

木薯 AT-hook 基序核定位基因家族的全基因组鉴定、表达谱及调控网络分析

王雨^{1,2}, 郑芸霏^{1,3*}, 赵海旭¹, 李美英^{1,2}, 谢郑楠^{1,2}, 叶晓雪^{1,2}, 纪长绵^{1,2**}, 胡伟^{1,2,4**}

1. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 3. 河南农业大学农学院, 河南郑州 450046; 4. 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339

摘要: AT-Hook 基序核定位 (AT-hook Motif Nuclear Localized, AHL) 蛋白作为植物中广泛存在的调控因子, 在植物生长发育调控和逆境胁迫中发挥重要作用。尽管该基因家族在多个植物中已被研究, 但木薯 (*Manihot esculenta*) AHL 家族的基因组学特征、进化机制及其表达调控模式仍未见报道。本研究基于木薯 SC205 的参考基因组, 通过全基因组鉴定、系统进化分析、基因结构解析以及大规模转录组数据整合, 系统揭示 MeAHL 家族的进化特征、基因表达模式和调控模块。研究共鉴定 41 个 MeAHL 基因, 其中 40 个为不稳定蛋白, 氨基酸数量介于 188–446 aa 之间。系统进化分析将其分为 Clade A 和 Clade B 两个分支, 并在 Chr01 和 Chr02 染色体的远端粒区域发现 2 个 MeAHL 基因簇。进化机制分析表明全基因组复制 (WGD) 事件是驱动该家族扩张的主要进化动力。结构域分析显示 MeAHL 基因含有 PPC/DUF296 结构域和 AT-hook 基序: Clade A 基因含有单个 Type-I AT-hook 基序, 而 Clade B 基因多具有 Type-I 和 Type-II 双基序。启动子顺式作用元件分析揭示 MeAHL 基因启动子区富集光响应元件、植物激素响应元件以及生物/非生物胁迫响应元件, 暗示其功能多样性。多组织转录组分析显示 MeAHL 两个分支在 11 种不同组织中呈现差异表达模式, 暗示其亚家族功能分化。非生物/生物胁迫转录组分析表明, 部分 MeAHL 对干旱 (ABA/PEG 处理)、木薯细菌性萎蔫病 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) 和螨虫侵害等胁迫具有显著响应, 且呈现分支特异性的表达模式。蛋白互作网络分析显示部分 MeAHL 可与 bHLH、NAC、ARF、NB-LRR 等参与发育调控和逆境响应相关的蛋白形成功能模块。本研究结果系统解析 MeAHL 基因家族进化特征与亚家族功能分化, 及其响应不同生物学过程的基因表达模式和部分 MeAHL 的调控模块, 为利用该家族基因进行木薯分子育种设计提供理论依据。

关键词: 木薯; AHL 基因家族; 生物信息学分析; 表达分析; 调控网络

中图分类号: S533 文献标志码: A

Genome-wide Identification, Expression Profiling and Network Analysis of AT-hook Gene Family in Cassava

WANG Yu^{1,2}, ZHENG Yunfei^{1,3*}, ZHAO Haixu¹, LI Meiyong^{1,2}, XIE Zhengnan^{1,2}, YE Xiaoxue^{1,2}, JI Changmian^{1,2**}, HU Wei^{1,2,4**}

1. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450046, China; 4. Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339, China

收稿日期 2025-05-26; 接受日期 2025-06-03

基金项目 海南省自然科学基金联合项目 (No. 2021JJLH0034); 国家自然科学基金项目 (No. 32460528); “崖州湾” 菁英人才科技专项项目 (No. SCKJ-JYRC-2023-75)。

作者简介 王雨 (1987—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 木薯功能基因组与分子育种; *同等贡献作者: 郑芸霏 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物信息学。 **通信作者 (Corresponding author): 纪长绵 (JI Changmian), E-mail: jichangmian@itbb.org.cn; 胡伟 (HU Wei), E-mail: huwei2013@itbb.org.cn。

Abstract: The AT-hook Motif Nuclear Localized (AHL) protein family is known for its pivotal roles in plant growth regulation, developmental patterning, and stress signal transduction. Although the gene family has been studied in various plant species, the genomic characteristics, evolutionary mechanism, and expression profiles of the AHL family in cassava (*Manihot esculenta*) remain unexplored. In this study, we comprehensively investigated the evolutionary features and biological response of the MeAHL gene family through genome-wide identification, phylogenetic analysis, structural characterization, and large-scale transcriptomes based on the cassava SC205 reference genome. We identified 41 putative members through genome-wide identification. Physicochemical property analysis showed that all 41 MeAHLs were hydrophilic proteins, and 40 of them were unstable proteins, with the number of amino acids generally ranging from 188 to 446 aa. Phylogenetic analysis indicated that the MeAHL family members could be divided into two clades, Clade A and Clade B. Two *MeAHL* gene clusters were located in the distal telomeric regions of chromosomes Chr01 and Chr02, respectively. Replication type analysis revealed that the evolution of *MeAHLs* was mainly driven by whole-genome duplication (WGD) and dispersed duplication (DSD), with the *Ka/Ks* values <1. Evolutionary mechanism analysis indicated that whole-genome duplication (WGD) primarily drove the *MeAHL* gene family expansion. Gene structure analysis showed that *MeAHL* genes were mainly composed of 1–10 exons. Analysis of conserved domains and motifs showed that all *MeAHLs* had the PPC/DUF296 domain and AT-hook motif. Members of Clade A generally contained one Type-I AT-hook motif. Among members of Clade B, except for *SC20508G13380* and *SC20509G13950*, which contained one Type-II AT-hook motif, most members contained two AT-hooks (Type-I and Type-II). Cis-acting element analysis via PlantCARE showed that the cis-acting elements related to light response were the most abundant in *MeAHLs*, such as Box 4, G-box, and they also contained elements responsive to hormones, biotic stresses, and abiotic stresses, such as ABRE, MBS, W-box, and TC-rich repeats. Tissue-specific expression profiling revealed distinct expression patterns between two clades of *MeAHL* across 11 different tissues. Stress transcriptome analysis demonstrated significant responses of specific *MeAHLs* to drought (ABA/PEG treatments), cassava bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*), and mite infestation, showing clade-specific regulatory patterns. Protein-protein interaction (PPI) network prediction suggested some *MeAHLs* formed functional modules with bHLH, NAC, ARF, and NB-LRR proteins involved in plant development and stress responses. This study would provide the systematic characterization of AHL family evolution and functional diversification in cassava, offering theoretical foundations for molecular breeding applications.

Keywords: cassava; AHL gene family; bioinformatics analysis; expression analysis; protein-protein interaction (PPI) network

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.10.002

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是属于大戟科 (Euphorbiaceae) 木薯属 (*Manihot*) 的一种二倍体植物, 是热带地区种植最广泛的作物之一^[1]。木薯作为全球第六大粮食作物, 与马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、甘薯 (*Dioscorea esculenta*) 并称世界三大薯类作物^[2], 是非洲、南美洲和亚洲热带地区至关重要的食物来源^[3]。木薯块根富含淀粉, 其淀粉含量在干物质中占比高达 85% 以上, 在纺织、造纸、食品及生物燃料生产等行业中具有重要用途^[4], 作为热带地区重要的粮食及经济作物, 在我国热带地区农民脱贫致富和乡村振兴中发挥重要作用^[5]。在木薯产业发展过程中, 持续遭受多种生物与非生物胁迫的威胁, 对木薯生长发育和产量造成严重影响^[6]。

AT-hook 基序核定位 (AT-hook motif nuclear localized, AHL) 蛋白在植物生长发育、逆境胁迫、植物激素响应以及免疫应答过程中发挥重要

调控作用^[7]。AT-hook 基序核定位蛋白是一类 DNA 结合蛋白, 主要定位于细胞核, 含有 RGRP 基序和 PPC 结构域 (plant and prokaryote conserved domain)^[8], RGRP 基序的核心基序为精氨酸 (Arg)-甘氨酸 (Gly)-精氨酸 (Arg)-脯氨酸 (Pro)。已有研究表明 *AHL* 基因在陆生植物进化过程中分为 Clade A 和 Clade B 两个进化分支^[9]。AHL 蛋白作为转录因子, 通过结合目标基因的 DNA 序列, 正向或负向调控目标基因的转录, 参与植物的生长发育过程, 如叶柄生长^[10]、根生长^[11]、下胚轴伸长^[12-13]、脉管系统分化^[14]、开花^[15-16]、叶片衰老^[17]、幼苗形态建成^[18]和根毛产量^[11]等。AHL 蛋白还参与非生物和生物胁迫响应过程, 如对盐度^[19]、干旱^[20]、镰刀菌^[21]和强毒假单胞菌^[22]等。但迄今为止, 只有相对较少的 AHL 家族得到了详细的研究, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[8]、水稻 (*Oryza sativa*)^[23]、番茄 (*Solanum*

lycopersicum)^[24]、大豆 (*Glycine max*)^[25]、棉花 (*Gossypium hirsutum*)^[26]、核桃 (*Juglans regia* L)^[27]、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)^[28]和胡萝卜 (*Daucus carota* subsp. *sativus*)^[29]等。本团队前期研究发现, *MeAHL17* 在木薯驯化过程中经历了强烈人工选择压力, 显著提高木薯块根重量, 同时导致木薯抗细菌性枯萎病能力降低^[30]。木薯 *MeAHL31* 基因启动子响应盐和干旱等非生物胁迫^[31]。然而, AHL 在木薯全基因组水平特征信息、进化关系及系统的基因表达模式研究不足, 阻碍了其在木薯新品种选育中的开发利用。

