植物学报 *Chinese Bulletin of Botany* 2025, **60** (3): 377–392, www.chinbullbotany.com
doi: 10.11983/CBB24117 cstr: 32102.14.CBB24117

·研究论文·

菠菜AT-hook基因家族鉴定与表达谱分析

杨莉，曲茜彤，陈子航，邹婷婷，王全华，王小丽*

上海师范大学生命科学学院/植物种质资源开发协同创新中心，上海 200234

摘要 AHL (AT-hook)蛋白家族在植物生长发育、器官构建、逆境胁迫及植物激素信号应答中发挥关键作用。为揭示菠菜(*Spinacia oleracea*) *AHL*基因家族的生物学功能，在基因组范围内对*SoAHL*家族成员进行鉴定和分析，并探究外源水杨酸对其表达水平的影响。结果表明，*SoAHL*家族包含19个成员，在6条染色体间不均匀分布，系统发育树将其分为2个亚族，I、II亚族分别包含10、9个*SoAHL*成员；不同亚族间PPC和AT-hook保守基序序列组成有差异；*SoAHL*主要定位在细胞核、细胞质和线粒体；*SoAHL* I亚族成员无内含子，II亚族成员含4–5个内含子；*SoAHL*启动子上游分布有不同数量的植物激素和非生物胁迫响应相关顺式作用元件。*SoAHL*成员在根、叶片及叶柄中均有表达，大多数在根中表达水平较高。水杨酸处理条件下，*SOV6g041850.1*和*SOV2g038950.1*受水杨酸显著诱导；*SOV2g031340.1*和*SOV4g018880.1*主要在地上部表达，与叶酸含量的组织分布特征相似。瞬时过表达*SOV4g018880.1*能提高菠菜叶酸含量1.75倍。研究结果可为进一步解析SoAHL的功能奠定基础。

关键词 菠菜，AT-hook基因家族，生物信息学，水杨酸

杨莉，曲茜彤，陈子航，邹婷婷，王全华，王小丽 (2025). 菠菜AT-hook基因家族鉴定与表达谱分析. 植物学报 **60**, 377–392.

菠菜(*Spinacia oleracea*)为苋科藜亚科菠菜属植物，风味鲜美，营养丰富，是世界性叶用蔬菜，具有重要的经济价值。由于人体自身不能从头合成叶酸，只能从饮食中摄取，而菠菜是人类通过膳食摄入叶酸的重要来源。尽管目前园艺植物叶酸合成途径已有较多研究，但其分子调控机制仍不清楚(潘曦等, 2023)。前期实验筛选到1个AT-hook核定位蛋白(AT-hook motif nuclear localized protein, AHL)，能与叶酸积累途径关键基因启动子结合，可能参与菠菜叶酸积累转录调控(潘曦, 2023)。因此，为探明叶酸积累调控规律，有必要对菠菜AHL家族进行分析，挖掘其它候选SoAHL。

AT-hook核定位蛋白是一类DNA结合蛋白，主要定位于细胞核，含有以精氨酸(Arg)-甘氨酸(Gly)-精氨酸(Arg)-脯氨酸(Pro) (RGRP)为核心的小基序(亦称RGRP基序)和PPC (plant sand prokaryotes conserved)基序(Zhao et al., 2013)。该蛋白最早在哺乳动物非组蛋白的染色体高移动群蛋白HMG-I/Y中被发现，在染色质结构组装以及对目标基因转录活性调控中具有重要作用(Eckner and Birnstiel, 1989)。

根据AHL家族中AT-hook基序和PPC结构域序列组成的不同，可将AHL家族分为3种类型。其中I亚家族含有1型AT-hook基序(核心序列GSKNK)和A型PPC结构域(核心序列LRSH)；II亚家族含有1型和2型AT-hook基序(核心序列RKY)，以及B型PPC结构域(核心序列FTPH)；III亚家族含有2型AT-hook基序和B型PPC结构域(Bishop et al., 2020)。水稻(*Oryza sativa*) (张贵慰等, 2014)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Zhao et al., 2013)中分别含有45和29个AT-hook成员，其中I类型成员分别有13和15个，II类型成员9和7个，III类型成员有2和7个。除拟南芥和水稻外，从玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、花生(*Arachis hypogaea*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)中鉴定到的AHL家族蛋白分别含有37、63、14、99、64和18个AHL成员(Bishop et al., 2020; Zhao et al.,

收稿日期: 2024-07-30; 接受日期: 2024-12-26
基金项目：上海市科技兴农项目(No.2022-02-08-00-12-F01116)
* 通讯作者。E-mail: wangxl@shnu.edu.cn

2020; Wang et al., 2021a, 2023; Li et al., 2021; 胡冬秀, 2021)。

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。在拟南芥中过表达*AtAHL9*显著加速叶片衰老(Zhou et al., 2022)。过表达*AtAHL22*和*AtAHL20*导致开花延迟，而敲除*AtAHL22*能促进下胚轴伸长(Xiao et al., 2009; Yun et al., 2012; Tayengwa et al., 2020; Jacques et al., 2022)。*AtAHL29*能抑制植物激素相关基因的转录激活，进而抑制叶柄生长(Favero et al., 2020)。*AtAHL4*能够抑制种子中三酰甘油水解和脂肪酸氧化相关基因的表达，从而抑制脂质分解代谢和幼苗的形态建成(Cai et al., 2020)。*AtAHL17*或*AtAHL18*过表达能够增强*RHD6* (*root hair defective 6*)下游一系列基因的转录水平，进而增加根毛产量(Širl et al., 2020; Zeng et al., 2023)。在大豆根瘤菌中鉴定出2种AT基序核定位(AHL)转录因子，能与*NCR169*启动子中富含AT的序列结合，诱导其表达，进而影响根瘤菌的固氮效率(Zhang et al., 2023)。棉花AT-hook基因(*GhAT1*)可通过抑制纤维特异基因*FSltp4*启动子活性影响棉纤维发育(Delaney et al., 2007)。AHL蛋白还参与植物逆境胁迫应答。在日本结缕草(*Zoysia japonica*)中过表达*AtAHL23*和*AtAHL20*能够增强植株的耐盐性(Jeong et al., 2020)。AHL也参与植物的免疫应答。拟南芥*AtAHL20*、*AtAHL19*、*AtAHL15*和*AHL27*过表达能够抑制植物对病原体相关分子模式触发的免疫响应相关基因的表达，从而对强毒假单胞菌表现出更高的敏感性，降低抗病能力(Lu et al., 2010; Zhang et al., 2022)。辣椒(*Capsicum annuum*) *CaATL1*过表达转基因植株对细菌和卵菌等病原菌具有抗性(Kim et al., 2007)。

综上，*AHL*基因在植物生长发育、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，但在植物叶酸积累中的作用尚未见报道。本文对菠菜*AHL*家族进行全基因组鉴定和生物信息学分析。为筛选叶酸积累相关候选基因，分析了不同组织及水杨酸处理下菠菜叶酸含量与*SoAHL*表达谱变化的关系，挖掘出叶酸积累和水杨酸响应关键候选基因，为深入解析其分子机制和遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 *SoAHL*基因家族系统发育、保守基序和基因结构分析

从TAIR数据库(www.arabidopsis.org/)中获取拟南芥AHL基因家族蛋白序列，在菠菜基因组数据库(www.spinachbase.org/) Blast检索获得菠菜AHL同源序列，根据*AHL*基因家族的特定结构域(PPC/DUF296结构域(PF03479)和AT-hook基序)，最终鉴定到19个菠菜AHL蛋白。利用ExPasy网站中的Prot-Param工具(web.expasy.org/prot-param)分析SoAHL蛋白的分子量、等电点和理化性质等。利用WoLF PSORT (wolfpsort.hgc.jp)预测菠菜*AHL*基因家族的亚细胞定位。

利用MEGA 11 (www.megasoft-ware.net)软件基于邻接法(neighbor joining)构建菠菜AHL、水稻AHL与拟南芥AHL蛋白系统进化树。利用MEME (meme-suite.org/meme/)和NCBI的Conserved domains在线软件分析保守基序和保守结构域，并利用TB tools-II (Toolbox for Biologists) v2.131软件进行基因结构可视化(Chen et al., 2023)。

1.2 *SoAHL*基因家族顺式作用元件分析

从菠菜基因组数据库提取菠菜*AHL*基因家族成员的启动子序列(ATG上游2 000 bp核苷酸序列)。利用PlantCARE (bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)和TBtools软件进行顺式作用元件分析和可视化。

1.3 植物材料培养与处理

以课题组完成全基因组测序的菠菜(*Spinacia oleracea* L.)高代自交系Sp75为材料，选取饱满一致的种子，在人工气候室(光周期为10小时光照/14小时黑暗，温度控制在23°C (光照)/18°C (黑暗)，光照强度为200 μmol·m^{-2}·s^{-1}，相对湿度为70%)培养至4片真叶，进行水杨酸(salicylic acid, SA)喷施处理。水杨酸喷施浓度为50 μmol·L^{-1}，每株平均喷施5 mL。对照组喷施乙醇-水(1/1 000 (v/v))溶液。分别在处理0、3、5和7天4个时间段采样，收集叶片，置于–80°C冰箱保存备用。所有样品均设3个生物学重复，每个重复3株。

1.4 基因表达谱分析

采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)法检测*SoAHL*基因水杨酸响应表达谱。首先，采用Trizol (ThermoFisher)试剂提取组织材料总RNA，使用Hifair® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) (翌圣生物科技)将RNA反转录成cDNA (complementary DNA)。使用Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒(翌圣生物科技)，在Applied Biosystems 7500 Real Time PCR仪器上进行qRT-PCR。内参基因为菠菜*18S*基因，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算基因相对表达量(Livak and Schmittgen, 2001)。qRT-PCR引物序列见表1。*SoAHL*组织表达谱采用已发表的菠菜根、茎、叶的转录组数据(NCBI BioProject PRJNA663445) (Wang et al., 2021b)，将RPKM值经$\log_2$均一化后采用TBtool绘制热图。

