

网络出版时间:2024-11-25

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20241125.1020.006

# 野生二粒小麦 AP2 家族基因鉴定与表达模式分析

刘涛,曹启彬,卫科旭,张艳,聂小军,童维

(西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:** AP2 转录因子在植物信号转导、生长发育和胁迫响应方面发挥着重要作用。为探索 AP2 转录因子在野生二粒小麦中的分子特征,基于野生二粒小麦基因组信息,采用 Blast 和 Hmmer 进行 AP2 家族成员鉴定,对鉴定到的成员进行蛋白质理化性质、亚细胞定位、系统进化树、保守结构域、基因扩增、顺式作用元件、密码子偏好性、表达模式和遗传多样性分析。结果表明,在野生二粒小麦中共鉴定到 265 个 AP2 基因,主要定位在细胞核和叶绿体中。根据系统进化树将其分为 3 个亚族,各亚族之间的保守结构域和基因结构存在保守性与多样性。AP2 含有多个与生长发育和非生物胁迫相关的顺式作用元件。AP2 基因的密码子偏好性可能受到压力选择作用。从 AP2 基因的表达模式看,该家族成员可能发生了亚功能化,且对盐胁迫响应有重要作用。通过对不同小麦群体中核酸多样性和分化指数分析,AP2 基因部分成员在野生二粒小麦中具有较高的遗传多样性。

**关键词:** 野生二粒小麦; AP2 基因; 进化分析; 表达模式; 遗传多样性

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)01-0024-13

## Identification and Expression Pattern Analysis of AP2 Family Genes in Wild Emmer Wheat

LIU Tao, CAO Qibin, WEI Kexu, ZHANG Yan, NIE Xiaojun, TONG Wei

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** AP2 transcription factors are a large class of transcription factors that play important roles in plant signaling, growth and development, and stress responses. To explore the molecular characteristics of AP2 transcription factors in wild emmer wheat, based on the genomic information of wild emmer wheat, AP2 gene family members were identified using Blast and Hmmer. The identified members were analyzed for protein physicochemical properties, subcellular localization, phylogenetic tree, conserved domains, gene expansion, cis-acting elements, codon usage bias, expression patterns, and genetic diversity. The results showed that a total of 265 AP2 genes were identified in wild emmer wheat, mainly located in the nucleus and chloroplasts. According to phylogenetic analysis, they were grouped into 3 subfamilies, showing both conservation and diversity in conserved domains and gene structures between subfamilies. Predictions of cis-acting elements indicated that AP2 contains multiple elements related to growth, development and abiotic stress. Analysis of codon usage bias revealed that the codon bias of AP2 genes may be subject to selective pressure. The expression pattern analysis of AP2 genes in tissues and under salt stress suggested subfunctionalization within the family and their important role in salt stress response. Analysis of nucleotide diversity and population differentiation indices in different wheat populations indicated that some members of the AP2 gene family exhibit

收稿日期:2024-01-31 修回日期:2024-03-14

基金项目:陕西省科技攻关项目

第一作者 E-mail:liutao22099@outlook.com(刘涛)

通讯作者 E-mail:tongw@nwsuaf.edu.cn(童维)

high genetic diversity in wild emmer wheat.

**Keywords:** Wild emmer wheat; AP2 gene; Evolutionary analysis; Expression pattern; Genetic diversity

野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides* L.)作为普通小麦重要的种质资源与遗传物质载体,其基因组的复杂性和适应性一直是植物基因组学和分子生物学的热点。转录因子通过识别靶基因启动子上的特定序列调控 DNA 表达,介导细胞反应<sup>[1]</sup>。AP2 转录因子是植物重要的调控因子,已在拟南芥<sup>[2]</sup>、水稻<sup>[3]</sup>和小偃麦<sup>[4]</sup>等中被报道。AP2 有 2 个可以与 DNA 结合的 AP2/ERF 结构域,在植物的发育和逆境应答中扮演着关键角色,可以与 *WOX11* 相互作用,控制水稻冠根的发生和发育<sup>[5]</sup>;对植物生殖以及营养器官的发育具有调节作用<sup>[6]</sup>;在拟南芥中过表达 AP2 转录因子 *FTL1/DDF1*,增强了拟南芥对寒冷、干旱和热胁迫的耐受性<sup>[7]</sup>;过表达 *GmAP2* 基因的转基因拟南芥与野生型相比,开花较早,种子长度、宽度和面积均增加<sup>[8]</sup>。目前,关于野生二粒小麦中的 AP2 基因鲜见报道。

本研究利用野生二粒小麦参考基因组,借助生物信息学手段,在全基因组水平进行 AP2 家族成员鉴定,并对所鉴定成员的基因结构、系统发育及其表达模式和遗传多样性进行分析,为野生二粒小麦 AP2 基因的功能研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 野生二粒小麦 AP2 基因的鉴定及蛋白质理化性质分析

从 Ensembl Plants 数据库 (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 下载野生二粒小麦 (wild emmer wheat) 的参考蛋白质序列和已报道的拟南芥 AP2 蛋白序列,利用 Blastp 对二者的序列进行比对,设置阈值为  $1e^{-5}$ 。利用 Pfam 数据库 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 下载含有 AP2 结构域的隐马尔可夫模型文件 PF00847,使用 Hmmer 3.4 搜索野生二粒小麦的蛋白质数据库,筛选条件为 e value 小于  $1e^{-5}$ 。对上述两种方法得到的结果取交集,将所得到的交集结果利用 NCBI 的 Batch-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 网站工具进行保守结构域预测,保留含有 AP2 结构域的基因。使用 ExPasy 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 AP2 蛋白进行理化性质

分析。使用 WoLF PSORT 在线网站 (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 对 AP2 蛋白进行亚细胞定位预测。

### 1.2 野生二粒小麦 AP2 成员的系统发育树构建、保守基序和基因结构分析

使用 MEGA11 软件中的 ClustalW 对鉴定到的 AP2 蛋白序列,使用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树,bootstrap 设置为 1 000, Gaps/Missing Data Treatment 设置为 Partial deletion, Site Coverage Cutoff 设置为 50。使用 Batch-CDD 进行保守结构域预测,采用默认参数。使用在线软件 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 对 AP2 家族基因预测 motif,设置 motif 数量为 10。使用 TBtools-II 软件对 AP2 家族基因进行结构分析并可视化。

### 1.3 野生二粒小麦 AP2 基因复制事件与共线性分析

应用 Blastp 对 AP2 家族成员进行两两间比对,鉴定基因复制事件,参数选择为 coverage  $\geq 75\%$  和 identity  $\geq 75\%$ ;用 Circos 软件从野生二粒小麦基因组数据库中提取 AP2 基因的物理位置信息,将所有野生二粒小麦 AP2 基因定位到染色体上,构建野生二粒小麦共线性图谱。用 TBtools 中的多重共线性扫描工具 MCScanX 对基因重复事件进行分析,参数为默认值。使用 KaKs\_Calculator 2.0 计算每个 AP2 同源基因的非同义替换 ( $K_a$ ) 和同义替换 ( $K_s$ )。

### 1.4 野生二粒小麦 AP2 基因上游调控元件和密码子偏好性分析

从野生二粒小麦参考基因组 (*Triticum dicoccoides*. WEWSeq\_v. 1. 0. 58) 提取每个 AP2 基因 CDS 上游 2 000 bp 序列,使用 PlantCare 数据库 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件分析。使用 codonW 对鉴定到的 AP2 基因的 CDS 序列进行密码子偏好性分析。