本研究利用生物信息学方法对木薯基因组进行 MeAHL 家族成员鉴定, 揭示其基因组分布特征、基因复制类型、基因结构特征及启动子顺式作用元件特征等, 并基于已有的 83 个木薯转录组数据, 系统解析 MeAHL 家族基因在不同组织、不同生物和非生物胁迫处理下的基因表达模式, 利用蛋白互作网络分析部分 MeAHL 蛋白的互作网络模块, 揭示其潜在的生物学功能。研究结果为理解木薯 MeAHL 家族起源演化及其在不同生物学过程的表达模式提供重要理论基础, 促进 *MeAHL* 基因在木薯分子育种开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料为 SC205 号木薯, 采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所文昌基地 (19°32'16"N, 110°45'41"E)。

1.2 方法

1.2.1 MeAHL 基因家族成员鉴定及蛋白理化特征分析 本研究从拟南芥基因组数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 中获取拟南芥 AtAHL 基因家族蛋白序列, 以 29 个拟南芥的 AtAHL 家族基因作为参考序列。利用 Blastp 将 29 个拟南芥 AHL 蛋白序列比对到木薯 SC205 基因组的蛋白序列文件, 鉴定 MeAHL 基因家族的同源序列作为候选基因(参数: 期望值 E value < 1E-5 和序列同源性 > 45%)。进一步将候选基因的蛋白序列上传到 NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 进行结构域预测。依据候选基因包含 AHL 基因家族的特征结构域 PPC/DUF296 (PF03479) 和 AT-hook 基序最终确定 MeAHL 基因家族成员。利用 ExPASy (<http://web.expasy.org>)

在线软件库对筛选到的 MeAHL 基因家族成员进行蛋白理化性质预测, 利用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 在线软件预测亚细胞定位。

1.2.2 MeAHL 基因家族进化关系及染色体位置分布特征分析 从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库下载已报道的大戟科橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、麻疯树 (*Jatropha curcas*)、蓖麻 (*Ricinus communis*) 和油桐 (*Vernicia fordii*) 的 AHL 基因家族成员的蛋白序列。利用 MUSCLE (v3.8.31) 软件对来自木薯、拟南芥、橡胶树、麻疯树、蓖麻和油桐的 AHL 蛋白序列进行多序列比对。使用 Mega 软件, 采用极大似然法 (maximum likelihood, ML), 设置 bootstrap 重复次数为 1000 次, 构建 AHL 基因家族的系统发育进化树。根据木薯基因组 gff 注释文件, 提取 *MeAHL* 基因在染色体上的位置信息, 利用 TBtools 软件分析其染色体分布特征^[32]。

1.2.3 MeAHL 基因家族复制类型分析 利用 DupGen_finder 流程^[33]鉴定木薯 MeAHL 基因家族的复制基因对及复制类型。利用 TBtools 软件计算 *MeAHL* 复制基因对之间的同义替换率 (K_s) 和非同义替换率 (K_a)^[32]。通过 K_a/K_s 比值分析复制基因对的选择压力, $K_a/K_s < 1$ 表示基因受到纯化选择, $K_a/K_s > 1$ 表示受到正选择, $K_a/K_s = 1$ 表示受到中性选择。

1.2.4 MeAHL 家族的基因结构特征及保守结构域分析 从木薯 SC205 基因组注释文件中提取 AHL 家族成员的核酸和蛋白序列, 包括其完整的基因组序列、外显子和内含子区域。分析 MeAHL 家族成员的基因结构, 统计外显子数量和长度。利用 MEME 软件对木薯 MeAHL 基因家族成员进行保守基序 motif 鉴定^[34]。利用 NCBI 的 Conserved domains 软件进行保守结构域分析, 并利用 TBtools 软件分析其 motif 和结构域的分布特征。

1.2.5 MeAHL 家族基因启动子区域的顺式作用元件预测 利用 TBtools 软件中的 gff3 序列提取工具提取木薯 *MeAHL* 基因起始密码子上游 2000 bp 序列作为候选启动子, 提交到 PlantCare (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站预测顺式作用元件。利用 TBtools 对预测的启动子顺式作用元件进行可视化分析^[32]。

1.2.6 MeAHL 基因家族在不同组织和胁迫处理下的表达分析 本研究从国家基因组科学数据中

心 (<https://download.cncb.ac.cn/>) 和 NCBI 数据库中共获得来自 7 个 BioProject 项目 (PRJNA524260、PRJNA324539、PRJNA658570、PRJNA231851、PRJNA396755、PRJNA282938 和 PRJNA578024) 的 83 个转录组样品数据集。木薯转录组测序数据来源于不同组织 (如根、茎、叶、花、贮藏根等) 和不同处理条件 (如干旱、细菌性枯萎病病原菌、螨虫损伤)。转录原始测序数据经过 Fastp 软件包^[35]质控后, 用 HISAT2 v1.34d 软件^[36]将高质量的转录组测序数据比对到木薯 SC205 参考基因组得到序列比对 bam 文件。采用 StringTie v2.1.0 软件^[37]组装比对上的 reads, 构建转录本序列, 并对比对到基因区域的 reads 数量做归一化处理, 计算基因和转录本的表达量 (FPKM)。利用 DESeq 2 软件^[38]鉴定差异表达基因: 差异倍数 Fold Change ≥ 2 , 差异显著性 FDR >0.05 。使用 R 软件中的 pheatmap 工具包绘制热图, 系统展示 *MeAHL* 基因在不同组织、不同非生物胁迫、不同生物胁迫下的基因表达模式。比较 Clade A 和 Clade B 两个分支成员的木薯 *MeAHL* 基因在不同组织中和逆境处理下的基因表达特征差异。

1.2.7 互作蛋白网络分析 利用 STRING (<https://string-db.org/cgi>) 在线软件预测木薯 *MeAHL* 蛋白质的相互作用网络。基于预测结果, 利用 Cytoscape v3.9.1 软件^[39]构建木薯 *MeAHL* 蛋白的相互作用网络图。

2 结果与分析

2.1 *MeAHL* 基因家族成员鉴定及蛋白理化特征分析

本研究利用拟南芥 29 个高质量 *AtAHL* 基因的蛋白序列作为参考, 利用 Blastp 同源比对到木薯 SC205 基因组蛋白序列文件 (identify $\geq 45\%$ 和 E value $<1E-5$), 鉴定 *AHL* 同源基因。同时, 结合 *AHL* 基因家族的 PPC/DUF296 结构域 (PF03479) 与 AT-hook 基序特征对木薯 SC205 基因组进行 *AHL* 基因家族成员鉴定, 最终获得 41 个 *MeAHL* 家族成员 (表 1)。*MeAHL* 蛋白长度分析表明 *MeAHL* 编码氨基酸数量主要介于 188~446 aa 之间, 其中 SC20502G08210 蛋白长度为 1006 aa。蛋白理化性质分析发现, 41 个 *MeAHL* 的相对分子量介于 18 645.94~109 150.71 Da 之间, 理论等电点介于 4.94~10.45 之间。只有 SC205-01G25540 不稳定指数小于 40, 属于稳定蛋白, 其余 40 个 *MeAHL* 的不稳定指数介于 40.63~62.23 之间, 属于不稳定蛋白。40 个 *MeAHL* 蛋白序列平均亲水性小于 0, 介于 -0.355~-0.271 之间, 属于亲水性蛋白。利用 WoLFPSORT 在线软件预测木薯 41 个 *MeAHL* 的亚细胞定位, 发现其分布在不同的亚细胞区域。18 个 *MeAHL* 定位在细胞核, 其余定位在线粒体和叶绿体等区域。该结果暗示 *MeAHL* 基因参与不同的生物学过程, 与已报道 *AHL* 功能一致^[40]。

表 1 木薯 *MeAHL* 蛋白基本信息
Tab. 1 Basic information of *MeAHL* proteins

序号 No.	基因 ID Gene ID	氨基酸数量 Amino acid (aa)	分子量 Molecular weight/Da	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	总平均亲水性 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
1	SC20501G06620	347	35 781.71	10.45	47.86	-0.271	细胞核
2	SC20501G07550	294	31 094.68	6.84	54.78	-0.503	细胞核
3	SC20501G07590	353	36 140.96	9.49	55.95	-0.228	叶绿体
4	SC20501G12870	268	28 145.19	9.40	47.64	-0.128	内质网 内质网_质膜
5	SC20501G15380	356	37 239.94	8.90	44.55	-0.345	细胞核
6	SC20501G17460	282	29 570.50	9.13	50.60	-0.211	细胞质
7	SC20501G24820	340	34 831.28	10.11	44.31	-0.248	叶绿体
8	SC20501G25490	297	31 454.18	6.55	56.39	-0.534	细胞核
9	SC20501G25540	340	35 375.92	8.72	39.52	-0.220	叶绿体
10	SC20502G02120	347	36 031.59	9.88	52.72	-0.388	叶绿体; 质膜
11	SC20502G02960	293	31 032.70	6.80	53.81	-0.473	细胞核
12	SC20502G03000	384	40 067.73	9.37	44.96	0.002	质膜