1.5 叶酸含量测定

采用荧光分光光度法测定菠菜各组织及处理下的叶酸含量(张玖漪等, 2020)。

1.6 菠菜*SOV4g018880.1*基因克隆与瞬时表达载体构建

从NCBI数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/)中获得*SOV4g018880.1* (暂称为*SoAHLa*)蛋白编码区核苷酸序列，根据序列设计并提交生工生物工程(上海)股份有限公司合成全长编码序列(coding sequences, CDS)扩增引物(F: 5′-ATGGAACCGAATGAACAAAGCGGAC-3′; R: 5′-CTAGTCGGGCATCTGCTCATAATCT-3′)。以菠菜高代自交系Sp75的叶片cDNA为模板，利用Prime STAR® GXL高保真酶进行基因克隆。扩增体系总体积为50 μL，包含10 μL 5× GXL Buffer, 4 μL dNTPs，上、下游引物各1.5 μL, 2 μL cDNA模板, 1 μL Primestar GXL, 30 μL ddH_2O。扩增程序: 95°C预变性3分钟; 95°C变性15秒, 57°C退火15秒, 72°C延伸1分钟(循环数35); 72°C终延伸5分钟。电泳检测PCR产物，根据DNA Marker比对条带大小，利用San Prep DNA胶回收试剂盒对条带大小与目的基因一致的片段进行切胶回收和纯化。将基因片段通过酶切位点*Xba*I构建至pEarleyGate100-SW表达载体，转化至大肠杆菌感受态细胞，挑取阳性克隆菌液送至生工生物

表1 引物信息

Table 1 Sequences of the primers used in this study

Gene ID	Forward primer (5′–3′)	Reverse primer (5′–3′)
SOV4g002370.1	GTTCTAACCATCTCCGCAAT	TGAATGGGTGAAATTGGCAT
SOV5g038710.1	GAGCGGCTATGATGGAG	GGATCTGATCTGTCCATGTC
SOV1g029900.1	TAAGATGGAGCAACAACAGG	TCGGGTTCTGATTATCCTCT
SOV6g041850.1	ATATCGGCATCACAACATGG	AGTGGTTTTGGAGTTGAAGT
SOV2g030150.1	ATGGAAGGCCTCTACCACC	GTGGTGAAACTGATGATGCTG
SOV6g047350.1	GACTCTCGTGGCCCATCTGC	GTAAGGTGAATTTGATTGGTGG
SOV2g031340.1	GAGAGGATTAGCCGAGTTAC	CCCGACATTTGATTGGAAAG
SOV3g001110.1	GTAGTTCAGGGGTAACTGTG	TTTTCACCCCTAGCTGTTAC
SOV2g038950.1	GATAACAATGCTCAAAACAATG	GTTGGAATTTGGAAGGATGAG
SOV4g018880.1	CCGAATGAACAAAGCGGAC	GACATTCCATTGGTGGCGG
SOV5g038610.1	TCTGAAAATGACGTCGGTAG	CGGCTTATAAACTGCATTCC
SOV6g041780.1	GTAGTAAGGTCAGATGCTCC	CATACTTCCTTGGTCTACCC
SOV2g029980.1	GGTGACAGTAATAGGAGCAG	TTACTGGAGTAACATCCCCA
SOV5g021850.1	TCAGGACCTGGTAGCTTTTA	AAAGTCATCCCGGAATTAGG
SOV6g040610.1	GGATGGGAGAGAAGGTATGGC	CCAACTGCCCCAGGAATTGT
SOV4g057830.1	ATAACGCCCTGGTGCAACTG	TGTGGCCTCCATCCGAACACAT
SOV4g019010.1	ACGAACAACCCGGACAACTT	ACCGCCATGATTCCATCCAT
SOV6g040700.1	TTGCCTCCGGTCCTGTGGTTATTAT	TCAGGTCTTTGCCAGTGATCTACC
SOV6g047370.1	TCCGGTCCTGTGGTTATTATGGC	TCAGGTCTTTGCCAGTGATCTACC
18S	CCATAAACGATGCCGACCAG	AGCCTTGCGACCATACTCCC

工程(上海)股份有限公司测序。测序正确后提取质粒，转化至农杆菌GV3101感受态细胞，于–80°C冰箱保种，备用。

1.7 *SOV4g018880.1*在菠菜叶片中瞬时过表达

利用农杆菌介导法在菠菜叶片中瞬时表达*SOV4g018880.1*。将含重组质粒的GV3101农杆菌在28°C摇床中培养至菌液OD=0.8。将离心收集的菌株用侵染液(含10 mmol·L^{-1} $MgCl_2$、10 mmol·L^{-1} MES以及150 μmol·L^{-1} AS的1/2MS培养基，pH5.8)稀释至OD=0.8，室温静置2–3小时后，用移液器注射于S4菠菜叶片背部。将侵染的植株置于20°C黑暗条件下培养12小时后转入正常光照条件下培养2–3天，然后对菠菜叶片侵染部位取样，液氮速冻后保存于–80°C冰箱，备用。

1.8 数据分析

采用SPSS 29.0软件进行数据分析。采用单因素方差分析(ANOVA)检验各处理间的差异显著性(Tukey检验，P<0.05表示差异显著)。

2 结果与分析

2.1 *SoAHL*基因家族成员的鉴定

在菠菜中共鉴定出19个AHL家族成员(表2)，其中1个*SoAHL*基因定位于1号染色体，4个基因定位于2号染色体，1个基因定位于3号染色体，4个基因定位于4号染色体，3个基因定位于5号染色体，6个基因定位于6号染色体(表2)。菠菜*SoAHL*基因编码氨基酸数介于268–470之间，蛋白质分子量最大为SOV6g047350.1 (52.13 kDa)，最小为SOV5g038710.1 (26.72 kDa)；等电点(pI)最小为SOV1g029900.1 (5.37)，最大为SOV5g038610.1 (9.87)。亚细胞定位预测结果显示，大部分*AHL*基因定位在细胞核，也有基因预测定位在其它细胞器(表2)。

2.2 菠菜SoAHL进化树分析

将19个菠菜AHL、29个拟南芥AHL以及21个水稻AHL蛋白序列通过多序列比对构建系统进化树(图1)，结果发现10个SoAHL成员与15个拟南芥AHL Clade-B

表2 菠菜*SoAHL*基因家族成员基本信息

Table 2 Information on the *SoAHL* gene family members in spinach

Gene ID	Genome location	Subcellular localization	Length (bp)	Amino acid (aa)	Molecular weight (kDa)	PI
SOV1g029900.1	Chr. 1: 113135928–113136926	NLS, Chl	999	333	33.84	5.37
SOV4g019010.1	Chr. 4: 52394687–52395604	NLS	918	306	31.47	6.16
SOV4g057830.1	Chr. 4: 186409628–186410449	NLS, Chl	822	274	27.68	6.42
SOV5g038710.1	Chr. 5: 123243932–123247784	NLS	819	273	26.72	6.43
SOV6g040700.1	Chr. 6: 140433598–140434404	NLS, Cyt	807	269	28.36	9.07
SOV6g047370.1	Chr. 6: 148547185–148548063	Chl, NLS	879	293	30.18	6.04
SOV2g030150.1	Chr. 2: 101786656–101787666	NLS, Chl	1011	337	34.80	7.22
SOV6g041850.1	Chr. 6: 141988749–141989711	NLS, Chl	963	321	32.97	5.97
SOV2g038950.1	Chr. 2: 112654862–112655896	Cyt, NLS	1035	345	36.80	6.85
SOV4g018880.1	Chr. 4: 52004210–52011645	NLS	1041	347	36.10	8.46
SOV2g031340.1	Chr. 2: 103380711–103385136	NLS	990	330	34.05	9.58
SOV6g040610.1	Chr. 6: 140337052–140344304	NLS, Cyt	1044	348	35.29	9.89
SOV2g029980.1	Chr. 2: 101504484–101511484	NLS, Chl	1032	344	35.92	9.44
SOV6g041780.1	Chr. 6: 141900514–141905585	NLS	1026	342	35.70	8.33
SOV3g001110.1	Chr. 3: 1145951–1151558	Chl, NLS	1089	363	37.96	5.73
SOV5g021850.1	Chr. 5: 39407625–39411618	NLS, Chl	1089	363	37.31	7.87
SOV5g038610.1	Chr. 5: 122545368–122554893	NLS	1092	364	37.09	9.87
SOV6g047350.1	Chr. 6: 148521377–148529101	NLS, Chl	1413	471	50.13	8.79
SOV4g002370.1	Chr. 4: 2764521–2765501	NLS, Cyt	981	327	36.06	6.04

NLS: 细胞核; Chl: 叶绿体; Cyt: 细胞质; PI: 等电点 NLS: Nucleus; Chl: Chloroplast; Cyt: Cytoplasm; PI: Isoelectric point

