

DOI: 10.11983/CBB25066

荒漠植物红砂 *AP2/ERF* 基因家族鉴定及在盐胁迫下的表达模式

朱梦璇, 刘渊, 赵颢宇, 孙振云, 巩薇, 党振华*

内蒙古大学生态与环境学院/蒙古高原生态与资源利用教育部重点实验室/内蒙古草地生态学重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021

摘要 红砂(*Reaumuria soongorica*)是我国西北荒漠区广泛分布的耐盐旱生小灌木, 具有极强的生境适应性, 是研究植物抗逆分子机制的理想材料。本研究以红砂基因组为参考, 鉴定了其 *AP2/ERF* 基因家族成员, 并进行了系统发育、基因结构、保守基序、顺式作用元件及基因复制事件等分析, 同时对该家族成员在盐胁迫下的表达模式进行了分析。结果表明, 红砂基因组中有 70 个 *AP2/ERF* 基因, 系统发育分析显示它们归类为 AP2、ERF、DREB 和 RAV 亚家族; 它们的启动子区有多种光响应、胁迫响应、生长发育和激素响应等顺式作用元件。红砂 *AP2/ERF* 基因非均匀分布在其基因组的 11 条染色体上, 其中的 63 个由不同基因复制事件演化而来, 全基因组复制和分散复制是该基因家族扩张的主导因素。在盐胁迫下, 红砂 *AP2/ERF* 基因呈现不同表达模式, 6 个差异表达显著, 可能在该植物响应盐胁迫过程中发挥积极作用。本研究在基因组水平鉴定和分析了红砂 *AP2/ERF* 基因家族的特征, 为进一步解析它们在该植物适应生境中的分子功能奠定了基础。

关键词 *AP2/ERF* 基因家族, 基因结构分析, 盐胁迫, 基因表达, 红砂

植物的生存与繁衍面临各种环境变化的挑战, 如干旱、高温、低温、盐碱等错误!未找到引用源。16。为适应这些环境, 植物可启动相应的适应机制。在这个过程中, 转录因子通过调控逆境响应基因的表达, 激活或抑制相应生理和代谢过程, 以适应环境变化。*APETALA2/乙烯响应因子(AP2/ERF)*是植物特有的一类转录因子家族, 在信号转导、生长和发育、生物与非生物胁迫应答过程中发挥重要作用 16。*AP2/ERF* 家族成员的特征是具有一个 *APETALA2 (AP2)/乙烯响应元件结合因子(EREB)*结构域, 该结构域由 60–70 个保守的氨基酸组成, 参与 DNA 结合。根据序列相似性和结构域数目可将 *AP2/ERF* 基因家族分为五个

收稿日期: 2025-04-15; 接受日期: 2025-08-20

基金项目: 国家自然科学基金(No.32460092, No.31860078)、内蒙古自然科学基金(No.2024JQ11)和内蒙古大学大学生创新项目

* 通讯作者。E-mail: zhdang@imu.edu.com

亚家族, 即 AP2、ERF、DREB (dehydration-responsive element binding proteins)、RAV (related to ABI3/VP1 (VIVIPAROUS1)和 Soloist 15。不同的亚家族保守 AP2 结构域数目不同。其中, AP2 亚家族具有两个重复的 AP2 结构域; EREBP 亚家族包括 ERF 和 DREB 亚家族, 含有 1 个 AP2 结构域; 根据保守序列 14 和 19 位氨基酸残基的差异, 进一步划分为 ERF 亚家族和 DREB 亚家族; RAV 亚家族含有一个 AP2 结构域和一个 B3 结构域; 其余成员被命名为 Soloist, 与其他家族成员相似度较低 19。每个亚家族在植物适应不同环境时具有独特的功能和调控机制。例如, ERF 亚家族成员在植物响应乙烯信号和生物胁迫中发挥关键作用 19, DREB 亚家族主要参与应答干旱、低温等非生物胁迫 18。

基因组学和转录组学研究的快速发展, 极大推动了植物 AP2/ERF 基因家族的研究进展。近期研究不断揭示该基因家族成员在植物生长发育和逆境适应中的调控作用。例如, 在干旱胁迫下, 甘薯中 DREB 转录因子成员 *SwDREB1* 参与激活一系列抗旱相关基因的表达, 从而增强植物的抗旱性 16。在盐碱胁迫下, 水稻 AP2 亚家族成员 *OsSAE1* 通过抑制水稻中的 ABA 信号转导, 从而提高种子萌发率和耐盐性 17。

红砂(*Reaumuria soongorica*)是柽柳科红砂属超旱生小灌木, 是我国干旱荒漠区分布最广的植物之一, 是荒漠和半荒漠化地区防风固沙、水土保持的优良物种, 亦是荒漠绿洲与荒漠过渡带的重要植被类型 18。由于红砂抗逆性强, 生态可塑性大, 具有极强的抗旱、耐盐、耐极端温度、耐辐射、耐贫瘠和集沙能力, 长期被视为研究荒漠植物逆境适应机制的代表, 甚至是研究非模式植物抗逆机制模式植物 16。本研究以红砂基因组为参考 17, 鉴定了红砂 AP2/ERF 基因家族, 进行了系统发育、基因结构、保守基序、顺式作用元件及基因复制事件等分析, 同时对该家族成员在盐胁迫下的表达模式进行分析, 鉴定出该家族中响应盐胁迫的关键成员, 探讨了它们在红砂适应盐渍荒漠中的潜在调节作用。

1 材料与方法

1.1 红砂基因组数据获取及 AP2/ERF 基因家族成员鉴定

红砂 (*Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim.) 基因组及其注释文件下载自 <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.7021974.v1>。从红砂基因组中提取 AP2/ERF 家族的基因序列, 基于 RNA-seq 数据比对到参考基因组, 利用 IGV-GSaman 自动识别剪接位点和外显子边界, 校准注释中的连接异常及 UTR 区域, 通过叠加 RNA-seq 覆盖度与注释信息, 人工核查外显子跳跃、可变剪接及转录本边界, 对复杂区域进行交互式坐标调整 15。

RNA-seq 数据过滤采用 SOAPnuke-v2.1.04 软件, 去除原始序列中的接头(Adaptor)以及少量低质量序列得到 Clean reads, 过滤参数为: -n 0.02 -l 20 -q 0.4 -i -G 2 --polyX 50 -Q 2 --seqType 0。

1.2 *AP2/ERF* 基因的系统发育分析

拟南芥 *AP2/ERF* 家族基因序列下载自 <https://www.arabidopsis.org/>。利用 TBtools 软件中“One Step Build a ML Tree”功能, 依次调用 Muscl、trimAl 和 IQ-tree 软件, 将拟南芥和红砂的 *AP2/ERF* 蛋白序列进行多序列比对和修剪, 通过最大似然法构建系统发育树, Bootstrap 设置为 5000。使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>)对进化树进行可视化。

1.3 *AP2/ERF* 基因的保守结构域、保守基序、基因结构和顺式作用元件分析

利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)分析 *AP2/ERF* 基因家族的保守基序, 设定 motif 数为 10, 其余参数均为默认值。运用 NCBI 平台的“BatchCD-Search”(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)功能对 *AP2/ERF* 基因的保守结构域进行分析, 参数设置为默认值。通过 TBtools 提取红砂 *AP2/ERF* 基因的起始密码子(ATG)上游 2000 bp 作为启动子序列, 通过 PlantCARE 网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)检索顺式作用元件。借助 TBtools 软件提取 *AP2/ERF* 家族的基因结构信息, 在使用“Gene Structure View (Advances)”功能对上述结果进行可视化。