续表 1 木薯 MeAHL 蛋白基本信息
Tab. 1 Basic information of MeAHL proteins (continued)

序号 No.	基因 ID Gene ID	氨基酸数量 Amino acid (aa)	分子量 Molecular weight/Da	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	总平均亲水性 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
13	SC20502G08210	1006	109 150.71	6.15	49.84	-0.467	细胞核
14	SC20502G10750	358	37 100.50	9.17	49.04	-0.320	细胞核
15	SC20502G12840	279	29 965.74	4.94	49.27	-0.278	细胞质
16	SC20502G13390	312	32 669.38	6.89	58.06	-0.491	内质网
17	SC20503G15750	302	31 177.09	5.88	50.52	-0.227	细胞外
18	SC20504G00910	353	36 101.59	5.05	46.30	-0.239	细胞核
19	SC20505G03450	340	34 961.57	10.11	41.28	-0.254	细胞核
20	SC20505G04200	307	32 597.63	6.50	58.32	-0.461	线粒体
21	SC20505G04360	325	33 760.20	9.41	46.14	-0.274	线粒体
22	SC20505G12810	290	29 120.32	9.16	48.71	-0.293	细胞核
23	SC20505G12910	375	37 285.77	10.08	50.04	-0.244	细胞核
24	SC20506G12640	386	40 564.04	9.31	40.63	-0.311	叶绿体
25	SC20507G11650	301	31 746.00	5.26	57.58	-0.461	叶绿体
26	SC20508G02230	390	40 087.53	6.18	53.45	-0.350	叶绿体
27	SC20508G13380	351	36 347.45	8.80	49.67	-0.455	细胞核
28	SC20508G13400	285	29 575.05	5.89	50.49	-0.489	叶绿体
29	SC20509G05090	364	37 761.17	9.17	51.24	-0.402	细胞核
30	SC20509G13920	288	29 961.50	5.50	54.54	-0.480	细胞核
31	SC20509G13950	377	39 855.75	10.07	46.88	-0.495	细胞核
32	SC20510G02590	337	35 685.13	5.55	62.23	-0.740	细胞核
33	SC20511G15260	341	35 333.68	5.57	50.24	-0.209	细胞核
34	SC20514G03200	421	44 875.56	8.62	41.43	-0.350	细胞核
35	SC20515G03600	188	18 645.94	5.19	45.72	0.077	内质网
36	SC20515G15920	297	30 795.28	6.03	45.86	-0.344	细胞质
37	SC20515G15930	371	38 266.75	9.51	57.11	-0.444	细胞核
38	SC20517G01110	419	43 832.83	9.80	60.72	-0.565	细胞核
39	SC20517G01140	377	40 278.69	9.24	45.25	-0.194	线粒体
40	SC20518G00200	446	45 545.07	9.85	55.40	-0.301	线粒体
41	SC20518G05780	315	32 853.94	8.36	57.93	-0.355	细胞质

2.2 MeAHL 基因家族进化关系及染色体分布特征分析

为了揭示 MeAHL 基因家族成员的进化关系, 本研究利用模式植物拟南芥和木薯、橡胶树、麻疯树、蓖麻、油桐的 AHL 蛋白序列进行多序列比对, 过滤低质量比对区域后, 构建极大似然进化树 (图 1)。结果表明拟南芥、橡胶树、麻疯树、蓖麻、油桐和木薯的 AHL 蛋白分为 Clade A 和 Clade B 两个进化分支^[9]。木薯 MeAHL 基因家族成员中, 19 个属于 Clade A 分支, 22 个属于 Clade

B 分支, 表明 2 个分支成员在进化过程中产生了功能分化。染色体位置分布特征分析结果如图 2 所示, *MeAHL* 基因不均匀地分布在木薯基因组的 15 条染色体上, 分别为 Chr01、Chr02、Chr03、Chr04、Chr05、Chr06、Chr07、Chr08、Chr09、Chr10、Chr11、Chr14、Chr15、Chr17 和 Chr18。其中, 在 Chr01 染色体上分布的 *MeAHL* 数量最多, 包含 4 个 Clade A 成员和 5 个 Clade B 成员。其余的 *MeAHL* 基因中, 7 个基因 (4 个 Clade A 和 3 个 Clade B) 定位在 Chr02 染色体上; 5 个基

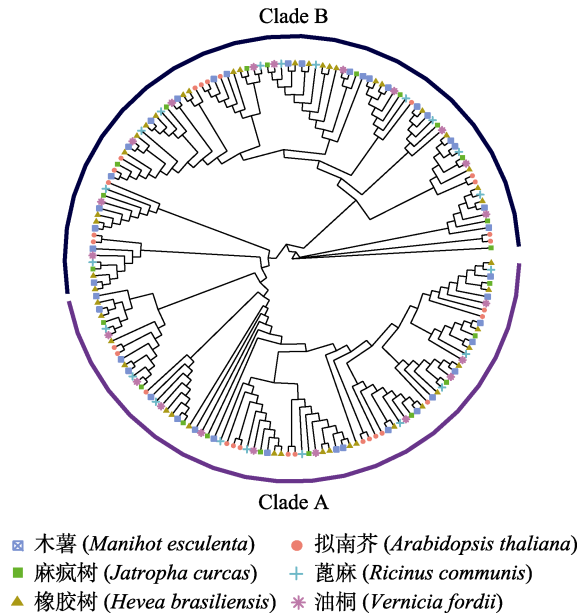


图 1 木薯与其他 5 个近缘物种 AHL 家族的系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of AHL gene family in cassava and five closely related species

因（2 个 Clade A 成员和 3 个 Clade B 成员）定位在 Chr05 染色体上；3 个基因（1 个 Clade A 成员和 2 个 Clade B 成员）定位在 Chr08 染色体上；3 个基因（1 个 Clade A 成员和 2 个 Clade B 成员）定位在 Chr09 染色体上；3 个基因（2 个 Clade A 成员和 1 个 Clade B 成员）定位在 Chr15 染色体上；各有 2 个 *MeAHL* 基因（1 个 Clade A 成员和 1 个 Clade B 成员）定位在 Chr17 和 Chr18 染色体上，其余 7 条染色体均只有 1 个 *MeAHL* 基因。Chr01 和 Chr02 染色体的远端粒区域分别有 2 个 *MeAHL* 基因簇（图 2）。

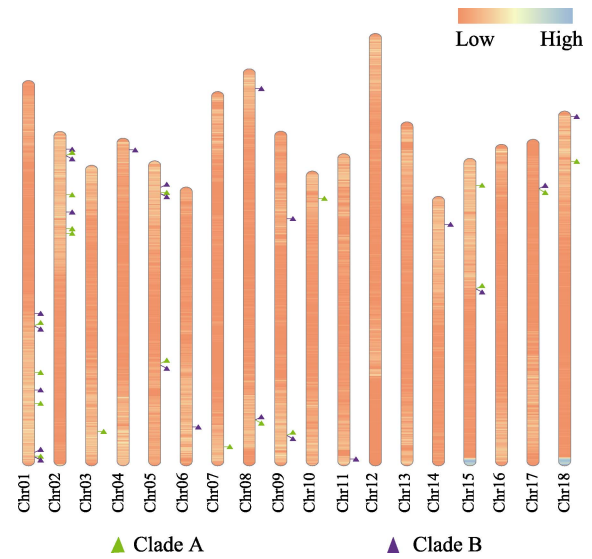


图 2 *MeAHL* 基因家族成员的染色体定位
Fig. 2 Chromosome localization of cassava *MeAHL* gene family

2.3 *MeAHL* 基因家族复制类型分析

基因复制分析发现木薯基因组中 41 个 *MeAHL* 基因主要来自 DSD (dispersed duplication, 分散复制) 和 WGD (whole genome duplication, 全基因组复制)，表明基因复制对木薯 *MeAHL* 家族的形成有重要贡献（表 2 和图 3）。木薯经历 2 次全基因组复制事件，包括 1 次双子叶植物共有的祖先基因组三倍化时间 (WGT- γ) 和近期 1 次谱系特异性的全基因组复制事件 (lineage-specific WGD)^[9]，表明全基因组复制和基因保留可能是木薯 AHL 基因家族形成的主要进化动力。植物基因组中基因复制是基因家族扩张的重要进化驱动力，为植物的基因突变和表型多样性提供

表 2 木薯 *MeAHL* 复制基因的 *Ka* 和 *Ks* 值
Tab. 2 *Ka* and *Ks* values of *MeAHL* gene duplicates in cassava