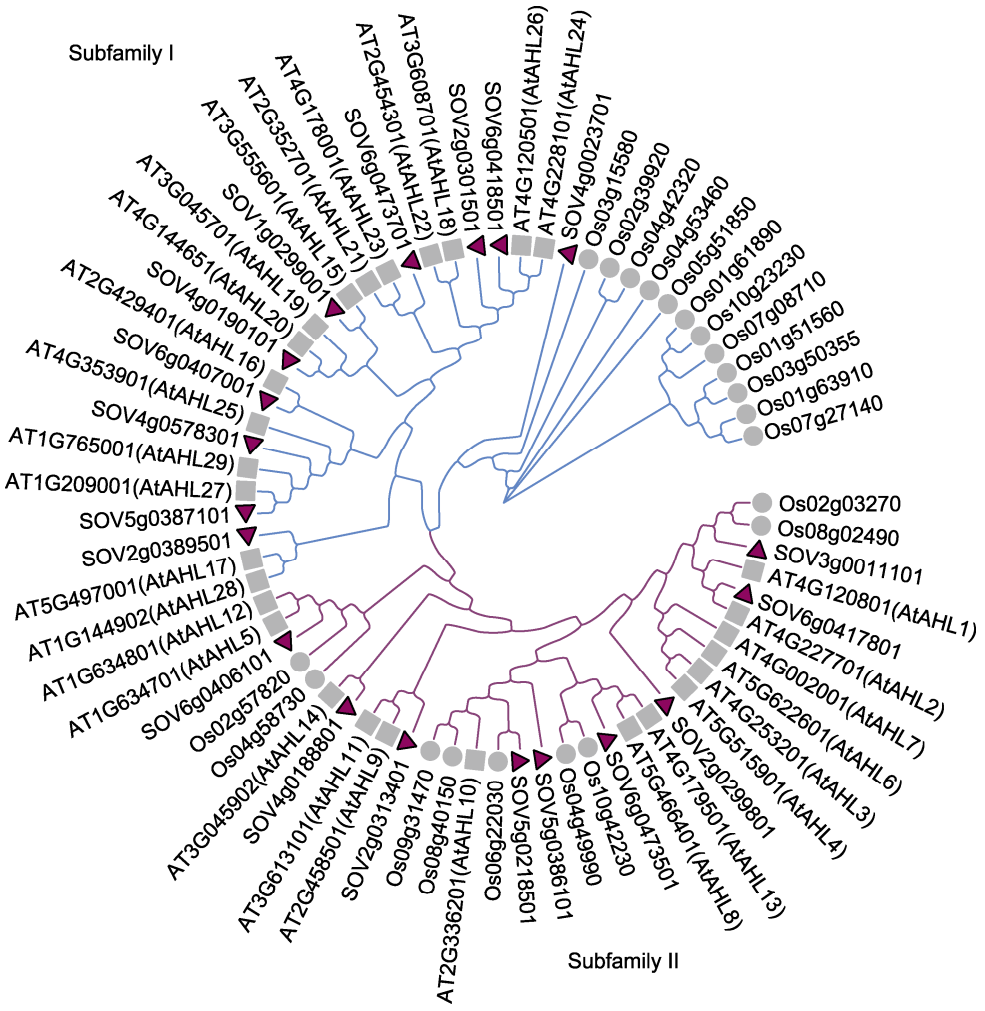


图1 菠菜、拟南芥和水稻AHL蛋白家族进化树分析
紫色表示I亚族，蓝色表示II亚族。

Figure 1 Phylogenetic tree of AHL family members of spinach, *Arabidopsis* and rice
Purple indicates subfamily I, and blue indicates subfamily II.

亚族成员聚为一支，可归为I亚族；9个菠菜SoAHL成员与14个拟南芥AHL蛋白(Clade-A)聚为一支，亲缘关系较近，归为II亚族。I亚族中SOV6g047370.1与AtAHL23和AtAHL21的同源性较高；SOV6g047100.1与AtAHL16亲缘关系较近；SOV1g029900.1与AtAHL15亲缘关系较近。II亚族中SOV6g041780.1与AtAHL2亲缘关系较近；SOV5g038610.1、SOV5g021850.1和SOV5g047350.1与3个AtAHL、5个OsAHL蛋白同源性较高，其中SOV5g021850.1与Os06g22030亲缘关系较近。

2.3 SoAHL蛋白保守结构域及保守基序分析

19个SoAHL成员都含有PPC/DUF296结构域，但2个亚族的PPC/DUF296结构域和AT-hook基序序列有差异(图2)。I亚族蛋白的AT-hook基序包含2个保守的序列RGRP和GSKNK；而II亚族AT-hook基序氨基酸组成为RGRPRKY和RGRPPGSGPK。其中，I亚族成员的PPC保守结构域保守序列为GRFEIL和LRSH，II亚族成员PPC保守结构域的序列组成种类较多，绝大多数含有FTPH保守序列。

对SoAHL家族成员中6个保守基序进行分析，发现6个保守基序在各成员中均以固定顺序排列，同一亚族的SoAHL成员具有相似的基序组成(图3A)。其中Motif1和Motif2是AHL家族PPC结构域中的保守基序；Motif3也位于PPC/DUF296结构域，除*SOV4-g002370.1*外，其余成员均具有Motif3；Motif5为

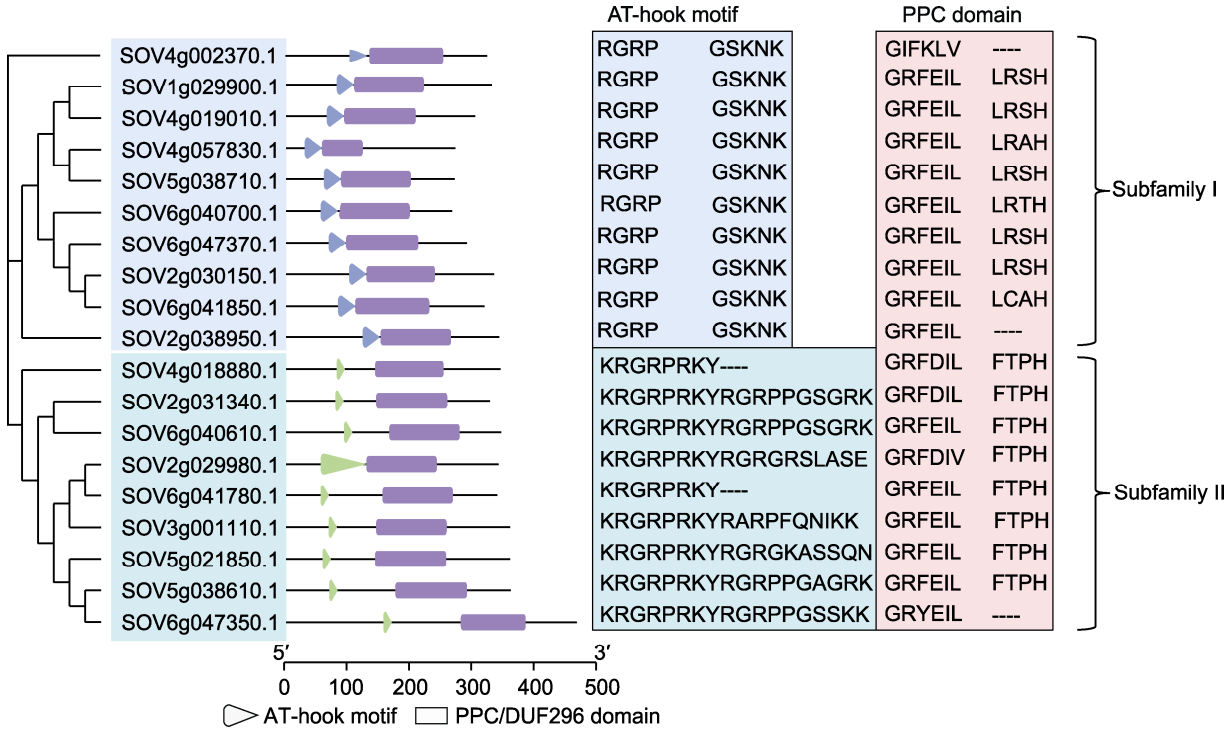


图2 菠菜SoAHL家族成员保守结构域分析

Figure 2 Conserved domain analysis of SoAHL family members in spinach

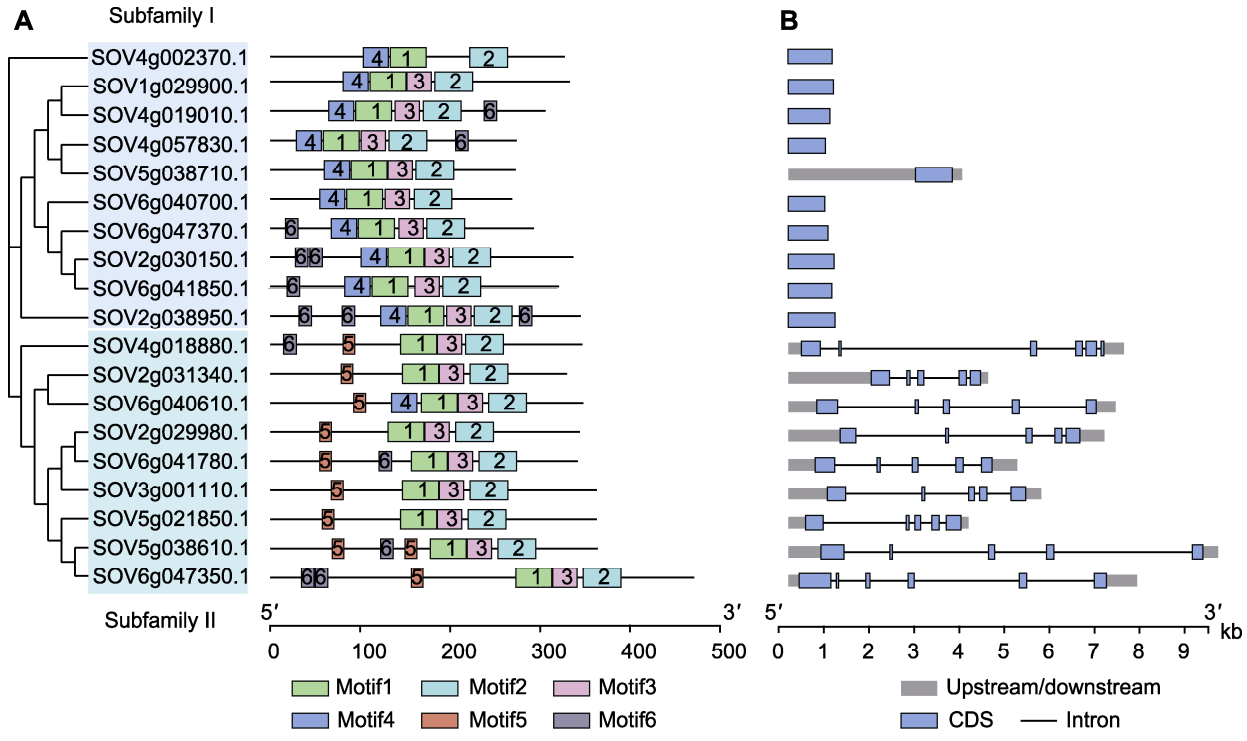


图3 SoAHL家族成员保守基序**(A)**及基因结构分析**(B)**

Figure 3 Analysis of conserved motifs **(A)** and gene structure **(B)** in the SoAHL family members

Clade-II亚族的典型AT-hook保守基序，大多存在于N端。本研究对*SoAHL*基因的结构进行分析，表明19个*SoAHL*基因的结构差异较大，内含子和外显子数量不等(图3B)。I亚族成员基因长度较短，包含的CDS数量最少且均无内含子，而II亚族的SoAHL成员至少含有4个内含子。