1.4 *AP2/ERF* 基因的基因复制事件和进化选择压力分析

使用 Dupgenfinder 软件确定红砂基因组中的重复基因类型, 进而对 *AP2/ERF* 家族成员的基因复制事件进行分类, 再用 Tbttools 软件对重复基因的非同义突变频率(K_a)和同义突变频率(K_s)的比率(K_a/K_s)进行计算, 并绘制 Circos 图, 最后使用基迪奥平台(<https://www.omicshare.com/>)的在线分析工具绘制小提琴图进行可视化。

1.5 *AP2/ERF* 基因响应盐胁迫的基因表达模式

本实验室前期发表的 3 个 Na_2SO_4 浓度梯度(CK、200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、每个梯度 3 个重复的红砂叶片转录组数据下载自

<https://identifiers.org/ncbi/insdc.sra:SRR27540875-81>。使用 Bowtie2 (version 2.2.6) 16 将 clean reads 比对到基因组序列上, 使用 RSEM (version 1.2.8) 17 进行基因定量, 以 FPKM 均一化。使用 DESeq2 软件进行差异表达基因(DEGs)识别, 以 $|\text{Log}_2\text{FC}|\geq 1$ 和错误出现率 (FDR) ≤ 0.05 为阈值进行筛选。最后提取 *AP2/ERF* 家族的基因表达数据进行分析, 使用 TBtools 绘制热图进行可视化。

1.6 幼苗培养和盐胁迫处理

选取籽粒饱满的红砂种子, 用 10%的 NaClO 浸泡 10 min, 再用无菌水清洗 3–5 次, 播种培养皿。待胚根生长至约 3 cm 时, 移栽到直径 9 cm、高度 13 cm 装有营养土的花盆中, 每盆放置 12 颗种子, 在温室中培育, 温室的昼/夜温度初步拟定为 $(25\pm 3)^\circ\text{C}/(15\pm 3)^\circ\text{C}$, 光照时间人为控制在每天 10 小时, 光强约为 $600 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度保持在 60%–70%。8 周后每盆中保留 8 株大小一致的植株, 然后分别用含有 0、200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2SO_4 的 Hoagland 营养液中进行盐胁迫处理, 每个处理设置三个生物重复, 每个重复由 8 株幼苗组成, 一周后收集材料, 液氮速冻后置于 -80°C 冰箱中备用。本实验的幼苗培养、胁迫处理及采样策略与前期转录组分析样本准备方法一致。

1.7 RNA 提取、反转录和 qRT-PCR

使用 TRIzol[®] reagent 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取红砂嫩叶 RNA, 利用反转录试剂盒(Takara, RR047A)将 RNA 反转录为 cDNA。使用 NCBI 的引物设计模块 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)设计引物, 委托华大基因生物有限公司合成。qRT-PCR 引物通过 NCBI 的 primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)工具设计, 引物长度为 20 bp, 退火温度 (T_m)在 55–65 $^\circ\text{C}$, GC 含量在 40%–60% (表 1)。内参基因引物参考自魏晓芸的研究 18。通过常规 PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测引物特异性及扩增效率。

表 1 qRT-PCR 验证基因引物序列

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
MSTRG.13085.1.p1	TCCGACAACAACAACCA	TCACTCTGGAAGTCTGCTG

MSTRG.3926.1.p1	GGTGGTGGTGATGGTAGTGG	CCGGAAGAATCCCAACTGCT
MSTRG.9293.1.p1	GCCGTCCTCCTCATTATCGG	GTTGTTGCTGCTGCTCTGAC
STRG.23363.1.p1	GTCGCCGTATCAAGCGTTTC	ACTCGTCCCACACAGGTAGA
STRG.23973.1.p1	TCAACCTGAACCACAGCCTC	AAGGTCCCAGCCATACTCT
STRG.30955.1.p1	AAGAGCAGCAACACCATCCA	CGGCGGTATCATAAGCTCGT
gmmChr05G015740.1	ACCGATACAGCACAACACGA	TCTTCGGCTTCAACAGGCTC
内参基因	GAGGCACCTCTTAACCCTAAAG	CAGCCTGGATAGCAACATACA

引物终浓度稀释至 $10 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，以上述 cDNA 为模板，使用 PerfectStart® Green qPCR SuperMix 试剂盒和 QIAquant 96 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 检测。配置 $20 \mu\text{L}$ 反应体系： $2\times$ PerfectStart® Green qPCR SuperMix $10 \mu\text{L}$ 、上、下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $0.4 \mu\text{L}$ 、模板 $2 \mu\text{L}$ ，加无酶水至 $20 \mu\text{L}$ 。反应过程为：预变性 94°C 30 sec、 94°C 5 sec、 60°C 30 sec，运行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法量化各基因的相对表达量，每个反应设置三个技术重复。数据分析和可视化由 GraphPadPrism (9.5.1)软件完成。

2 结果与分析

2.1 红砂基因组中 *AP2/ERF* 家族成员鉴定

在红砂基因组中，共提取出 73 个 *AP2/ERF* 家族基因。经过 IGV-GSaman 可视化与校准，发现 70 个基因的结构注释稳定可靠(图 1)，3 个基因 (*MSTRG.12998.1.p1*、*gmmChr08G012210.1*、*gmmChr10G009770.1*)注释错误，最终保留 70 个基因用于后续分析。

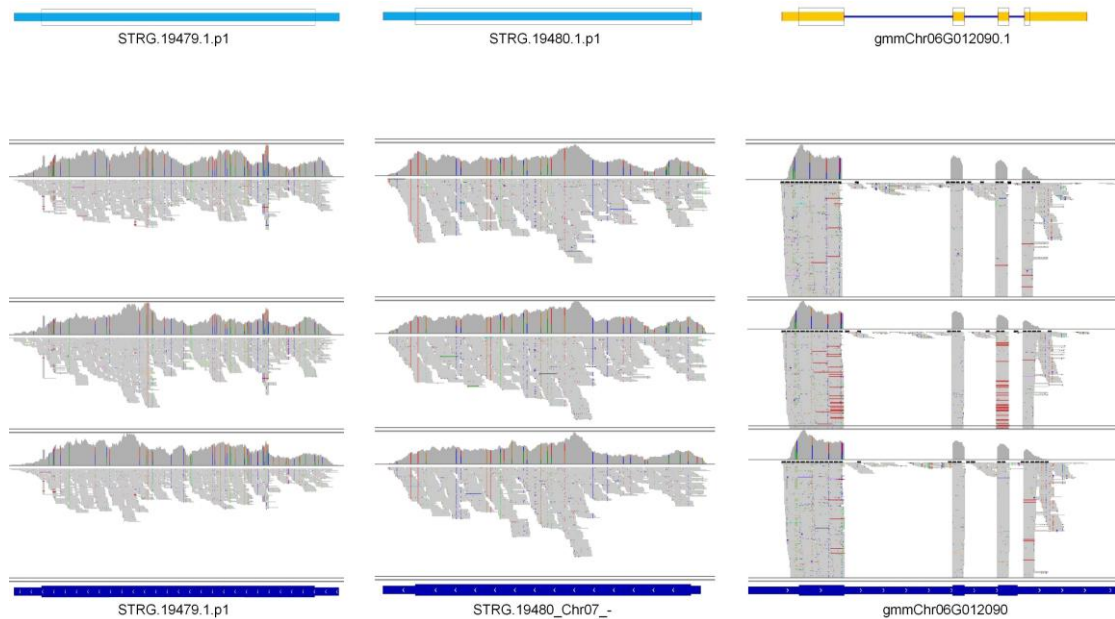


图 1 红砂 *AP2/ERF* 基因代表的结构注释校准图

Figure 1 Structurally annotated calibration map of the representative *R. soongarica* *AP2/ERF* genes

