

艾 *AP2/ERF* 基因家族鉴定及表达模式分析

岳雪雪¹, 肖 闯¹, 张倩雯¹, 彭赛男¹, 陈昌婕¹, 周 佳¹, 李金鑫¹, 李宇琨¹,
苗玉焕^{1,2*}, 刘大会^{1,2*}

(1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065)

摘要: 艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 为我国传统中药, 以叶入药, 主要含黄酮类、酚酸、挥发油等多种化合物, 具有多种药理活性。 *AP2/ERF* 转录因子在植物中数量较多, 主要参与植物的生长发育、非生物胁迫响应及次生代谢物合成调控, 但艾 *AP2/ERF* 基因家族的研究及其功能鲜有报道。本研究系统鉴定了艾 *AP2/ERF* 基因家族, 分析其系统进化树、蛋白理化性质、亚细胞定位、保守基序和启动子作用元件、茉莉酸甲酯诱导表达模式及不同组织表达模式。结果表明, 艾基因组中共含有 204 个 *AP2/ERF* 转录因子, 其编码的蛋白质由 88~483 个氨基酸组成, 相对分子质量为 10~52.94 kDa, 理论等电点为 4.62~9.88。亚细胞预测显示, 绝大部分 *AP2/ERF* 位于细胞核、细胞质而少部分位于细胞膜和叶绿体。根据拟南芥 *AP2/ERF* 家族分类, 艾 *AP2/ERF* 蛋白分为 Soloist、*AP2*、*ERF* (B3、B4、B5、B6) 及 DREB (A1、A2、A4、A5、A6) 四个亚家族, 其中 DREB 家族所占比例最大, 同一亚家族具有相似的保守基序。顺式作用元件分析表明, *AP2/ERF* 启动子上具有大量响应光和非生物胁迫的元件。表达模式分析显示, *AP2/ERF* 家族大部分基因主要在根和茎中优势表达, 其中 19 个在叶片中优势表达, 77 个会受到茉莉酸甲酯诱导表达, 其中既在叶片中优势表达又受到茉莉酸甲酯诱导表达的基因有 16 个, 这些 *AP2/ERF* 基因可能是艾叶中有效成分合成的关键调控基因。该研究为艾 *AP2/ERF* 家族基因的功能研究及其在艾叶活性成分合成中的积累调控作用奠定了基础。

关键词: 艾; 有效成分; *AP2/ERF* 转录因子; 生物信息学; 表达模式

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2634-14

Identification and expression analysis of *AP2/ERF* gene family in *Artemisia argyi*

YUE Xue-xue¹, XIAO Chuang¹, ZHANG Qian-wen¹, PENG Sai-nan¹, CHEN Chang-jie¹,
ZHOU Jia¹, LI Jin-xin¹, LI Yu-kun¹, MIAO Yu-huan^{1,2*}, LIU Da-hui^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China)

Abstract: *Artemisia argyi* is a traditional Chinese medicine in China, which is used as medicine with its leaves. The leaves of *A. argyi* mainly contain flavonoids, phenolic acids, volatile oils and other compounds, and have a variety of pharmacological activities. *AP2/ERF* transcription factors are abundant in plants and are mainly involved in plant growth and development, abiotic stress response and secondary metabolite biosynthesis regulation. However, there are few reports on the *AP2/ERF* gene family and its functions in *A. argyi*. In this study, we systematically identified the *AP2/ERF* gene family in *A. argyi* genome, and analyzed its phylogenetic tree, protein physicochemical properties, subcellular localization, conserved motifs, promoter elements, and expression patterns. The results showed that a total of 204 *AP2/ERF* transcription factors were identified in *A. argyi* genome, encoding

收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-06-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304660, 32270391); 国家重点研发计划 (2023YFC3503804); 湖北省自然科学基金创新群体项目 (2023AFA032).

*通讯作者 Tel: 86-27-68890106, E-mail: liudahui@hbcum.edu.cn; miaoyh@hbcum.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0277

proteins consisting of 88–483 amino acids with a relative molecular mass of 10–52.94 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.62–9.88. Subcellular prediction showed that the majority of AP2/ERFs were located in the nucleus, cytoplasm, and the minority of them is located in the membrane and chloroplasts. According to the Arabidopsis AP2/ERF family classification, *A. argyi* AP2/ERF proteins were divided into four subfamilies: Soloist, AP2, ERF (B3, B4, B5, B6), and DREB (A1, A2, A4, A5, A6), among which DREB family accounted for the largest proportion, and the same subfamily had similar conserved motifs. *cis*-Acting element analysis showed that AP2/ERF promoters have a large number of elements responding to light and abiotic stress. Expression pattern analysis showed that most of the genes of the AP2/ERF family were dominantly expressed mainly in roots and stems, of which 19 were dominantly expressed in leaves, 77 would be induced to be expressed by methyl jasmonate, of which 16 genes were both dominantly expressed in leaves and induced to be expressed by methyl jasmonate, and these AP2/ERF genes may be the key regulatory genes for the synthesis of active ingredients in *A. argyi* leaves. This study lays the foundation for the functional study of AP2/ERF family genes and their regulating roles in the active components biosynthesis in *A. argyi* leaves.

Key words: *Artemisia argyi*; active component; AP2/ERF transcription factor; bioinformatics; expression pattern

艾 (*Artemisia argyi*) 为菊科多年生草本植物, 是我国传统药用植物和民俗植物, 早在《诗经》就记录了艾, 其干燥叶片具有温经止血、散寒止痛、祛湿止痒等功效^[1]。艾叶中含有多种药效成分, 如黄酮、酚酸、挥发油等^[2], 其也是艾灸的主要原材料, 具有较好的药用价值。随着艾叶、艾绒在临床医疗和日化产品等领域的广泛应用, 艾叶的品质研究引起了广泛关注, 提高艾叶中药用活性成分的含量对其品质的提升具有重大意义。

转录因子 (transcription factors, TFs) 是一类具有特定序列的 DNA 结合蛋白, 能与相应的顺式作用元件发生相互作用。通过这种相互作用, 转录因子可以调控相关基因的转录活性, 激活或是抑制目标基因的表达^[3]。AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor) 又称 APETALA2/乙烯响应元件结合蛋白, 是植物中特有的转录因子, 在药用植物贯叶连翘、杜仲及三七^[4-6]等均有报道。根据其保守结构域数目及保守基序的相似性, AP2/ERF 基因家族大致可分为五个亚家族分别为: DREB (dehydration-responsive element binding proteins)、ERF (ethylene-responsive factor)、AP2 (APETALA2)、RAV (related to AB13/VP) 及 Soloist^[4]。该转录因子家族主要参与植物器官发育、生物合成及对逆境胁迫的响应^[7-10]等生物过程。此外, AP2/ERF 转录因子在植物类黄酮、萜类等化合物的生物合成调控中也起到重要作用。AP2/ERF 转录因子与青钱柳黄酮类化合物生物合成中关键酶的表达调控有关^[11]。SmERF73 调控丹参酮合成相关基因的表达, 超表达该基因可显著提高丹参酮类化合物的含量, 而 SmERF73 的沉默降低了相关基因的表达及丹参酮的积累^[12]。

转录因子调控药用植物中药效成分的生物合成普遍存在。研究发现, 艾中药效成分主要在叶片中合成,

根和茎中含量较低^[13]。WRKY、bHLH、bZIP 等转录因子在艾叶中萜类化合物的生物合成具有一定的调控作用^[14-16]。AP2/ERF 作为植物中重要的一类转录因子家族, 在艾叶中还未有研究。除此之外, 艾叶有效成分还受到植物激素的诱导表达。本团队前期研究表明, 茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理艾叶后, 可以诱导艾叶黄酮和萜类成分含量的大幅提升。因此鉴定在艾叶片组织中优势表达并且受 MeJA 诱导表达的 AP2/ERF 基因, 对于艾叶有效成分的生物合成调控研究具有重要意义。

本团队前期已对蕲艾进行了蕲艾高质量染色体级别基因组分析, 为艾基因组分析奠定了一定的数据基础。本研究利用生物信息学方法, 对艾 AP2/ERF 基因家族进行了全基因组系统鉴定, 包括其基因家族信息、染色体定位、系统进化、保守基序、基因结构及表达模式等, 以期为今后深入研究艾 AP2/ERF 基因家族在艾叶有效成分生物合成中的调控机制奠定基础。

材料与方法

材料 本团队前期在湖北蕲春筛选的富含有效成分的艾种质“香艾”(基因组测序材料)。

AP2/ERF 基因全基因组的鉴定、系统发育树构建及染色体定位 在 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 上搜索并下载拟南芥 AP2/ERF 家族的基因序列, 并作为参考序列。将艾蛋白组序列与已下载的拟南芥序列进行 BLASTP 比对, *E* 值设置为 $1e^{-5}$, 最终得到 258 个候选艾 AP2/ERF 基因。接着在 PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) 上下载 AP2/ERF 对应结构域 PF00847, 基于 TBtools (v2.069) Simple HMM Search 进行比对, 最终得到 385 个候选艾 AP2/ERF 基因。基于二者筛选结果

