

光皮桦 AP2/ERF 基因家族鉴定与表达分析

黄奕孜, 钱 旺, 邱 姗, 王文新, 黄华宏, 林二培

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】深入研究 AP2/ERF 基因家族在光皮桦 *Betula luminifera* 生长发育及环境胁迫响应中的生物学功能。【方法】利用光皮桦基因组数据, 通过生物信息学方法开展 AP2/ERF 基因家族鉴定、基因特征、系统进化、基因结构、保守基序、顺式作用元件、蛋白互作和表达分析。【结果】在光皮桦基因组中共鉴定到 77 个 AP2/ERF 基因, 其编码的蛋白理化性质存在差异, 大多数蛋白 (60 个) 的理论等电点小于 7.0。系统进化分析显示: 这 77 个 AP2/ERF 转录因子属于 5 个亚家族, 其中 ERF 亚家族最大, 包含 34 个成员。光皮桦 AP2/ERF 各亚家族间的基因结构存在较大差异, 其中 AP2 亚家族成员均具有 6~9 个内含子, 而 DREB 亚家族基因则没有内含子; 但 AP2/ERF 各亚家族内的不同成员具有相似的保守基序类型和分布。同时, AP2/ERF 基因启动子上都存在大量与激素、调节、胁迫响应及生长发育相关的顺式作用元件。此外, 互作网络分析预测不同的光皮桦 AP2/ERF 亚家族蛋白间存在广泛的互作关系。进一步的表达分析显示: 绝大多数光皮桦 AP2/ERF 基因 (71 个) 的表达存在较强组织特异性, 且在高温胁迫下, 多数 ERF 或 DREB 基因的表达发生显著变化, 表明 ERF 和 DREB 基因在高温胁迫应答中可能发挥着重要作用。【结论】通过生物信息学分析获得光皮桦 77 个 AP2/ERF 基因, 分属于 5 个亚家族。不同亚家族基因具有相似的基因结构、保守基序等特征。基因启动子区含激素、胁迫响应等相关的作用元件。基因表达具有较强的组织特异性, 且多数 ERF 或 DREB 基因对高温胁迫有明显响应。图 6 表 1 参 39

关键词: 光皮桦; AP2/ERF 家族; 表达模式; 高温胁迫

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2022)06-1183-11

Identification and expression analysis of AP2/ERF gene family in *Betula luminifera*

HUANG Yizi, QIAN Wang, QIU Shan, WANG Wenxin, HUANG Huahong, LIN Erpei

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to explore biological roles of AP2/ERF gene family in growth and development of *Betula luminifera*, and its responses to environmental stress. [Method] Based on the genome data of *B. luminifera*, AP2/ERF gene family were identified through bioinformatics method, and their gene features, phylogeny, gene structure, conserved motifs, cis-acting elements, protein interactions and expression pattern were analyzed. [Result] A total of 77 AP2/ERF genes were identified in the genome of *B. luminifera*. The physical and chemical properties of the encoded proteins were different, and the isoelectric points of most proteins (60) were less than 7.0. Phylogenetic analysis showed that these 77 AP2/ERF transcription factors belonged to 5 subfamilies, among which ERF subfamily was the largest, including 34 members. The gene structures of AP2/ERF subfamilies were quite different. The members of AP2 subfamily had 6–9 introns, while DREB subfamily gene had no introns. However, similar conserved motif types and distributions were observed

收稿日期: 2022-04-29; 修回日期: 2022-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770641); 浙江省重点研发计划项目 (2021C02037)

作者简介: 黄奕孜 (ORCID: 0000-0003-3990-2629), 从事林木遗传育种研究。E-mail: yizimiaoo@163.com。通信作者: 林二培 (ORCID: 0000-0001-7578-2869), 副教授, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: zjulep@hotmail.com

in different members of AP2/ERF subfamilies. At the same time, there were a large number of cis acting elements related to hormone, regulation, stress responses, and growth and development in promoter of *AP2/ERF* genes. Protein interaction network analysis predicted that there were extensive interactions among different AP2/ERF subfamily proteins. Further expressions analysis showed that the expression of most *AP2/ERF* genes (71) had strong tissue specificity, and the expressions of most *ERF* or *DREB* genes changed significantly under heat stress, indicating that *ERF* and *DREB* genes might play an important role in the response to heat stress. [Conclusion] Through bioinformatics analysis, 77 *AP2/ERF* genes are identified in *B. luminifera*, which belong to 5 subfamilies. Different subfamily genes have similar gene structure and conserved motifs. The promoter region of the gene contains hormone, stress response and other related elements. Gene expression has strong tissue specificity, and most *ERF* and *DREB* genes have obvious response to heat stress. [Ch, 6 fig. 1 tab. 39 ref.]

Key words: *Betula luminifera*; AP2/ERF family; expression pattern; heat stress

AP2/ERF 基因家族是植物最大的转录因子家族之一, 广泛参与植物生长发育和逆境胁迫响应等生物学过程, 在植物遗传改良与育种方面具有重要应用价值^[1-2]。AP2/ERF 转录因子家族成员通常含有 1~2 个高度保守的 AP2 结构域, AP2 结构域由 60~70 个氨基酸组成, 构成典型的螺旋-转角-螺旋结构, 通过特异性结合 DNA 以调节靶基因表达^[3-4]。根据 AP2 结构域数量和特征序列, AP2/ERF 基因家族可分为 AP2、ERF、DREB、RAV 和 Soloist 等 5 个亚家族^[5]。一般来讲, AP2 亚家族成员具有 2 个 AP2 结构域, 在调控植物发育方面具有重要功能^[6]。ERF、DREB 和 RAV 亚家族成员则仅具有 1 个 AP2 结构域, 其中 RAV 亚家族成员还具有 1 个 B3 结构域^[7]。此外, 其他具有特殊基因结构和类似 AP2 结构域的成员则属于 Soloist 亚家族^[8]。

随着越来越多植物基因组被测序, AP2/ERF 基因家族成员已在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[5]、葡萄 *Vitis vinifera*^[7]、萝卜 *Raphanus sativus*^[9]、生姜 *Zingiber officinale*^[10]、花生 *Arachis hypogaea*^[11]、水稻 *Oryza sativa*^[12]、甘蔗 *Saccharum officinarum*^[13]、玉米 *Zea mays*^[14] 和大麦 *Hordeum vulgare*^[15] 等单子叶植物中得到鉴定。对不同植物的研究表明: 不同亚家族的 AP2/ERF 转录因子在植物发育和胁迫响应中发挥不同的功能。通常, AP2 亚家族的转录因子参与了植物不同的发育过程, 如拟南芥 AP2 基因调节开花时间^[16-17], 决定种子质量及大小^[18]; *BBM* 基因能够促进体胚发生^[6, 19-21]。ERF 和 DREB 亚家族基因则与生物胁迫和环境因子胁迫响应有关^[22], 如水稻 *OsDREB* 基因就与植株对干旱、高盐、低温胁迫的耐受性有关^[23], *AtERF6* 等 4 个 *ERF* 基因在响应强光方面起重要作用^[24]。而 RAV 亚家族基因则被认为在响应生物胁迫和非生物胁迫中发挥关键作用^[25-26]。

