsBBM*扩增产物和线性化载体pCAMBIA2300-GFP进行同源重组反应。反应产物的质粒pCAMBIA2300-GFP-*MsBBM*转化大肠杆菌感受态DH5 α ,获得阳性克隆并进行PCR鉴定。鉴定正确的阳性菌落进行过夜摇菌,按照质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)说明书提取质粒。

1.7 BBM 基因亚细胞定位

以重组表达载体 pCAMBIA2300-GFP-*MsBBM* 的农杆菌 (GV3101) 为侵染液, pCAMBIA2300-GFP 空载的农杆菌菌液作为对照, 选取 4~5 周长势良好的烟草 (*Nicotiana benthamiana*), 使用去针头的 1 mL 一次性注射器将含有 *BBM* 基因和空载的侵染液分别注射到烟草叶片 (选择倒三叶和倒四叶) 下表皮, 并做好标记; 将已侵染的烟草放置于人工气候箱暗培养 12 h 后, 转移至光照条件下培养 48 h, 切取侵染后的烟草叶片, 撕取表皮制片, 于激光共聚焦扫描电子显微镜 (FV3000, 日本) 在 488 nm 激光波长下观察, 并拍照。

1.8 数据处理

使用 Microsoft Excel 2016 进行数据整理, 采用 Graph Pad Prism 8 绘图。

2 结果与分析

2.1 *MsAP2/ERF* 基因家族的鉴定及分类

根据 HMMER 搜索结果, 从紫花苜蓿基因组中共鉴定到 186 个 *MsAP2/ERF* 转录因子, 为了对 *MsAP2/ERF* 基因成员进行分类, 从蒺藜苜蓿 *AP2/ERF* 家族中分别取各个分支中的一个基因, 与 *MsAP2/ERF* 共同构建系统发育树。*MsAP2/ERF* 基因家族可初步分为 *AP2* (27 个)、*DREB* (69 个)、*RAV* (3 个) 和 *ERF* (85 个) 4 个亚家族和 2 个单独的亚族基因。其中 *ERF* 分为 6 个子组, 分别为 *ERF5*、*ERF6*、*ERF7*、*ERF8*、*ERF9* 和 *ERF10*; *DERB* 分为 4 个子组, 分别为 *DERB1*、*DERB2*、*DERB3* 和 *DERB4* (图 2)。

2.2 紫花苜蓿 *AP2* 及 *BBM* 基因的鉴定

在 27 个 *AP2* 候选基因中筛选包含 2 个完整 *AP2* 结构域的蛋白序列, 最终鉴定到 10 个 *MsAP2* 基因, 并根据其在基因组中的出现顺序命名。利用 10 个 *MsAP2* 基因和拟南芥、大豆、蒺藜苜蓿、玉米以及水稻的 *BBM* 基因构建系统发育树, 最终鉴定到一个 *MsBBM* 基因。*MsBBM* 和蒺藜苜蓿 *MtBBM* 亲缘关系最近, 并与大豆的 2 个 *BBM* 及拟南芥的 1 个 *BBM* 聚为一类。有趣的是, 单子叶植物玉米和水稻的 *BBM* 聚为一类, 剩下的 9 个 *MsAP2*

表 1 *MsBBM* 基因克隆、亚细胞定位及 *MsAP2* 家族成员的 qRT-PCR 引物

Table 1 MsBBM gene cloning, subcellular localization and qRT-PCR primers for MsAP2 family members						
引物名称 Primer name	基因 ID Gene ID	正向引物 Forward primer (5'—3')	反向引物 Reverse primer (5'—3')	试验类别 Experiment category		
MsBBM	MsG0780039855.01	ATGAACAACAACAACCAACAAGC	TTCATGCAACAAAAGTGAAGGAG	基因克隆 Gene cloning		
P-MsBBM	MsG0780039855.01	AGAAGACGTTCCAACCAACGCT	CGGTAAGGATCTGAGCTACACA	阳性克隆鉴定 Positive clone identification		
pCEGFP-BBM	MsG0780039855.01	ATGAACAACAACAACCAACAAGC	TTCATGCAACAAAAGTGAAGGAGG	亚细胞定位 Subcellular localization		
qMsBBM	MsG0780039855.01	GGCAGCGGAGGCATATGA	CGTTTTGCAGCACCAACCA	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-1	MsG0280011046.01	TGGTGAACATGCAGCGGA	AAGCATCTGCACCCGACC	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-2	MsG0380017239.01	GTGGAGCTGGTGGTGGTT	CCAGGGCTCATTTGAAAAGGC	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-3	MsG0480021078.01	CAGAGGACTCAACGCCGT	TGCAGCTCCTCCTCCGAT	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-4	MsG0680030730.01	TGCAAGGCACCAACCACAA	GCACGAGCAGCTTTCCTCT	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-5	MsG0880042725.01	TTCTCAGCCGCCTCCTCT	TGCTTGGTGAACCCGTGCT	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-6	MsG0880043914.01	CGTGGGGTTGCTAGGCAT	TGCCATTGCTGCCTCCTC	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-7	MsG0880043916.01	AACATCCCTTTGGCCCGTGG	AGCTAACAGTGCCGGCTG	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-8	MsG0880046012.01	TGGAAGATGGCAAGCTCGA	GGCTTCAAGCTGCTTCCTCT	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
qMsAP2-9	MsG0880047564.01	GCATCACACTCGCTCGGA	CTCCGCATGCAAGCAACC	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		
Actin	MsG0780037052.01	CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT	CATGACACCAAGTATGACGAGGTCTG	定量实时荧光逆转录聚合酶链式反应 qRT-PCR		

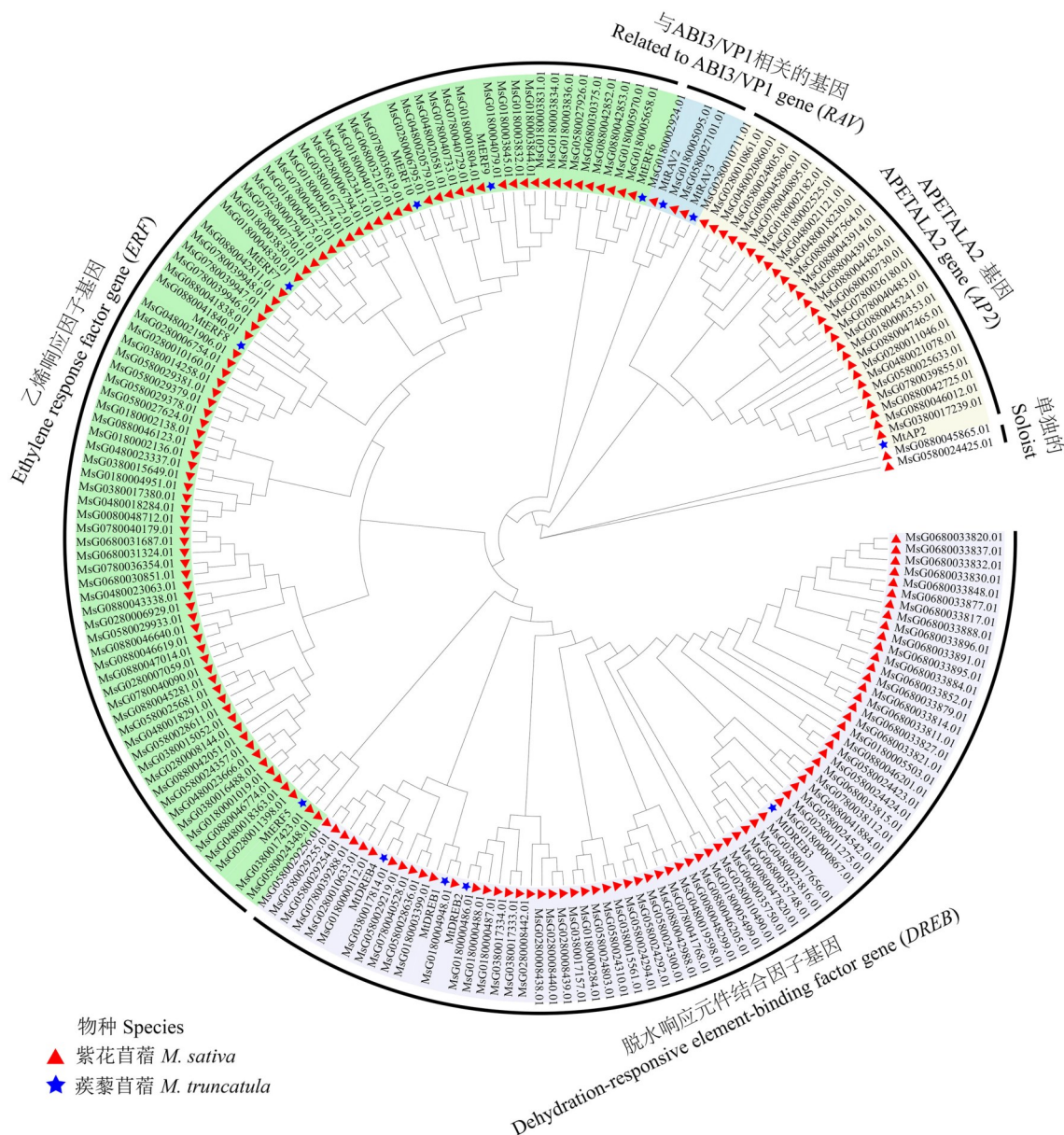


图2 蒺藜苜蓿和紫花苜蓿中MsAP2/ERF蛋白的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of MsAP2/ERF protein in *M. truncatula* and *M. sativa*

蓝色五角星代表蒺藜苜蓿的AP2/ERF蛋白 The blue five-pointed star represents the AP2/ERF protein of *M. truncatula*; 红色三角代表本研究鉴定的紫花苜蓿MsAP2/ERF蛋白 The red triangle represents the MsAP2/ERF protein of alfalfa identified in this study.

