

• 药材与资源 •

当归 AP2/ERF 转录因子家族鉴定及干旱胁迫下的表达分析

刘天乐¹, 朱田田^{1,2,3,4*}, 晋玲^{1,2,3,4}, 康舒淇¹, 张菁¹, 徐丽¹, 张帅¹, 杨白梅¹

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 西北中藏药省部共建协同创新中心, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃省珍稀中药资源评价与保护利用工程研究中心, 甘肃 兰州 730000

4. 陇药产业创新研究院, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 对当归 *Angelica sinensis* 中的 AP2/ERF 转录因子基因进行鉴定以及生物信息学分析, 并分析其在干旱胁迫下的表达差异, 以期筛选出与响应干旱胁迫相关的 *AsAP2/ERF* 基因, 为后续深入研究 2 品种当归抗逆性差异及抗性育种提供参考依据。**方法** 基于全长转录组测序数据, 利用生物信息学方法对 *AsAP2/ERF* 转录因子家族成员进行鉴定, 并分析该家族特征。基于干旱胁迫转录组数据分析 *AsAP2/ERF* 基因的表达模式, 并利用 qRT-PCR 技术进行验证。**结果** 从当归中共鉴定到 53 个 AP2/ERF 转录因子, 包括 28 个 ERF、18 个 DREB、5 个 RAV、2 个 AP2 亚家族成员。*AsAP2/ERF* 转录因子的氨基酸数量是 142~440 aa, 均为亲水性蛋白, 亚细胞定位预测结果显示多数成员定位于细胞核。基因表达模式的分析结果表明, 在响应干旱胁迫条件下, “岷归 2 号”(M2) 中表达上调的基因数量多于“岷归 1 号”(M1), 其中 8 个基因在 2 品种当归 D2 组表达差异显著, 这可能与 2 品种当归的抗旱性相关。qRT-PCR 分析结果表明, 6 个基因与干旱胁迫转录组数据基本一致。**结论** 鉴定了当归中的 AP2/ERF 转录因子家族, 探究了不同基因在干旱胁迫下的表达模式, 最终获得了 6 个响应干旱胁迫的 *AsAP2/ERF* 候选基因, 为后期开展当归抗旱功能基因的研究奠定基础。

关键词: 当归; AP2/ERF 家族; 干旱胁迫; 基因表达; 转录组

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4849-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.021

Identification of AP2/ERF transcription factor family in *Angelica sinensis* and its expression analysis under drought stressLIU Tianle¹, ZHU Tiantian^{1,2,3,4}, JIN Ling^{1,2,3,4}, KANG Shuqi¹, ZHANG Jing¹, XU Li¹, ZHANG Shuai¹, YANG Baimei¹

1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine and Tibetan Medicine Co-constructed by Gansu Province & Ministry of Education, Lanzhou 730000, China

3. Engineering Research Center for Evaluation, Protection, and Utilization of Rare Traditional Chinese Medicine Resources, Lanzhou 730000, China

4. Gansu Pharmaceutical Industry Innovation Research Institute, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective The AP2/ERF transcription factor genes in two cultivars of *Angelica sinensis* were identified and analyzed the differences in their expression under drought stress, so as to screen *AsAP2/ERF* genes related to the response to drought stress, and provide a reference basis for the subsequent in-depth study on the stress resistance differences between the two cultivars of *A. sinensis* and the breeding for drought resistance. **Methods** *AsAP2/ERF* transcription factor family members based on full-length transcriptome sequencing data were identified using bioinformatics approaches and family characterisation was analyzed.

收稿日期: 2024-01-03

基金项目: 甘肃省高校青年博士基金资助项目(2023QB094); 甘肃省科技重大专项(23ZDFA0131); 甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目(GSSYLXM05); 甘肃省科技计划项目(20JR5RA182); 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2021KCZD4); 西北中藏药省部共建协同创新中心开放基金(Xbzzy202207)

作者简介: 刘天乐(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源保护、评价与可持续利用。E-mail: 18382244052@163.com

***通信作者:** 朱田田, 副教授, 硕士生导师, 从事中药资源评价与分子生药学研究。E-mail: ztt0935@163.com

The expression patterns of *AsAP2/ERF* family members were further analyzed based on drought stress transcriptome data and the selected genes were validated by using qRT-PCR. **Results** A total of 53 *AP2/ERF* transcription factors were identified from *A. sinensis*, including 28 *ERF*, 18 *DREB*, five *RAV*, and two *AP2* subfamily members. The amino acid number of *AsAP2/ERF* transcription factors ranged from 142—440. These transcription factors were hydrophilic proteins and the prediction of subcellular location was mainly in the nucleus. The results of gene expression patterns analysis showed that more genes were up-regulated in M2 than in M1 in response to drought stress, and eight genes were significantly differentially expressed during the D2 period in the two cultivars of *A. sinensis*, which might be related to drought resistance in the two cultivars of *A. sinensis*. The results of qRT-PCR analyses showed that six genes were generally consistent with the drought stress transcriptome data. **Conclusion** In this study, *AP2/ERF* family transcription factors were identified in two cultivars of *A. sinensis*, the expression patterns of different genes under drought stress were preliminarily investigated, and finally six *AsAP2/ERF* candidate genes in response to drought stress were obtained, which lays the foundation for later studies on drought-resistant functional genes of *A. sinensis*.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; *AP2/ERF* gene family; drought stress; gene expression; transcriptome

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,是甘肃省重要道地药材之一,具有补血活血、调经止痛、润肠通便等重要功效^[1]。当归属于高山产地药材,喜冷凉湿润环境,其三叶至五叶期间需水较多,水分不充足会对当归的生长产生不利影响^[2-4]。近年来,随着全球气候变暖、极端降水等问题日趋严重,干旱风险增加^[5-6],对当归的生长发育及产量造成严重危害。“岷归 1 号”(M1)为甘肃省主栽品种,其叶呈深绿色,叶柄和茎呈淡紫红色;而种植面积逐年扩大的“岷归 2 号”(M2),其叶柄、叶脉和茎则均呈绿色。研究发现 2 品种当归中的黄酮类、阿魏酸、藁本内酯等代谢物含量均存在差异,而其茎叶色差异主要是由类黄酮的代谢差异引起^[7-9]。

AP2/ERF (*APETALA2/ethylene-responsive element binding factor*) 基因家族是植物中常见的转录因子家族之一,已成为响应多种胁迫和参与激素信号传导的关键调节因子,在植物抗逆性选育工程方面具有重要应用价值^[10]。*AP2/ERF* 转录因子家族成员至少包含 1 个高度保守的 *AP2* 结构域,该结构域由 60~70 个氨基酸组成,可以直接通过与顺式作用元件相互作用来调节靶基因的表达^[11]。根据 *AP2* 和其他保守结构域的数量或结构不同,通常将 *AP2/ERF* 家族分为 *AP2*、*ERF*、*DREB*、*RAV* 以及 *Soloist* 等 5 个亚家族^[12]。目前,*AP2/ERF* 基因已在多种植物中被鉴定和验证功能,大量研究表明该家族成员与调节干旱、高温、盐等逆境胁迫响应过程^[13-18]以及调控类黄酮、萜类、生物碱类等次生代谢产物合成途径^[19-20]密切相关。

