

木薯 *MeAHL17* 基因的克隆及表达分析

张亚文^{1,2,3}, 王晓彤^{1,2,3}, 张兴龙^{1,2,3}, 唐湘宁^{1,2,3}, 刘 姣^{2,3*}, 郭建春^{2,3*}

1. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/海南热带农业资源研究院/海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572000

摘 要: AT-hook 核定位蛋白 (AT-hook nuclear localized proteins, AHLs) 是一种小的 DNA 结合蛋白基序, 在植物的生长发育、器官构建、逆境胁迫与激素信号应答等方面发挥重要作用。本研究从华南 8 号木薯 (SC8) 中克隆获得 *MeAHL17* 基因, 利用生物信息学方法对 *MeAHL17* 基因进行启动子分析、蛋白理化性质分析、保守功能域的预测和序列比对。结果表明: *MeAHL17* 基因的开放阅读框长度为 939 bp, 编码一个具有 312 个氨基酸的蛋白, 其理论等电点为 6.89, 分子式为 $C_{1420}H_{2215}N_{415}O_{451}S_{11}$, 分子量为 32.669 38 kDa, 带正电荷氨基酸残基总数 (Lys+Arg) 为 23, 带负电荷氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 24, 脂肪系数为 57.47, 总平均亲水性系数 (GRAVY) 为 -0.491, 不稳定系数为 58.06; 该蛋白不含有信号肽, 位于细胞膜内, 无跨膜结构, 含有 5 个糖基化位点和 45 个磷酸化位点, 是一个不稳定的亲水性酸性蛋白; *MeAHL17* 蛋白包含 AT-hook 保守核心序列和 PPC 结构域的保守核心序列, 符合 AT-hook 家族的典型结构特征。通过亚细胞定位和转录活性分析实验证明 *MeAHL17* 是一个定位于细胞核且具有转录活性的转录因子。组织表达模式分析表明, *MeAHL17* 基因主要在体胚、须根和愈伤组织中表达。不同激素处理表明, *MeAHL17* 基因受到乙烯 (ACC)、茉莉酸甲酯 (JA) 和生长素 (IAA) 等激素的诱导表达, 推测其可能参与了乙烯、茉莉酸甲酯和生长素信号途径。非生物胁迫处理表明, *MeAHL17* 基因响应干旱和盐胁迫。本研究初步确定了木薯 *MeAHL17* 基因在生长发育、激素信号和逆境胁迫等方面具有重要的作用, 为进一步研究其功能提供理论依据和参考。

关键词: 木薯; *MeAHL17*; 基因克隆; 亚细胞定位; 转录活性分析; 表达模式分析

中图分类号: S31 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *MeAHL17* Gene in Cassava

ZHANG Yawen^{1,2,3}, WANG Xiaotong^{1,2,3}, ZHANG Xinglong^{1,2,3}, TANG Xiangning^{1,2,3}, LIU Jiao^{2,3*}, GUO Jianchun^{2,3*}

1. School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: AT-hook nuclear localized proteins (AHLs) are small DNA-binding protein motifs that play an important role in plant growth and development, organ construction, stress and hormone signaling response. In this study, *MeAHL17* was cloned from cassava cultivar SC8. Bioinformatics methods were used to analyze *MeAHL17* promoter, protein physicochemical properties, prediction of conserved functional domain and sequence comparison. The results showed that the open reading frame length of *MeAHL17* gene was 939 bp, encoding a protein with 312 amino acids, its theoretical isoelectric point was 6.89, its molecular formula was $C_{1420}H_{2215}N_{415}O_{451}S_{11}$, and its molecular weight was 32.669 38 kDa.

收稿日期 2023-10-11; 修回日期 2023-12-10

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32001602); 海南省自然科学基金项目 (No. 323MS087); 现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-11-HNGJC)。

作者简介 张亚文 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 木薯分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 刘 姣 (LIU Jiao), E-mail: liujiao@itbb.org.cn; 郭建春 (GUO Jianchun), E-mail: guojianchun@itbb.org.cn。

The total number of positively charged amino acid residues (Lys+Arg) was 23, the total number of negatively charged amino acid residues (Asp+Glu) was 24, the fat coefficient was 57.47, the total average hydrophilic coefficient (GRAVY) was -0.491 and the instability coefficient was 58.06. The protein contains no signal peptide, is located in the cell membrane, has no transmembrane structure, contains 5 glycosylation sites and 45 phosphorylation sites, and is an unstable hydrophilic acidic protein. MeAHL17 contained AT-hook conserved core sequences and PPC domain conserved core sequences, which was consistent with the typical structural characteristics of AT-hook family. Through subcellular localization and transcriptional activity analysis experiments, MeAHL17 was proved to be a nucleus localized transcription factor with transcriptional activity. Tissue expression pattern analysis showed that MeAHL17 was mainly expressed in somatic embryo, fibrous root and callus. Different hormone treatments showed that MeAHL17 was induced by ethylene (ACC), methyl jasmonate (JA) and growth hormone (IAA), which suggested that MeAHL17 might be involved in ethylene, methyl jasmonate and growth hormone signaling pathway. Abiotic stress treatment showed that MeAHL17 was responsive to drought and salt stress. This study preliminarily identified the important role of MeAHL17 in growth and development, hormone signaling and stress, and provided theoretical basis and reference for further study of its function.

Keywords: cassava; MeAHL17; gene cloning; subcellular localization; transcriptional activity analysis; expression pattern analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.07.001

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是大戟科 (Euphorbiaceae)、木薯属 (*Manihot*) 植物, 是世界三大薯类 (甘薯、马铃薯、木薯) 和六大粮食作物 (小麦、水稻、玉米、马铃薯、大麦、木薯) 之一, 广泛种植于非洲、美洲和亚洲 100 多个国家的热带和亚热带地区^[1-2]。木薯虽然具有许多生物学优势, 比如耐贫瘠、抗旱和产量高等^[3], 但持续干旱、盐毒害和低温等不利条件均可能导致木薯长势不佳和低产^[4-5]。AT-hook 核定位蛋白 (AT-hook nuclear localized proteins, AHLs) 在植物的生长发育、器官构建、逆境胁迫和激素信号应答等方面发挥重要作用^[6]。因此, 研究 AT-hook 基因对木薯品种改良具有重要意义。

目前, AHL 基因家族已在多个物种中进行了全基因组鉴定和分析, 从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中鉴定出 29 个 AHLs^[7], 水稻 (*Oryza sativa*) 有 20 个 AHLs^[8], 高粱 (*Sorghum bicolor*) 有 22 个 AHLs^[9], 玉米 (*Zea mays*) 有 37 个 AHLs^[10], 分别从雷蒙德氏棉 (*Gossypium raimondii*)、亚洲棉 (*Gossypium arboreum*) 和陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 中各鉴定出 48、51 和 99 个 AHLs^[11], 大豆 (*Glycine max*) 基因组中鉴定出 63 个 AHLs^[12], 葡萄 (*Vitis vinifera*) 中鉴定出 14 个 AHLs^[13], 花生 (*Arachis hypogaea*) 中鉴定出 64 个 AHLs^[14], 胡萝卜 (*Daucus carota*) 中鉴定出 47 个 AHLs^[15], 毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 中鉴定出 37 个 AHLs^[16], 甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 中鉴定出 122 个 AHLs^[17], 近一年来又相继在核桃 (*Juglans regia*)、鹅掌楸 (*Liriodendron*

chinense)、芜菁 (*Brassica rapa*) 和番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中各鉴定出 37、21、42 和 18 个 AHLs^[18-21]; 随着对植物中 AHLs 基因的研究不断积累, AHLs 已被证明可以调控多种生长发育过程, 包括花发育^[22]、下胚轴伸长^[23-24]、花粉发育和育性^[25-26]、玉米穗发育^[27]、维管组织分化^[28], 调节开花时间^[29-31]以及叶片衰老调节^[32]等。AHLs 也参与了植物对生物和非生物胁迫的反应, 包括增强抗旱性^[33-34]和调节植物抵抗病原微生物入侵的能力^[35-36]。AHLs 还参与调节初级代谢^[37]、调节赤霉素^[38]的稳态以及调控茉莉酸和生长素相关基因的表达^[33, 39-40]。尽管 AHL 基因家族有如此广泛的作用, 但对其功能的了解还不够全面和系统化, 依旧值得继续探索。