光皮桦 *Betula luminifera* 属桦木科 Betulaceae 桦木属 *Betula* 珍贵用材树种, 广泛分布于云南、贵州、广西、福建和浙江等。由于具有适应性强、速生以及材质优良等特点, 光皮桦是南方山地造林的优良树种, 兼具较高的经济价值和生态价值, 其遗传育种工作也逐渐受到重视。因此, 本研究利用基因组序列, 对光皮桦 AP2/ERF 基因家族进行鉴定, 对其进行理化性质、系统进化等生物信息学分析, 同时通过表达分析对光皮桦 AP2/ERF 基因家族的组织表达特异性及对高温胁迫的响应进行研究, 旨在为光皮桦 AP2/ERF 基因家族的功能研究及在遗传育种中的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 基因鉴定及序列分析

从 Pfam 数据库中 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 AP2/ERF 家族基因结构域的隐马尔可夫文件 (PF00847), 利用 HMMER v3.1b1 软件筛选光皮桦基因组蛋白序列 (未发表) 中含有 AP2/ERF 结构域的序列 ($E \leq e^{-5}$)。利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) CDD Tools (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)^[27] 对获得的候选基因进行结构域鉴定, 去除其中结构域不完整的序列。最后将获得的光皮桦 AP2/ERF 基因上传至 Genbank 获得登录号。通过 ExPaSy (<https://www.expasy.org/>) 在线分析预测工

具^[28], 分别对光皮桦 *AP2/ERF* 基因的氨基酸数目、开放阅读框 (ORF) 长度、相对分子质量、理论等电点等性质进行分析。

1.2 系统进化分析

利用 MEGA 7 软件对获得的光皮桦和拟南芥 *AP2/ERF* 基因家族的蛋白序列进行比对, 参数为默认设置。拟南芥 *AP2/ERF* 蛋白序列下载于拟南芥数据库 TAIR (<http://www.arabidopsis.org>)。基于 *AP2* 结构域序列, 利用 MEGA 软件采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, Bootstrap 值设置为 1 000^[29]。借助在线工具 EvolView (<https://www.evolgenius.info/evolview/#/>) 绘制进化树图^[30]。

1.3 基因结构及保守基序分析

利用 MEME 在线工具 (<https://meme-suite.org/meme/>) 对光皮桦基因蛋白序列上的保守基序进行预测, 保守基序数量设置为 10, 其他参数为默认设置。采用 TBtools 软件绘制基因结构及保守基序图^[31]。

1.4 顺式作用元件分析

利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库^[32], 取光皮桦基因起始密码子上游 2 000 bp 作为启动子区域进行顺式作用元件预测。采用 TBtools 软件对启动子元件的分布进行绘图^[31]。

1.5 蛋白互作网络分析

利用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)^[33], 对光皮桦 *AP2/ERF* 蛋白相互作用网络进行预测, 以拟南芥为参照物种, 选择最低互动分为 0.4, 其他参数默认, 借助 Cytoscape 软件绘制蛋白互作网络图^[34]。

1.6 基因表达模式分析

利用 13 个 2 年生光皮桦植株不同组织器官的转录组数据进行 *AP2/ERF* 基因组织表达特异性分析。13 个不同组织器官包括根 (Root)、嫩叶 (YL)、成熟叶 (ML)、雌花序 (FC)、雄花序 (MC)、第 1~6 节茎 (S1~S6)、木质部 (Xylem) 及枝皮 (Bark)。高温胁迫实验以 6 月龄光皮桦植株为材料, 42 °C 处理 12 和 36 h 后取植株中部成熟叶片, 以 25 °C 生长植株成熟叶为对照, 通过转录组测序分析 *AP2/ERF* 基因表达。提取 FPKM 值 (a), 进行 $\log_2 a$ 标准化处理, 再借助 TBtools 软件绘制表达热图^[31]。

2 结果与分析

2.1 光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族鉴定与序列分析

通过生物信息学方法在光皮桦基因组数据库中筛选得到 77 条具有完整 *AP2* 结构域的基因序列 (表 1)。对这 77 个基因进行序列分析, 结果显示: 光皮桦 *AP2/ERF* 基因的 ORF 长度为 444~2 121 bp, 其编码的氨基酸为 147~706 个。其中: 分子质量最小的蛋白是 BIDREB2, 仅 16.65 kDa; 分子质量最大的蛋白是 BIAP2-6, 达 77.37 kDa; 理论等电点为 4.73~10.06, 约 77.9% 的蛋白理论等电点小于 7.0, 说明光皮桦 *AP2/ERF* 蛋白含有较多酸性氨基酸 (表 1)。

2.2 光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族系统进化分析

为了分析光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族的进化关系, 基于拟南芥及光皮桦 *AP2/ERF* 转录因子的 *AP2* 结构域序列, 利用 MEGA7 软件构建了系统进化树。结果显示: 这些转录因子可分为 *AP2*、*ERF*、*DREB*、*RAV* 和 *Soloist* 等 5 个亚家族, 并可进一步分成 15 个进化枝 (图 1)。光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族在各亚家族中的分布并不均匀, 其中 *AP2* 亚家族包含 13 个基因, 占基因总数的 16.89%; *DREB* 亚家族包含 27 个基因, 占基因总数的 35.06%; *ERF* 亚家族包含 34 个基因, 占光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族总数的 44.15%; *RAV* 亚家族包含 2 个基因, *Soloist* 亚家族仅有 1 个基因 (表 1, 图 1)。参考拟南芥等的研究^[2], *DREB* 亚家族可进一步分为 6 个亚类, 即 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6; *ERF* 亚家族可进一步分为 6 个亚类, 即 B1、B2、B3、B4、B5 和 B6。在光皮桦中, *DREB* 亚家族成员集中分布在 A1、A4、A5 亚类上, 其中 A1 和 A4 亚类均包含 9 个基因, A5 亚类包含 6 个基因; 光皮桦 *ERF* 亚家族的 6 个亚类分别包括 7、2、9、5、3、8 个成员 (表 1, 图 1)。

2.3 光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族结构及保守基序分析

基因结构也是基因的保守性特征之一。对光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族结构的分析显示: 光皮桦 *AP2/ERF* 基因各亚家族间的基因结构存在较大差异。所有的 *AP2* 亚家族基因均具有多个内含子, 其内