基因分为2类(图3A)。保守基序分析显示,motif 1、motif 2、motif 3和motif 5存在于所有AP2基因中,其中motif 1和motif 5组成了完整的AP2-R2结构,motif 2和motif 3组成了完整的AP2-R1结构,motif 4是连接(linker)区。所有的BBM基因均含有一个特有基序motif 7,比对发现其正是BBM的特有结构bbm-1(SIGLSMIKTWLRNQP),证实了MsBBM鉴定的准确性(图3B,C)。保守结构域分析发现,所有的AP2基因都包含2个AP2结构域,表明MsAP2基因鉴定的真实性和可靠性(图3D)。

2.3 BBM蛋白序列比对

利用MEGA软件进行双子叶植物拟南芥、大豆、蒺藜苜蓿和紫花苜蓿BBM蛋白的序列比对,除了AP2-R1、linker、AP2-R2和BBM特有基序bbm-1外,BBM中也含有其他基序,包括euANT1、euANT2、euANT3、euANT4、euANT5和euANT6,以及bbm-2、bbm-3、bbm-4和bbm-5,其中euANT3最保守,bbm类基序变异较大(图4)。

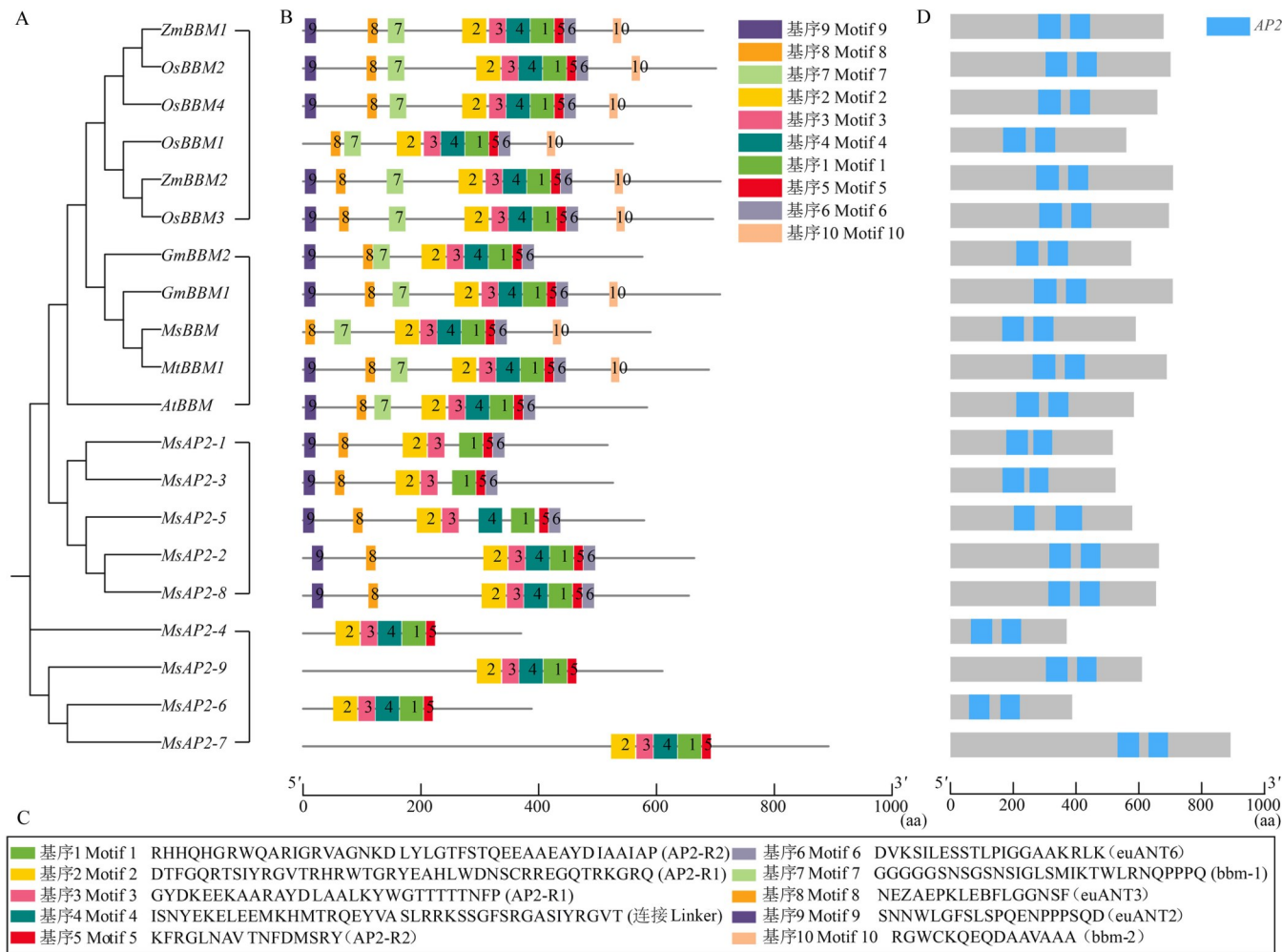


图3 紫花苜蓿AP2基因的系统进化树(A)、基因保守基序(B)、基序所对应的蛋白序列(C)及蛋白质结构域(D)分析
Fig. 3 Phylogenetic tree (A), conserved motif analysis (B), protein sequences corresponding to motifs (C), and protein domain analysis (D) of AP2 genes in alfalfa

2.4 MsAP2蛋白的理化性质分析

10个MsAP2蛋白的氨基酸数目、分子量和理论等电点之间存在较大差异,MsAP2-7编码892个氨基酸,数目最多,分子量也最大,可达99767.58 Da。MsAP2-4编码的氨基酸数目最少,分子量也最小,仅为42048.77 Da。MsAP2家族成员的理论等电点为5.37(MsAP2-7)~8.69(MsAP2-4),不稳定性指数为42.72(MsBBM)~58.60(MsAP2-6)。10个MsAP2的不稳定性指数均高于40,表明MsAP2均为不稳定蛋白。MsAP2蛋白的脂肪指数为52.32(MsAP2-3)~79.61(MsAP2-9),均小于100,且只有MsAP2-9的蛋白疏水性系数介于-0.5~0.5,表明MsAP2-9为两性蛋白,其余9个MsAP2均为亲水蛋白(表2)。

2.5 MsAP2蛋白的亚细胞定位及结构分析

对MsAP2家族成员进行亚细胞定位预测发现,2个MsAP2蛋白(MsAP2-5和MsAP2-9)定位在叶绿体,其余7个MsAP2和MsBBM定位在细胞核(表3)。所有MsAP2均无信号肽、导肽和跨膜结构,表明MsAP2基因不进行转运输出或分泌,直接在细胞核或叶绿体中发挥作用。蛋白磷酸化位点分析显示,MsAP2-2和MsAP2-7各含有66个丝氨酸,数量较多,MsAP2-1和MsAP2-4数量较少,仅28个;MsAP2-7的苏氨酸数量最多,为31个,MsAP2-6最少,仅为10个;MsAP2-1的酪氨酸最多,为13个,MsAP2-5仅为4个(表3)。分析MsAP2蛋白的二级结构发现,其中所占比例最大的是无规则卷曲,其组成百分比表现为无规则卷曲> α 螺旋>延伸链,均无 β 转角(表3)。同时构建了MsAP2蛋白的三级结构,由于二级结构组成百分比不同,三级结构也表现出明显差异,10个MsAP2编码蛋白具有各自的特异空间构型(图5)。