虽然已有研究表明 MeAHL17 在抗木薯细菌性枯萎病 (cassava bacterial blight, CBB) 中具有积极作用^[41], 但是该基因在其他激素信号应答与逆境胁迫等方面作用的机制还未知, 依旧值得继续探索。本研究通过克隆木薯 MeAHL17 基因, 并对其进行生物信息学分析、亚细胞定位、转录活性分析和表达模式分析, 为进一步研究 MeAHL17 参与木薯生长发育、逆境胁迫和激素信号应答等方面的功能提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 华南 8 号 (SC8) 木薯采自国家木薯种质资源圃; 本生烟由本实验室提供。

质粒和菌株: pCambia1300-35S-GFP 和

pGBKT7 载体质粒由本实验室提供；大肠杆菌菌株 DH5α、根癌农杆菌菌株 GV3101 和酵母菌株 AH109 购自上海唯地生物技术有限公司。

试剂：多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（Plant Total RNA Isolation Kit Plus）购自成都福际生物技术有限公司；RNA 反转录试剂盒（MonScript™ RTIII ALL-in-One Mix）和 qPCR 试剂（MonAmp™ ChemoHS qPCR Mix）购自莫纳生物科技有限公司；LA *Taq*® 高保真酶和 pMDTM 19-vector 购自 TaKaRa 公司；质粒 DNA 小量抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和 T₄ DNA 连接酶购自生工生物工程（上海）股份有限公司；限制性内切酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司；MES 和乙酰丁香酮（AS）购自北京索莱宝科技有限公司；六水合氯化镁购自西陇化工科技有限公司。

引物：本研究引物均由北京擎科生物科技有限公司合成，引物信息见表 1。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
MeAHL17-F	ATGAAAGGTGAATATGTAGAGGCA
MeAHL17-R	TCAGTAGGGCGGTGGTGG
BD-AHL17-F	GGCCGAATTCCTCGGGGATCCATGAAAGG
BD-AHL17-R	TGAATATGTAGAGGC TGCGGCCGTGCAGGTCGACTCAGTAGG GCGGTGGT
AHL17-F(<i>Sal</i> I)	CGTCGACATGAAAGGTGAATATGTAG
AHL17-R(<i>Bam</i> H I)	TAGGATCCGTAGGGCGGTGGTGCC
1300-F	TTTGAGAGAACACGGGGGA
1300-R	CAGGGTCAGCTTGCCGTAG
BD-F	GTGCGACATCATCGGAAG
BD-R	CCGGAATTAGCTTGGCTGC
Tublin-F	ATGCGGTTCTTGATGTTGTTTC
Tublin-R	TCGGTGAAGGAATACAGAGA
q-MeAHL17-F	CAGATCGTGGGTGGGTTTGT
q-MeAHL17-R	GACACAGACGAGACTGACC

1.2 方法

1.2.1 *MeAHL17* 基因的克隆 以 SC8 组培苗作为提取 RNA 的材料，用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取木薯总 RNA，取 4~6 μL 总 RNA 样品用 1%浓度的琼脂糖胶检测其质量，用超微量分光光度计检测其浓度。用 MonScript™ RTIII ALL-in-One Mix 试剂盒进行反转录获得 cDNA，用于基因扩增。利用 phytozome 网站（<https://phytozome.jgi.doe.gov>）查找到 *MeAHL17* 序列（Manes. 02G145600）后，于 NCBI 数据库 Primer-BLAST

设计 *MeAHL17* 的扩增引物（*MeAHL17*-F/*MeAHL17*-R，表 1），以反转录后所得 cDNA 为模板，PCR 扩增 *MeAHL17* 编码区片段。反应体系：LA *Taq* 0.5 μL，10×LA PCR Buffer 5 μL，dNTP Mixture 8 μL，上下游引物各 1 μL，模板 2 μL，加 ddH₂O 补至 50 μL。反应程序为：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，循环 35 次；72 ℃ 延伸 10 min；16 ℃ 保存。取 3 μL PCR 产物，用 1%的琼脂糖胶检测目的条带，再进行产物纯化，用 pMDTM 19-vector 试剂将 pMD19-T 载体和 *MeAHL17* 基因片段连接，按照唯地生物的 DH5α Chemically Competent Cell 的说明书进行转化，随机挑取多个菌斑进行 PCR 检测并扩大培养，选取 3 个阳性克隆送至楠山生物技术有限公司进行测序验证后，用质粒小量快速提取试剂盒提取 pMD19T-*MeAHL17* 质粒。

1.2.2 生物信息学分析 使用如表 2 所示的在线分析软件对 *MeAHL17* 进行生物信息学分析。

表 2 生物信息学分析网址

Tab. 2 Website of bioinformatics analysis

作用 Effect	网址 Website
启动子分析	https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/
保守结构域预测	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/
磷酸化位点预测	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1
糖基化位点预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
亲疏水性预测	https://web.expasy.org/protscale/
理化性质预测	https://web.expasy.org/protparam/
跨膜结构域、信号肽分析	http://wlab.ethz.ch/protter/

1.2.3 亚细胞定位 以 pMD19T-*MeAHL17* 载体质粒为模板，通过设计引物 AHL17-F（*Sal* I）/AHL17-R（*Bam*H I）对其进行 PCR 扩增；pCAMBIA1300-GFP 载体质粒用 *Sal* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶对其进行双酶切；纯化 PCR 产物和酶切后的载体质粒；利用 T₄ DNA 连接酶将 pCAMBIA1300-GFP 载体与 *MeAHL17* 基因片段连接，转化 DH5α 并扩大培养后，提取质粒，取 4 μL pCAMBIA1300-*MeAHL17*-GFP 质粒和 pCAMBIA1300-GFP 空载质粒转化 GV3101 感受态细胞，随机挑取多个菌斑进行 PCR 检测（引物为 1300-F/1300-R）并扩大培养，将含有 pCAMBIA 1300-*MeAHL17*-GFP 质粒和 pCAMBIA1300-GFP 空载质粒的农杆菌注射至烟草叶片中瞬时表达，

培养 48~72 h 后用 DAPI 染料染色 10 min, 用清水清洗 5~8 次后, 于激光共聚焦显微镜下观察荧光。

1.2.4 转录活性分析 设计同源重组引物 BD-AHL17-F/BD-AHL17-R, 并以 pMD19T-MeAHL17 载体质粒为模板进行扩增; 利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 对 pGBKT7 载体进行双酶切, 纯化 PCR 产物和酶切后的载体后, 利用同源重组酶将 pGBKT7 载体与 MeAHL17 基因片段连接, 转化 DH5 α 并扩大培养后, 提取质粒, 取 4 μ L pGBKT7-MeAHL17、pGBKT7-p53+pGADT7-largeT (阳性对照) 和 pGBKT7 (阴性对照) 转化 AH109 感受态细胞, PCR 检测 (引物为 BD-F/BD-R) 后, 扩大培养至 OD₆₀₀ 约 0.7, 稀释后各取 5 μ L 菌液点到 SD/-Trp/X- α -gal 固体缺陷培养基上, 观察酵母菌的生长情况。

