

# 甜橙 AP2 亚家族转录因子的鉴定与分析

赵鑫悦, 谢婧蕻, 王天, 杨莉, 胡威, 宋杰, 匡柳青, 刘勇, 刘德春\*

(江西农业大学农学院, 南昌 330045)

**摘要:**【目的】AP2 亚家族转录因子具有调控植物种子、叶、花、根、茎等器官发育和响应非生物及生物胁迫的功能。本研究对甜橙 AP2 亚家族基因进行鉴定、生物信息学分析和表达分析, 为深入研究甜橙 AP2 亚家族基因的生物学功能提供理论基础。【方法】利用生物信息学分析方法, 对甜橙 AP2 亚家族基因进行筛选与鉴定, 通过 qRT-PCR 分析基因在不同组织部位以及不同非生物胁迫下的表达模式。【结果】鉴定出 14 个甜橙 AP2 亚家族基因, 不均等分布在 6 条染色体上, 其编码蛋白均为不稳定的亲水性蛋白。甜橙 AP2 亚家族基因在根、茎、叶中的表达存在差异, 且多数基因可以被干旱和高盐胁迫诱导表达。【结论】鉴定出 14 个甜橙 AP2 亚家族基因, 它们可能在甜橙响应非生物胁迫过程中起重要作用。

**关键词:** 甜橙; AP2 亚家族; 基因鉴定; 非生物胁迫; 生物信息学; 表达分析

## Identification and Analysis of AP2 Subfamily Transcription Factors in Sweet Orange (*Citrus sinensis*)

ZHAO Xinyue, XIE Jinghen, WANG Tian, YANG Li, HU Wei, SONG Jie, KUANG Liuqing, LIU Yong, LIU Dechun\*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, NanChang 330045)

**Abstract:** 【Objective】 AP2 subfamily transcription factors have the function of regulating the development of plant seeds, leaves, flowers, roots, stems and other organs and responding to abiotic and biotic stresses. In this study, we performed gene identification, bioinformatics analysis, and gene expression analysis of the AP2 subfamily, which provided a theoretical basis for studying the biological functions of AP2 subfamily genes in sweet orange (*Citrus sinensis*).

【Method】 Bioinformatics analysis was used to screen and identify AP2 subfamily genes in sweet orange. Gene expression patterns in various tissue and abiotic stresses were analyzed by qRT-PCR.

【Result】 14 AP2 subfamily genes were identified from the sweet orange genome database using bioinformatics methods. According to the analysis of protein physicochemical properties, the AP2 subfamily proteins of sweet orange are all unstable hydrophilic proteins. These proteins are primarily localized in the nucleus, which is consistent with their function and properties as transcription factors. The results of phylogenetic tree analysis showed that AP2 subfamily proteins of sweet orange could be divided into three evolutionary branches, including the ancient clade (CsRAP2-5, CsRAP2-6, CsRAP2-9, CsRAP2-2 and CsRAP2-13), the intermediate clade (CsRAP2-1, CsRAP2-7, CsRAP2-11 and CsRAP2-14) and the modern clade

基金项目: 江西省自然科学基金-杰出青年基金 (20224ACB215006); 国家自然科学基金 (32360735); 江西省柑橘产业技术体系 (JXARS-07-栽培岗位)

作者简介: 赵鑫悦, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为柑橘抗逆分子机制。Tel: 15370804330, E-mail: 1340791660@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 15879149348, E-mail: ldc873380800@163.com

(CsRAP2-2~CsRAP2-4, CsRAP2-8 and CsRAP2-10). In the phylogenetic tree of plant AP2 subfamily proteins, there were significant interspecific differences in the number of AtAP2, OsAP2, CcAP2 and CsAP2 protein members clustered in the same group. The AP2 subfamily proteins of sweet orange are more closely related to the homologous proteins of Clementine orange than the homologous proteins of Arabidopsis and rice. Protein conserved motif analysis showed that the AP2 subfamily proteins contained conserved elements of Motif3, Motif4, Motif2, Motif5 and Motif1. In addition, each group in the orange AP2 subfamily protein phylogenetic tree has its specific conserved elements. These results indicate that the members of the same subgroup of AP2 subfamily proteins in sweet orange are highly conserved, which also reflects the reliability of the phylogenetic analysis results. The number of introns and exons of AP2 subfamily genes in sweet orange is 5~9 and 6~10. The promoter sequences of AP2 subfamily genes in sweet orange contain cis-acting elements such as endogenous hormone response, growth and development and abiotic stress response, indicating that the subfamily genes may have the function of regulating plant growth and development in response to plant hormones, light and abiotic stresses. The results of collinearity comparative analysis showed that sweet orange had more AP2 subfamily homologous gene pairs with Arabidopsis and apple compared with rice and maize. These results indicated that compared with monocots, the AP2 subfamily genes of sweet orange had more homologous genes and closer relatives with dicots. The prediction of protein secondary structure showed that the AP2 subfamily proteins of sweet orange had the highest proportion of  $\alpha$ -helix and random coil. Tissue-specific expression analysis showed that AP2 subfamily genes were expressed in three tissues: leaves, stems and roots, with higher expression levels of *CsRAP2-3* and *CsRAP2-6* in roots and higher expression levels of *CsRAP2-7* in stems. In order to further verify the response of AP2 subfamily genes to abiotic stresses in sweet orange, qRT-PCR was used to detect the expression pattern of AP2 subfamily genes in leaves of sweet orange under simulated drought (20% PEG6000), high salt (250 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl), abscisic acid (100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> ABA) and low temperature (4 °C) stresses. The results showed that the expressions of *CsRAP2-1*, *CsRAP2-2*, *CsRAP2-8* and *CsRAP2-10* were generally down-regulated under simulated drought, high salinity, ABA and low temperature treatments. The expression of *CsRAP2-12* was down-regulated after high-salt, ABA and low-temperature treatments, and down-regulated at 1-12 hours after simulated drought treatment, but the expression level was higher at 24 h than before treatment. Except for these five genes, the expression levels of the other 9 AP2 subfamily genes in sweet orange showed an upward trend after drought treatment. *CsRAP2-3*, *CsRAP2-4*, *CsRAP2-6*, *CsRAP2-7*, *CsRAP2-9*, *CsRAP2-11* and *CsRAP2-13* were induced by high salt stress. After ABA treatment, only the expression of *CsRAP2-7* showed an upward trend. Except for *CsRAP2-13*, the expression levels of the other 13 genes showed a down-regulated trend after low temperature treatment. These results indicated that the expression of most AP2 subfamily genes in sweet orange increased under drought and high salt stress, and decreased under ABA and low temperature treatments. **【Conclusion】** The AP2 subfamily genes of sweet orange were identified

and analyzed in detail at the genome-wide level. The tissue expression characteristics of this subfamily genes and their responses to abiotic stress were studied, which provided a basis for the subsequent study of the function of these genes in regulating the citrus responses abiotic stresses.

**Key words:** *Citrus*, AP2 subfamily, gene identification, Abiotic stress, Bioinformatics, Expression analysis

AP2/ERF (APETALA2/ Ethylene responsive factor) 家族转录因子是植物特有的一类转录因子, 以 AP2 保守结构域为特征。AP2/ERF 家族转录因子主要分为 AP2 (APETALA2)、ERF (ethylene-responsive-element-bindingprotein)、CBF/DREB (dehydration responsive element binding)、RAV (Related to ABI3/VP) 和 Soloist 等 5 个亚家族<sup>[1]</sup>。其中 AP2 亚家族转录因子蛋白序列含有 2 个 AP2 结构域; ERF 和 CBF/DREB 亚家族均只含有 1 个 AP2 结构域; RAV 亚家族转录因子含有 1 个 AP2 结构域和 B3 结构域; Soloist 亚家族仅含有单一 AP2 结构域, 但其序列和结构与其他四个亚家族成员不同, 因此独立分为 1 个亚家族<sup>[2]</sup>。AP2 亚家族成员根据核定位和氨基酸序列以及其他保守基序进一步细分为 euAP2、basalANT 和 euANT 三个分支<sup>[3]</sup>。AP2 亚家族转录因子可以与下游基因启动子上富含 T/A 的元件结合, 并通过第二个 AP2 结构域直接激活下游基因表达<sup>[4]</sup>。据报道, AP2 亚家族基因主要参与响应非生物胁迫和调节植物各器官生长发育<sup>[5]</sup>。例如: 牡丹(*Paeonia × suffruticosa Andr.*) *PoBBM* 在体细胞胚胎发育中具有重要作用, 在种子、愈伤组织和叶中的表达量最高<sup>[6]</sup>; 大豆(*Glycine max*) *GmBBM7* 调控体细胞胚胎发生和根系生长, 并可以通过激素途径增加愈伤组织的形成率和密度<sup>[7]</sup>; 小麦(*Triticum aestivumL.*) *TaAP2-10* 正向调节小麦条锈病的抗性<sup>[8]</sup>; 辣椒(*Capsicum annuum L.*) *CaAIL1* 通过与下游基因启动子中的不同顺式元件结合来抑制负免疫调节因子, 从而正向调节辣椒植物对青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum* infection, RSI) 的免疫力<sup>[9]</sup>; 杂交枫香(*Liquidambar styraciflua* \times *Liquidambar formosana*) *AIL1*、*AIL5* 在从愈伤组织到体细胞胚胎形态发生过程中起着重要作用<sup>[10]</sup>; 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtANT* 和 *AtAIL6* 调节发育中的花器官的生长和形态发生<sup>[11]</sup>; *AtAIL5*、*AtAIL6* 和 *AtAIL7* 在 *AtANT* 功能缺失突变体中具有改变花器官定位和生长的功能, 从而导致萼片融合和花瓣数量减少<sup>[12]</sup>; 盐穗木(*Halostachys caspica*) *HcTOE3* 正向调节植物冷冻胁迫的耐受性, 且上调冷反应基因和脱落酸信号转导通路基因的转录水平来提高植物冷冻耐受性<sup>[13]</sup>; 牡丹 *PITOE3* 直接调控色氨酸脱羧酶基因表达, 增强牡丹耐高温性<sup>[14]</sup>。