类型 Type	基因 ID1 Gene ID1	基因 ID2 Gene ID2	<i>Ka</i> 值 <i>Ka</i> value	<i>Ks</i> 值 <i>Ks</i> value
DSD	SC20505G12810	SC20501G12870	0.42	
	SC20515G15920	SC20517G01140	0.06	0.35
	SC20515G15930	SC20517G01110	0.10	0.45
WGD	SC20501G06620	SC20502G02120	0.10	0.38
	SC20501G07550	SC20502G02960	0.02	0.23
	SC20501G07590	SC20502G03000	0.04	0.33
	SC20501G15380	SC20502G10750	0.10	0.46
	SC20501G17460	SC20502G12840	0.25	0.55
	SC20501G24820	SC20505G03450	0.06	0.32
	SC20501G25490	SC20505G04200	0.06	0.28
	SC20501G25540	SC20505G04360	0.07	0.36
	SC20502G02120	SC20505G03450	0.37	1.53

续表 2 木薯 *MeAHL* 复制基因的 *Ka* 和 *Ks* 值

Tab. 2 *Ka* and *Ks* values of *MeAHL* gene duplicates in cassava (continued)

类型 Type	基因 ID1 Gene ID1	基因 ID2 Gene ID2	<i>Ka</i> 值 <i>Ka</i> value	<i>Ks</i> 值 <i>Ks</i> value
WGD	<i>SC20502G02960</i>	<i>SC20505G04200</i>	0.16	2.55
	<i>SC20502G03000</i>	<i>SC20505G04360</i>	0.24	1.57
	<i>SC20502G10750</i>	<i>SC20505G12910</i>	0.29	1.73
	<i>SC20502G13390</i>	<i>SC20518G05780</i>	0.08	0.47
	<i>SC20503G15750</i>	<i>SC20515G03600</i>	0.04	0.36
	<i>SC20504G00910</i>	<i>SC20508G02230</i>	0.55	1.50
	<i>SC20505G04360</i>	<i>SC20506G12640</i>	0.31	1.12
	<i>SC20505G12910</i>	<i>SC20518G00200</i>	0.16	0.44
	<i>SC20506G12640</i>	<i>SC20514G03200</i>	0.14	0.38
	<i>SC20507G11650</i>	<i>SC20510G02590</i>	0.13	0.46
	<i>SC20508G13380</i>	<i>SC20509G13950</i>	0.09	0.42
	<i>SC20508G13400</i>	<i>SC20509G13920</i>	0.05	0.36
	<i>SC20508G02230</i>	<i>SC20509G05090</i>	0.16	0.39
	<i>SC20509G05090</i>	<i>SC20511G15260</i>	0.48	1.88
	<i>SC20509G13920</i>	<i>SC20515G03600</i>	0.17	NaN

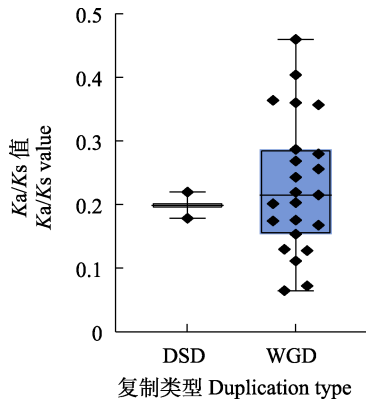


图 3 *MeAHL* 基因家族复制类型分析

Fig. 3 Duplication type analysis of *MeAHL* gene family in cassava

重要遗传材料^[41]。*MeAHL* 复制基因对之间选择压力分析发现其 *Ka/Ks* 值都小于 1，表明这些复制基因对形成后经历强烈的自然选择，暗示其在木薯环境适应性和表型多样性中的发挥重要作用。

2.4 *MeAHL* 家族的基因结构、保守结构域及保守基序分析

MeAHL 基因结构分析结果如图 4 所示，Clade A 分支中 16 个基因（84.2%）属于单外显子结构类型。其余 3 个基因（*SC20503G15750*、*SC20517G01140* 和 *SC20502G08210*）属于多外显子基因，可能来源于单外显子基因内含子插入事件。Clade B 分支中的 22 个 *MeAHL* 基因属于多外显子基因类型。Clade B 分支比 Clade A 分支表现出更明显的基因长度变化。以上结果表明 *MeAHL* 基因家族 2 个进化分支之间出现基因

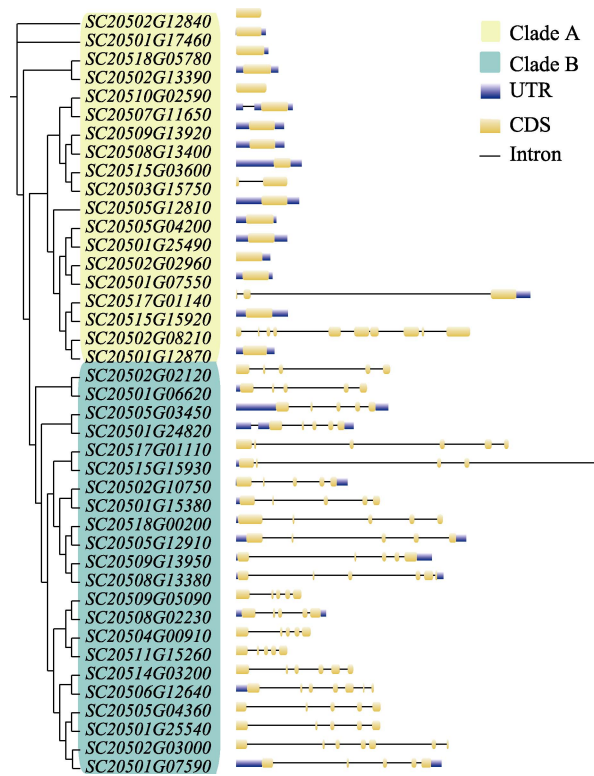


图 4 *MeAHL* 基因结构分析

Fig. 4 Analysis of *MeAHL* gene structures in cassava

结构的分化可能导致功能差异。保守结构域分析结果如图 5 所示，41 个木薯 *MeAHL* 蛋白均含有 PPC/DUF296 结构域（PF03479）。保守基序分析结果如图 6 所示，木薯 *MeAHL* 蛋白具有 10 个保守基序（motif 1~motif 10），其中 motif 4 为 Type-I 类型 AT-hook 结构域，motif 5 为 Type-II 类型 AT-hook 结构域。Clade A 分支成员含有一个