2.2 AP2/ERF 家族成员的系统发育分析

以拟南芥的 147 个 AP2/ERF 家族成员为参照，利用最大似然法构建系统发育树。结果表明，不同物种相同亚家族成员聚集，红砂 AP2/ERF 基因家族可分为四个亚家族，即 AP2、ERF、DREB 和 RAV 亚家族，分别有 11 个、36 个、22 个和 1 个成员。

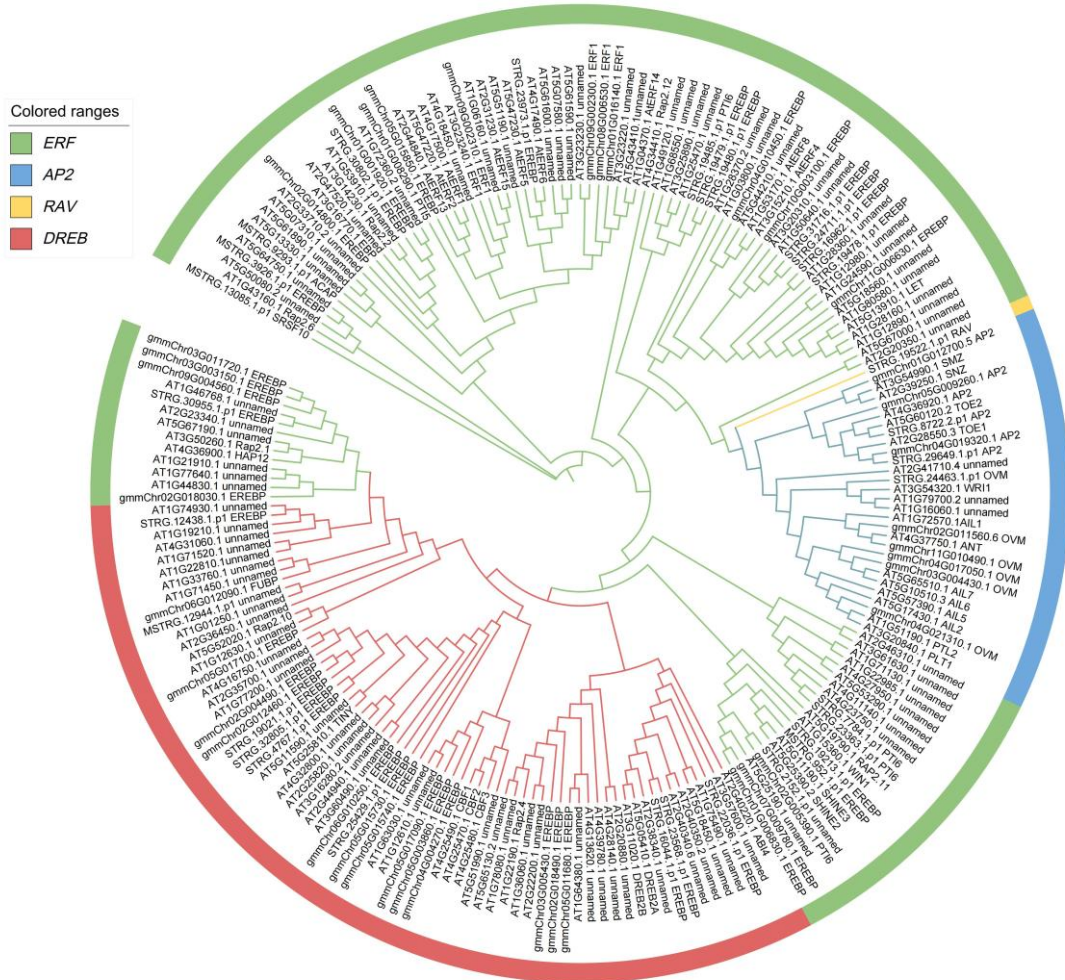


图 2 红砂 AP2/ERF 基因家族系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of the AP2/ERF gene family in *R. soongarica*

2.3 保守基序、基因结构和顺式作用元件分析

红砂 AP2/ERF 亚家族中共含有 10 种 motif。一些保守基序在不同亚家族中分布广泛，如 motif1、2 和 7 在各亚家族中都存在，体现了 AP2/ERF 基因的进化保守性和功能相似性。而一些基序只存在于特定亚家族成员中，如 ERF 亚家族的 motif10 序列及 DREB 亚家族的 motif4 序列。AP2 亚家族成员含有代表 AP2 结构域的 motif3 序列，部分含有 motif5 和 motif6，表明不同亚家族 AP2/ERF 基因可能具有不同功能。

红砂 AP2/ERF 基因家族成员的非编码区(UTR)、外显子及内含子分布分析表明，所有

基因都含有外显子, 除 AP2 亚家族 *gmmChr04G017050.1* 基因不含 UTR 序列, 其他都含有 UTR。在红砂 70 个 *AP2/ERF* 基因中, 28 个基因含有内含子, 约占所有基因数量的 40%。

在红砂 *AP2/ERF* 基因的转录起始位点上游 2000 bp 中, 共鉴定到 41 种顺式作用元件, 不同基因启动子区域含有不同顺式作用元件, 可与多种转录因子结合, 可能在红砂应对多种环境胁迫中发挥多样化作用。这些顺式作用元件至少被分类为五类, 包括光响应元件、激素响应元件、胁迫响应元件、植物生长发育相关元件和其他元件。不同 *AP2/ERF* 基因成员启动子元件的种类和数目差异显著。其中, 与光响应相关的顺式作用元件最多, 存在于 67 个基因成员的启动子区域, 包括 G-box、GT1-motif、ATCT-motif、TCCC-motif、AE-box、GATA-motif、I-box、TCTmotif、SP1 和 LAMP-element。47 个基因含有茉莉酸甲酯元件 (MeJA), 44 个基因含有脱落酸(ABA)响应元件(ABRE), 39 个基因含有低温响应元件(LTR), 34 个基因含有旱胁迫响应元件 MBS (MYB binding site)。