取交集,得到256个艾*AP2/ERF*基因,将其结果上传至NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行保守结构域分析,并剔除无保守结构域的序列,最终得到了204个艾*AP2/ERF*家族成员。

利用204个*AP2/ERF*蛋白序列与拟南芥的*AP2/ERF*家族成员进行系统进化树分析,通过MEGA (v11.0) 比对工具采取NJ (neighbour-join) 方法,并进行了重复1 000次的bootstrap检验,所有设定均采用默认值。与此同时,从艾基因组注释GFF中筛选出候选基因ID,利用TBtools (v2.069) 将筛选出来的基因ID在染色体上进行可视化定位。

***AP2/ERF*基因家族蛋白质特征分析及亚细胞定位** 基于TBtools (v2.069) 中的Protein Paramter Calc工具,对所筛选出来的204个*AP2/ERF*序列进行蛋白理化性质分析,包括氨基酸长度、理论等电点值及相对分子质量等。*AP2/ERF*蛋白的亚细胞定位预测使用在线工具 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PI>) 进行分析。

***AP2/ERF*基因保守基序、基因结构和顺式作用元件分析** 通过在线网站MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>),对204个*AP2/ERF*蛋白的保守基序进行分析,保守基序序列设为10,其余均为默认参数。利用TBtools (v2.069) 中的Visualize Gene Structure工具对所筛选的204个艾*AP2/ERF*基因结构进行可视化。提取基因组中*AP2/ERF*基因上游2 000 bp序列,提交至PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件分析,筛选并合并响应元件标签后利用TBtools (v2.069) 软件进行可视化。

***AP2/ERF*基因家族表达模式分析** 组织表达模式:取香艾根 (root, R)、茎秆 (stem, S)、叶芽 (leaf bud, LA)、嫩叶 (young leaves, LB)、成熟叶 (mature leaves, LC)、老叶 (old leaves, LD) 等不同组织作为实验材料分别进行转录组测定,转录组数据参考本团队前期发表的蕪艾全基因组测序和组装结果。MeJA诱导表达模式:选择长势基本一致且健康的香艾植株,喷施300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA,分别处理6、12、24、48 h,对照为用

去离子水处理的CK,每个处理重复3次,进行转录组测定。获得不同处理时间下*AP2/ERF*基因家族的表达量,利用在线工具迈维云 (<https://cloud.metware.cn/>) 进行绘制表达量热图,分析*AP2/ERF*基因家族成员在MeJA处理不同时间下的表达模式。

qRT-PCR分析 取艾不同组织包括R、S、LA、LB、LC、LD六个组织部位。根据天根试剂盒提取叶片不同发育期的总RNA,通过NanoDrop 2 000紫外分光光度计检测所提RNA的A260/A280,利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测所提RNA完整性。将符合要求的RNA利用反转录试剂盒进行合成cDNA,以cDNA为模板, β -actin为内参基因,利用Premier 5设计引物(表1)用于qRT-PCR反应,引物由生工生物(上海)股份有限公司合成。qRT-PCR反应体系及条件按照ABclon公司的qRT-PCR试剂盒说明书进行,利用荧光定量qPCR仪进行反应,相对定量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法。

结果与分析

1 艾*AP2/ERF*基因家族成员鉴定

基于HMM及本地BLASTP比对从艾叶基因组数据库筛选*AP2/ERF*家族基因,剔除无保守结构域的序列,最终筛选得到204个艾*AP2/ERF*家族基因。为了进一步揭示该家族成员的进化关系,利用拟南芥*AP2/ERF*成员与所筛选得到的204个艾*AP2/ERF*序列进行系统进化树构建。如图1所示,系统进化树分析表明艾中*AP2/ERF*家族成员主要分为四个亚家族,分别为Soloist、*AP2*、*ERF*及DRED,四个亚家族中DREB和*ERF*所占比例较大,其中*ERF*又分为*ERF B3*、*ERF B4*、*ERF B5*及*ERF B6*四个亚家族,而DREB又分为DREB A1、DREB A2、DREB A4、DREB A5及DREB A6五个亚家族。基于本课题组所组装的艾参考基因组,利用TBtools (v2.069) 对候选的204个*AP2/ERF*基因进行染色体水平的可视化分析,如图2所示,结果表明204个*AP2/ERF*基因分别位于10条染色体上,且其分布与染色体长度及密度无关,每条染色体上分布的基因数据相差较大,比如5、6及10号染色体上分布基因数目较多,而8号染色体上仅有一个基因。

Table 1 Sequences of primers for qRT-PCR

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Reference gene	GCAAGAGCTTGAAACCGCAA	AAGAGAACCTCAGGGCAACG
<i>AP2-1</i>	CCGTAGATCATTCTCGGCC	GGTTGTTGAGACGTTGGGGA
<i>AP2-2</i>	CACAAGGCACCATCAACACG	ACGGCATTAAAGCCTCGGAA
<i>ERF-1</i>	GGGGGAAGTTCACAGCAGAA	AGACCCTCGGTGCTTAAACG
<i>ERF-2</i>	GATCCACAAAAGGCGGCAAG	AGAGCTGCCTCATCGTATGC
<i>DREB-1</i>	CCGGTCTATCGAGGTGTTTCG	GCTCCGACCAGTTCAGGAAA
<i>DREB-2</i>	TCCGAGATTCGACACCCTC	AATGGCAGCCTCGTCATAGG

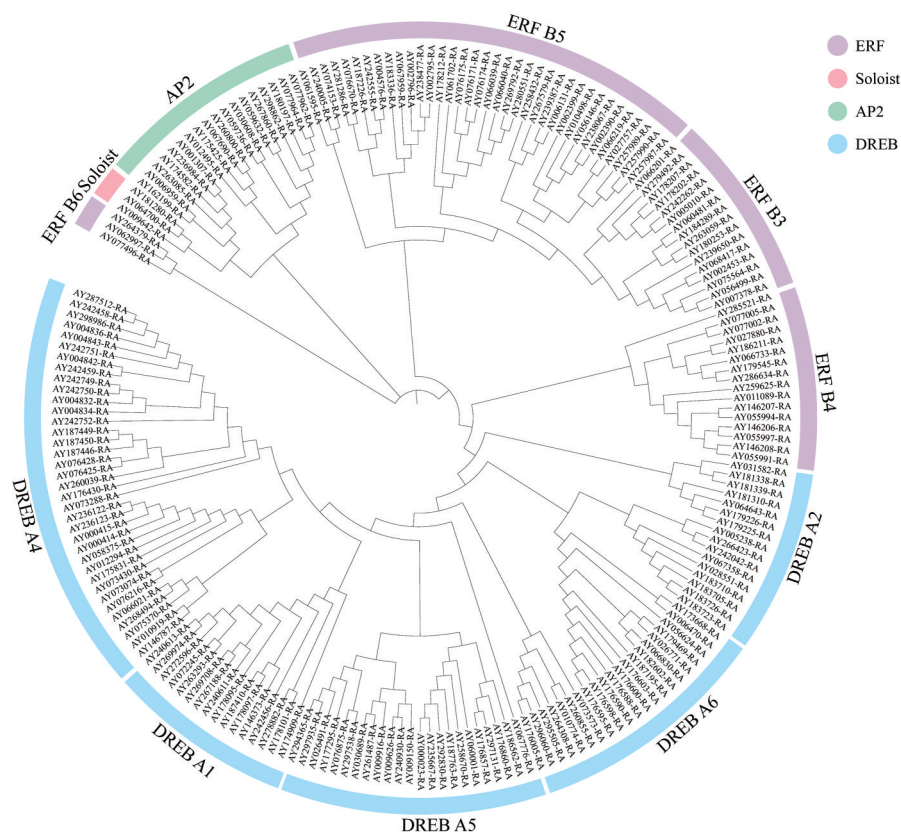


Figure 1 Phylogenetic tree of *AP2/ERF* gene family. DREB: Dehydration-responsive element binding proteins; ERF: Ethylene-responsive factor; AP2: APETALA2; RAV: Related to AB13/VP

2 艾 *AP2/ERF* 基因家族蛋白理化性质和亚细胞定位预测

基于艾 *AP2/ERF* 基因 ID 和艾蛋白质 fasta 文件, 通过 TBtools (v2.069) 软件中的 Fasta Extract (Basic) 工具提取 204 个 *AP2/ERF* 蛋白序列, 依次命名为 *AP2/ERF1*~*AP2/ERF204*, 利用 Protein Paramter Calc 工具预测 *AP2/ERF* 的蛋白理化性质, 利用在线工具 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测该蛋白的亚细胞定位。结果如表 2 所示, 发现艾 *AP2/ERF* 蛋白氨基酸长度范围为 88~483、相对分子质量处于 10~52.94 kDa, 理论等电点值为 4.62~9.88, 脂溶性指数约在 41.24~82.03, 平均亲水性约在 -1.22~0.407。204 个 *AP2/ERF* 蛋白中, 有 37 个蛋白为稳定蛋白 (不稳定指数, instability index < 40), 其余蛋白都是不稳定蛋白, 所有 *AP2/ERF* 蛋白都是亲水性蛋白。亚细胞定位显示绝大多数蛋白位于细胞质和细胞核中, 仅有一个蛋白 (AY183336-RA) 位于叶绿体中, 一个蛋白 (AY012495-RA) 位于细胞膜中。