1.2.5 MeAHL17 基因表达模式分析 (1) MeAHL17 在不同组织器官的表达模式分析。将 SC8 的愈伤、体胚、嫩叶、成熟叶、茎、须根、块根、块根韧皮部和块根木质部等 9 个组织进行转录组测序, 根据测序结果提取 MeAHL17 的 FPKM 值 (每千个碱基的转录每百万映射读取的片段) 进行不同组织的表达模式分析。

(2) MeAHL17 在不同块根发育时期的表达模式分析。将 SC8 的块根形成期 (种植后 80 d)、块根膨大期 (种植后 130、180 d) 和块根成熟期 (种植后 230、280 d) 的块根进行转录组测序, 根据测序结果提取 MeAHL17 的 FPKM 值进行木薯块根不同发育时期的表达模式分析。

(3) MeAHL17 在不同激素处理下的表达模式分析。以 MS 培养基上生长 8 周左右的生长状态良好且一致的木薯组培苗为对象, 用 100 μ mol/L 脱落酸 (ABA)、100 μ mol/L 茉莉酸甲酯 (MeJA)、100 μ mol/L 乙烯前体 (ACC) 和 100 μ mol/L 生长素 (IAA) 溶液喷洒木薯的根、茎、叶, 进行外源激素处理 0、6、12、24 h, 每个样品 3 个重复。提取样品 RNA 并反转录为 cDNA, 将 cDNA 稀释 10 倍作为模板, 以 β -Tublin 为内参基因, 对 MeAHL17 基因进行实时荧光定量 PCR。反应体系: MonAmpTM ChemoHS qPCR Mix 5 μ L, 上、下游引物各 0.2 μ L, DNA 模板 1 μ L, Nuclease-Free Water 3.6 μ L; 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s 作溶解曲线。每个样品设置 3 个重复, 表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算相

对表达量。

(4) MeAHL17 在不同胁迫处理下的表达模式分析。用 20% 的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 溶液模拟干旱胁迫处理; 用 300 mmol/L 的氯化钠 (NaCl) 溶液进行盐胁迫处理; 将木薯放置到 4 $^{\circ}$ C 的培养房中进行低温胁迫处理。分别处理 0、12、24、48 h, 每个样品 3 个重复, 后续实验操作同 1.2.5- (3)。

2 结果与分析

2.1 MeAHL17 基因的克隆

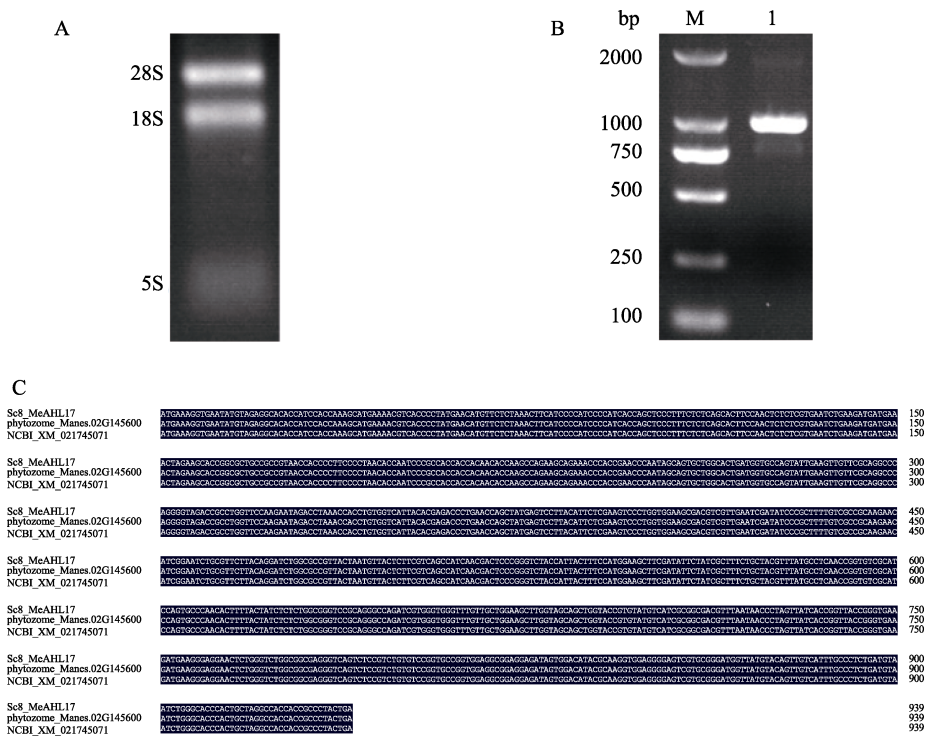
本研究从 SC8 组培苗中提取总 RNA, 并用 1% 浓度的琼脂糖胶检测其质量, 胶图显示质量好 (图 1A)。反转录成 cDNA 后, 以其为模板 PCR 扩增出 MeAHL17 编码区序列, 获得全长 939 bp 的目的基因 (图 1B)。为验证得到的 MeAHL17 序列的准确性, 将扩增的 MeAHL17 编码区序列与将 pMD19-T 载体进行连接并测序, 测序结果发现, 扩增获得的基因序列与 NCBI 数据库中 LOC110606315 对应的基因序列和木薯数据库中 Manes.02G145600 对应的基因序列完全一致, 说明成功得到目的基因 MeAHL17 (图 1C)。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 MeAHL17 基因启动子分析 通过在线网站 Plantcare 对 MeAHL17 的启动子进行顺式作用元件分析发现, MeAHL17 基因启动子的顺式作用元件除了核心元件 TATA-box 与 CAAT-box 外, 还包括脱落酸、水杨酸和茉莉酸甲酯等激素响应元件, 低温响应元件和光响应元件等 (表 3)。

2.2.2 MeAHL17 蛋白理化性质分析 通过在线网站 ProtParam 对 MeAHL17 蛋白理化性质进行分析, 结果发现, MeAHL17 蛋白由 312 个氨基酸组成, 理论等电点为 6.89, 分子式为 C₁₄₂₀H₂₂₁₅N₄₁₅O₄₅₁S₁₁, 分子量为 32 669.38 kDa, 带正电荷氨基酸残基总数 (Lys+Arg) 为 23, 带负电荷氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 24, 脂肪系数为 57.47, 总平均亲水性系数 (GRAVY) 为 -0.491, 不稳定系数为 58.06, 结合亲水性预测结果 (图 2A) 表明, MeAHL17 蛋白是一个亲水性的、不稳定的酸性蛋白。

对 MeAHL17 蛋白进行糖基化位点和磷酸化位点预测, 结果显示, MeAHL17 蛋白有 5 个糖基化位点 (图 2B) 和 45 个磷酸化位点 (图 2C), 包括 Tyr (18 个)、Ser (24 个)、Thr (3 个), 说明木薯 MeAHL17 蛋白活性的调控可能与磷酸化



A: 木薯总 RNAs; B: 目的基因克隆, M: DL2000 DNA marker; C: *MeAHL17* 基因序列比对。
A: Total RNAs of cassava; B: Target gene cloning, M: DL2000 DNA marker; C: *MeAHL17* gene sequence alignment.