### 1.5 野生二粒小麦 AP2 基因表达模式和核酸多样性分析

从 EMBL-EBI 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/>) 中下载野生二粒小麦的根、叶、花、颖片和籽粒的 RNA-seq 数据 (ERP022006, SRR7226483, SRR7226484, SRR7226491, SRR9025703, SRR2084160 和 SRR722646)<sup>[9-10]</sup> 和

耐盐品系(Gamal A5)在盐处理 0、0.5、3、8、27 h 后叶组织 RNA-seq 数据(GSA 登录号 CRA003671)。使用 Fastp 软件对原始 reads 进行质控,将质控后的 reads 通过 Hisat2 v2.21 比对到野生二粒小麦参考基因组,使用 Stringtie v2.1.7 对比对结果进行定量,并标准化为 TPM,得到每个 AP2 基因的相对表达量,将其转换为  $\log_2(TPM+1)$  后,使用 R 包 Pheatmap 绘制 AP2 基因表达模式。

根据盐处理下转录组表达谱,选择不同时间点共 6 个表达量较高的 AP2 基因,检测其在盐胁迫条件下的表达模式。实时荧光定量 PCR 引物如表 1 所示。

表 1 用于实时荧光定量 PCR 的特异性引物

Table 1 Specific primers for real-time fluorescence quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
TdAP2.95-F	TTATCAGTACGTTGTCCGCG
TdAP2.95-R	GGATCCACCTTAGTTGATCGAC
TdAP2.3-F	TACGTACGTTGACACGTTG
TdAP2.3-R	TTGTAGATGCTCTAACGCGT
TdAP2.216-F	CGGCGAGTGAATCTATACCA
TdAP2.216-R	ATACCTCGCAACCAGAGAC
TdAP2.177-F	GGCATCAGTGGCTCCTCTT
TdAP2.177-R	GGTTCGAACCGGACCATGAG
TdAP2.67-F	AATCATCCAATGGACCTCG
TdAP2.67-R	TTCAGCTCCTCCCAGAAGTC
TdAP2.197-F	AACACCAAGATGATGGAGCAG
TdAP2.197-R	ATGGATGGAGCTAGCTAGCA

取野生二粒小麦耐盐品系(Gamal A5)种子,温室培养至三叶期,用  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液处理幼苗,分别取 0、0.5、3、8 和 27 h 的幼苗

倒二叶,用 RNA 提取试剂盒(TIANGEN,中国)提取其总 RNA,用反转录试剂盒 Prime-Script™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)(TaRaKa,日本)合成 cDNA。3 次生物学重复。以真核转录起始因子(eukaryotic translation initiation factor, eIF)作为内参。PCR 反应体系参考 F488 SYBR qPCR Mix(iScience,中国)说明书,利用 Quant Studiotm 3 Real-Time PCR 系统(Thermo,美国)进行反应。PCR 反应程序:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。3 个生物学重复。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算基因的相对表达量。

利用鲁非质控后的麦类基因型数据库(GVM000082)<sup>[11]</sup>,从中提取 28 份野生二粒小麦、13 份硬粒小麦(*Triticum durum* Desf.)、99 份普通小麦(*Triticum aestivum* L.)地方种和 25 份普通小麦栽培种的数据。使用 Blastp 将鉴定到的 AP2 蛋白质序列与中国春(IWGSC RefSeq v1.0)参考基因组的高可信蛋白质序列比对,选择比对得分最高的基因作为候选基因;根据候选基因位点信息提取单倍型信息;利用 vcftools 计算核酸多样性( $P_i$  值)和群体分化指数( $F_{st}$ ),利用 R 包 geneHapR 进行单倍型频率分析。

## 2 结果与分析

2.1 野生二粒小麦的 AP2 家族成员及其理化性质  
在野生二粒小麦中鉴定到 265 个 AP2 家族成员。2A 和 2B 染色体上数量最多(图 1),均含

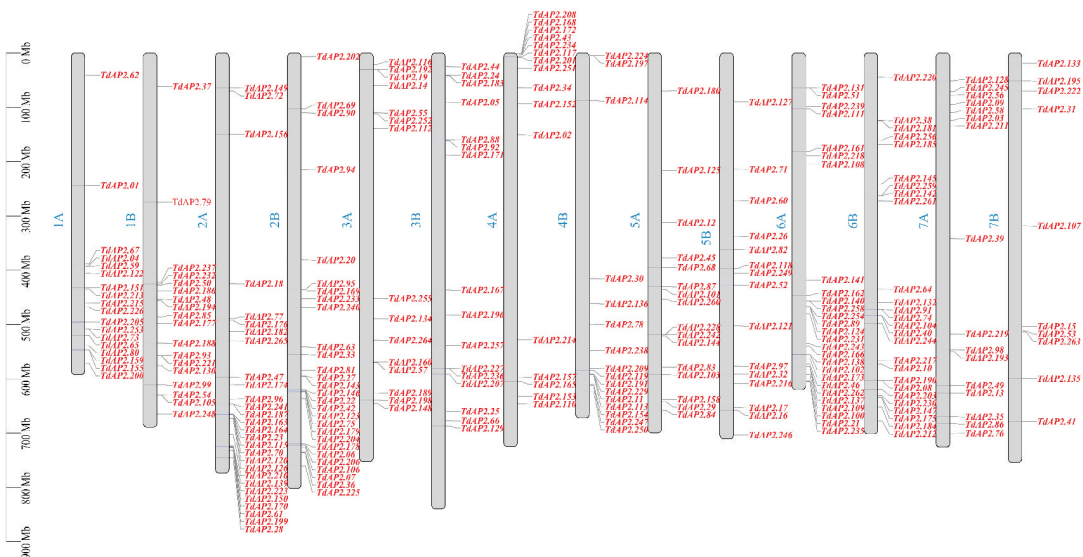


图 1 野生二粒小麦 AP2 家族成员的染色体分布

Fig. 1 Chromosome distribution of AP2 family members in wild emmer wheat

有 28 个成员,其次为 6A(27 个)和 6B(26 个), 7B 染色体上成员数量最少(10 个)。这说明 AP2 家族成员的分布与染色体大小无关。蛋白质理化性质分析结果表明,野生二粒小麦 AP2 蛋白的长度为 82(TdAP2. 35)~658 aa(TdAP2. 64),分子量为 9.043 kDa(TdAP2. 35)~70.252 kDa(TdAP2. 141),等电点为 4.48(TdAP2. 43)~11.62 (TdAP2. 189),负电荷残基总数为 8(TdAP2. 35)~66(TdAP2. 47、TdAP2. 64、TdAP2. 141),正电荷残基总数为 13(TdAP2. 35)~72(TdAP2. 66),亲水性平均值为 -1.073(TdAP2. 168)~0.062(TdAP2. 228),表明野生二粒小麦中 AP2 家族成员有较好的亲水性。

野生二粒小麦的 AP2 成员主要定位在细胞核(69.0%)和叶绿体(21.9%),少数定位在细胞质(3.8%)、线粒体(3.8%)和内质网(1.1%)等(表 2)。这表明 AP2 家族不同成员在野生二粒小麦生长过程中发挥着不同的作用。

表 2 AP2 家族成员在野生二粒小麦中亚细胞定位结果  
Table 2 Results of AP2 family members subcellular localization in wild emmer wheat

亚细胞 Subcellular	成员数量 Number of members	占比 Ratio/%
细胞核 Nucleus	183	69.0
叶绿体 Chloroplast	58	21.9
细胞质 Cytoplasm	10	3.8
线粒体 Mitochondria	10	3.8
内质网 Endoplasmic reticulum	3	1.1
过氧化物酶体 Peroxisomes	1	0.4

2.2 野生二粒小麦 AP2 系统进化和保守基序分析

对野生二粒小麦 AP2 家族成员进行系统进化分析,结果(图 2)显示,AP2 家族可分为 3 个亚族(图 2a)。根据 Motif 预测结果(图 2b),亚族 I 成员主要包含 motif6、motif2、motif1 和 motif3,且这些 motif 的排列顺序基本一致;亚族 II 成员主要包含 motif5、motif4、motif2、motif1 和 motif3;亚族 III 成员主要包含 motif6、motif2、motif1、



a: 系统发育关系; b: 保守基序; c: 保守结构域; d: 基因结构。

a: Phylogenetic relationships; b: Conserved motif; c: Conserved domain; d: Gene structure.