3 艾 *AP2/ERF* 基因家族保守基序和基因结构分析

通过在线工具 MEME 对艾 *AP2/ERF* 基因家族蛋白保守基序进行分析, 共预测了 10 个 motif (motif 1~10), 如图 3b。发现 motif 1 和 motif 2 普遍存在于 *AP2/*

ERF 家族中, 视为该家族最保守的两个蛋白基序。其中, *AP2* 亚家族中所含 motif 较多且近一半的 motif 基序较长, 而 *DREB* 亚家族的保守基序最少, 主要包括 motif 1 和 2。此外, 保守基序在亚家族内也会出现特异性, 如 *ERF* 亚家族中只有两个蛋白含有 motif 6, *AP2* 亚家族中只有部分蛋白含有 motif 4、5、8 及 9。基因结构分析显示 *AP2* 亚家族基因结构较长, 而 *DREB* 亚家族基因结构普遍较短, 大多以 CDS 为主 (图 3Bc)。

4 艾 *AP2/ERF* 基因家族启动子顺式作用元件分析

艾 *AP2/ERF* 基因家族启动子顺式作用元件分析发现, 脱落酸响应 (abscisic acid responsiveness) 和光响应相关元件 (light responsiveness) 在所有亚家族中普遍存在, 干旱诱导 (MYB drought-inductility)、蛋白结合位点 (protein binding site)、分生组织表达 (meristem expression) 和胁迫响应等元件除个别亚族未出现, 在其他亚族中也均有发现 (图 4)。由图 4 可知, *AP2/ERF* 家族中光响应相关元件 (light responsiveness)、茉莉酸甲酯响应元件 (MeJA-responsiveness)、厌氧响应元件 (anaerobic induction) 及脱落酸响应元件 (abscisic acid responsiveness) 占比较高, 分别为 42.2%、10.59%、9.48% 和 8.95%, 其他响应元件约占 26.06%。

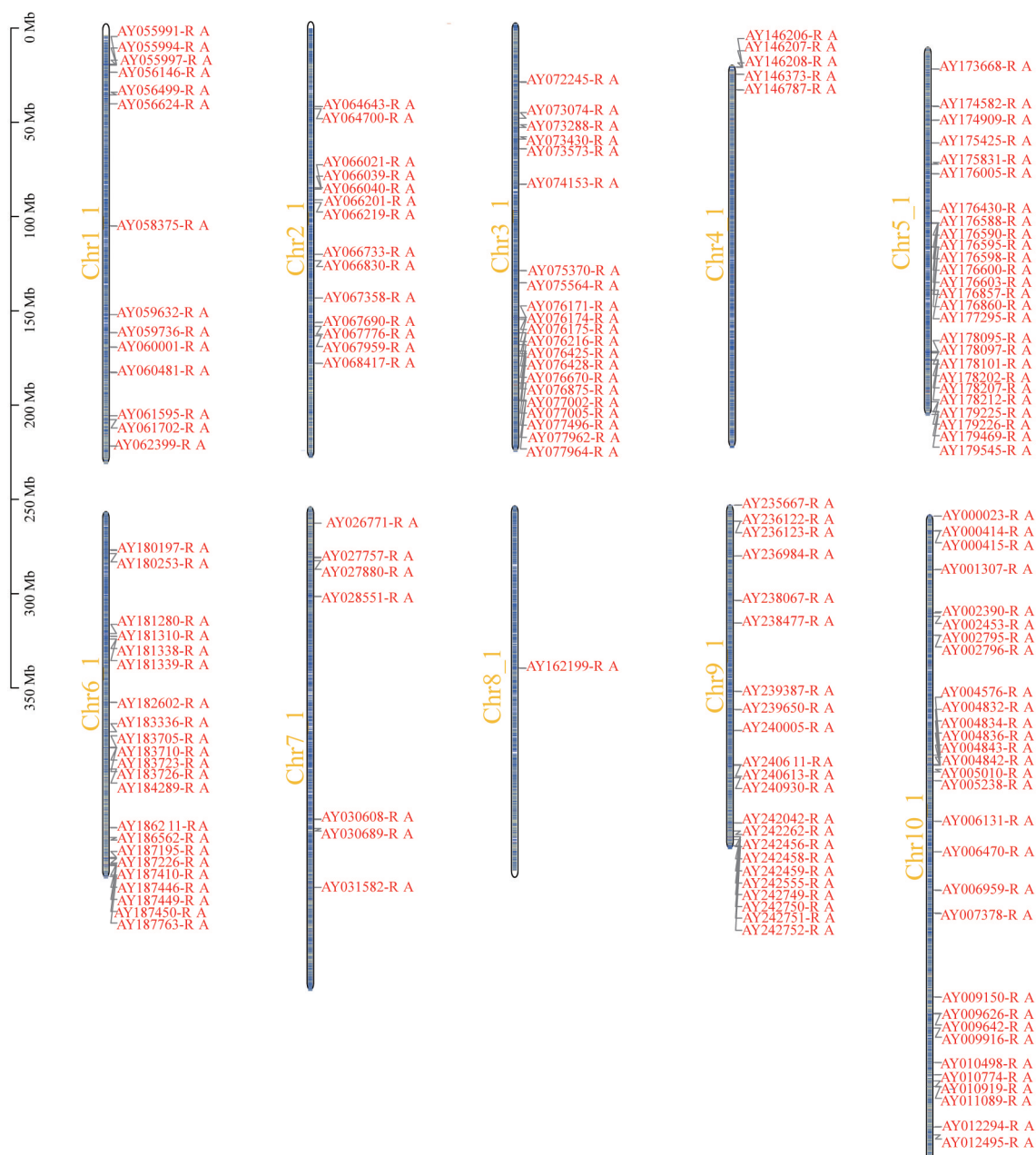


Figure 2 The distribution of members of the *AP2/ERF* family on chromosomes

Table 2 Information and characteristics of the *AP2/ERF* gene family of *A. argyi*. pI: Isoelectric point; GRAVY: Grand average of hydrophobicity

Sequence ID	Amino acid length	Molecular mass/kDa	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
AY180197-RA	406	45.49	9.37	30.16	60.34	-0.726	Cytoplasm, nucleus
AY180253-RA	137	15.43	6.75	43.86	57.01	-0.894	Nucleus
AY181280-RA	340	38.04	9.12	40.14	69.35	-0.569	Nucleus
AY181310-RA	321	35.75	4.91	53.21	70.72	-0.695	Cytoplasm, nucleus
AY181339-RA	211	23.39	9.68	38.36	68.67	-0.716	Cytoplasm, nucleus
AY181338-RA	208	23.08	9.62	37.84	68.75	-0.718	Cytoplasm
AY182602-RA	355	41.04	5.25	59.31	41.24	-1.101	Nucleus
AY183336-RA	303	35.19	6.67	56.14	78.51	-0.469	Chloroplasts, cytoplasm
AY183705-RA	467	52.40	5.57	45.44	78.14	-0.369	Nucleus
AY183710-RA	314	34.62	4.67	39.04	58.79	-0.697	Cytoplasm, nucleus
AY183723-RA	534	58.29	4.71	43.03	56.89	-0.586	Nucleus