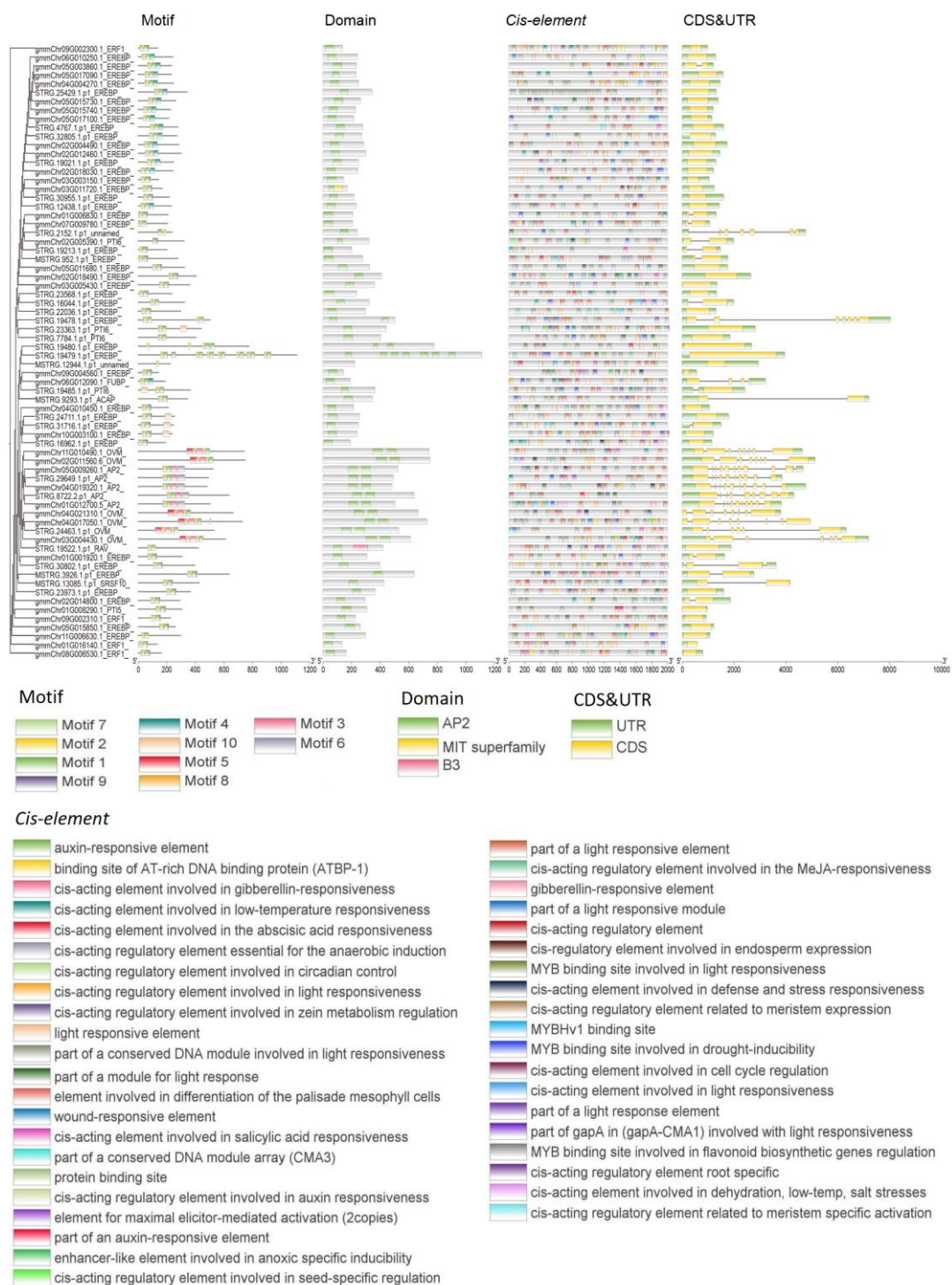


图 3 红砂 AP2/ERF 家族遗传关系，基因保守结构域、保守基序、顺式作用元件和基因结构

Figure 3 Genetic relationship of *R. soongarica* AP2/ERF family, conserved structural domains, conserved motifs, *cis-acting elements* and gene structures

2.4 AP2/ERF 基因的染色体定位、基因复制事件和进化选择压力分析

染色体定位分析显示，70 个 AP2/ERF 基因不均匀分布在红砂的 11 条染色体上，不同

亚家族基因在染色体上的分布无特定规律。其中分布最多的是 5 号染色体, 有 12 个基因成员, 最少的是 6 号染色体, 仅 3 个 *DREB* 亚家族基因分布在染色体一端。

在红砂 *AP2/ERF* 基因中, 90.00% (63/70) 由不同基因复制事件产生, 包括 27 个全基因组重复基因(WGDs, 42.86%)、20 个分散复制基因(DSDs, 31.74%)、11 个转座复制基因(TRDs, 17.46%)和 5 个串联复制基因(TDs, 7.94%)。WGD 基因主要为 *ERF* 亚家族, TD 基因全部为 *ERF* 亚家族。WGD 基因分布于各个染色体上, 除 8 号染色体外的所有染色体上均有 DSD 基因, 转座复制基因较为分散, 主要分布于 8 号染色体上, TD 复制的 5 个基因分别位于 5 号和 7 号染色体。*ERF*、*DREB* 和 *AP2* 亚家族基因多属于 WGD 复制类型, 其次是 DSD 复制类型。

在红砂基因组中, 共鉴定出 197 对 *AP2/ERF* 共线性基因, 各基因对的 K_a/K_s 在 0.058–0.769 间, 表明该基因家族进化过程中经历了较强的净化选择。TRD 基因的 K_a/K_s 比率较高, 表明这些基因的序列分化更快。不同复制类型(WGD、DSD、TRD 和 TD)基因的 K_a/K_s 统计检验分析显示, WGD 与 TRD 及 DSD 基因在进化速率上存在显著差异($P<0.01$)。

2.5 在盐胁迫下的基因表达模式分析

在 70 个 *AP2/ERF* 基因中, 18 个在盐胁迫处理下的表达水平相对较高, 16 个较低甚至不表达。在不同浓度盐胁迫下, 6 个基因(*gmmChr09G002310.1*、*MSTRG.13085.1.p1*、*STRG.32805.1.p1*、*gmmChr05G017090.1*、*STRG.23973.1.p1* 和 *gmmChr05G015740.1*) 差异表达。其中, *STRG.23973.1.p1* 表达量较高。与对照相比, 在 200 mmol·L⁻¹ Na₂SO₄ 胁迫下的表达量上调近一倍, FPKM 值从 52.80 上调到 100.97。*gmmChr09G002310.1* 和 *MSTRG.13085.1.p1* 在盐胁迫下差异显著, 在 200 mmol·L⁻¹ Na₂SO₄ 胁迫下, *gmmChr09G002310.1* 的表达量上调了 6.5 倍; 在 400 mmol·L⁻¹ Na₂SO₄ 胁迫下, *MSTRG.13085.1.p1* 的表达量上调了近 4 倍。

2.6 qRT-PCR 分析

对 7 个基因进行表达量验证, 其中 3 个(*MSTRG.13085.1.p1*、*STRG.23973.1.p1* 和 *gmmChr05G015740.1*) 为表达量相对较高(FPKM≥0.5)且在不同盐胁迫处理下显著差异表达的基因, 4 个(*MSTRG.3926.1.p1*、*MSTRG.9293.1.p1*、*STRG.23363.1.p1* 和 *STRG.30955.1.p1*) 为表达量相对较高(FPKM≥1)的非差异表达基因。结果显示, qRT-PCR 结果与转录组数据趋势一致, 表明这些基因在盐胁迫下的表达模式稳定。

