

DOI:10.11686/cyxb2024277

http://cyxb.magtech.com.cn

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.

WEN Xiao-Yue, ZHAO Ying, WANG Bao-qiang, 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.

# 外源NO调控干旱胁迫下紫花苜蓿 AP2/ERFs基因的表达分析

温小月<sup>1</sup>, 赵颖<sup>1,2,3\*</sup>, 王宝强<sup>1,2,3</sup>, 王贤<sup>1,4</sup>, 朱晓林<sup>1,4</sup>, 王义真<sup>1,4</sup>, 魏小红<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 4. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**紫花苜蓿是世界上种植最广泛的饲用豆科作物。APETALA2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF) 转录因子在植物抵御非生物胁迫中起着关键作用。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 作为植物体内的一种信号分子, 在植物抗旱中扮演重要角色。本研究利用生物信息学方法对紫花苜蓿 MsAP2/ERF 基因家族成员进行鉴定及其对 NO 和干旱的响应模式分析, 并从 MsAP2/ERF 基因家族中筛选到强烈响应 NO 调控的 MsERF07 基因进行亚细胞定位。结果表明, 该家族成员均含有 AP2 结构域, 其蛋白质的氨基酸数目介于 176~422; 亚细胞定位预测大部分蛋白都定位在细胞核; MsERF01 和 MsERF11 的亲缘关系较近, 并且它们具有相似的结构域; 61.54% 的 MsAP2/ERF 基因只含有外显子, 也具有高度相似的保守基序; 蛋白互作显示 MsERF01 和 MsERF11、MsERF05 和 MsERF07 均处于蛋白互作图中的同一节点; 13 个 MsAP2/ERF 基因家族成员被不均匀分布在 13 条染色体上, MsAP2/ERF 基因家族成员的启动子序列中有 43 个与光反应、组织特异性表达、胁迫以及植物激素相关的顺式调控元件。此外, 紫花苜蓿的转录组测序数据分析表明大部分 MsAP2/ERF 基因家族成员在 NO 的调控下表达量增加, 进一步 qRT-PCR 试验结果显示, 外源 NO 促进了干旱胁迫下 MsAP2/ERF 基因的表达量。克隆 MsERF07 基因, 亚细胞定位结果显示该蛋白定位在细胞核与细胞膜中, 本研究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基础。

**关键词:**干旱胁迫; 一氧化氮; 紫花苜蓿; AP2/ERF

## Expression analysis of AP2/ERFs genes in alfalfa regulated by exogenous NO under drought stress

WEN Xiao-Yue<sup>1</sup>, ZHAO Ying<sup>1,2,3\*</sup>, WANG Bao-qiang<sup>1,2,3</sup>, WANG Xian<sup>1,4</sup>, ZHU Xiao-lin<sup>1,4</sup>, WANG Yi-zhen<sup>1,4</sup>, WEI Xiao-hong<sup>1,2,3,4</sup>

1. College of Life Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Key Laboratory of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China; 3. Gansu Provincial Key Laboratory of Aridland Crop Science, Lanzhou 730070, China; 4. College of Agronomy, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China

**Abstract:** Alfalfa (*Medicago sativa*) is the most widely grown forage legume crop in the world. APETALA2/ethylene-responsive (AP2/ERF) transcription factors play a key role in plant resistance to abiotic stress. Nitric oxide (NO), as a signaling molecule in plants, plays an important role in plant drought resistance. In this study, bioinformatics methods were used to identify members of the alfalfa MsAP2/ERF gene family and analyze their

收稿日期: 2024-07-16; 改回日期: 2024-09-05

基金项目: 甘肃农业大学科技创新基金-科研启动基金(GSAU-KYQD-2020-7)和国家自然科学基金(32060401)资助。

作者简介: 温小月(1998—), 女, 江西宜春人, 在读硕士。E-mail: 1096106697@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 1137974332@qq.com

response patterns to NO and drought. The *MsERF07* gene, which strongly responds to NO regulation, was screened from the *MsAP2/ERF* gene family for subcellular localization. The results showed that all members of the family contained AP2 domains, and the number of amino acids in their proteins ranged from 176 to 422. Subcellular localization predicted that most proteins were localized in the nucleus. *MsERF01* and *MsERF11* were closely related and had similar domains. 61.54% of *MsAP2/ERF* genes contained only exons and also had highly similar conserved motifs. Protein interaction showed that *MsERF01* and *MsERF11*, *MsERF05* and *MsERF07* were all located at the same node in the protein interaction map. The 13 *MsAP2/ERF* gene family members were unevenly distributed on 13 chromosomes, and there were 43 *cis*-regulatory elements related to light response, tissue-specific expression, stress and plant hormones in the promoter sequences of the *MsAP2/ERF* gene family members. In addition, transcriptome sequencing data analysis of alfalfa showed that the expression of most *MsAP2/ERF* gene family members increased under the regulation of NO, and further qRT-PCR experimental results showed that exogenous NO promoted the expression of *MsAP2/ERF* genes under drought stress. The *MsERF07* gene was cloned, and subcellular localization results showed that the protein was localized in the nucleus and cell membrane. This study provides a basis for subsequent research on the molecular mechanism of the alfalfa *MsERF07* gene action in response to drought stress.

**Key words:** drought stress; nitric oxide; alfalfa; AP2/ERF

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是豆科异花授粉的同源四倍体植物, 其以高产量、营养丰富、适口性良好等特点被誉为“牧草之王”。随着我国草食性家畜养殖业的迅速扩张, 对紫花苜蓿的需求量逐步增加<sup>[1]</sup>。然而, 苜蓿广泛种植在我国西北干旱和半干旱地区 (苜蓿种植面积占全国的 60.6%), 受干旱环境影响严重<sup>[2]</sup>。研究表明, 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 作为一种小型的气体信号分子, 通过细胞间和细胞内两种途径传递着植物生命活动的信息, 在植物抗逆方面有着不可或缺的作用<sup>[3]</sup>。在分子水平上, NO 能诱导相关基因的表达并响应干旱胁迫。例如, 一氧化氮能通过调节 *LEA* 基因的表达从而减轻干旱胁迫对绿豆 (*Vigna radiata*) 的生长和氮代谢的不利影响<sup>[4]</sup>; *AtWRKY15*、*AtWRKY25*、*AtWRKY40* 和 *AtWRKY53* 在 NO 处理下显著上调表达<sup>[5]</sup>。生理水平上, 在大豆 (*Glycine max*)<sup>[6]</sup>、油菜 (*Brassica napus*)<sup>[7]</sup>、玉米 (*Zea mays*)<sup>[8]</sup> 等植物中通过施加一氧化氮可减轻植物因干旱引起的氧化损伤, 从而缓解干旱胁迫对植株的破坏。苜蓿种子在水分胁迫条件下, 添加 NO 后, 其萌发能力得到了显著的增强<sup>[9]</sup>, 在转录水平上, 对照与乙烯反应转录因子 1 (ethylene responsive factor 1, ERF1) 相比表达量显著增强<sup>[10]</sup>。NO 参与了植物对逆境的调节机制, 并且能缓解干旱胁迫对植物细胞造成的损害, 目前, 已证明叶施硝普纳 (sodium nitroprusside, SNP) 作为 NO 外源供体可显著增强植物的耐旱性<sup>[11]</sup>。

近年来, 紫花苜蓿抗旱机理研究逐渐由表观形态和生理代谢向基因表达层面转变, 转录调控成为植物对逆境胁迫反应中的研究重点。转录因子是一类能够调控基因表达的蛋白质, 在植物受到外界逆境胁迫时会与下游基因的顺式作用元件结合, 通过信号传递调控下游基因, 从而调控植物对外界逆境环境的响应<sup>[12]</sup>。AP2/ERF 基因家族在植物抗逆机制研究中最广泛, 尤其在调节干旱耐受性相关基因的表达上起关键作用。根据序列相似性和保守结构域 AP2/ERF 被分为多个亚家族, 包括 AP2、DREB/CBF、ERF 和 RAV 4 个亚家族, ERF 亚家族只有一个 AP2/ERF 结构域, 可分为两个主要亚家族, ERF 和 DREB/CBF, ERF 亚家族主要参与植物在逆境条件下的应答, 如干旱、盐胁迫等<sup>[13]</sup>。研究表明, ERF 亚家族的转录因子在干旱胁迫下被显著上调, 并且与植物的抗旱性能密切相关<sup>[14]</sup>。过表达 *MsERF003* 的转基因烟草 (*Nicotiana tabacum*) 植株比野生型有更好的保水性, 其脯氨酸含量极显著高于野生型, 显示出更强的抗旱能力<sup>[15]</sup>。*OsERF83* 作为一种定位于细胞核的转录因子, 积极响应各种非生物胁迫, 而过表达 *OsERF83* 能显著提高水稻 (*Oryza sativa*) 的耐旱性<sup>[16]</sup>。转基因大豆的抗旱性通过 GmDREB1 与 ERF 类转录因子形成异二聚体来调控下游胁迫相关基因的表达而提升<sup>[17]</sup>。玉米中 *ZmERF21* 基因通过与潜在靶基因的启动子结合, 直接调控激素 (乙烯、脱落酸) 和 Ca 信号相关基因以及其他应激反应基因的表