本研究基于当归全长转录组鉴定了其 *AP2/ERF* (*AsAP2/ERF*) 转录因子家族成员,并对这些成员进行

理化性质、蛋白结构、系统发育、保守基序、顺式作用元件等生物信息学分析;M1 和 M2 为目前当归的主栽品种,通过分析其在干旱胁迫下的转录组数据,筛选 *AsAP2/ERF* 基因进行 qRT-PCR 验证,为解析当归中 *AP2/ERF* 基因响应干旱胁迫的分子机制、发掘当归抗旱关键基因以及培育当归抗逆新品种奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

当归样品“岷归 1 号”(M1)和“岷归 2 号”(M2)均采自甘肃省定西市临洮县峡口镇谷家沟村(海拔 2 708 m; 35°37'52.22"N, 104°7'10.13"E),经甘肃中医药大学中药资源教研室晋玲教授鉴定为伞形科植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels。qRT-PCR 试验使用的植物材料与测量干旱胁迫转录组数据的样品为同一批次。

1.2 仪器

FTC-3000P 型荧光定量 PCR 仪(加拿大 Funglyon Biotech 公司)、Q5000 型微量紫外可见光分光光度计(美国 Quawell 公司)、TOne 96G 型梯度 PCR 扩增仪(德国 Analytik Jena 公司)。

2 方法

2.1 *AsAP2/ERF* 转录因子家族的筛选及鉴定

从 Pfam (<http://pfam.xfam.org>) 网站获得 *AP2/ERF* 转录因子的隐马尔可夫模型(PF00847),并在 HMMER3.0 软件中 *hmmsearch* 程序搜索当归转录组文件中含有 *AP2/ERF* 结构域的蛋白序列,E-value 值设为 0.001。从 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)中获得的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *AP2/ERF* 蛋白序列为探查序列,使用本地 BLASTP 程序进行序列比对,合并 HMMER 和

BLASTP 结果删除冗余序列,得 AsAP2/ERF 蛋白候选序列。将得到的候选序列进一步在植物转录因子数据库 (<http://planttfdb.gao-lab.org/prediction.php>) 进行鉴定,并将鉴定结果提交至 SMART (<https://smart.embl.de/>) 和 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库,对其保守结构域进行验证,去除结构域不完整的序列后,得到含有 AP2 结构域的当归蛋白序列。

2.2 理化性质和结构分析

通过 ExPASy (<https://web.expasy.org/>) 网站对当归 AsAP2/ERF 转录因子的基本理化性质进行预测;利用 Cell-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 网站进行亚细胞定位分析;采用 Prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html) 和 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 网站对蛋白质的二级结构进行预测;使用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 网站进行蛋白质 3D 建模。

2.3 系统发育分析

使用 MEGA11.0 软件中内置的 ClustalW 程序对 53 条 AsAP2/ERF 和 135 条 AtAP2/ERF 蛋白序列进行比对分析。选用邻接 (neighbor joining, NJ) 法构建系统发育树,并运用自举评估 (bootstrap) 方法进行 1 000 次重复;采用配对状态删除 (pairwise deletion) 的方式处理缺失值,将其他参数设置为默认值;借助在线工具 EvolView (<https://evolgenius.info/evolview-v2/>) 对获得的进化树进行美化。

2.4 保守基序和保守结构域分析

利用 MEME (<http://meme.suite.org/tools/meme>) 在线软件对 53 个 AsAP2/ERF 转录因子家族成员进行保守基序的鉴定,保守基序的数目限制设置为 8;

利用 Batch CD-Search 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 查找多序列的保守结构域;使用 TBtools 软件 (version 1.09876) 对两者分析结果进行可视化。

2.5 顺式元件分析

从课题组当归基因序列文件中获得 AsAP2/ERF 转录因子对应的 CDS (Coding sequences) 序列,提交到 Plant-CARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站进行顺式作用元件的预测,筛选后使用 TBtools 软件对顺式作用元件进行可视化。

2.6 AsAP2/ERF 基因在干旱胁迫下表达分析

基于干旱胁迫转录组数据分析 53 个 AsAP2/ERF 家族成员在不同干旱胁迫下的表达模式。筛选到 8 个 AP2/ERF 基因进行 qRT-PCR 验证试验。研究选用 *actin* 作为内参基因^[21],运用 NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 网站设计引物 (表 1),委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。将当归叶片在液氮中研磨成粉末,总 RNA 提取使用 Omega 公司生产的 Plant RNA Kit R6827 试剂盒;反转录为 cDNA 使用天根生化科技 (北京) 有限公司生产的 FastKing RT Kit (KR116) 试剂盒;qRT-PCR 定量使用天根生化科技 (北京) 有限公司生产的 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (FP205) 试剂盒。采用 FTC-3000P 型荧光定量 PCR 仪,反应程序设定为:95 ℃变性 10 min;95 ℃、15 s,55 ℃、20 s,72 ℃、30 s,循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量,并使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行数据统计和分析作图。

2.7 转录组数据分析

2.7.1 全长转录组数据

本研究所用的当归全长转

表 1 AsAP2/ERF 实时荧光定量实验引物
Table 1 qRT-PCR primers for AsAP2/ERF genes

基因名称	引物序列 (5'→3')	
	正向引物	反向引物
As-03ERF	CGACGTTGTTAAGCCGGAAC	CCTTAACCGGAGGTGAAGCC
As-08DREB	ACATTGGCCGAGGGAAAGAG	TTGACCCGATACAGGCGATG
As-18ERF	CGAGCCACCCATCAAAGCTA	CTCACTCGCCCCCTTGCTAAG
As-24DREB	TGCTCAACATCAACAAGCCC	TCGGTTGAACCATGTAGCTGT
As-35ERF	TGAGGCAAGGAGAATTCGGG	TTGAACCCTGGGGTTTGGT
As-46DREB	CTGAGCCTACAACTCCGGG	CGCGGGTCTTTTGGTTTGT
As-51RAV	GGGATTGAATGCTGGTGACA	ACAACCTGACCATCTCGACG
As-53RAV	AAAGGTTGGAGCCGGTTTGTT	CCGAACCGGAGCAAAATCAAC
<i>actin</i>	TGGTATTGTGCTGGATTCTGGT	TGAGATCACCACCAGCAAGG

录组数据来源于课题组前期研究^[7], 当归全长转录组参考序列数据已上传于 NCBI (Access: PRJNA782300)。

2.7.2 干旱胁迫转录组数据 本研究所用的当归干旱胁迫转录组数据来源于课题组前期研究, 已上传于 NCBI (Access: PRJNA1089806)。采用的干旱胁迫处理如下: 培育至生长出 3 片真叶后, 选取长势一致、健康的当归植株进行试验。试验前对植株给予充足的水分, 保证正常生长。将植株随机分为 4 组, 对照组 (CK) 的土壤湿度控制为 60%~65%, 干旱胁迫组 (D1~D3) 的土壤湿度分别为 50%~55%、40%~45%、30%~35%, 每日使用土壤酸碱度计测定土壤湿度。分别采收对照组和干旱胁迫组的当归叶片, 每个样品 3 次生物学重复, 洗净后用液氮速冻, 置于 -80 °C 保存备用。

3 结果与分析

3.1 AsAP2/ERF 家族鉴定、理化性质及结构分析

将 HMMER 和 BLASTP 结果合并后共筛选出 90 条 AsAP2/ERF 蛋白候选序列, 经过保守结构域预测, 剔除没有 AP2 结构域的蛋白序列, 最终鉴定得到 53 条 AsAP2/ERF 家族成员。根据保守结构域预测结果