Continued

Sequence ID	Amino acid length	Molecular mass/kDa	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
AY183726-RA	278	30.56	5.02	43.97	56.62	-0.611	Nucleus
AY184289-RA	137	15.14	6.06	31.35	62.12	-0.743	Nucleus
AY186211-RA	205	23.41	7.97	55.68	58.59	-0.895	Nucleus
AY186562-RA	170	18.82	4.98	39.25	63.18	-0.589	Cytoplasm, nucleus
AY187195-RA	298	33.09	8.98	40.32	65.17	-0.668	Cytoplasm, nucleus
AY187226-RA	315	34.95	6.26	52.22	55.08	-0.726	Cytoplasm, nucleus
AY187410-RA	202	22.54	5.52	46.12	57.57	-0.690	Cytoplasm, nucleus
AY187446-RA	190	21.40	5.19	62.77	66.32	-0.521	Cytoplasm, nucleus
AY187449-RA	188	20.93	4.85	56.22	66.54	-0.476	Cytoplasm, nucleus
AY187450-RA	190	21.25	5.49	55.68	68.84	-0.441	Cytoplasm, nucleus
AY187763-RA	873	96.38	4.89	50.28	76.21	-0.579	Nucleus
AY264308-RA	197	22.93	8.62	81.10	57.01	-0.914	Nucleus
AY258670-RA	236	25.80	4.75	64.52	57.50	-0.581	Cytoplasm, nucleus
AY292830-RA	226	25.10	4.43	53.93	53.54	-0.639	Cytoplasm, nucleus
AY267860-RA	381	43.34	9.16	34.36	62.47	-0.743	Cytoplasm
AY026491-RA	219	23.96	7.65	79.63	57.08	-0.515	Cytoplasm, nucleus
AY026771-RA	269	30.03	5.65	47.25	61.00	-0.643	Nucleus
AY027757-RA	205	22.86	9.45	52.61	61.90	-0.709	Nucleus
AY027880-RA	287	32.17	6.37	58.42	56.13	-0.835	Nucleus
AY028551-RA	243	27.06	5.91	53.74	59.55	-0.670	Cytoplasm, nucleus
AY030608-RA	611	68.67	6.84	41.31	56.69	-0.854	Nucleus
AY030689-RA	176	19.87	9.03	51.61	56.02	-0.949	Cytoplasm, nucleus
AY031582-RA	223	24.99	6.48	48.51	64.66	-0.889	Cytoplasm, nucleus
AY261487-RA	155	17.64	8.88	40.57	67.94	-0.685	Cytoplasm, nucleus
AY072245-RA	111	12.49	10.72	41.42	79.19	-0.505	Nucleus
AY073074-RA	164	18.85	5.56	34.90	73.23	-0.596	Nucleus
AY073288-RA	176	18.65	4.68	49.47	71.19	-0.244	Cytoplasm, nucleus
AY073430-RA	203	22.61	8.69	48.66	66.31	-0.728	Cytoplasm, nucleus
AY073573-RA	197	21.92	8.35	62.23	74.21	-0.639	Nucleus
AY074153-RA	179	20.37	8.66	57.85	78.49	-0.427	Cytoplasm, nucleus
AY075370-RA	227	25.27	6.06	36.88	53.00	-0.815	Nucleus
AY075564-RA	170	19.08	9.81	53.33	76.88	-0.512	Cytoplasm, nucleus
AY076174-RA	208	23.34	5.72	60.54	69.47	-0.512	Nucleus
AY076175-RA	212	23.84	5.24	66.37	67.22	-0.577	Nucleus
AY076171-RA	216	24.19	6.00	61.78	67.78	-0.525	Nucleus
AY076216-RA	202	22.77	5.81	46.18	72.52	-0.634	Nucleus
AY076428-RA	168	18.21	4.75	45.18	61.67	-0.389	Nucleus
AY076425-RA	169	18.19	4.66	50.11	63.61	-0.475	Cytoplasm, nucleus
AY076670-RA	265	30.03	6.16	52.70	66.19	-0.667	Nucleus
AY076875-RA	205	22.71	5.39	55.14	74.83	-0.358	Cytoplasm, nucleus
AY077002-RA	245	27.94	8.35	52.80	66.94	-0.805	Nucleus
AY077005-RA	132	15.15	6.20	53.15	62.95	-0.901	Nucleus
AY077496-RA	208	23.32	8.17	34.71	60.96	-0.796	Cytoplasm
AY077962-RA	406	45.48	9.24	28.34	61.53	-0.682	Cytoplasm, nucleus
AY077964-RA	477	53.43	8.78	28.65	64.23	-0.611	Cytoplasm, nucleus
AY000023-RA	219	24.45	4.38	51.69	54.79	-0.675	Cytoplasm, nucleus
AY000414-RA	222	24.27	4.93	48.75	54.95	-0.690	Cytoplasm, nucleus
AY000415-RA	222	24.37	5.35	52.38	60.23	-0.583	Cytoplasm, nucleus
AY001307-RA	261	28.99	9.12	42.40	51.99	-0.826	Cytoplasm, nucleus
AY002453-RA	227	25.76	5.49	67.66	64.05	-0.708	Cytoplasm, nucleus
AY002390-RA	122	13.76	9.84	74.25	51.39	-0.705	Nucleus
AY002795-RA	214	24.67	9.84	28.34	68.79	-0.865	Nucleus
AY002796-RA	186	21.63	9.64	34.20	77.58	-0.803	Cytoplasm
AY004576-RA	337	37.71	5.02	52.72	63.56	-0.749	Nucleus
AY004834-RA	164	17.59	4.92	48.02	54.33	-0.822	Cytoplasm, nucleus
AY004842-RA	201	21.85	9.46	58.71	60.85	-0.672	Cytoplasm, nucleus
AY004843-RA	188	20.07	6.07	61.01	51.06	-0.818	Cytoplasm, nucleus
AY004832-RA	153	16.37	4.90	55.22	68.43	-0.454	Cytoplasm, nucleus
AY005010-RA	252	28.30	5.36	51.89	68.13	-0.510	Nucleus

Continued

Sequence ID	Amino acid length	Molecular mass/kDa	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
AY004836-RA	188	19.98	6.07	55.72	53.67	-0.774	Cytoplasm, nucleus
AY005238-RA	331	36.15	8.82	55.99	51.57	-0.760	Nucleus
AY006131-RA	278	30.56	4.93	52.25	53.06	-0.745	Nucleus
AY006470-RA	299	33.49	7.11	50.92	71.47	-0.600	Nucleus
AY006959-RA	254	28.70	4.54	69.01	72.56	-0.701	Cytoplasm, nucleus
AY007378-RA	141	16.23	9.46	58.04	71.28	-0.750	Nucleus
AY009150-RA	147	16.34	9.54	29.41	61.22	-0.821	Cytoplasm, nucleus
AY009626-RA	147	16.32	9.54	29.41	63.88	-0.803	Nucleus
AY009642-RA	291	33.60	6.25	41.22	65.29	-0.731	Nucleus
AY009916-RA	111	12.53	9.23	49.16	60.72	-0.767	Cytoplasm, nucleus
AY010498-RA	203	22.27	8.41	49.19	67.29	-0.574	Nucleus
AY010774-RA	180	20.13	9.25	66.66	66.17	-0.691	Nucleus
AY010919-RA	190	21.42	5.82	43.74	81.11	-0.392	Nucleus
AY011089-RA	342	37.77	4.91	32.26	52.28	-0.712	Nucleus
AY012294-RA	245	27.02	5.06	55.68	56.61	-0.660	Nucleus
AY012495-RA	838	93.52	5.92	38.03	85.49	-0.325	Cell membrane
AY294365-RA	221	24.03	8.30	83.73	55.25	-0.506	Cytoplasm, nucleus
AY260039-RA	217	23.31	4.86	82.79	67.97	-0.453	Cytoplasm, nucleus
AY260800-RA	408	44.86	8.67	49.25	58.85	-0.666	Cytoplasm, nucleus
AY264379-RA	164	18.30	8.24	55.77	55.37	-0.848	Cytoplasm
AY278882-RA	210	23.14	4.78	64.39	54.43	-0.643	Cytoplasm, nucleus
AY298862-RA	406	45.48	9.24	28.34	61.53	-0.682	Cytoplasm, nucleus
AY279492-RA	133	14.90	9.27	36.68	58.80	-0.868	Nucleus
AY272596-RA	168	18.85	7.78	42.70	81.25	-0.268	Cytoplasm, nucleus
AY298986-RA	188	20.04	6.07	60.72	51.06	-0.808	Cytoplasm, nucleus
AY281286-RA	265	30.03	6.16	52.70	66.19	-0.667	Nucleus
AY287512-RA	107	11.69	8.93	77.98	59.44	-0.755	Cytoplasm, nucleus
AY295505-RA	197	22.93	8.62	81.10	57.01	-0.914	Nucleus
AY297935-RA	221	24.03	8.30	83.73	55.25	-0.506	Cytoplasm, nucleus
AY235667-RA	226	25.08	4.43	53.93	53.54	-0.639	Cytoplasm, nucleus
AY236122-RA	222	24.25	4.91	48.75	54.95	-0.690	Cytoplasm, nucleus
AY236123-RA	222	24.32	5.49	51.38	56.71	-0.646	Cytoplasm, nucleus
AY236984-RA	257	28.45	9.28	40.87	52.41	-0.782	Nucleus
AY238067-RA	123	13.91	9.98	75.12	50.98	-0.736	Nucleus
AY238477-RA	209	24.08	9.81	28.50	66.22	-0.907	Cytoplasm, nucleus
AY239387-RA	278	30.54	4.93	53.83	53.06	-0.738	Nucleus
AY239650-RA	124	13.82	4.81	42.41	59.92	-0.710	Cytoplasm, nucleus
AY240005-RA	179	20.31	8.66	55.27	79.61	-0.398	Cytoplasm, nucleus
AY240611-RA	192	21.75	6.96	56.65	78.75	-0.356	Cytoplasm, nucleus
AY240613-RA	192	21.77	6.24	50.16	78.70	-0.364	Cytoplasm, nucleus
AY240930-RA	161	18.02	9.16	29.39	68.01	-0.780	Cytoplasm, nucleus
AY242042-RA	331	36.12	8.81	55.30	53.32	-0.743	Nucleus
AY242262-RA	252	28.21	5.51	52.18	69.25	-0.493	Nucleus
AY242456-RA	203	22.79	6.84	41.87	68.23	-0.436	Cytoplasm, nucleus
AY242458-RA	188	20.04	6.07	60.72	51.06	-0.808	Cytoplasm, nucleus
AY242459-RA	189	20.33	6.41	58.56	63.65	-0.562	Cytoplasm, nucleus
AY242555-RA	360	40.36	4.54	47.91	62.47	-0.628	Nucleus
AY242749-RA	150	16.09	5.06	57.28	66.53	-0.483	Cytoplasm, nucleus
AY242750-RA	168	17.94	4.92	49.41	53.63	-0.817	Cytoplasm, nucleus
AY242752-RA	164	17.35	8.08	54.87	46.04	-0.850	Cytoplasm, nucleus
AY242751-RA	188	19.98	5.91	58.59	52.61	-0.812	Cytoplasm, nucleus
AY297538-RA	205	22.69	5.27	55.38	72.93	-0.366	Cytoplasm, nucleus
AY062997-RA	164	18.30	8.24	55.77	55.37	-0.848	Cytoplasm
AY064643-RA	355	39.94	5.66	45.82	74.39	-0.654	Cytoplasm, nucleus
AY064700-RA	350	39.54	9.68	51.18	66.20	-0.738	Nucleus
AY066021-RA	240	26.12	5.18	45.95	60.75	-0.643	Nucleus
AY066039-RA	199	22.37	7.99	70.19	66.68	-0.627	Nucleus
AY066040-RA	198	22.22	8.00	67.83	67.53	-0.619	Nucleus
AY066201-RA	275	30.76	5.35	43.71	75.16	-0.587	Nucleus