甜橙是我国乃至全球第一大柑橘种类, 探索甜橙非生物胁迫的响应机制, 对促进甜橙的经济效益提升具有重要意义。在本研究中采用生物信息的方法鉴定和分析了甜橙 AP2 亚家族的 14 个基因, 并采用荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析甜橙 AP2 亚家族基因在不同组织部位和非生物胁迫下的基因表达差异。笔者的工作将为后续验证甜橙 AP2 亚家族基因响应非生物胁迫的功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 甜橙 AP2 亚家族基因鉴定与分析

甜橙 (*Citrus sinensis*) 基因组数据来源于柑橘基因组数据库 (<http://citrus.hzau.edu.cn/index.php>)<sup>[15]</sup>。拟南芥 AP2 亚家族序列来源于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>)。利用以下方法鉴定 AP2 亚家族基因。首先, 从 Pfam 数据库 (<https://pfam-docs.readthedocs.io/en/latest/searching-pfam.html>) 下载 AP2 结构域序列 (PF00847)<sup>[16]</sup>。其次, 使用 TBtools (v1.09867+), 以 PF00847 为模型从甜橙基因组搜索出候选 AP2 亚家族候选基因。用 CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 验证序列中双 AP2 结构域的存在, 确定甜橙 AP2 亚家族基因。利用 ExPASy 网站 (<https://www.expasy.org/>) 对甜橙 AP2 亚家族蛋白进行二级结构预测和理化性质分析<sup>[17]</sup>。利用 WOLF-PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 对该家族蛋白进行亚细胞定位分析<sup>[18]</sup>。

### 1.2 甜橙 AP2 亚家族蛋白系统进化分析

水稻 (*Oryza sativa*)、克里曼丁橘 (*Citrus clementina*) 和苹果 (*Malus pumila*) AP2 亚家族蛋白序列来源于基因组数据库 (<https://asia.ensembl.org/index.html>)<sup>[19]</sup>。通过 MEGA X 软件中的邻接法 (Neighbor-joining) 进行系统进化树的构建, 参数设置默认<sup>[20]</sup>。并通过 Evolview (<https://www.evolgenius.info/help/>) 进行美化。

### 1.3 甜橙 AP2 亚家族蛋白结构与基序分析

利用 Jalview 软件对甜橙 AP2 亚家族蛋白的双 AP2 域进行可视化。使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 对甜橙 AP2 亚家族蛋白的基序进行识别, 其中基序最大值为 10<sup>[21]</sup>。

### 1.4 甜橙 AP2 亚家族基因启动子顺式作用元件分析与 miRNA 预测

利用 Ttools 提取甜橙 AP2 亚家族基因起始密码子上游 2kb 序列, 具体参照马青龄<sup>[16]</sup>的方法。

### 1.5 甜橙 AP2 亚家族基因染色体定位和共线性分析

利用 TBtools 进行甜橙内, 拟南芥、水稻和甜橙, 克里曼丁橘、苹果和甜橙的 AP2 亚家族基因之间的共线性可视化展示。

### 1.6 甜橙 AP2 亚家族基因表达分析

将甜橙幼苗置于霍格兰 (Hoagland) 营养液中, 在光照培养箱培养一周。再将植株分别置于含有 20% PEG6000、250 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、100 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 和 4 °C 的霍格兰 (Hoagland) 营养液中进行模拟干旱、高盐、ABA 和低温处理, 在 0、1、3、6、12 和 24 h 后分别采集叶片。样品 RNA 提取采用试剂盒法 (普洛麦格, 中国), 利用 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒 (天根, 中国) 合成 cDNA 第一链。利用 Primer 软件设计实时荧光定量引物 (表 1)。反应体系 20 μL: 2×FastReal qPCR PreMix (SYBR GREEN) (天根, 中国) 10 μL, 模板 1 μL, 上、下游引物 各 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。反应程序为: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 60 °C 15 s, 循环 40 次。用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法计算相对表达量。利用 SPSS 软件进行差异显著

性分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Gene name	Forward primer (5'-3')	Forward primer (5'-3')
<i>CsRAP2-1</i>	TCAGGAGCAGCAAGCCACATC	ACTTGACACCAACCCAGTTAGCC
<i>CsRAP2-2</i>	ATGGCAAGCAAGGATTGGCAGAG	CTTCAGCAGCTTCTCTCTGTGTG
<i>CsRAP2-3</i>	TGACCACCAACAGGATCTCAAAGC	GCGAACTCAGCGGCAGGTAAC
<i>CsRAP2-4</i>	GACTCTGCTCCGCTTGTTCCTCG	GGCACTCCACACCATGTCAACC
<i>CsRAP2-5</i>	AAACCTAGCAACCTCAACAAAACC	CGATGACGCCGAGCCACTAC
<i>CsRAP2-6</i>	GCAAACGCAGCCAGCATTATTACC	GTCAGTAGCCGCATAGCACAAAC
<i>CsRAP2-7</i>	CTGCTGCTGATGATGTTGACGATG	TCTCACTTGTGCGGCTTCTG
<i>CsRAP2-8</i>	AGCAGCAGCAGCAGCAACAG	TGGCGGCGGTGGTGAAGG
<i>CsRAP2-9</i>	TGGTTTACTGGCATCGTTGGAC	TGTGCTGCCGCTTCTTCATCG
<i>CsRAP2-10</i>	GAATGGCAGTGGTGGCAGTAGTG	TTGAGAAGCGGCAAGGTTGAGC
<i>CsRAP2-11</i>	TCCATTCTCCGTCGTCACCTC	GGTTGCTGCCACTGTTGTTGTTAG
<i>CsRAP2-12</i>	TGTGACTTCACTTGGCTGCGATG	TCCACCGATGCCTGCTGACTC
<i>CsRAP2-13</i>	TTAATAAGAGAAGGCGGCGTGAGC	GCAGCAGTAGTAGCAGCAGCAGC
<i>CsRAP2-14</i>	CCTGCGAGTGGTGGAGGAGAG	GCTGGGGCTGTTGGTTCTGATAC

## 2 结果与分析

### 2.1 甜橙 AP2 亚家族基因鉴定与分析

鉴定出甜橙 AP2 亚家族成员 14 个。根据染色体位置与拟南芥同源基因的相似性进行命名 (*CsRAP2-1*~*CsRAP2-6*、*CsRAP2-7*、*CsRAP2-8*~*CsRAP2-14*)。甜橙 AP2 亚家族基因的 CDS 序列长度为 915 (*CsRAP2-9*)~2181 (*CsRAP2-10*) bp。氨基酸数目为 316 (*CsRAP2-5*)~691 (*CsRAP2-10*) aa; 蛋白分子质量为 36.830 (*CsRAP2-1*)~75.314 (*CsRAP2-10*) ku ; 等电点为 5.33 (*CsRAP2-6*)~9.06 (*CsRAP2-13*); 不稳定系数为 40.42 (*CsRAP2-10*)~63.45 (*CsRAP2-13*), 亲水性为-0.954 (*CsRAP2-6*)~-585 (*CsRAP2-8*), 表现为不稳定的亲水蛋白; 该家族的亚细胞定位大多位于细胞核, 这与 AP2 亚家族作为转录因子的功能和特性一致 (表 2)。