表1 光皮桦 AP2/ERF 基因家族成员序列特征

Table 1 Gene features of AP2/ERF gene family from *B. luminifera*

分类	基因名称	登陆号	ORF 长度/bp	氨基酸 数目/个	分子量/ kDa	理论等 电点	分类	基因名称	登陆号	ORF 长度/bp	氨基酸 数目/个	分子量/ kDa	理论等 电点
AP2	<i>BLAP2-1</i>	ON092428	1 527	508	55.95	6.20	ERF (B-1)	<i>BIERF1</i>	ON092417	1 131	376	41.40	6.56
	<i>BLAP2-2</i>	ON092430	1 494	497	55.01	6.58		<i>BIERF4</i>	ON092422	783	260	27.62	9.85
	<i>BLAP2-3</i>	ON092431	1 644	547	60.45	6.17		<i>BIERF9</i>	ON092433	633	210	22.91	6.85
	<i>BLAP2-4</i>	ON092437	1 203	400	44.64	8.37		<i>BIERF15</i>	ON092447	510	169	18.52	10.06
	<i>BLAP2-5</i>	ON092446	1 458	485	52.91	7.83		<i>BIERF18</i>	ON092458	468	155	16.80	9.81
	<i>BLAP2-6</i>	ON092453	2 121	706	77.37	6.39	ERF (B-2)	<i>BIERF33</i>	ON092489	636	211	22.85	9.74
	<i>BLAP2-7</i>	ON092456	975	324	37.20	5.44		<i>BIERF34</i>	ON092491	900	299	32.64	5.10
	<i>BLAP2-8</i>	ON092457	1 428	475	51.86	6.43		<i>BIERF2</i>	ON092418	942	313	34.89	5.65
	<i>BLAP2-9</i>	ON092466	1 929	642	71.38	6.50		<i>BIERF13</i>	ON092443	1 137	378	42.28	5.12
	<i>BLAP2-10</i>	ON092474	1 956	651	71.92	6.53		<i>BIERF3</i>	ON092419	729	242	27.18	6.03
	<i>BLAP2-11</i>	ON092483	1 614	537	58.88	5.95	ERF (B-3)	<i>BIERF10</i>	ON092438	837	278	29.98	6.46
	<i>BLAP2-12</i>	ON092485	1 068	355	39.52	7.16		<i>BIERF11</i>	ON092439	828	275	29.76	8.72
DREB (A-1)	<i>BIDREB6</i>	ON092434	741	246	27.06	4.77		<i>BIERF21</i>	ON092468	996	331	36.46	6.03
	<i>BIDREB7</i>	ON092435	714	237	26.13	4.89		<i>BIERF22</i>	ON092469	996	331	36.36	7.68
	<i>BIDREB8</i>	ON092436	900	299	33.24	4.94		<i>BIERF23</i>	ON092470	996	331	36.52	6.67
	<i>BIDREB15</i>	ON092454	678	225	25.22	8.58		<i>BIERF24</i>	ON092471	996	331	36.49	8.57
	<i>BIDREB17</i>	ON092461	564	187	20.58	6.12		<i>BIERF25</i>	ON092472	1 011	336	37.03	6.47
	<i>BIDREB23</i>	ON092484	657	218	23.93	8.90		<i>BIERF28</i>	ON092477	699	232	25.68	6.21
	<i>BIDREB24</i>	ON092487	612	203	22.27	5.47	ERF (B-4)	<i>BIERF6</i>	ON092426	1 092	363	39.30	6.51
	<i>BIDREB25</i>	ON092488	609	202	22.14	5.48		<i>BIERF26</i>	ON092475	612	203	22.47	4.86
DREB (A-3)	<i>BIDREB26</i>	ON092490	621	206	22.93	5.48		<i>BIERF27</i>	ON092476	657	218	24.47	6.13
	<i>BIDREB19</i>	ON092463	972	323	34.95	6.58		<i>BIERF31</i>	ON092481	1 383	460	49.08	5.72
	<i>BIDREB5</i>	ON092429	717	238	25.85	4.92		<i>BIERF32</i>	ON092482	612	203	22.48	4.87
DREB (A-4)	<i>BIDREB9</i>	ON092440	642	213	23.46	4.99	ERF (B-5)	<i>BIERF7</i>	ON092427	924	307	35.10	5.14
	<i>BIDREB10</i>	ON092441	558	185	20.22	4.73		<i>BIERF17</i>	ON092455	969	322	36.12	5.50
	<i>BIDREB12</i>	ON092448	546	181	20.42	5.18		<i>BIERF20</i>	ON092464	1 053	350	39.54	4.88
	<i>BIDREB14</i>	ON092452	531	176	18.89	5.20	ERF (B-6)	<i>BIERF5</i>	ON092423	549	182	20.42	6.71
	<i>BIDREB16</i>	ON092459	540	179	19.95	6.90		<i>BIERF8</i>	ON092432	609	202	22.49	6.83
	<i>BIDREB18</i>	ON092462	603	200	21.85	4.95		<i>BIERF12</i>	ON092442	624	207	23.23	6.98
	<i>BIDREB21</i>	ON092473	606	201	20.88	4.80		<i>BIERF14</i>	ON092444	756	251	28.52	4.94
	<i>BIDREB22</i>	ON092480	684	227	24.39	4.81		<i>BIERF16</i>	ON092450	996	331	36.52	5.00
DREB (A-5)	<i>BIDREB1</i>	ON092420	615	204	22.57	5.11	RAV	<i>BIRAV1</i>	ON092451	948	315	35.16	9.00
	<i>BIDREB2</i>	ON092421	444	147	16.65	7.83		<i>BIRAV2</i>	ON092465	1 203	400	44.15	8.08
	<i>BIDREB3</i>	ON092424	699	232	24.96	5.16	Soloist	<i>BISoloist</i>	ON092486	957	318	36.27	6.01
	<i>BIDREB11</i>	ON092445	525	174	19.43	6.64							
	<i>BIDREB13</i>	ON092449	486	161	17.59	4.77							
	<i>BIDREB20</i>	ON092467	624	207	22.78	4.76							
DREB (A-6)	<i>BIDREB4</i>	ON092425	1 134	377	41.15	5.54							
	<i>BIDREB27</i>	ON092492	1 008	335	36.97	6.18							

含子数量为 6~9 个；除了 *BIDREB10* 具有 1 个内含子外，其余 DREB 亚家族成员均没有内含子 (图 2A)。此外，9 个 ERF 和 1 个 RAV 亚家族成员具有 1 个内含子，其他成员则没有内含子；而 *BISoloist* 则有