达,从而参与玉米干旱胁迫反应<sup>[18]</sup>。*CqERF24*在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的过表达通过增加抗氧化酶活性和激活相关的胁迫基因来增强抗旱性<sup>[19]</sup>。除此以外,在甘薯(*Ipomoea batatas*)<sup>[20]</sup>、番茄(*Solanum lycopersicum*)<sup>[21]</sup>等植物中过表达*ERF*基因都显著提高植物的抗旱性,由此可见,AP2/ERF在植物应对干旱胁迫中起着重要作用。但作为世界上最重要的饲用豆科植物之一的紫花苜蓿在AP2/ERF基因家族中的研究却鲜有报道。

为了进一步探明外源NO在增强紫花苜蓿抗旱性中的调控机制,本研究基于前期转录组测序鉴定出响应NO和干旱胁迫的13个紫花苜蓿*MsAP2/ERF*基因成员,对它们进行生物信息学分析,结合干旱胁迫下的表达模式分析和qRT-PCR,筛选出在NO和干旱胁迫下最显著的*MsERF07*基因,通过克隆*MsERF07*基因,进行亚细胞定位研究生物分子的功能和作用机制,为研究紫花苜蓿应答逆境的机制以及培育优良抗逆品种提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究以抗旱性较强且对NO敏感的紫花苜蓿品种“三得利”(由甘肃农业大学生命科学技术学院保存)为试验材料,于2023年3月27日播种于直径为15 cm的塑料花盆中,置于甘肃农业大学生命科学技术学院植物逆境生理实验室中培养。选取籽粒饱满且无病虫害的紫花苜蓿种子,经0.1% HgCl消毒5 min后,用去离子水冲洗5~6次,然后用水浸泡24 h。均匀点播于装有高压灭菌营养土的花盆中,每隔2 d使用称重法补充水分,培养45 d后对紫花苜蓿幼苗进行处理。试验设计为:正常浇水对照(CK);10% PEG-6000(聚乙二醇6000);0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SNP+10% PEG-6000(SNP+PEG)。每个处理设置3个重复,在处理的0、3、9、12、24、48 h采集紫花苜蓿幼苗叶片进行后续试验。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 生物信息学分析** 从已公布出的159个紫花苜蓿ERF转录因子数据库中<sup>[22]</sup>,及课题组前期已完成的紫花苜蓿幼苗叶片的转录组测序分析工作中,鉴定获得13个响应干旱胁迫和NO的*MsAP2/ERF*基因家族成员。使用ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线软件计算基本理化性质。BUSCA预测蛋白质亚细胞定位(<http://busca.biocomp.unibo.it/>)。MEGA 7.0的ClustalW软件对上述2个物种和紫花苜蓿AP2/ERF蛋白序列进行多次比对。使用MEGA 7.0的最大似然(maximum likelihood, ML)方法构建系统发育树。用Evolview(<http://120.202.110.254:8280/evolview>)对进化树进行美化<sup>[23]</sup>。使用基于web的生物信息学工具GSDS 2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)图形显示*MsAP2/ERFs*基因的外显子/内含子基因组结构。用Motif Elicitation(multiple expectation maximization for motif elicitation, MEME Suite)(<http://meme-suite.org/>)<sup>[24]</sup>分析紫花苜蓿AP2/ERF蛋白的保守基序,最大模式数调整为10。使用在线软件ExPaSy SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)对*MsAP2/ERFs*基因进行三维结构的同源性建模<sup>[25]</sup>。用TBTOOLS软件对*MsAP2/ERFs*基因进行染色体定位分析<sup>[26]</sup>。利用PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)数据库来预测启动子顺式作用元件。用STRING(<http://STRINGdb.org/>)软件构建蛋白网络结构图(置信限为0.4)<sup>[27]</sup>。

在NCBI序列读取档案中下载紫花苜蓿幼苗叶片的RNA测序数据(编号:PRJNA478630),利用hisat2构建紫花苜蓿的基因组索引,将转录组中的数据比对到该索引中,并运用Feature Counts进行计数,得到基因标准化后的表达矩阵,随后使用TBtools绘制热图,表达量高低用log<sub>2</sub> FPKM(fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM)计算<sup>[28]</sup>。

**1.2.2 引物设计** 通过软件Primer Premier 5.0进行荧光定量PCR的引物设计(表1)。设计参数包括扩增子长度,100~200 bp;引物长度,20~25 bp;熔化温度(melting temperature, T<sub>m</sub>),55~65 °C。

**1.2.3 RNA提取和实时定量PCR** 用生工生物工程(上海)股份有限公司UNIQ-10柱Trizol总RNA提取试剂盒提取各样品总RNA,且使用M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒逆转录RNA获得的cDNA作为qRT-PCR反应模板,用引物*MsActin-F*和*MsActin-R*作为荧光定量的内参基因。实时定量PCR(qRT-PCR)由Light Cycler

96 仪器 (Roche, 瑞士) 进行。设置 3 个独立的生物学重复, 通过比较  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法<sup>[29]</sup> 计算紫花苜蓿 *AP2/ERFs* 基因的相对表达量, 采用 SPSS 统计软件建立广义线性模型, 对于旱胁迫下各基因在不同时间的相对表达量进行方差分析。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : cDNA 1  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ 、SYBR 10  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 个循环, 重复 3 次。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers

登录号 Gene ID	基因名 Gene name	上游引物序列 Forward primer sequence	下游引物序列 Reverse primer sequence
MS.gene057432.t1	<i>MsERF01</i>	AGATTACCAAACAGCCGCCA	TAGCACCCTGCCACGTAAG
MS.gene022984.t1	<i>MsERF02</i>	AACCGAAGAGTGAACAGCCT	TCCTGCAAGGGTTGGTTGAA
MS.gene31024.t1	<i>MsERF03</i>	TCGTAACCCTCCACCAGCTA	CCTTGCAAGGAATACCCGA
MS.gene011550.t1	<i>MsERF04</i>	ATGCGTCAATGGGGCAAATG	TTGAGGTAAGCCGAAGAGCC
MS.gene30848.t1	<i>MsERF05</i>	TGCCACTACTCAGGCAAAGG	GGCGGCTATAGTCGTGTCAA
MS.gene072828.t1	<i>MsERF06</i>	CTCTAACAGCCGCCTTGAA	CAGTAGCCAGCAACTCCA
MS.gene006341.t1	<i>MsERF07</i>	GCCGGAGAGTGTGTTGAGA	ACTCCGGCACTGTATCCTCT
MS.gene58366.t1	<i>MsERF08</i>	CCACCGCCGCTTGATTTAAC	ACGTGCGAATGCGTCAAAAA
MS.gene022105.t1	<i>MsERF09</i>	ATGGGCAGCTGAAATACGTGA	TTGTGCCTTTGAATTTGAGTGC
MS.gene030784.t1	<i>MsERF10</i>	TACCGCGGAGTTAGACAACG	ATGGAAGCGCATGTGAGGAA
MS.gene025280.t1	<i>MsERF11</i>	CATCGGATGGGACGACAACA	TCTCCGGCACGTAGAAATCG
MS.gene067817.t1	<i>MsERF12</i>	CAGGAAGATGGCGTTGTTGC	AGCACGGGTGCGAAATAGTGT
MS.gene016368.t1	<i>MsERF13</i>	AGGAATCAATGCCGTGACCA	AGCGGGGTAGTTGTTGTTT

**1.2.4 *MsERF07* 基因的克隆及亚细胞载体的构建** 以反转录紫花苜蓿叶片的 cDNA 为模板, 用 2 $\times$ Easy Taq PCR Super Mix (+dye) 进行 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 (按照 TIANGEN 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书操作) 送测序, 提取亚细胞定位载体 pCAMBIA1300-35S-EGFP 质粒, 使用限制性内切酶 Kpn I 和 Sal I 将载体质粒线性化, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带进行琼脂糖凝胶 DNA 回收, 将上述回收的 *MsERF07* 基因扩增产物和线性化载体片段按照 Clon Express® II One Step Cloning Kit 说明书构建同源重组反应体系, 将上述同源重组产物的质粒 pCEGFP-*MsERF07* 转化大肠杆菌并进行酶切鉴定。酶切验证后正确的质粒即为亚细胞定位表达载体, 命名为 pCEGFP-*MsERF07*, 用于下一步试验。