表 2 甜橙 AP2 亚家族基因信息

Table 2 Information of AP2 subfamily genes in *Citrus sinensis*

基因名称	编码区	登录号	氨基酸数	分子质量	等电点	不稳定系数	亲水性	亚细胞定位
Gene name	CDS	Accession No.	No. of	Molecular	PI	Instability	Gravy	Subcellular
	Length/ bp		amino acids	weight		index (II)		location
<i>CsRAP2-1</i>	1560	Cs1g_pb017560	330	36830.98	6.49	60.46	-0.693	nucl: 14
<i>CsRAP2-2</i>	2043	Cs1g_pb018830	651	72100.17	6.3	57.95	-0.712	nucl: 14
<i>CsRAP2-3</i>	1608	Cs1g_pb019650	532	58446.33	6.17	50.39	-0.605	nucl: 9, chlo:3,

								cyto: 1,extr: 1
<i>CsRAP2-4</i>	1863	Cs1g_pb016600	583	64616.54	6.46	40.82	-0.842	nucl: 14
<i>CsRAP2-5</i>	1047	Cs1g_pb009560	316	35544.91	6.03	51.65	-0.919	chlo: 8, nucl:5, mito: 1
<i>CsRAP2-6</i>	1362	Cs3g_pb008940	416	47000.55	5.33	61.95	-0.954	nucl:11,chlo:2,
<i>CsRAP2-7</i>	1512	Cs7g_pb020540	471	51525.09	8.65	49.9	-0.632	nucl: 13,plas:1
<i>CsRAP2-8</i>	1728	Cs4g_pb002610	543	58938.78	8.2	46.45	-0.585	nucl:11,cyto:2,
<i>CsRAP2-9</i>	915	Cs4g_pb001200	339	38460.04	5.7	49.23	-0.847	pero: 5, chlo:4, nucl: 3
<i>CsRAP2-10</i>	2181	Cs6g_pb002300	691	75314.18	5.97	40.42	-0.703	nucl: 14
<i>CsRAP2-11</i>	1467	Cs6g_pb004660	456	50786.81	6.8	44.38	-0.795	nucl:13,vacu:1
<i>CsRAP2-12</i>	1182	Cs6g_pb019310	361	40592.88	7.8	58.39	-0.764	nucl: 14
<i>CsRAP2-13</i>	1203	Cs7g_pb003570	328	36862.84	9.06	63.45	-0.778	nucl:11,chlo:1, cyto: 1, pero: 1
<i>CsRAP2-14</i>	1533	Cs8g_pb019330	469	50593.56	6.9	49.49	-0.661	nucl: 14

## 2.2 甜橙 AP2 亚家族蛋白的系统发育树构建及多序列比对

为了分析甜橙 AP2 亚家族蛋白的系统发育关系，构建了拟南芥、水稻、克里曼丁橘和甜橙的 AP2 亚家族蛋白的系统发育树（图 1）。结果显示，甜橙 AP2 亚家族蛋白分为古代进化支（*CsRAP2-5*、*CsRAP2-6*、*CsRAP2-9*、*CsRAP2-2* 和 *CsRAP2-13*）、中间进化支（*CsRAP2-1*、*CsRAP2-7*、*CsRAP2-11* 和 *CsRAP2-14*）和现代进化支（*CsRAP2-2*~*CsRAP2-4*、*CsRAP2-8* 和 *CsRAP2-10*）。根据进化树的拓扑结构分类，14 个甜橙 AP2 亚家族蛋白可以分为 10 组，用不同的颜色绘制。同一组的蛋白结构同源性较高，可能有相似功能。聚在同一组中的拟南芥 *AtAP2*、水稻 *OsAP2*、克里曼丁橘 *CcAP2* 和甜橙 *CsAP2* 蛋白成员数量的差异表明四个物种之间 AP2 亚家族蛋白存在明显的种间差异。甜橙 AP2 亚家族蛋白与克里曼丁橘的亲缘关系较近，与拟南芥和水稻的关系较远。

为了进一步分析和鉴定甜橙 AP2 亚家族蛋白中双 AP2 结构域重复序列的特征，笔者进行了多序列比对（图 2）。比对结果揭示了氨基酸残基 S-3、R-6、G-7、V-8、R-12、T-14、R-16、E-18、H-20、W-22、D-23、G-35、Q-37、G-41、D-44、A-49、A-50、Y-53、D-54、A-56、A-57、K-59、G-62、N-68、F-69、Y-74、M-81、E-88、L-93、R-94、R-95、R-103、G-104、S-106、Y-108、R-109、G-110、V-111、H-115、R-119、W-120、A-122、R-123、G-125、G-129、K-131、Y-134、L-135、G-136、E-143、A-144、A-145、A-147、Y-148、D-149、A-151、G-157、A-160、V-161、T-162、N-163、F-164、Y-168 在甜橙 AP2 亚家族基因蛋白中完全保守。在两个 AP2 结构域中皆含有 3 个精氨酸（R）、4 个甘氨酸（G）、1 个缬氨酸（V）、1 个谷氨酸（E）、1 个色氨酸（W）、1 个天冬氨酸（D）、4 个丙氨酸（A）、1 个赖氨酸（K）、1 个天冬酰胺（N）、1 个苯丙氨酸（F）和 1 个酪氨酸（Y）。

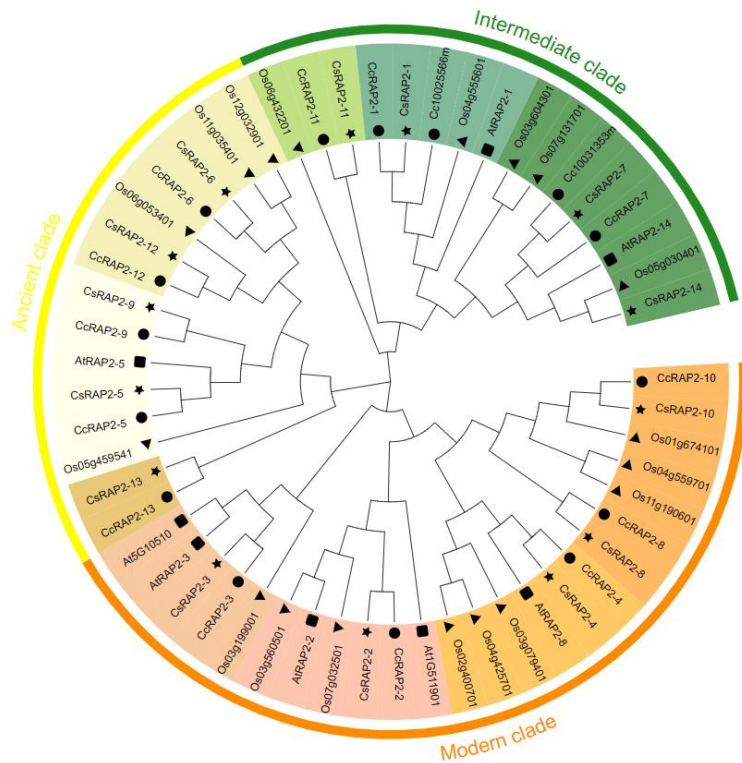


图 1 4 个物种 AP2 蛋白的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of AP2 proteins from four plant species

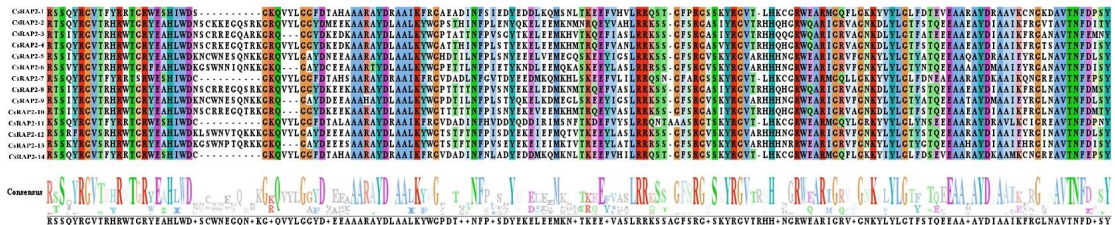


图 2 甜橙 AP2 家族蛋白结构域分析

Fig. 2 Domain analysis of AP2 subfamily proteins in *Citrus sinensis*

### 2.3 甜橙 AP2 亚家族蛋白保守结构域、基因结构和保守基序分析

为了分析甜橙 AP2 亚家族基因结构和遗传性，揭示该基因家族的进化规律，使用 TBtools 软件对该家族基因结构进行可视化。结果表明，甜橙 AP2 亚家族基因包含 5~9 个内含子和 6~10 个外显子。甜橙 AP2 亚家族蛋白可分为 10 个亚组，且同一亚组的内含子与外显子的数量基本相等。