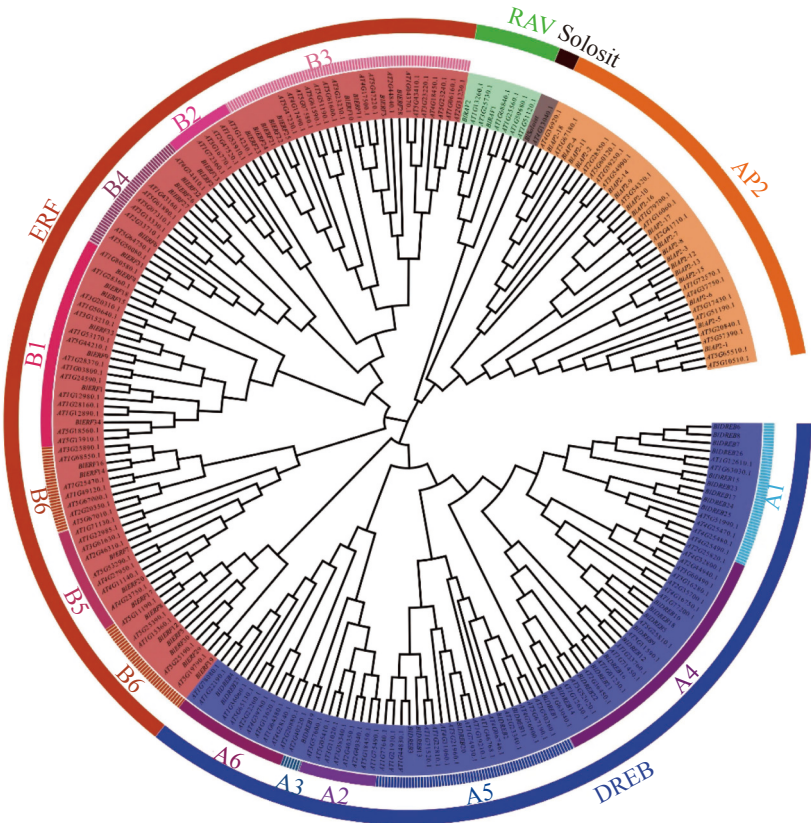


图 1 光皮桦与拟南芥 AP2/ERF 转录因子家族系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of AP2/ERF transcription factors from *B. luminifera* and *A. thaliana*

5 个内含子，与 AP2 亚家族成员比较相似 (图 2A)。

进一步对光皮桦 AP2/ERF 转录因子的保守基序进行分析表明：绝大多数光皮桦 AP2/ERF 基因家族成员 (71 个) 都同时拥有 Motif 1、Motif 4 和 Motif 5 这 3 个 Motif，表明 Motif 1、Motif 4 和 Motif 5 是构成 AP2 结构域的主要基序 (图 2B)。同时，光皮桦同一亚家族基因的保守基序组成表现出高度的相似性，可能发挥相似的生物学功能。除了 *BIAP2-7* 外，其余 AP2 家族成员都具有 Motif 4；2 个 *RAV* 基因的保守基序较少，仅 3 个；大部分 DREB 亚家族成员特有 Motif 10，少部分成员特有 Motif 6。此外，ERF 亚家族成员中仅 *BIERF21*、*BIERF22*、*BIERF23*、*BIERF24* 及 *BIERF25* 具有 Motif 8，推测这 5 个基因发挥更特殊的生物学功能。

2.4 光皮桦 AP2/ERF 基因家族启动子顺式作用元件分析

启动子区域的顺式作用元件在基因转录起始调控中起重要作用。利用 PlantCARE 数据库对 77 个光皮桦 AP2/ERF 基因家族启动子区域的顺式作用元件进行分析，共检测到 1 072 个特异元件，大致可分成 3 类：激素响应、胁迫响应及生长发育相关元件。其中，激素响应元件有赤霉素、脱落酸、生长素等元件，胁迫响应元件包含缺氧、干旱、低温防御等相关元件，生长发育相关元件包含胚乳表达、分生组织表达等元件 (图 3)。光响应 (492 个)、脱落酸响应 (180 个)、茉莉酸甲酯响应 (125 个) 及厌氧诱导 (74 个) 元件是光皮桦 AP2/ERF 基因启动子序列所具有的主要顺式作用元件。其中，光响应元件在所有的基因启动子区域均有分布，除 *BIERF7* 和 *BIERF8* 仅包含 1 个光响应元件，其余基因包含多个光响应元件，如 *BIDREB8* (16 个)、*BIERF27* (15 个) 等。这提示光皮桦 AP2/ERF 基因可能参与了植株的光形态建成或光照相关的环境适应。而具有茉莉酸甲酯、脱落酸、赤霉素、生长素等激素响应元件的光皮桦 AP2/ERF 基因数量分别为 61、63、20、18 个，说明光皮桦 AP2/ERF 基因家族成员广泛参与了不同植物激素的信号途径。此外，仅 *BIDREB10* 和 *BIERF12* 具有创伤响应元件，仅 *BIDREB13*、*BIERF4* 和 *BIERF28* 具有细胞周期调控元件，这部分具有特殊元件的基因可能具有更特异的功能。