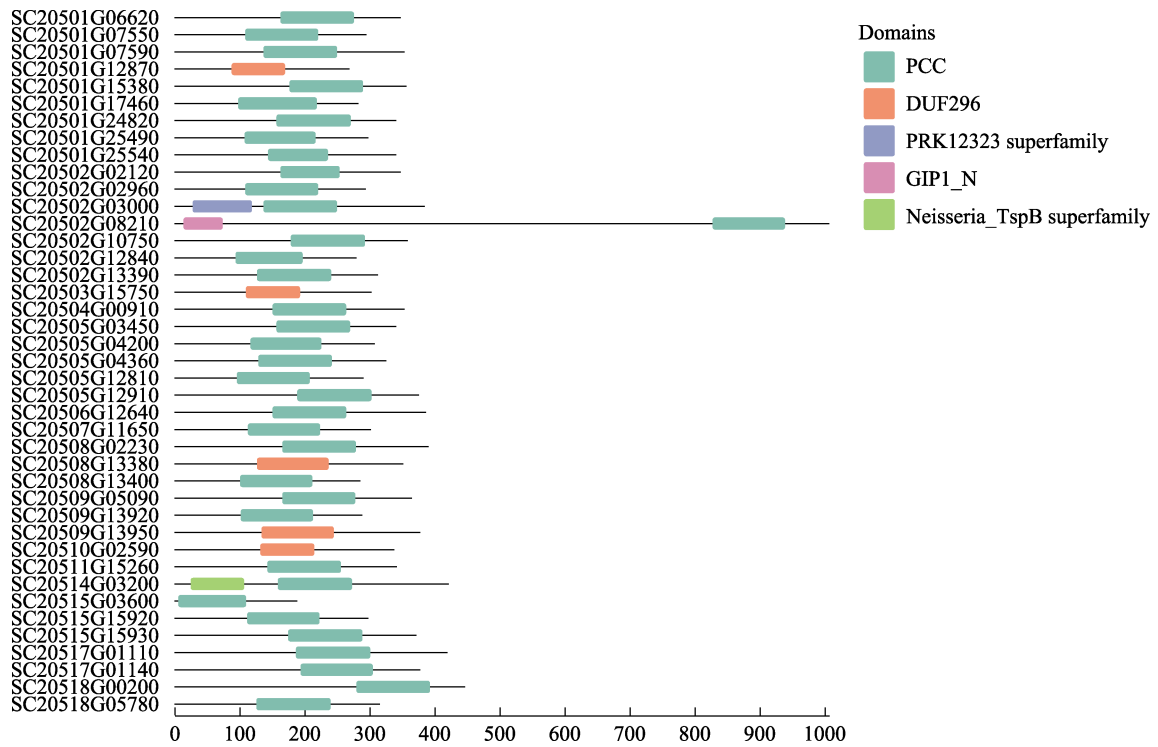


图 5 MeAHL 蛋白保守结构域分析

Fig. 5 Analysis of MeAHL protein conserved domain in cassava

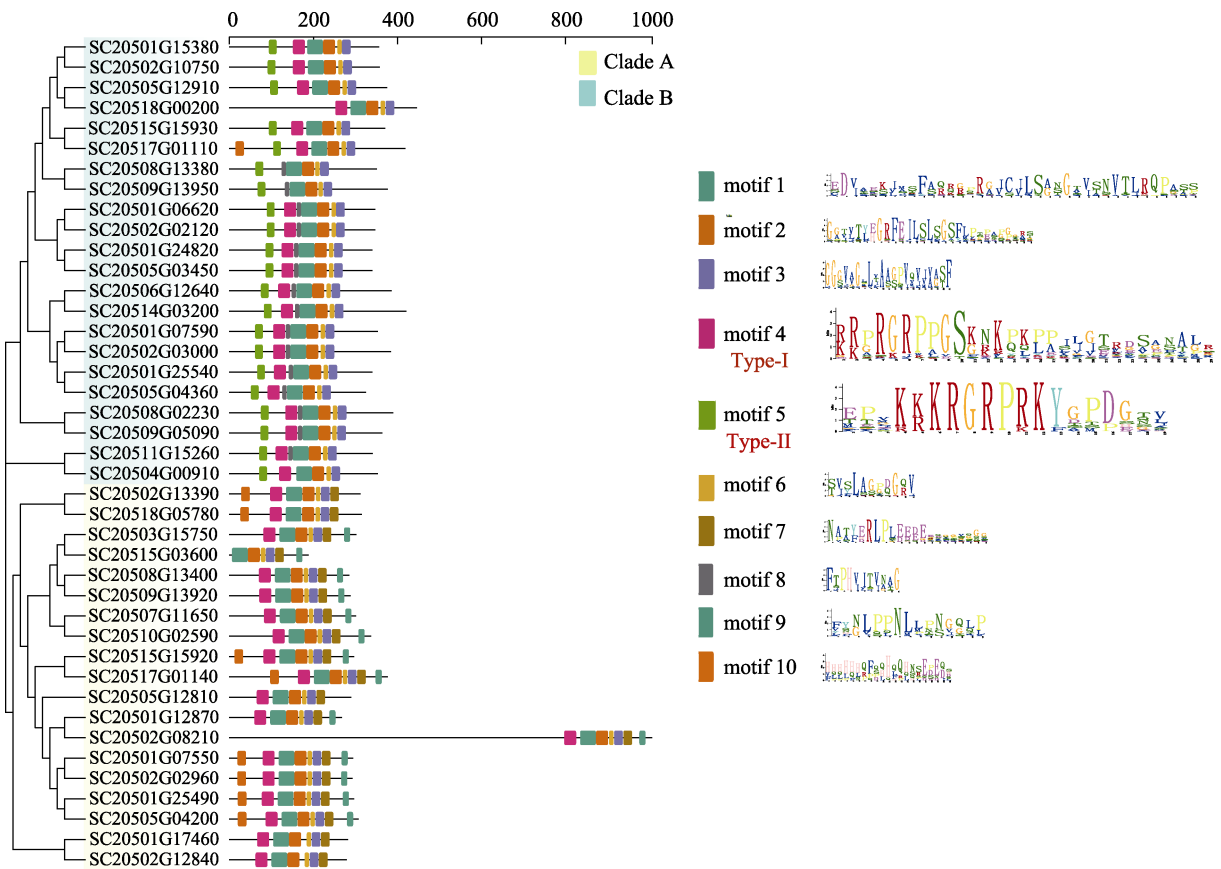


图 6 MeAHL 蛋白保守基序分析

Fig. 6 Analysis of MeAHL protein conserved motifs in cassava

Type-I 类型 AT-hook 基序，而 Clade B 分支成员同时含有 1 个 Type-II 类型或者 Type-I 和 Type-II 类型 AT-hook 基序。

2.5 MeAHL 家族基因启动子区域的顺式作用元件预测

顺式作用元件分析结果 (图 7) 表明, 41 个 MeAHL 基因的启动子区主要存在 19 类顺式作用元件, 主要与光信号响应、植物激素、生物和非生物胁迫响应相关。光响应元件 (light-response element) 数量最多, 表明其在光信号传导和环境适应性生物学过程中发挥重要作用。植物激素类响应元件如茉莉酸甲酯 (CGTCA-motif)、脱落酸 (ABRE)、水杨酸 (ABRE、TCA-element)、赤霉素 (P-box、GARE-motif) 和生长素 (TGA-element、AuxRR-core) 等相关元件, 广泛分布在 MeAHL 启动子区域, 表明其可能参与植物激素响应生物过程。31 个 MeAHL 基因的启动子中含有 69 个 ABA 响应元件 (ABRE), 其

中包含 4 个以上 ABRE 的 MeAHL 基因有 SC20501G07550 (4 个)、SC20501G25540 (6 个)、SC20502G02960 (6 个)、SC20505G12810 (7 个)、SC20515G03600 (5 个) 和 SC20517G01110 (4 个)。干旱诱导的 MYB 结合位点响应元件 (MBS) 和低温响应元件 (LTR) 是主要的非生物胁迫相关元件。18 个 MeAHL 基因启动子中含有 29 个干旱诱导相关的 MYB 结合位点 (MBS), 其中 SC20501G12870 (4 个)、SC20501G25540 (3 个) 和 SC20506G12640 (3 个) 含有 3 个以上的 MBS 元件。此外, 10 个 MeAHL 基因含防御相关 TC-rich repeats, 24 个 MeAHL 基因含伤口响应元件 WUN-motif。以上结果表明, MeAHL 可能广泛参与木薯植物激素响应和环境适应性, 与木薯 MeAHL17^[30] 参与木薯细菌性枯萎病抗性和块根重量形成过程及 MeAHL31^[31] 参与茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate) 介导的盐和干旱胁迫响应一致。