**1.2.5 农杆菌转化** 采用热激法<sup>[30]</sup> 转化大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ , 分别挑取边缘光滑的单菌落于 5 mL 含有抗生素的 LB 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、230  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  培养 12~18 h, 以此悬浮好的菌液作为 PCR 模板, 进行菌液 PCR 鉴定, 将有目标条带的菌液冻存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.2.6 烟草的遗传转化和亚细胞定位观察** 将已制备好的重组表达载体 pCAM-*MsERF07*-EGFP 的农杆菌为侵染液, pCEGFP 空载的农杆菌菌液作为对照 (CK), 选取 4~5 周长势良好的烟草为材料 [普通本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*), 由本实验室保存提供, 在 2023 年 10 月 23 日播种于直径为 15 cm 的塑料花盆中, 种植方法参照 1.1], 使用 5 mL 的一次性注射器将含有目的基因和空载的菌液分别注射到烟草叶片下表皮细胞中, 然后将已侵染的烟草放置于人工气候箱黑暗处理 12 h 以上, 然后转移至光照条件下培养 48 h 后, 浸染后的烟草叶片用激光共聚焦扫描电子显微镜 (型号: LSCM 800; 产地: 德国) 在 488 nm 激光波长下观察, 确定目的基因的表达位置。

### 1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 整理数据, SPSS 17.0 进行方差分析, 通过 Duncan 法比较处理间显著性差异, 最后

使用 Origin 2021 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MsAP2/ERFs* 基因的基本理化性质分析

通过对 13 个紫花苜蓿 *MsAP2/ERFs* 氨基酸序列的分析, 13 个家族成员均含有 AP2 结构域, 属于 ERF 亚家族。氨基酸数目为 176 (*MsERF09*)~422 (*MsERF13*), 相对分子量为 19699.82 Da (*MsERF09*)~47454.26 Da (*MsERF13*)。等电点为 4.58 (*MsERF01*, *MsERF11*)~9.76 (*MsERF03*), 紫花苜蓿的 *MsAP2/ERF* 基因的理论等电点数值可能会因具体的蛋白质序列而有所不同, 其中 8 个 *MsAP2/ERFs* 的等电点小于 7, 呈酸性, 在酸性细胞中发挥作用, 5 个 *MsAP2/ERFs* 的等电点大于 7, 呈碱性。所有基因的总平均亲水指数值为 -0.446 (*MsERF11*)~-0.928 (*MsERF13*), 表明它们本质上都是具有亲水性的。亚细胞定位预测显示 *MsERF01*、*MsERF03*、*MsERF04*、*MsERF06*、*MsERF07*、*MsERF09*、*MsERF10*、*MsERF11*、*MsERF12*、*MsERF13* 均定位在细胞核, 而 *MsERF02*、*MsERF05*、*MsERF08* 都定位于叶绿体 (表 2)。

表 2 13 个 *MsAP2/ERFs* 基因的基本理化性质

Table 2 Basic physicochemical properties of 13 *MsERFs* genes

基因 Gene name	登录号 Gene ID	氨基酸数目 Number of amino acids (aa)	分子量 Molecular weight (Da)	等电点 Isoelectric point	亲水性 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>MsERF01</i>	MS.gene057432.t1	217	23830.29	4.58	-0.535	细胞核 Nucleus
<i>MsERF02</i>	MS.gene022984.t1	233	26506.06	8.91	-0.758	叶绿体 Chloroplast
<i>MsERF03</i>	MS.gene31024.t1	324	35332.93	9.76	-0.572	细胞核 Nucleus
<i>MsERF04</i>	MS.gene011550.t1	199	21765.18	5.93	-0.551	细胞核 Nucleus
<i>MsERF05</i>	MS.gene30848.t1	243	27717.37	6.55	-0.676	叶绿体 Chloroplast
<i>MsERF06</i>	MS.gene072828.t1	231	25918.02	5.71	-0.526	细胞核 Nucleus
<i>MsERF07</i>	MS.gene006341.t1	180	20443.92	5.76	-0.687	细胞核 Nucleus
<i>MsERF08</i>	MS.gene58366.t1	210	22898.71	9.66	-0.596	叶绿体 Chloroplast
<i>MsERF09</i>	MS.gene022105.t1	176	19699.82	7.89	-0.823	细胞核 Nucleus
<i>MsERF10</i>	MS.gene030784.t1	288	32496.66	7.01	-0.558	细胞核 Nucleus
<i>MsERF11</i>	MS.gene025280.t1	202	22322.82	4.58	-0.446	细胞核 Nucleus
<i>MsERF12</i>	MS.gene067817.t1	259	28852.95	5.76	-0.661	细胞核 Nucleus
<i>MsERF13</i>	MS.gene016368.t1	422	47454.26	5.54	-0.928	细胞核 Nucleus

GRAVY: 总平均亲水性 Grand average of hydropathicity.

### 2.2 *MsAP2/ERFs* 基因的系统发育进化树与蛋白互作网络图分析

由图 1A 可见, 为了明确紫花苜蓿中 *AP2/ERF* 基因之间的关系, 通过拟南芥、大豆所编码的蛋白序列为基础构建系统进化树, 引入已鉴定的拟南芥 *AP2/ERF* 蛋白, 将所有成员分为 I~VI 组, 利用 MEGA 7.0 软件对 *MsAP2/ERF* 蛋白进行进化分析。结果表明, *MsERF01*、*MsERF04*、*MsERF05*、*MsERF06*、*MsERF07*、*MsERF11* 属于 Group I, 其亲缘关系较近, *MsERF12* 属于 Group II, *MsERF08* 属于 Group III, *MsERF03*、*MsERF09* 属于 Group IV, *MsERF02*、*MsERF10*、*MsERF13* 则属于未知分组, 对于密切相关的蛋白质, 推测它们具有相似的生物学功能。为了分析蛋白质之间的功能联系和调控关系, 以模式植物拟南芥为背景, 构建蛋白互作网络图, 结果显示, 一共 11 个拟南芥蛋白与 13 个紫花苜蓿蛋白形成互作关系, 其中 *MsERF01*、*MsERF11* 和 *MsERF05*、*MsERF07* 都分别处于蛋白互作图中的同一个节点, 对于处在同一节点的两个基因, 它们可能在功能上相关联 (图 1B)。