图 1 *MeAHL17* 基因克隆
Fig. 1 Cloning of *MeAHL17*

表 3 *MeAHL17* 基因启动子顺式作用元件分析
Tab. 3 Cis acting element analysis of promoter of *MeAHL17*

顺式作用元件 Cis acting element	功能 Function	数量 Quantity
ABRE	脱落酸响应元件	1
ARE	厌氧诱导必需元件	3
Box 4, G-Box, GATA-motif I-box, TCCC-motif, TCT-motif	光响应元件	11
CGTCA-motif, TGACG-motif	茉莉酸甲酯响应元件	2
LTR	低温响应元件	1
TCA-element	水杨酸响应元件	3
WUN-motif	创伤反应元件	2

修饰有关。通过 Protter 软件对 *MeAHL17* 进行蛋白结构分析,发现 *MeAHL17* 不含有信号肽,位于细胞膜内,无跨膜结构(图 2D)。

2.2.3 *MeAHL17* 蛋白保守功能域的预测和序列比对 通过 NCBI 网站对 *MeAHL17* 蛋白的保守功能域进行预测发现,该蛋白包含 AHL 基因家族特有的 DUF296 保守结构域,即 PPC 结构域(图 3);将木薯 *MeAHL17* 与其他物种中同源性较高的 AHL 蛋白进行序列比对,发现所有蛋白序列具有高度保守性,且包含 AT-hook 保守核心序列和包含 PPC 结构域的保守核心序列(图 4),说明

MeAHL17 是一个 AHL 基因。

2.3 亚细胞定位

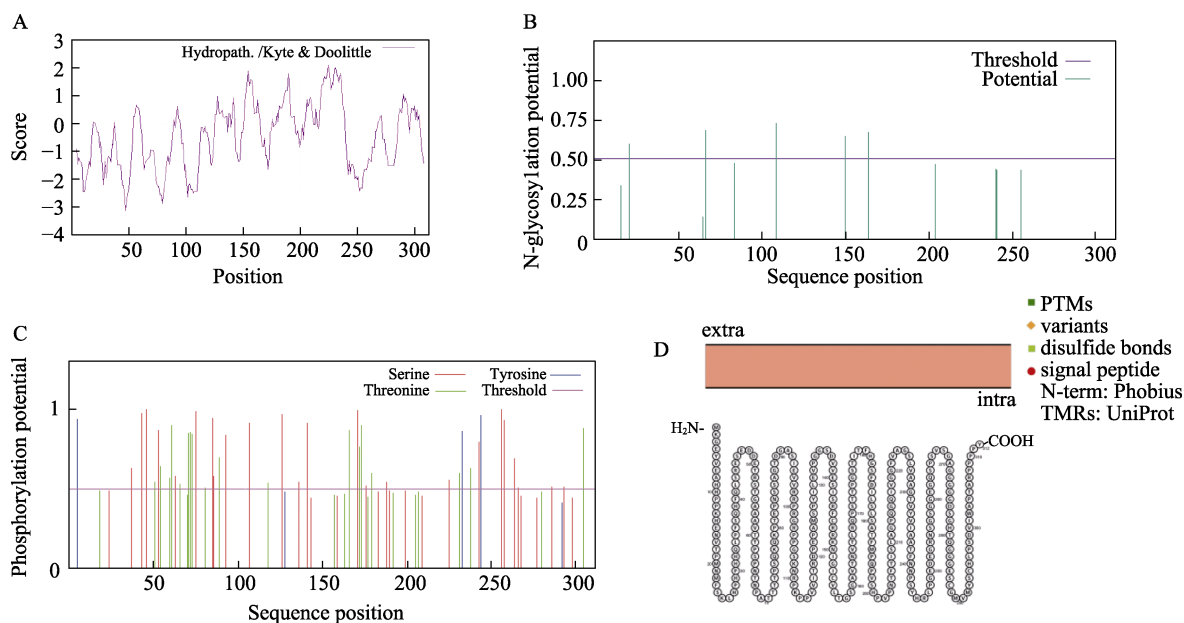
将 GV3101/pCambia1300-*MeAHL17*-GFP 和 GV3101/pCambia1300-GFP 活化集菌后,利用侵染液将菌体重悬,然后注射烟草叶片进行瞬时表达。结果如图 5 所示,*MeAHL17* 定位在细胞核。

2.4 转录活性分析

将 pGBKT7-*MeAHL17*、pGBKT7-p53+pGADT7-largeT (阳性对照)和 pGBKT7 (阴性对照)质粒分别转化至 AH109 酵母感受态后,点到 SD/-Trp/X-α-gal 固体缺陷培养基上,发现 pGBKT7-*MeAHL17* 在 SD/-Trp/X-α-gal 固体缺陷培养基上与阳性对照一样变蓝,而阴性对照未变蓝(图 6),说明 *MeAHL17* 是转录因子且具有转录活性。

2.5 *MeAHL17* 基因表达模式分析

2.5.1 *MeAHL17* 在不同组织器官的表达模式分析 根据实验室已有的 SC8 木薯的转录组数据,对 *MeAHL17* 进行表达模式分析,发现该基因在木薯不同组织表达量差异显著,其中,*MeAHL17* 在体胚的表达量最高,其次是须根、愈伤和块根韧皮部,在块根和茎中表达量较低,其余组织几乎不表达(图 7)。



A: 亲疏水性分析; B: 糖基化位点预测; C: 木薯 MeAHL17 蛋白结构绘制图; D: 磷酸化位点预测。

A: Analysis of hydrophilicity and hydrophobicity; B: Prediction of glycosylation sites; C: Structural map of cassava MeAHL19 protein; D: Prediction of phosphorylation sites.