2.5 光皮桦 AP2/ERF 蛋白互作网络分析

为了分析光皮桦 AP2/ERF 转录因子在调控过程中的协同作用，利用 STRING 数据库匹配到的 49 个

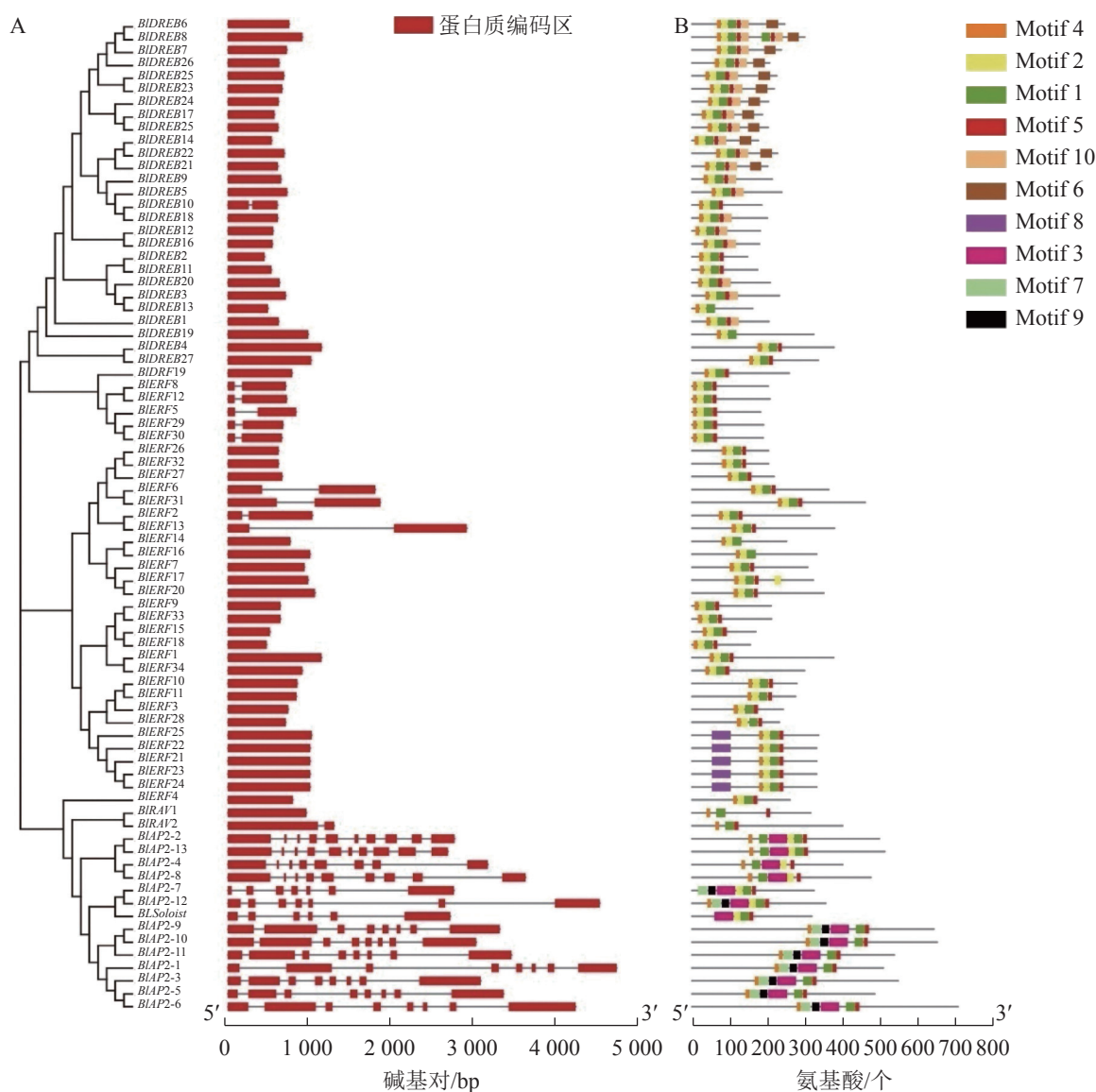


图2 光皮桦 AP2/ERF 家族基因成员结构 (A) 及保守基序 (B)

Figure 2 Gene structure (A) and conserved motif (B) of AP2/ERF family members in *B. luminifera*

拟南芥同源蛋白构建了相互作用网络,结果如图4所示。BIRAV2 (RAV1)、BIERF28 (ERF13) 及 BIAP2-13 (AP2) 具有较多的节点 (互作蛋白) 数量,分别为 6、7、10 个,表明这 3 个基因在光皮桦 AP2/ERF 基因家族中可能占据核心地位并发挥着重要的生物学功能。此外,各亚家族成员内部及之间也存在复杂的相互作用,如 BIERF7、BIERF17 及 BIERF20 构成三角相互作用网络,而核心成员 BIAP2-13 与多个 ERF 及 DREB 成员分别存在互作关系,BIRAV2 也与多个 ERF 和 DREB 成员互作 (图4)。这种不同亚家族成员间复杂的互作关系,暗示这些基因可能在功能上存在非常复杂的交互关系。

2.6 光皮桦 AP2/ERF 基因家族组织表达特异性分析

对 77 个光皮桦 AP2/ERF 家族成员在根、嫩叶、成熟叶、雌花序、雄花序、不同木质化的茎、皮、木质部等 8 个不同组织器官的表达情况进行分析。结果显示:多数 (71 个) 家族基因的表达具有较强的组织特异性 (图5)。其中,只在特定组织或器官中表达或表达量较强的基因有 4 个,如 BIAP2-6 只在根中表达、BISoloist 仅在嫩叶及第 1 节茎中表达;在所有组织器官中均有表达且表达量较高的基因有 5 个,分别为 BIAP2-13、BIERF9、BIERF33、BIERF13、BIDREB27;而 BIERF25 在这 13 个组织器官中的表达量均极低 (图5)。

2.7 高温胁迫下光皮桦 AP2/ERF 基因家族表达分析

分析高温胁迫转录组数据,结果检测到 45 个基因在叶片中能够表达,包括 4 个 AP2 亚家族基因,

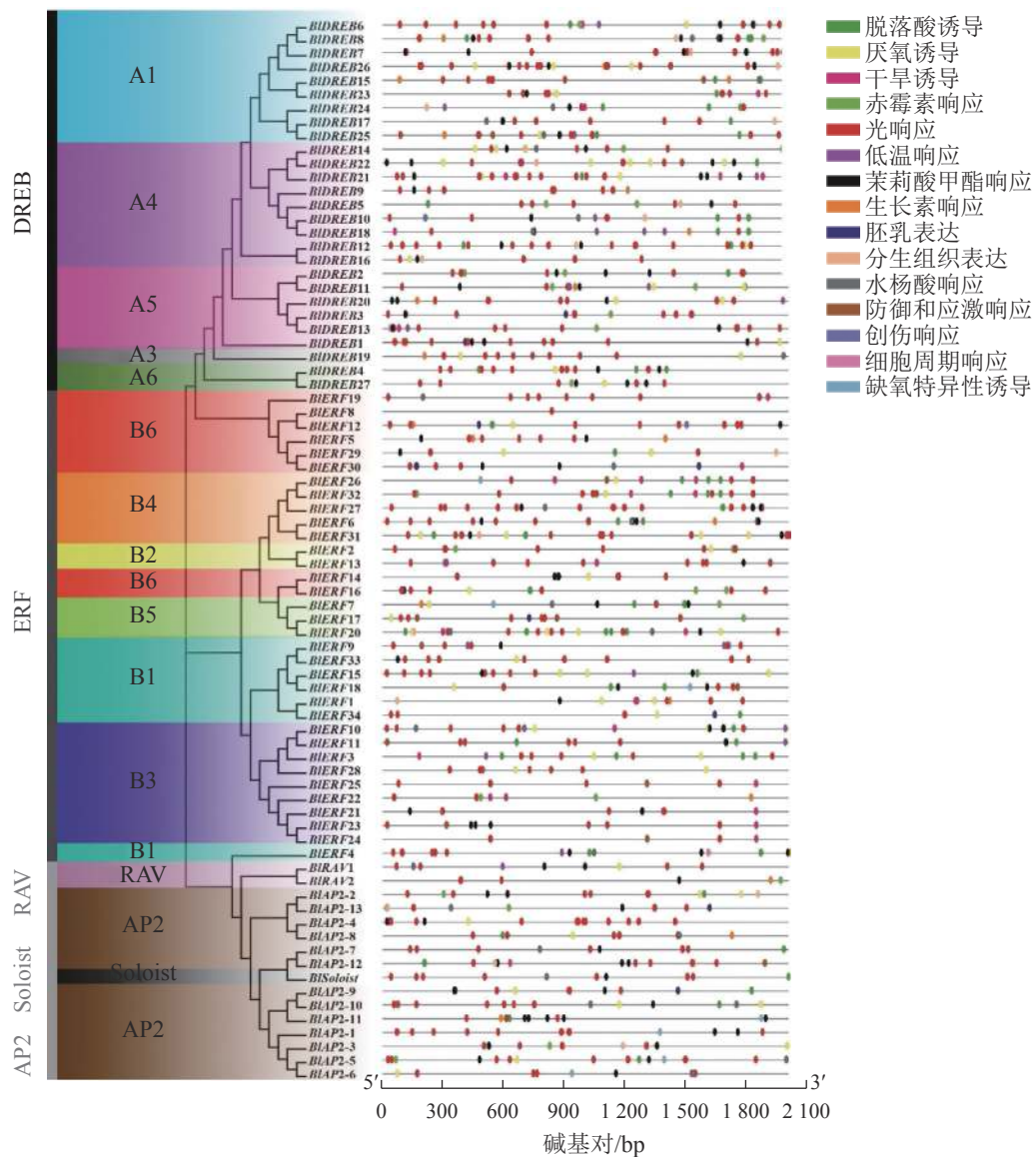


图3 光皮桦 *AP2/ERF* 基因启动子顺式作用元件
Figure 3 The cis-elements in promoter of *AP2/ERF* genes in *B. luminifera*