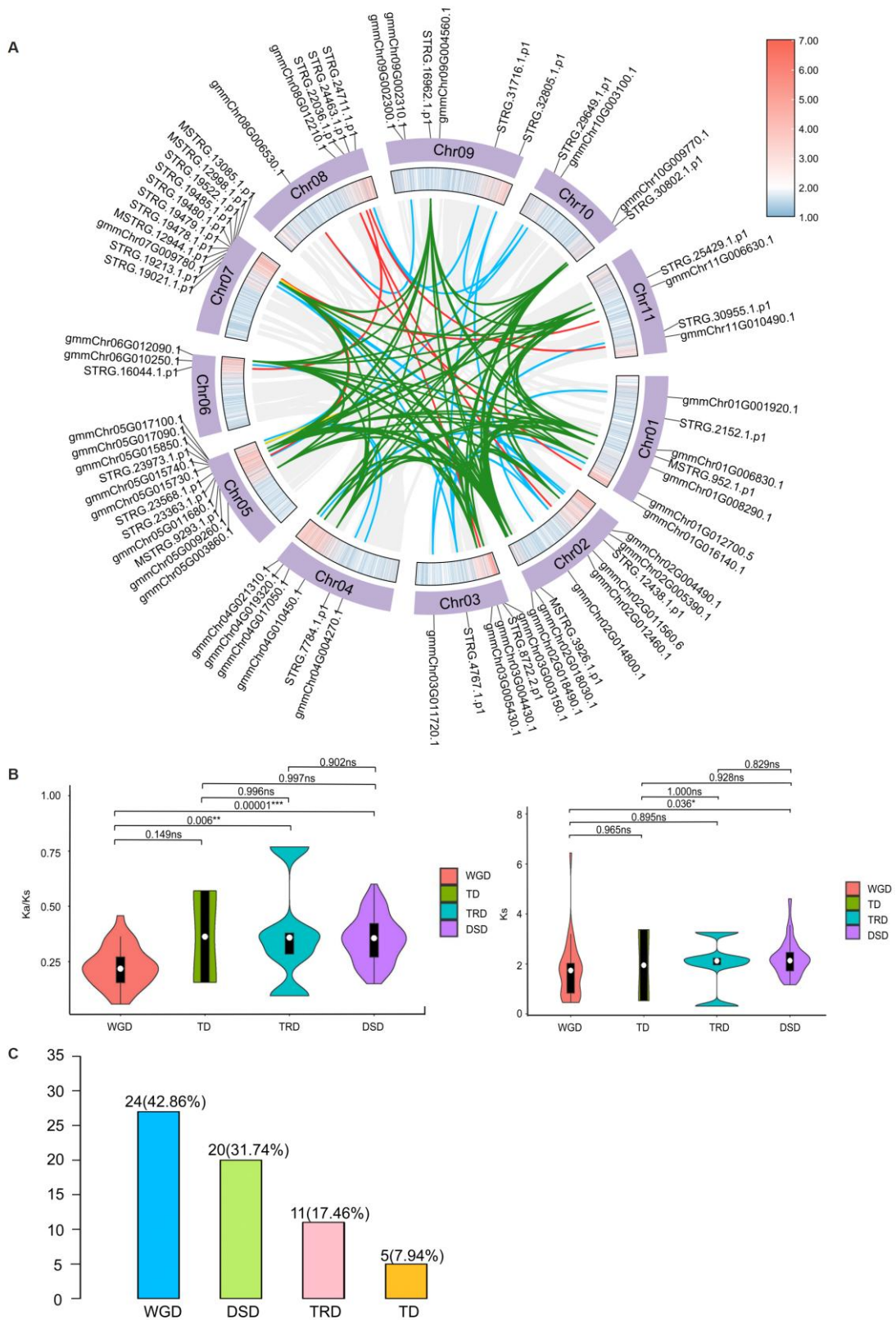


图 4 红砂 *AP2IERF* 基因家族的基因复制事件和选择压力分析

(A) 红砂 *AP2IERF* 基因家族的基因复制事件(绿色线表示 *AP2IERF* 基因的分散复制, 蓝色线表示全基因

组复制, 红色线表示转座复制, 黄色线表示串联复制); (B) 红砂 *AP2/ERF* 基因家族 K_a/K_s 值和 K_s 值的小提琴图, 图中*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$, ns 表示 $P\geq 0.05$ (无统计学意义); (C) 红砂 *AP2/ERF* 家族基因复制事件的条形统计图

Figure 4 Analysis of gene duplication events and selection pressures in the *R. soongarica* *AP2/ERF* gene family

(A) Gene duplication events of the *R. soongarica* *AP2/ERF* gene family (green line indicates dispersed duplication of *AP2/ERF* genes, blue line indicates genome-wide duplication, red line indicates transposable duplication, and yellow line indicates tandem duplication); (B) Violin plots of K_a/K_s and K_s values for the *R. soongarica* *AP2/ERF* gene family. In the figure, * indicates $P<0.05$, ** indicates $P<0.01$, *** indicates $P<0.001$, and ns indicates $P\geq 0.05$ (no statistical significance); (C) Bar chart of gene duplication events of the *R. soongarica* *AP2/ERF* family.

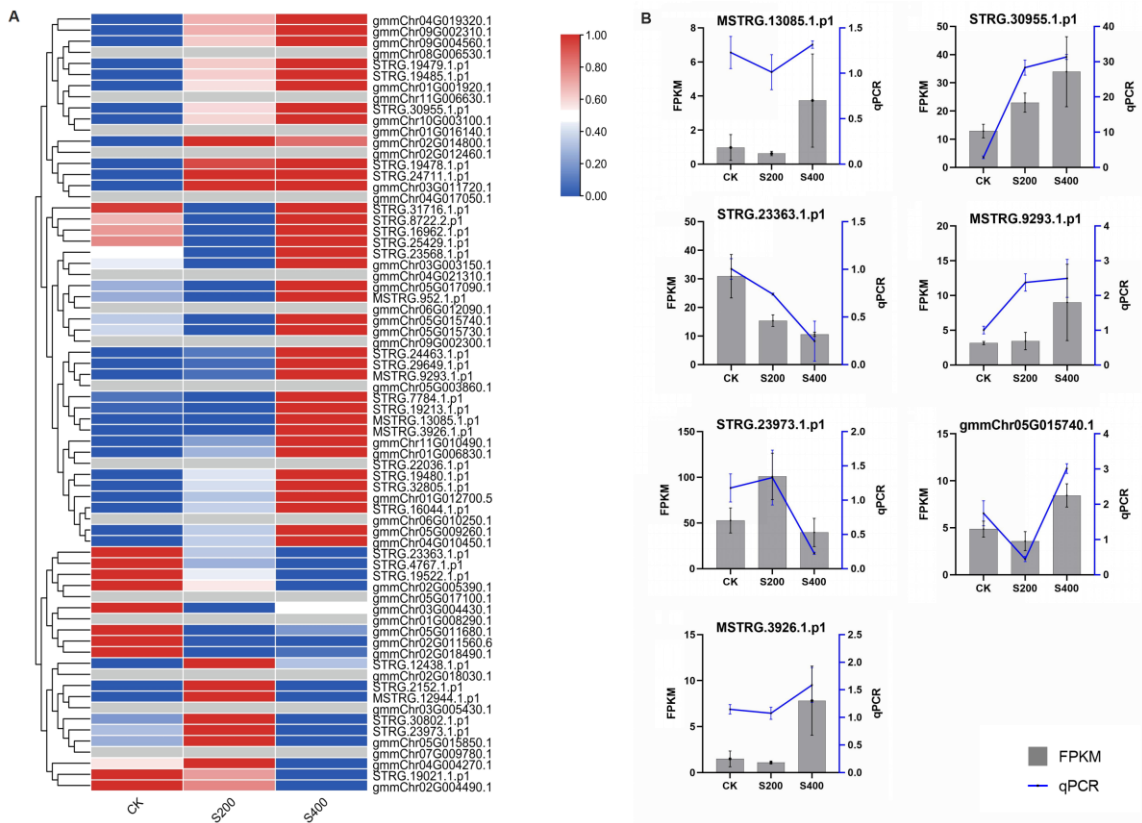


图 5 红砂 *AP2/ERF* 基因家族在盐胁迫下的表达模式

(A) 红砂 *AP2/ERF* 家族成员在不同浓度盐胁迫下的表达谱; (B) 部分 *AP2/ERF* 基因在盐胁迫下的 qRT-PCR 验证结果

Figure 5 Expression pattern of the *R. soongarica* *AP2/ERF* gene family under salt stress

(A) Expression profiles of the *R. soongarica* AP2/ERF family members under different concentrations of salt stress; (B) qRT-PCR validation results of some AP2/ERF genes under salt stress

3 讨论

AP2/ERF 转录因子家族是植物中一类高度保守的调控因子,其成员通过结合靶基因启动子中的特定顺式作用元件(如 GCC-box 和 DRE/CRT 等),调控下游基因的表达,从而在植物生长发育和逆境响应中发挥核心作用¹⁸。根据结构域组成和功能差异,AP2/ERF 家族被划分为 AP2、ERF、DREB、RAV 和 Soloist 五个亚家族。其中,DREB 和 ERF 亚家族是植物应答非生物胁迫的主要调控枢纽:DREB 成员通过激活渗透调节基因(如 *LEA*、*COR15A*),增强植物对干旱和低温的耐受性¹⁷;而 ERF 成员则通过整合乙烯(ET)、茉莉酸(JA)等激素信号,参与生物胁迫防御和逆境适应调控网络¹⁸。近年来,AP2/ERF 家族在非模式植物极端环境适应中的功能备受关注,但其在红砂等典型耐盐物种中的进化特征及调控机制尚不明确。