图 2 MeAHL17 蛋白理化性质分析

Fig. 2 Analysis of physical and chemical properties of MeAHL17

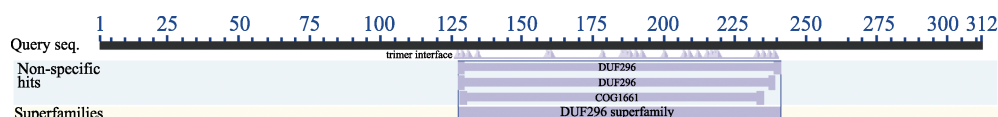


图 3 MeAHL17 蛋白保守结构域示意图

Fig. 3 Schematic maps of MeAHL17 protein conserved domain

MeAHL17	MKGEYVEAHHPKHEENVTP...MNFESKLHPHP...HHOLFPSOHLFSRES...EDDE...TRSTG.AAAVTPS.PNTNPATTT	72
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_199781	MKGEYREQ...KSNE...MFSKLPHHQ...QQQQQQHSLTSHFLS...STVTPT	46
<i>Jatropha curcas</i> XP_012067986	MKGEYVEAQHHHQQKHEENTANFESKLQSHHH...HHQHHLPFSOHLFSRES...EDDD...TRSTGAAAVTPSTAAAAAAAI	82
<i>Citrus sinensis</i> XP_006472999	MKSDYVVEPKN.ANSQT...MFSKLHHQ...QQHHFPFSOHLFSRES...QASE...EDTSHNSPVTTPPTTNPAAAAAK	70
<i>Capsicum annuum</i> XP_016569035	MKGEYVLEERKDHSSSTSNKNTMFGKLHHHPHPPHPPHQQQQSPNQNLHLHHQHQGGFHHPAFQLTRECQTSSEADSTVHRMSPAERNPLNP	100
<i>Raphanus sativus</i> KAJ4906124	MKGE...GNE...MFKLP...QNHSLSHFNLP...ATIT	29
<i>Lactuca sativa</i> XP_052623289	MKGEY...REDKGSRPSS.TMFSEKQHH...HHQAAQQTTPPOHFAITSHQ...FQLS...NTSEADSRSR	60
<i>Zea mays</i> PWZ14487	MKGEY...MDVPP...VHSTTPPPP...COQQHGHGGHGGQKLERFS...DEVDSRLS	43
<i>Pisum sativum</i> KAJ5404464	MKGEYVDQHSK.LHQSLQ...LOSQTQNNP...FLPFLSLHHECQTV...GEDD.NRSGG	51
<i>Salix purpurea</i> KAJ6685662	MKGEYVEHQQS.KHENTPT...MFSKLHSHR...QQHCHLPFSLPQFSRES...EEDD...TRSTG...ADAT	59
AT-hook 核心区		
MeAHL17	TPSQKQK...PTEPNSSAGTDCASIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	167
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_199781	TPSQKQK...VDDSSIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEAINRFRCKRSIGICVLGSGGANVIL	125
<i>Jatropha curcas</i> XP_012067986	TPSQKQK...PIEPNSSGGTDCATIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	177
<i>Citrus sinensis</i> XP_006472999	SRQQQQQQQLQEPPTTG.CDCAITIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEITSNFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	167
<i>Capsicum annuum</i> XP_016569035	QPVNAIAPPQQQEPSTAGNDGATIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	198
<i>Raphanus sativus</i> KAJ4906124	SPNDAITPTQTKDVSTTVNDGATIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	108
<i>Lactuca sativa</i> XP_052623289	AEQKEPASGALVVSVGGGDCASIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	158
<i>Zea mays</i> PWZ14487	AAAQK...PNSSG.DCATIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	143
<i>Pisum sativum</i> KAJ5404464	PATQKQK...LSEPNISGGTDCATIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	139
<i>Salix purpurea</i> KAJ6685662	PATQKQK...LSEPNISGGTDCATIEVVRIRGRPPGSKNPKPPVILTRDPEPA...MSPVILVPGGSDVVEISIRFCRRKNIGICVLGSGGANVIL	154
PPC 核心区		
MeAHL17	RQPS.TTEPGST...ITPESFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	255
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_199781	RQPS.PAALGST...ITPESFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	218
<i>Jatropha curcas</i> XP_012067986	RQPS.TTEPGST...ITPESFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	265
<i>Citrus sinensis</i> XP_006472999	RQPS.ATPGST...ITPESFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	256
<i>Capsicum annuum</i> XP_016569035	RQPS.TTPAST...VTHCRFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	291
<i>Raphanus sativus</i> KAJ4906124	RQPS.PAARGST...ITPESFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	203
<i>Lactuca sativa</i> XP_052623289	RQPS.TTPGAT...VTHCRFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	251
<i>Zea mays</i> PWZ14487	RQPS.TTPGAT...VTHCRFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	243
<i>Pisum sativum</i> KAJ5404464	RQPS.TTPGAT...VTHCRFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	229
<i>Salix purpurea</i> KAJ6685662	RQPS.TTPGAT...VTHCRFDILSISATNLP...VSHVPVNTITSLAGPQGLVGGVAGCTVVAAGTIVVAATENNFSYHRLFEDEGRN..	242
SGSGG...EGQSPSVS...GAGGGGDSCHTQGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...		
MeAHL17	SGSGG...EGQSPSVS...GAGGGGDSCHTQGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	311
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_199781	SAGTGER...EGQSPSVS...GGGEGSGMAGSGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	276
<i>Jatropha curcas</i> XP_012067986	SGSGG...EGQSPSVS...GAGGGGDSCHTQGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	300
<i>Citrus sinensis</i> XP_006472999	TSVSAGG...EGQSPSVS...GGGEGSGMAGSGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	323
<i>Capsicum annuum</i> XP_016569035	SGSGG...EGQSPSVS...GAGGGGDSCHTQGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	352
<i>Raphanus sativus</i> KAJ4906124	SARKGEG...EGQSPSVS...GGGEGSGMAGSGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	263
<i>Lactuca sativa</i> XP_052623289	NSGGGTGSAASDQSPA...GAGGGGDSCHTQGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	317
<i>Zea mays</i> PWZ14487	SVLSAGSGDPADEHRRGHQHPVPEPPPRRHRPHVGRKPAHPLASALVPEPGPPAIPYAAHPQPDVMEPPARPPPPPP...	333
<i>Pisum sativum</i> KAJ5404464	SVSGG...EGQSPSVS...GAGGGGDSCHTQGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	281
<i>Salix purpurea</i> KAJ6685662	SGSGG...EGQSPSVS...GAGGGGDSCHTQGG...ESGCMVMSCHLP...SDVWAPARPP...PP...	303

图 4 不同物种的 AHLs 蛋白序列比对

Fig. 4 Alignment of AHLs protein sequences in different species

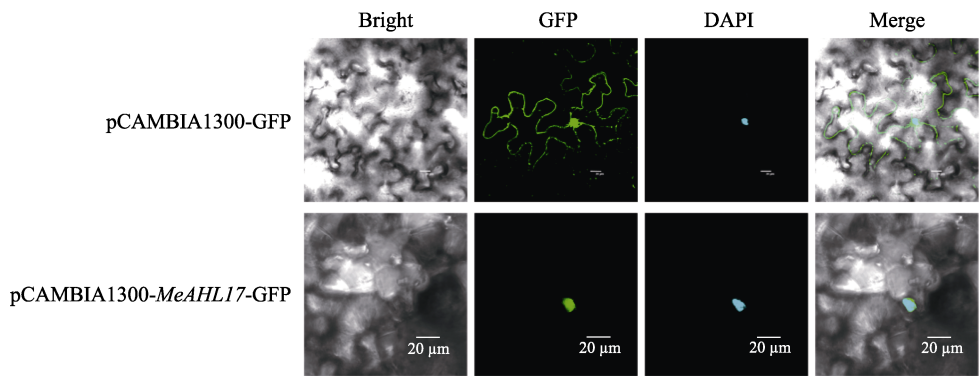


图 5 *MeAHL17* 在烟草叶片中的亚细胞定位
Fig. 5 Subcellular localization of *MeAHL17* in tobacco leaves

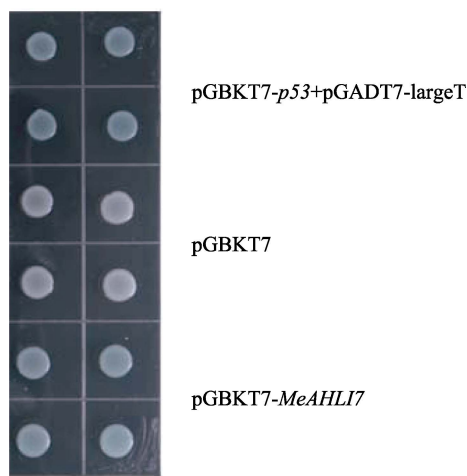


图 6 *MeAHL17* 在酵母中的转录活性
Fig. 6 Transactivation activity of *MeAHL17* protein in yeast

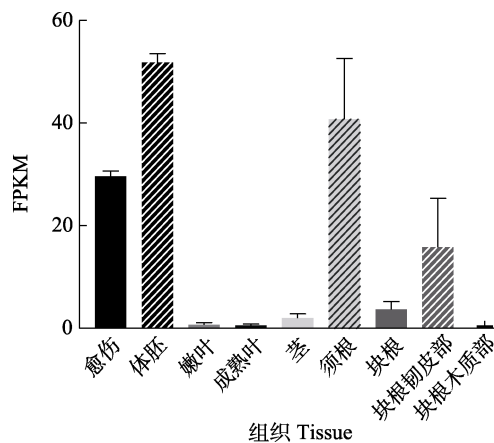


图 7 *MeAHL17* 的组织表达模式分析
Fig. 7 Analysis of tissue expression pattern of *MeAHL17*

2.5.2 *MeAHL17* 在块根发育时期的表达模式分析 在 SC8 木薯块根发育过程中, *MeAHL17* 在木薯种植后 180 d 的块根中表达量最高, 在其他时间段表达量差异不显著 (图 8)。