使用 MEME 预测了 14 个甜橙 AP2 亚家族蛋白的 10 个保守基序（图 3）。结果表明，甜橙 AP2 亚家族都含有 Motif3 (VPKSRDTPGQRSSQYRGVTRHRWTGRYEAHLWD)、Motif4 (KQVYLGQYDKKEAAA)、Motif2 (RAYDLAALKYWGPDTTINFPVSDYEKELEEMK NLTKZEYVASLRRKSSGF)、Motif5 (RGASKYRGVTR) 和 Motif1 (HQNGRWEARIGRVF GNKYLYLGTFTSTZEEAAEAYDIAAIKYRGLNAVTFN)。甜橙 AP2 亚家族蛋白的古代进化支

(CsRAP2-5、CsRAP2-6、CsRAP2-9、CsRAP2-2 和 CsRAP2-13) 都含有 Motif7; Motif6 只存在于古代进化支成员 (CsRAP2-5、CsRAP2-9、CsRAP2-2 和 CsRAP2-13); 现代进化支 (CsRAP2-2~CsRAP2-4、CsRAP2-8 和 CsRAP2-10) 都有 Motif9 和 Motif8。这个研究结果表明, 甜橙 AP2 亚家族蛋白同一亚组的成员高度保守, 这也反映出构建的系统进化分析结果可靠。

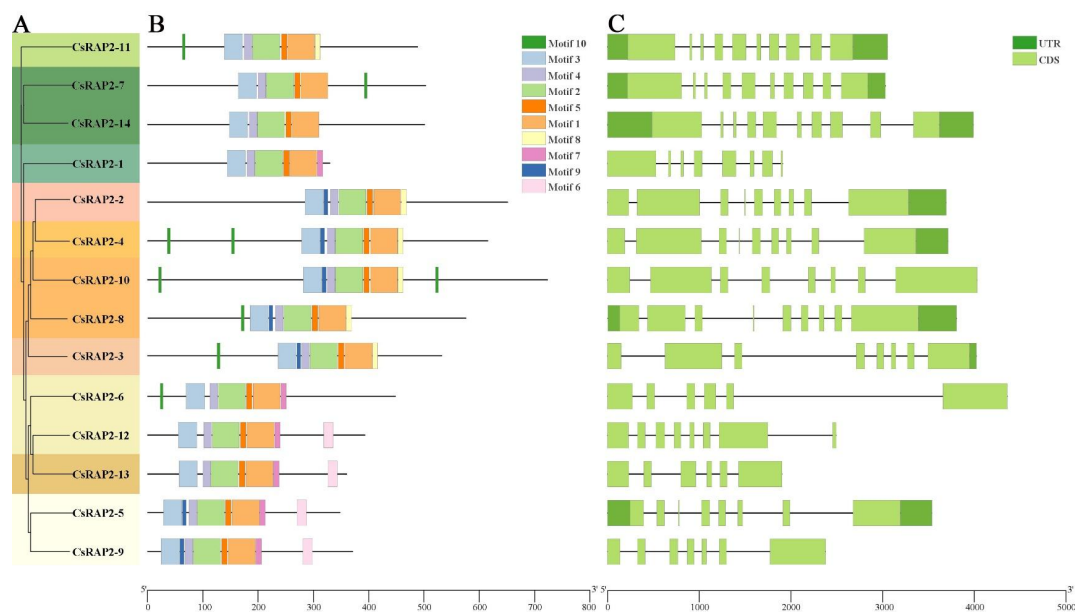


图 3 甜橙 AP2 家族蛋白系统发育树 (A)、蛋白基序 (B)、基因结构 (C)

**Fig. 3 Phylogenetic tree (A), conserved domains (B), gene structure (C) of AP2 subfamily proteins in *Citrus sinensis***

#### 2.4 甜橙 AP2 亚家族启动子顺式作用元件分析与 miRNA 的预测

通过 PlantCARE 网站对甜橙 AP2 亚家族启动子的顺式作用元件进行预测。结果显示, 甜橙 AP2 亚家族基因启动子上存在激素响应、防御与应激响应、脱落酸响应、厌氧诱导、昼夜节律调控、分生组织表达相关、干旱响应等元件。例如, 植物激素调控元件中的生长素响应元件 I (TGA-element) 和脱落酸响应元件 III (ABRE); 逆境防御响应元件 II (TC-rich repeats)、干旱诱导元件 VIII (MBS)、损伤响应元件 X (WUN-motif); 植物生长发育相关元件包括参与昼夜节律调控的顺式调控元件 V (circadian) 和分生组织表达相关的元件 VII (CAT-box); 光响应元件 IX (G-box、MRE、Box4、GATA-motif、G-Box、GT1-motif、TCT-motif 和 AE-box) (图 4)。该家族基因的启动子中都至少含有 6 个光响应元件, 其中 CsRAP2-5 和 CsRAP2-14 最多, 含有 18 个光响应元件。综上所述, 该亚家族基因可能与胁迫响应和激素应答有关, 并参与植物生长发育过程。



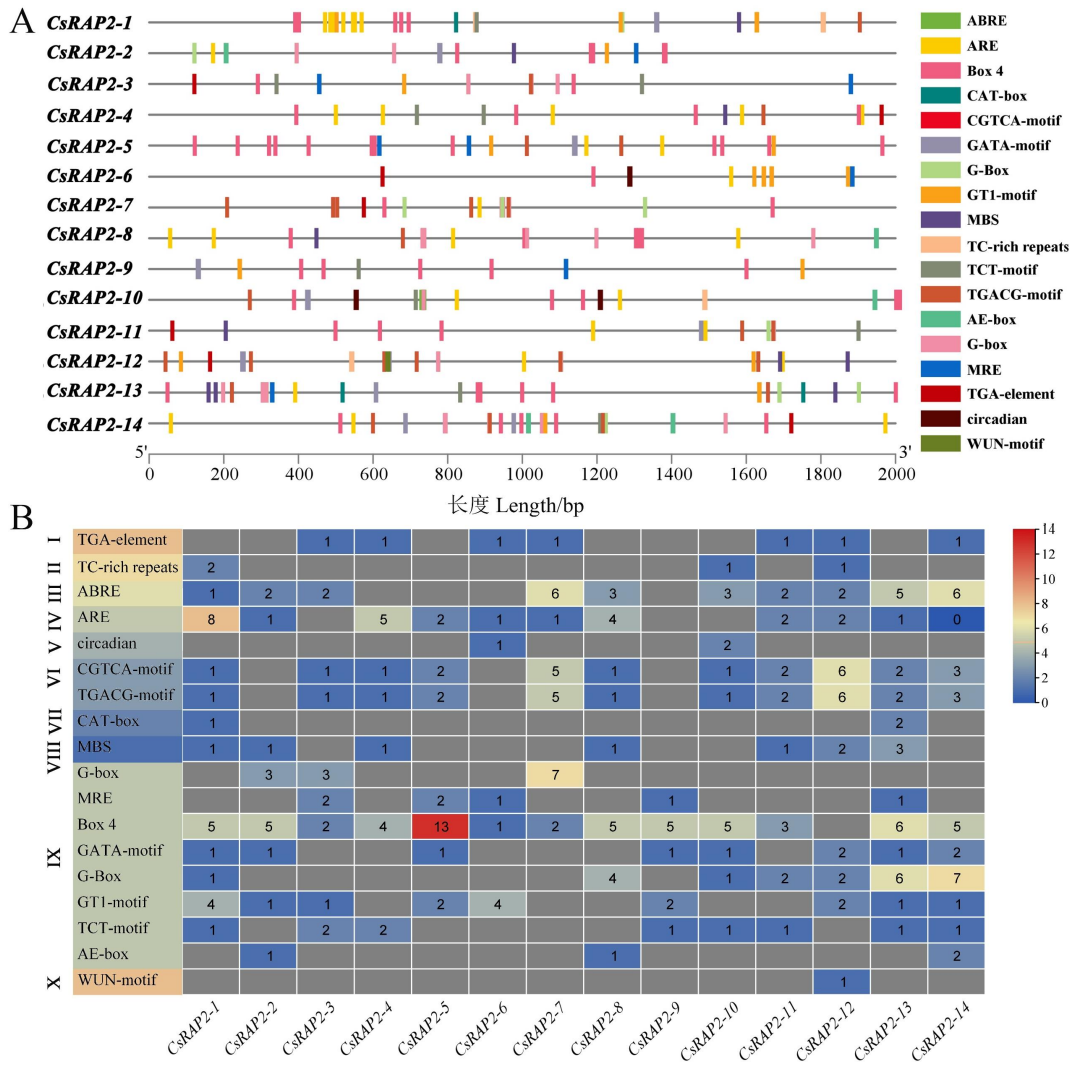


图 4 甜橙 AP2 家族基因启动子的顺式作用元件预测

Fig. 4 Prediction of cis-acting elements on the promoter of AP2 subfamily proteins in *Citrus sinensis*