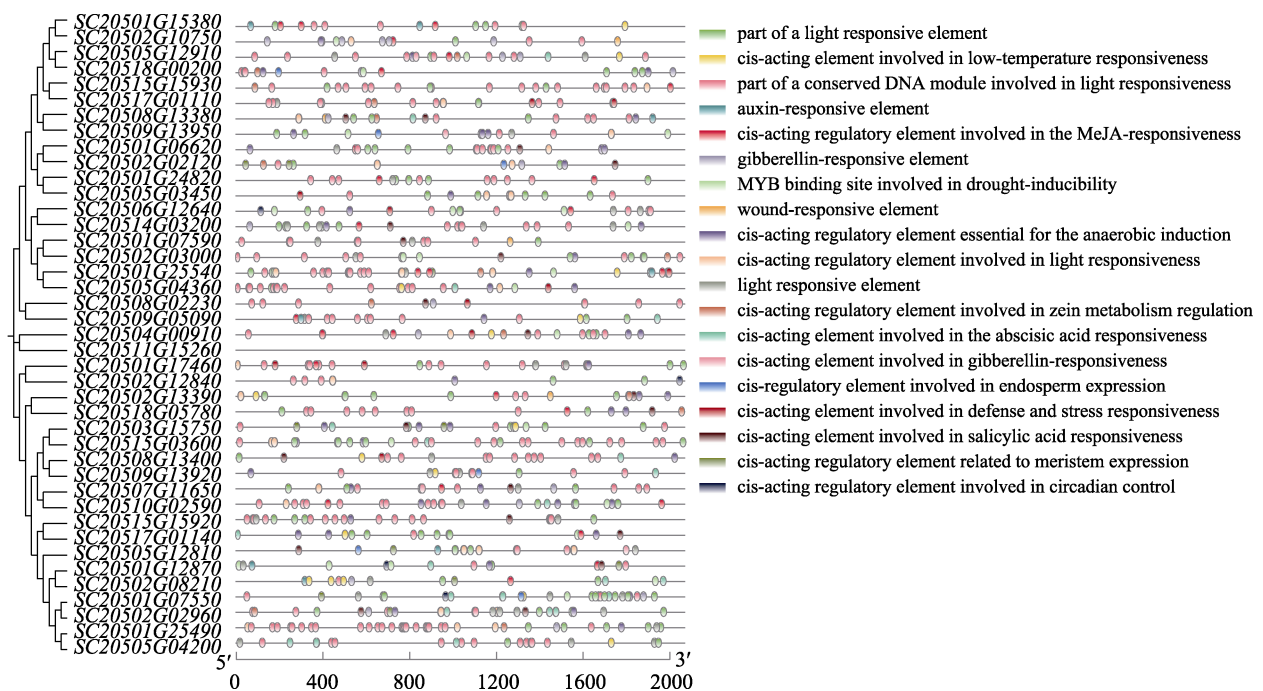


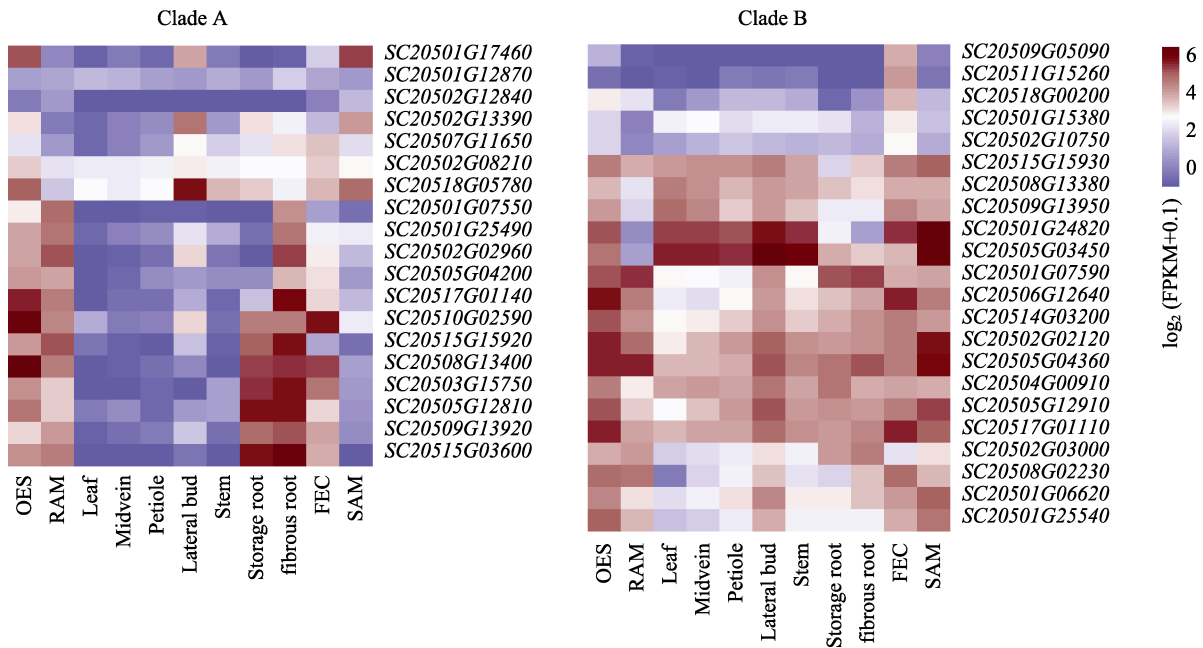
图 7 MeAHL 家族基因启动子区顺式作用元件分析

Fig. 7 Analysis of cis-acting elements in the promoter regions of cassava MeAHL family genes

2.6 MeAHL 在不同组织中基因表达模式

本研究系统解析了木薯 MeAHL 基因在包括有序的胚性愈伤组织 (OES)、根尖分生组织 (RAM)、叶片 (leaf)、叶片中脉 (midvein)、叶柄 (petiole)、叶芽 (lateral bud)、茎 (stem)、贮藏根 (storage root)、须根 (fibrous root)、松

散的胚性愈伤组织 (FEC)、茎尖分生组织 (SAM) 共 11 种组织类型中的基因表达模式 (图 8)。Clade A 分支基因倾向在根顶端分生组织、须根、贮藏根和松散的胚性愈伤组织中特异性高表达, 而多数 Clade B 分支基因在全部组织中表现出高表达模式。Clade A 和 Clade B 分支的大部分基因在 FEC



A. Clade A 分支基因在不同组织中表达量热图；B. Clade B 分支基因在不同组织中的表达量热图。
 A. Expression heatmap of MeAHL genes belonging to Clade A subfamily. B. Expression heatmap of MeAHL genes belonging to Clade B subfamily.

图 8 木薯 MeAHL 基因家族成员在 11 种组织中的表达分析

Fig. 8 Expression profiles of MeAHL family members among eleven tissues of cassava

和 OES 中高表达，推测其参与木薯无性繁殖生物学过程。在 Clade B 分支中，SC20509G05090、SC20511G15260、SC20518G00200、SC20502G10750 在松散的胚性愈伤组织中特异性高表达，其可能在诱导木薯早期具有高度胚性分化能力的胚性愈伤组织过程中发挥重要作用，可作为木薯组织培养和遗传转化效率改良的重要目标基因。Clade A 和 Clade B 分支在叶片、叶片中脉、叶柄、叶芽和茎尖分生组织中表现出差异的表达模式，说明它们在不同组织中出现功能分化。

2.7 MeAHL 响应不同的非生物和生物胁迫

木薯能在热带地区常见的干旱和肥力低下的土壤中生长良好，表现出较强的抗逆能力^[42]。本研究解析了木薯 MeAHL 基因在 ABA（脱落酸）和 PEG（聚乙二醇）处理模拟干旱胁迫条件下的叶片基因表达模式（图 9）。Clade A 成员 SC20502G13390、SC20510G02590、SC20507G11650 在 ABA 处理的叶片组织中表达量下调，而 Clade B 成员 SC20501G24820、SC20505G03450、SC20504G00910 的表达量上调。经 PEG 处理后，Clade A 成员 SC20502G13390、SC20518G05780 的表达量下调，而 Clade B 成员 SC20504G00910 的表达量上调。在拟南芥中过表达 AtAHL17 能够显著促进根毛的产生和伸长。在干旱胁迫下（ABA

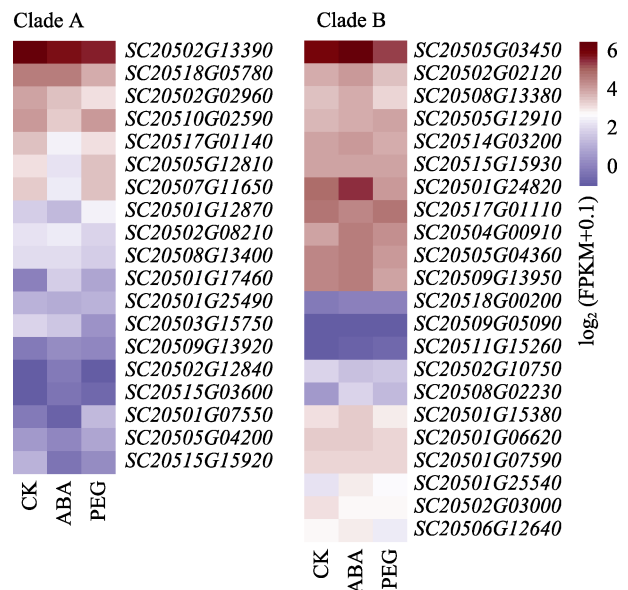


图 9 MeAHL 基因家族成员在干旱处理后的表达分析
 Fig. 9 Expression analysis of AHL genes in cassava after drought treatment

和 PEG 处理），Clade A 成员 SC20502G13390（MeAHL17）的表达量均显著降低，表明木薯为了更好地适应干旱环境而优化基因表达谱的一种策略^[20]。在水稻中，OsAHL1 的过表达显著提高了植株对干旱胁迫的耐受性^[20]。杨树中的 PtrAHL34 在干旱胁迫下的表达模式和功能与 OsAHL1 相似^[28]。Clade B 成员 SC20504G00910 在 ABA 和 PEG 处理

后表达量均上升，表明其可能参与 ABA 信号通路介导的干旱响应。

致病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) 引起的木薯细菌性枯萎病 (cassava bacterial blight, CBB)，严重威胁木薯产量^[29]。为了解析 *MeAHL* 基因在细菌性枯萎病中的响应特征，本研究利用 2 组独立的 *Xam* 侵染木薯茎组织的转录组数据，分别解析了木薯茎组织中接种 TALE1*Xam* 致病性菌株 0、5、7 d 后和接种 *Xam681* 致病性菌株 1、3、5 d 后的转录组 *MeAHL* 基因表达模式。在接种 TALE1*Xam* 致病性菌株试验中，ORST4 为接种非致病性菌株的对照组 (CK1)，TALE1*Xam* 为接种致病性菌株的试验组；在接种 *Xam681* 致病性菌株试验中，ck 为未接种的为对照组 (CK2)，MgCl₂ 为接种无致病菌的氯化镁溶液的对照组，*Xam681* 为接种致病性菌株的试验组。比较 Clade A 和 Clade B 分支成员在致病性菌株 TALE1*Xam*、*Xam681* 侵染条件下木薯茎组织中的基因表达模式 (图 10) 发现，

Clade A 基因：TALE1*Xam* 处理 5、7 d 时，SC20502G13390 和 SC20518G05780 表达量明显高于对照组；*Xam681* 侵染 1 d 时，SC20502G13390、SC20518G05780、SC20507G11650 的表达量均呈现上调表达趋势；接种 *Xam681* 第 3 天和第 5 天后，其在对照和处理组之间差异表达，但表达量明显降低。SC20502G13390 (*MeAHL17*) 与木薯细菌性枯萎病抗性显著关联，是木薯驯化过程中导致抗病性丢失的核心基因^[30]，SC20502G13390 在致病性 *Xam* 菌株侵染过程中显著高表达，表明其参与细菌性枯萎病抗性响应过程，是抗细菌性枯萎病木薯遗传改良的重要目标基因。Clade B 基因：TALE1*Xam* 侵染后，SC20501G24820、SC20505G12910、SC20502G02120、SC20505G04360 在对照和处理组之间表现出差异表达，其中 SC20505G12910 在侵染 5 d 后仍维持高表达水平。*Xam681* 侵染试验进一步证实，SC20501G24820、SC20505G12910、SC20502G02120、SC20505G04360 在对照和处理组之间差异表达。