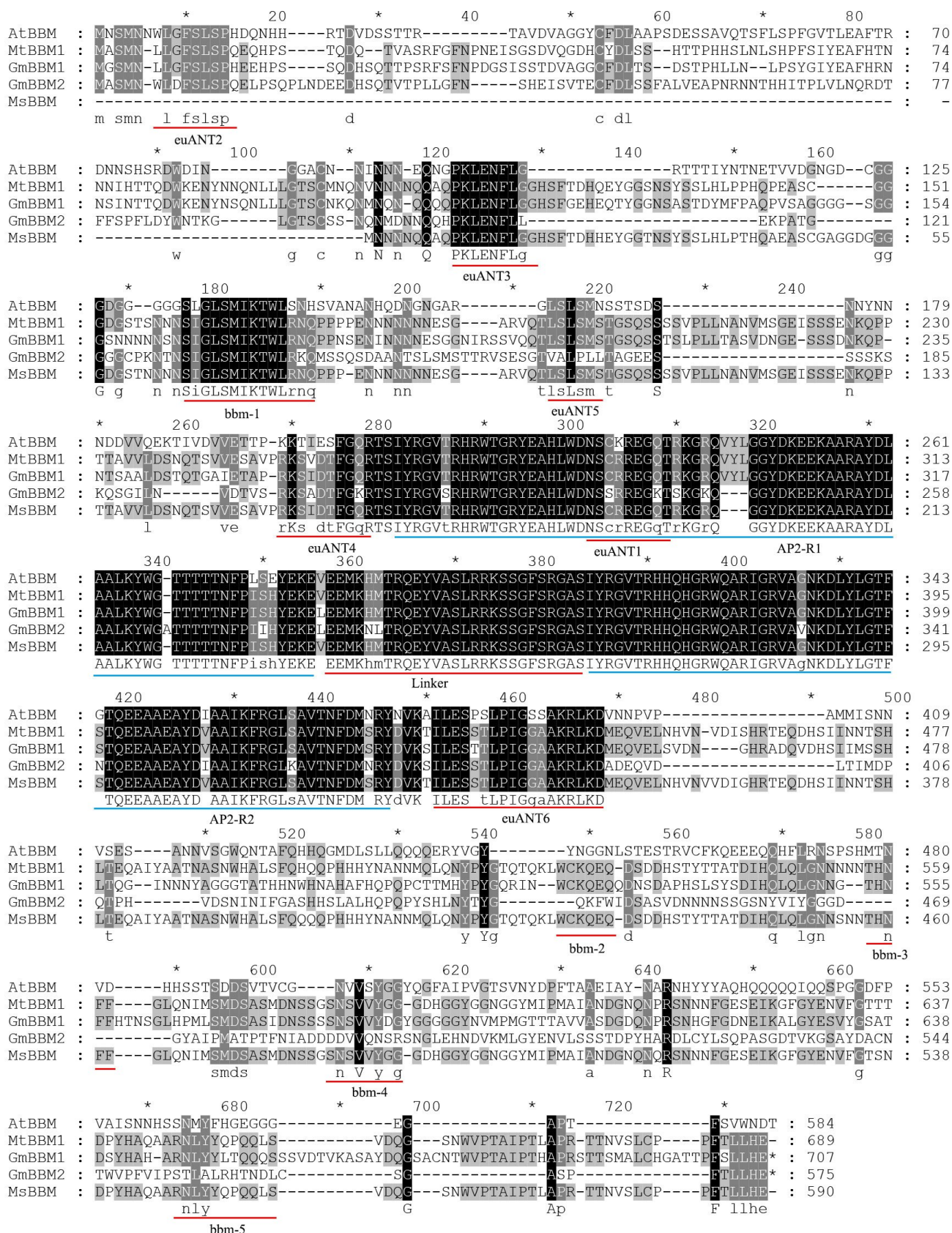


图4 拟南芥、蒺藜苜蓿、大豆和紫花苜蓿BBM蛋白序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of BBM proteins in *A. thaliana*, *M. truncatula*, *G. max* and *M. sativa*

AtBBM: 拟南芥BBM蛋白 BBM proteins in *A. thaliana*; MtBBM: 蒺藜苜蓿BBM蛋白 BBM proteins in *M. truncatula*; GmBBM: 大豆BBM蛋白 BBM proteins in *G. max*; MsBBM: 紫花苜蓿BBM蛋白 BBM proteins in *M. sativa*. 红色线段代表BBM蛋白的保守域 The red line represents the conserved domain of BBM protein; 蓝色线段代表BBM蛋白的2个AP2结构域 The blue line represents the two AP2 domains of BBM protein.

表 2 MsAP2 蛋白的理化性质分析

Table 2 Physicochemical properties analysis of MsAP2 proteins

基因名 Gene name	氨基酸数目 Number of amino acid	分子量 Molecular weight (Da)	理论等电点 Theoretical isoelectric point	不稳定性指数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	疏水性系数 Grand average of hydropathicity
<i>MsBBM</i>	590	65160.04	6.43	42.72	56.75	−0.840
<i>MsAP2-1</i>	517	57501.91	5.60	44.77	60.06	−0.759
<i>MsAP2-2</i>	664	73121.27	6.65	51.20	56.14	−0.747
<i>MsAP2-3</i>	526	58996.41	5.66	43.41	52.32	−0.881
<i>MsAP2-4</i>	370	42048.77	8.69	51.89	57.03	−0.858
<i>MsAP2-5</i>	579	64194.62	6.58	45.54	57.60	−0.780
<i>MsAP2-6</i>	388	44099.97	5.63	58.60	61.62	−0.889
<i>MsAP2-7</i>	892	99767.58	5.37	53.23	69.54	−0.641
<i>MsAP2-8</i>	655	73416.14	6.54	56.94	59.15	−0.770
<i>MsAP2-9</i>	610	68181.84	7.14	42.76	79.61	−0.312

表 3 MsAP2 蛋白的亚细胞定位、蛋白磷酸化位点及结构分析

Table 3 Subcellular localization, protein phosphorylation sites and structural analysis of MsAP2 protein

基因名 Gene name	亚细胞定位 Subcellular localization	蛋白磷酸化位点 Protein phosphorylation sites			二级结构 Secondary structure		
		丝氨酸 Serine	苏氨酸 Threonine	酪氨酸 Tyrosine	α螺旋 Alpha helix (%)	延伸链 Extended strand (%)	无规则卷曲 Random coil (%)
<i>MsBBM</i>	细胞核 Nucleus	39	23	11	15.93	4.92	79.15
<i>MsAP2-1</i>	细胞核 Nucleus	28	17	13	14.89	3.68	81.43
<i>MsAP2-2</i>	细胞核 Nucleus	66	24	10	14.16	5.42	80.42
<i>MsAP2-3</i>	细胞核 Nucleus	40	16	11	15.78	5.13	79.09
<i>MsAP2-4</i>	细胞核 Nucleus	28	18	8	29.73	5.59	64.32
<i>MsAP2-5</i>	叶绿体 Chloroplasic	49	27	4	15.72	8.29	75.99
<i>MsAP2-6</i>	细胞核 Nucleus	35	10	6	25.52	5.67	68.81
<i>MsAP2-7</i>	细胞核 Nucleus	66	31	7	21.75	10.20	68.05
<i>MsAP2-8</i>	细胞核 Nucleus	65	19	8	13.28	3.82	82.90
<i>MsAP2-9</i>	叶绿体 Chloroplasic	45	21	9	30.66	11.64	57.70

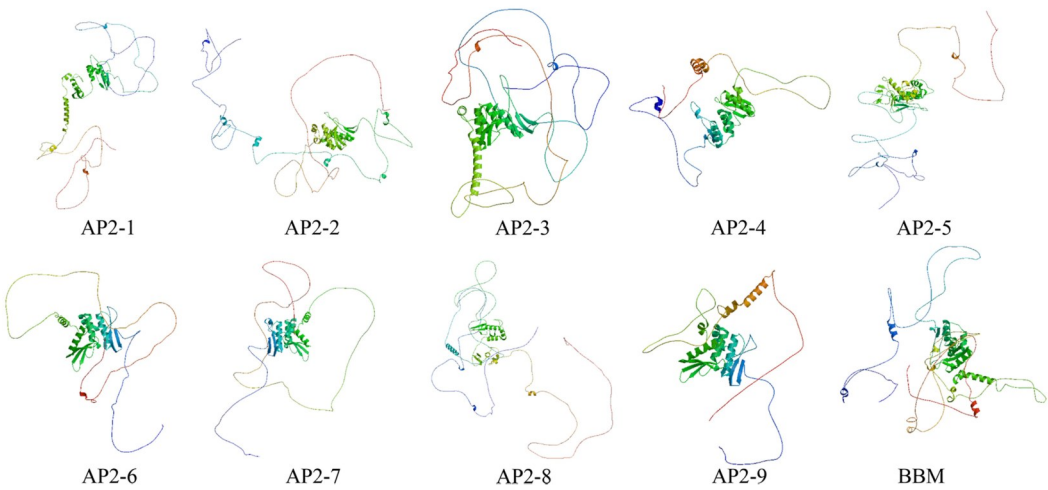


图 5 MsAP2 蛋白的三级结构分析

Fig. 5 Analysis of the tertiary structure of MsAP2 protein

2.6 MsAP2基因的染色体定位和同源性分析

旁系同源基因对关系鉴定显示,10个 MsAP2 基因不均匀地分布在紫花苜蓿的6条染色体(chromosome, Chr)上,其中8号染色体分布最多(5个),Chr 2、Chr 3、Chr 4、Chr 6和Chr 7均定位到1个AP2基因上,MsBBM基因在7号染色体上(图6A)。基因重复事件检测发现,共鉴定到2对片段重复,分别为 MsAP2-1/MsAP2-3和 MsAP2-2/MsAP2-8(图6B)。分析发现,2对片段重复对的 K_a/K_s 均小于1,表明它们在重复后经历了纯化选择(表4)。