20个 DREB 亚家族基因, 20个 ERF 亚家族基因和 1个 RAV 亚家族基因 (图 6)。进一步差异表达分析显示: 多数 *ERF* 或 *DREB* 基因对高温胁迫产生了明显的响应, 如 *BIDREB23* 在高温胁迫 12 h 后表达上调了 12 倍, *BIERF6* 在高温胁迫 12 和 36 h 后分别被上调了 3 倍以上; 而 *BIDREB24*、*BIDREB25* 和 *BIERF21* 等基因的表达则明显受到了高温胁迫的抑制 (图 6)。这些结果说明: ERF 和 DREB 亚家族基因可能对光皮桦高温胁迫响应有重要的调控作用。

3 结论与讨论

AP2/ERF 基因家族是植物最大的转录因子家族之一，在生长发育和逆境胁迫响应中扮演重要的角色^[2, 22]。具有 60~70 个氨基酸的保守 AP2 结构域是该基因家族成员的重要特征。本研究在光皮桦基因组鉴定中获得了 77 个至少具有 1 个 AP2 结构域的 *AP2/ERF* 基因。与其他植物类似，这些光皮桦

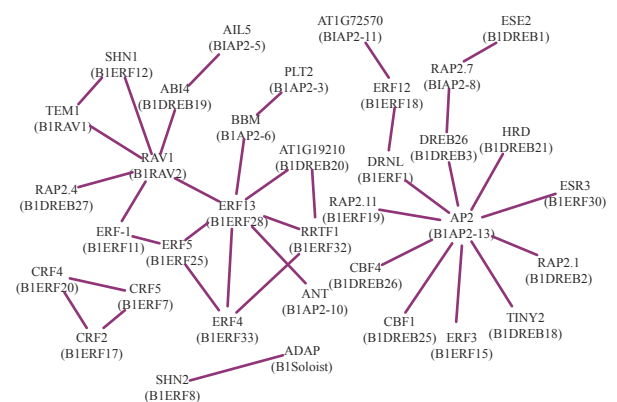
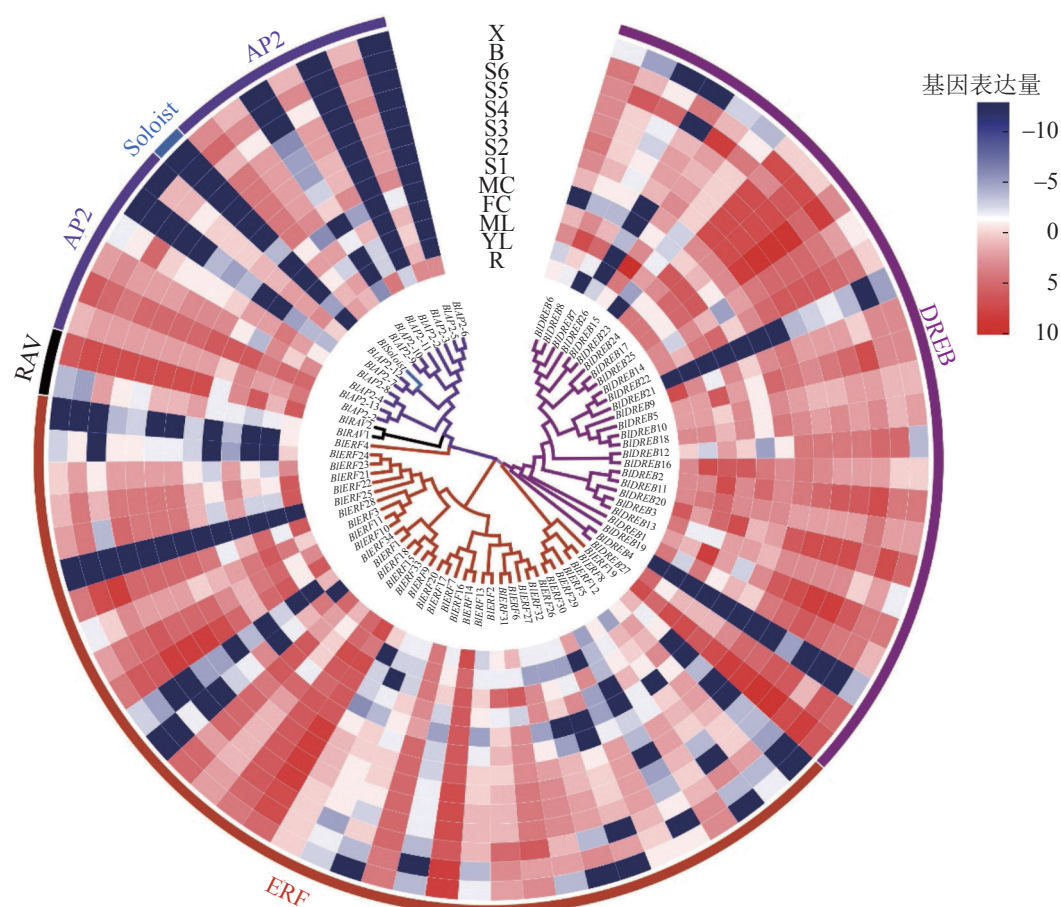


图 4 光皮桦 AP2/ERF 家族蛋白互作预测
Figure 4 Prediction of interactions of AP2/ERF proteins in *B. luminifera*



R. 根; YL. 嫩叶; ML. 成熟叶; FC. 雌花序; MC. 雄花序; S1~S6. 第 1~6 节茎; B. 枝皮; X. 木质部

图 5 光皮桦 AP2/ERF 基因家族在不同组织器官中的表达

Figure 5 Expression profiles of AP2/ERF family genes in different tissues and organs of *B. luminifera*

AP2/ERF 基因也可被分为 AP2、ERF、DREB、RAV 和 Soloist 等 5 个亚家族, 包括 13 个 AP2 基因、27 个 DREB 基因、34 个 ERF 基因、2 个 RAV 基因及 1 个 Soloist 基因。通常, 在植物中 ERF 亚家族具有最多的成员, 然后依次是 DREB、AP2、RAV, Soloist 亚家族成员最少。光皮桦与拟南芥^[22]、水稻^[22]、玉米^[14]和杨树 *Populus trichocarpa*^[35] 等物种的 AP2/ERF 基因各亚家族成员在数量上也具有相似的规律, 这说明 AP2/ERF 基因在进化上可能有共同的起源。