对这些家族成员进行初步分类并按顺序编号。

理化性质分析结果表明 (表 2), 氨基酸数量从 142 aa 到 440 aa 不等, 相对分子质量最小为 15 649 880, 最大为 49 543 980。等电点为 4.59~9.84, 其中等电点 ≥ 7.0 的 AP2/ERF 家族成员有 29 个, < 7.0 的成员有 24 个, 说明含有较多碱性氨基酸。不稳定系数结果表明有 10 个家族成员为稳定蛋白, 其编号分别为 As-21ERF、As-23ERF、As-25ERF、As-28ERF、As-35ERF、As-37ERF、As-41ERF、As-49RAV、As-50RAV、As-51RAV。该家族成员亲水性平均值都为负值, 均是亲水性蛋白。亚细胞定位结果显示有 50 个家族成员定位于细胞核, 这与多数转录因子的报道相一致。

53 条 AsAP2/ERF 家族转录因子家族成员的二级结构预测以及 3D 建模结果表明, 蛋白质二级结构由 α -螺旋、延伸链、 β -转角以及无规则卷曲组成 (表 2), 这些结构与蛋白质的功能和结构稳定性密切相关。ERF 和 DREB 亚家族的蛋白质三级结构较为相似 (图 1), 而 AP2、RAV 亚家族的结构均与其他亚家族有较大差异, 这与 AP2/ERF 亚家族分类的特征相符合。

表 2 AsAP2/ERF 蛋白基本信息及理化性质预测

Table 2 Basic information and physicochemical properties prediction of AsAP2/ERF protein

基因 ID	编号	亚细胞定位	氨基酸	相对分子质量	等电点	不稳定系数	亲疏水性	α -螺旋/%	延伸链/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
Isoform0024121	As-01AP2	Nu	397	44 892.02	9.17	60.70	-0.733	27.42	9.32	4.79	51.80
Isoform0016641	As-02AP2	Cy/Nu	440	49 543.98	9.37	51.58	-0.849	26.19	12.50	4.77	59.55
Isoform0026581	As-03ERF	Nu	266	29 180.03	8.35	61.29	-0.488	21.39	13.16	2.63	62.78
Isoform0032392	As-04ERF	Nu	181	20 347.94	9.30	57.32	-0.608	24.05	9.39	6.08	43.65
Isoform0029986	As-05DREB	Cy/Nu	217	24 398.53	7.56	48.64	-0.605	13.24	12.44	1.84	52.07
Isoform0019593	As-06DREB	Nu	299	33 713.93	6.54	50.72	-0.656	21.13	10.37	2.34	59.87
Isoform0018811	As-07DREB	Nu	336	37 209.72	6.97	50.00	-0.568	19.68	8.93	2.68	62.20
Isoform0016970	As-08DREB	Nu	360	39 640.87	6.01	49.46	-0.741	23.89	11.67	2.50	64.44
Isoform0027749	As-09ERF	Nu	291	32 569.28	6.01	49.02	-0.659	31.80	14.43	3.78	57.73
Isoform0030236	As-10ERF	Nu	204	22 491.17	8.70	49.38	-0.605	20.13	17.65	3.92	65.20
Isoform0028173	As-11ERF	Nu	194	21 421.81	7.71	54.13	-0.646	33.83	14.43	3.61	60.82
Isoform0024553	As-12ERF	Nu	310	34 484.27	5.92	46.99	-0.715	20.10	7.74	4.52	68.06
Isoform0023406	As-13ERF	Nu	293	32 433.16	5.84	57.49	-0.529	19.59	9.22	3.75	63.14
Isoform0032270	As-14ERF	Nu	217	24 376.64	9.47	53.88	-0.871	20.39	5.99	2.30	59.91
Isoform0032826	As-15ERF	Nu	149	16 462.58	7.93	50.65	-0.483	26.19	8.05	4.70	67.11
Isoform0029313	As-16ERF	Nu	266	30 268.22	8.47	56.38	-0.939	18.50	9.77	3.01	53.38
Isoform0030332	As-17ERF	Nu	209	22 645.35	9.84	58.85	-0.519	20.18	21.05	5.26	53.59
Isoform0027695	As-18ERF	Nu	291	32 087.55	6.60	44.75	-0.750	31.58	7.56	4.47	68.38
Isoform0023296	As-19ERF	Nu	206	22 601.28	8.85	50.58	-0.674	37.11	12.14	4.37	63.11
Isoform0019776	As-20ERF	Nu	210	23 186.09	8.37	55.84	-0.670	22.89	14.76	5.24	53.81
Isoform0024754	As-21ERF	Cy/Nu	319	35 452.77	6.16	37.80	-0.553	12.09	13.48	1.57	66.46
Isoform0017840	As-22ERF	Cy/Nu	342	38 543.84	4.92	48.98	-0.656	33.91	9.36	1.75	68.71
Isoform0010688	As-23ERF	Cy/Nu	399	44 048.03	4.59	52.57	-0.608	20.13	10.78	2.76	54.89
Isoform0025222	As-24DREB	Cy/Nu	291	32 788.02	7.00	42.08	-0.534	28.86	8.25	2.41	52.23
Isoform0032515	As-25ERF	Nu	201	22 275.17	9.57	37.21	-0.626	30.80	8.46	1.00	67.66
Isoform0028105	As-26ERF	Nu	215	23 841.61	7.73	53.11	-0.628	42.04	26.05	7.91	53.95
Isoform0024797	As-27DREB	Cy/Nu	289	32 189.29	8.69	47.09	-0.461	26.78	9.34	3.46	53.29
Isoform0024155	As-28ERF	Nu	313	34 668.67	5.35	37.04	-0.548	18.25	11.82	1.28	66.77
Isoform0015385	As-29ERF	Cy/Nu	343	38 946.73	5.44	49.58	-0.813	31.23	10.79	1.46	58.89
Isoform0029348	As-30ERF	Nu	263	29 621.26	9.04	47.86	-0.813	25.67	9.89	1.52	57.79

表 2 (续)