图 2 野生二粒小麦 AP2 家族成员序列分析

Fig. 2 Sequence analysis of AP2 family members in wild emmer wheat

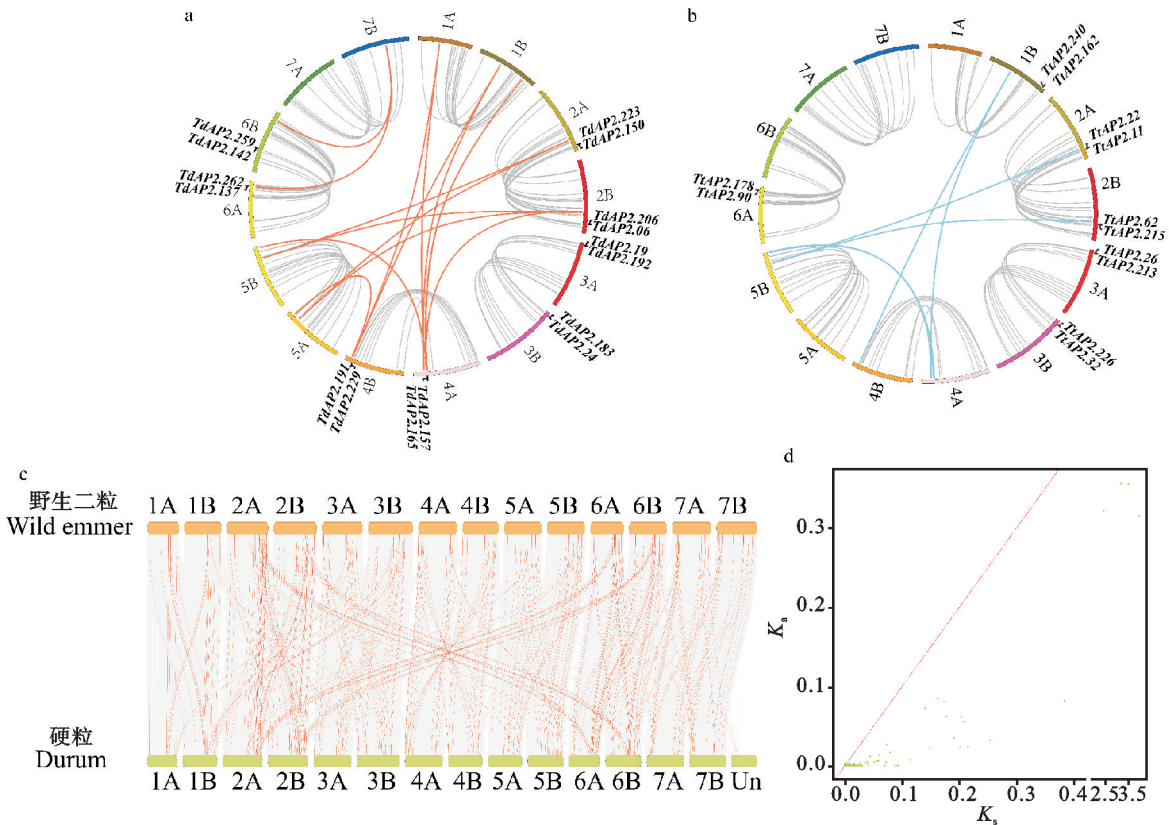
motif3、motif10、motif7 和 motif9。同一亚族成员携带相似的 motif 组成,不同亚族成员之间的 motif 存在差异,可能暗示不同亚族间功能有差异。保守结构域分析显示,亚族 I 和亚族 III 大部分成员仅包含一个 AP2 结构域,而亚族 II 大部分成员则包含一个 AP2 结构域和 AP2 超家族结构域或一个 AP2 结构域和 B3 结构域(图 2c)。亚族 I 的基因长度较亚族 II 和 III 更短,而亚族 II 的基因拥有更多的外显子和内含子数量(图 2d)。

### 2.3 野生二粒小麦 AP2 基因复制与共线性分析

在野生二粒小麦中总共鉴定到 137 对 AP2 基因复制事件(图 3a), 分别有 8 对串联复制和 129 对片段复制,共涉及 229 个基因。绝大多数存在共线性关系的 AP2 基因分别位于相对应的

A/B 染色体组上,但存在 15 对 AP2 基因不符合此模式,例如 5A 染色体上的 *TdAP2. 83* 基因与 2A 染色体上的 *TdAP2. 187* 基因存在共线性关系。在硬粒小麦中总共鉴定到 118 对 AP2 基因复制事件(图 3b), 分别有 6 对串联复制和 112 对片段复制,涉及 205 个基因。结果说明了多倍化促进了野生二粒小麦中 AP2 基因的扩张。

为进一步了解野生二粒小麦与硬粒小麦之间 AP2 基因的进化关系,对两个物种进行同源分析,发现共有 189 个野生二粒小麦 AP2 基因与 190 个硬粒小麦 AP2 基因共组成 101 对直系同源关系(图 3c), 表明这些同源基因在进化过程中得以保留。101 对同源基因对的  $K_a/K_s$  结果(图 3d) 显示, $K_a/K_s$  平均值为 0.330, 其中, *TdAP2. 10* 与 *TtAP2. 23*、*TdAP2. 51* 与 *TtAP2. 211*、*TdAP2. 137* 与



a: 野生二粒小麦 AP2 基因复制事件,相邻基因表示发生了串联复制事件;b: 硬粒小麦 AP2 基因复制事件,相邻基因表示发生了串联复制事件;c: 野生二粒小麦与硬粒小麦的 AP2 基因同源性分析;d: 野生二粒小麦和硬粒小麦间 AP2 同源基因对  $K_a/K_s$  散点图,红色斜线表示  $K_a/K_s$  等于 1。

a: Replication events of AP2 genes in wild emmer wheat, where adjacent genes indicate tandem duplication events; b: Replication events of AP2 genes in durum wheat, where adjacent genes indicate tandem duplication events; c: Homology analysis of AP2 genes between wild emmer wheat and durum wheat; d:  $K_a/K_s$  scatter plot of homologous AP2 genes between wild emmer wheat and durum wheat, with a red diagonal line indicating  $K_a/K_s$  equals 1.