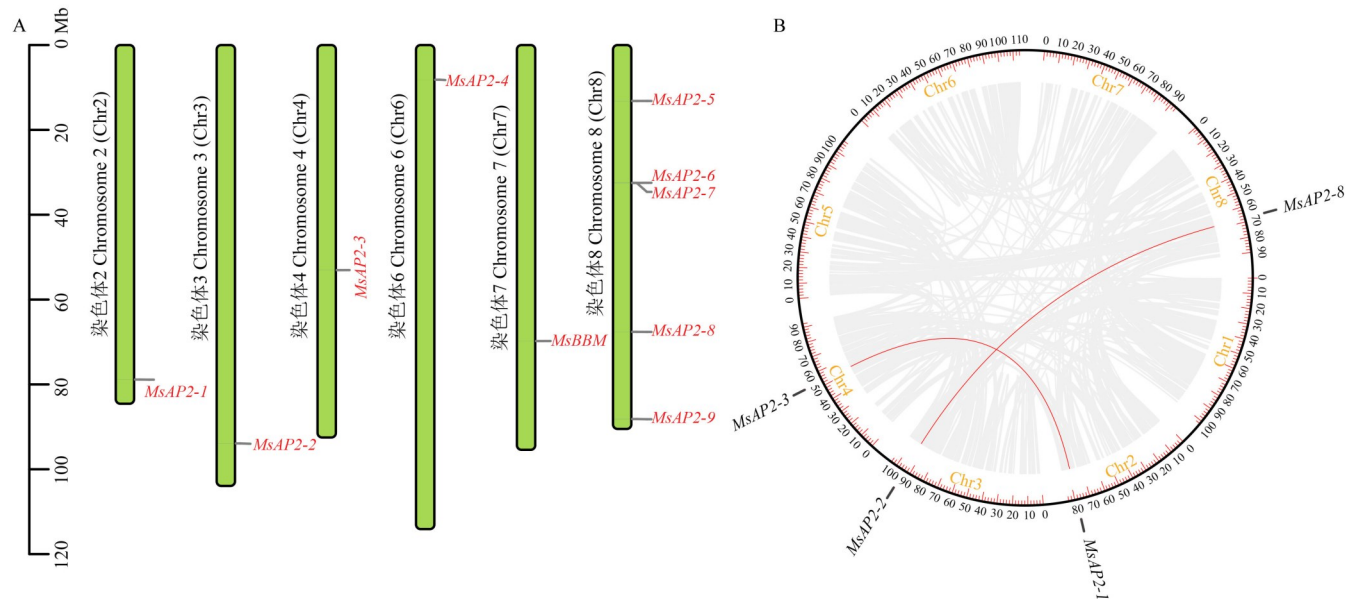


图6 MsAP2基因的染色体定位(A)及种内共线性分析(B)

Fig. 6 Chromosomal localization (A) and intra-species collinearity analysis (B) of MsAP2 genes

红色线条代表 MsAP2 基因中的片段重复基因 The red lines represent fragment repeat genes in the MsAP2 gene.

表4 MsAP2 基因对的非同义替换率和同义替换率

Table 4 Nonsynonymous substitution rate (K_a) and synonymous substitution rate (K_s) of MsAP2 gene pairs

基因对 Gene pairs	重复类型 Duplication type	非同义替换率 Nonsynonymous substitution rate (K_a)	同义替换率 Syn- onymous substitution rate (K_s)	K_a/K_s	选择压力 Selection pressure
MsAP2-1, MsAP2-3	片段重复 Segmental duplication	0.23	0.71	0.32	纯化选择 Purifying selection
MsAP2-2, MsAP2-8	片段重复 Segmental duplication	0.35	1.05	0.33	纯化选择 Purifying selection

2.7 MsAP2 家族基因启动子的顺式调控元件分析

利用基因启动子,分析 MsAP2 家族成员的顺式调控元件发现,除 MsAP2-4 和 MsAP2-9 分别含有 6 和 5 个非生物和生物胁迫顺式调控元件外,其余的 MsAP2 基因均含有 10 个以上非生物和生物胁迫顺式调控元件。MsBBM 仅含有 2 个植物激素响应顺式调控元件,数量最少;MsAP2-3 和 MsAP2-4 的植物激素响应元件较多,均为 13 个。MsAP2-6 和 MsAP2-1 含有的植物生长发育类顺式调控元件数量较多,而 MsAP2-8 和 MsAP2-9 较少。总体而言,大多数 MsAP2 基因含有数目较多的植物生长发育类顺式调控元件,表明 AP2 基因在调控紫花苜蓿生长发育方面具有重要作用(图7)。

2.8 MsAP2 基因家族的功能富集分析

为确定功能分类,对 10 个 MsAP2 基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。10 个 MsAP2 均未鉴定到富集的 KEGG

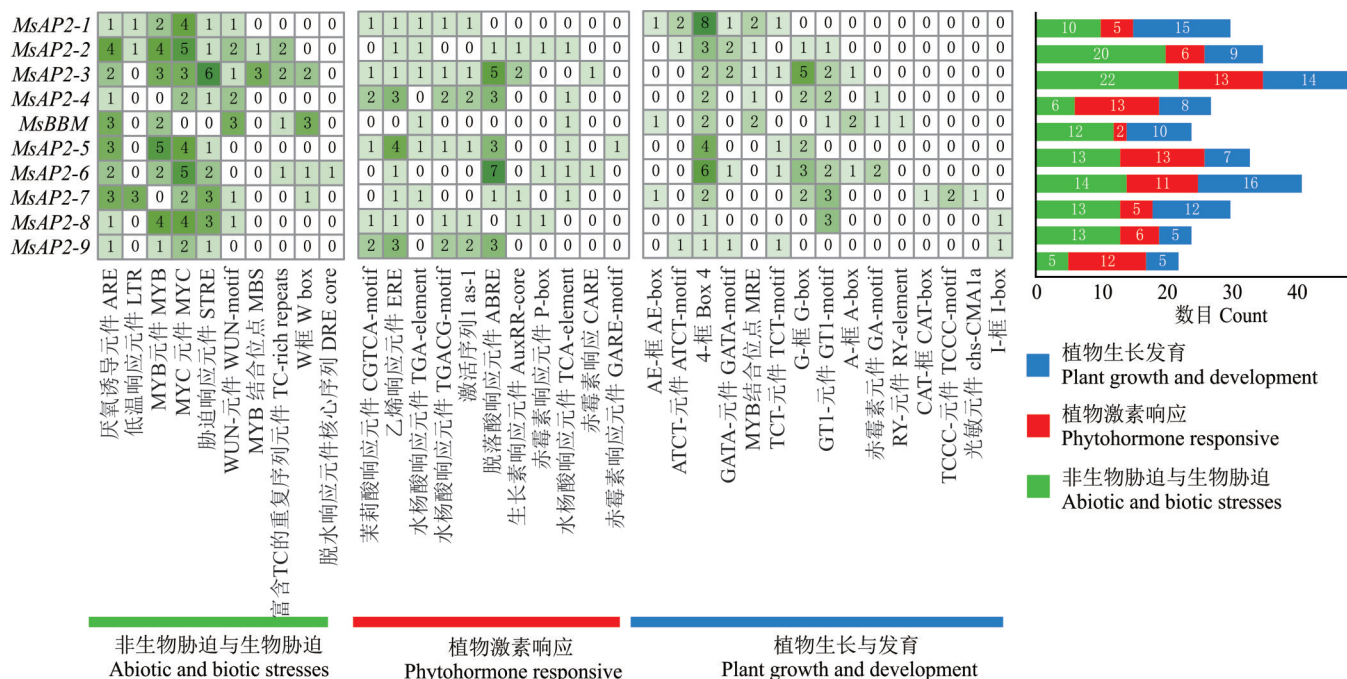
图7 *MsAP2* 基因上游启动子中顺式调控元件的分析

Fig. 7 Analysis of cis regulatory elements in the upstream promoter of *MsAP2* gene

通路。GO 富集分析表明, *MsAP2* 基因主要富集在含核碱基化合物代谢过程的调控、大分子生物合成过程的调控、细胞大分子生物合成过程的调控、RNA 代谢过程的调控、RNA 生物合成过程的调控、核酸模板转录的调控、DNA 模板转录的调控、转录调控因子活性及 DNA 结合转录因子活性等(图 8)。