2.4 *SoAHL*基因家族共线性分析

菠菜基因组中共存在71个共线性区域，涉及1 216个基因，其中*SoAHL*基因分散分布在各条染色体上，以2号和6号染色体上的分布较为密集(图4)。*SoAHL*家族成员间存在串联重复事件，如4个片段*SOV6g041780.1*与*SOV2g029980.1*、*SOV6g041780.1*与*SOV3g001110.1*、*SOV2g030150.1*与*SOV6g041850.1*、*SOV2g031340.1*与*SOV6g040610.1*。重复事件发生在2、3和6号染色体上，且不全是一一对应关系。

进一步对菠菜、水稻和拟南芥进行种间共线性分析，结果表明，19个菠菜*SoAHL*与拟南芥中12个*AtAHL*成员组成22对直线同源基因；菠菜中7个*SoAHL*与水稻中7个*OsAHL*成员组成7对共线性基因。说明*AHL*家族基因在不同物种间具有一定的保守性和相似性(图5)。

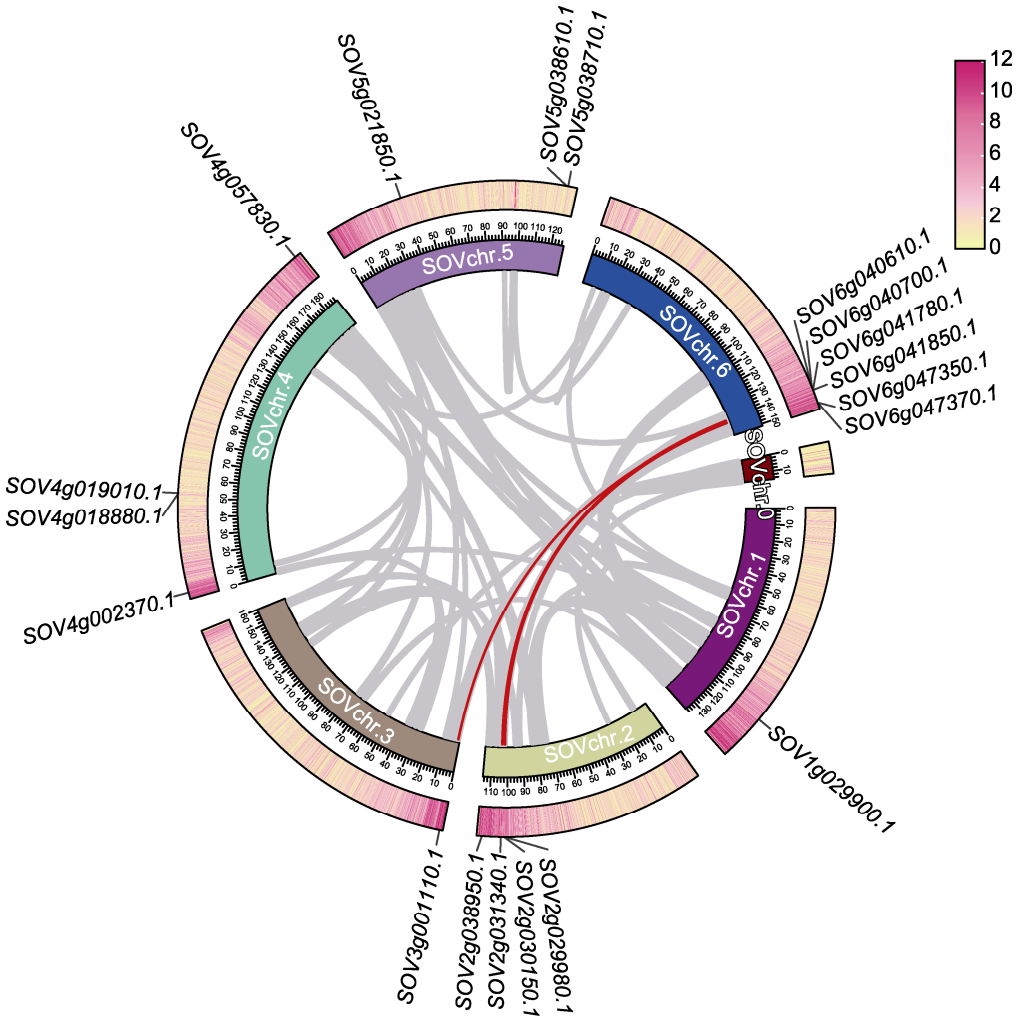


图4 菠菜*SoAHL*基因的区域共线性关系

具有同源性的染色体区域用红线连接*SoAHL*基因，外环为基因密度热图。

Figure 4 Regional collinearity of the *SoAHL* gene in spinach

The homologous chromosome regions were connected with the *SoAHL* genes by red lines, and the outer ring represents the gene density heatmap.

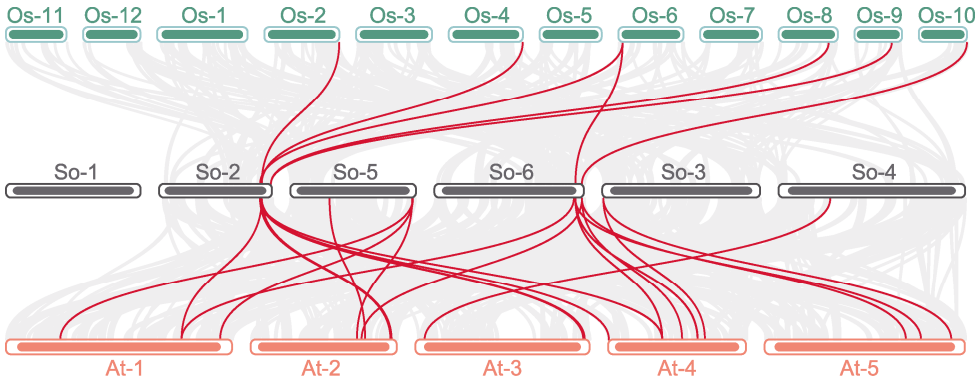


图5 *AHL*基因家族物种间共线性分析

红色线表示物种间*AHL*基因家族成员的共线性基因，浅灰线表示各物种间包含的所有共线性基因。At: 拟南芥; Os: 水稻; So: 菠菜

Figure 5 Collinearity analysis of the *AHL* gene family in different species

The red lines between the bars indicate collinear genes among members of the *AHL* gene family across species; the fine gray line shows all the collinear genes contained between species. At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; So: *Spinacia oleracea*

2.5 *SoAHL*基因家族顺式作用元件分析

利用PlantCARE对菠菜*SoAHL*基因家族成员上游2 Kb片段进行启动子分析，结果显示19个*SoAHL*基因启动子区存在38种顺式作用元件，主要包括光响应(45%)、植物激素响应(32%)、非生物胁迫(23%)以及发育相关元件。其中光响应元件占比最大，植物激素(如乙烯、赤霉素、生长素、茉莉酸甲酯和脱落酸)响应元件分布较广泛(图6)。其次，逆境胁迫相关元件中干旱(如MYB)与低温(如MBS)胁迫响应元件数量最多，分别占非生物胁迫元件总数的45%和20% (图6)。

*SoAHL*基因间顺式作用元件组成有差异，与2个亚族间顺式作用元件组成差异并不显著。*SOV6g040610.1*、*SOV5g038610.1*和*SOV5g038710.1*含有4个以上茉莉素响应元件(TGACG-motif与CGTCA-motif)，其中*SOV6g040610.1*最多(6个)，其余基因不存在或存在不到2个茉莉素响应元件; *SOV2g030150.1*含有12个干旱诱导元件(MYB); *SOV5g021850.1*含有4个乙烯响应元件(ERE); 除*SOV4g057830.1*外的*SoAHL*都含有至少1个脱落酸响应元件(ABRE与AAGAA-motif)，*SOV6g041850.1*、*SOV6g047350.1*分别含有11和12个。*SOV4g018880.1*、*SOV4g019010.1*、*SOV5g038610.1*、*SOV6g040700.1*、*SOV6g041850.1*以及*SOV6g047350.1*含有水杨酸响应元件(TCA-element)，其余基因启动子区不存在水杨酸响应元件。与其它成员相比，*SOV5g038710.1*启动子区域的光响应元件显著多于其它基因(7–13个)，其中G-Box数量最多; *SOV4g018880.1*逆境胁迫响应元件数目最多(21个)，比其它成员多4个以上; 植物激素响应元件中脱落酸响应元件最多，*SOV6g041850.1*与*SOV6g047350.1*含有的植物激素响应元件最多。

2.6 *SoAHL*表达谱分析及菠菜叶酸积累相关基因筛选

为探究*AHL*在叶酸积累中的作用，比较了不同菠菜组织叶酸含量和*SoAHL*的表达量，发现菠菜叶片叶酸含量最高，其次为叶柄，根中含量最低。转录组测序结果表明，*SoAHL*家族成员在菠菜根、叶片和叶柄中均有表达，在叶片和叶柄中表达水平相似。大部分*SoAHL*在根中的表达量较高，如*SOV4g019010.1*在根中的表达量最高，是其它组织的10倍以上。与II亚族成员相比，I亚族成员在根中的表达量较高; 而II亚族成员主要在叶片与叶柄中表达量较高，如*SOV2g031340.1*和*SOV4g018880.1*在叶中表达量明显高于其它组织，其次为*SOV6g040610.1*和*SOV5g038610.1*。叶柄中*SOV5g038610.1*的表达量最高，其次为*SOV6g047350.1*、*SOV6g040610.1*和*SOV4g018880.1*。*SOV2g038950.1*、*SOV3g001110.1*和*SOV4g002370.1*在叶柄中的表达量也较高，占比为17%–21% (图7)。