图 3 野生二粒小麦 AP2 基因复制与共线性分析

Fig. 3 AP2 gene replication and collinearity analysis in wild emmer wheat

*TtAP2. 90* 和 *TdAP2. 137* 与 *TtAP2. 178* 四对同源基因对的  $ka/ks$  值大于 1, 分别为 1.357、1.261、1.314 和 2.198, 表明 AP2 基因绝大部分受到纯化选择压力。

## 2.4 野生二粒小麦 AP2 基因顺式作用元件和密码子偏好性分析

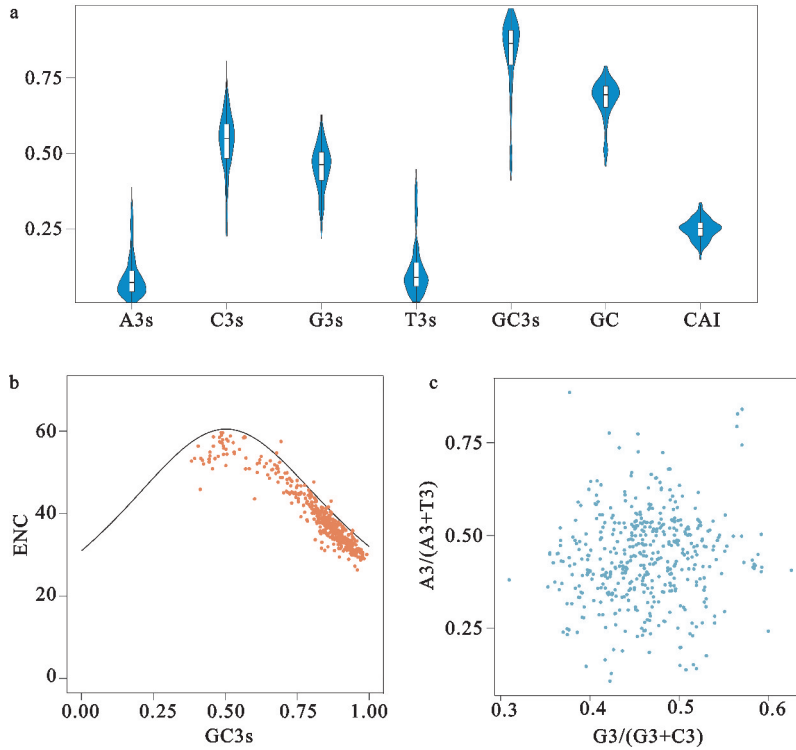
对野生二粒小麦 AP2 基因上游 2 000 bp 启动子区域进行分析, 共鉴定到 63 种不同类型的调控元件。这些调控元件主要与 23 个生物进程相关联(表 3), 在这些元件中, 包括光响应元件(如 G-box、*sp1*、GT1-motif、GATA-motif)、防御和胁迫响应元件(如 TC-rich repeats、DRE)、低温响应元件(如 LTR)、干旱响应元件(如 MBS)、损伤响应元件(如 WUN-motif)等与非生物胁迫相关的元件; 还有许多与植物激素响应相关的元件, 包括参与脱落酸的元件(ABRE)、参与赤霉素反应的

元件(GARE-motif、P-box)、参与茉莉酸甲酯反应的元件(CGTCA-motif)、生长素(IAA)响应元件(TGA-box)等; 另外, 还存在与植物生长发育相关的元件, 例如调节细胞周期的元件(MSA-like)、控制栅栏叶肉细胞分化的元件(HD-Zip 1)以及控制昼夜节律的元件(Circadian)。因此, 推测野生二粒小麦 AP2 家族基因可能参与多种非生物胁迫、植物激素反应和细胞生长发育调控等生物进程。

密码子偏好性分析表明, 野生二粒小麦的 A3、C3、G3、T3 和 GC3 的平均使用频率为 9.1%、53.5%、45.3%、11.7% 和 82.6%; GC 含量为 67.8%(图 4a)。这表明 AP2 家族成员在野生二粒小麦中存在密码子偏好性。密码子适应性指数(CAI)的变化范围为 14.8%~33.7%, 有效密码子数量(ENC)为 26.28~59.59(图 4b)。为了探

表 3 AP2 家族成员上游 2 000 bp 顺式调控元件分析  
Table 3 Analysis of cis-acting elements in upstream 2 000 bp of AP2 family members

功能 Function	元件数量 Number of elements
在转录开始的一30左右核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start	4 889
光响应元件 Light responsive element	3 080
启动子和增强子区域 Promoter and enhancer regions	2 800
茉莉酸甲酯反应 MeJA-responsiveness	1 428
脱落酸反应性 Abscisic acid responsiveness	1 288
厌氧诱导 Anaerobic induction	724
生长素反应 Auxin responsiveness	240
干旱响应 Drought responsiveness	225
低温响应 Low-temperature responsiveness	210
防御和应激响应 Defense and stress responsiveness	60
赤霉素响应 Gibberellin-responsiveness	237
分生组织表达 Meristem expression	249
水杨酸反应 Salicylic acid responsiveness	127
玉米蛋白代谢调节 Zein metabolism regulation	164
种子特异性调控 Seed-specific regulation	94
胚乳表达 Endosperm expression	54
昼夜节律调控 Circadian control	39
栅栏叶肉细胞的分化 Differentiation of the palisade mesophyll cells	23
细胞周期调节 Cell cycle regulation	18
类黄酮生物合成调控 Flavonoid biosynthetic regulation	11
根特异性 Root specific	12
损伤响应 Wound-responsiveness	9
脱水, 低温, 盐压力响应 Dehydration, low-temperature, salt stresses responsiveness	4



a: 野生二粒小麦 AP2 家族成员密码子使用情况; b: 野生二粒小麦 AP2 家族成员 ENC-plot 分析, 横坐标表示所有密码子的第 3 位的 GC 含量, 纵坐标表示有效密码子; c: 野生二粒小麦 AP2 家族成员 PR2-bias-plot 分析, 横坐标表示所有密码子的第 3 位的 G 碱基与第 3 位 C 和 G 碱基的比值, 纵坐标表示所有密码子的第 3 位的 A 碱基与第 3 位 A 和 T 碱基的比值。

a: Codon usage of AP2 family members in wild emmer wheat; b: ENC-plot analysis of AP2 family members in wild emmer wheat; the horizontal coordinate represents the GC content of the third bit of all codons, and the vertical coordinate represents the effective codons; c: PR2-bias-plot analysis of AP2 family members in wild emmer wheat. The horizontal coordinate represents the ratio of G base at the 3rd position of all codons to C and G base at the 3rd position, and the vertical coordinate represents the ratio of A base at the 3rd position of all codons to A and T base at the 3rd position.

图 4 野生二粒小麦 AP2 家族成员密码子偏好性分析

Fig. 4 Codon preference analysis of AP2 family members in wild emmer wheat

究 AP2 基因的密码子在野生二粒小麦中是否只受核苷酸中性突变影响, 我们绘制了 ENC (图 4b), 发现野生二粒小麦中 AP2 基因位于 ENC 标准曲线右下方, 这表明 AP2 基因的密码子偏好性受到其他非中性突变的影响。PR2 分析结果 (图 4c) 显示, 大部分 AP2 基因分布在左下角区域, 表明这些基因的密码子偏好性可能受到压力选择作用。

2.5 野生二粒小麦 AP2 基因表达模式

使用 RNA-seq 数据分析 AP2 基因在野生二粒小麦不同组织中的表达模式, 结果如图 5 所示。AP2 基因在野生二粒小麦中表现出显著的组织特异性, 少数 AP2 家族成员在叶片和颖片中高表达, 如 *TdAP2. 107* 和 *TdAP2. 111* 等在叶片中高表达, 而 *TdAP2. 36*、*TdAP2. 61* 和 *TdAP2. 166* 等在颖片中高表达。多数成员则在根、花和籽粒中高表达, 如 *TdAP2. 33*、*TdAP2. 174*、*TdAP2. 120*

等在根中高表达, 推测其与植株形态建成有关; *TdAP2. 162*、*TdAP2. 136*、*TdAP2. 55* 和 *TdAP2. 189*、*TdAP2. 150*、*TdAP2. 187* 等分别在花和籽粒中高表达, 而在其他组织中低表达, 这些基因可能对籽粒发育和最终产量具有重要作用。