转录因子的调控功能通常与一些重要的保守结构域或基序有关^[36]。在 AP2/ERF 转录因子中, 除了高度保守的 AP2 结构域, 不同亚类的基因还具有特异的保守基序, 如拟南芥 AP2/ERF 转录因子除了保守的 AP2 结构域, 还具有 50 个保守基序^[5], 萝卜的 AP2/ERF 转录因子具有 20 个特异的保守基序^[9]。光皮桦的 AP2/ERF 转录因子也具有 7 个特异的保守基序。进一步分析发现: 同一亚家族基因具有相同或相似的保守基序, 如绝大多数 BIDREB 基因具有特异基序 Motif 10, 同属 ERF(B3) 亚类的 BIERF21~BIERF25 具有 1 个特异基序 Motif 8。在其他植物中, AP2/ERF 基因的保守基序和结构域组成在亚家族内也具有类似的高度相似性, 暗示同一亚家族基因可能具有相似的生物学功能和调控途径。此外, 基因结构分析也表明: 不同亚家族光皮桦 AP2/ERF 基因具有特异的基因结构特征, 如 AP2 亚家族基因具有多个内含子 (6~9 个), 而其他亚家族中仅少数基因具有单个内含子, 其余基因则没有内含子。这种不同亚家族 AP2/ERF 基因具有的基因结构特征, 在拟南芥、龙眼 *Dimocarpus longan*、萝卜和玉米等不同植物中均存在类似现象, 进一步说明该家族基因在进化上有共同的起源。

启动子顺式作用元件是基因功能的重要组分, 能够反映基因潜在的功能和调控途径^[11]。本研究显示: 光皮桦 AP2/ERF 基因启动子区域的顺式作用元件主要可分为激素响应、胁迫响应和生长发育相关等 3 类, 其中光响应元件、脱落酸响应元件和茉莉酸甲酯响应元件是最多的 3 种元件, 这与美国山核桃

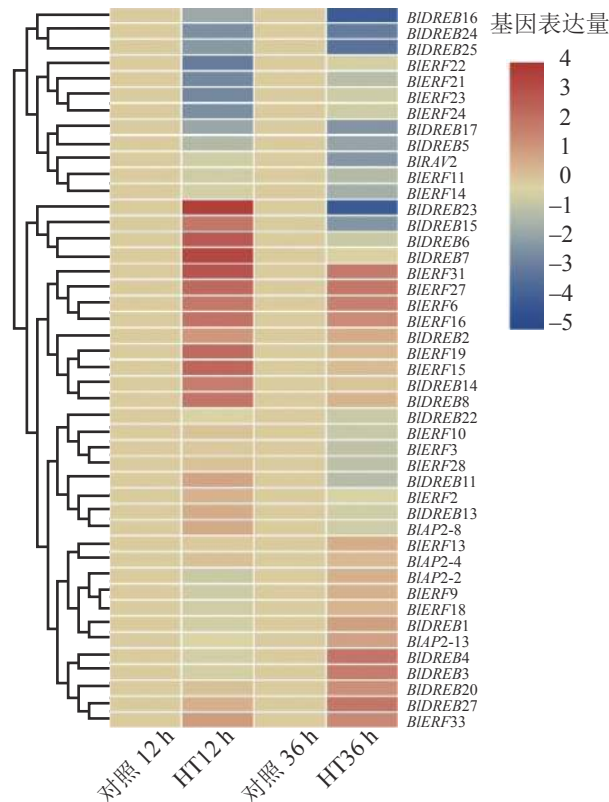
Carya illinoensis 的 AP2/ERF 家族基因的顺式作用元件的分布模式类似^[37]。有意思的是, 不同 AP2/ERF 基因启动子的响应元件数量及类型不同, 但不同亚家族基因启动子可能存在同类的响应元件, 如脱落酸响应元件和茉莉酸甲酯响应元件在不同亚家族基因启动子中均存在。这说明不同亚家族基因在功能上产生了分化, 但可能共同参与了相同的调控途径。同时, 蛋白互作分析的结果显示: 包括光皮桦在内的不同植物的 AP2/ERF 亚家族蛋白间存在广泛的互作关系^[9, 11, 14, 38], 进一步说明不同亚家族的 AP2/ERF 转录因子可能参与同一调控途径。

研究表明: 不同 AP2/ERF 亚家族基因在植物生长发育和逆境胁迫响应中发挥不同作用。不同组织器官的表达分析显示: 光皮桦 AP2/ERF 各家族成员在根、茎、叶等不同组织器官的表达存在差异, 如 *BIAP2-6* 特异地在根中表达, 而 *BIAP2-13*、*BIERF9*、*BIERF33*、*BIERF13* 和 *BIDREB27* 等 5 个基因则在所有组织器官中均有较高水平的表达。有意思的是, 进化关系相近的基因, 其表达模式也存在明显分化, 如 *BIRAV1* 和 *BIRAV2* 的表达模式并不相同, 而 *BIERF10* 和 *BIERF11*、*BIERF9* 和 *BIERF3* 的表达模式则非常相似。这说明, 在这些进化关系较近的光皮桦 AP2/ERF 基因中既存在功能上的分化, 也存在一定的功能冗余。已有研究表明: 植物 *ERF* 和 *DREB* 基因主要在响应生物和非生物胁迫中发挥作用, 它们的表达往往会受到逆境胁迫的诱导。如在萝卜中, *RsERF003* 和 *RsERF039* 的表达明显受高温胁迫的诱导^[9]; 玉米 *ZmERF135*、水稻 *OsDREB2A* 和拟南芥 *AtDREB2A* 等基因的表达在被高温处理后明显上调^[14, 39]。本研究的高温胁迫表达分析也表明: 相比 AP2 亚家族基因, 光皮桦 *ERF* 和 *DREB* 基因对高温胁迫更敏感, 呈现出显著的表达差异, 如 *BIDREB23*、*BIERF6* 等基因明显受到高温胁迫的诱导。这些结果显示: *ERF* 和 *DREB* 基因在高温胁迫应答中发挥了重要作用。

在光皮桦 77 个 AP2/ERF 家族成员中, 值得注意的是 ERF(B3) 亚类中的 *BIERF21*~*BIERF25* 分支。这 5 个基因具有 1 个特异基序 Motif 8, 且基因启动子区域中均含 1~2 个干旱诱导顺式作用元件, 同时, 在高温 42 °C 胁迫处理 12 h 后, 除了 *BIERF25* 基因外, 其他 4 个基因表达水平均明显下调, 推测这一分支的 5 个基因可能在抵御高温及干旱胁迫中发挥着重要的作用, 但具体基因功能仍需开展后续实验进行验证。

4 参考文献

- [1] XIE Zhouli, NOLAN T M, JIANG Hao, *et al.* AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2019, **10**: 228 [2022-03-20]. doi: 10.3389/fpls.2019.00228.
- [2] GU Cao GUO Zhihua, HAO Pingping *et al.* Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm [J]. *Bot Stud*, 2017, **58**(1): 1–8.
- [3] XU Wei, LI Fei, LING Lizhen, *et al.* Genome-wide survey and expression profiles of the AP2/ERF family in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2013, **14**(1): 785–800.
- [4] OKAMURO J K, CASTER B, VILLARROEL R, *et al.* The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(13): 7076–7081.