Continued

Sequence ID	Amino acid length	Molecular mass/kDa	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
AY066219-RA	210	23.44	9.39	61.95	57.57	-0.725	Nucleus
AY066733-RA	379	41.82	6.00	57.47	43.06	-0.960	Nucleus
AY066830-RA	301	33.52	8.40	56.09	60.66	-0.601	Nucleus
AY067358-RA	257	29.45	7.19	55.16	61.44	-0.836	Nucleus
AY067690-RA	242	27.46	8.78	46.23	59.21	-0.784	Nucleus
AY067776-RA	142	16.70	9.65	52.81	52.89	-1.361	Cytoplasm, nucleus
AY067959-RA	257	29.41	7.73	55.25	73.85	-0.684	Nucleus
AY068417-RA	205	23.50	8.76	49.73	70.44	-0.486	Nucleus
AY269974-RA	192	21.67	6.16	48.66	80.73	-0.332	Cytoplasm, nucleus
AY267188-RA	192	21.74	6.22	54.32	81.30	-0.324	Cytoplasm, nucleus
AY257987-RA	220	23.89	8.31	52.84	55.59	-0.629	Nucleus
AY257989-RA	185	20.36	8.95	54.21	58.22	-0.631	Nucleus
AY257990-RA	186	20.21	8.51	59.11	61.02	-0.560	Nucleus
AY286634-RA	356	39.67	9.17	49.54	57.87	-0.865	Nucleus
AY268494-RA	250	27.66	6.14	42.52	55.52	-0.776	Nucleus
AY267579-RA	319	35.41	4.90	43.75	60.88	-0.751	Nucleus
AY259625-RA	222	25.52	7.76	43.51	61.53	-0.845	Nucleus
AY173668-RA	230	25.74	9.57	34.46	81.83	-0.305	Nucleus
AY174582-RA	329	36.33	6.22	60.07	57.87	-0.634	Nucleus
AY174909-RA	213	23.96	9.18	54.48	67.84	-0.688	Cytoplasm, nucleus
AY175425-RA	202	23.00	9.85	50.85	62.28	-0.854	Nucleus
AY175831-RA	248	27.95	5.20	61.98	64.07	-0.548	Nucleus
AY176005-RA	195	22.70	8.62	79.47	58.56	-0.875	Nucleus
AY176430-RA	167	18.29	4.77	52.09	69.58	-0.417	Nucleus
AY176588-RA	236	26.78	9.66	41.55	73.56	-0.579	Nucleus
AY176590-RA	236	26.68	9.59	38.87	73.56	-0.562	Nucleus
AY176600-RA	237	26.86	9.02	43.88	71.60	-0.569	Cytoplasm, nucleus
AY176595-RA	236	26.72	9.59	38.87	74.79	-0.542	Nucleus
AY176598-RA	236	26.65	9.59	39.69	71.91	-0.581	Nucleus
AY176603-RA	234	26.21	8.77	39.10	72.52	-0.531	Nucleus
AY176857-RA	177	19.86	4.80	51.42	61.75	-0.634	Nucleus
AY176860-RA	176	19.68	5.20	53.45	65.45	-0.606	Cytoplasm, nucleus
AY177295-RA	211	23.23	4.99	64.41	61.14	-0.491	Cytoplasm, nucleus
AY178095-RA	203	22.54	5.08	52.54	64.43	-0.574	Cytoplasm, nucleus
AY178097-RA	160	18.04	5.86	46.81	68.94	-0.542	Cytoplasm, nucleus
AY178101-RA	364	40.32	4.88	56.07	70.16	-0.482	Nucleus
AY178202-RA	274	30.51	6.55	48.82	66.90	-0.522	Nucleus
AY178207-RA	270	30.09	5.71	53.11	74.04	-0.424	Nucleus
AY178212-RA	207	22.85	9.36	52.51	68.84	-0.494	Nucleus
AY179225-RA	530	60.40	6.92	40.84	67.34	-0.834	Cytoplasm, nucleus
AY179226-RA	487	55.62	4.97	39.04	70.47	-0.709	Cytoplasm, nucleus
AY179469-RA	272	30.15	6.31	46.69	64.63	-0.630	Nucleus
AY179545-RA	355	39.56	9.17	49.65	58.03	-0.857	Nucleus
AY258432-RA	329	36.31	6.56	57.13	48.66	-0.675	Nucleus
AY266423-RA	331	36.15	8.82	55.99	51.57	-0.760	Nucleus
AY260855-RA	180	20.11	9.25	68.04	68.89	-0.633	Nucleus
AY263059-RA	137	15.44	9.05	38.83	54.16	-0.940	Nucleus
AY280551-RA	199	22.30	7.99	70.19	66.68	-0.627	Nucleus
AY263293-RA	132	14.89	10.51	57.23	88.71	-0.396	Nucleus
AY269708-RA	192	21.74	6.22	54.32	81.30	-0.324	Cytoplasm, nucleus
AY263085-RA	154	17.30	7.99	38.90	75.45	-0.338	Nucleus
AY269792-RA	198	22.22	8.00	67.83	67.53	-0.619	Nucleus
AY296060-RA	197	22.93	8.62	81.10	57.01	-0.914	Nucleus
AY297131-RA	177	19.86	4.80	51.42	61.75	-0.634	Nucleus
AY055991-RA	316	35.40	4.90	39.17	57.47	-0.776	Cytoplasm, nucleus
AY055994-RA	331	36.86	6.26	40.28	59.85	-0.670	Nucleus
AY055997-RA	313	35.23	5.79	39.29	50.83	-0.706	Nucleus
AY056146-RA	321	35.48	9.70	48.23	67.45	-0.633	Nucleus
AY056499-RA	160	18.04	5.18	52.02	65.31	-0.784	Nucleus

Continued

Sequence ID	Amino acid length	Molecular mass/kDa	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
AY056624-RA	232	26.59	9.04	61.87	53.84	-0.954	Cytoplasm, nucleus
AY058375-RA	226	24.75	6.52	38.65	66.86	-0.420	Cytoplasm, nucleus
AY059632-RA	347	39.53	9.18	33.06	62.68	-0.732	Nucleus
AY059736-RA	305	33.99	9.27	41.12	62.03	-0.671	Cytoplasm, nucleus
AY060001-RA	195	21.71	4.98	72.38	45.64	-0.790	Cytoplasm, nucleus
AY060481-RA	142	15.77	5.38	36.37	51.69	-0.890	Nucleus
AY061595-RA	257	29.47	5.04	53.31	64.44	-0.816	Nucleus
AY061702-RA	436	48.13	4.94	41.78	79.89	-0.286	Nucleus
AY062399-RA	173	19.14	10.39	62.20	69.31	-0.623	Nucleus
AY146206-RA	313	35.13	5.39	43.07	50.54	-0.755	Cytoplasm, nucleus
AY146207-RA	280	31.44	6.13	40.10	54.07	-0.736	Nucleus
AY146208-RA	951	10.65	5.88	36.48	77.22	-0.355	Nucleus
AY146373-RA	205	23.10	5.51	56.67	59.02	-0.562	Cytoplasm, nucleus
AY146787-RA	203	22.64	5.07	64.90	72.61	-0.580	Nucleus
AY162199-RA	254	28.68	4.52	69.83	71.81	-0.710	Cytoplasm, nucleus
AY285521-RA	190	21.34	9.47	25.93	59.53	-0.715	Nucleus