分析耐盐品系 (A5) 在不同盐胁迫处理时间的 RNA-seq 数据, 结果 (图 6) 显示, 与 0 h 相比, *TdAP2. 27* 和 *TdAP2. 197* 的相对表达量在盐处理 0.5 h 后明显上升, 随着盐处理时间延长, 其表达水平逐渐下降; *TdAP2. 35* 和 *TdAP2. 153* 在盐处理 3 h 后开始上调表达; *TdAP2. 95* 和 *TdAP2. 261* 在盐处理 27 h 后表达水平显著增加; 而 *TdAP2. 216* 在处理后一直保持高水平表达。这些结果表明, AP2 基因在响应盐胁迫过程中发挥作用, 但不同成员可能发挥着不同的作用。选择盐处理下不同时间点高表达 AP2 成员, 利用 qRT-PCR 分析其在盐胁迫条件下的表达模式, 结果 (图 7) 发现, 与

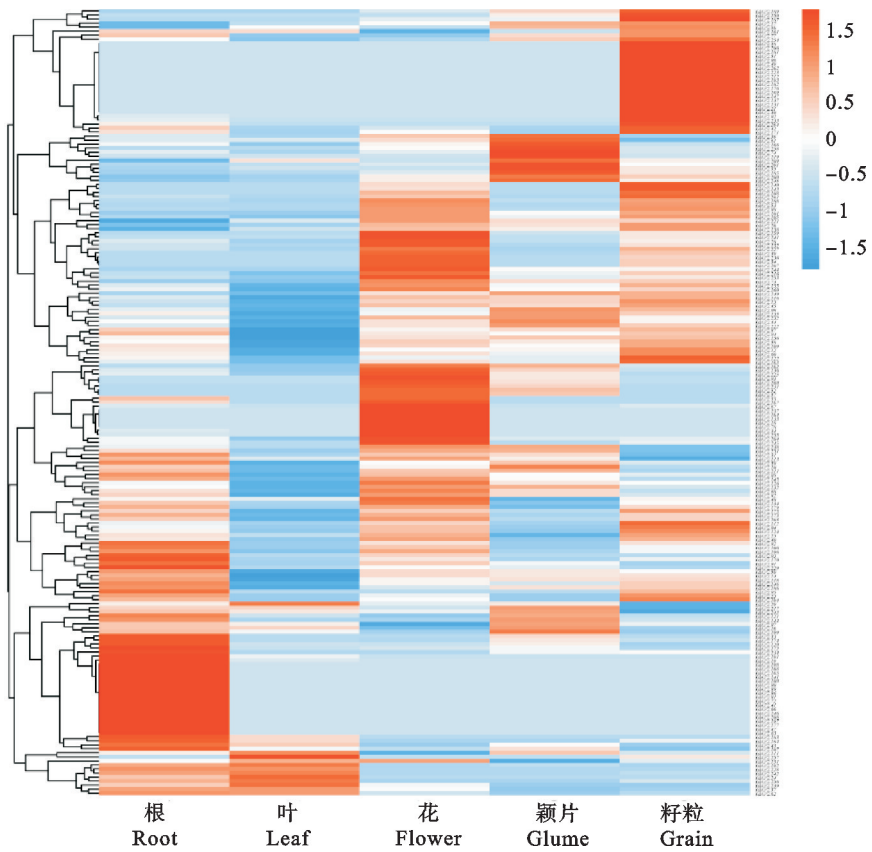


图 5 AP2 家族成员在野生二粒小麦不同组织的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of AP2 family members in different tissues of wild emmer wheat

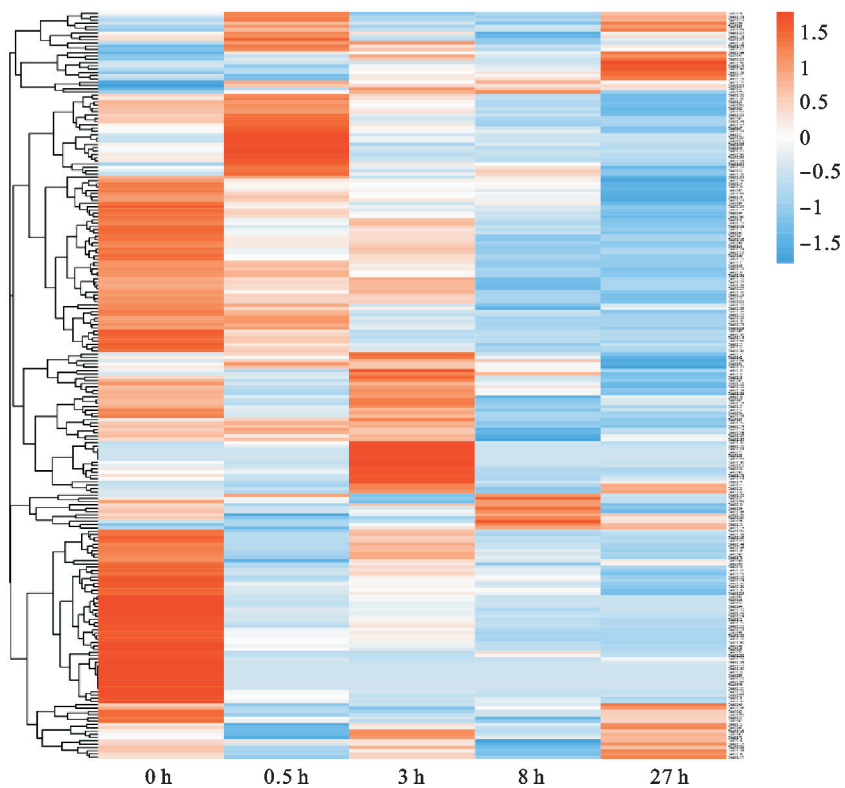
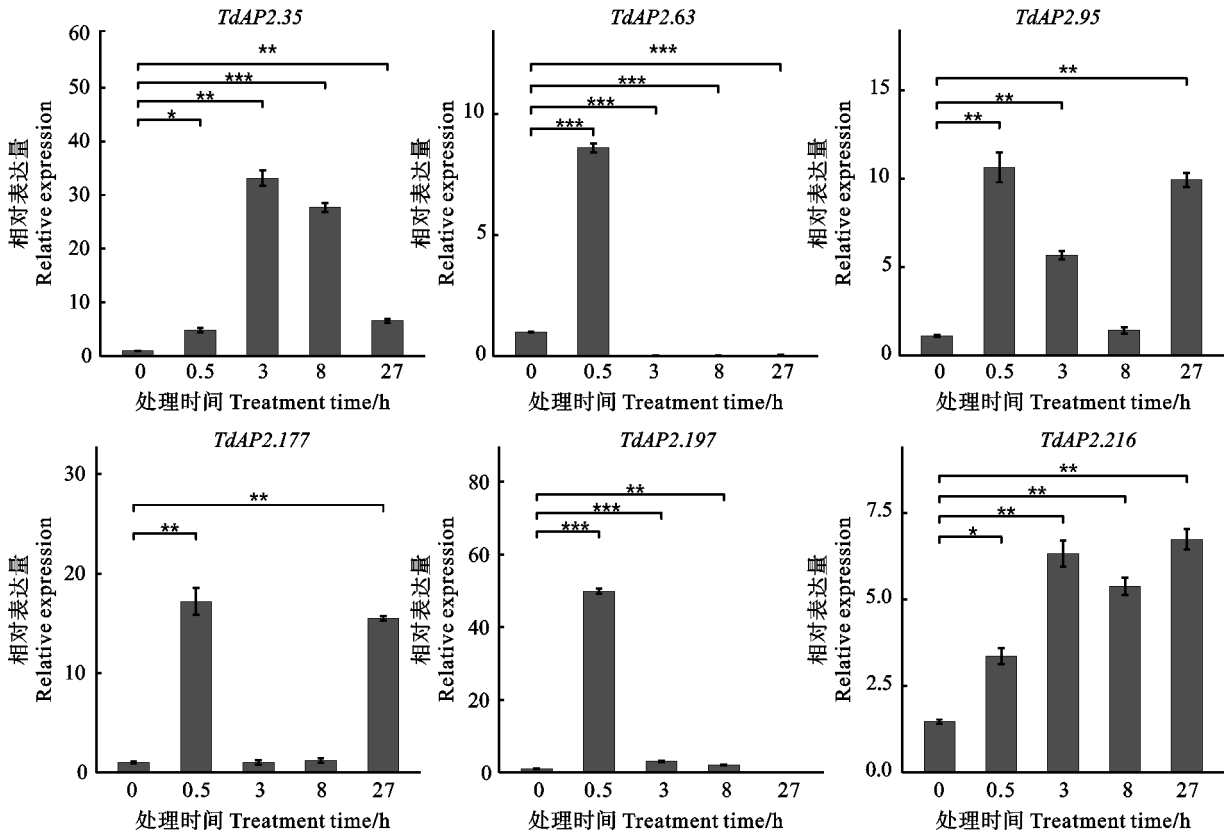