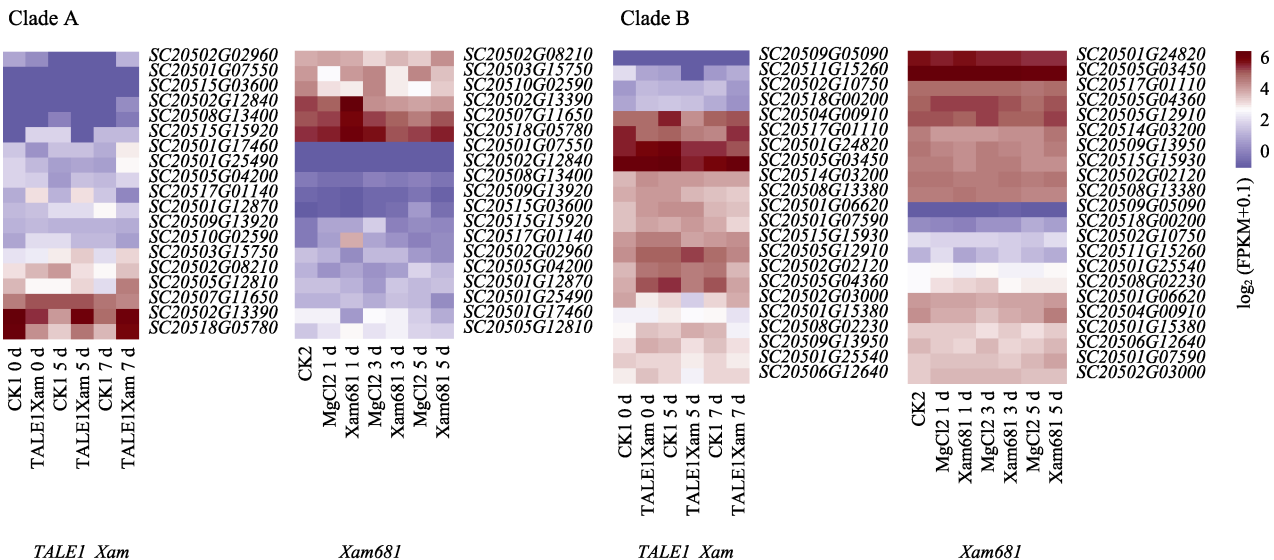


图 10 MeAHL 基因家族成员在 *Xam* 侵染后的木薯茎组织表达分析
Fig. 10 Expression profiles of *MeAHL* genes in cassava stem under *Xam* infection

Clade A 和 Clade B 分支基因在不同程度蚜虫侵害后的叶片中基因表达模式分析结果如图 11 所示。Clade A 分支中 SC20518G05780、SC20502G13390 和 SC20501G12870 在受到严重侵害的叶片中表达量明显高于受到轻度侵害的样品，而 SC20502G08210 则在轻度损伤下呈现更高表达水平。Clade B 分支中 SC20502G02120、SC20509G13950、SC20514G03200、SC20501-

G06620 和 SC20501G07590 在蚜虫侵害后均呈现显著上调表达，且轻度损伤下的表达量普遍高于重度损伤。

2.8 互作蛋白网络分析

部分 *MeAHL* 蛋白互作网络 (PPI) 分析结果如图 12 所示，部分 *MeAHL* 蛋白成员间存在显著的模块化互作特征。SC20501G07550、SC20502G02960、SC20501G25490 和 SC20505G04200 形

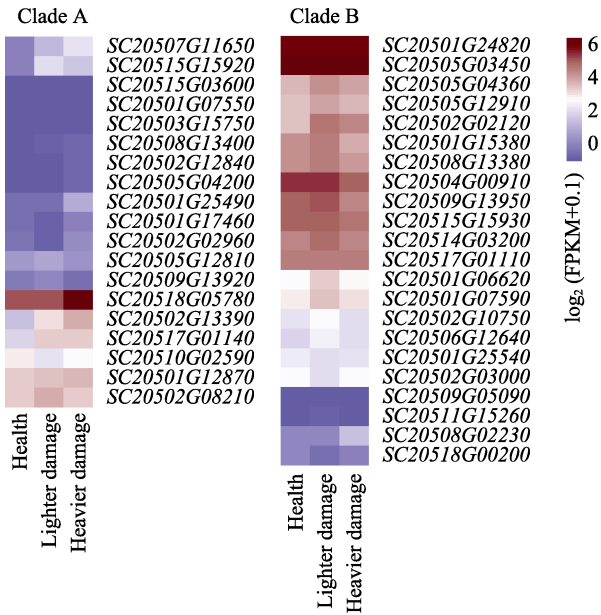


图 11 *MeAHL* 基因家族成员在螨虫侵害后的叶片组织表达分析

Fig. 11 Expression profiles of *AHL* genes in leaves of cassava under mite infestation

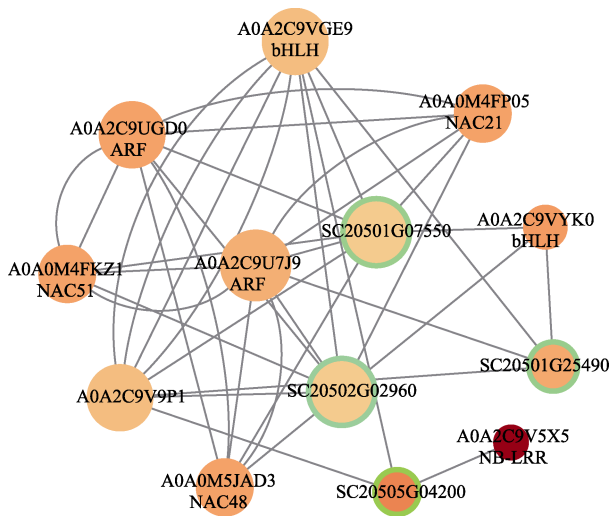


图 12 *MeAHL* 基因家族成员蛋白互作网络分析

Fig. 12 Analysis of *AHL* protein interaction network in cassava

成一个紧密连接的蛋白簇，这些 *MeAHL* 蛋白可能与 bHLH、NAC、ARF、NB-LRR 等蛋白存在互作关系。bHLH、NAC、生长素响应因子 ARF、抗病基因 NB-LRR 蛋白主要与生长发育和逆境响应相关。

3 讨论

AT-hook 基序核定位蛋白是一种保守的转录因子，在植物生长发育和逆境胁迫中发挥关键作

用^[40]。木薯 (SC205) 基因组包含 41 个 *MeAHL* 基因，其部分蛋白定位于细胞核，与其作为转录因子的潜在功能相符。木薯 *MeAHL* 家族基因可分为 Clade A 和 Clade B 两个分支，与其他陆生植物 *AHL* 家族分类一致，表明其在进化上的保守性^[9]。WGD (全基因组复制) 和 DSD (分散复制) 是驱动木薯 *MeAHL* 家族形成的主要进化驱动力，表明木薯的 2 次全基因组复制事件对 *MeAHL* 基因家族形成的重要贡献^[43]。Clade A 成员主要为单外显子基因结构，而 Clade B 成员主要为多个外显子基因结构，与其他物种的 *AHL* 基因家族结构一致^[23, 25]，其基因结构差异表明 *MeAHL* 两个分支进化过程中可能出现了功能分化。顺式作用元件是位于基因启动子区域的一类 DNA 序列。转录因子能够识别特定顺式作用元件来调节目标基因表达，进而影响作物表型^[44]。木薯 *MeAHL* 基因启动子含有的顺式作用元件主要与光响应、植物激素 (如 MeJA、ABA、水杨酸、赤霉素和生长素)、干旱诱导、低温响应及伤口响应等生物学过程相关，表明 *MeAHL* 可能通过多种机制广泛参与木薯生长发育和环境适应性。转录组分析发现 Clade A 分支基因在根顶端分生组织、须根和贮藏根中表现出特异性高表达，而 Clade B 分支基因在有序的胚性愈伤组织、侧芽、松散的胚性愈伤组织和茎顶端分生组织中呈现显著高表达。该表达模式差异与木薯 *MeAHL* 家族 2 个分支基因结构分化一致，2 个分支在各自进化过程中出现功能分化。本研究挖掘到 3 个可能与诱导木薯早期具有高度胚性分化能力相关的 Clade B 分支基因，可作为木薯组织培养和遗传转化效率改良候选基因，具有重要研究价值。ABA 和 PEG 模拟干旱胁迫的转录组数据分析发现 SC20504G00910 在 ABA 和 PEG 处理后表达量均上升，表明其可能参与 ABA 信号通路介导的干旱响应。水稻 *OsAHL1* 的过表达显著提高了植株对干旱胁迫的耐受性，且杨树中的 *PtrAHL34* 在干旱胁迫下的表达模式和功能与 *OsAHL1* 相似^[28]。该结果表明不同单双子叶植物 *AHL* 基因在响应干旱胁迫上具有功能保守性。*Xam* 严重威胁木薯的生长发育。本研究发现响应 *Xam* 侵染的 *MeAHL* 基因，包括已报道的 *MeAHL17*，为利用现在分子技术创制抗细菌性枯萎病木薯新种质提供新的目标基因资源。