microRNA (miRNA) 可能在植物中参与转录基因表达调控。通过在线网站分析了甜橙 AP2 亚家族基因可能被靶向的 miRNA，包括对果实成熟和变色、开花时间和植物耐盐性有调控作用的 miR172<sup>[22]</sup>，参与调控植物根系生长发育和抗逆(干旱、盐碱和高温)的 miR164<sup>[23]</sup>，以及参与调节幼苗生长、气孔密度和耐旱性的 miR393<sup>[24]</sup> (表 3)。以上结果表明这几个 miRNA 可能靶向甜橙 AP2 亚家族基因表达来调控植物生长发育和响应激素、非生物胁迫。

表 3 与甜橙 AP2 亚家族基因相关的 miRNA

Table 3 The prediction of miRNA related to AP2 subfamily genes in *Citrus sinensis*

靶基因	miRNA 名称	抑制类型
Target gene	miRNA name	Inhibition
CsRAP2-1 (Cs1g_pb017560.1)	csi-miR172a-3p	Cleavage
	csi-miR172c	Cleavage
	csi-miR172b	Cleavage

CsRAP2-2 (Cs1g_pb018830.1)	csi-miR164	Cleavage
CsRAP2-4 (Cs1g_pb016600.1)	csi-miR393	Cleavage
CsRAP2-6 (Cs3g_pb008940.1)	csi-miR164	Cleavage
CsRAP2-7 (Cs7g_pb020540.1)	csi-miR172a-3p	Cleavage
	csi-miR172b	Cleavage
	csi-miR172c	Cleavage
CsRAP2-9 (Cs4g_pb001200.1)	csi-miR156	Cleavage
CsRAP2-10 (Cs6g_pb002300.1)	csi-miR3946	Cleavage
CsRAP2-11 (Cs6g_pb004660.1)	csi-miR172a-3p	Cleavage
	csi-miR172c	Cleavage
	csi-miR172b	Cleavage
CsRAP2-12 (Cs6g_pb019310.1)	csi-miR396c	Cleavage
CsRAP2-14 (Cs8g_pb019330.1)	csi-miR172a-3p	Cleavage
	csi-miR172c	Cleavage
	csi-miR172b	Cleavage

## 2.5 甜橙 AP2 亚家族基因染色体定位和共线性分析

染色体定位分析表明,甜橙 AP2 亚家族基因分别定位于 1 号 (*CsRAP2-1~CsRAP2-5*)、3 号 (*CsRAP2-6*)、4 号 (*CsRAP2-8, CsRAP2-9*)、6 号体 (*CsRAP2-10~CsRAP2-12*)、7 号 (*CsRAP2-7, CsRAP2-13*) 和 8 号染色体 (*CsRAP2-14*)。共线性显示,一共有 4 个片段存在重复 (*CsRAP2-7* 和 *CsRAP2-11*、*CsRAP2-7* 和 *CsRAP2-14*、*CsRAP2-11* 和 *CsRAP2-14*、*CsRAP2-12* 和 *CsRAP2-13*),说明在甜橙 AP2 亚家族基因进化的过程中存在基因复制(图 5)。

物种间共线性分析表明,甜橙与拟南芥之间有 10 个同源基因对,分布在 1、4、6、7、8 号染色体上;甜橙与苹果之间有 37 个同源基因对,分布在 1、3、4、6、7、8 号染色体上;甜橙与水稻之间有 7 个同源基因对,分布在 1、4、7、8 号染色体上;甜橙与玉米之间有 6 个同源基因对,分布在 1、4、7、8 号染色体上。甜橙 AP2 亚家族基因中有 4 个基因(*CsRAP2-7*、*CsRAP2-9*、*CsRAP2-1* 和 *CsRAP2-12*)能在其他物种中都找到同源基因(图 5),可能在植物进化过程中有重要作用。与水稻和玉米相比,甜橙与拟南芥、苹果的 AP2 亚家族同源基因对更多,说明 AP2 亚家族基因在物种间分化时较保守。

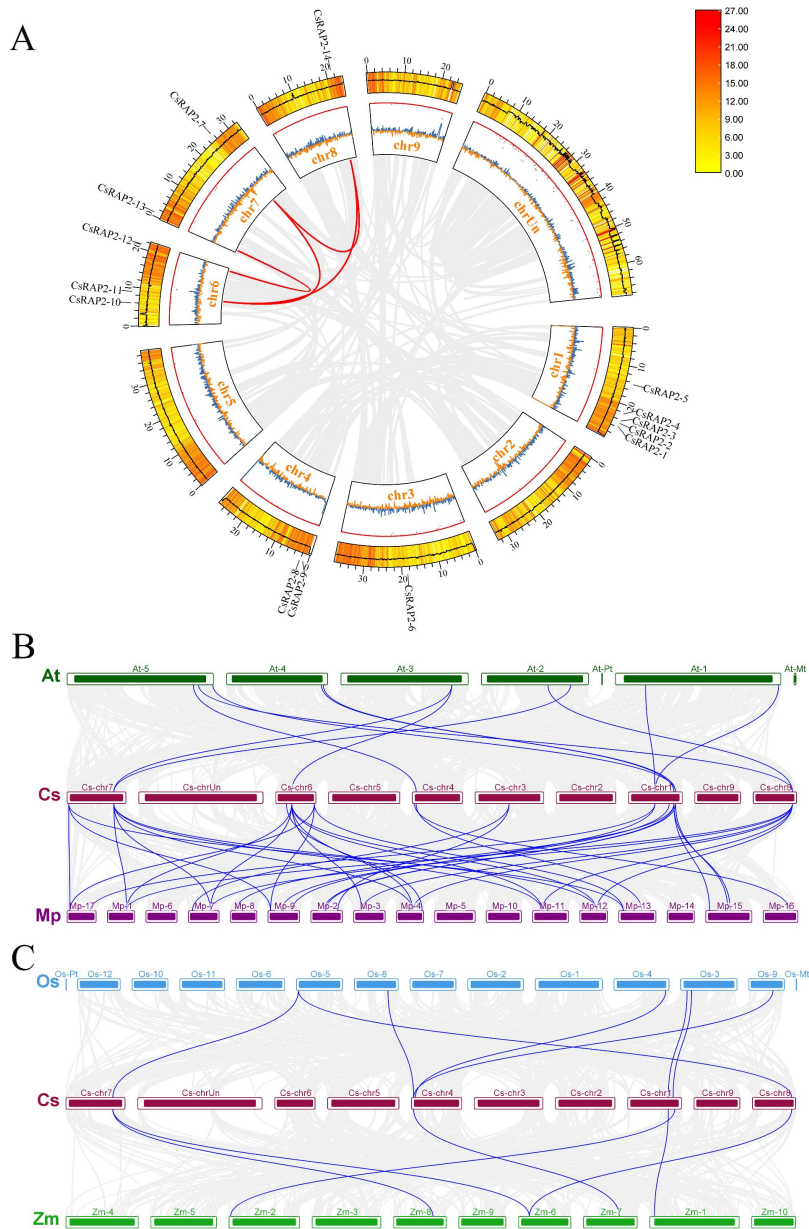


图 5 甜橙 AP2 亚家族成员染色体定位 (A) 和共线性关系 (B、C)

**Fig. 5 Chromosomal location(A) and syntenic relationship (B、 C) of AP2 subfamily proteins in *Citrus sinensis***

## 2.6 甜橙 AP2 亚家族蛋白质二级结构预测

通过 ProtParam 在线分析工具预测甜橙 AP2 亚家族成员的二级结构 (表 4)。结果表明,甜橙 AP2 亚家族基因均含有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规则卷曲和延伸链 4 种构型,其中  $\alpha$ -螺旋占比在 14.15% (CsRAP2-5)~34.50% (CsRAP2-9) 之间;延伸链占比在 7.55% (CsRAP2-9)~19.09% (CsRAP2-7) 之间; $\beta$ -转角占比在 3.25% (CsRAP2-4)~8.15% (CsRAP2-7) 之间;无规则卷曲占比在 49.33% (CsRAP2-6)~69.43% (CsRAP2-4) 之间。 $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲比例最高。