对照 12 h 表示 25 °C 处理 12 h; HT12 h 表示 42 °C 处理 12 h; 对照 36 h 表示 25 °C 处理 36 h; HT36 h 表示 42 °C 处理 36 h

图 6 高温胁迫下光皮桦 AP2/ERF 基因表达分析
Figure 6 Expression analysis of AP2/ERF genes under heat stress in *B. luminifera*

- [5] 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.
- [6] EL O S, SCHNELL J, ABDEEN A, *et al.* Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, **74**(4/5): 313 – 326.
- [7] LICAUSI F, GIORGI F M, ZENONI S, *et al.* Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera* [J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 719 – 734.
- [8] LI Hui, WANG Yu, WU Mei, *et al.* Genome-wide identification of AP2/ERF transcription factors in cauliflower and expression profiling of the ERF family under salt and drought stresses [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 946 [2022-03-20]. doi:10.3389/fpls.2017.00946.
- [9] KARANJA B K, XU Liang, WANG Yan, *et al.* Genome-wide characterization of the AP2/ERF gene family in radish (*Raphanus sativus* L.): unveiling evolution and patterns in response to abiotic stresses [J/OL]. *Gene*, 2019, **718**: 144048 [2022-03-20]. doi: 10.1016/j.gene.2019.144048.
- [10] XING Haitao, JIANG Yusong, ZOU Yong, *et al.* Genome-wide investigation of the AP2/ERF gene family in ginger: evolution and expression profiling during development and abiotic stresses [J]. *BMC Plant Biol*, 2021, **21**(1): 1 – 21.
- [11] CUI M, HAIDER M S, CHAI P, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of AP2/ERF transcription factor related to drought stress in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J/OL]. *Front Genet*, 2021, **12**: 750761 [2022-03-20]. doi:10.3389/fgene.2021.750761.
- [12] SHARONI A M, NURUZZAMAN M, SATOH K, *et al.* Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, **52**(2): 344 – 360.
- [13] LI Peiting, CHAI Zhe, LIN Pingping, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of AP2/ERF transcription factors in sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2020, **21**(1): 685. doi:10.1186/s12864-020-07076-x.
- [14] ZHANG Jing, LIAO Jiayao, LING Qiqi, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling analysis of maize AP2/ERF superfamily genes reveal essential roles in abiotic stress tolerance [J]. *BMC Genomics*, 2022, **23**(1): 1 – 22.
- [15] GUO Baojian, WEI Yafeng, XU Ruibin, *et al.* Genome-wide analysis of APETALA2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J/OL]. *PLoS One*, 2016, **11**(9): e161322 [2022-03-20]. doi: 10.1371/journal.pone.0161322.
- [16] JOFUKU K D, den BOER B G, van MONTAGU M, *et al.* Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. *Plant Cell*, 1994, **6**(9): 1211 – 1225.
- [17] AUKERMAN M J, SAKAI H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(11): 2730 – 2741.
- [18] JOFUKU K D, OMIDYAR P K, GEE Z, *et al.* Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2* [J]. *Proc Natl Acad Sci PNAS*, 2005, **102**(8): 3117 – 3122.
- [19] FLOREZ S L, ERWIN R L, MAXIMOVA S N, *et al.* Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor [J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2015, **15**: 121 [2022-03-22]. doi: 10.1186/s12870-015-0479-04.
- [20] SRINIVASAN C, LIU Zhongrang, HEIDMANN I, *et al.* Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Planta*, 2007, **225**(2): 341 – 351.
- [21] BOUTILIER K, OFFRINGA R, SHARMA C V K, *et al.* Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(8): 1737 – 1749.
- [22] FENG Kai, HOU Xilin, XING Guoming, *et al.* Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, **40**(6): 750 – 776.
- [23] DUBOUZET J G, SAKUMA Y, ITO Y, *et al.* *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression [J]. *Plant J*, 2003, **33**(4): 751 – 763.
- [24] VOGEL M O, MOORE M, KÖNIG K, *et al.* Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2014, **26**(3): 1151 – 1165.

- [25] FU Minjie, KANG H K, SON S H, *et al.* A subset of *Arabidopsis* RAV transcription factors modulates drought and salt stress responses independent of ABA [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, **55**(11): 1892 – 1904.
- [26] LI C W, SU R C, CHENG C P, *et al.* Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway [J]. *Plant Physiol*, 2011, **156**(1): 213 – 227.
- [27] MARCHLER-BAUER A, DERBYSHIRE M K, GONZALES N R, *et al.* CDD: NCBI's conserved domain database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(D1): 222 – 226.
- [28] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, *et al.* *The Proteomics Protocols Handbook* [M]. Clifton: Humana Pr Inc, 2005: 571 – 607.
- [29] NEWMAN L, DUFFUS A, LEE C. Using the free program MEGA to build phylogenetic trees from molecular data [J]. *Am Biol Teach*, 2016, **78**(7): 608 – 612.
- [30] HE Zilong, ZHANG Huangkai, GAO Shenghan, *et al.* Evolvview v2: an online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees[J/OL]. *Nucl Acids Res*, 2016, **44**(W1): W236-W241 [2022-03-20]. doi: 10.1093/nar/gkw370.
- [31] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, *et al.* TBtools-an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, **13**(8): 1194 – 1202.
- [32] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(1): 325 – 327.
- [33] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, **49**(1): 605 – 612.
- [34] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, **13**(11): 2498 – 2504.
- [35] 赵金玲, 姚文静, 王升级, 等. 杨树 AP2/ERF 转录因子家族生物信息学分析[J]. *东北林业大学学报*, 2015, **43**(10): 21 – 29.
- ZHAO Jinling, YAO Wenjing, WANG Shengji, *et al.* AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa* by bioinformatics [J]. *J Northeast For Univ*, 2015, **43**(10): 21 – 29.
- [36] SAKUMA Y, LIU Qiang, DUBOUZET J G, *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **290**(3): 998 – 1009.
- [37] YANG B, YAO X, ZENG Y, *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression profiling of AP2/ERF superfamily genes under different development and abiotic stress conditions in pecan (*Carya illinoensis*)[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(6) [2022-03-20]. doi:10.3390/ijms23062920.
- [38] LI Mengyao, LIU Jiexia, HAO Jiannan, *et al.* Genomic identification of AP2/ERF transcription factors and functional characterization of two cold resistance-related AP2/ERF genes in celery (*Apium graveolens* L.) [J]. *Planta*, 2019, **250**(4): 1265 – 1280.
- [39] SAKUMA Y, MARUYAMA K, QIN Feng, *et al.* Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(49): 18822 – 18827.