5 艾 *AP2/ERF* 基因家族表达模式分析

为了揭示 *AP2/ERF* 家族在艾不同组织及 MeJA 处理下的表达情况, 首先将鉴定到的 *AP2/ERF* 四个亚家族基因分别在艾的 R、S、LA、LB、LC、LD 共 6 个不同组织基因的表达量绘制热图进行分析, 接着利用 MeJA 不同时间诱导下的基因表达量值 FPKM 绘制热图并分析。如图 5 所示, 发现 *AP2/ERF* 家族中大多基因在根和茎秆中显著表达, 在叶中显著表达的基因相对于根和茎秆中较少, 其中亚家族 AP2 仅有 2 个基因在叶片中优势表达, ERF 与 DREB 亚家族分别有 5、12 个基因在叶片中优势表达。MeJA 诱导表达模式发现, *AP2/ERF* 家族基因随着 MeJA 处理时间的延长, 该家族中大部分基因表达呈现出上调的趋势, 且大部分基因在 MeJA 诱导 12 h 表达量较高, 部分基因呈现下调趋势。AP2 亚家族中 5 个基因呈上调趋势, 而 *AY006959-RA* 经 MeJA 诱导后反而下调, ERF 亚家族中绝大部分基因经 MeJA 诱导后呈上调趋势, 仅有 4 个基因经 MeJA 诱导后呈现下调趋势分别为 *AY027880-RA*、*AY186211-RA*、*AY183336-RA* 及 *AY066733-RA*, DREB 亚家族中经 MeJA 诱导后呈现下调趋势的基因约占 25%。根据基因表达量及表达模式, 共筛选出 16 个在叶片中特异表达且受 MeJA 诱导表达的 *AP2/ERF* 基因, 其中有 2 个属于 AP2 亚家族、4 个来源于 ERF 亚家族、10 个属于 DREB 亚家族。

6 艾 *AP2/ERF* 基因家族成员的 qRT-PCR 分析

从筛选到的 16 个在叶片中特异表达且受 MeJA 诱导表达的 *AP2/ERF* 基因中随机选择 6 个基因, 分别是来自 AP2 亚家族的 *AY236984-RA* (*AP2-1*)、*AY001307-RA* (*AP2-2*), ERF 亚家族的 *AY061702-RA* (*ERF-1*)、*AY027880-RA* (*ERF-2*) 及 DREB 亚家族的 *AY073430-*

RA (*DREB-1*)、*AY260855-RA* (*DREB-2*)。采用实时荧光 PCR 技术对以上 6 个基因组织表达模式进行了验证。通过比对目标基因的 FPKM 值发现 (图 6), *AP2-1*、*AP2-2* 及 *DREB-2* 在叶芽期优势表达, *DREB-1* 和 *ERF-1* 在艾叶成熟期优势表达, *ERF-2* 在老叶中优势表达, 这与热图中 6 个目的基因表达量的 FPKM 值变化一致, 均在叶片中优势表达, 推测叶片中优势表达的基因, 可能主要参与艾叶片中药效成分的生物合成。

讨论

AP2/ERF 转录因子超家族是植物中最大的转录因子家族之一, 对于植物体内有效成分的合成、逆境胁迫响应及植物生长发育具有一定的作用^[3,17]。目前, 许多药用植物已在基因组水平上对 *AP2/ERF* 进行了鉴定: 在三七全基因组水平上鉴定了 140 个 *AP2/ERF* 家族候选成员^[4]; 在栀子全基因组水平上鉴定了 142 个 *AP2/ERF* 家族成员^[8]; 在丹参的基因组水平上鉴定了 170 个 *AP2/ERF* 基因家族成员^[19], 而艾中 *AP2/ERF* 类转录因子尚未被鉴定。

AP2/ERF 类转录因子在植物生长发育、有效成分的生物合成及抵抗环境胁迫等方面具有一定的调控作用。*CmAP2* 在菊花不同组织中的表达水平表现出明显差异。舌状花雌蕊中表达量最高, 管状花、舌状花次之, 并随开花时间延长而升高, 推测其可能参与了菊花成花的调节^[20]。利用酵母单杂交技术筛选出 2 个长春花 *AP2/ERF* 转录因子 *ORCA1*、*ORCA2*, 发现 *ORCA2* 中含有 GCC-box 响应元件, 推测其在 MeJA 诱导吲哚类生物碱生物合成中具有一定的调控作用^[21]。*B3TcERFs* 正向调控 MeJA 合成的同时, 与紫杉醇生物合成基因紧密共表达, 表明 *AP2/ERF* 转录因子在紫杉

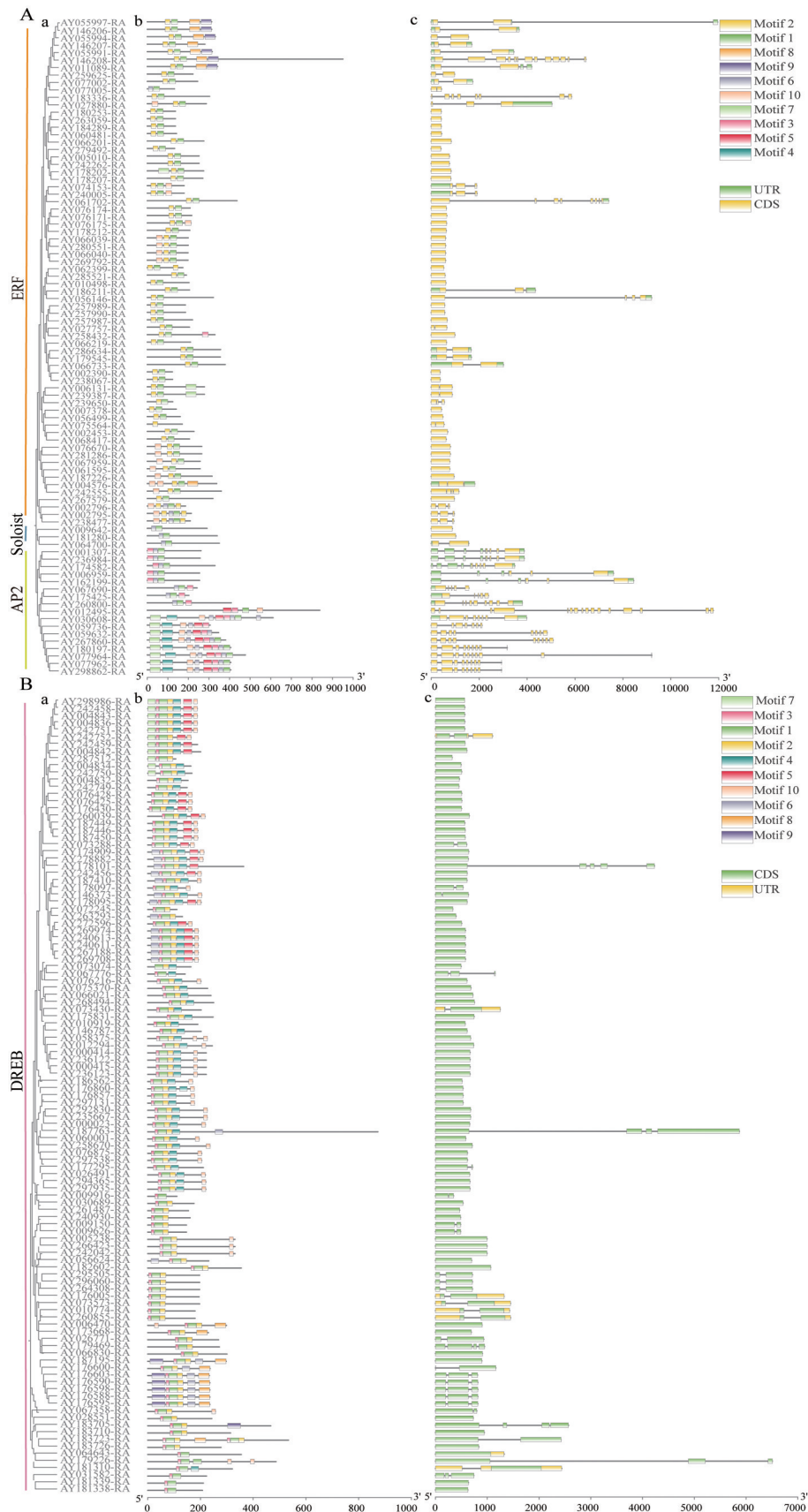


Figure 3 Conserved motifs and gene structures of *AP2/ERFs* in *A. argyi*. A shows the protein conserved motifs and gene structures of sub-families AP2 and *ERF* and B shows the protein conserved motifs and gene structure of subfamily DREB. a: Phylogenetic tree of *AP2/ERF* gene family of *A. argyi*; b: The motifs of *AP2/ERF* gene family of *A. argyi*; c: Gene structure analyses of *AP2/ERF* gene family of *A. argyi*