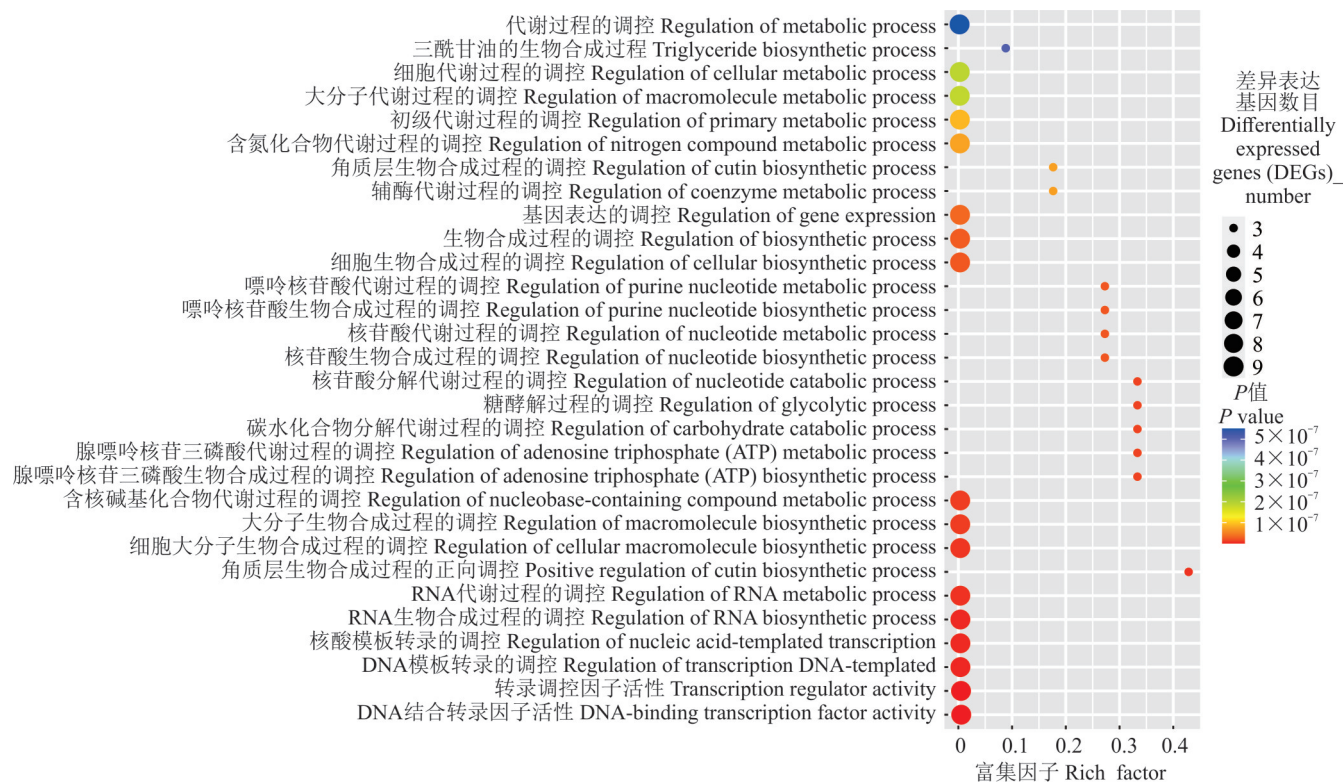


图 8 *MsAP2* 基因 GO 富集分析

Fig. 8 GO enrichment analysis of *MsAP2* genes

2.9 *MsAP2* 基因家族的表达模式分析

表达谱数据分析发现,10个*MsAP2*基因分为3类,第1类的3个基因(*MsAP2-1*、*MsAP2-3*和*MsBBM*)主要在铅胁迫时低表达,并受甘露醇和冷处理诱导;第2类的3个基因(*MsAP2-4*、*MsAP2-7*和*MsAP2-6*)在冷胁迫下具有较高的表达水平;第3类的4个基因(*MsAP2-2*、*MsAP2-8*、*MsAP2-9*和*MsAP2-5*)主要受铅胁迫诱导(图9A)。组织表达分析显示,第1类的5个基因(*MsAP2-1*、*MsAP2-3*、*MsBBM*、*MsAP2-7*和*MsAP2-4*)主要在茎伸长阶段和伸长后期的茎中高表达;第2类的5个基因(*MsAP2-2*、*MsAP2-8*、*MsAP2-9*、*MsAP2-6*和*MsAP2-5*)主要在花和根瘤中高表达(图9B)。有趣的是,与胁迫处理相比,*MsAP2*基因在特有组织中的表达水平较高,表明*MsAP2*主要参与调控紫花苜蓿的生长发育。

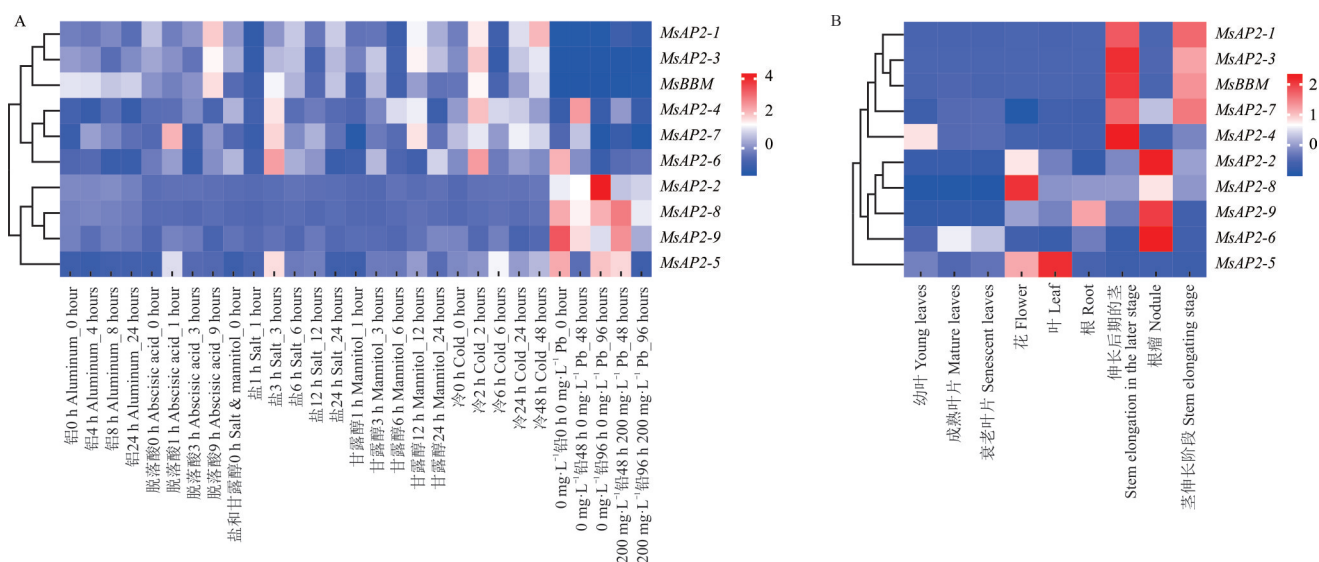


图9 10个*MsAP2*基因在多种非生物胁迫下(A)以及在不同组织中的表达(B)

Fig. 9 Expression of 10 *MsAP2* genes under various abiotic stresses (A) and in different tissues (B)

2.10 *MsAP2* 基因的组织表达水平测定

采集紫花苜蓿不同器官进行*AP2*基因的组织特异性表达分析(图10A),结果发现,部分基因在某些器官中不表达或表达很低,检测不到,如开花早期的*MsAP2-1*、*MsAP2-3*、*MsAP2-4*、*MsAP2-7*和*MsAP2-9*,以及开花晚期的*AP2-6*,与叶片相比,其余基因均在花中上调表达,且4个基因(*MsAP2-2*、*MsAP2-5*、*MsAP2-8*和*MsBBM*)在开花早期和开花晚期表达水平相差不大(图10B)。与叶片相比,大部分基因在根和茎中上调表达,如*MsAP2-1*、*MsAP2-2*、*MsAP2-3*、*MsAP2-4*、*MsAP2-6*、*MsAP2-8*和*MsBBM*,剩余的*MsAP2-5*和*MsAP2-9*仅在茎中上调表达。另外,相较于叶片,所有基因在花芽晚期中均下调表达。与其他器官相比,*MsAP2*基因在荚果中的表达相对多样化,其中*MsAP2-2*和*MsAP2-9*与叶片相比下调表达,*MsAP2-1*、*MsAP2-7*、*MsAP2-8*和*MsBBM*与叶片相比无明显差异,*MsAP2-4*、*MsAP2-5*和*MsAP2-6*上调表达。

2.11 *MsBBM* 基因克隆和亚细胞定位分析

特异性PCR扩增结果显示,目的条带大小约为1776 bp,编码560个氨基酸(图11A)。对阳性克隆进行菌落PCR鉴定,结果显示,泳道1、2、3、5、7和8与目标基因长度一致,条带单一清晰,且无杂带或非特异性扩增,为阳性克隆;泳道4无明显条带,可能为假阳性克隆;泳道6出现两条条带,需进一步验证(图11B)。为揭示BBM蛋白在细胞内的具体位置和分布情况,通过注射烟草叶片表皮细胞观察荧光信号。结果显示,空载在细胞膜及细胞核中的荧光信号均匀且强度较高,无特异性亚细胞定位现象,BBM仅定位在细胞核,且表达效果良好(图11C),与生信预测结果相同,表明*MsBBM*蛋白主要在细胞核中发挥作用。