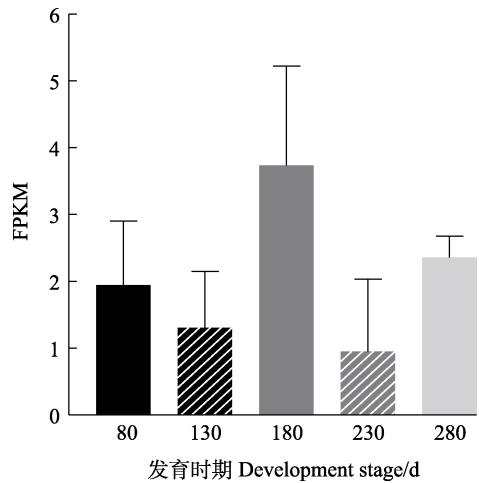
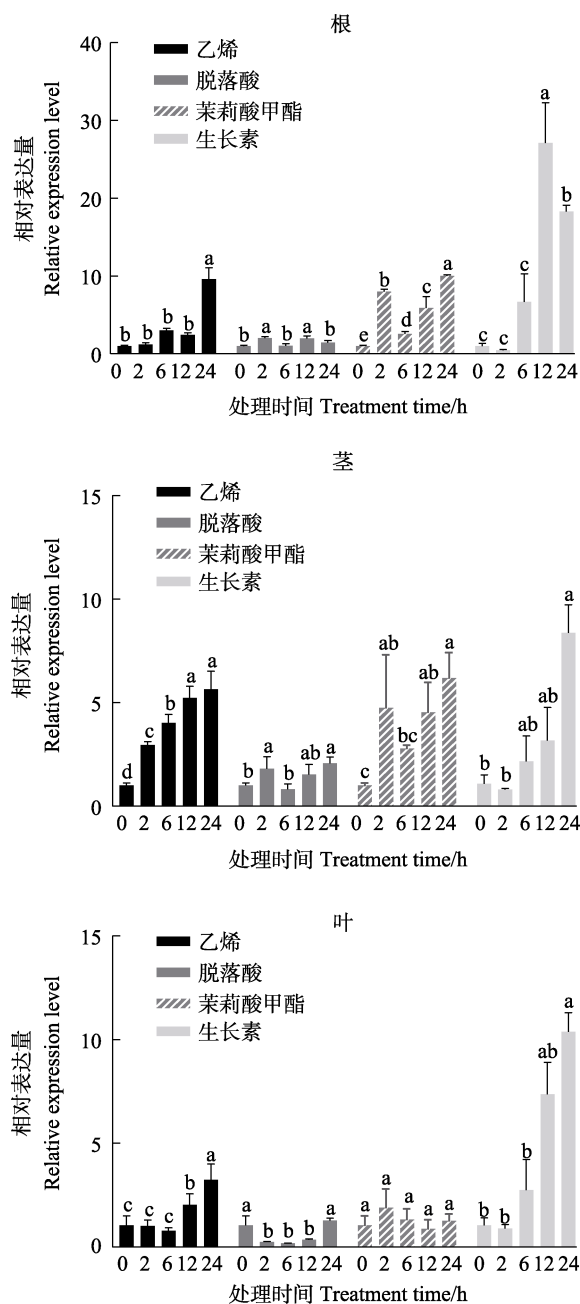


图 8 *MeAHL17* 在木薯块根发育过程中的表达模式分析
Fig. 8 Analysis of expression pattern of *MeAHL17* in cassava storage roots development

2.5.3 *MeAHL17* 在各激素处理下的表达模式分析 由于 *MeAHL17* 基因启动子含有 ABA、MeJA 等响应元件, 为验证 *MeAHL17* 是否在木薯中响应激素胁迫, 通用实时荧光定量 PCR 法分析 *MeAHL17* 在各激素处理下的响应情况。如图 9 所示, *MeAHL17* 可以被外源乙烯前体、茉莉酸甲酯、和生长素诱导, 并且在根、茎和叶中的表达模式略有不同: 施加乙烯前体 (ACC) 后, *MeAHL17* 在茎中的相对表达量随着处理时间的延长逐渐增加, 该基因在根、茎和叶中的相对表达量均在处理后 24 h 达到最高水平, 其相对表达量分别约为 0 h 的 9 倍、5 倍和 3 倍; 施加脱落酸后, *MeAHL17* 的相对表达量在根、茎和叶中略有变化; 施加茉莉酸甲酯后, *MeAHL17* 在根和茎中的相对表达量随着处理时间的延长逐渐增加, 且在处理后 24 h 达到最高水平, 其相对表达量分别约为 0 h 的 10 倍和 6 倍, 但 *MeAHL17* 在叶中不响应外源茉莉



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

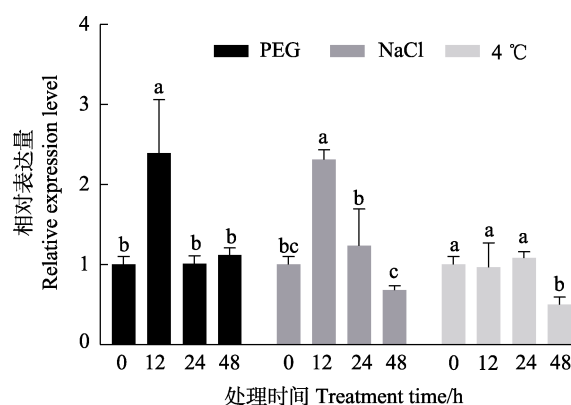
Different lowercase letters indicate significant difference between different treatments ($P < 0.05$).

图 9 *MeAHL17* 在不同组织不同激素处理下的表达模式
Fig. 9 Expression patterns of *MeAHL17* in different tissues under different hormone treatments

酸甲酯的诱导；施加生长素后，*MeAHL17* 在根、茎和叶中的相对表达量随着处理时间的延长逐渐增加，且其在茎和叶中的相对表达量在处理 24 h 达到最高水平，分别约为 0 h 的 8 倍和 10 倍，但 *MeAHL17* 在根中的相对表达量在处理 12 h 达到最高水平，约为 0 h 对照的 27 倍。结果表明，*MeAHL17* 可能参与了乙烯、茉莉酸甲酯、和生长

素信号途径。

2.5.4 *MeAHL17* 在不同胁迫处理下的表达模式分析 为验证 *MeAHL17* 是否在木薯中响应逆境胁迫，通过实时荧光定量 PCR 法分析 *MeAHL17* 在不同胁迫处理下的响应情况。如图 10 所示，在干旱处理下，*MeAHL17* 相对表达量在 12 h 达到最高水平，约为 0 h 的 2 倍，而随着时间的延长，相对表达量回到正常水平；在盐胁迫处理下，*MeAHL17* 相对表达量在 12 h 达到最高水平，约为 0 h 的 2 倍，而随着时间的延长，相对表达量逐渐降低；在低温处理下，*MeAHL17* 相对表达量在 0~24 h 无明显变化，但是在处理 48 h 后 *MeAHL17* 相对表达量降低。结果表明，*MeAHL17* 响应干旱和盐胁迫。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference between different treatments ($P < 0.05$).

图 10 *MeAHL17* 在不同胁迫处理下的表达模式
Fig. 10 Expression patterns of *MeAHL17* under different stress treatments

3 讨论

AT-hook 核定位蛋白是一种小的 DNA 结合蛋白基序，在生物界中广泛存在^[42]，最先是由 GOODWIN 等^[43]在哺乳动物非组蛋白的染色体高迁移率蛋白 HMG-I (Y) 中发现。AT-hook 核定位蛋白主要包含 2 个特殊的保守功能结构域，AT-hook 基序和植物与原核生物保守基序 (plant and Prokaryote conservative, PPC) 结构域，后者也称为 domain of unknown function#296 (DUF296) 结构域^[44-45]。AT-hook 基序是 AT-hook 蛋白结合 DNA 和核定位的重要结构域^[46-47]，其核心序列由 Arg(R)-Gly(G)-Arg(R)-Pro(P) 构成，其中脯氨酸主要负责该序列的稳定性，而精氨酸则是深入到双链 DNA 内部并和 DNA 中富含 AT 碱基的区域相

互作用^[46, 48]; PPC 结构域与 AT-hook 蛋白在细胞核中的定位有关, 该结构域长度约为 120 个氨基酸, 位于 AT-hook 基序的羧基末端, PPC 结构域包含保守的 Gly(G)-Arg(R)-Phe(F)-Glu(E)-Ile(I)-Leu(L)序列^[9, 44, 49]。