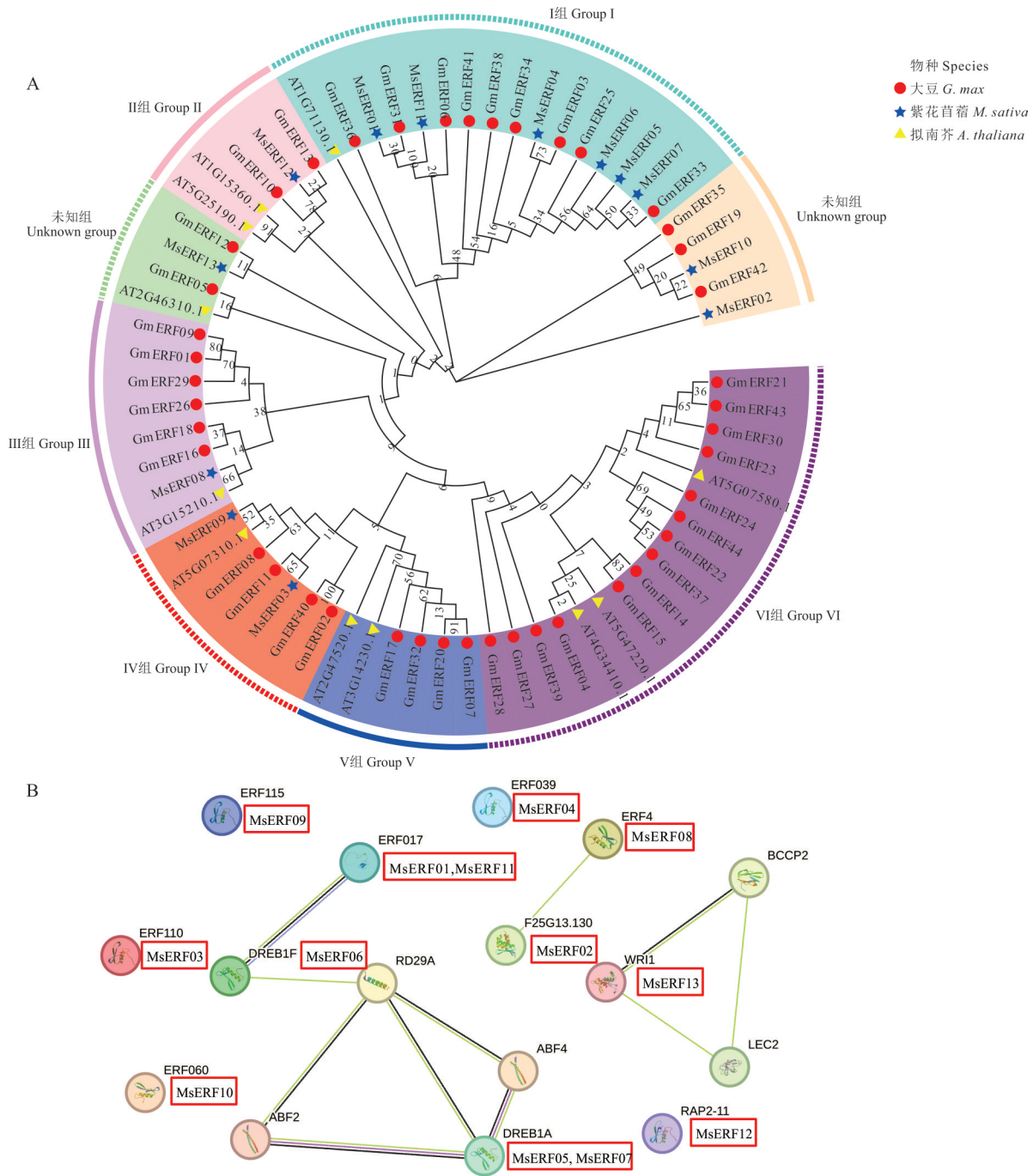


图 1 基于紫花苜蓿、拟南芥和大豆 *AP2/ERF* 基因家族的氨基酸序列构建系统进化树 (A)、蛋白互作网络图 (B)  
 Fig. 1 Construction of phylogenetic tree (A) and protein interaction network (B) based on amino acid sequences of *AP2/ERF* gene family in alfalfa, *Arabidopsis* and soybean

### 2.3 *MsAP2/ERF* 基因家族的基因结构与保守结构域分析

为了进一步确定基因在基因组中的位置以及边界,通过分析 *MsAP2/ERF* 基因的外显子和内含子结构,预测基因可能编码的蛋白质结构和功能。从基因结构图看出 *MsERF01*、*MsERF04*、*MsERF06*、*MsERF07*、*MsERF08*、*MsERF10*、*MsERF11*、*MsERF12* 均只含有外显子, *MsERF02*、*MsERF03*、*MsERF05*、*MsERF09*、*MsERF13* 则都存在外显子和内含子,其中 *MsERF03*、*MsERF05*、*MsERF09* 只含有 2 个外显子, *MsERF02* 与 *MsERF13* 分别各含有 5 个外显子,是所有基因中外显子较多的两个基因(图 2A),以上结果表明紫花苜蓿中 *AP2/ERF* 基因家族成员在进化过程中功能相对保守,但也存在功能分化。用 MEME 软件在线服务器阐明了

*MsAP2/ERF* 基因家族成员的保守碱基序列,并在 *MsAP2/ERF* 中鉴定出 13 个保守基序,分析发现,除了 *MsERF02*,所有基因都含有 Motif 2,表明 Motif 2 在大部分基因中有着极其重要的功能,除此以外,在所有基因中亲缘关系越近的基因其保守结构域所包含的基序也更为相似,例如 *MsERF01* 与 *MsERF11* 亲缘关系很近,它们的保守结构域均包含 Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 5、Motif 6、Motif 8、Motif 12,表明它们可能具有相似的分子功能(图 2B 和图 2C)。

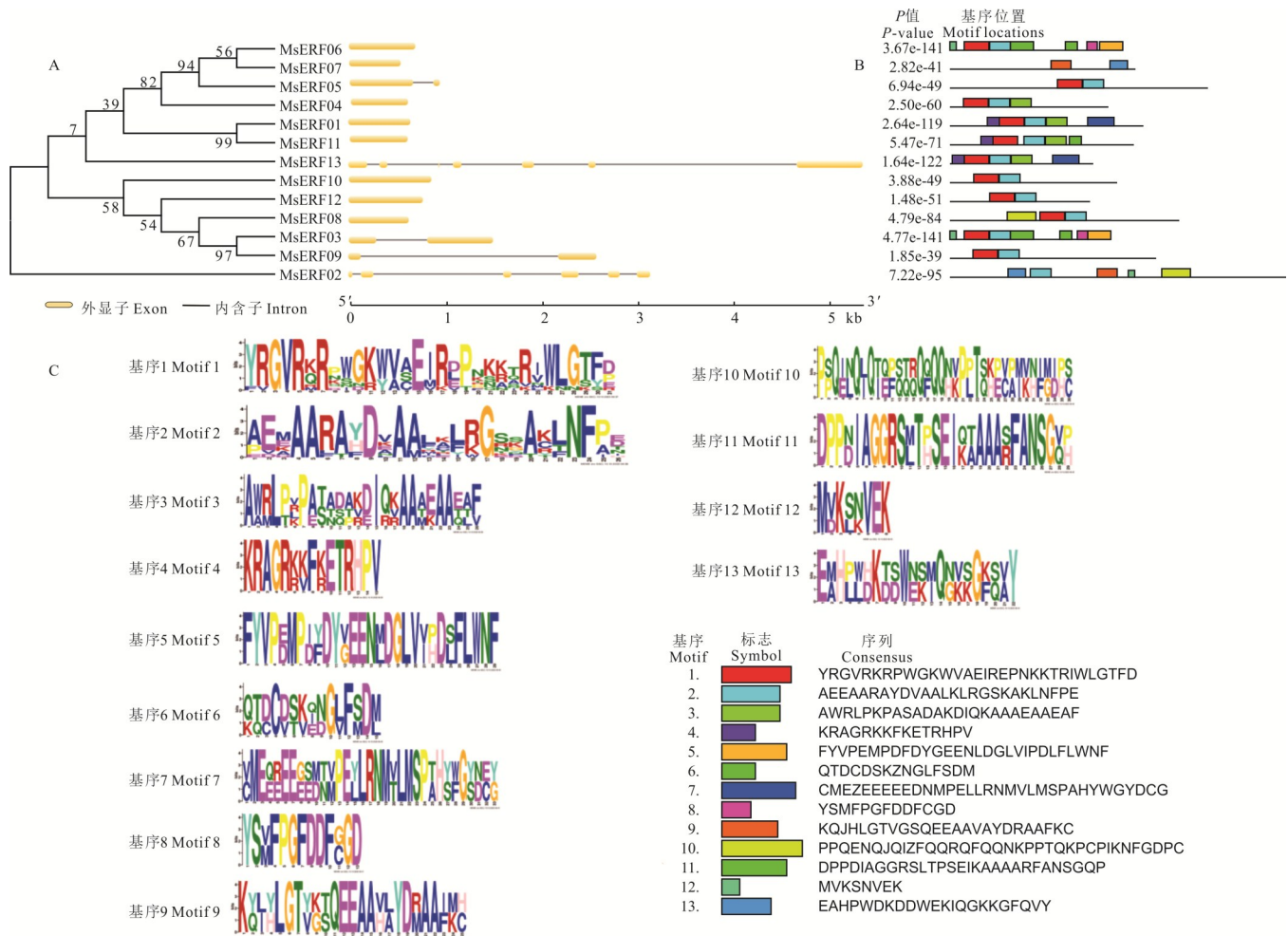


图 2 紫花苜蓿 *AP2/ERF* 的基因结构 (A) 与保守结构域中 Motif 分布 (B)、Motif 序列 (C)

Fig. 2 *AP2/ERF* gene structure (A) and Motif distribution (B), Motif sequence (C) in conserved domain of alfalfa