图 6 AP2 家族成员在 Gamal A5 叶片中盐处理不同时间下的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of AP2 family members under different salt stress time in Gamal A5



\*、\* \*、\* \* \* 分别表示与 0 h 差异在 0.05、0.01、0.001 水平显著。

\*、\* \*、\* \* \* mean significant difference with 0 h at 0.05, 0.01, 0.001 levels, respectively.

图 7 AP2 基因在盐处理不同时间下的相对表达量

Fig. 7 Relative expression patterns of AP2 genes under salt treatment

0 h 相比较, *TdAP2. 63*、*TdAP2. 177* 和 *TdAP2. 197* 在盐处理 0.5 h 后转录水平显著上升(8~50 倍); *TdAP2. 35* 在盐处理 3 h 后达到高峰, 其转录水平上升了 33 倍, 并在能维持较长时间高水平表达; *TdAP2. 95* 和 *TdAP2. 177* 在 0.5 h 和 27 h 表达水平最高; *TdAP2. 216* 在处理 0.5 h 后开始表达上调。这些结果表明, 在响应盐胁迫的过程中, AP2 基因可能具有不同的作用。

### 2.6 野生二粒小麦 AP2 基因核酸多样性和遗传分化指数分析

对 165 份小麦的 AP2 基因进行核酸多样性和群体分化分析, 核酸多样性结果(图 8)显示, 野生二粒小麦的  $P_i$  中位值为 0.000 51, 硬粒小麦的  $P_i$  中位值为 0.000 12, 普通小麦农家种和栽培种的  $P_i$  中位值分别为 0.000 33 和 0.000 25。说明 AP2 大部分成员在野生二粒小麦的驯化和改良过程经历了选择压力, *TdAP2. 240* 和 *TdAP2. 05* 的核酸多样性在栽培品种中明显的下降, 说明这两个位点在进化时经历较强的选择压力。比较不同小

麦群体间的 AP2 基因分化指数, 发现野生二粒小麦与硬粒小麦间、硬粒小麦与普通小麦农家种间 AP2 基因的  $F_{st}$  高于普通小麦农家种与栽培种的  $F_{st}$ , 但野生二粒小麦与硬粒小麦间、硬粒小麦与普通小麦农家种间 AP2 基因的  $F_{st}$  无显著差异。然而 *TdAP2. 240* 和 *TdAP2. 05* 在野生二粒小麦到硬粒小麦的驯化过程中存在明显的分化(图 9)。

### 2.7 野生二粒小麦 AP2 基因单倍型分析

为了解 AP2 基因从野生种被驯化为栽培种过程中的单倍型变异情况, 分析了 4 个 AP2 家族成员在野生二粒小麦和硬粒小麦中的基因型频率。结果表明, *TdAP2. 148* 在野生二粒小麦中具有两种单倍型(图 10a), 分别为主要单倍型 2(G/G C/C) (89%) 和次要单倍型 1(A/A C/C) (11%), 而在硬粒小麦中全部以单倍型 3(G/G G/G) 形式存在。 *TdAP2. 191* 在野生二粒小麦中具有 4 种单倍型(图 10b), 分别为单倍型 1(A/A A/A)、单倍型 2(A/A C/C)、单倍型 3(G/G

A/A)和单倍型 4(G/G C/C),对应频率为 8.7%、21.7%、65.2%和 4.4%,在硬粒小麦中仅检测到单倍型 3,说明可能单倍型 3 是一种优异单倍型。*TtAP2.121* 在野生二粒小麦中存在三种单倍型,分别为单倍型 1(A/A C/C)、单倍型 2(G/G C/C)和单倍型 3(G/G T/T),对应频率为 59.1%、18.1%和 22.8%,硬粒小麦仅检测到单倍型 1 (图 10c)。*TtAP2.205* 在野生二粒小麦中检测到

单倍型 1(C/C G/G C/C)、单倍型 2(C/C G/G T/T)、单倍型 3(T/T G/G T/T)和单倍型 4(T/T C/C T/T),频率分别为 4.3%、26.1%、56.6%和 13%(图 11d),在硬粒小麦中仅鉴定到单倍型 2 和单倍型 4,且单倍型 2 是主要单倍型(90.1%)。这些结果表明,AP2 基因在野生二粒小麦中存在单倍型多样性,但在驯化过程中发生了丢失,导致相应位点的遗传多样性降低。