基因 ID	编号	亚细胞定位	氨基酸	相对分子质量	等电点	不稳定系数	亲疏水性	α -螺旋%	延伸链%	β -转角%	无规则卷曲%
Isoform0031888	As-31ERF	Nu	157	17 822.01	9.36	63.65	-0.781	26.83	10.83	4.46	42.68
Isoform0021742	As-32DREB	Nu	239	26 203.26	9.24	45.00	-0.834	27.15	14.64	4.60	53.97
Isoform0026469	As-33ERF	Nu	274	31 234.89	5.52	57.43	-0.719	25.25	19.34	4.74	57.66
Isoform0025351	As-34DREB	Nu	365	40 944.99	7.63	50.08	-0.627	31.93	6.58	1.10	61.10
Isoform0011273	As-35ERF	Nu	374	41 159.33	4.98	36.29	-0.767	28.44	7.22	3.21	63.90
Isoform0018531	As-36DREB	Nu	369	40 972.23	4.91	48.74	-0.839	28.45	8.67	4.61	59.89
Isoform0008222	As-37ERF	Nu	291	32 407.55	4.71	36.42	-0.750	32.19	8.59	3.09	61.17
Isoform0028562	As-38DREB	Cy/Nu	198	21 841.53	7.04	48.76	-0.523	27.63	13.64	5.56	55.56
Isoform0004250	As-39DREB	Cy	285	31 753.98	5.61	46.47	-0.605	25.48	15.79	8.77	43.51
Isoform0026846	As-40DREB	Cy/Nu	211	23 399.26	5.99	44.50	-0.495	25.00	11.85	4.74	54.98
Isoform0021994	As-41ERF	Nu	362	40 292.23	4.98	39.98	-0.754	30.20	8.56	3.87	59.12
Isoform0007908	As-42DREB	Cy	320	35 848.51	5.67	43.05	-0.601	30.99	17.19	9.06	41.56
Isoform0027692	As-43DREB	Cy/Nu	228	25 479.01	4.85	64.10	-0.844	25.00	12.28	1.75	58.33
Isoform0027907	As-44DREB	Nu	208	23 028.89	9.30	81.13	-0.693	21.58	14.42	5.77	54.33
Isoform0028804	As-45DREB	Cy/Nu	224	25 151.80	4.99	60.32	-0.749	24.58	12.05	0.89	62.05
Isoform0027956	As-46DREB	Cy/Nu	245	27 116.84	5.23	53.68	-0.732	22.19	11.84	3.67	54.29
Isoform0029607	As-47DREB	Cy/Nu	142	15 649.88	9.67	23.49	-0.595	34.28	13.38	4.23	51.41
Isoform0024176	As-48RAV	Nu	340	38 562.82	9.58	42.12	-0.617	23.48	18.24	6.76	50.00
Isoform0026618	As-49RAV	Nu	329	37 188.25	9.51	30.75	-0.553	27.42	20.36	7.29	50.76
Isoform0024237	As-50RAV	Nu	358	40 214.54	9.20	35.58	-0.522	26.19	19.27	5.87	50.28
Isoform0021428	As-51RAV	Nu	347	39 085.13	9.21	32.17	-0.658	21.39	18.16	5.19	54.47
Isoform0018766	As-52ERF	Cy	353	40 492.74	5.42	55.15	-0.720	24.05	14.16	6.23	45.33
Isoform0025483	As-53RAV	Nu	362	41 193.55	9.20	40.14	-0.645	13.24	21.27	5.25	50.00

Nu-细胞核; Cy-细胞质。

Nu-Nuclear; Cy-Cytoplasm.

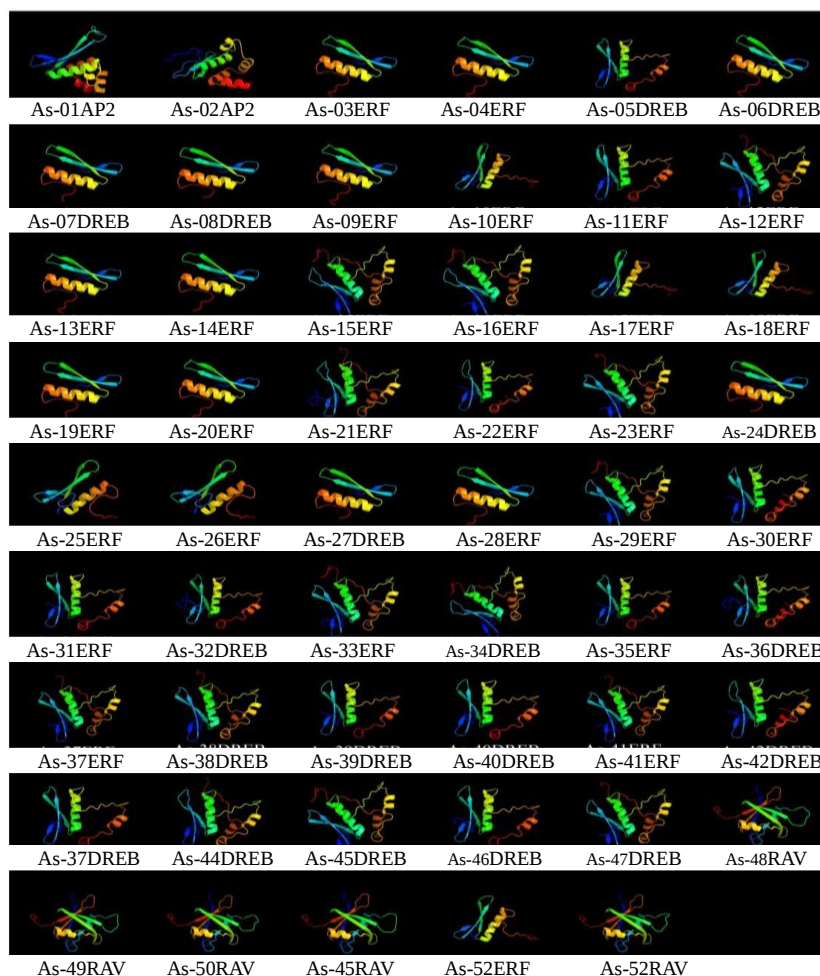


图 1 AsAP2/ERF 基因家族蛋白质三级结构

Fig. 1 Tertiary structure of AsAP2/ERF genes family

3.2 AsAP2/ERF 家族系统进化分析

将 53 个 AsAP2/ERF 预测蛋白序列与 135 个 AtAP2/ERF 转录因子构建 NJ 进化树 (图 2), 发现 AsAP2/ERF 各亚家族成员可与 AtAP2/ERF 各亚家族

成员有规律地聚集为 4 个亚家族, 其中 AP2 亚家族包含 2 个成员、RAV 亚家族包含 5 个成员、ERF 亚家族包含 28 个成员以及 18 个 DREB 亚家族成员, 该结果与根据保守结构域预测分类的成员编号一致。

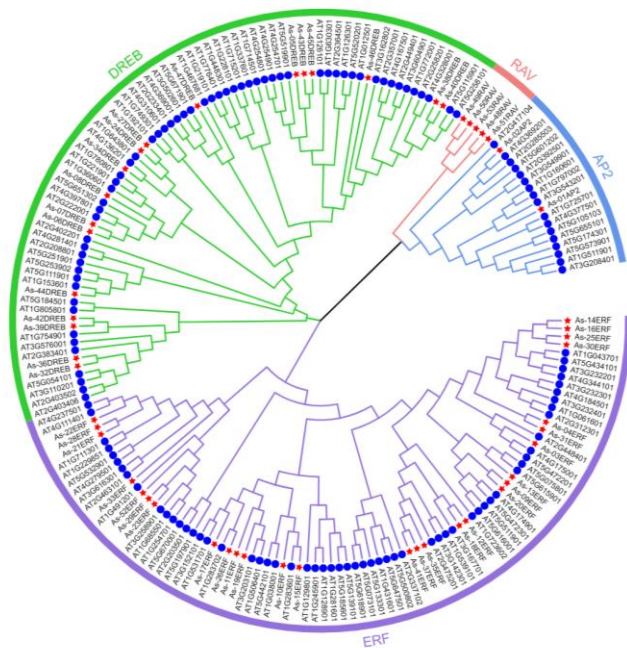


图 2 当归和拟南芥中 AP2/ERF 家族的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of AP2/ERF family between *A. sinensis* and *Arabidopsis thaliana*