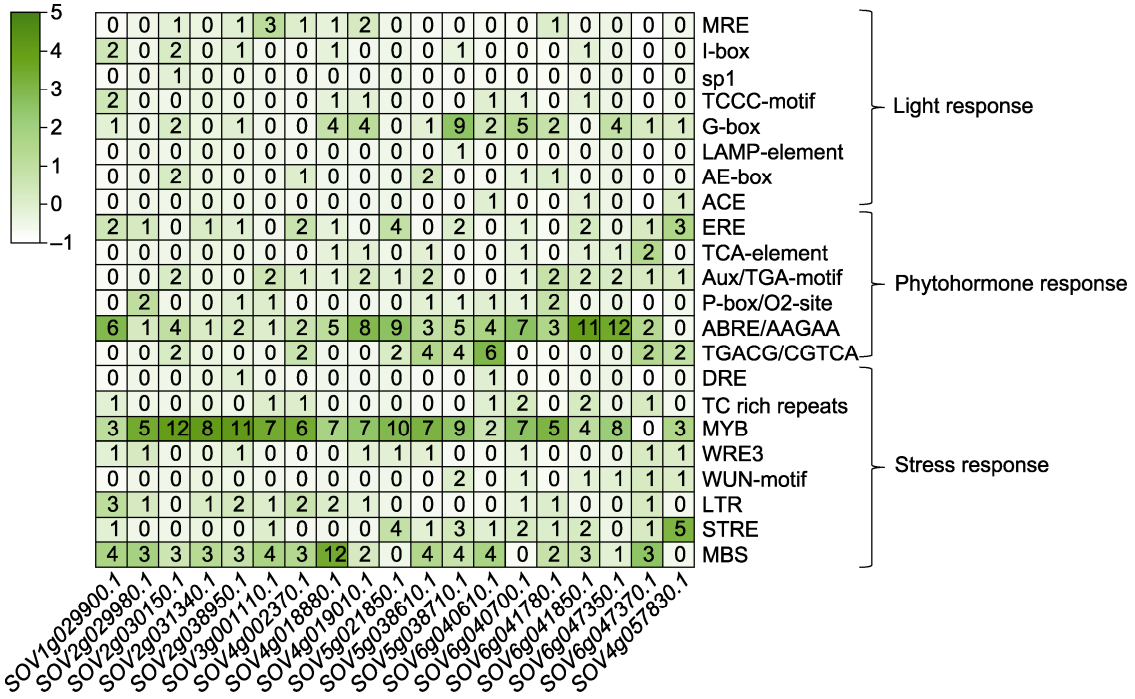


图6 *SoAHL*基因家族成员顺式作用元件分析

Figure 6 Analysis of *cis*-acting elements of the *SoAHL* gene family members

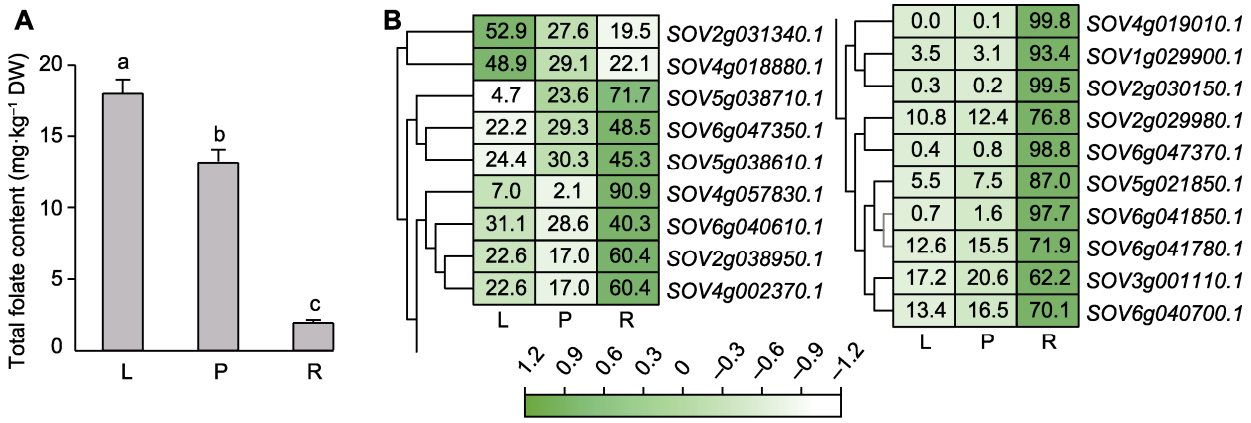


图7 菠菜3种组织叶酸含量**(A)**与*SoAHL*基因表达谱**(B)**

L: 叶片; P: 叶柄; R: 根。不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

Figure 7 Folate content **(A)** and expression pattern of *SoAHL* gene **(B)** in three tissues of spinach

L: Leaf; P: Petiole; R: Root. Different lowercase letters indicate significant differences(P<0.05).

研究表明，植物叶酸含量可能受到水杨酸诱导(Puthusseri et al., 2013)，而*AHL*启动子中也包含数量不等的水杨酸响应元件。因此，为进一步筛选与菠菜叶酸积累相关的*SoAHL*基因，分析了外源水杨酸处理下菠菜叶片叶酸含量及*SoAHL*表达模式的变化。结果发现，外源喷施50 μmol·L^{-1}水杨酸7天内，菠菜表型和生物量与对照相比无明显差异(表3; 图8A)。但叶酸含量在处理第3天(3 D)和第7天(7 D)显著增加(图8B)，增幅最高约1.25倍。qRT-PCR分析发现，水杨酸处理后较多*SoAHL*基因表达明显上调，处理5天时，4个I亚族成员(*SOV1g029900.1*、*SOV6g041850.1*、*SOV2g030150.1*和*SOV2g038950.1*)和4个II亚族成员

表3 水杨酸(SA)处理对菠菜生物量的影响

Table 3 Effects of salicylic acid (SA) treatment on the biomass of spinach

Salicylic acid	Days of treatments (d)	Shoot fresh biomass (g)	Root fresh biomass (g)	Shoot dry biomass (g)	Root dry biomass (g)
Mock	0	0.737±0.171 d	0.053±0.004 b	0.083±0.013 b	0.004±0.001 a
	1	1.042±0.049 c	0.076±0.016 b	0.083±0.013 b	0.030±0.036 a
	3	1.097±0.125 c	0.066±0.008 b	0.095±0.014 b	0.008±0.002 a
	5	1.304±0.017 b	0.079±0.016 b	0.132±0.028 a	0.012±0.008 a
	7	1.511±0.054 a	0.104±0.016 a	0.111±0.020 ab	0.010±0.003 a
SA50	0	0.800±0.190 c	0.061±0.003 a	0.087±0.015 a	0.007±0.003 a
	1	1.123±0.116 b	0.077±0.015 a	0.123±0.032 a	0.012±0.005 a
	3	1.083±0.115 b	0.088±0.056 a	0.339±0.441 a	0.010±0.003 a
	5	1.303±0.080 ab	0.069±0.010 a	0.096±0.018 a	0.010±0.006 a
	7	1.501±0.085 a	0.077±0.015 a	0.094±0.038 a	0.049±0.070 a

不同小写字母表示同一处理下差异显著(Duncan's检验, $P<0.05$); Mock和SA50分别表示对照组和50 μmol·L^{-1} SA处理组。

Different lowercase letters indicate significant differences under the same treatment (Duncan's test, $P<0.05$); Mock and SA50 indicate control and 50 μmol·L^{-1} SA treatment group, respectively.

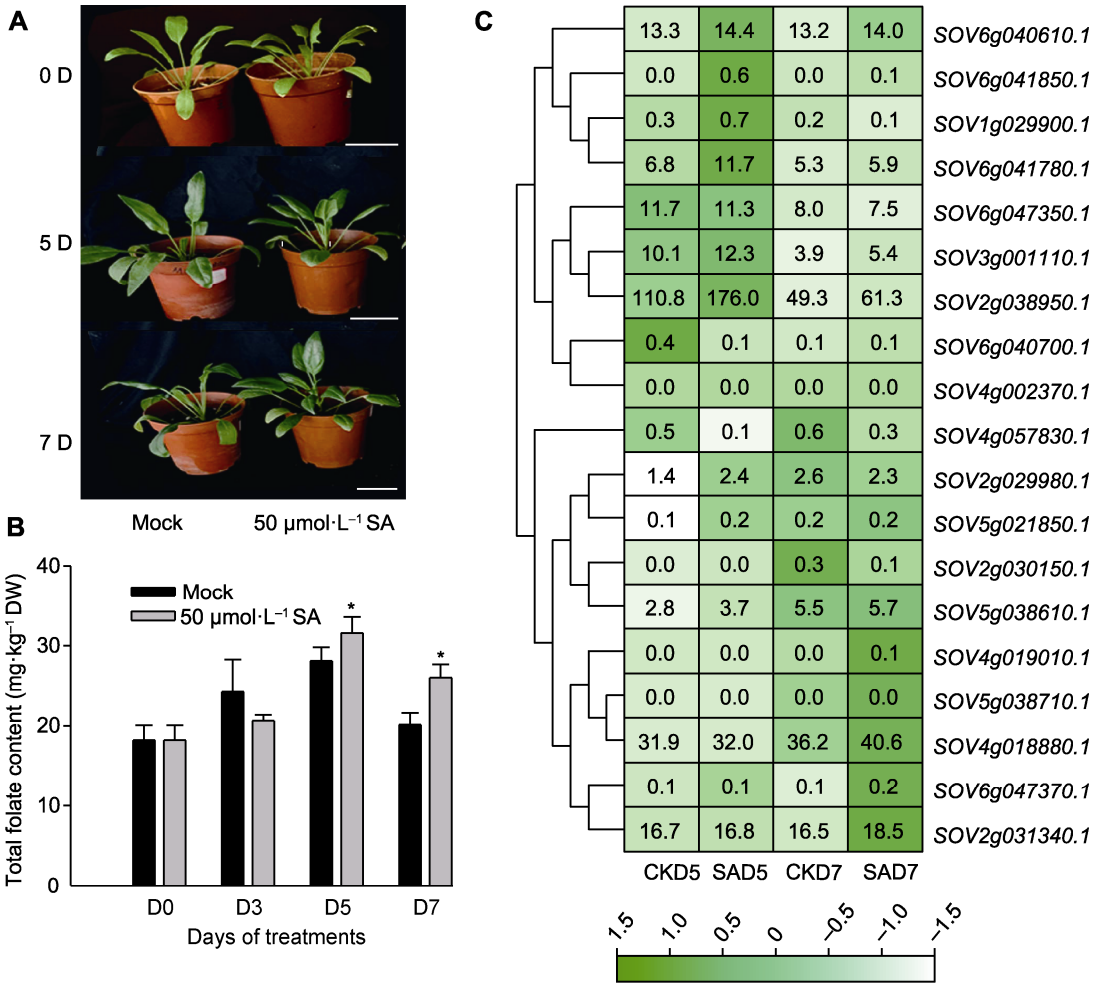


图8 水杨酸(SA)处理下菠菜表型**(A)**、叶酸含量**(B)**与*SoAHL*表达谱**(C)**

CKD5: 对照组处理5天; SAD5: SA处理5天; CKD7: 对照组处理7天; SAD7: SA处理7天。星号表示同一时间下处理间差异显著($P<0.05$, Tukey检验); 热图方框中数字为基因相对表达量。Bars=5 cm