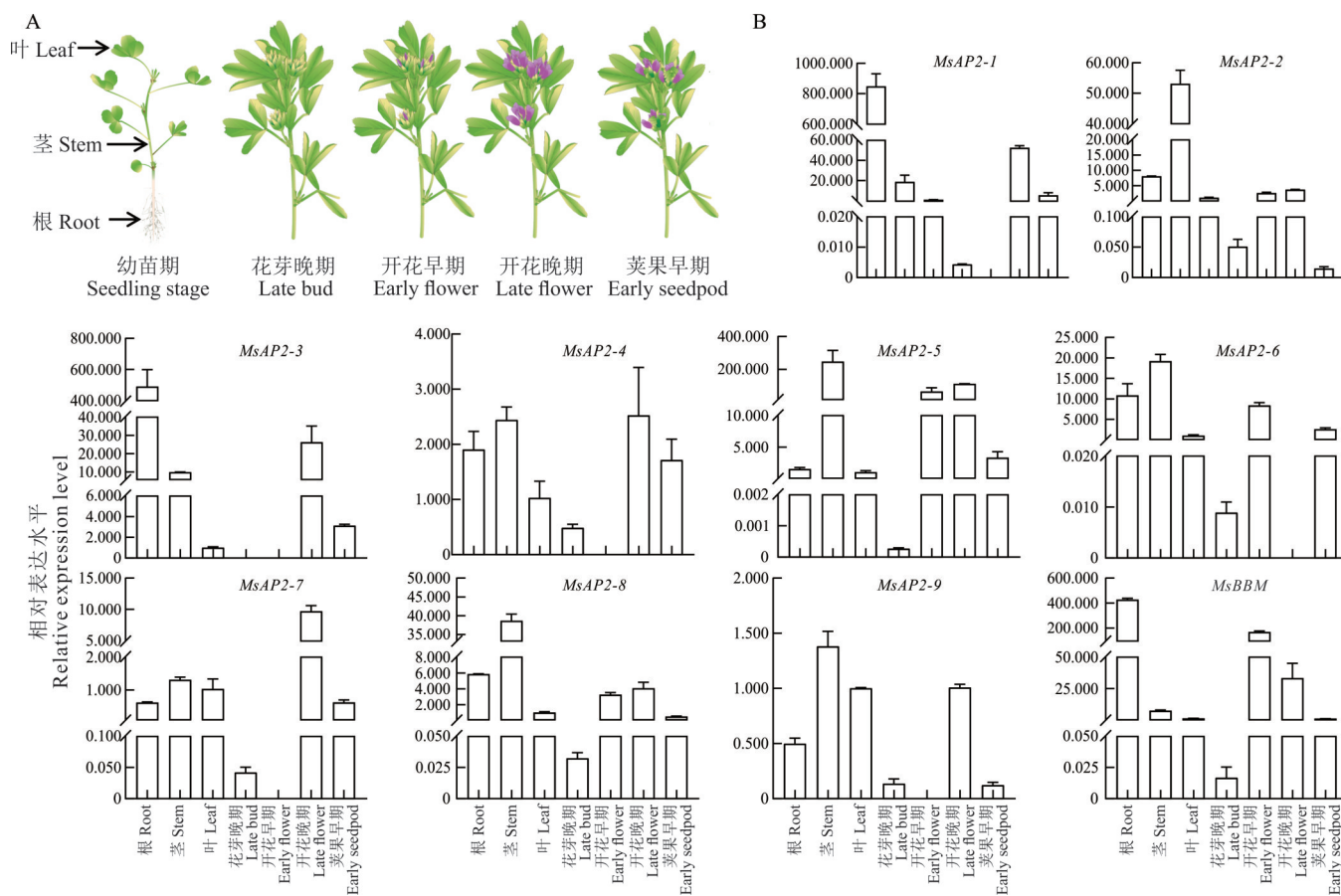


图 10 不同组织的取样示意图(A)及 *MsAP2* 基因的表达水平(B)

Fig. 10 Schematic diagram of sampling from different tissues (A) and expression level of *MsAP2* genes (B)

3 讨论

3.1 紫花苜蓿 *AP2* 家族基因在进化过程中的多样性

不同物种含有的 *AP2* 亚家族基因成员数量存在差异,相关学者指出,*AP2* 亚家族成员的数量在高等植物中高度保守,如在蒺藜苜蓿中鉴定出 21 个 *AP2* 家族成员^[25],拟南芥^[27]、水稻^[28]和龙眼 (*Dimocarpus longan*)^[29]中分别鉴定到 18、19 和 26 个。本研究根据系统进化分析在紫花苜蓿中初步鉴定到 27 个 *AP2* 成员(图 2),这与其他物种的 *AP2* 成员数量接近。值得注意的是,本研究后续根据两个完整的 *AP2* 结构域,仅筛选到 10 个 *AP2* 基因(图 3),这可能是由于不同筛选方法导致的差异。不同物种中 *AP2* 成员数量不同,可能是由基因复制引起,包括串联复制和片段复制^[30]。本研究发现,*AP2* 基因存在 2 对片段重复, K_a/K_s 值均小于 1(图 6B 和表 4),表明 *AP2* 基因在数量上的扩张可以更好地适应多变的环境,对物种进化具有重要意义。生信分析结果表明,10 个 *AP2* 基因的性质均符合 *AP2* 作为转录因子调控下游基因表达的特性^[31],也与大多数研究结果相似,表明 *MsAP2* 主要在细胞核内发挥转录因子的调控作用^[32]。10 个 *AP2* 基因不均匀地分布在 6 条染色体上,其中有 5 个均定位在 8 号染色体上(图 6A),这种定位导致的基因簇及基因复制是物种形成和进化的基础。蛋白二级结构分析发现,具体基因的二级比例存在差异,这种差异导致三级结构各不相同(图 5),表明 *AP2* 基因在进化过程中保持了理化性质和空间结构的多样性。不同 *AP2* 蛋白的磷酸化位点均表现为丝氨酸>苏氨酸>酪氨酸,但具体的 *AP2* 个体间差异较大(表 3),表明 *AP2* 基因可能在功能上存在相似性或一致性,但是不同成员依然通过参与不同的信号转导途径起作用,表现出多样性^[33]。

3.2 *AP2* 家族成员在植物生长发育调节和应对逆境胁迫中的重要作用

AP2 作为植物常见的转录因子,通常含有一些决定其功能的保守结构域和基序^[34],*AP2* 基因在功能上主要

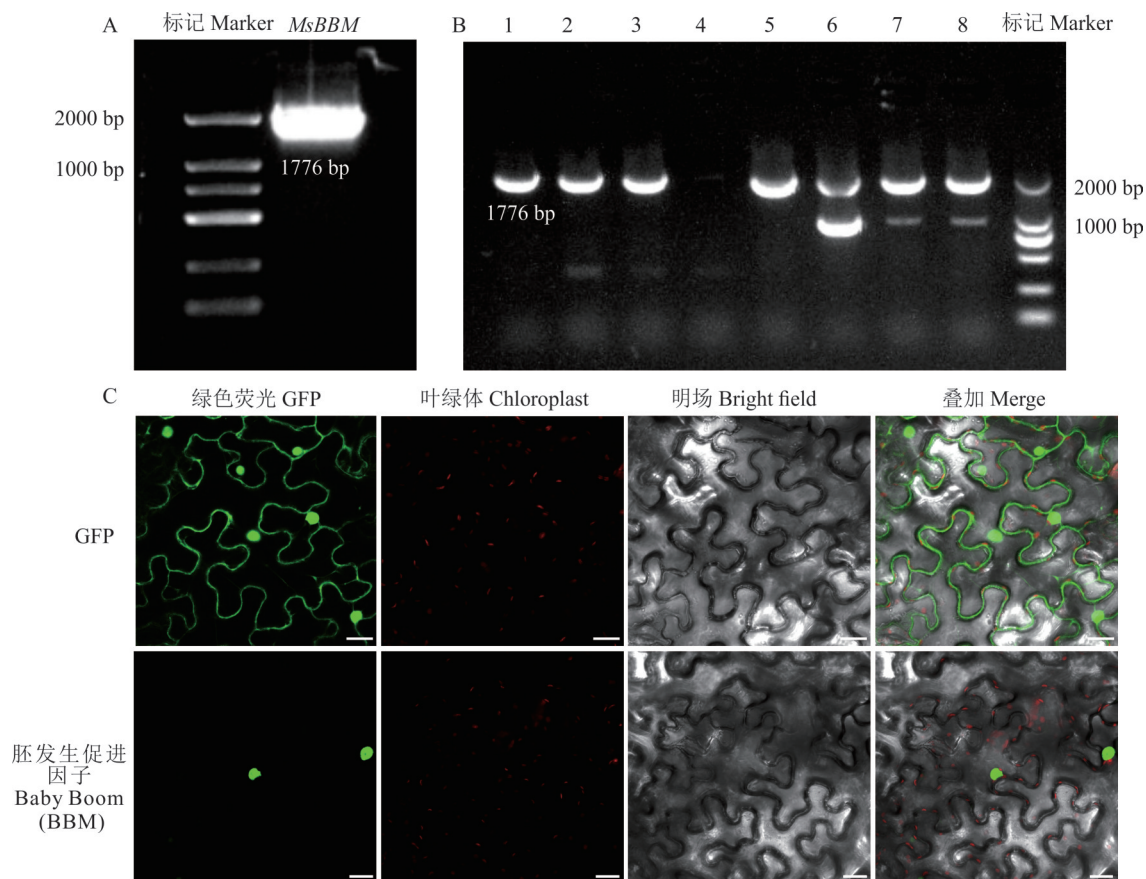


图 11 *MsBBM* 基因的扩增(A)、鉴定(B)及其编码蛋白的亚细胞定位(C)(标尺=25 μm)

Fig. 11 Amplification (A) and verification (B) of the *MsBBM* gene, and the subcellular localization of its encoded proteins (C) (bar=25 μm)