3.3 AsAP2/ERF 转录因子保守基序和保守结构域分析

利用 TBtools 软件结合进化树对 AsAP2/ERF 蛋白的保守基序结果进行可视化分析 (图 3), 共获得 8 个保守基序。所有蛋白均含有 Motif1 和 Motif4, 表明 Motif1 和 Motif4 是构成 AP2/ERF 结构域的主要基序。同时, 相同亚家族基因的保守基序呈现高度相似性, 这可能导致这些亚家族成员具有类似的生物学功能。AP2 亚家族成员都具有 2 个 Motif1; 5 个 RAV 亚家族成员的保守基序较多, 都含有 Motif1、Motif3、Motif4、Motif5、Motif6、Motif7; 大部分 ERF 和 DREB 亚家族成员都特有 Motif2, 而 As-14ERF、As-16ERF、As-25ERF、As-30ERF 特有 Motif8, As-39DREB、As-42DREB 特有 Motif5, 推测这 6 个基因发挥更特殊的生物学功能。保守结构域分析的结果表明 AsAP2/ERF 的保守结构域种类、数量与系统发育进化分析结果一致。

3.4 AsAP2/ERF 基因家族的顺式响应元件分类特点

利用 PlantCARE 数据库对 53 个 AsAP2/ERF

基因家族成员的 CDS 序列进行了顺式作用元件分析, 共检测到 565 个特异元件 (图 4)。其中, 大部分 AsAP2/ERF 基因家族成员中存在光响应元件, 这提示光可能在调控 AsAP2/ERF 表达中发挥着重要的作用。AsAP2/ERF 家族成员还广泛参与了不同植物激素的信号途径, 如 22.64% 的家族成员具有赤霉素响应元件, 22.64% 的家族成员含有生长素响应元件, 67.92% 的家族成员含有茉莉酸甲酯响应元件, 56.60% 的家族成员含有脱落酸响应元件, 30.18% 的家族成员含有水杨酸响应元件。与非生物逆境胁迫相关的元件主要有 4 种类型, 47.17%、39.62%、50.94%、13.2% 的 AsAP2/ERF 家族成员分别含有与厌氧诱导、干旱诱导、低温响应以及防御和应激响应相关的顺式作用元件, 该结果验证了 AP2/ERF 基因家族对非生物逆境的响应具有多样性。此外, 还鉴定到了胚乳表达、分生组织表达以及调控类黄酮生物合成的相关元件。这些结果表明, AsAP2/ERF 基因可能在植物光合作用、激素信号调控、逆境胁迫响应等途径中发挥了重要作用。

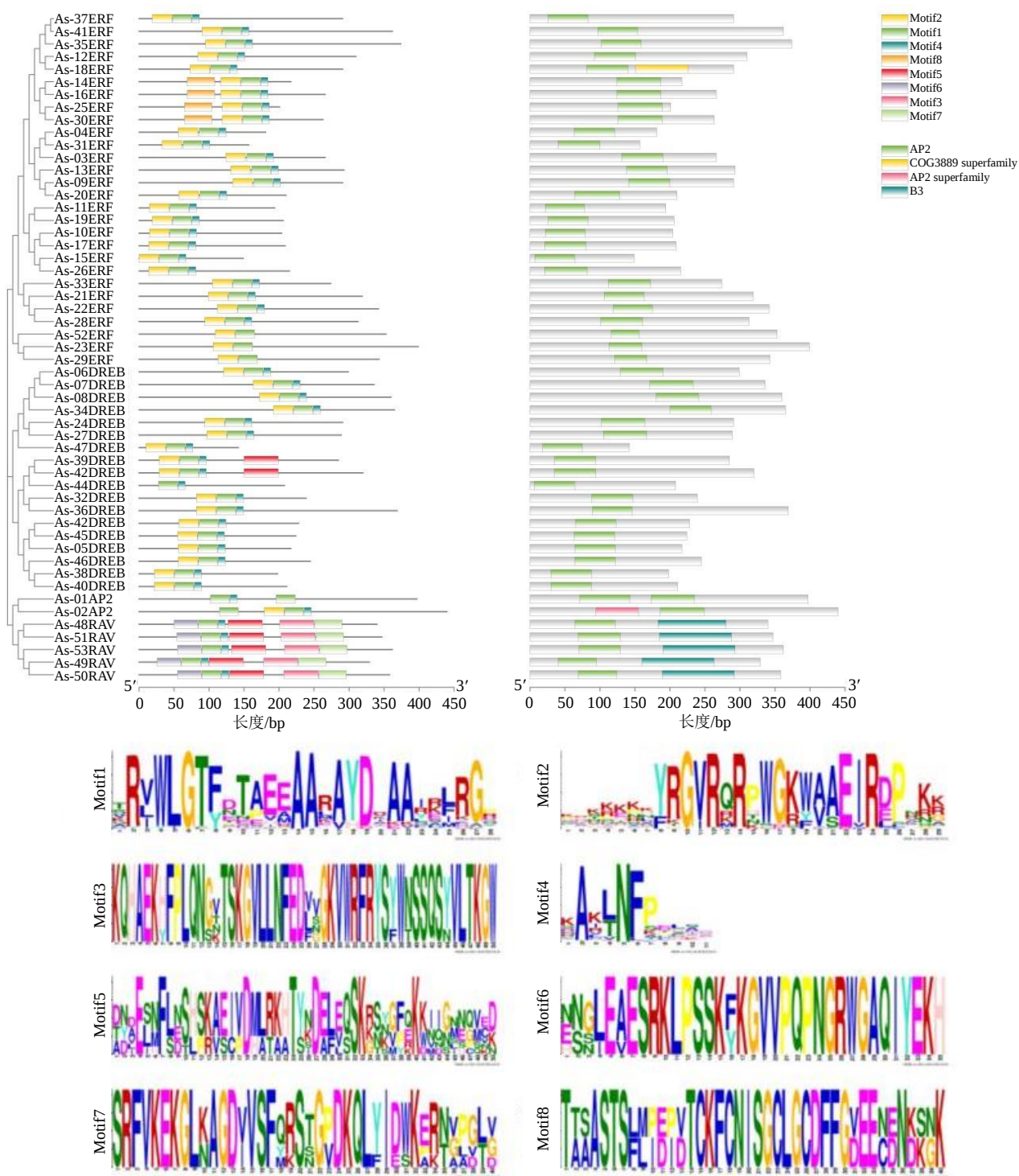


图 3 AsAP2/ERF 蛋白的保守结构域和保守基序

Fig. 3 Conserved domains and conserved motifs of AsAP2/ERF proteins

3.5 AsAP2/ERF 基因在干旱胁迫下表达分析

分析当归干旱胁迫转录组数据, 结果检测到 53 个基因在各组中均有表达, 构建表达热图 (图 5) 进行趋势分析, 探讨不同干旱胁迫下 2 品种当归中 AP2/ERF 基因的动态变化 (图 6)。从干旱胁迫响

应热图看出, 与 M1 相比, M2 在响应干旱胁迫过程中表达上调的基因数量更多, 且在 D2 组上调最为明显。随着干旱胁迫增加, M2 中基因表达量的主要趋势为先升后降, 在 D2 组达到最高, 共有 14 个基因; 第 2 类趋势是基因表达量在 D1 组增加后,