Figure 8 Phenotype **(A)**, total folate content **(B)** of spinach and expression analysis of *SoAHL* **(C)** under salicylic acid (SA) treatment

CKD5: Control group for 5 days; SAD5: SA treatment for 5 days; CKD7: Control group for 7 days; SAD7: SA treatment for 7 days. The stars indicate significant differences between treatments at the same time (P<0.05, Tukey test); the numbers in the heat map boxes respresent gene relative expression. Bars=5 cm

(*SOV2g029980.1*、*SOV5g021850.1*、*SOV5g0386-10.1*以及*SOV6g041780.1*)表达显著上调约1.5–2.4倍; 处理7天时, 与II亚族成员相比, 4个I亚族成员(*SOV6g041850.1*、*SOV4g019010.1*、*SOV6g047-370.1*和*SOV2g038950.1*)表达呈现上调趋势, 其中*SOV6g041850.1*和*SOV4g019010.1*上调幅度明显, 为对照组的4倍以上。*SOV2g038950.1*和*SOV6g-041850.1*的表达在处理5和7天均显著上调。II亚族成员中存在2个在叶片中表达量较高的基因(*SOV4g-018880.1*和*SOV2g031340.1*), 仅在处理7天时表达有所上调, 上调幅度约1.2倍(图8C)。

2.7 *SOV4g018880.1*在叶片中瞬时过表达分析

为验证叶酸积累与*AHL*基因表达之间的相关性, 以*SOV4g018880.1*基因(*SoAHLa*)为研究对象, 将其在菠菜叶片中瞬时过表达。结果表明, 与对照组相比, 过表达组菠菜叶片*SoAHLa*的转录水平上调, 为对照组的4.33倍(图9A), 且过表达组叶片叶酸含量显著提高, 约为对照组的1.75倍(图9B)。说明*SoAHLa*能够增加菠菜叶片中的叶酸含量。

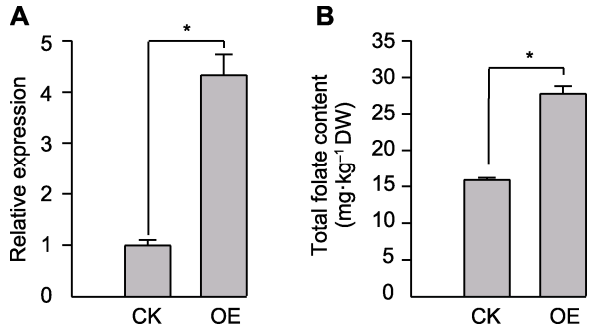


图9 *SoAHLa*瞬时过表达后基因的相对表达量**(A)**及菠菜叶片叶酸含量变化**(B)**

CK: 注射空载体pEG100-SW的菠菜叶片; OE: 注射含*SOV4g018880.1*重组过表达载体的菠菜叶片。* 表示同一时间下处理间差异显著(P<0.05, Tukey检验)。

Figure 9 Changes in the relative expression level of the *SoAHLa* **(A)** and the folate content of leaf **(B)** after transient overexpression of *SoAHLa*

CK: Spinach leaves injected with empty pEG100-SW; OE: Spinach leaves injected with vector containing *SOV4g0188-80.1*. * indicate significant differences between treatments at the same time (P<0.05, Tukey test).

3 讨论

本研究从菠菜数据库中共鉴定出19个*SoAHL*基因家族成员, 与葡萄(14个)数量相近, 但明显少于拟南芥(29个)、水稻(45个)、番茄(32个)、玉米(37个)和大豆(63个)等物种的*SoAHL*家族成员数量。基因家族成员数量的多少与基因重复和缩减事件有关。共线性分析发现, 菠菜*SoAHL*与多个拟南芥和水稻*AHL*成员组成多对直线同源关系, 说明菠菜*AHL*家族存在明显的基因缩减现象, 具有共线性关系的成员间可能存在功能相似性, 减少了*AHL*功能冗余。与拟南芥相似, 菠菜*SoAHL*基因家族也包括2个分支(I和II)。I、II亚族分别包含10、9个成员(Zhao et al., 2013)。全基因组内共线性分析发现, 菠菜*SoAHL*成员可能通过基因重复得到扩增。基因重复主要包括片段重复、随机重复和反转录3种形式。菠菜*AHL*家族中发现4个片段重复基因对, 这可能是导致各亚族成员数量不等以及染色体分布不均的主要原因。2个重复基因片段位于同一亚族(II), 说明菠菜*AHL*家族的基因扩张主要来自片段重复。*SoAHL*成员在1–6号染色体上都有分布, 且随机不均匀, 其中6号染色体上基因数目最多。这与番茄*AHL*的染色体分布相似(Wang et al., 2023), 番茄*AHL*基因在不同染色体上呈不均匀分布, 其中第8号染色体上基因数目最多, 含有6个基因, 其余染色体基因数目在1–4之间。菠菜19个*SoAHL*家族成员中有14个成员定位于细胞核中, 与其它植物中的研究结果基本一致(Li et al., 2021)。同一亚族内的*SoAHL*成员具有相似的基序类型和数量, 表明*AHL*家族在进化过程中高度保守。SoAHL蛋白均具有AT-hook基序与PPC结构域, 但在保守序列组成上有差异, 可能是不同亚家族成员之间功能差异的主要原因, 这也为研究不同亚族基因功能的差异提供了线索。

*AHL*成员基因结构的差异表明其进化轨迹不同, 内含子天然剪接的改变导致编码蛋白的多样性, 从而

产生丰富的生物学功能，内含子的数量则决定了植物适应性的潜力和发育过程(Zhu et al., 2020)。菠菜*AHL*家族的亚族基因均无内含子，可能在进化过程中发生丢失。内含子缺失型基因在非生物胁迫下能够有效减少转录后的加工过程，可以快速转录和翻译(Jeffares et al., 2008)，推测I亚族成员可能与抗逆境胁迫能力有关。与I亚族相比，II亚族的基因结构更加复杂，成员至少含有4个内含子，其中*SOV4g018880.1*和*SOV6g047350.1*的内含子数量最多，可能执行更为复杂的生物学功能。因此II亚族成员中内含子数量的增加可能扩大了AHL蛋白的丰度。此外，菠菜*AHL* I亚族中仅1个基因(*SOV5g038710.1*)具有非翻译区(UTR)，与玉米Type-I中的情况相同(Bishop et al., 2020)，而在大豆中包括Type-I在内的大多数*AHL*基因均具有UTR (Wang et al., 2021a)，表明不同物种的*AHL*基因结构具有多样性。

基因组织表达谱可反映基因的作用部位，进而推测其生物学功能。大豆5个*GmAHL* (*GmAHL1*除外)在各组织中均有不同程度的表达，且在根部的表达受外界生物和非生物胁迫诱导(张大勇等，2017)。丁丽雪等(2016)利用实时荧光定量PCR技术对番茄32个*AHL*基因进行组织表达分析，发现该类基因在根和花中表达量较高。本研究发现*SoAHL*家族基因在菠菜根、叶片和叶柄中均有表达，成员间组织表达谱有差异，但大多数基因在根中表达量较高。根据拟南芥*AHL*基因(*AtAHL3*、*AtAHL4*和*AtAHL18*)参与调控下胚轴伸长(Zhang et al., 2022)，推测菠菜*SoAHL*可能参与地下部的生长调控。此外，II亚族成员中*SOV-2g031340.1*和*SOV4g018880.1*在叶中表达量明显高于其它组织，考虑到叶酸在菠菜叶片中含量较高，推测地上部表达水平较高的基因可能与菠菜叶酸积累相关。

当前的研究表明，*AHL*基因在非生物胁迫响应中发挥重要作用。刘行行和种培芳(2023)发现*PeAHLs*的表达受PEG显著诱导，与对照相比，*PeAHLs*在PEG处理下表达量最高。且其启动子上响应干旱胁迫的元件种类与数量最多，表明*AHL*基因参与干旱胁迫响应。在大青杨(*Populus ussuriensis*)中发现，干旱和ABA胁迫下，*PuAHL17*在根中的表达均显著上调，说明*PuAHL17*可提高大青杨的抗旱性且可能依赖于ABA信号转导(孙佳丽，2023)。本研究中观察到菠菜*AHL*家族I亚族成员在根中表达量最高。根作为植物检测土壤条件变化的主要器官，在应对水分胁迫方面发挥至关重要的作用。结合I亚族*AHL*基因启动子上具有较多与干旱响应有关的应答元件(如MYB、MBS、ABRE和ARE)，推测I亚族*SoAHL*基因可能在干旱胁迫下表达模式有所不同或参与根的生长发育，具体表达模式及调控途径尚待进一步验证。综上，*SoAHL*基因可能编码转录因子，通过调控靶基因增强菠菜的抗旱性或参与地下部的生长调控，该类基因可能与植物激素信号转导或抗逆相关，这为深入研究菠菜*AHL*基因功能提供了重要依据。