本研究通过生物信息方法鉴定木薯基因组的 *MeAHL* 基因，并系统解析其基因组分布特征、基

因结构特征、基因家族形成的进化机制及分支之间的分化, 为理解木薯 *MeAHL* 基因家族起源和演化提供重要基础。本研究进一步通过大规模转录组数据集系统解析 *MeAHL* 基因在不同组织、不同生物胁迫和非生物胁迫条件下的基因表达模式, 挖掘与木薯分化、抗病和抗逆相关的 *MeAHL* 基因。研究结果为理解木薯 AHL 家族起源演化及其在不同生物学过程的表达模式提供重要理论基础, 为进一步深入研究 *MeAHL* 基因在木薯生长发育和逆境胁迫响应过程中的重要作用奠定基础。

参考文献

- [1] BREDESON J V, LYONS J B, PROCHNIK S E, WU G A, HA C M, EDSINGERGONZALES E, GRIMWOOD J, SCHMUTZ J, RABBI I Y, EGESI C. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(5): 562-570.
- [2] NASSAR N M. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, genetic resources: origin of the crop, its evolution and relationships with wild relatives[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2002, 1(4): 298-305.
- [3] PARMAR A, STURM B, HENSEL O. Crops that feed the world: production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses[J]. *Food Security*, 2017, 9: 907-927.
- [4] BAEYENS J, KANG Q, APPELS L, DEWIL R, LV Y Q, TAN T W. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol[J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2015, 47: 60-88.
- [5] 张鹏. 我国薯类基础研究的动态与展望[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(4): 65-71.
ZHANG P. Dynamics and prospects of basic research on tubers in China[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(4): 65-71. (in Chinese)
- [6] DEVI B, KUMAR M N, CHUTIA M, BHATTACHARYYA N. Abiotic and biotic stress challenges of cassava in changing climate and strategies to overcome: a review[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 305: 111432.
- [7] 杨莉, 曲茜彤, 陈子航, 邹婷婷, 王全华, 王小丽. 菠菜 AT-hook 基因家族鉴定与水杨酸响应表达谱分析[J]. *植物学报*, 2025, 60(3): 377-392.
YANG L, QU X T, CHEN Z H, ZOU T T, WANG Q H, WANG X L. Identification of the AT-hook gene family and analysis of salicylic acid - responsive expression profiles in spinach[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2025, 60(3): 377-392. (in Chinese)
- [8] ZHAO J F, 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.
- [9] ZHAO J F, FAVERO D S, QIU J W, 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: 1-19.
- [10] 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.
- [11] ŠIRL M, ŠNAJDROVÁ T, GUTIÉRREZ-ALANÍS 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.
- [12] XIAO C W, CHEN F L, YU X H, LIN C T, FU Y F. Overexpression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71(1/2): 39-50.
- [13] JACQUES C N, FAVERO D S, KAWAMURA A, SUZUKI T, SUGIMOTO K, NEFF M M. SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME B-4#3 reduces the expression of PIF-activated genes and increases expression of growth repressors to regulate hypocotyl elongation in short days[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 1-19.
- [14] 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.
- [15] 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]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 15307-15316.
- [16] TAYENGWA R, SHARMA KOIRALA P S, PIERCE C F, WERNER B E, NEFF M M. Overexpression of AtAHL20 causes delayed flowering in *Arabidopsis* via repression of FT expression[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 559.
- [17] ZHOU Y S, ZHANG X M, CHEN J, GUO X P, WANG H Y, ZHEN W B, ZHANG J L, HU Z B, ZHANG X B, BOTELLA J R, ITO T, GUO S. Overexpression of AHL9 accelerates leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC*

- Plant Biology, 2022, 22(1): 248.
- [18] CAI G Q, KIM S C, LI J W, ZHOU Y M, WANG X M. Transcriptional regulation of lipid catabolism during seedling establishment[J]. Molecular Plant, 2020, 13(7): 984-1000.
- [19] JEONG H N, SUN H J, ZUO Z F, LEE D H, LEE H Y. Overexpression of ATHG1/AHL23 and ATPG3/AHL20, *Arabidopsis* AT-hook motif nuclear-localized genes, confers salt tolerance in transgenic *Zoysia japonica*[J]. Plant Biotechnology Reports, 2020, 6: 351-361.
- [20] ZHOU L G, LIU Z C, LIU Y H, KONG D Y, LI T F, YU S W, MEI H W, XU X Y, LIU H Y, CHEN L, LUO L J. A novel gene OsAHL1 improves both drought avoidance and drought tolerance in rice[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30264.
- [21] LI Y, JIANG L, MO W, WANG L H, ZHANG L, CAO Y P. AHLs' life in plants: especially their potential roles in responding to Fusarium wilt and repressing the seed oil accumulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 208: 509-519.
- [22] ZHANG W M, CHENG X Z, FANG D, CAO J. AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED (AHL) proteins of ancient origin radiate new functions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 214: 290-300.
- [23] KUMAR A, SINGH S, MISHRA A. Genome-wide identification and analyses of the AHL gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. 3 Biotech, 2023, 13(7): 248.
- [24] WANG L Y, LI T T, LIU N, LIU X C. Identification of tomato AHL gene families and functional analysis their roles in fruit development and abiotic stress response[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 202: 107931.
- [25] WANG M, CHEN B W, ZHOU W, XIE L N, WANG L S, ZHANG Y L, ZHANG Q Z. Genome-wide identification and expression analysis of the AT-hook motif nuclear localized gene family in soybean[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 361.
- [26] ZHAO L J, YOUJUN L, CHEN W, YAO J B, LI Y. Genome-wide identification and analyses of the AHL gene family in cotton (*Gossypium*)[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 69.
- [27] JIA P, LIU J L, YAN R, YANG K Y, DONG Q, LUAN H, ZHANG X M, 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.
- [28] WANG H Z, LENG X, YANG J, ZHANG M Q, ZENG M Z, XU X M, WANG F D, LI C H. Comprehensive analysis of AHL gene family and their expression under drought stress and ABA treatment in *Populus trichocarpa*[J]. PeerJ, 2021, 9: e10932.
- [29] 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.
- [30] HU W, JI C M, LIANG Z, YE J Q, OU W J, DING Z H, ZHOU G, TIE W W, YAN Y, YANG J H. Resequencing of 388 cassava accessions identifies valuable loci and selection for variation in heterozygosity[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 1-23.
- [31] WANG X T, TANG X N, ZHANG Y W, GUO Y Q, YAO Y, LI R M, WANG Y J, LIU J, GUO J C. Promoter of cassava MeAHL31 responds to diverse abiotic stresses and hormone signals in transgenic *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(14): 7714.
- [32] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [33] QIAO X, LI Q H, YIN H, QI K J, LI L T, WANG R Z, ZHANG S L, PATERSON A H. Gene duplication and evolution in recurring polyploidization-diploidization cycles in plants[J]. Genome Biology, 2019, 20(1): 38.
- [34] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, FRITH M, GRANT C E, CLEMENTI L, REN J, LI W W, NOBLE W S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(suppl. 2): W202-W208.
- [35] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, GU J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [36] KIM D, PAGGI J M, PARK C, BENNETT C, SALZBERG S L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 907-915.
- [37] PERTEA M, KIM D, PERTEA G M, LEEK J T, SALZBERG S L. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. Nature Protocols, 2016, 11(9): 1650-1667.
- [38] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [39] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA N S, WANG J T, RAMAGE D, AMIN N, SCHWIKOWSKI B, IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Research, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [40] MARTINČOVÁ M, SOUKUP A. Twenty years of AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED (AHL) gene family research—their potential in crop improvement[J]. Current Plant Biology, 2025, 42: 100460.

- [41] LAWTON-RAUH A. Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(3): 396-409.
- [42] XIAO L, CHENG D, OU W, CHEN X, RABBI I Y, WANG W Q, LI K M, YAN H B. Advancements and strategies of genetic improvement in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): from conventional to genomic approaches[J]. *Horticulture Research*, 2025, 12(3): uhae341.
- [43] HU W, JI C M, SHI H T, LIANG Z, DING Z H, YE J Q, OU W J, ZHOU G, TIE W W, YAN Y. Allele-defined genome reveals biallelic differentiation during cassava evolution[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(6): 851-854.
- [44] MARAND A P, EVELAND A L, KAUFMANN K, SPRINGER N M. cis-Regulatory elements in plant development, adaptation, and evolution[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2023, 74(1): 111-137.