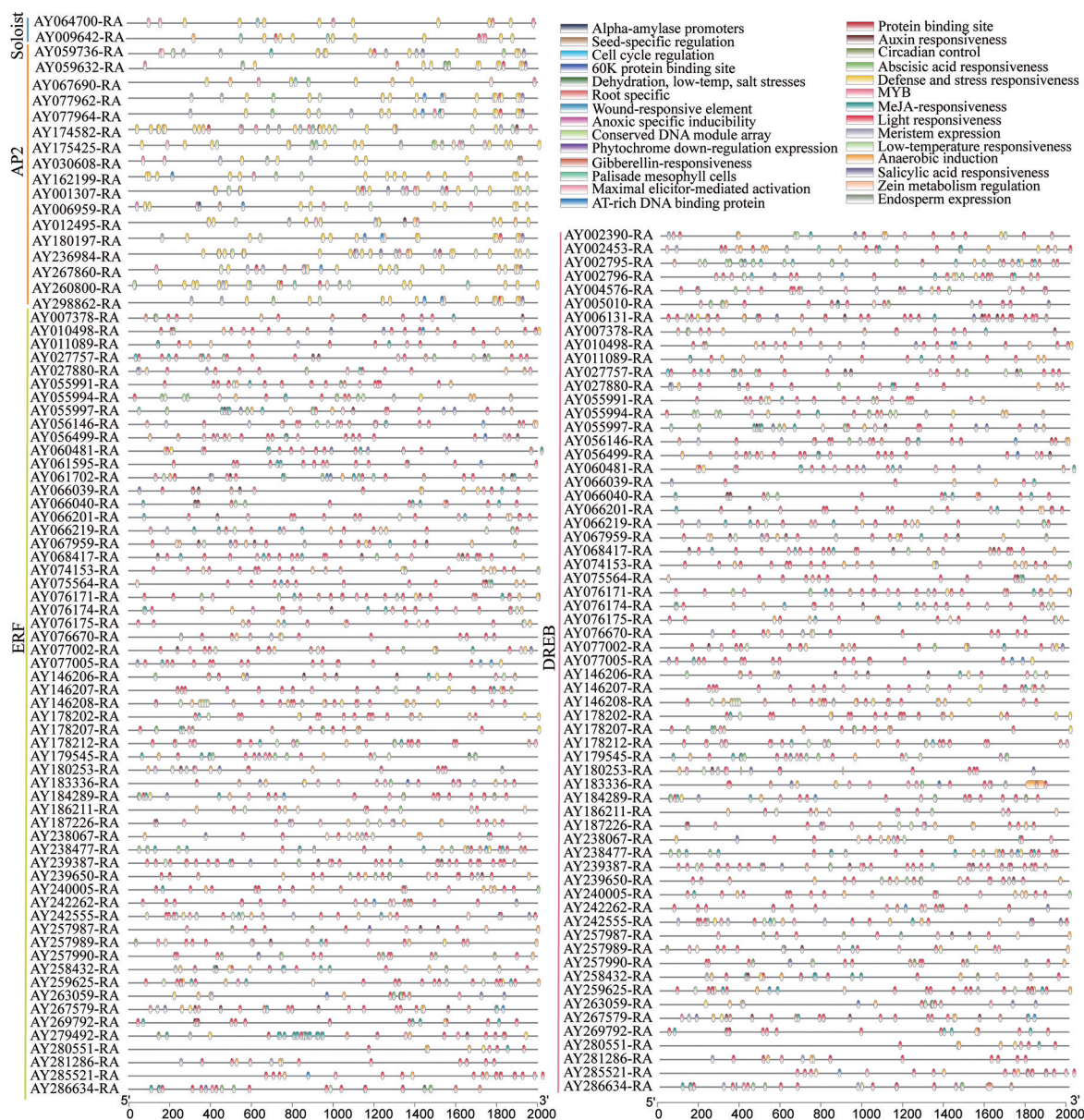


Figure 4 *cis*-Acting elements in promoters of *AP2/ERFs* in *A. argyi*

醇生物合成中具有一定的调控作用^[22]。拟南芥过表达 *MdSHINE2* 可直接间接上调蜡质基因表达, 促进蜡质沉积, 增强蜡质渗透能力, 从而增强 ABA 敏感性及抗旱性^[23]。IbERF07 是一个序列比较保守的蛋白, 受病原菌侵染后, *IbERF07* 表达量明显增加, 且在侵染 2 h 达到最高水平, 表明基因可能参与了甘薯抗根肿病的调控^[24]。

AP2/ERF 基因家族可以分为五个亚家族, 即 AP2、ERF、DREB、Soloist 和 RAV。ERF 和 DREB 亚家族主要参与植物根系的生长发育、有效成分的积累等, AP2 及 RAV 主要调控植物中花、种子和果实的生长发育等^[17]。本研究对艾中 *AP2/ERF* 家族进行了全基因组分析, 并鉴定到 204 个 *AP2/ERF* 基因家族成员。艾 *AP2/*

ERF 基因家族可分为四个亚家族即 AP2、ERF、DREB 和 Soloist, 缺少 RAV 亚家族, 该结果表明并不是所有的物种均具有 *AP2/ERF* 的 5 个亚家族, 在椴子和三七^[4,25] 中发现 *AP2/ERF* 家族缺少 Soloist 亚家族。保守基序及基因结构分析发现, AP2、ERF 和 Soloist 亚家族中序列长度大多在 500 bp 左右, DREB 亚家族中序列长度大多在 400 bp 左右。顺式作用元件发现, Soloist 亚家族中的 AY101280-RA 序列中未发现含有相关的响应元件, 而该家族其他两个序列中绝大部分响应元件为光响应、脱落酸响应及 MeJA 响应, 同样 DREB 亚家族中部分序列也未鉴别出相关的响应元件。虽然艾中有 204 个 *AP2/ERF* 基因, 但在叶片中表达同时又受 MeJA 诱导表达的基因只有 16 个, 这 16 个基因可能是

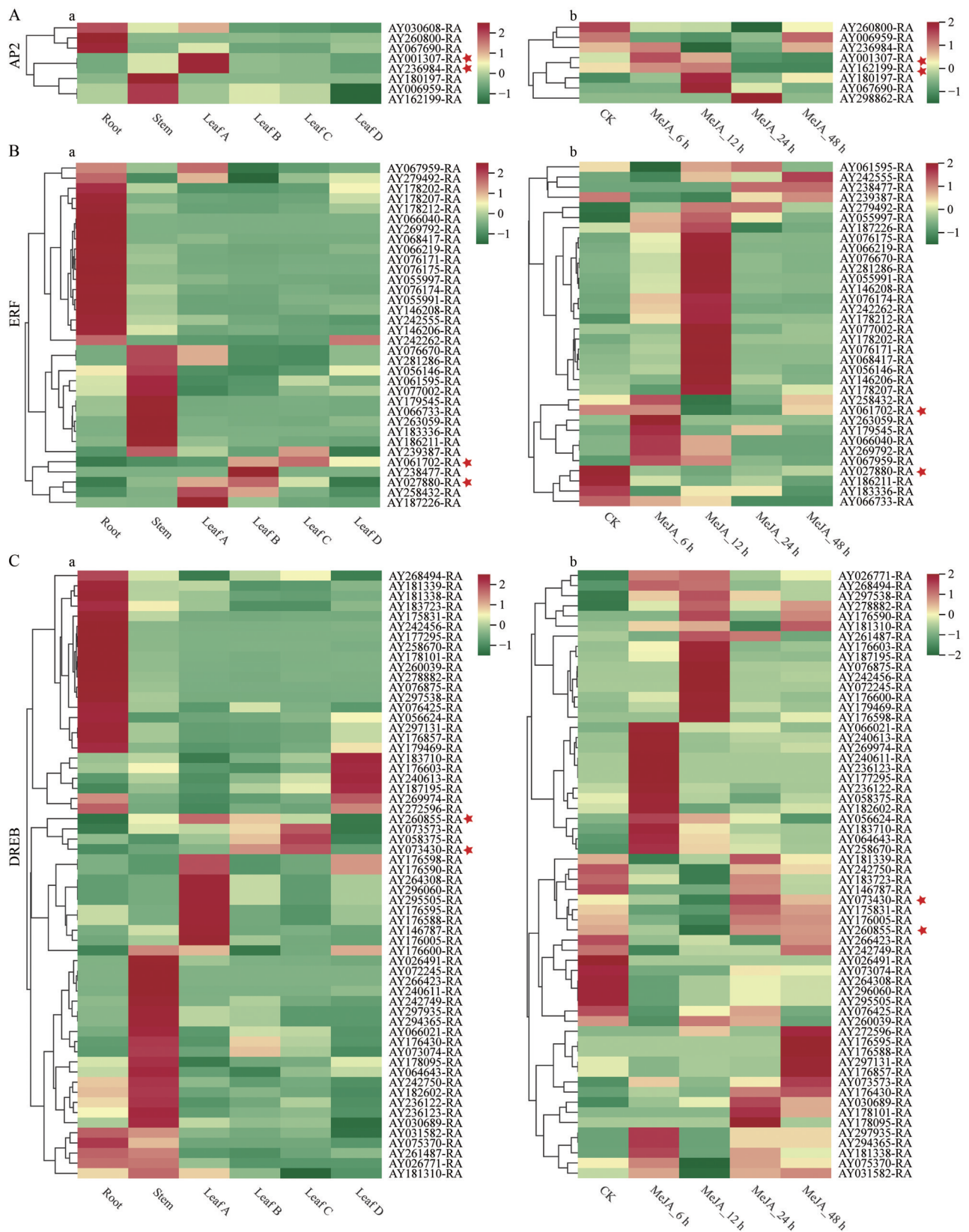


Figure 5 Expression patterns of the *A. argyi* *AP2/ERF* family in different tissues and at different treatment times with MeJA. A, B and C represent the expression pattern maps of the three subfamilies AP2, ERF, and DREB, respectively, where a is the tissue expression pattern map and b is the MeJA-induced expression pattern map. Leaf A: Leaf bud; Leaf B: Young leaves; Leaf C: Mature leaves; Leaf D: Old leaves; CK: Control treatment group. MeJA_6 h, MeJA_12 h, MeJA_24 h, and MeJA_48 h denote induction treatment with MeJA for 6, 12, 24, and 48 h, respectively. The red asterisks indicate the *AP2/ERF* genes randomly selected from *A. argyi*