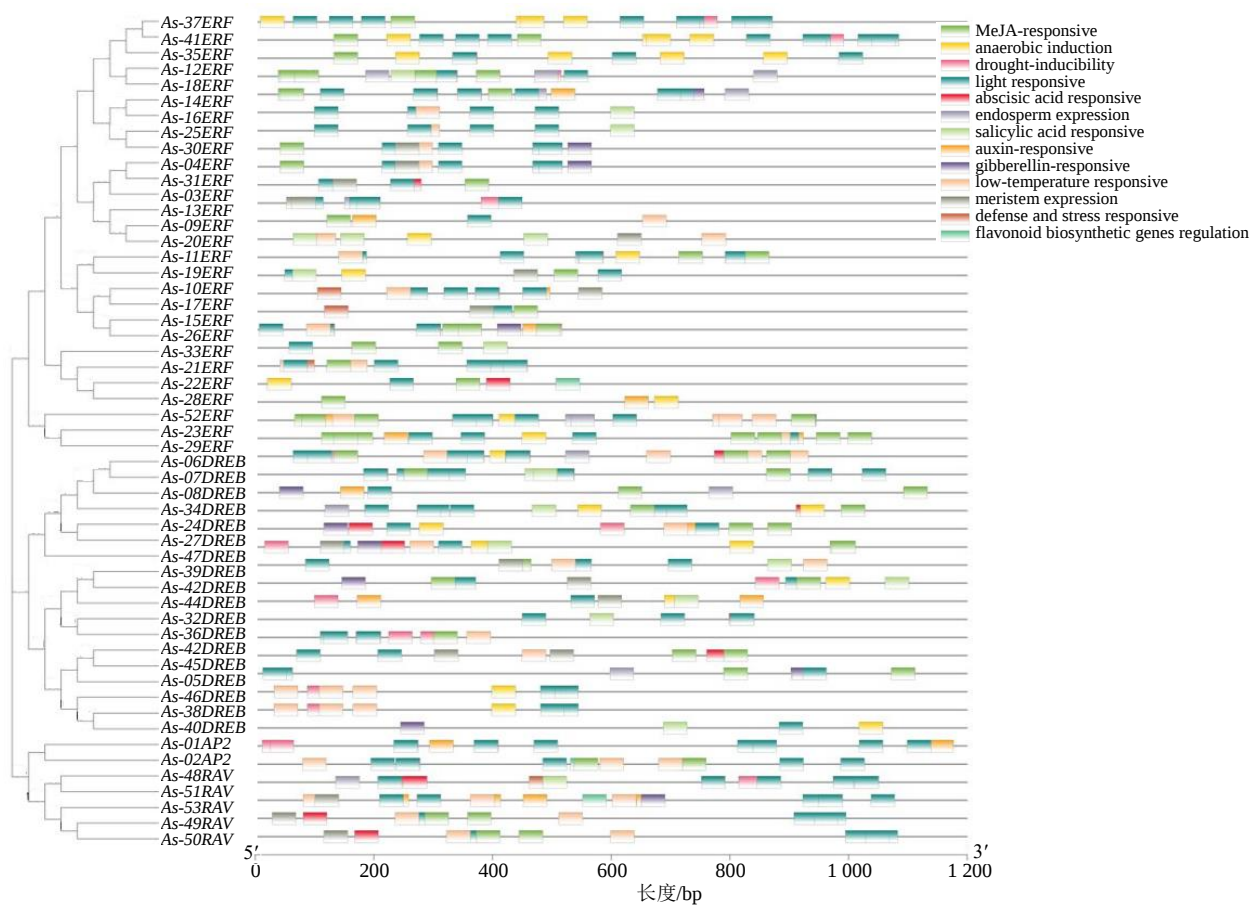


图 4 *AsAP2/ERF* 基因顺式作用元件
Fig. 4 Cis-acting elements of *AsAP2/ERF* genes

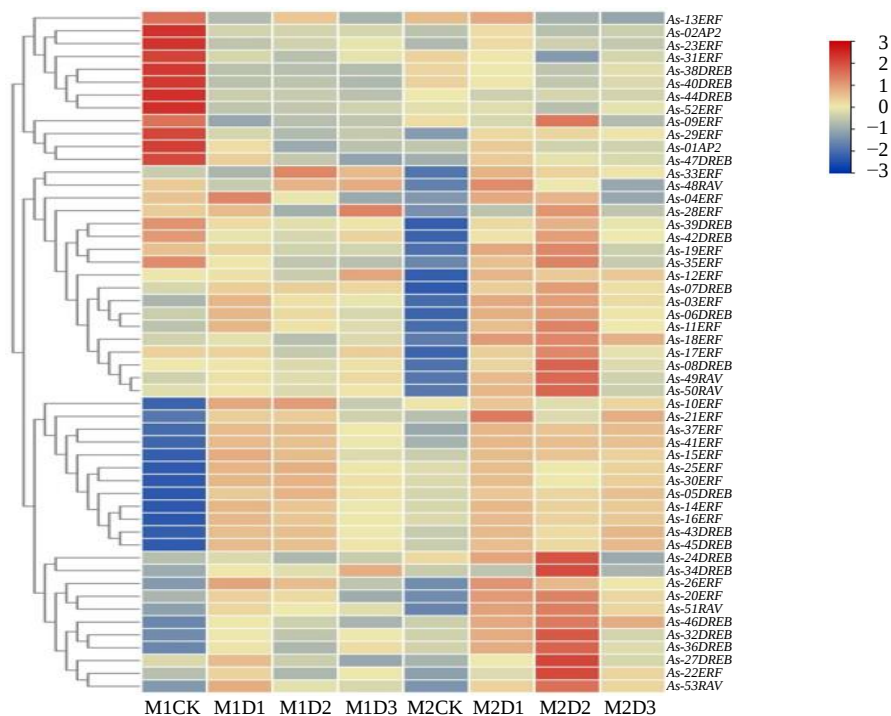


图 5 2 品种当归中 *AP2/ERF* 基因的干旱胁迫响应热图
Fig. 5 Heat map of drought stress response of *AP2/ERF* genes in two varieties