其它植物中已有*AHL*响应植物激素的报道。木薯(*Manihot esculenta*)不同组织器官中*MeAHL17*的表达受乙烯、茉莉素和生长素诱导(张亚文等，2024)。番茄*AHL*家族32个基因的表达受低温、高温、高盐、水杨酸和ABA诱导(丁丽雪等, 2016)。本研究发现，水杨酸处理5天，16个*SoAHL*基因的表达水平均受水杨酸诱导，其中显著上调的有*SOV6g041850.1*、*SOV-2g038950.1*、*SOV1g029900.1*以及*SOV2g029980.1*等。番茄*AHL*基因家族中*SlAHL14*和*SlAHL9*受SA诱导表达显著上调，且在根中的表达量最高，与*SOV-6g041850.1*、*SOV1g029900.1*和*SOV2g029980.1*的表现相似。有趣的是，*SlAHL14*在前人报道中被确认为番茄根特异性表达基因(冯婵莹等，2015)，推测*SOV6g041850.1*、*SOV1g029900.1*和*SOV2g0299-80.1*也可能具有在根中表达的特异性或偏好性。由于基因的表达模式与启动子中调控元件的特性有关，本研究在启动子元件分析中，发现*SOV6g041850.1*、*SOV1g029900.1*和*SOV2g029980.1*中并不含有根特异性表达必需元件，因此极有可能这3个基因不是在根中特异性表达而是偏好性表达，但也有可能基因的表达模式在不同植物中会发生不同程度的变化，*SOV-6g041850.1*、*SOV1g029900.1*以及*SOV2g029980.1*的组织特异性表达仍需深入研究。在辣椒中也发现1个AT-hook基因*CaATL1*，在水杨酸处理后表达量显著增加，过表达*CaATL1*提高了转基因番茄对细菌和卵菌病原体的抗性(Kim et al., 2007)，推测菠菜中受SA显著诱导的*AHL*基因可能也具有相似的功能。

与已有研究中SA能促进园艺植物叶酸含量积累的结果相似(Puthusseri et al., 2013; Huang et al., 2020)，本研究也发现适宜浓度的水杨酸能够提高菠

菜叶酸含量。植物叶酸高度不稳定，易被氧化分解，SA能够通过增强植物细胞内过氧化氢酶、过氧化物酶和超氧化物歧化酶等抗氧化酶活性提升植物内部抗氧化状态，保护合成的叶酸免受氧化分解，从而提高叶酸的稳定性，最终使叶酸含量增加(Scott et al., 2000)。目前, SA促进叶酸积累的分子机制仍不清楚。在前期研究的基础上，我们观察到较多*SoAHL*基因的表达受水杨酸诱导上调，其中在叶片中表达量较高的2个基因(*SOV4g018880.1*和*SOV2g031340.1*)的表达量与叶酸含量变化趋势一致，可能正向调控叶酸积累。为进一步验证*SoAHL*的生物学功能，将*SOV4g018880.1* (*SoAHLa*)在菠菜叶片中瞬时过表达，结果发现菠菜叶片叶酸含量增加，初步推测*SOV4g018880.1*参与水杨酸调控的菠菜叶酸积累途径，后续有必要进一步通过稳定遗传转化和基因沉默等手段验证其功能，并阐明其作用机制。

作者贡献声明

杨莉: 完成实验操作、分析数据及撰写论文; 曲茜彤: 构思实验和分析数据; 陈子航和邹婷婷: 分析数据; 王全华: 审阅文稿和分析数据; 王小丽: 论文设计与撰写。

参考文献

Bishop EH, Kumar R, Luo F, Saski C, Sekhon RS (2020). Genome-wide identification, expression profiling, and network analysis of AT-hook gene family in maize. *Genomics* **112**, 1233–1244.

Cai GQ, Kim SC, Li JW, Zhou YM, Wang XM (2020). Transcriptional regulation of lipid catabolism during seedling establishment. *Mol Plant* **13**, 984–1000.

Chen CJ, Wu Y, Li JW, Wang X, Zeng ZH, Xu J, Liu YL, Feng JT, Chen H, He YH, Xia R (2023). TBtools-II: a "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining. *Mol Plant* **16**, 1733–1742.

Delaney SK, Orford SJ, Martin-Harris M, Timmis JN (2007). The fiber specificity of the cotton *FSltp4* gene promoter is regulated by an AT-rich promoter region and the AT-hook transcription factor GhAT1. *Plant Cell Physiol* **48**, 1426–1437.

Ding LX, Li T, Li ZL, Xu XW, Li Y, Wang HM, Wang YF, Ma SM, Li ZX (2016). Genome-wide identification and expression analysis in oxidative stress of AT-hook gene family in tomato. *J Plant Genet Resour* **17**, 303–315. (in Chinese)
丁丽雪，李涛，李植良，徐小万，李颖，王恒明，王永飞，马三梅，黎振兴 (2016). 番茄AT-hook基因家族的鉴定及胁迫条件下的表达分析. 植物遗传资源学报 **17**, 303–315.

Eckner R, Birnstiel ML (1989). Cloning of cDNAs coding for human HMG I and HMG Y proteins: both are capable of binding to the octamer sequence motif. *Nucl Acids Res* **17**, 5947–5959.

Favero DS, Kawamura A, Shibata M, Takebayashi A, Jung JH, Suzuki T, Jaeger KE, Ishida T, Iwase A, Wigge PA, Neff MM, Sugimoto K (2020). AT-hook transcription factors restrict petiole growth by antagonizing PIFs. *Curr Biol* **30**, 1454–1466.

Feng CY, Li T, Li ZX, Li ZL, Xu XW, Ding LX, Wang YF (2015). Expression analysis of root-specific genes in tomato. *Plant Physiol J* **51**, 921–934. (in Chinese)
冯婵莹，李涛，黎振兴，李植良，徐小万，丁丽雪，王永飞 (2015). 番茄根特异基因的表达分析. 植物生理学报 **51**, 921–934.

Hu DX, Liu H, Liang XQ, Wu ZM, Fang JH (2021). Bioinformatics analysis of AT-hook genes family in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Chin J Trop Crops* **42**, 649–659. (in Chinese)
胡冬秀，刘浩，梁炫强，吴自明，方加海 (2021). 花生AT-hook家族基因的生物信息学分析. 热带作物学报 **42**, 649–659.

Huang PX, Dong Z, Guo PR, Zhang X, Qiu YP, Li BS, Wang YC, Guo HW (2020). Salicylic acid suppresses apical hook formation via NPR1-mediated repression of EIN3 and EIL1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **32**, 612–629.

Jacques CN, Favero DS, Kawamura A, Suzuki T, Sugimoto K, Neff MM (2022). 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. *BMC Plant Biol* **22**, 399.

Jeffares DC, Penkett CJ, Bähler J (2008). Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends Genet* **24**, 375–378.

Jeong HN, Sun HJ, Zuo ZF, Lee DH, Song PS, Kang HG, Lee HY (2020). Overexpression of *ATHG1*/*AHL23* and *ATPG3*/*AHL20*, *Arabidopsis AT-hook motif nuclear-localized* genes, confers salt tolerance in transgenic *Zoysia japonica*. *Plant Biotechnol Rep* **14**, 351–361.

Kim SY, Kim YC, Seong ES, Lee YH, Park JM, Choi D (2007). The chili pepper CaATL1: an AT-hook motif-con-

taining transcription factor implicated in defence responses against pathogens. *Mol Plant Pathol* **8**, 761–771.

Li XL, He HH, Wang H, Wu XQ, Wang H, Mao J (2021). Identification and expression analysis of the *AHL* gene family in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Gene* **26**, 100285.

Liu HH, Chong PF (2023). Bioinformatics analysis of the AHL gene family in *Populus euphratica* and its expression characteristics under stress. *Acta Agrestia Sin* **31**, 741–750. (in Chinese)

刘行行，种培芳 (2023). 胡杨AHL基因家族生物信息学分析及逆境胁迫下的表达特征. 草地学报 **31**, 741–750.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.

Lu HB, Zou Y, Feng N (2010). Overexpression of *AHL20* negatively regulates defenses in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **52**, 801–808.

Pan X (2023). Screening and Identification of Upstream Regulatory Factors of *SoGCH1* and *SoPTAR* Genes in Spinach. Master's thesis. Shanghai: Shanghai Normal University. pp. 52–60. (in Chinese)

潘曦 (2023). 菠菜*SoGCH1*与*SoPTAR*基因上游调控因子筛选及鉴定. 硕士论文. 上海: 上海师范大学. pp. 52–60.

Pan X, Sun F, Zhang JY, Yang F, Wang QH, Wang XL (2023). Research progress on folate accumulation in horticultural plants. *China Veg* (**4**), 29–38. (in Chinese)

潘曦，孙飞，张玖漪，杨帆，王全华，王小丽 (2023). 园艺植物叶酸积累规律研究进展. 中国蔬菜 (**4**), 29–38.

Puthusseri B, Divya P, Lokesh V, Neelwarne B (2013). Salicylic acid-induced elicitation of folates in coriander (*Coriandrum sativum* L.) improves bioaccessibility and reduces pro-oxidant status. *Food Chem* **136**, 569–575.

Scott J, Rébeillé F, Fletcher J (2000). Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric* **80**, 795–824.

Širl M, Šnajdrová T, Gutiérrez-Alanís D, Dubrovsky JG, Vielle-Calzada JP, Kulich I, Soukup A (2020). AT-hook motif nuclear localised protein 18 as a novel modulator of root system architecture. *Int J Mol Sci* **21**, 1886.

Sun JL (2023). Function Analysis of *PuAHL17* Gene for Drought Tolerance in *Populus ussuriensis*. Master's thesis. Harbin: Northeast Forestry University. pp. 32–50. (in Chinese)

孙佳丽 (2023). 大青杨*PuAHL17*基因抗旱功能研究. 硕士论文. 哈尔滨: 东北林业大学. pp. 32–50.

Tayengwa R, Sharma Koirala P, Pierce CF, Werner BE, Neff MM (2020). Overexpression of *AtAHL20* causes delayed flowering in *Arabidopsis via* repression of *FT* expression. *BMC Plant Biol* **20**, 559.

Wang LY, Li TT, Liu N, Liu XC (2023). Identification of tomato AHL gene families and functional analysis their roles in fruit development and abiotic stress response. *Plant Physiol Biochem* **202**, 107931.

Wang M, Chen BW, Zhou W, Xie LN, Wang LS, Zhang YL, Zhang QZ (2021a). Genome-wide identification and expression analysis of the *AT-hook Motif Nuclear Localized* gene family in soybean. *BMC Genomics* **22**, 361.

Wang XL, Cai XF, Xu CX, Wang QH (2021b). Identification and characterization of the *NPF*, *NRT2* and *NRT3* in spinach. *Plant Physiol Biochem* **158**, 297–307.

Xiao CW, Chen FL, Yu XH, Lin CT, Fu YF (2009). Over-expression of an AT-hook gene, *AHL22*, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **71**, 39–50.