#### 2.4 *MsAP2/ERF* 基因家族的三级结构与染色体定位分析

利用三维结构同源性对 *MsAP2/ERF* 基因家族 13 个成员的氨基酸序列进行了建模。使用软件 SWISS-MODEL 进行在线分析,其中 *MsERF03* 和 *MsERF06* 的氨基酸序列高度相似,剩余 *MsAP2/ERF* 基因家族的 11 个成员的三级氨基酸序列在形态、结构或特征上具有较为明显的个体差异性(图 3A)。*AP2/ERF* 基因家族成员染色体定位中共有 13 个 *MsAP2/ERF* 基因,被分别映射到 13 条染色体上,其中 *MsERF01*、*MsERF02* 和 *MsERF03* 分别分布在 Chr2.1、Chr7.2 和 Chr3.3 染色体上,*MsERF04*、*MsERF05* 和 *MsERF06* 分别分布在 Chr8.1、Chr6.2 和 Chr5.3 染色体上,*MsERF07*、*MsERF08*、*MsERF09* 和 *MsERF10* 分别分布在 Chr1.1、Chr2.3、Chr7.4 和 Chr4.2 染色体上,*MsERF11*、*MsERF12* 和 *MsERF13* 分别分布在 Chr2.2、Chr7.1 和 Chr8.2 染色体上(图 3B)。

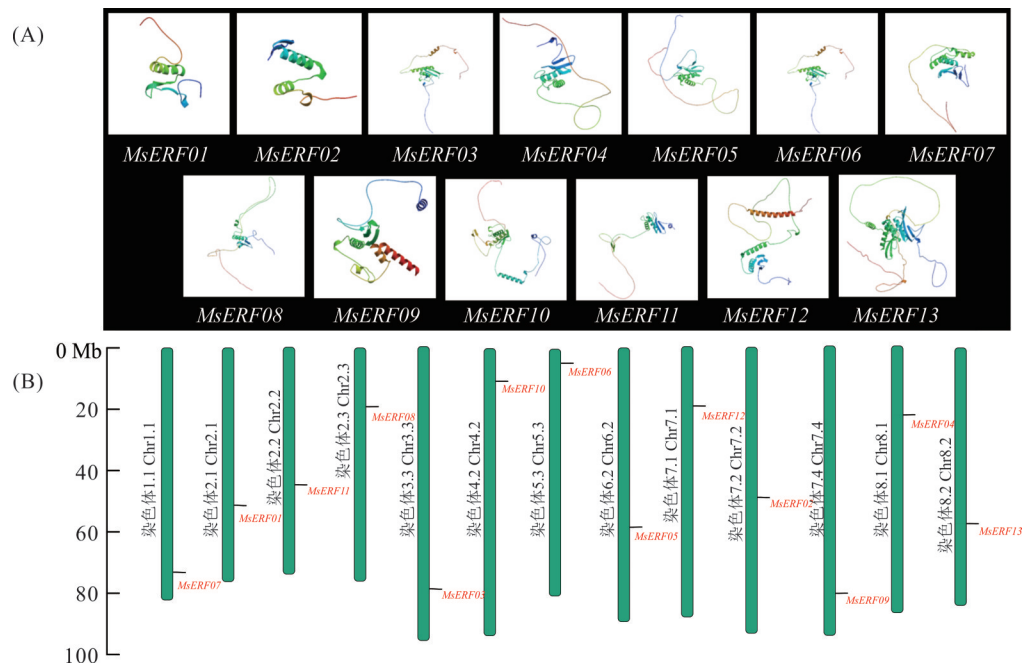


图 3 紫花苜蓿 *AP2/ERF* 基因家族成员的三级结构(A)和染色体定位(B)

Fig. 3 Tertiary structure (A) and chromosome mapping (B) of members of *AP2/ERF* gene family in alfalfa

## 2.5 *MsAP2/ERF* 基因家族的启动子顺式作用元件

利用 *MsAP2/ERF* 基因启动子上游的 2000 bp 序列借助 Plant CARE 网站预测顺式作用的调控元件, 分析发现有 43 个与光反应、组织特异性表达、胁迫以及植物激素相关的顺式调控元件。不同基因在不同的细胞类型、生理状态或发育阶段可能需要不同的调控机制, 因此, 它们的启动子区域可能会包含不同类型和数量的顺式作用元件, 以适应其特定的调控需求。其中光反应中顺式调控元件有 20 种, 组织特异表达与激素信号通路相关的元件各包含 10 种, 同时还存在同外部或环境压力的反应相关的 3 个顺式调节元件, 其中 *MsERF03* 基因缺乏经典意义上的顺式作用元件, 这代表 *MsERF03* 基因其转录调控可能涉及非典型的调控序列或调控因子, 这种现象进一步反映了基因调控机制的特殊性或差异性(图 4)。

## 2.6 基于转录组测序 *MsAP2/ERF* 在干旱胁迫下的表达量分析

通过利用前期课题组在紫花苜蓿幼苗期的叶片转录组测序数据, 分析紫花苜蓿在 CK(正常浇水)、PEG(模拟干旱胁迫)、SNP(外源喷施 NO)和 PEG+SNP(外源 NO 调控的干旱胁迫)4 个处理下的紫花苜蓿叶片转录组测序数据, 以 FPKM 值经  $\log_2(\text{FPKM}+1)$  进行聚类分析, 并绘制 13 个差异表达 *MsAP2/ERF* 家族基因热图。聚类结果显示, *MsERF10*、*MsERF04*、*MsERF02* 在 PEG、SNP、PEG+SNP 处理下表达量是下调的, 呈现出负调控趋势, *MsERF09* 在单独的 PEG 处理下没有明显的表达量变化, 但在单独的 SNP 处理下表达量明显增高, 并且在 PEG+SNP 混合处理下相对于对照也是明显增高, 在 PEG、SNP 和 PEG+SNP 不同处理的胁迫下, 与 CK 相比较, *MsERF01*、*MsERF03*、*MsERF05*、*MsERF06*、*MsERF07*、*MsERF08*、*MsERF11*、*MsERF12*、*MsERF13* 都出现不同程度的上调表达, 表明 NO 能参与调节紫花苜蓿的抗逆性, 并帮助其应对环境压力(图 5)。

## 2.7 *MsAP2/ERF* 基因的 qRT-PCR 分析

为了进一步确认 *MsAP2/ERFs* 基因与干旱和 NO 三者之间的表达模式, 根据课题组前期试验结果, 选取 CK、PEG 和 PEG+SNP 的 3 个处理, 每个处理在 0、3、9、12、24、48 h 进行采样, 对 13 个 *MsAP2/ERFs* 基因进行了 qRT-PCR 试验验证。数据显示, 与对照(0 h)相比较, *MsERF02* 和 *MsERF10* 的整体表达水平呈现下调趋势, *MsERF04* 呈现低表达, 在不同处理条件下, *MsERF01*、*MsERF03*、*MsERF05*、*MsERF06*、*MsERF07*、*MsERF08*、*MsERF09*、*MsERF11*、*MsERF12*、*MsERF13* 基因则呈现出不同程度的上调趋势。具体而言, *MsERF01*、*MsERF03*、*MsERF04* 等基因的对照组(0 h)相对于处理组, 显示出轻微的上调; 而与此相比, *MsERF07* 处理组则