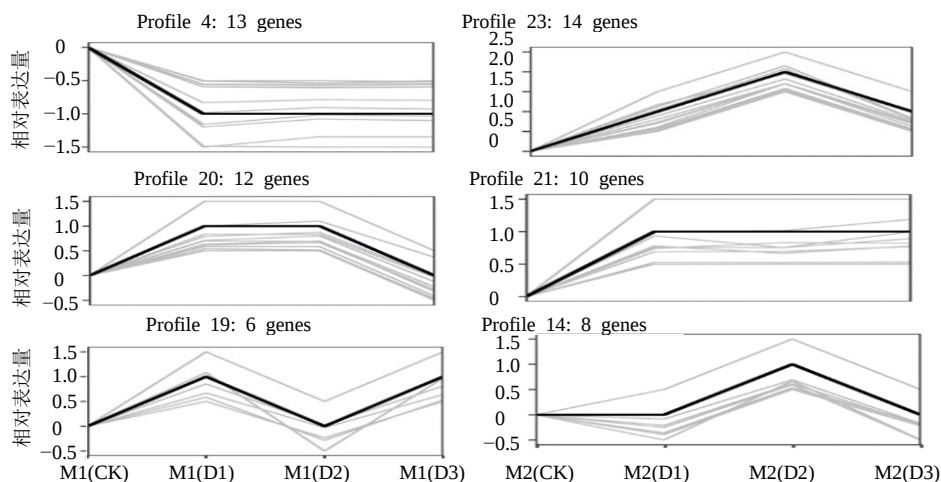


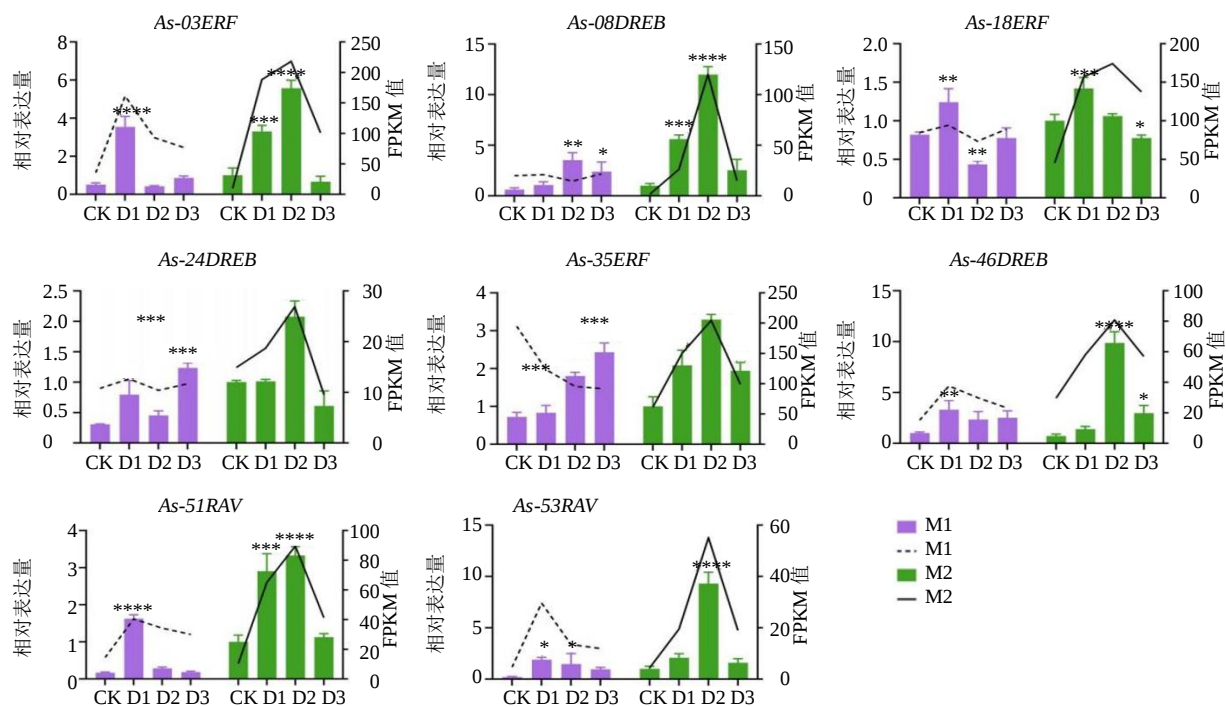
图 6 2 品种当归中 *AP2/ERF* 基因的表达趋势

Fig. 6 Expression trends of *AP2/ERF* genes in two varieties

D2、D3 组无显著变化，共有 10 个基因；第 3 类趋势是基因表达量仅在 D2 组显著上调，这类基因共有 8 个。而在 M1 中，主要趋势为基因表达量在 D1 组下降后，D2、D3 组无显著变化，共有 13 个基因；第 2 类趋势为先升后降，D1、D2 组为上调表达，共有 12 个基因；第 3 类是在 3 个干旱胁迫时期先升

后降再升的趋势，共有 6 个基因。

根据 2 品种当归中 *AP2/ERF* 基因在 D2 组的表达差异 ($\log_2 \text{Fold change} \geq 2$) 以及其整体表达趋势，共筛选出 8 个 *AsAP2/ERF* 基因 (*As-03ERF*、*As-08DREB*、*As-18ERF*、*As-24DREB*、*As-35ERF*、*As-46DREB*、*As-51RAV*、*As-53RAV*) 进行 qRT-PCR 验证 (图 7)。



与同品种对照 (CK) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ 。柱状图为 *AsAP2/ERFs* 差异基因的相对表达量; 折线图为 *AsAP2/ERFs* 差异基因 FPKM 值。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$, vs control group (CK) of same variety. Bar graph shows the relative expression of *AsAP2/ERFs* differential genes; the fold plot shows the FPKM values of the *AsAP2/ERFs* differential genes.

图 7 干旱胁迫下 2 品种当归中 *AP2/ERF* 基因表达情况

Fig. 7 *AP2/ERF* gene expression in two varieties of *A. sinensis* under drought stress

在干旱胁迫下, 6 个 *AsAP2/ERF* 基因 (*As-03ERF*、*As-08DREB*、*As-24DREB*、*As-46DREB*、*As-51RAV*、*As-53RAV*) 表达谱与转录组数据 (FPKM) 基本一致, 在 M2 的 D2 时期均呈现不同程度地表达上调。

4 讨论

课题组前期研究^[7-8]发现, M1 和 M2 在表型上的差异主要是由类黄酮成分的代谢差异引起, 该物质与植物的抗逆性密切相关^[22]; 进一步通过对 2 品种当归转录组测序差异比较分析, 发现它们在脱落酸调节、渗透调节、活性氧清除和其他功能蛋白质调节等抗旱途径方面存在一定的差异性。逆境胁迫会诱导转录因子大量表达, 转录因子通过感知胁迫信号和调控下游基因表达, 能够调节防御相关次生代谢产物的特异性累积, 从而帮助植物抵抗环境压力^[23]。*AP2/ERF* 转录因子家族能够广泛参与调控植物对各种逆境胁迫的应答反应, 在已报道^[24]的相关研究中, 发现该家族在不同植物间的成员数量、结构、功能都存在显著差异。因此, 对当归 *AP2/ERF* 基因家族的鉴定、生物信息学分析和以及干旱胁迫下的表达分析, 有助于深入研究当归特有的生物学过程。

本研究基于当归全长转录组数据, 共鉴定到 53 个 *AsAP2/ERF* 家族成员, 根据保守结构域特点将其可分为 4 类, 包括了 28 个 *ERF*、18 个 *DREB*、5 个 *RAV* 以及 2 个 *AP2*。大量研究表明, *ERF*、*DREB* 以及 *RAV* 等亚家族成员能够在干旱胁迫响应过程中发挥重要调控作用。例如, 将从藜麦 *Chenopodium quinoa* Willd 中分离得到的 *CqERF24* 在拟南芥中过表达, 可增加抗氧化酶活性和激活其他响应胁迫的相关基因, 进而增强拟南芥的抗旱性^[24]; 甘蔗 *Saccharum officinarum* L. 中的 *ScDREB2B-1* 基因在烟草中过表达, 可通过调节 ABA 信号传导、活性氧水平以及胁迫相关基因的表达来响应干旱胁迫^[25]; 烟草 *Nicotiana tabacum* L. 中的 *NtRAV4* 能够通过激活抗氧化系统及相关基因表达, 维持活性氧系统稳定并减少水分流失, 从而调控植株在干旱胁迫下的耐受性^[26]。此外, 在干旱胁迫下, 植物可以通过诱导体内类黄酮的累积, 从而提高植物的抗旱性, 以帮助植物适应环境^[27]。如柑橘 *Citrus reticulata* L. 中的 *CitERF32*、*CitERF33* 和 *CitRAV1* 可通过正向调节 *CitCHIL1* 的表达, 以提高类黄酮的合成^[28]; *MdERF38* 能够与花青素生物合成的正调节因子 *MdMYB1* 相互作用, 进而促进苹果 *Malus domestica* cv. Gala 花青素在干旱胁迫