表现为调控植物形态发生、各种胁迫响应、植物激素信号转导、代谢产物等过程^[2],表明 AP2 蛋白中含有与功能对应的结构域。本研究中,10 个保守基序中,motif 1、motif 2、motif 3 和 motif 5 存在于所有 AP2 基因中,而这 4 个保守基序组成了完整的 2 个 AP2 保守域;同时也鉴定到 motif 7 是 *BBM* 基因的特有结构域 bbm-1(图 3),表明这些结构域的特有性是决定 AP2 基因功能分化的主要原因。同时,该结果也表明本研究中 *BBM* 和 AP2 基因鉴定的准确性和真实性。除了基序结构外,顺式作用元件在启动子区域中对基因表达的调控也起着关键作用^[35]。本研究中,在 *MsAP2* 家族成员中,鉴定出许多顺式作用元件,包括植物生长发育、植物激素响应以及生物和非生物胁迫等,除了 *BBM* 基因仅含有 2 个植物激素响应元件外,其余基因均含有数量超过 5 个的同类元件(图 7),表明 *MsAP2* 基因广泛参与了紫花苜蓿的生长发育、植物激素和逆境响应过程,这也与其他研究结果相似^[28],表明 AP2 基因的功能可能在高等植物中具有保守性。

基因的表达模式与其功能关系密切,本研究基于转录组数据分析发现,不同处理条件下的 AP2 基因表达存在差异,*MsAP2-1*、*MsAP2-3* 和 *MsBBM* 基因在铅胁迫下低表达,表明它们可能具有负调控铅胁迫的功能,与此相反的是,*MsAP2-2*、*MsAP2-8*、*MsAP2-9* 和 *MsAP2-5* 受铅胁迫诱导上调表达,可能正向调控铅胁迫;另外的 3 个基因(*MsAP2-4*、*MsAP2-7* 和 *MsAP2-6*)主要受冷胁迫诱导(图 9A)。总的来看,即使部分基因受到胁迫诱导,但表达水平依然较低。与此不同的是,*MsAP2* 基因在不同器官中的表达差异更为突出,如 *MsAP2-1*、*MsAP2-3*、*MsBBM*、*MsAP2-7* 和 *MsAP2-4* 在茎中高表达;*MsAP2-2*、*MsAP2-9* 和 *MsAP2-6* 在根瘤,以及 *MsAP2-8* 和 *MsAP2-5* 分别在花和叶中高表达(图 9B),表明相较于应对逆境胁迫,AP2 基因的主要功能可能体现在参与植物的生长发育方面。多个基因在同一处理或组织中的高表达表明,这些基因可能在功能上存在冗余,如 AP2 家族成员 *ANT* 和 *AIL6* 在参与调控花发育和分生组织确定性方面存在功能冗余^[36]。

3.3 *MsAP2* 成员在调节紫花苜蓿生长发育过程中的潜在功能

拟南芥 *AP2* 成员 *PLT1*、*PLT2*、*PLT3*、*BBM* 和 *AIL1* 均可参与调控根的生长发育^[37-38]。随后的研究报道表明, *AP2* 基因家族成员广泛参与植物花、叶、腋芽、种子、果实以及根等组织和器官的发育过程^[39-40], 尤其在决定花器官身份及重瓣花形成中发挥关键作用^[41]。本研究对 10 个 *MsAP2* 基因在紫花苜蓿幼苗根、茎、叶及生殖生长时期的花芽晚期、开花早期、开花晚期和荚果早期的表达水平测定发现, *AP2* 基因在不同组织中的表达水平存在差异(图 10)。 *AtWRI1* 主要在根中表达, 通过调控生长素响应基因表达维持根系的生长素含量, 最终调控拟南芥的根系发育^[42]。玉米中 *ZmRAP2-7* 也主要在根中表达, 刺激根发育^[43]。本研究发现, *MsAP2-1*、*MsAP2-2*、*MsAP2-3*、*MsAP2-4*、*MsAP2-6*、*MsAP2-8* 和 *MsBBM* 也在根中上调表达, 其中 *MsAP2-1*、*MsAP2-3* 和 *MsBBM* 分别比叶片上调 600、400 和 500 倍(图 10), 表明与其他物种 *MsAP2* 成员相似, 紫花苜蓿 *MsAP2-1*、*MsAP2-3* 和 *MsBBM* 可能也具有调控根系发育的作用。除此之外, 本研究发现, 与叶片相比, 除了 *MsAP2-7*, 其余基因均在茎中上调表达, 表明 *MsAP2* 基因可能在紫花苜蓿茎的发育过程中发挥重要作用, 但这还需要后续进一步验证。

生殖器官中, *AP2* 基因也具有重要功能, 如拟南芥 *AtAIL6* 在花中的表达量最高, 功能分析发现, 其调节发育中的花器官生长和形态建成^[44]。单子叶植物研究也发现, 在不同发育时期小麦和大麦(*Hordeum vulgare*)的根、茎、幼叶和穗等组织中均发现了 *AP2* 基因的表达, 其中穗中的表达量最高^[45]; 水稻 *AP2* 基因在根、花、叶、种子、茎中均有表达, 且在花序和茎中表达量较高^[28]。本研究结果发现, 与叶片相比, *AP2* 基因均在芽中下调表达; 而在花中的表达具有高特异性, 部分基因检测不到表达量; 荚果中, *AP2* 基因的表达呈现多样性(图 10)。这些结果表明, *AP2* 基因在生殖器官中的表达特异性较高, 这可能暗示了其在生殖器官中的特殊功能。另一方面, 这种组织特异性表达同样也会介导抗逆性, 如金银花(*Lonicera japonica*)的 *AP2_7*、*AP2_24* 和 *AP2_30* 在低温胁迫下高表达, 且叶中的表达量明显高于茎和根; 而 *AP2_10* 在胁迫下 3 h 表达量显著增加, 且在根中的表达水平明显高于茎和叶, 表明这些基因可能介导了不同器官对低温的抗性^[33]。这可能是由于植物不同器官应对非生物胁迫时发挥着不同的功能, 且在胁迫不同阶段可协同作用。因此, *MsAP2* 基因的组织特异性表达是否介导不同器官对特定胁迫的特异性响应, 还需要进一步试验。

BBM 基因的重要功能已被多次报道, 然而对紫花苜蓿 *BBM* 基因的研究十分匮乏。本研究从鉴定、生信分析、表达模式以及克隆和亚细胞定位的全流程对 *MsBBM* 基因进行了系统解析, 明确了其在不同组织的表达特征及响应非生物胁迫的潜在功能。 *MsBBM* 仅包含 2 个水杨酸响应元件, 且主要在根和花中表达量较高, 表明其可能介导水杨酸信号参与苜蓿根和花的生长发育。克隆获得的 CDS 序列及亚细胞定位均与生信预测结果一致, 为后续 *MsBBM* 基因的遗传转化和功能验证提供了基础。

4 结论

本研究利用生物信息学手段在全基因水平下鉴定到紫花苜蓿的 10 个 *AP2* 基因成员, 其中仅有一个 *MsBBM* 基因。 *AP2* 成员均属于不稳定、亲水的非分泌蛋白, 理化性质多样, 含有生长发育、植物激素响应及生物和非生物胁迫响应的多个顺式调控元件, 在不同器官的表达模式中具有多样性和特异性。进一步克隆了 *MsBBM* 基因, 其编码 560 个氨基酸, 含特有结构域 *bbm-1*, 不具备跨膜结构、信号肽和导肽, 与蒺藜苜蓿 *MtBBM* 亲缘关系最近。烟草瞬时表达结果显示, *MsBBM* 蛋白亚细胞定位于细胞核。 *MsBBM* 在根中表达量最高, 在花芽晚期表达量最低, 但在开花早期和开花晚期表达水平上升, 表明 *MsBBM* 基因可能是调控紫花苜蓿根系生长和花器官发育的关键候选基因。

参考文献 References:

- [1] Gu C, Guo Z H, Hao P P, *et al.* Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm. *Botanical Studies*, 2017, 58(1): 6.
- [2] Feng K, Hou X L, Xing G M, *et al.* Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(6): 750—776.