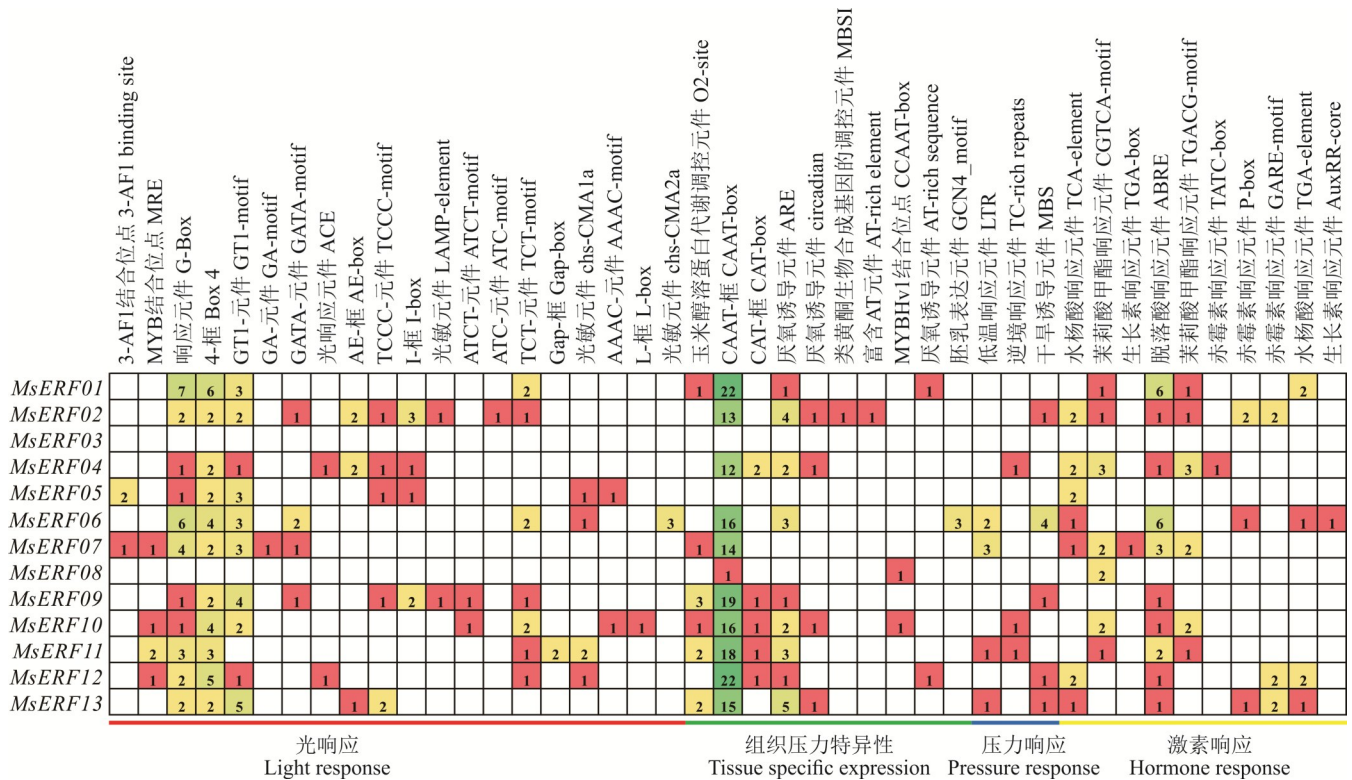


图4 紫花苜蓿 AP2/ERF 基因家族成员的启动子顺式作用元件  
Fig. 4 Promoter cis-acting elements of alfalfa AP2/ERF gene family members

表现出了更为显著的上调趋势,尤其是在 PEG+SNP 处理下,相对于对照组(0 h),处理组(9 h)的表达量最显著。在不同时间下,大部分紫花苜蓿 AP2/ERF 基因的表达量上调幅度与不同处理呈正相关关系,除了 MsERF13 在 48 h 时的表达量相对于对照更显著之外,其他基因均在处理 9 h 时的表达量最显著,这表明处理时间的变化对于表达量上调的程度具有重要影响(图6)。

2.8 MsERF07 基因的克隆

基于以上生物信息学和 qRT-PCR 分析,筛选了 MsERF07 响应干旱胁迫和 NO 的基因,用于后期试验。用紫花苜蓿品种“三得利”的叶片 cDNA 作为模板,用亚细胞定位引物进行 PCR 扩增,并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的片段的大小。结果表明,目的片段条带的大小约为 552 bp,与预期目的片段大小相吻合。将正确的克隆载体命名为 MsERF07-pCEGFP 并用于后续亚细胞定位试验(图7)。

2.9 MsERF07 的亚细胞定位分析

将筛选出的具有抵御非生物胁迫功能的潜在基因 MsERF07,通过 BUSCA 预测蛋白质亚细胞定位,MsERF07 蛋白仅定位在细胞核中,为了进一步揭示该蛋白在紫花苜蓿细胞内各种细胞器的位置和分布情况,本研究将成功构建的 pCAM-MsERF07-EGFP(enhanced green fluorescent protein, EGFP)转化到烟草叶片中,首先

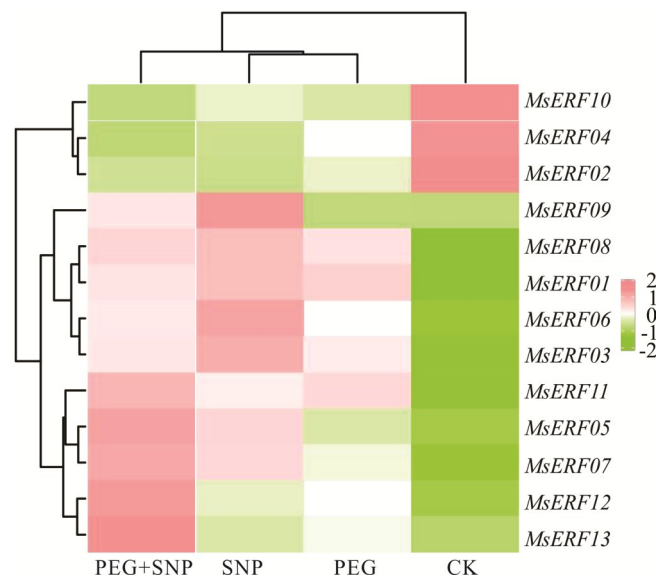


图5 MsAP2/ERF 基因在不同处理下的表达模式  
Fig. 5 Expression patterns of MSAP2/ERF gene under different treatments

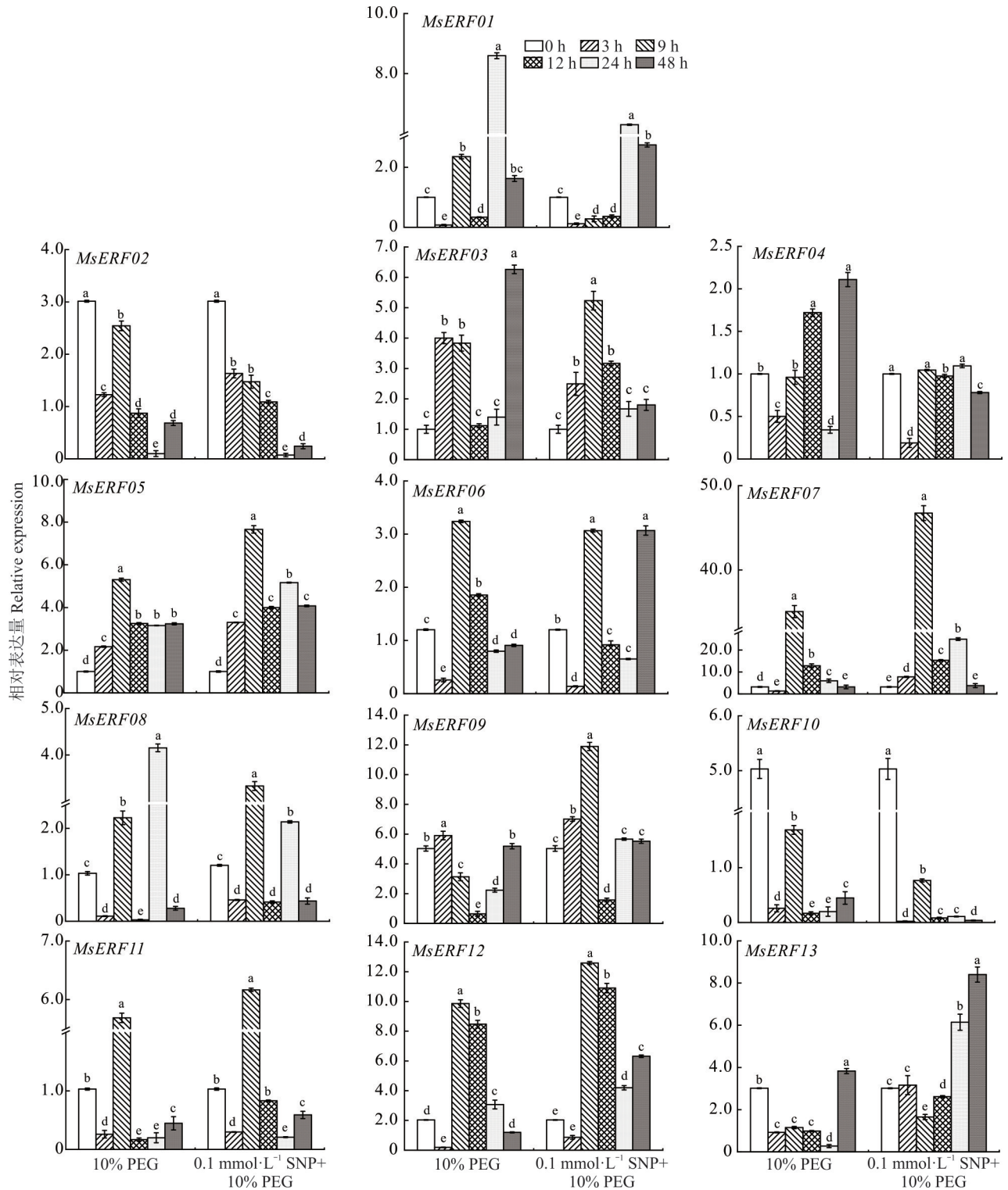


图 6 通过 qRT-PCR 检测干旱 (PEG) 和干旱 (PEG)+NO (SNP) 胁迫下 *MsAP2/ERF* 的表达量

Fig. 6 Expression levels of *MsAP2/ERF* gene family members in leaves of alfalfa seedlings under different treatments

10% PEG: 干旱处理; 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SNP+10% PEG: 外源 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SNP 处理下的干旱胁迫。不同小写字母代表 0.05 水平上存在显著性差异。There was significant difference in the level of 0.05 for different lowercase letters. PEG: 聚乙二醇 Polyethylene glycol. SNP: 硝普钠 Sodium nitroprusside.