下的生物合成^[29]。本研究通过分析 2 品种当归中的干旱胁迫转录组数据和 qRT-PCR 结果, 筛选出 6 个 *AsAP2/ERF* 转录因子 (*As-03ERF*、*As-08DREB*、*As-24DREB*、*As-46DREB*、*As-51RAV*、*As-53RAV*), 这些基因在干旱胁迫下表达水平均上调, 推测这些转录因子在当归响应干旱胁迫过程中发挥关键作用。

本研究鉴定了 *AsAP2/ERF* 转录因子家族成员, 对其基本性质、分布、分类、结构、进化特征和干旱相关表达谱均进行了较为详细的分析。这些家族成员的亚细胞定位情况与多数植物转录因子相似, 大部分位于细胞核内, 少部分存在于细胞质中, 表明该家族中成员可能在当归生长发育过程中行使着不同功能。通过 Motif 预测分析, 发现 *AsAP2/ERF* 转录因子家族成员具有较多且较为复杂的 Motif, 可能参与调控多种不同基因; 每个 *AsAP2/ERF* 转录因子含有 3~6 个不等的保守基序, 不同成员间保守基序的数量与分布不同可能揭示了基因的不同功能, 其中 Motif1 和 Motif4 存在于所有 *AsAP2/ERF* 蛋白中, 具有高度保守性, 推测这 2 个 Motif 组成了 AP2 结构域。顺式作用元件能反映基因的潜在功能和调控途径, 从 *AsAP2/ERF* 顺式元件的种类和数量进行分析, 它们主要参与了植物光合作用、激素调节以及非生物胁迫的响应, 其中光响应元件、茉莉酸甲酯响应元件和脱落酸响应元件所占比例最多。通过分析干旱胁迫下的 M1 和 M2 中 *AP2/ERF* 基因的表达模式, 发现有 6 个基因在 M2 的 D2 时期表达量均明显上调, 将这些基因作为研究 2 品种当归响应干旱胁迫分子机制的候选基因, 为进一步探索当归抗旱调控机制及培育抗逆能力更强的当归品种提供数据支持和理论参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 139.
- [2] 刘天乐, 朱田田, 张明惠, 等. 当归活性成分生物合成与调控研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7545-7553.
- [3] 张婷, 李强. 岷县当归种植的气候资源分析 [J]. 南方农机, 2023, 54(4): 54-56.
- [4] 武延安, 蔺海明, 赵贵宾, 等. 遮光对当归栽培的效应 [J]. 中药材, 2008, 31(3): 334-336.
- [5] 杜一博, 李双双, 冯典, 等. 全球变暖背景下陕西省夏季极端降水及其大尺度环流特征 [J]. 高原气象, 2024, 43(2): 342-352.

- [6] 菅煜婷, 张勃, 黄浩. 近 58 年甘肃气候变化区域差异分析及环流影响 [J]. 高原气象, 2022, 41(5): 1291-1301.
- [7] Zhu T T, Zhang M H, Su H Y, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic analysis reveals differential mechanism of flavonoid biosynthesis in two cultivars of *Angelica sinensis* [J]. *Molecules*, 2022, 27(1): 306.
- [8] 徐丽, 朱田田, 晋玲, 等. 基于混合测序策略的 2 品种当归中类黄酮调控基因差异分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(1): 141-147.
- [9] 荔淑楠, 王引权, 王富胜, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的不同品种当归代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 138-147.
- [10] Xie Z L, Nolan T M, Jiang H, *et al.* AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 228.
- [11] 悦曼芳, 张春, 吴忠义. 植物转录因子 AP2/ERF 家族蛋白结构和功能的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(12): 11-26.
- [12] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, *et al.* Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 411-432.
- [13] 董晓旭, 贾红卫, 谢世兴, 等. 植物 AP2/EREBP 转录因子及其生物学功能 [J/OL]. 分子植物育种, (2023-06-09) [2023-11-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230608.1300.002.html>.
- [14] Geng L Z, Ren J, Ji X L, *et al.* Over-expression of DREB46 enhances drought tolerance in *Populus trichocarpa* [J]. *J Plant Physiol*, 2023, 281: 153923.
- [15] 郑佳秋, 王薇薇, 梅赓, 等. 辣椒 DREB 转录因子鉴定及其在涝害胁迫下的表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 148-159.
- [16] Zha Q, Yin X J, Xi X J, *et al.* Heterologous VvDREB2c expression improves heat tolerance in *Arabidopsis* by inducing photoprotective responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5989.
- [17] Hou L X, Wu Q Q, Zhu X M, *et al.* Transcription factor VvDREB2A from *Vitis vinifera* improves cold tolerance [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9381.
- [18] Tu T Q, Vacixaxa P, Lo T T M, *et al.* GmDREB6, a soybean transcription factor, notably affects the transcription of the *NtP5CS* and *NtCLC* genes in transgenic tobacco under salt stress conditions [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(12): 7175-7181.
- [19] Zhou M L, Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(4): 441-449.
- [20] 兰孟焦, 后猛, 肖满秋, 等. AP2/ERF 转录因子参与植物次生代谢和逆境胁迫响应的研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(5): 1223-1235.
- [21] Dong H, Li M L, Jin L, *et al.* Cool temperature enhances growth, ferulic acid and flavonoid biosynthesis while inhibiting polysaccharide biosynthesis in *Angelica sinensis* [J]. *Molecules*, 2022, 27(1): 320.
- [22] 曾勇, 刘慧敏. 黄酮类化合物介导的植物耐逆性分析 [J/OL]. 分子植物育种, (2023-08-21) [2023-11-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230820.1354.004.html>.
- [23] Meraj T A, Fu J Y, Raza M A, *et al.* Transcriptional factors regulate plant stress responses through mediating secondary metabolism [J]. *Genes*, 2020, 11(4): 346.
- [24] Zhu X L, Wang B Q, Liu W Y, *et al.* Genome-wide analysis of AP2/ERF gene and functional analysis of CqERF24 gene in drought stress in quinoa [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 8): 127582.
- [25] Chen Y F, Li Z, Sun T T, *et al.* Sugarcane ScDREB2B-1 confers drought stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana* by regulating the ABA signal, ROS level and stress-related gene expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9557.
- [26] Gao Y, Yang J, Duan W J, *et al.* NtRAV4 negatively regulates drought tolerance in *Nicotiana tabacum* by enhancing antioxidant capacity and defence system [J]. *Plant Cell Rep*, 2022, 41(8): 1775-1788.
- [27] Zhuang W B, Li Y H, Shu X C, *et al.* The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses [J]. *Molecules*, 2023, 28(8): 3599.
- [28] Zhao C N, Liu X J, Gong Q, *et al.* Three AP2/ERF family members modulate flavonoid synthesis by regulating type IV chalcone isomerase in citrus [J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(4): 671-688.
- [29] An J P, Zhang X W, Bi S Q, *et al.* The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple [J]. *Plant J*, 2020, 101(3): 573-589.

[责任编辑 时圣明]