本研究成功从华南 8 号木薯中克隆获得 *MeAHL17* 基因, 其编码区序列长 939 bp, 编码 312 个氨基酸。通过对 *MeAHL17* 蛋白理化性质分析发现, *MeAHL17* 蛋白是一个亲水性的、不稳定的酸性蛋白且不含有信号肽和跨膜结构, 与胡冬秀等^[14]和王晓彤等^[50]的研究结果一致。对 *MeAHL17* 蛋白进行糖基化位点和磷酸化位点预测, 结果发现 *MeAHL17* 蛋白有 5 个糖基化位点和 45 个磷酸化位点, 已有研究表明 *AtAHL10* 的 S314 位点磷酸化能在干旱胁迫下调节发育和激素相关基因的表达, 从而对植物的生长发育具有重要的调控作用^[33], 因此推测 *MeAHL17* 蛋白的磷酸化修饰对木薯的生长发育具有重要的调控作用。通过 *MeAHL17* 蛋白保守功能域的预测和与其他物种中已鉴定的且同源性较高的 AHL 蛋白进行序列比对发现, 该蛋白包含 AHL 基因家族特有的 PPC 保守结构域, 且包含 AT-hook 保守核心序列和 PPC 结构域的保守核心序列, 符合 AT-hook 基因家族结构特征^[7]。通过亚细胞定位和转录活性分析实验证明, *MeAHL17* 是一个定位于细胞核且具有转录活性的转录因子。

已有研究表明, *AT-hook* 基因在植物的生长发育、器官构建、逆境胁迫和激素信号应答等方面发挥重要的作用^[6], 如, *AHL18* 通过调节根尖分生组织的伸长和细胞分裂从而参与主根生长和侧根发育^[51]; *AHL22* 通过调控 FT 和 PIF4 的表达来控制开花和下胚轴伸长^[24, 31], AHL 转录因子通过降低 PIFs 与激素信号通路相关基因的结合从而抑制其转录激活来影响叶柄的生长^[52]; *ORE7/ESC* 基因可以延缓茉莉酸甲酯、脱落酸和乙烯激素参与的叶片衰老进程^[32]; *LcAHL* 基因参与了抗干旱胁迫和体细胞胚的发育, 且在体细胞胚发生过程中呈高表达^[19]。在本研究中, 结合 *MeAHL17* 在各激素处理下的表达模式分析和不同组织器官的表达模式分析, 推测 *MeAHL17* 可能通过参与乙烯、茉莉酸甲酯、和生长素信号途径, 从而对植物的生长发育, 尤其是体胚和根的发育发挥重要的调控作用; *MeAHL17* 在不同胁迫处理下的表达模式分析结果表明 *MeAHL17* 对于干旱和盐胁迫有

所响应。以上研究结果为进一步了解 *MeAHL17* 基因在木薯生长发育、器官构建及逆境胁迫与激素信号应答等方面的功能奠定基础。

参考文献

- [1] TEMBO M, MATAA M, LEGG J P, CHIKOTI P C, NTAWURUHUNGA P. Cassava mosaic disease: incidence and yield performance of cassava cultivars in Zambia[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2017, 99(3): 681-689.
- [2] LEBOT V, ATHERTON J, REES A. Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids[M]. Beijing: CABI, 2020.
- [3] OKOGBENIN E, SETTER T L, FERGUSON M, MUTEGI R, CEBALLOS H, OLASANMI B, FREGENE M. Phenotypic approaches to drought in cassava: review[J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 93.
- [4] EL-SHARKAWY M A. Cassava biology and physiology cassava: a crop for sustainable agriculture and food security in developing countries[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56: 481-501.
- [5] 王惠君, 王文泉, 李文彬, 陈新, 卢诚, 黎明, 陈友. 木薯的抗寒性及北移栽栽培技术研究进展综述[J]. *热带作物学报*, 2016, 37(7): 1437-1443.
WANG H J, WANG W Q, LI W B, CHEN X, LU C, LI M, CHEN Y. Research progress on cold resistance of cassava and northward migration cultivation techniques[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(7): 1437-1443. (in Chinese)
- [6] 李津璇, 郭敏, 王加峰, 杨瑰丽. *AT-hook* 基因及其在植物开花调控中的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(27): 77-81.
LI J X, GUO M, WANG J F, YANG G L. Research progress of *AT-hook* genes and their role in plant flowering regulation[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(27): 77-81. (in Chinese)
- [7] 肖朝文. 拟南芥 *AT-hook* 蛋白的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
XIAO C W. Functional study of *AT-hook* protein in *Arabidopsis Thaliana*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009. (in Chinese)
- [8] KIM H B, OH C J, PARK Y C, LEE Y, CHOE S, AN C S, CHOI S B. Comprehensive analysis of *AHL* homologous genes encoding AT-hook motif nuclear localized protein in rice[J]. *Bmb Reports*, 2011, 44(10): 680.
- [9] ZHAO J, FAVERO D S, QIU J, ROALSON E H, NEFF M M. Insights into the evolution and diversification of the *AT-hook* motif nuclear localized gene family in land plants[J]. *Bmc Plant Biology*, 2014, 14(1): 266.
- [10] BISHOP E H, KUMAR R, LUO F, SASKI C, SEKHON R S.

- Genome-wide identification, expression profiling, and network analysis of AT-hook gene family in maize[J]. *Genomics*, 2019, 112(2): 1233-1244.
- [11] ZHAO L, LU Y, CHEN W, YAO J, LI Y, LI Q, PAN J, FANG S, SUN J, ZHANG Y. Genome-wide identification and analyses of the AHL gene family in cotton (*Gossypium*)[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 69.
- [12] WANG M, CHEN B, ZHOU W, XIE L, WANG L, ZHANG Y, ZHANG Q. Genome-wide identification and expression analysis of the AT-hook motif nuclear localized gene family in soybean[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 361.
- [13] LI X, HE H, WANG H, WU X, MAO J. Identification and expression analysis of the AHL gene family in grape (*Vitis vinifera*)[J]. *Plant Gene*, 2021, 26: 100285.
- [14] 胡冬秀, 刘浩, 梁炫强, 吴自明, 方加海. 花生 AT-hook 家族基因的生物信息学分析[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(3): 649-659.
- HU D X, LIU H, LIANG X Q, WU Z M, FANG J H. Bioinformatics analysis of AT-hook genes in peanut[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(3): 649-659. (in Chinese)
- [15] MACHAJ G, GRZEBELUS D. Characteristics of the AT-Hook motif Containing Nuclear Localized (AHL) genes in carrot provides insight into their role in plant growth and storage root development[J]. *Genes*, 2021, 12(5): 764.
- [16] WANG H, LENG X, YANG J, ZHANG M, ZENG M, XU X, WANG F, LI C. Comprehensive analysis of AHL gene family and their expression under drought stress and ABA treatment in *Populus trichocarpa*[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10932.
- [17] ZHANG W M, FANG D, CHENG X Z, CAO J, TAN X L. Insights into the molecular evolution of AT-Hook motif nuclear localization genes in *Brassica napus*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 714305.
- [18] JIA P, LIU J, YAN R, YANG K, DONG Q, LUAN H, ZHANG X, LI H, GUO S, QI G. Systematical characterization of the AT-Hook gene family in *Juglans regia* L. and the functional analysis of the *JrAHL2* in flower induction and hypocotyl elongation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(8): 7244.
- [19] TANG Y, WU W, ZHENG X, LU L, CHEN X, HAO Z, LIU S, CHEN Y. AT-Hook transcription factors show functions in *Liriodendron chinense* under drought stress and somatic embryogenesis[J]. *Plants*, 2023, 12(6): 1353.
- [20] ZHANG X, LI J, CAO Y, HUANG J, DUAN Q. Genome-wide identification and expression analysis under abiotic stress of *BrAHL* genes in *Brassica rapa*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15): 12447.
- [21] WANG L, LI T, LIU N, LIU X. Identification of tomato AHL gene families and functional analysis their roles in fruit development and abiotic stress response[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2023, 202: 107931.
- [22] JIN Y, LUO Q, TONG H, WANG A, CHENG Z, TANG J, LI D, ZHAO X, LI X, WAN J, JIAO Y, CHU C, ZHU L. An AT-hook gene is required for palea formation and floral organ number control in rice[J]. *Developmental Biology*, 2011, 359(2): 277-288.
- [23] STREET I H, SHAH P K, SMITH A M, AVERY N, NEFF M M. The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2010, 54(1): 1-14.
- [24] XIAO C, CHEN F, YU X, LIN C, FU Y F. Over-expression of an AT-hook gene, *AHL22*, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71(1): 39-50.
- [25] LOU Y, XU X F, ZHU J, GU J N, BLACKMORE S, YANG Z N. The tapetal AHL family protein TEK determines nexine formation in the pollen wall[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 3855.
- [26] JIA Q S, ZHU J, XU X F, LOU Y, ZHANG Z L, ZHANG Z P, YANG Z N. *Arabidopsis* AT-hook protein TEK positively regulates the expression of arabinogalactan proteins for Nexine formation[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(2): 251-260.
- [27] GALLAVOTTI A, MALCOMBER S, GAINES C, STANFIELD S, WHIPPLE C, KELLOGG E, SCHMIDT R J. BARREN STALK FASTIGIATE1 is an AT-hook protein required for the formation of maize ears[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(5): 1756-1771.
- [28] ZHOU J, WANG X, LEE J Y, LEE J Y. Cell-to-cell movement of two interacting AT-hook factors in *Arabidopsis* root vascular tissue patterning[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(1): 187-201.
- [29] XU Y, WANG Y, STROUD H, GU X, SUN B, GAN E S, NG K H, JACOBSEN S E, He Y, ITO T. A matrix protein silences transposons and repeats through interaction with retinoblastoma-associated proteins[J]. *Current Biology*, 2013, 23(4): 345-350.
- [30] XU Y, GAN E S, ITO T. The AT-hook/PPC domain protein TEK negatively regulates floral repressors including *MAF4* and *MAF5*[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(8): e25006.
- [31] YUN J, KIM Y S, JUNG J H, SEO P J, PARK C M. The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying *FLOWERING LOCUS T* chromatin in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 15307-15316.
- [32] LIM P O, KIM Y, BREEZE E, KOO J C, WOO H R, RYU J S, PARK D H, BEYNON J, TABRETT A, BUCHANAN-WOLLASTON V, NAM H G. Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of