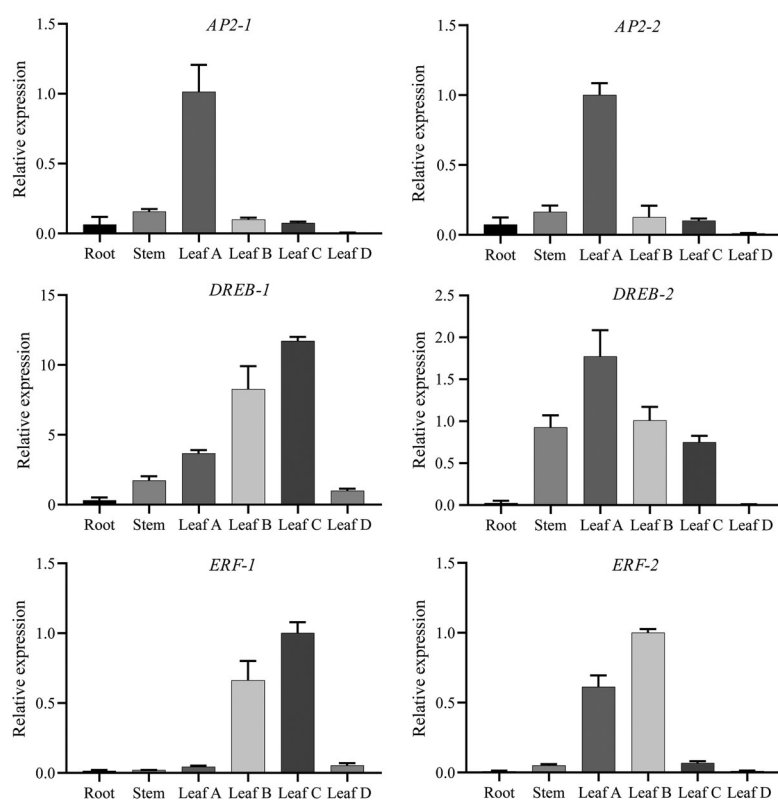


Figure 6 The expression levels of the *AP2/ERF* genes in different tissues

艾叶有效成分合成的关键基因,可以用于进一步的功能验证。

综上所述,该研究系统鉴定了204个艾 *AP2/ERF* 类转录因子,并对其理化性质、系统发育、保守基序、基因结构等多角度分析了该家族的生信特点。能初步了解 *AP2/ERF* 家族的基因数量、功能分类及表达趋势,为进一步深入鉴定艾叶中 *AP2/ERF* 类转录因子的功能及解析其对艾叶有效成分合成的调控机制奠定基础。

作者贡献: 第一作者岳雪雪负责论文设计、实验、数据分析及论文撰写;通讯作者刘大会、苗玉焕负责论文设计、数据分析和论文指导;肖闯、张倩雯、彭赛男、周佳参与实验及数据分析;陈昌婕指导文章撰写并提出修改意见;李金鑫、李宇醞参与样品采集。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang Y, Kang LP, Guo LP, et al. Progress of research on herbal examination and application of mugwort leaves [J]. Shanghai J Acupunct Moxib (上海针灸杂志), 2017, 36: 245-255.
- [2] Lan XY, Zhang Y, Zhu LB, et al. Progress of research on chemical composition, pharmacological effects and quality of mugwort [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 4017-4030.
- [3] Zhao LF, Chai TY. Role of AP2/EREBP transcription factors in plant development and stress response [J]. Bot Bull (植物学通报), 2008, 25: 89-101.
- [4] Zhang SH, Hou C, Chen YF, et al. Identification of *Panax ginseng* AP2/ERF gene family and preliminary investigation of PnDREB84 gene function [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 3428-3438.
- [5] Li YH, Liang YJ, Chang SJ, et al. Genome-wide identification and expression characterisation of the AP2 family in *Oncorhynchus mykiss* [J]. J Agric Biotechnol (农业生物技术学报), 2023, 31: 754-766.
- [6] Wang Q, Yang YJ, Li JY, et al. Identification of AP2/ERF gene family and expression analysis under drought stress in *C. juncea* [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2024, 43: 1-14.
- [7] Zhao MQ, Liu XJ, Liang YQ, et al. Identification of AP2/ERF transcription factor family and expression analysis in response to rot disease in Xinjiang wild apple [J]. Northwest J Bot (西北植物学报), 2022, 42: 930-942.
- [8] Wen KX, Liu XM. Important roles of AP2 functional genes in plant flower development [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2010, 26: 1-7.
- [9] Cui B, Niu SY, Jiang SH, et al. Cloning of LFY gene and construction of efficient plant expression vector in *Phalaenopsis* [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2012, 28: 65-68.
- [10] Wang WE, Wang BZ, Zhou Y, et al. Expression characteristics and cold tolerance function analysis of MfERF028 gene of AP2/

- ERF family in yellow clover [J]. *Chin J Grassl Sci* (中国草地学报), 2023, 45: 15-22.
- [11] Sheng XL. Effects of Water Stress on the Synthesis of Flavonoids, Polysaccharides and Terpenoids in *Cymbopogon flexuosus* and Investigation of the Mechanism (水分胁迫对青钱柳黄酮、多糖和萜类化合物合成的影响及机制探究) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2022.
- [12] Wu SJ. Mechanistic Studies on the Regulation of Tanshinone Biosynthesis by ERF Transcription Factors in Response to the Endophytic Fungal D16 Polysaccharide Inducer (响应内生真菌D16多糖诱导子的ERF转录因子调控丹参酮生物合成的机制研究) [D]. Shanghai: People's Liberation Army Naval Military Medical University, 2023.
- [13] Miao YH, Luo DD, Zhao TT, et al. Genome sequencing reveals chromosome fusion and extensive expansion of genes related to secondary metabolism in *Artemisia argyi* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 1902-1915.
- [14] Yi XZ, Wang MY, Wu L, et al. Screening and expression analysis of WRKY transcription factors related to the regulation of biosynthesis of active ingredients in *Artemisia argyi* [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2022, 24: 1811-1824.
- [15] Yi XZ, Wang XW, Wu L, et al. Integrated analysis of basic helix loop helix transcription factor family and targeted terpenoids reveals candidate AarBHLH genes involved in terpenoid biosynthesis in *Artemisia argyi* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 12: 811166.
- [16] Chen BH, Wang MY, Wu L, et al. Genome-wide identification of *Artemisia argyi* bZIP gene family and screening of genes regulating terpene synthesis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2023, 48: 5181-5194.
- [17] Wu SR, Gao K, Liu X, et al. Progress of AP2/ERF transcription factors regulating biosynthesis of active ingredients in medicinal plants [J]. *Chin Herb Med* (中草药), 2016, 47: 1605-1613.
- [18] Gao L, Lu JW. Cloning of ERF gene of *Gardenia jasminoides* and its expression during fruit ripening [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2013, 29: 60-65.
- [19] Zhan ZG, Li X. Biosynthesis of tanshinones and salvianolic acid analogues and their transcriptional regulatory mechanisms [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 2110-2121.
- [20] Chen SM, Lu GS, Zhu XR, et al. Cloning and expression characterisation of *CgF3'H* gene in *Chrysanthemum* [J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2011, 9: 623-628.
- [21] Menke FL, Champion A, Kijne JW, et al. A novel jasmonate and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2 [J]. *EMBO J*, 1999, 18: 4455-4463.
- [22] Zhang M, Chen Y, Jin XF, et al. New different origins and evolutionary processes of AP2/EREBP transcription factors in *Taxus chinensis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 413.
- [23] Zhang YL, Zhang CL, Wang GL, et al. Apple AP2/EREBP transcription factor MdSHINE2 confers drought resistance by regulating wax biosynthesis [J]. *Planta*, 2019, 249: 1627-1643.
- [24] Xu L, Chen PR, Liu Y, et al. Cloning and expression characterisation of sweet potato IbERF071 gene [J]. *J Changjiang Univ Nat Sci Edi* (长江大学学报 自然科学版), 2022, 19: 99-108.
- [25] Zhang QG, Lin XQ, Ye ZL, et al. Identification of AP2 gene family members in *Gardenia jasminoides* and their expression patterns under salt stress [J]. *J Fujian Agric For Univ Nat Sci Ed* (福建农林大学学报 自然科学版), 2023, 52: 457-465.