表 4 甜橙 AP2 亚家族蛋白二级结构

**Table 4 The protein secondary structure of AP2 subfamily genes in *Citrus sinensis***

基因名	$\alpha$ -螺旋	延长链	$\beta$ -转角	无规则卷曲	二级结构元件分布
Gene Name	Alpha helix	Extended strand	Beta turn	Random coil	Secondary structure element distribution
CsRAP2-1	28.48%	16.67%	5.45%	49.39%	
CsRAP2-2	25.81%	13.21%	4.30%	56.68%	
CsRAP2-3	28.76%	13.16%	4.70%	53.38%	
CsRAP2-4	14.15%	13.17%	3.25%	69.43%	
CsRAP2-5	26.72%	11.21%	3.45%	58.62%	
CsRAP2-6	31.25%	13.62%	5.80%	49.33%	
CsRAP2-7	31.81%	19.09%	8.15%	40.95%	
CsRAP2-8	17.74%	16.70%	5.04%	60.52%	
CsRAP2-9	34.50%	7.55%	4.31%	53.64%	
CsRAP2-10	17.98%	13.42%	3.73%	64.87%	
CsRAP2-11	17.83%	17.01%	5.94%	59.22%	
CsRAP2-12	28.50%	10.69%	4.07%	56.74%	
CsRAP2-13	33.89%	10.56%	5.28%	50.28%	
CsRAP2-14	19.36%	16.17%	4.59%	59.88%	

## 2.7 甜橙 AP2 亚家族基因的组织特异性表达分析

对甜橙 AP2 亚家族在甜橙根、茎和叶中的表达进行了分析。结果显示，*CsRAP2-2*、*CsRAP2-7*、*CsRAP2-9*、*CsRAP2-11* 和 *CsRAP2-12* 在茎中表达量较高。*CsRAP2-4*、*CsRAP2-10* 和 *CsRAP2-13* 在茎中表达最低。*CsRAP2-3* 和 *CsRAP2-6* 在根中表达量较高。*CsRAP2-2* 主要在根和茎中表达（图 6）。*CsRAP2-3*、*CsRAP2-6* 和 *CsRAP2-8* 主要在根中表达。综上，甜橙 AP2 亚家族基因在不同组织部位中的表达存在差异。

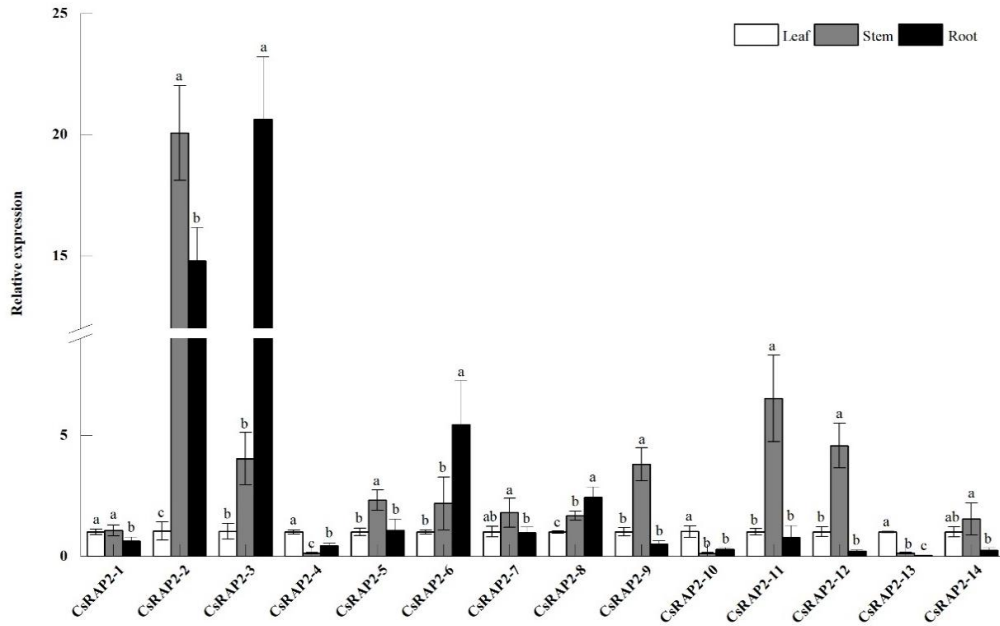


图 6 甜橙 AP2 亚家族基因不同组织中表达量

Fig. 6 The expression levels in different tissues of AP2 subfamily proteins in *Citrus sinensis*

### 2.8 甜橙 AP2 亚家族基因在非生物胁迫下的表达分析

14 个甜橙 AP2 亚家族基因在不同非生物胁迫处理下的表达量差异较大 (图 7)。模拟干旱处理后, *CsRAP2-1*、*CsRAP2-2*、*CsRAP2-8* 和 *CsRAP2-10* 在叶中的表达总体呈下调趋势。处理 6 h 时, *CsRAP2-3*、*CsRAP2-5*、*CsRAP2-6*、*CsRAP2-9*、*CsRAP2-11* 和 *CsRAP2-14* 在叶中的表达量显著上升。*CsRAP2-7* 在处理 3 h 时表达量显著上升, 随后陡然下降。

在盐处理下, *CsRAP2-5* 和 *CsRAP2-14* 的表达量与处理前差异不显著。在处理 6 h 时, *CsRAP2-4*、*CsRAP2-6*、*CsRAP2-7*、*CsRAP2-11* 和 *CsRAP2-13* 在叶中的表达量显著上升并达到峰值。*CsRAP2-1*、*CsRAP2-2*、*CsRAP2-8* 和 *CsRAP2-12* 在叶中的表达量在处理后总体呈下调趋势。*CsRAP2-10* 在叶中的表达量先下调, 在 12 h 上升达到峰值。

ABA 处理后, *CsRAP2-1*、*CsRAP2-2*、*CsRAP2-4*、*CsRAP2-6*、*CsRAP2-8*、*CsRAP2-10*~*CsRAP2-14* 在叶中的表达总体呈下调趋势, 表达量低于处理前。*CsRAP2-3* 和 *CsRAP2-5* 在叶中的表达量先显著下调, 然后在 6h 时上升且表达量接近处理前。*CsRAP2-9* 的表达量与处理前差异不显著。在 12 h 时, *CsRAP2-7* 在叶中的表达量显著上升并达到峰值。

在低温处理后, *CsRAP2-13* 的表达量先下调, 在处理 3 h 时上调后又下调, 并在 12 h 上升达到峰值, 表达量总体呈现“M”形双峰变化趋势。除 *CsRAP2-13* 外, 其他 13 个基因的表达量基本呈下调趋势。



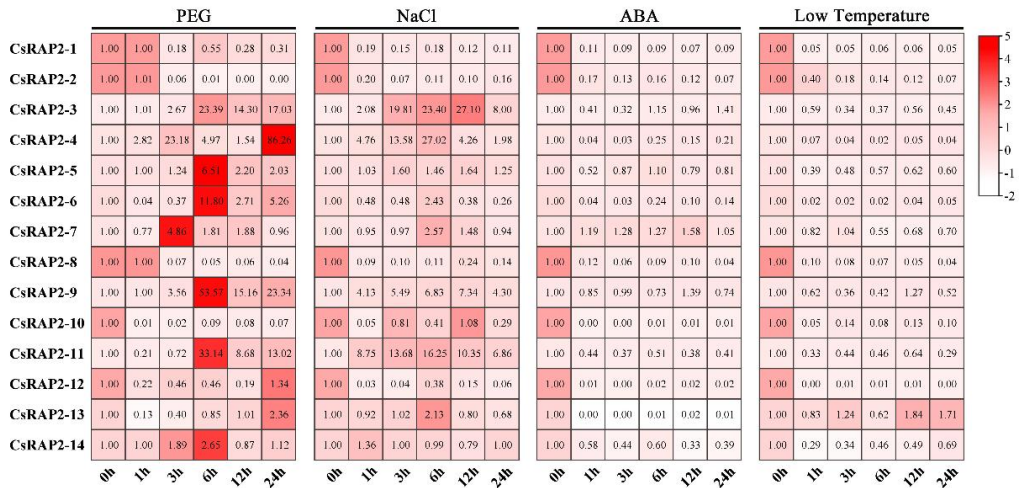


图 7 甜橙 AP2 亚家族基因在非生物胁迫下的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of AP2 subfamily genes in *Citrus sinensis* under abiotic stress