本研究在红砂基因组中鉴定到 70 个 AP2/ERF 基因,其数量显著少于拟南芥(147 个)、水稻(164 个)和枣(127 个)等植物¹⁷¹⁶,这可能与其荒漠生境下的基因组精简策略相关。系统发育分析显示,红砂 AP2/ERF 家族以 ERF 亚家族(36 个)为主,而 RAV 亚家族仅含 1 个成员,与拟南芥(6 个 RAV 基因)形成鲜明对比。这一现象可能反映了二者生存策略的差异:RAV 亚家族在拟南芥中通过整合光信号与 ABA 通路调控发育可塑性¹⁵,而红砂作为多年生矮灌木,可能通过功能整合或代偿机制简化发育调控网络,以集中资源应对极端环境压力。值得注意的是,红砂 AP2/ERF 各亚家族成员数目与多数植物一致(ERF>DREB>AP2>RAV)^{17 15},反映了该家族在进化上的共同起源¹⁷。保守基序分析表明,motif1、2、7 的广泛分布印证了 AP2/ERF 家族的进化保守性,而 ERF 亚家族特有的 motif10 和 DREB 亚家族特有的 motif4 则提示功能分化可能与基序组合模式相关。此外,AP2 亚家族的外显子和内含子数量显著多于其他亚家族,表明其基因结构在长期进化中经历了更多修饰,这一特征与黄瓜 AP2 基因家族相似¹⁸,暗示了 AP2 亚家族在调控复杂发育过程中更强的可塑性。

基因复制事件是植物基因家族扩张和功能多样化的关键驱动力¹⁵。本研究发现,红砂 AP2/ERF 家族中 90.00%的成员(63/70)源自基因复制事件,其中全基因组复制(WGD, 42.86%)和分散复制(DSD, 31.74%)是主要扩张方式。WGD 基因多为 ERF 亚家族,分布于

红砂所有染色体, 暗示多倍化事件驱动剂量效应增强红砂对盐渍环境的适应性。 K_a/K_s 分析进一步表明, 红砂 *AP2/ERF* 家族成员在进化中经历了强烈的净化选择($K_a/K_s=0.058-0.769$), 尤其是 WGD 基因的极低 K_a/K_s 值(平均 0.15), 可能与 *AP2* 结构域在 DNA 结合中的功能约束有关。值得注意的是, 转座复制(TRD)基因的 K_a/K_s 值较高(0.769), 提示其可能通过序列快速分化获得新功能, 类似于胡杨中转座子相关基因在盐胁迫响应中的创新机制 17。

红砂 *AP2/ERF* 基因启动子区鉴定出多种顺式作用元件, 包括光响应元件(G-box、GT1-motif、SP1、GATA-motif)及非生物胁迫相关元件(ABRE、MBS)。其中, ABRE 元件参与植物盐胁迫响应调控 17, 而 MBS 元件通过增强抗旱性基因的表达提高逆境适应性 18。例如, 过表达 *SmERFB3-45* 通过调节 Na^+/K^+ 稳态和缓解氧化损伤显著提升植物耐盐性 16, 而 *OsDREB2A* 则通过积累渗透溶质(如脯氨酸和可溶性糖)增强盐胁迫抗性 19。本研究发现, 红砂 *ERF* 和 *DREB* 亚家族成员在盐胁迫下显著上调, 而 *AP2* 亚家族表达水平无显著变化, 这与梔子 19 的研究结果一致, 表明 *AP2* 亚家族可能在盐胁迫响应中功能保守或存在代偿机制。在盐胁迫下, 红砂 *ERF* 亚家族基因 *gmmChr09G002310.1* ($200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{SO}_4$ 处理下上调 6.5 倍)可能通过激活 JA 信号通路增强耐盐性, 类似于拟南芥 *AtERF1* 的调控机制 15; 而 *DREB* 亚家族基因 *MSTRG.13085.1.p1* ($400\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胁迫下上调 4 倍)可能通过结合 *DRE* 元件调控渗透保护物质(如甜菜碱)的合成, 与拟南芥 *CBF3* 的功能保守性一致 16。此外, 启动子区 ABRE 和 LTR 元件的富集(分别占 44 和 39 个基因)暗示红砂可能通过交叉调控网络整合盐胁迫、干旱和低温信号, 这一多胁迫协同适应策略与其荒漠生境的高度异质性高度契合。

本研究在基因组水平系统鉴定了荒漠植物红砂 *AP2/ERF* 转录因子家族基因, 揭示了其进化特征及盐胁迫响应机制。系统发育分析表明, 红砂 *AP2/ERF* 家族以 *ERF* 和 *DREB* 亚家族为主, 其基因结构、保守基序及顺式作用元件的分布特征与功能分化高度关联。全基因组复制和分散复制是红砂 *AP2/ERF* 家族扩张的主要驱动力, 强烈的净化选择($K_a/K_s<1$)作用维持了其核心功能域的保守性。盐胁迫实验表明, 6 个 *ERF* 和 *DREB* 亚家族基因在盐胁迫下显著上调表达, 其启动子区富集 ABA、干旱及低温响应元件, 提示红砂通过整合多胁迫信号通路实现对盐渍生境的适应。本研究为红砂遗传资源的挖掘和进一步解析其逆境适应分子机制提供了新依据, 鉴定的盐胁迫响应基因为植物基因工程改良提供了候选。

作者贡献声明

朱梦璇: 数据分析、实验、初稿撰写及修改; 刘渊和赵颢宇: 数据分析和初稿撰写; 巩薇: 验证实验; 孙振云: 基因结构校准; 党振华: 实验设计、数据分析、论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

参考文献

- Chen CJ, Li JW, Feng JT, Liu B, Feng L, Yu XL, Li GL, Zhai JX, Mereys BC, Xia R** (2021). sRNAanno—a database repository of uniformly annotated small RNAs in plants. *Hortic Res* **8**, 45.
- Chen Y, Sun MZ, Jia BW, Leng Y, Sun XL** (2022). Research progress regarding the function and mechanism of rice *AP2/ERF* transcription factor in stress response. *Acta Agron Sin* **48**(4), 781–790.
- Cheng MC, Liao PM, Kuo WW, Lin TP** (2013). The *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol* **162**(3), 1566–1582.
- Dong YM, Zhang WY, Ling ZY, Li JR, Bai HT, Li H, Shi L** (2020). Advances in transcription factors regulating plant terpenoids biosynthesis. *Chin Bull Bot* **55**, 340–350.
- 董燕梅, 张文颖, 凌正一, 李靖锐, 白红彤, 李慧, 石雷** (2020). 转录因子调控植物萜类化合物生物合成研究进展. *植物学报* **55**(3), 340–350.
- Fan K, Ye FT, Mao ZJ, Pan XF, Li ZW, Lin WX** (2021). Comparative genomics of the small heat shock protein family in angiosperms. *Chin Bull Bot* **56**, 245–261.
- 范凯, 叶方婷, 毛志君, 潘鑫峰, 李兆伟, 林文雄** (2021). 被子植物小热激蛋白家族的比较基因组学分析. *植物学报* **56**(3), 245–261.
- Feng CZ, Chen Y, Wang C, Kong YH, Wu WH, Chen YF** (2014). *Arabidopsis* RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. *Plant J* **80**(4), 654–668.
- Geng DM, Shan LS, Li Y, Васильевич ЖА** (2014). Effect of soil water stress on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme activity in *Reaumuria soongorica* seedlings. *Chin Bull Bot* **49**, 282–291.
- 耿东梅, 单立山, 李毅, Жигунов Анатолий Васильевич** (2014). 土壤水分胁迫对红砂幼苗叶绿素荧光和抗氧化酶活性的影响. *植物学报* **49** (03), 282-291.
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF** (2000). Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold

- acclimation. *Plant Physiol* **124**(4), 1854–1865.
- Guo HB, Hao LD, Wei YD** (2021). Genome-wide identification and expression profile analysis of maize AP2 transcription factors. *Mol Plant Breed* **19**(5), 1402–1408.
- 郭海滨, 郝立冬, 魏雅冬 (2021). 全基因组鉴定和表达模式分析玉米 AP2 转录因子. 分子植物育种 **19**(5), 1402–1408.
- Hong L, Yang L, Yang HJ, Wang W** (2020). Research advances in AP2/ERF transcription factors in regulating plant responses to abiotic stress. *Chin Bull Bot* **55**, 481–496.
- 洪林, 杨蕾, 杨海健, 王武 (2020). AP2/ERF 转录因子调控植物非生物胁迫响应研究进展. 植物学报 **55**(4), 481–496.
- Hua X, Tian BW, Zhou XT, Jiang ZH, Wang SQ, Huang QH, Zhang J, Chen YH** (2024). Cloning *SmERF B3-45* from *Salix matsudana* and functional analysis on its tolerance to salt. *Biotechnol Bull* **40**(12), 124–135.
- 华炫, 田博雯, 周欣彤, 江梓涵, 王诗琦, 黄倩慧, 张健, 陈艳红 (2024). 旱柳 *SmERF B3-45* 的克隆及耐盐功能研究. 生物技术通报 **40**(12), 124–135.
- Ji Q, Zhou F, Zhou J, Wang D, Hu MH, Li D, Shen BQ, Deng L, Gao XY, Du ZY** (2018). Whole genome identification and bioinformatics analysis of AP2/EREBP transcription factors of *Ziziphus jujube*. *Genomics Appl Biol* **37**(7), 2983–2997.
- 纪晴, 周凡, 周军, 王大玮, 胡孟豪, 李丹, 沈兵琪, 邓浪, 高晓宇, 杜宗义 (2018). 枣 AP2/EREBP 转录因子的全基因组鉴定及生物信息学分析. 基因组学与应用生物学 **37**(7), 2983–2997.
- Kim YH, Yang KS, Ryu SH, Kim KY, Song WK, Kwon SY, Lee HS, Bang JW, Kwak SS** (2008). Molecular characterization of a cDNA encoding DRE-binding transcription factor from dehydration-treated fibrous roots of sweetpotato. *Plant Physiol Biochem* **46**(2), 196–204.
- Langmead B, Salzberg SL** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**(4), 357–359.
- Li B, Dewey CN** (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 1–16.
- Li JY, Ma J, Cai L, Zeng YL, Mei XD, Zhang FC** (2003). Sequence analysis of bacterial transposon in *NHX* gene of *Populus euphratica*. *Guihaia* **19**(5), 628–631.

- 李金耀, 马纪, 蔡伦, 曾幼玲, 梅新娣, 张富春 (2003). 在胡杨 *NHX* 基因内发现细菌转座子 IS10-L 的存在. *生物工程学报* (5), 628–631.
- Li Y, Zhou J, Li Z, Qiao J, Quan R, Wang J, Huang R, Qin H (2022). SALT AND ABA RESPONSE ERF1 improves seed germination and salt tolerance by repressing ABA signaling in rice. *Plant Physiol* **189**(2), 1110–1127.
- Liu H, Tang X, Zhang N, Li S, Si H (2023). Role of bZIP transcription factors in plant salt stress. *Int J Mol Sci* **24**(9), 7893.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**(8), 1391–1406.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006). Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* **140**(2), 411–432.
- Sharoni AM, Nuruzzaman M, Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Sasaya T, Choi IR, Omura T, Kikuchi S (2011). Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol* **52**(2), 344–360.
- Song M, Gong W, Tian Y, Meng Y, Huo T, Liu Y, Zhang Y, Dang Z (2024). Chromosome-level genome assembly and annotation of xerophyte secretahalophyte *Reaumuria soongarica*. *Sci Data* **11**(1), 812.
- WANG YF, MENG Y, YU HH, CUI DY, BAI Y (2023). Identification of AP2/ERF gene family in *Aquilegia vulgaris* and expression analysis under salt stress. *Guihaia*, **43**(10), 1861–1875.
- 王玉凤, 孟缘, 于海航, 崔丁元, 白云 (2023). 欧耧斗菜 *AP2/ERF* 基因家族鉴定及盐胁迫下表达分析. *广西植物* **43**(10), 1861–1875.
- Wang YJ, Li MC, Wu W, Wu HY, Xu YN (2013). Cloning and characterization of an AP2/EREBP gene *TmAP2-1* from *Tetraena mongolica*. *Chin Bull Bot* **48**, 23–33.
- 王玉静, 李敏春, 武旺, 吴韩英, 许亦农 (2013). 四合木抗逆相关的转录因子 *TmAP2-1* 基因的克隆及功能分析. *植物学报* **48**(1), 23–33.
- Wei XY (2021). Study on the physiological and transcriptomics analysis of *Reaumuria soongarica* seedlings under drought stress. Master's Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University. pp. 1–82.

- 魏晓芸 (2021). 干旱胁迫下红砂幼苗的生理和转录组学分析. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学. pp. 1–82.
- Wu YM, Fan WZ, Li HY, Li XY (2020). Identification and expression of protein kinase gene family related to drought resistance in *Setaria italica*. *J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed)* **40**(1), 01-10.
- 武懿茂, 樊武哲, 李红英, 李雪垠 (2020). 谷子抗旱相关蛋白激酶基因家族鉴定及表达分析. 山西农业大学学报(自然科学版) **40**(1), 1–10.
- Yamada Y, Nishida S, Shitan N, Sato F (2020). Genome-wide identification of *AP2/ERF* transcription factor-encoding genes in California poppy (*Eschscholzia californica*) and their expression profiles in response to methyl jasmonate. *Sci Rep* **10**(1), 18066.
- Yang W, Zhao LF, Yang J, Li F, Wang TW, Deng Y (2024). Genome-wide identification and expression analysis of the *AP2/ERF* gene family in *Cucumis sativus* L. *J Yunnan Agric Univ (Nat Sci)* **39**(3), 127–143.
- 杨巍, 赵丽芬, 杨娟, 李飞, 王天文, 邓英 (2024). 黄瓜 *AP2/ERF* 基因家族全基因组鉴定及表达模式分析. 云南农业大学学报(自然科学) **39**(3), 127–143.
- Zeng YJ, Wang YR, Zhang BL, Zhuang GH (2002). Reproductive characteristics of *Reaumuria soongorica* populations. *Acta Pratacult Sin* **11**(2), 66–71.
- 曾彦军, 王彦荣, 张宝林, 庄光辉 (2002). 红砂种群繁殖特性的研究. 草业学报 (2), 66–71.
- Zhai Y, Yang XJ, Sun TG, Zhao Y, Yu CF, Wang XW (2013). Cloning, expressing and functional analysis of *GmERF5* from soybean. *Chin Bull Bot* **48**, 498–506.
- 翟莹, 杨晓杰, 孙天国, 赵艳, 余春粉, 王秀文 (2013). 大豆转录因子 *GmERF5* 的克隆、表达及功能分析. 植物学报 **48** (05), 498–506.
- Zhang QG, Lin XQ, Ye ZL, Xu YZ, Zou SQ, Zou XX (2023). Identification of *AP2* gene family in *Gardenia jasminoides* and its expression analysis under salt stress. *J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed)* **52**(4), 457–465.
- 张麒功, 林协全, 叶泽霖, 徐易溱, 邹双全, 邹小兴 (2023). 梔子 *AP2* 基因家族成员鉴定及其在盐胁迫下的表达模式. 福建农林大学学报(自然科学版) **52**(4), 457–465.
- Zhang XX, Tang YJ, Ma QB, Yang CY, Mu YH, Suo HC, Luo LH, Nian H (2013). OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean. *PLoS one* **8**(12), e83011.