- [3] Chen Y, Sun M Z, Jia B W, *et al.* Research progress regarding the function and mechanism of rice AP2/ERF transcription factor in stress response. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(4): 781–790.
陈悦, 孙明哲, 贾博为, 等. 水稻 AP2/ERF 转录因子参与逆境胁迫应答的分子机制研究进展. *作物学报*, 2022, 48(4): 781–790.
- [4] Ouakfaoui S E, Schnell J, Abdeen A, *et al.* Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74(4): 313–326.
- [5] Tian M K, Xu Z X, Liu X Q, *et al.* Identification of the AP2 subfamily transcription factors in *Chimonanthus praecox* and the functional study of *CpAP2-L11*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(2): 382–396.
田明康, 徐智祥, 刘秀群, 等. 蜡梅 AP2 亚家族转录因子鉴定及 *CpAP2-L11* 功能研究. *园艺学报*, 2023, 50(2): 382–396.
- [6] Xie Z, Nolan T M, Jiang H, *et al.* AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 228.
- [7] Yu Y, Duan X B, Ding X D, *et al.* A novel AP2/ERF family transcription factor from *Glycine soja*, *GsERF71*, is a DNA binding protein that positively regulates alkaline stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2017, 94(415): 509–530.
- [8] Wang J D, Zhou Y, Yu J W, *et al.* Advances in the regulation of plant growth and development and stress response by miR172-AP2 module. *Chinese Bulletin of Botany*, 2020, 55(2): 205–215.
王劲东, 周豫, 余佳雯, 等. miR172-AP2 模块调控植物生长发育及逆境响应的研究进展. *植物学报*, 2020, 55(2): 205–215.
- [9] Shao C Y, Gao Z, Sun M, *et al.* The drought-responsive wheat AP2/ERF transcription factor TaRAP2-13L and its interacting protein TaWRKY10 enhance drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* and wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 309(Pt 4): 143008.
- [10] Hussein A, Abdelsattar M, Radwan K H, *et al.* Streamlining the defense mechanism involving miRNA/mRNA and phytohormones during mycorrhiza-*Fusarium* infecting tomato roots. *Brazilian Journal of Biology*, 2025, 84: e280450.
- [11] Zhong J Q, Situ J J, He C C, *et al.* A virulent miRNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* impairs plant resistance by targeting banana AP2 transcription factor coding gene *MaPTI6L*. *Horticulture Research*, 2024, 12(4): uhae361.
- [12] Xing H W, Wang H, Huang Y Y, *et al.* *FZP* modulates tillering via *OsMADS57* in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(4): 1202–1212.
- [13] Li W H, Zhang W H, Li H W, *et al.* Overexpression of a *Fragaria* × *ananassa* AP2/ERF transcription factor gene (*FaTINY2*) increases cold and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(5): 2109.
- [14] Chen B J, Maas L, Figueiredo D, *et al.* BABY BOOM regulates early embryo and endosperm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(25): e2201761119.
- [15] Wang T T, Hu J, Jiao H H, *et al.* Effect of *BBM* gene on callus growth and ginsenoside content in *Panax quinquefolius*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, 48(12): 3156–3161.
王腾腾, 胡进, 焦红红, 等. *BBM* 基因对西洋参愈伤组织生长及人参皂苷含量的影响. *中国中药杂志*, 2023, 48(12): 3156–3161.
- [16] Li P, Xue H W. Structural characterization and expression pattern analysis of the rice *PLT* gene family. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2011, 43(9): 688–697.
- [17] Li M, Wrobel-Marek J, Heidmann I, *et al.* Auxin biosynthesis maintains embryo identity and growth during BABY BOOM-induced somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 2011, 188(2): 1095–1110.
- [18] Zhang J J, Hao Z D, Ruan X X, *et al.* Role of BABY BOOM transcription factor in promoting somatic embryogenesis and genetic transformation in a woody *Magnoliid liriodendron*. *Plant, Cell & Environment*, 2025, 48(7): 4859–4872.
- [19] Ji Y J, Xiong J, Qiu X J, *et al.* Progress on plant parthenogenesis: promoting the application of synthetic apomixis. *Hereditas*, 2025, 47(4): 448–455.
姬亚捷, 熊杰, 邱先进, 等. 植物孤雌生殖研究进展: 助力无融合生殖走向应用. *遗传*, 2025, 47(4): 448–455.
- [20] Chen J J, Tomes S, Gleave A P, *et al.* Significant improvement of apple (*Malus domestica* Borkh.) transgenic plant production by pre-transformation with a BABY BOOM transcription factor. *Horticulture Research*, 2022, 9: DOI: 10.1093/hr/uhab014.
- [21] Li X H. *TaBBM* genes regulate plant regeneration and grain size in common wheat. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021.
李晓慧. *TaBBM* 基因调控小麦植株再生和籽粒大小的机理研究. 泰安: 山东农业大学, 2021.

- [22] Chen H T, Zeng Y, Yang Y Z, *et al.* Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2494.
- [23] Jin X Y, Yin X F, Ndayambaza B, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of the *ERF* gene family in *Medicago sativa* L. under various abiotic stresses. *DNA Cell Biology*, 2019, 38(10): 1056–1068.
- [24] Wen X Y, Zhao Y, Wang B Q, *et al.* Expression analysis of *AP2/ERFs* genes in alfalfa regulated by exogenous NO under drought stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(6): 154–167.
温小月, 赵颖, 王宝强, 等. 外源 NO 调控干旱胁迫下紫花苜蓿 *AP2/ERFs* 基因的表达分析. *草业学报*, 2025, 34(6): 154–167.
- [25] Shu Y J, Liu Y, Zhang J, *et al.* Genome-wide analysis of the *AP2/ERF* superfamily genes and their responses to abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1247.
- [26] Yang X J. Analysis of the copy number of exogenous genes in transgenic cotton using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(23): 6226–6233.
- [27] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, *et al.* Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411–432.
- [28] Huang X, Ke X N, Hu H C, *et al.* Genome-wide identification and characterization of the *AP2* gene family in *Oryza sativa*. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(11): 3489–3498.
黄霞, 柯笑楠, 胡海超, 等. 全基因组鉴定和分析水稻 *AP2* 基因家族. *分子植物育种*, 2021, 19(11): 3489–3498.
- [29] Zhang S T, Zhu C, Lyu Y M, *et al.* Genome-wide identification, molecular evolution, and expression analysis provide new insights into the APETALA2/ethylene responsive factor (*AP2/ERF*) superfamily in *Dimocarpus longan* Lour. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 62.
- [30] Li M Y, Wang F, Jiang Q, *et al.* Genome-wide analysis of the distribution of *AP2/ERF* transcription factors reveals duplication and elucidates their potential function in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Plant Molecular Biology*, 2013, 31: 1002–1011.
- [31] Han X W, Han S, Hu Y F, *et al.* Genome-wide identification of *AP2/ERF* gene family in *Alternanthera philoxeroides* and its expression patterns under herbicide stresses. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(20): 4021–4034.
韩晓文, 韩硕, 胡义锋, 等. 喜旱莲子草 *AP2/ERF* 基因家族的鉴定及其在除草剂胁迫下的表达模式. *中国农业科学*, 2023, 56(20): 4021–4034.
- [32] Hu Y L, Huang Y Q, Wang T C, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *AP2/ERF* transcription factor family in *Baphicacanthus cusia*. *Plant Physiology Journal*, 2024, 60(9): 1461–1474.
胡永乐, 黄杨钦, 王天才, 等. 马蓝 *AP2/ERF* 转录因子家族全基因组鉴定与表达分析. *植物生理学报*, 2024, 60(9): 1461–1474.
- [33] Qiao Y G, Chen L, Cui F F, *et al.* Bioinformatics and expression analysis of *AP2* gene family based on transcriptome of *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(9): 1698–1706.
乔永刚, 陈亮, 崔芬芬, 等. 基于转录组金银花 *AP2* 基因家族的生物信息学及表达分析. *核农学报*, 2019, 33(9): 1698–1706.
- [34] Zhang Q, Zhou W, Li B, *et al.* Genome-wide analysis and the expression pattern of the *ERF* gene family in *Hypericum perforatum*. *Plants*, 2021, 10(1): 133.
- [35] Cui Y, Cao Q, Li Y P, *et al.* Advances in *cis*-element and natural variation-mediated transcriptional regulation and applications in gene editing of major crops. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(18): 5441–5457.
- [36] Krizek B. *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* act redundantly to regulate *Arabidopsis* floral growth and patterning. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 1916–1929.
- [37] Aida M, Beis D, Heidstra R, *et al.* The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 2004, 119(1): 109–120.
- [38] Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, *et al.* *PLETHORA* proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*, 2007, 449(7165): 1053–1057.
- [39] Krizek B A. *AINTEGUMENTA-LIKE* genes have partly overlapping functions with *AINTEGUMENTA* but make distinct contributions to *Arabidopsis thaliana* flower development. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(15): 4537–4549.
- [40] Chen W, Zhou Y Y, Luo P, *et al.* Molecular mechanism of petal doubling of flower in angiosperm. *Chinese Bulletin of Botany*, 2024, 59(2): 257–277.

- 陈雯, 周颖盈, 罗平, 等. 被子植物花朵重瓣化分子调控机制. 植物学报, 2024, 59(2): 257—277.
- [41] Liu Y L, Fan J Y, Chen X F, *et al.* Preliminary study on the role of *OsAP2-4* in regulating rice tillers development. Plant Physiology Journal, 2022, 58(5): 817—824.
- 刘宜林, 范均怡, 陈晓菲, 等. *OsAP2-4* 调控水稻分蘖功能的初步研究. 植物生理学报, 2022, 58(5): 817—824.
- [42] Kong Q, Low P M, Lim A R Q, *et al.* Functional antagonism of *WRI1* and *TCP20* modulates *GH3.3* expression to maintain auxin homeostasis in roots. Plants, 2022, 11(3): 454.
- [43] Li J P, Chen F J, Li Y Q, *et al.* *ZmRAP2.7*, an AP2 transcription factor, is involved in maize brace roots development. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 820.
- [44] Krizek B A, Bantle A T, Heflin J M, *et al.* *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* directly regulate floral homeotic, growth, and vascular development genes in young *Arabidopsis* flowers. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(15): 5478—5493.
- [45] Gil-Humanes J, Pistón F, Martín A, *et al.* Comparative genomic analysis and expression of the *APETALA2-like* genes from barley, wheat, and barley-wheat amphiploids. BMC Plant Biology, 2009, 9: 66.