### 3 讨论

甜橙 AP2 亚家族转录因子家族在植物体内广泛存在，目前已在拟南芥<sup>[1]</sup>、山核桃<sup>[25]</sup>、马尾松<sup>[26]</sup>、菠萝<sup>[27]</sup>、铁皮石斛<sup>[28]</sup>和油棕<sup>[29]</sup>等植物中分别鉴定到 18、30、7、24、14、34 个成员。在本研究中，共鉴定出甜橙中 14 个 AP2 亚家族基因。相较于 T.M. Ito 等人提出存在 13 个甜橙 AP2 亚家族成员<sup>[30]</sup>，本文基于柑橘基因组数据库的搜索还包括了一个新基因，*CsRAP2-1*。蛋白理化性质分析和亚细胞定位预测表明，甜橙 AP2 亚家族均为不稳定的亲水性蛋白，且主要定位于细胞核，这与该家族作为转录因子的特征相符，且与梔子 AP2 亚家族的分析一致<sup>[31]</sup>。系统进化树显示，甜橙 AP2 亚家族可分为古代进化支(*CsRAP2-5*、*CsRAP2-6*、*CsRAP2-9*、*CsRAP2-2* 和 *CsRAP2-13*)、中间进化支 (*CsRAP2-1*、*CsRAP2-7*、*CsRAP2-11* 和 *CsRAP2-14*) 和现代进化支 (*CsRAP2-2~CsRAP2-4*、*CsRAP2-8* 和 *CsRAP2-10*)，这与蜡梅 AP2 亚家族分类相近<sup>[32]</sup>。在植物 AP2 亚家族蛋白的系统进化树中，聚在同一组中的 *AtAP2*、*OsAP2*、*CcAP2* 和 *CsAP2* 蛋白成员数量存在明显的种间差异。甜橙 AP2 亚家族蛋白与克里曼丁橘的亲缘关系较近，与拟南芥和水稻的关系较远。蛋白基序预测表明，甜橙 AP2 亚家族皆包含 Motif3、Motif4、Motif2、Motif5 和 Motif1。另外，甜橙 AP2 亚家族蛋白进化树中每个组都有其特异性的保守元件，证明了系统进化树分析的可信度。甜橙 AP2 亚家族基因包含 5~9 个内含子和 6~10 个外显子，这与拟南芥中 AP2 亚家族基因的外显子-内含子结构相似<sup>[1]</sup>。甜橙 AP2 亚家族基因启动子序列含有内源激素响应、生长发育和非生物胁迫响应等顺式作用元件，这与山核桃中 AP2 亚家族基因启动子的预测分析类似<sup>[25]</sup>。蛋白质二级结构预测显示，甜橙 AP2 亚家族蛋白的  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲比例最高， $\alpha$ -螺旋平均比例为 25.48%，无规则卷曲比例为 55.92%，这个比例与梔子中 AP2 亚家族的比例相近<sup>[31]</sup>。

组织特异性表达分析表明，*CsRAP2-6* 主要在根中表达。与本研究结果一致，*CsRAP2-6* 同源基因拟南芥 *AtWR11* 主要在根中表达。而 *AtWR11* 在拟南芥中通过调控生长素响应基因表达维持根系生长素含量，最终调控拟南芥根系发育<sup>[33]</sup>。因此，*CsRAP2-6* 基因也可能在甜

橙根系发育中起重要作用。本研究结果表明, *CsRAP2-7* 主要在茎中表达。这与 *CsRAP2-7* 同源基因烟草 *NiTOE3* 在茎中表达量较高的结果一致<sup>[34]</sup>。但是, *CsRAP2-7* 在玉米中的同源基因 *ZmRAP2-7* 主要在根中表达, 刺激穗根发育<sup>[35]</sup>, 这与本研究结果不同。*CsRAP2-3* 在甜橙根中表达量最高。但是, *CsRAP2-3* 在拟南芥中的同源基因 *AtAIL6* 却在花中的表达量最高, 并且调节发育中的花器官的生长和形态发生<sup>[11]</sup>。这些结果说明 AP2 亚家族基因在不同物种中的组织部位表达量存在差异。

有研究表明, AP2 亚家族的基因主要参与响应非生物胁迫和调节植物的生长发育, 如花器官形成、胚胎发生和根系发育<sup>[5]</sup>。本研究从甜橙 AP2 亚家族成员启动子区域中鉴定出内源激素响应、生长发育和非生物胁迫响应等顺式作用元件, 表明甜橙 AP2 亚家族可能在甜橙响应非生物胁迫过程中起重要作用。为进一步验证甜橙 AP2 亚家族基因对非生物胁迫的响应, 本研究分析了这些基因在非生物胁迫下叶中的表达模式。结果表明, *CsRAP2-1*、*CsRAP2-2*、*CsRAP2-8* 和 *CsRAP2-10* 在模拟干旱、高盐、ABA 和低温处理下, 表达量总体上呈下调趋势。*CsRAP2-12* 的表达量在高盐、ABA 和低温处理后下调表达, 在模拟干旱处理 1-12 小时下调表达, 但在 24 h 时表达量高于处理前。除这 5 个基因外, 其余 9 个甜橙 AP2 亚家族基因的表达量在干旱处理后均呈上调趋势。*CsRAP2-3*、*CsRAP2-4*、*CsRAP2-6*、*CsRAP2-7*、*CsRAP2-9*、*CsRAP2-11* 和 *CsRAP2-13* 均被高盐胁迫诱导表达。ABA 处理后, 只有 *CsRAP2-7* 的表达量呈上调趋势。除 *CsRAP2-13* 外, 其他 13 个基因的表达量在低温处理后都呈下调趋势。这些结果说明, 多数甜橙 AP2 亚家族基因在干旱和高盐胁迫下表达量上升, 在 ABA 和低温处理下表达量下降。与本研究结果一致, *CsRAP2-2* 同源基因拟南芥 *AtANT* 在高盐胁迫下表达量显著降低<sup>[36]</sup>, 且与 *SCABP8 / CBL10* (*SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN 8*) 启动子结合, 负调节拟南芥耐盐性。因此, *CsRAP2-2* 也可能在甜橙中负调节其耐盐性。与本研究结果一致, *CsRAP2-7* 同源基因烟草 *NiTOE3* 也可被高盐、干旱和 ABA 诱导表达。不同的是, *NiTOE3* 对低温敏感, 这个现象在 *CsRAP2-7* 同源基因盐穗木 *HcTOE3* 同样存在, 且相较 4 °C 低温处理, 冰冻胁迫 (-2°C) 更能强烈诱导 *HcTOE3*<sup>[13]</sup>, 而 *CsRAP2-7* 在低温处理下的表达量和处理前没有明显变化<sup>[34]</sup>。*CsRAP2-2* 同源基因拟南芥 *AtANT* 在干旱和 ABA 处理后表达量都显著上升<sup>[37]</sup>, 而 *CsRAP2-2* 在这两个处理后表达量都显著降低。这些结果说明不同植物的 AP2 亚家族基因对非生物胁迫的响应存在差异。

目前有关甜橙 AP2 亚家族基因的研究还没有较多报道, 本研究鉴定和分析甜橙 AP2 亚家族基因, 对该亚家族基因在不同组织部位和非生物胁迫下的表达进行分析。这些研究结果为后续研究这些基因调控甜橙非生物胁迫的功能提供了依据。

#### 4 结论

本研究鉴定和分析了甜橙 14 个 AP2 亚家族基因, 均编码不稳定的亲水性蛋白。甜橙 AP2 亚家族基因在不同组织部位中的表达存在差异。14 个成员中, 8 个基因在模拟干旱胁迫下表达上升, 7 个基因在高盐胁迫下表达上升, 大多数基因在 ABA 和低温胁迫下表达下调,