- plants[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2010, 52(6): 1140-1153.
- [33] WONG M M, BHASKARA G B, WEN T N, LIN W D, NGUYEN T T, CHONG G L, VERSLUES P E. Phosphoproteomics of *Arabidopsis* highly ABA-Induced1 identifies AT-hook-Like10 phosphorylation required for stress growth regulation[J]. *Proceedings of the National Academy*, 2019, 116(6): 2354-2363.
- [34] ZHOU L, LIU Z, LIU Y, KONG D, LI T, YU S, MEI H, XU X, LIU H, CHEN L, LUO L. A novel gene *OsAHL1* improves both drought avoidance and drought tolerance in rice[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30264.
- [35] LU H, ZOU Y, FENG N. Overexpression of *AHL20* negatively regulates defenses in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(9): 801-808.
- [36] KUMAR K, PURAYANNUR S, KALADHAR V C, PARIDA S K, VERMA P K. mQTL-seq and classical mapping implicates the role of an AT-HOOK MOTIF CONTAINING NUCLEAR LOCALIZED (AHL) family gene in *Ascochyta* blight resistance of chickpea[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2018, 41(9): 2128-2140.
- [37] LI B, KLIEBENSTEIN D J. The AT-hook motif-encoding gene *METABOLIC NETWORK MODULATOR 1* underlies natural variation in *Arabidopsis* primary metabolism[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 415.
- [38] MATSUSHITA A, FURUMOTO T, ISHIDA S, TAKAHASHI Y. AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of *AtGA3ox1* encoding GA 3-oxidase[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3): 1152-1162.
- [39] RASHOTTE A M, CARSON S D, TO J P, KIEBER J J. Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 1998-2011.
- [40] VOM ENDT D, SOARES E SILVA M, KIJNE J W, PASQUALI G, MEMELINK J. Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* *ORCA3* transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding proteins[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1680-1689.
- [41] HU W, JI C, LIANG Z, YE J, OU W, DING Z, ZHOU G, TIE W, YAN Y, YANG J, MA L, YANG X, WEI Y, JIN Z, XIE J, PENG M, WANG W, GUO A, XU B, GUO J, CHEN S, WANG M, ZHOU Y, LI X, LI R, XIAO X, WAN Z, AN F, ZHANG J, LENG Q, LI Y, SHI H, MING R, LI K. Resequencing of 388 cassava accessions identifies valuable loci and selection for variation in heterozygosity[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 316.
- [42] CHURCHILL M E, TRAVERS A A. Protein motifs that recognize structural features of DNA[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, 16(1): 92-97.
- [43] GOODWIN G H, SANDERS C, JOHNS E W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1973, 38(1): 14-19.
- [44] 王元元, 刘姣, 郭育强, 王硕, 符少萍, 段瑞军, 李瑞梅, 姚远, 胡新文, 郭建春. AT-hook 蛋白的最新研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(2): 713-717.
- WANG Y Y, LIU J, GUO Y Q, WANG S, FU S P, DUAN R J, LI R M, YAO Y, HU X W, GUO J C. Recent advances in AT-hook proteins[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(2): 713-717. (in Chinese)
- [45] ZHAO J, FAVERO D S, PENG H, NEFF M M. *Arabidopsis thaliana* AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(48): E4688-E4697.
- [46] ARAVIND L, LANDSMAN D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(19): 4413-4421.
- [47] DO H J, SONG H, YANG H M, KIM D K, KIM N H, KIM J H, CHA K Y, CHUNG H M, KIM J H. Identification of multiple nuclear localization signals in murine Elf3, an ETS transcription factor[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(7): 1865-1871.
- [48] DELANEY S K, ORFORD S J, MARTIN-HARRIS M, TIMMIS J N. The fiber specificity of the cotton *FSlp4* gene promoter is regulated by an AT-rich promoter region and the AT-hook transcription factor GhAT1[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2007, 48(10): 1426.
- [49] FUJIMOTO S, MATSUNAGA S, YONEMURA M, UCHIYAMA S, AZUMA T, FUKUI K. Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(2): 225-239.
- [50] 王晓彤, 张建禹, 耿沙, 任思杨, 毋志浩, 李瑞梅, 姚远, 郭建春, 刘姣, 胡新文. 木薯 *MeAHL22* 基因的克隆及功能初步分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(5): 1443-1451.
- WANG X T, ZHANG J Y, GENG S, REN S Y, WU Z H, LI R M, YAO Y, GUO J C, LIU J, HU X W. Cloning and functional analysis of *MeAHL22* gene in cassava[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(5): 1443-1451. (in Chinese)
- [51] SIRL M, SNAJDROVA T, GUTIERREZ-ALANIS D, DUBROVSKY J G, VIELLE-CALZADA J P, KULICH I, SOUKUP A. AT-Hook motif nuclear localised protein 18 as a novel modulator of root system architecture[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): 1886.
- [52] FAVERO D S, KAWAMURA A, SHIBATA M, TAKEBAYASHI A, JUNG J H, SUZUKI T, JAEGER K E, ISHIDA T, IWASE A, WIGGE P A, NEFF M M, SUGIMOTO K. AT-hook transcription factors restrict petiole growth by antagonizing PIFs[J]. *Current Biology*, 2020, 30(8): 1454-1466.