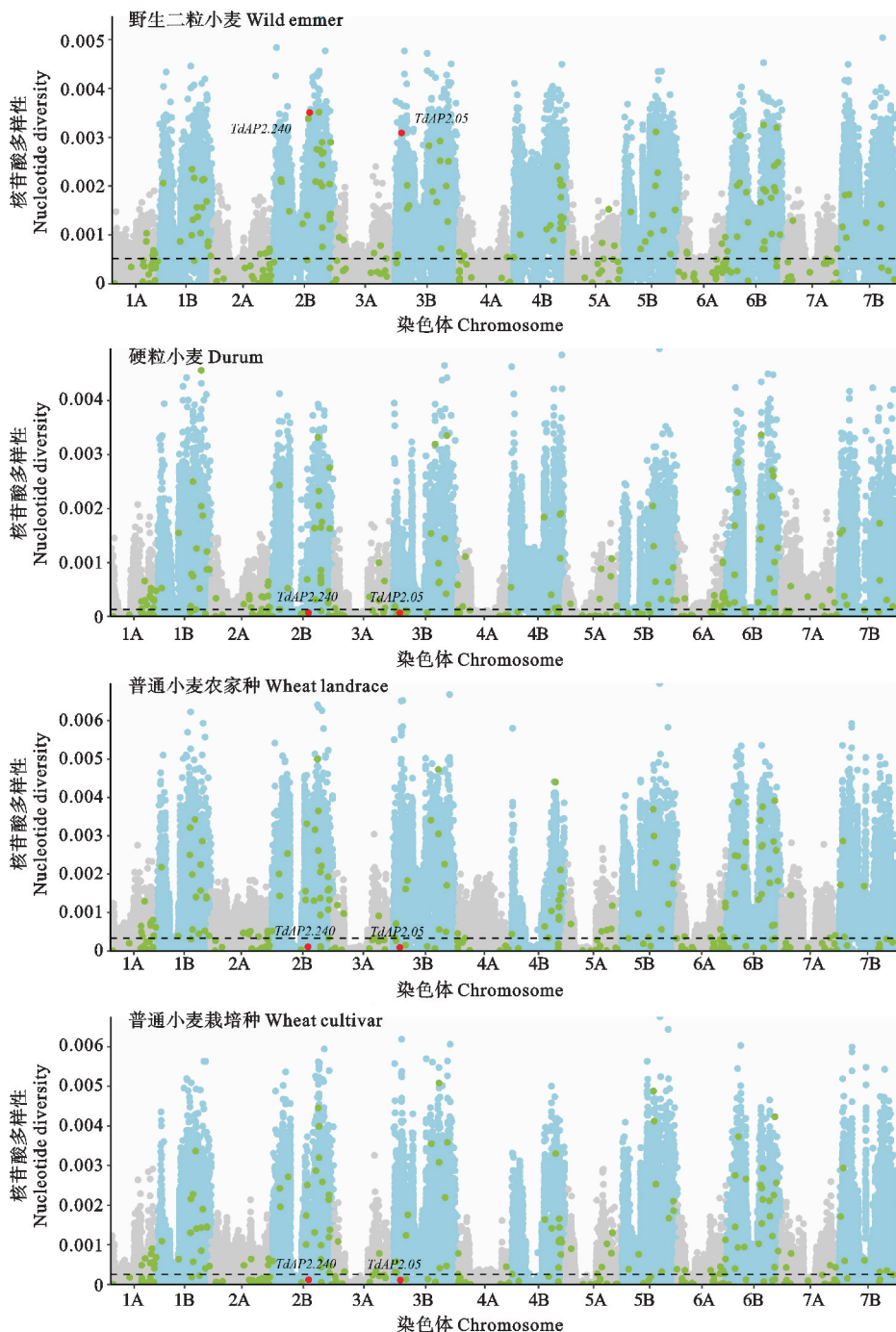


图 8 AP2 基因在不同小麦群体种的核酸多样性指数

Fig. 8 Nucleic acid diversity index of AP2 gene in different wheat populations

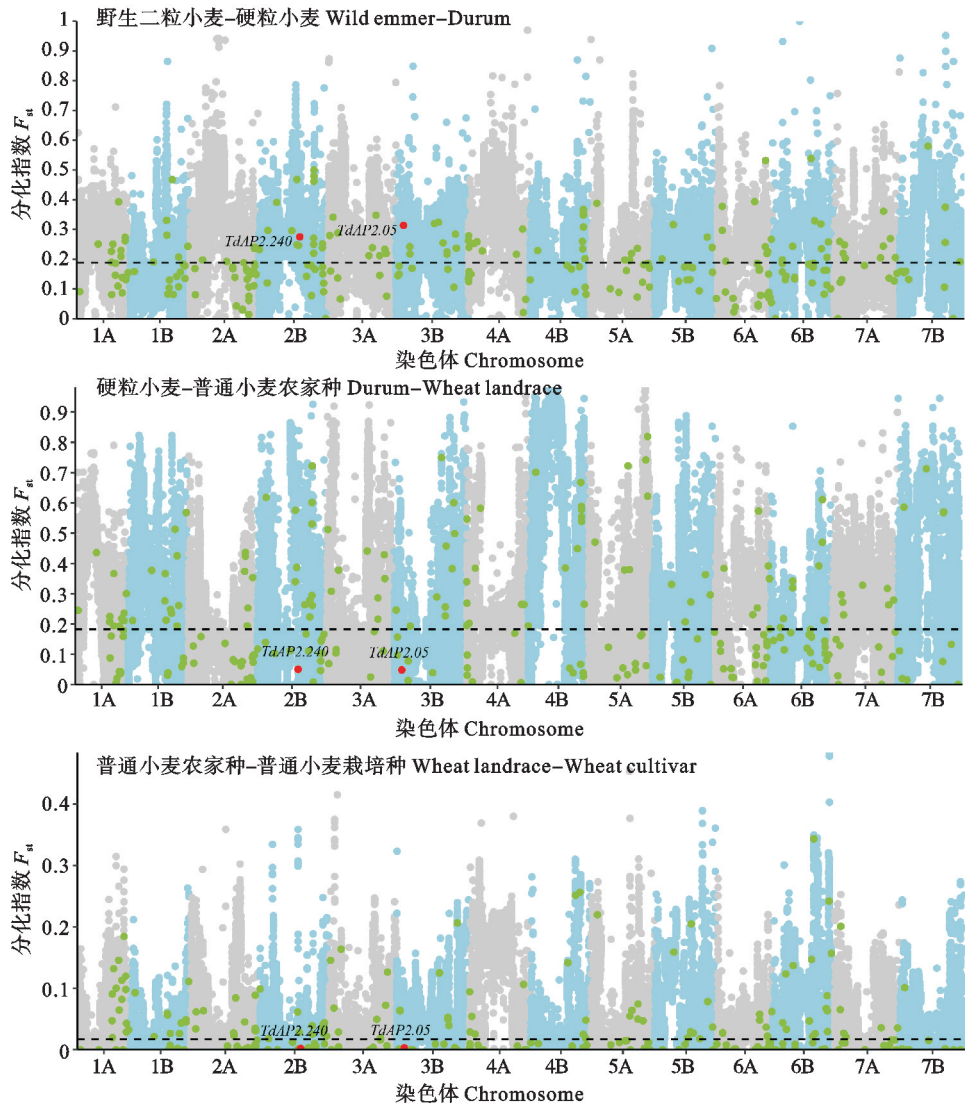


图 9 AP2 基因在不同小麦群体种的群体分化指数

Fig. 9 Population differentiation index of AP2 gene in different wheat population species