推测该家族基因可能在甜橙响应非生物胁迫过程中起重要作用。

#### 参考文献：

- [1] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, SHINSHI H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice[J/OL]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432. DOI:10.1104/pp.105.073783.
- [2] LICAUSI F, OHME-TAKAGI M, PERATA P. APETALA 2/Ethylene Responsive Factor (AP 2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs[J]. *New Phytologist*, 2013, 199(3): 639-649.
- [3] KIM S, SOLTIS P S, WALL K, SOLTIS D E. Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family[J/OL]. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, 23(1): 107-120. DOI:10.1093/molbev/msj014.
- [4] DINH T T, GIRKE T, LIU X, YANT L, SCHMID M, CHEN X. The floral homeotic protein APETALA2 recognizes and acts through an AT-rich sequence element[J]. *Development*, 2012, 139(11): 1978-1986.
- [5] JOFUKU K D, DEN BOER B, VAN MONTAGU M, OKAMURO J K. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2.[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(9): 1211-1225.
- [6] ZHANG X, ZHANG W, CHANG Y, MA Y, DENG Y, ZHANG N, BAI Y, JIANG Z, HU T. Cloning, characterization, and expression pattern analysis of the BBM gene in tree peony (*Paeonia ostii*)[J]. *Forests*, 2023, 15(1): 36.
- [7] ZHOU R, ZHAO Y, CHENG P, ZHANG B, LIU Z, WANG S, LI H, CHEN Q, ZHAO Y, LI S, OTHERS. GmBBM7 promotes callus and root growth during somatic embryogenesis of soybean (*Glycine max*)[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2023, 37(1): 2238833.
- [8] HU Z, WANG X, WEI L, WANSEE S, CHEN L, KANG Z, WANG J, OTHERS. TaAP2-10, an AP2/ERF transcription factor, contributes to wheat resistance against stripe rust[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2023, 288: 154078.
- [9] ZHENG Y, HE S, CAI W, SHEN L, HUANG X, YANG S, HUANG Y, LU Q, WANG H, GUAN D, OTHERS. CaAIL1 acts positively in pepper immunity against *Ralstonia solanacearum* by repressing negative regulators[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2021, 62(11): 1702-1717.
- [10] QI S, ZHAO R, YAN J, FAN Y, HUANG C, CHEN S, KONG L, ZHAO J, ZHANG J. Global transcriptome and coexpression network analyses reveal new insights into somatic embryogenesis in hybrid sweetgum (*Liquidambar styraciflua* × *Liquidambar formosana*)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 751866.
- [11] KRIZEK B A, BANTLE A T, HEFLIN J M, HAN H, FREESE N H, LORAIN A E. AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6 directly regulate floral homeotic, growth, and vascular development genes in young Arabidopsis flowers[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(15): 5478-5493.
- [12] KRIZEK B A. AINTEGUMENTA-LIKE genes have partly overlapping functions with AINTEGUMENTA but make distinct contributions to Arabidopsis thaliana flower development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(15): 4537-4549.
- [13] YIN F, ZENG Y, JI J, LI W. The halophyte *Halostachys caspica* AP2/ERF transcription factor HcTOE3 positively regulates freezing tolerance in Arabidopsis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 638788.
- [14] ZHANG T, TANG Y, LUAN Y, CHENG Z, WANG X, TAO J, ZHAO D. Herbaceous peony AP2/ERF transcription factor binds the promoter of the tryptophan decarboxylase gene to enhance high-temperature stress tolerance[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2022, 45(9): 2729-2743.
- [15] XU Q, CHEN L L, RUAN X, CHEN D, ZHU A, CHEN C, BERTRAND D, JIAO W B, HAO B H, LYON



- M P, OTHERS. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*)[J]. *Nature genetics*, 2013, 45(1): 59-66.
- [16] QINGLING M, BEIBEI L, LI Y, WEI H, YONG L, DECHUN L. Genome-wide identification and expression analysis of WOX gene family in Trifoliolate orange[J].
- [17] ZHANG Dan, ZHENG Pin, DENG Biao, CHAI Gaifeng, AN Chang, DENG Kao, ZHANG Wenbing, LU Yuming, LU Xiangyu, WANG Xiaomei, QIN Yuan. Passion fruit (*Passiflora edulis*) R2R3-MYB structural and functional analysis of gene families [J]. *Journal of Fruit Science*, 2024(01 vo 41): 12-29.
- [18] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, FUJITA N, HARADA H, ADAMS-COLLIER C, NAKAI K. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. *Nucleic acids research*, 2007, 35(suppl\_2): W585-W587.
- [19] FANG Sen, SONG Xuelian, HAN Xuanxuan, SONG Chunhui, JIAO Jian, WANG Miaomiao, SONG Shangwei, ZHENG Xianbo, BAI Tuanhui. Gene identification and expression analysis of apple PIN family in adventitious root formation[J]. *Journal of Fruit Science*, 2023(09 vo 40): 1789-1799.
- [20] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular biology and evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [21] BAILEY T L, WILLIAMS N, MISLEH C, LI W W. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs[J]. *Nucleic acids research*, 2006, 34(suppl\_2): W369-W373.
- [22] CHENG X, HE Q, TANG S, WANG H, ZHANG X, LV M, LIU H, GAO Q, ZHOU Y, WANG Q, OTHERS. The miR172/IDS1 signaling module confers salt tolerance through maintaining ROS homeostasis in cereal crops[J]. *New Phytologist*, 2021, 230(3): 1017-1033.
- [23] QING C, DU L Y, WEN M, NIU R Y, WU B wei, GUO L jian, MENG M, LIU X L, ZHAO H xian. The miR164-TaNAC14 module regulates root development and abiotic-stress tolerance in wheat seedlings[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, 22(4): 981-998.
- [24] YUAN W, SUO J, SHI B, ZHOU C, BAI B, BIAN H, ZHU M, HAN N. The barley miR393 has multiple roles in regulation of seedling growth, stomatal density, and drought stress tolerance[J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2019, 142: 303-311.
- [25] YANG Z, JIN H, CHEN J, LI C, WANG J, LUO J, WANG Z. Identification and Analysis of the AP2 Subfamily Transcription Factors in the Pecan (*Carya illinoensis*)[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13568. DOI:10.3390/ijms222413568.
- [26] ZHU P, CHEN Y, ZHANG J, WU F, WANG X, PAN T, WEI Q, HAO Y, CHEN X, JIANG C, OTHERS. Identification, classification, and characterization of AP2/ERF superfamily genes in Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.)[J]. *Scientific reports*, 2021, 11(1): 5441.
- [27] ZHANG H, PAN X, LIU S, LIN W, LI Y, ZHANG X. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors in pineapple reveals functional divergence during flowering induction mediated by ethylene and floral organ development[J]. *Genomics*, 2021, 113(2): 474-489.
- [28] ZENG D, SILVA J A T da, ZHANG M, YU Z, SI C, ZHAO C, DAI G, HE C, DUAN J. Genome-wide identification and analysis of the APETALA2 (AP2) transcription factor in *Dendrobium officinale*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5221.
- [29] ZHOU L, YARRA R. Genome-wide identification and characterization of AP2/ERF transcription factor family genes in oil palm under abiotic stress conditions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6): 2821.
- [30] ITO T M, POLIDO P B, RAMPIM M C, KASCHUK G, SOUZA S G H. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the AP2/ERF gene superfamily in sweet orange (*Citrus sinensis*)[J/OL]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(3): 7839-7851. DOI:10.4238/2014.September.26.22.
- [31] ZHANG Linggong, LING Xiequan, YE Zeling, XU Yiqing, ZOU Shuangquan, ZOU Xiaoxing. Identification of AP2 gene family members and their expression patterns under salt stress in gardenia [J]. *Journal*

of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2023, 52(04): 457-465.

[32] TIAN Mingkang, XU Zhixiang, LIU Xiuqun, SUI Shunzhao, LI Mingyang, LI Zhineng. Identification of AP2 subfamily transcription factors and CpAP2-L11 function in *Prunus wax* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(02): 382-396. DOI:10.16420/j.issn.0513-353x.2021-1114.

[33] KONG Q, LOW P M, LIM A R, YANG Y, YUAN L, MA W. Functional antagonism of WRI1 and TCP20 modulates GH3. 3 expression to maintain auxin homeostasis in roots[J]. *Plants*, 2022, 11(3): 454.

[34] ZHUO W, CHEN Q, LUO Y, YANG S, LU L, LI L, OTHERS. Cloning, construction of expression vector and expression analysis of the ethylene-responsive factor ERF gene NtTOE3 in *Nicotiana tabacum*. [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, 38(5): 733-740.

[35] LI J, CHEN F, LI Y, LI P, WANG Y, MI G, YUAN L. ZmRAP2. 7, an AP2 transcription factor, is involved in maize brace roots development[J]. *Frontiers in plant science*, 2019, 10: 453067.

[36] MENG L S, WANG Y B, YAO S Q, LIU A. Arabidopsis AINTEGUMENTA mediates salt tolerance by trans-repressing SCABP8[J]. *Journal of Cell Science*, 2015, 128(15): 2919-2927.

[37] MENG L S, WANG Z B, YAO S Q, LIU A. The ARF2-ANT-COR15A gene cascade regulates ABA-signaling-mediated resistance of large seeds to drought in Arabidopsis[J]. *Journal of cell science*, 2015, 128(21): 3922-3932.