Yun J, Kim YS, Jung JH, Seo PJ, Park CM (2012). The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying *FLOWERING LOCUS* chromatin in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **287**, 15307–15316.

Zeng QK, Song L, Xia MZ, Zheng Z, Chen ZA, Che XM, Liu D (2023). Overexpression of AHL proteins enhances root hair production by altering the transcription of *RHD6*-downstream genes. *Plant Direct* **7**, e517.

Zhang DY, Qi WC, Wan Q, Liu J, Xu ZL, Huang YH, Shao HB (2017). Cloning and localization analysis on five AT-hook genes *GmAHLs* from *Glycine max*. *J Plant Resour Environ* **26**(4), 1–7. (in Chinese)

张大勇，戚维聪，万群，刘佳，徐照龙，黄益洪，邵宏波 (2017). 5个大豆AT-hook基因*GmAHLs*的克隆与定位分析. 植物资源与环境学报 **26**(4), 1–7.

Zhang GW, Zeng Y, Guo W, Luo Q (2014). Bioinformatics analysis of the AT-hook gene family in rice. *Chin Bull Bot* **49**, 49–62. (in Chinese)

张贵慰，曾珏，郭维，罗琼 (2014). 水稻AT-hook基因家族生物信息学分析. 植物学报 **49**, 49–62.

Zhang JY, Cai XF, Xu CX, Wang QH, Wang XL (2020). Gene identification and expression profiling analysis of spinach folate anabolic pathway. *J Shanghai Norm Univ* (*Nat Sci*) **49**, 637–649. (in Chinese)

张玖漪，蔡晓锋，徐晨曦，王全华，王小丽 (2020). 菠菜叶酸合成代谢途径基因鉴定及表达谱分析. 上海师范大学学报(自然科学版) **49**, 637–649.

Zhang SL, Wang T, Lima RM, Pettkó-Szandtner A, Ker-

eszt A, Downie JA, Kondorosi E (2023). Widely conserved AHL transcription factors are essential for *NCR* gene expression and nodule development in *Medicago*. *Nat Plants* **9**, 280–288.

Zhang WM, Cheng XZ, Fang D, Cao J (2022). AT-hook motif nuclear localized (AHL) proteins of ancient origin radiate new functions. *Int J Biol Macromol* **214**, 290–300.

Zhang YW, Wang XT, Zhang XL, Tang XN, Liu J, Guo JC (2024). Cloning and expression analysis of *MeAHL17* gene in cassava. *Chi J Trop Crops* **45**, 1303–1313. (in Chinese)
张亚文，王晓彤，张兴龙，唐湘宁，刘姣，郭建春 (2024). 木薯*MeAHL17*基因的克隆及表达分析. 热带作物学报 **45**, 1303–1313.

Zhao JF, Favero DS, Peng H, Neff MM (2013). *Arabidopsis thaliana* AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E4688–E4697.

Zhao LJ, Lü YJ, Chen W, Yao JB, Li Y, Li QL, Pan JW, Fang ST, Sun J, Zhang YS (2020). Genome-wide identification and analyses of the *AHL* gene family in cotton (*Gossypium*). *BMC Genomics* **21**, 69.

Zhou YS, Zhang XM, Chen J, Guo XP, Wang HY, Zhen WB, Zhang JL, Hu ZB, Zhang XB, Botella JR, Ito T, Guo SY (2022). Overexpression of *AHL9* accelerates leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **22**, 248.

Zhu M, Yan BW, Hu YJ, Cui ZB, Wang XX (2020). Genome-wide identification and phylogenetic analysis of rice *FTIP* gene family. *Genomics* **112**, 3803–3814.

Identification of the Spinach AT-hook Gene Family and Analysis of Expression Profiles

Li Yang, Xitong Qu, Zihang Chen, Tingting Zou, Quanhua Wang, Xiaoli Wang*

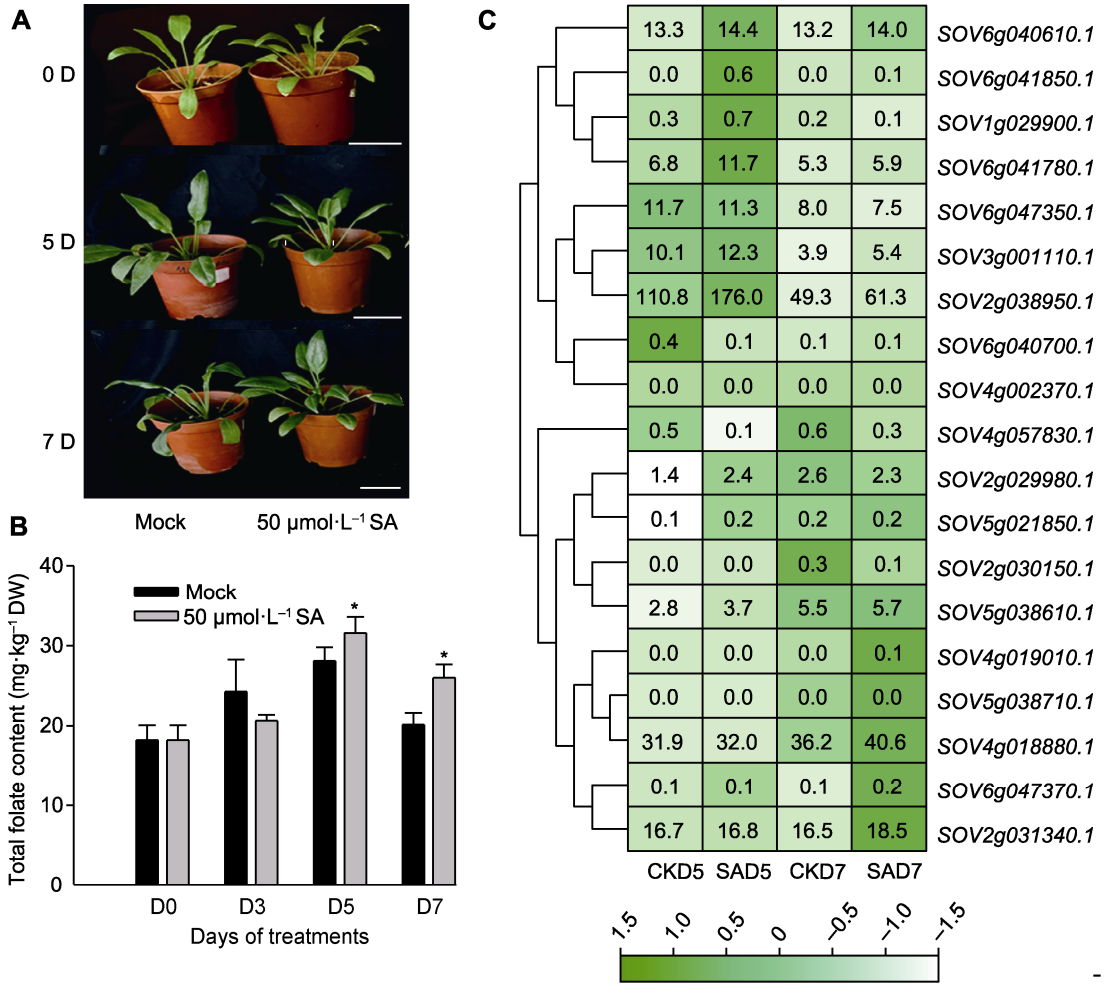
Development and Collaborative Innovation Center of Plant Germplasm Resources, College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

INTRODUCTION: The AT-hook motif nuclear localized (AHL) gene family is a highly conserved transcription factors involved in plant growth, development, and stress responses, but their roles in spinach are still unknown.

RATIONALE: To reveal the basic characteristics of the AHL family in spinach, members of the spinach *SoAHL* family were identified at the whole-genome level, and their physicochemical properties, gene structure, conserved motifs, promoter elements, and salicylic acid-responsive expression profiles were analyzed in this study.

RESULTS: The results revealed 19 *SoAHL* family members in the spinach genome, which were unevenly distributed across six chromosomes. These *SoAHL* members can be classified into three branches, with 10 members in subfamily I and 9 members in subfamily II. The sequence composition of PPC and AT-hook conserved motifs varies among subfamilies; most of the *SoAHL* genes are located in the nucleus, cytoplasm, and mitochondrion. Members of subfamily I of *SoAHL* have no introns, whereas members of subfamily II contain 4–5 introns. The varying numbers of *cis*-acting elements relate to phytohormones and abiotic stress responses were distributed upstream of the promoters of the *SoAHL* members. The *SoAHL* genes can be expressed in roots, leaves, and petioles, with most genes expressed at relatively high levels in roots. The expression of two *SoAHL* genes (*SOV6g041850.1* and *SOV2g038950.1*) was significantly induced by salicylic acid treatment. The expression profiles and salicylic acid-induced expression levels of *SOV2g031340.1* and *SOV4g018880.1* were highly correlated with the folic acid content, which may play a role in the spinach response to the salicylic acid signaling pathway. The transient overexpression of *SOV4g018880.1* increased the folate content of spinach leaves by 1.75 times.

CONCLUSION: The results from the sequence characteristics, expression profiles and exogenous salicylic acid treatment revealed that the *SoAHL*s had potential functional diversity and that specific members may have positive effects on spinach folate accumulation. Our results will lay the foundation for further resolving the function of spinach AT-hook genes.



Phenotype (A), total folate content (B) and expression analysis of *SoAHL* (C) under 50 μmol·L^{-1} salicylic acid (SA) treatment for 5 days (D5) and 7 days (D7). CK: Control

Key words spinach, AT-hook gene family, bioinformatics, salicylic acid

Yang L, Qu XT, Chen ZH, Zou TT, Wang QH, Wang XL (2025). Identification of the spinach AT-hook gene family and analysis of expression profiles. *Chin Bull Bot* **60**, 377–392.

---

* Author for correspondence. E-mail: wangxl@shnu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

通讯作者/团队简介

王小丽, 上海师范大学生命科学学院副教授, 硕士生导师。主要从事园艺植物营养品质调控、遗传鉴定及新品种选育等工作。目前研究团队以菠菜为主要研究对象, 收集了世界各地菠菜种质资源千余份, 完成菠菜资源的深度转录组测序和全基因组测序工作, 利用生理生化、遗传学和分子生物学等手段对其重要农艺性状进行研究。