暗培养 12 h, 再将烟草置于光下 48 h 后, 最后用激光共聚焦显微镜对转化后的烟草进行观察, 捕捉激光信号。试验结果显示, pCAM-*MsERF07*-EGFP 融合蛋白不仅在细胞核中强烈表达, 还在细胞膜中表达。这与 BUSCA 预测的结果有所差异, 但符合转录因子在细胞核中发挥作用的特征 (图 8)。

### 3 讨论

#### 3.1 生物信息学

我国北方苜蓿产业化受干旱限制,培育抗旱品种一直是关键课题,鉴定参与抗旱的关键基因成为苜蓿遗传改良的有效策略。AP2/ERF 家族是植物中最大的特异性转录调节因子之一,它们参与广泛的生物学过程,包括植物生长、种子发育、损伤修复、病菌防御以及抗高盐和干旱能力<sup>[22]</sup>。本研究共鉴定到 13 个积极响应干旱与一氧化氮的 *MsAP2/ERF* 基因,基本理化性质显示 13 个基因家族成员均含有 AP2 结构域,

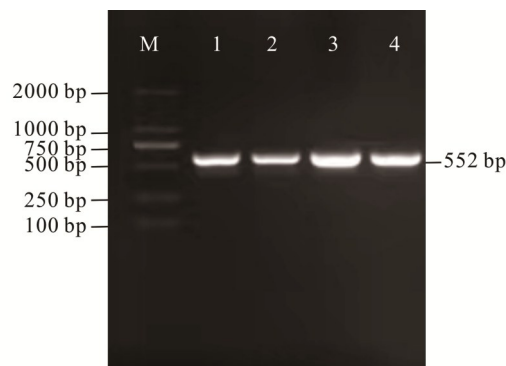


图7 紫花苜蓿 *MsERF07* 基因的克隆

Fig. 7 Cloning of *MsERF07* gene from alfalfa

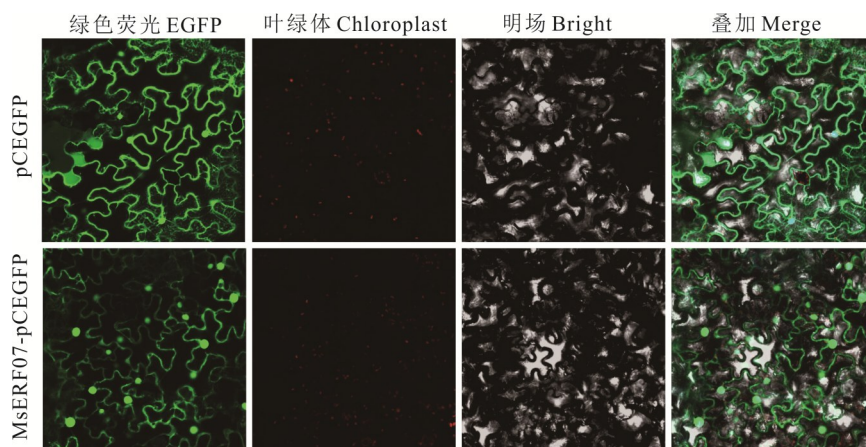


图8 *MsERF07* 蛋白的亚细胞定位分析

Fig. 8 Subcellular localization analysis of *MsERF07* protein

所有蛋白的亲水性良好且都为热稳定性蛋白,亚细胞定位预测大部分基因定位在细胞核中<sup>[31]</sup>。结合拟南芥、大豆序列构建的系统发育进化树将 13 个蛋白分为 I~VI 组,通过进化树的拓扑结构,可以推断出这些基因具有相似的功能,并具有共同祖先和分化关系。基因结构显示大部分均为无内含子基因,只包含外显子序列,这与小豆 (*Vigna angularis*)<sup>[32]</sup>、枣 (*Chinese jujube*)<sup>[33]</sup>、玉米<sup>[34]</sup>等物种报道的 ERF 亚族大多数基因不含有内含子的结果相似。无内含子基因的结构简单,转录调控元件(如启动子和增强子)可能更容易与编码序列进行相互作用并且有助于快速响应环境变化或生物发育阶段的需要<sup>[35]</sup>。用 MEME 软件在线服务器阐明了 *MsAP2/ERFs* 基因的保守碱基序列,在 *MsAP2/ERFs* 中鉴定出 13 个保守基序,发现在所有基因中亲缘关系越近的基因其保守结构域所包含的基序也更为相似。蛋白质的三级结构是由其二级结构( $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠等)的折叠所形成的,三级结构显示 *MsERF03* 和 *MsERF06* 的氨基酸序列高度相似,剩余 *MsAP2/ERF* 基因家族的 11 个成员的三级氨基酸序列在形态、结构或特征上的差异性相对显著<sup>[36]</sup>。为进一步了解基因组的整体结构和组织方式,利用染色体定位分析发现 13 个基因分别被定位在 13 条染色体上面,不同染色体上的基因具有不同的遗传背景和表达调控模式,这种多样性有助于物种在进化过程中适应不同的环境和生存压力<sup>[37]</sup>。在蛋白互作网络图中可以看出 *MsERF01*、*MsERF11* 和 *MsERF05*、*MsERF07* 都分别处于同一个节点,意味着它们之间可能存在共同调控关系<sup>[38]</sup>。紫花苜蓿 AP2/ERF 家族成员的启动子区域包含多种顺式作用元件且数据众多,主要分为光响应元件、组织特异性响应元件、激素响应元件和压力胁迫元件 4 类。与众多具有传统的顺式作用元件基因不同的是其中 *MsERF03* 不具有任何顺式作用元件,缺乏顺式作用元件可能导致 *MsERF03* 基因对环境信号或发育阶段的调控能力减弱<sup>[39]</sup>。

### 3.2 qRT-PCR与亚细胞定位

在甘薯<sup>[19]</sup>、番茄<sup>[21]</sup>等植物中过表达 $ERF$ 基因均显示能显著提高植物对干旱胁迫的耐受性,  $AP2/ERF$ 家族在植物对各种逆境的应对中起着重要的调节作用, 是一种优秀的分子育种基因资源。NO作为一种新型信号分子, 在干旱胁迫下进行SNP处理能提高紫花苜蓿<sup>[40]</sup>、大豆<sup>[6]</sup>、油菜<sup>[7]</sup>等植物抵御干旱胁迫的能力。因此, 为了挖掘出能够积极响应紫花苜蓿中干旱胁迫和NO的 $MsAP2/ERF$ 基因, 本研究采用生物信息学方法将 $MsAP2/ERF$ 基因与已知公共转录组数据进行比较, 初步筛选出对干旱胁迫和NO敏感的13个 $MsAP2/ERF$ 基因家族成员, 将其作为候选基因, 然后用qRT-PCR技术验证其表达模式。结果显示,  $MsERF01$ 、 $MsERF03$ 、 $MsERF05$ 、 $MsERF06$ 、 $MsERF07$ 、 $MsERF08$ 、 $MsERF09$ 、 $MsERF11$ 、 $MsERF12$ 、 $MsERF13$ 基因在NO的作用下呈现出不同程度的上调趋势, 且大部分基因在干旱胁迫9h时的表达量最高, 其中 $MsERF07$ 在干旱胁迫下的表达量显著, 并且在SNP处理下 $MsERF07$ 基因的表达量更显著地呈现上升趋势, 故将 $MsERF07$ 作为候选基因。本研究通过荧光蛋白融合技术, 首先将 $MsERF07$ 基因片段与荧光蛋白基因片段结合, 再将融合基因插入到亚细胞定位的表达载体pCAMBIA1300-35S-EGFP中。而后将携带融合基因的载体导入烟草细胞, 使融合蛋白在细胞内表达。利用荧光标记技术, 能够明确观察到该蛋白在细胞中的具体位置。最终, 通过检测植物叶片上的荧光信号, 实现对目标蛋白的精准定位<sup>[41]</sup>, 前期生物信息学定位预测显示该蛋白仅定位在细胞核中, 但实验数据验证 $MsERF07$ 蛋白定位在细胞核与细胞膜中, 可见程序预测存在局限性, 预测的定位数据往往离不开实验数据的验证。 $MsERF07$ 蛋白定位在细胞核表明该蛋白参与转录调控基因的表达, 而在细胞膜中则显示该蛋白可能与信号传导相关, 这与大部分物种中 $ERF$ 基因的定位特征一致。