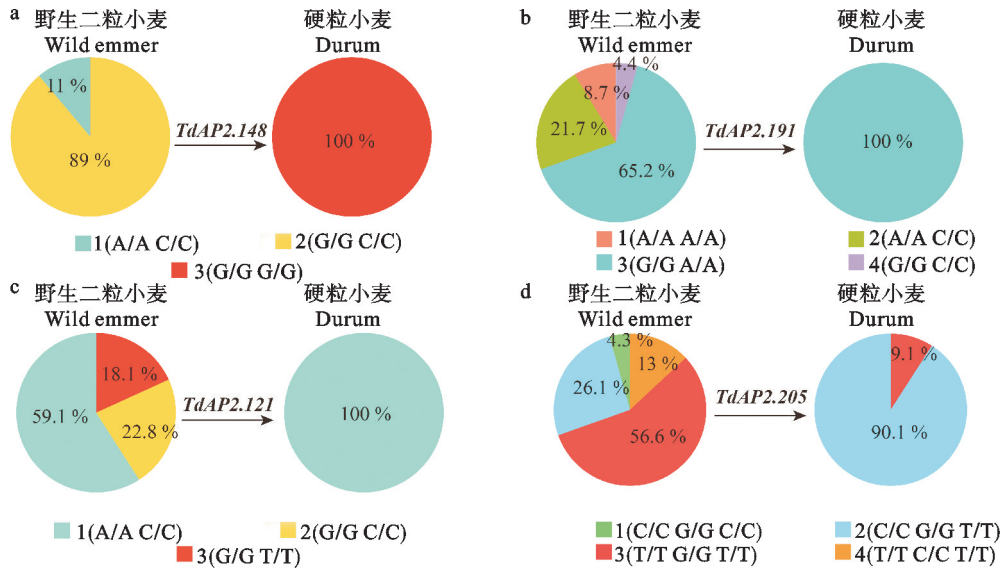


图 10 野生二粒小麦 AP2 基因单倍型频率

Fig. 10 Haplotype frequency of AP2 gene in wild emmer wheat

### 3 讨论

AP2 转录因子在植物形态发生、各种胁迫响应、激素信号转导、代谢产物调控等过程中具有重要调节作用<sup>[12]</sup>。本研究通过对野生二粒小麦全基因组分析,共鉴定出 265 个 AP2 家族成员。其数量多于拟南芥(18 个)<sup>[13]</sup>、水稻(26 个)<sup>[14]</sup>、玉米(229 个)<sup>[15]</sup>、藜麦(148 个)<sup>[16]</sup>,但小于小麦数量(322 个)<sup>[17]</sup>。这可能与野生二粒小麦 AP2 基因较多的片段复制事件有关。系统进化树将野生二粒小麦的 AP2 基因分为 3 个亚族,其中亚族 I 中成员数量最多,亚族 III 成员数量最少;保守基序分析表明,聚集在同一亚族的 AP2 基因具有相似保守基序,不同亚族之间存在差异。这与苦荞的 AP2 家族成员基因结构和保守基序特征相似<sup>[18]</sup>。揭示了不同亚家族成员的进化总体较保守,但在长期进化中基因结构和保守结构域上发生了差异。这一特征与小麦 AP2 基因家族相似<sup>[17]</sup>。

本研究在野生二粒小麦 AP2 基因启动子区鉴定到的顺式作用元件主要包括:光响应元件,如 G-box、spl、GT1-motif、GATA-motif 等,低温响应(LTR),干旱响应(MBS)等非生物胁迫相关元件。研究表明,LTR 元件对植物响应低温胁迫有重要作用<sup>[19]</sup>,MBS 被发现普遍存在于抗旱基因的启动子序列中<sup>[20]</sup>。本研究还在 AP2 基因启动子中发现参与植物激素反应的顺式作用元件,如参与脱落酸(ABA)反应的作用元件 ABRE,参与茉莉酸甲酯(MeJA)反应的顺式作用元件 CGT-CA-motif。ABA 也是多种非生物胁迫的应激激素,诱导胁迫相关基因表达促进植物对胁迫环境的适应<sup>[21]</sup>。这表明 AP2 在植物生长调节、发育和应对不同的环境胁迫中具有重要作用。

基因的表达模式与其功能关系密切。野生二粒小麦的 AP2 基因表现出组织特异性(图 6),说明不同 AP2 基因在野生二粒小麦发育过程中的功能不同。野生二粒小麦 AP2 基因在盐处理不同时间的表达谱表明,大多数基因在不同时间表现出不同的表达量(图 6)。这与小麦<sup>[17]</sup>和硬粒小麦<sup>[22]</sup>中的结果类似。qRT-PCR 结果(图 8)显示,AP2 家族不同成员在应对盐胁迫过程中发挥不同的功能。例如相较于 0 h, *TdAP2. 63*、*TdAP2. 177* 和 *TdAP2. 197* 在盐处理后 0.5 h 后转录水平显著上升(8~50 倍);*TdAP2. 35* 在盐处理 3 h 后达到表达峰值,相较于 0 h 的转录水平

上升了 33 倍,并能维持较长时间的高表达水平。

本研究从群体遗传学角度分析了 AP2 基因在不同材料中的核酸多样性和分化指数,发现大部分 AP2 基因在野生二粒小麦中的核酸多样性高于硬粒小麦、普通小麦农家种和栽培种,推测人工选择与进化过程中的选择压力导致 AP2 的核酸多样性下降。此外,野生二粒小麦与硬粒小麦间的 AP2 基因的  $F_{st}$  高于普通小麦农家种与栽培种的  $F_{st}$ ,说明野生二粒小麦到硬粒小麦的分化程度更高。分析单倍型频率发现,野生二粒小麦有更为丰富的单倍型,这一结果也进一步证明了上述观点。本研究结果可为未来的作物改良和基因功能研究提供宝贵的信息。

#### 参考文献:

- [1]FRANCO-ZORRILLA J M, LÓPEZ-VIDRIERO I, CARRASCO J L, *et al.* DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(6):2367.
- [2]XIE Z, NOLAN T M, JIANG H, *et al.* AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:228.
- [3]RASHID M, HE G, YANG G, *et al.* AP2/ERF transcription factor in rice: Genome-wide canvas and syntenic relationships between monocots and eudicots [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2012, 8:321.
- [4]LIU X, ZHOU G, CHEN S, *et al.* Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Triticum* and the response of *TtERF\_B2-50* in salt-tolerance [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1):541.
- [5]ZHAO Y, HU Y, DAI M, *et al.* The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(3):736.
- [6]RIECHMANN J L, MEYEROWITZ E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors [J]. *Biological Chemistry*, 1998, 379(6):633.
- [7]KANG H G, KIM J, KIM B, *et al.* Overexpression of FTL1/DDF1, an AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 2011, 180(4):634.
- [8]JIANG W, ZHANG X, SONG X, *et al.* Genome-wide identification and characterization of APETALA2/ethylene-responsive element binding factor superfamily genes in soybean seed development [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:566647.
- [9]AVNI R, NAVE M, BARAD O, *et al.* Wild emmer genome

- architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication [J]. *Science*, 2017, 357(6346): 93.
- [10] MACCAFERRI M, HARRIS N S, TWARDZIOK S O, *et al.* Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets [J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(5): 885.
- [11] ZHOU Y, ZHAO X, LI Y, *et al.* *Triticum* population sequencing provides insights into wheat adaptation [J]. *Nature Genetics*, 2020, 52(12): 1412.
- [12] FENG K, HOU X L, XING G M, *et al.* Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(6): 750.
- [13] SAKUMA Y, LIU Q, 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]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(3): 998.
- [14] 黄霞, 柯笑楠, 胡海超, 等. 全基因组鉴定和分析水稻 AP2 基因家族 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(11): 3491.  
HUANG X, KE X N, HU H C, *et al.* Genome-wide identification and characterization of the AP2 gene family in *Oryza sativa* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(11): 3491.
- [15] CHENG C, AN L, LI F, *et al.* Wide-range portrayal of AP2/ERF transcription factor family in maize (*Zea mays* L.) development and stress responses [J]. *Genes*, 2023, 14(1): 194.
- [16] 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 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253(Pt 8): 127582.
- [17] RIAZ M W, LU J, SHAH L, *et al.* Expansion and molecular characterization of AP2/ERF gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 632155.
- [18] LIU M, SUN W, MA Z, *et al.* Genome-wide investigation of the AP2/ERF gene family in tartary buckwheat (*Fagopyum Tataricum*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 84.
- [19] WANG C T, RU J N, LIU Y W, *et al.* Maize WRKY transcription factor ZmWRKY106 confers drought and heat tolerance in transgenic plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3046.
- [20] YUSUF C Y L, ABDULLAH J O, SHAHARUDDIN N A, *et al.* Characterization of promoter of *EgPAL1*, a novel PAL gene from the oil palm *Elaeis guineensis* Jacq [J]. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(2): 265.
- [21] YOSHIDA T, MOGAMI J, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 21: 133.
- [22] FARAJI S, FILIZ E, KAZEMITABAR S K, *et al.* The AP2/ERF gene family in triticum durum; Genome-wide identification and expression analysis under drought and salinity stresses [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(12): 1464.