Zhang Z, Li X (2018). Genome-wide identification of *AP2/ERF* superfamily genes and their expression during fruit ripening of Chinese jujube. *Sci Rep* **8**(1), 15612.

Zhao XH, Wang QJ, Li C, Chen XD, Xiao W, Gao DS, Fu XL (2018). Genome-wide identification of ethylene responsive factor (ERF) family genes in peach and screening of genes related to germination. *Chin Bull Bot* **53**, 612–624.

赵雪惠, 王庆杰, 李晨, 陈修德, 肖伟, 高东升, 付喜玲 (2018). 桃 ERF 转录因子家族生物信息学分析及芽萌发相关基因筛选. *植物学报* **53**(5), 612–624.

Genome-wide Identification of the *AP2/ERF* Gene Family and Its Expression Patterns under Salt Stress in the Desert Plant

Reaumuria soongorica

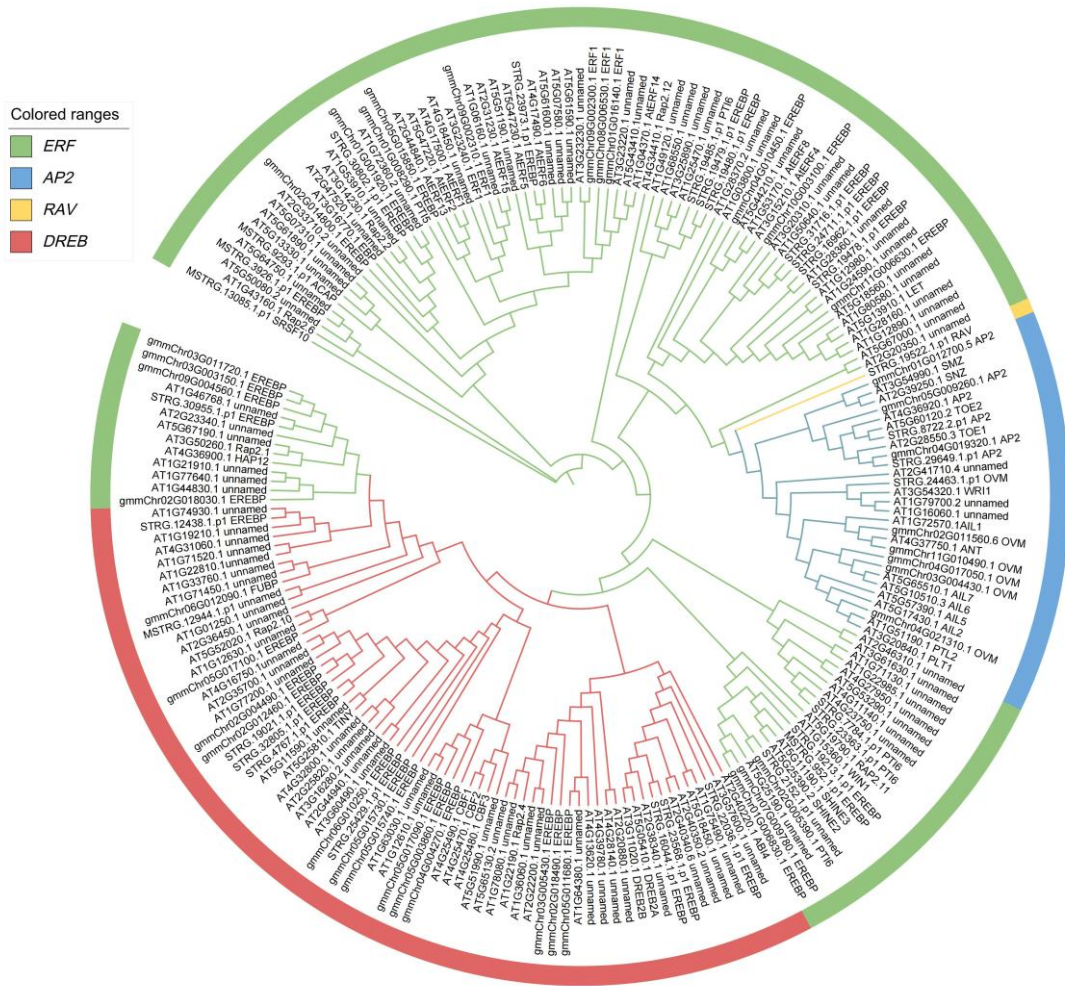
Mengxuan Zhu, Yuan Liu, Haoyu Zhao, Zhenyun Sun, Wei Gong, Zhenhua Dang*
Ministry of Education Key Laboratory of Ecology and Resource Use of the Mongolian Plateau, Inner
Mongolia Key Laboratory of Grassland Ecology, School of Ecology and Environment, Inner Mongolia
University, Hohhot 010021, China

INTRODUCTION: *Reaumuria soongorica*, a perennial small shrub, is widely distributed in arid desert regions of northwestern China. It exhibits exceptional drought and salt tolerance, making it an ideal model for studying molecular mechanisms of plant stress resistance.

RATIONALE: We used the *R. soongorica* genome as a reference to identify members of the AP2/ERF gene family in this species, and analyzed their phylogeny, gene structure, conserved motifs, cis-acting elements, gene duplication events, as well as the expression patterns of these family members under salt stress.

RESULTS: Seventy AP2/ERF genes were identified from the *R. soongorica* genome. Phylogenetic analysis classified these genes into four subfamilies: AP2, ERF, DREB, and RAV. Cis-acting element analysis revealed multiple regulatory elements associated with light responsiveness, stress adaptation, growth regulation, and hormone signaling in the promoter regions of *R. soongorica* AP2/ERF genes. These genes exhibited an uneven distribution across all 11 chromosomes of the *R. soongorica* genome, with 63 genes (90% of the total) originating from gene duplication events. Evolutionary analysis suggested that whole-genome duplication (WGD) and dispersed duplication were the primary drivers of family expansion. Under salt stress, AP2/ERF genes showed divergent expression patterns in *R. soongorica* seedlings, with six genes displaying significant differential expression ($|\log_2FC| \geq 1$, $p < 0.05$), implicating their potential roles in salt stress response.

CONCLUSION: This study identified and characterized the AP2/ERF gene family in *R. soongorica* at the genomic level, thereby establishing a foundation for elucidating its functional roles in this species' adaptation to arid and saline environments.



Phylogenetic tree of the AP2/ERF gene family in *R. soongorica*.

Key words AP2/ERF gene family, gene structure analysis, salt stress, expression analysis, *Reaumuria soongorica*

* Author for correspondence. E-mail: zhidang@imu.edu.com

通讯作者/团队介绍

党振华, 内蒙古大学生态与环境学院副教授、博士生导师, 主要研究方向为植物分子生态学, 研究内容涉及植物逆境适应进化、植物基因组学、基因功能鉴定等, 主持国家自然科学基金项目、国家重点研发计划项目专题及省级项目 8 项, 在国内外学术期刊发表论文 40 余篇。