### 4 结论

基于转录组数据筛选获得13个干旱胁迫下差异表达的紫花苜蓿 $AP2/ERF$ 基因家族成员, 并且它们对NO敏感。理化性质显示13个家族成员均含有 $AP2$ 结构域, 氨基酸数目为176( $MsERF09$ )~422( $MsERF13$ ), 大部分基因家族成员的三级氨基酸序列在形态、结构有明显差异。13个 $MsAP2/ERF$ 基因家族成员分为6组, 分布在13条染色体上, 有43个与光反应、组织特异性表达、胁迫以及植物激素相关的启动子顺式调控元件。转录组数据的差异表达模式和qRT-PCR显示, 加入NO后, 多数紫花苜蓿 $AP2/ERF$ 基因家族成员呈现不同程度上调趋势, 其中 $MsERF07$ 基因在SNP处理下表达量显著上调。克隆了紫花苜蓿 $MsERF07$ 基因, 分析了该基因编码的蛋白序列特征, 而后进行亚细胞定位分析, 结果显示该蛋白定位于细胞核与细胞膜中, 符合转录因子的特征。

### 参考文献 References:

- [1] Gou J, Debnath S, Sun L, *et al.* From model to crop: functional characterization of SPL8 in *M. truncatula* led to genetic improvement of biomass yield and abiotic stress tolerance in alfalfa. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(4): 951–962.
- [2] Xiao Y, Zhang J, Jia T T, *et al.* Effects of alternate furrow irrigation on the biomass and quality of alfalfa (*Medicago sativa*). *Agricultural Water Management*, 2015, 161: 147–154.
- [3] Siddiqui M H, Al-Wahaibi M H, Basalah M O. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 2011, 248: 447–455.
- [4] Lian H, Qin C, Shen J, *et al.* Alleviation of adverse effects of drought stress on growth and nitrogen metabolism in mungbean (*Vigna radiata*) by sulphur and nitric oxide involves up-regulation of antioxidant and osmolyte metabolism and gene expression. *Plants*, 2023, 12(17): 3082.
- [5] Palmieri M C, Sell S, Huang X, *et al.* Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(2): 177–186.
- [6] de Sousa L F, de Menezes-Silva P E, Lourenço L L, *et al.* Improving water use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. *Physiologia Plantarum*, 2020, 168(3): 576–589.
- [7] Abedi T, Pakniyat H. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2010, 46(1): 27–34.
- [8] Majeed S, Nawaz F, Naem M, *et al.* Nitric oxide regulates water status and associated enzymatic pathways to inhibit nutrients

- imbalance in maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 155: 147–160.
- [9] Cai Z S. Effects of exogenous NO on seed germination and drought resistance of alfalfa under water stress. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013.  
蔡卓山. 水分胁迫下外源NO对苜蓿种子萌发和幼苗抗旱生理的影响. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [10] Zhao Y, Wei X, Long Y, *et al.* Transcriptional analysis reveals sodium nitroprusside affects alfalfa in response to PEG-induced osmotic stress at germination stage. *Protoplasma*, 2020, 257: 1345–1358.
- [11] Brouquisse R. Multifaceted roles of nitric oxide in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(17): 4319–4322.
- [12] Shi K, Liu J, Liang H, *et al.* An alfalfa MYB-like transcriptional factor *MsMYBH* positively regulates alfalfa seedling drought resistance and undergoes *MsWAV3*-mediated degradation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(4): 683–699.
- [13] 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.
- [14] Liu K, Yang Q, Yang T, *et al.* Transcriptome-based identification and expression profiling of AP2/ERF members in *Caragana intermedia* and functional analysis of *CiDREB3*. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(12): 7953–7965.
- [15] Jian W N, Zuo P, Zhang G Z, *et al.* Cloning and functional analysis of *MsERF003* gene in drought stress from *Medicago sativa*. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(17): 5674–5681.  
坚伟宁, 左朋, 张国珍, 等. 紫花苜蓿 *MsERF003* 的基因克隆及其在干旱胁迫中的功能分析. *分子植物育种*, 2020, 18(17): 5674–5681.
- [16] Jung S E, Bang S W, Kim S H, *et al.* Overexpression of *OsERF83*, a vascular tissue-specific transcription factor gene, confers drought tolerance in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7656.
- [17] Chen K, Tang W, Zhou Y, *et al.* AP2/ERF transcription factor *GmDREB1* confers drought tolerance in transgenic soybean by interacting with GmERFs. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 170: 287–295.
- [18] Wang Z, Zhao X, Ren Z, *et al.* *ZmERF21* directly regulates hormone signaling and stress-responsive gene expression to influence drought tolerance in maize seedlings. *Plant, Cell & Environment*, 2022, 45(2): 312–328.
- [19] Zhu X, Wang B, Liu W, *et al.* Genome-wide analysis of AP2/ERF gene and functional analysis of *CqERF24* gene in drought stress in quinoa. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 127582.
- [20] Li Y, Zhang H, Zhang Q, *et al.* An AP2/ERF gene, *IbRAP2-12*, from sweet potato is involved in salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2019, 281: 19–30.
- [21] Wang Y Q, Xia D N, Wen Q L, *et al.* Overexpression of a tomato AP2/ERF transcription factor SlERF. B1 increases sensitivity to salt and drought stresses. *Scientia Horticulturae*, 2022, 304: 111332.
- [22] Jin X, Yin X, Ndayambaza B, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of the *ERF* gene family in *Medicago sativa* L. under various abiotic stresses. *DNA and Cell Biology*, 2019, 38(10): 1056–1068.
- [23] Zhang H, Gao S, Lercher M J, *et al.* EvolView, an online tool for visualizing, annotating and managing phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(1): 569–572.
- [24] Bailey T L, Boden M, Buske F A, *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S2): 202–208.
- [25] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(1): 296–303.
- [26] Gao T, Gao Y, Liu X, *et al.* Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 58.
- [27] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, *et al.* STRING v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*, 2012, 41: 808–815.
- [28] Li X J, Yang J L, Hao B, *et al.* Comparative transcriptome and metabolome analyses provide new insights into the molecular mechanisms underlying taproot thickening in *Panax notoginseng*. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 451.
- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [30] Froger A, Hall J E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, 2007(6): e253.
- [31] Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, 2003, 5618(300): 445–452.

- [32] Ke X W, Zhang J P, Liu G H, *et al.* Identification of adzuki bean AP2/ERF gene family and expression analysis in response to rust infection. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020(4): 394–404.  
柯希望, 张金鹏, 刘国辉, 等. 小豆 AP2/ERF 基因家族鉴定及其应答锈菌侵染的表达分析. *植物病理学报*, 2020(4): 394–404.
- [33] Zhang Z, Li X. Genome-wide identification of AP2/ERF superfamily genes and their expression during fruit ripening of Chinese jujube. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 15612.
- [34] Zhao Y Z. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in maize. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2022.  
赵御璋. 玉米 AP2/ERF 基因家族的分析与鉴定. 成都: 四川农业大学, 2022.
- [35] Keller P A, Yvonne J K E. A primer of genome science. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2002: 318–319, 10.1093/bfpg/1.3.318.
- [36] Liu M, Sun W, Ma Z, *et al.* Genome-wide investigation of the AP2/ERF gene family in tartary buckwheat (*Fagopyum tataricum*). *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 84.
- [37] Ghorbani R, Zaki pour Z, Alemzadeh A, *et al.* Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors family in *Brassica napus*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(7): 1463–1476.
- [38] Guo B J, Wei Y F, Xu R B, *et al.* Genome-wide analysis of APETALA2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161322.
- [39] Ma J, Zhang G Z, Ye Y C, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of HSF transcription factors in alfalfa (*Medicago sativa*) under abiotic stress. *Plants*, 2022, 20(11): 2763.
- [40] Zhao Y, Xin X Q, Wei X H. Effects of nitric oxide on nitrogen metabolism of alfalfa under drought stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(9): 86–96.  
赵颖, 辛夏青, 魏小红. 一氧化氮对干旱胁迫下紫花苜蓿氮代谢的影响. *草业学报*, 2021, 30(9): 86–96.
- [41] Barnard E, McFerran N V, Trudgett A, *et al.* Detection and localisation of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* using a split-GFP method. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(5): 597–604.