

巴西蕉2个ERF转录因子基因的克隆及功能研究

侯晓婉¹, 胡伟², 徐碧玉², 张鲁斌¹, 金志强^{2*}

(¹中国热带农业科学院南亚热带作物研究所·海南省热带园艺产品采后生理与保鲜重点实验室, 广东湛江 524091;

²中国热带农业科学院热带生物技术研究所·农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101)

摘要:【目的】筛选、克隆响应非生物胁迫的关键ERF转录因子基因,并研究其功能。【方法】综合运用转录组学、生物信息学、生物化学等技术手段,分析不同非生物逆境胁迫下AP2/ERF转录因子超家族基因的表达谱聚类变化,并从中筛选、克隆关键ERF转录因子,对其功能进行研究。【结果】不同非生物胁迫下,AP2/ERF超家族基因的表达模式不同,对低温胁迫的响应较其他胁迫敏感;筛选克隆的MaERF25和MaERF27基因是ERF家族基因,具备ERF家族基本特征,编码蛋白为核定位蛋白,C端具有转录激活活力,并参与了香蕉对非生物胁迫和激素的应答,在其中发挥着一定的作用。【结论】获得了2个巴西蕉ERF基因MaERF25和MaERF27,被定位在细胞核,具有转录激活活性,参与非生物逆境胁迫应答。

关键词: 香蕉; AP2/ERF; 基因克隆; 亚细胞定位; 转录激活; 实时荧光定量PCR

中图分类号: S668.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)07-0806-11

Cloning and characterization of two ERF transcription factor genes in Brazil banana

HOU Xiaowan¹, HU Wei², XU Biyu², ZHANG Lubin¹, JIN Zhiqiang^{2*}

(¹South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences·Key Laboratory of Hainan Province for Post-harvest Physiology and Technology of Tropical Horticultural Products, Zhanjiang 524091, Guangdong, China; ²Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture·Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, Hainan, China)

Abstract: 【Objective】Banana (Musaceae, *Musa*) is one of the most important food plants, widely distributed in tropical and subtropical countries. Banana is particularly sensitive to most of the abiotic stresses, such as freezing, drought and salt, which would cause heavy decrease of the yield and quality. Therefore, investigation the molecular mechanism of the response of banana to abiotic stresses is of prime importance for improving stress-resistant ability. Moreover, over the last decades APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) proteins have been found to be involved in a variety of biological processes. Based on the number of the structure domain, AP2/ERF superfamily was divided into four families as AP2/ERF, ERF, RAV and soloist. The proteins of ERF family only contained an AP2/ERF structure domain and were studied more deeply than others in all transcription factors family. The genes of ERF family played an important role in regulating plant response to abiotic stresses. The purpose of this study is to clone the key ERF transcription factors of banana and to identify their functions in response to abiotic stresses in order to provide a basis for improving stress-resistant ability. 【Methods】The relative transcriptome results of AP2/ERF superfamily genes of Brazilian banana involved in responding to abiotic stresses of leaves were obtained. The expression profile analysis on AP2/ERF super family genes of banana were conducted by us-

收稿日期: 2016-12-26 接受日期: 2017-03-23

基金项目: 现代农业产业技术体系(国家香蕉产业技术体系)建设专项(CARS-32); 973计划前期研究专项(2014CB160314); 香蕉、芒果、菠萝保鲜、贮运关键技术集成与产业化应用(ZDZX2013011)

作者简介: 侯晓婉, 研究实习员, 硕士, 主要从事热带水果基因功能相关研究。Tel: 18789231837, E-mail: yimiyanguanghwxw@163.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: zhiqiangjin2001@yahoo.com.cn

ing MeV software. In view of the sensitivity to low temperature stress, *MaERF25* and *MaERF27* were isolated from banana using RNA reverse transcription cDNA mixture from various tissues and organs of banana as template. By using ExPASy, DNAMAN and some other related biological analysis softwares and on the basis of protein sequence homology, the sequences homologue and the basic characteristics of protein were analyzed. In addition, the transient expression vectors containing *MaERF25* and *MaERF27* gene were constructed on the basis of plant expression vector pCAMBIA1302. pCAMBIA1302-*MaERF25*-GFP, pCAMBIA1302-*MaERF27*-GFP and empty vector (pCAMBIA1302-GFP) were respectively introduced into onion epidermal cells by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient transformation and the fluorescent signals were observed by a FluoView™ FV1000 laser scanning confocal microscope to analyze the effecting position. The transcriptional activating activity of *MaERF25* and *MaERF27* proteins was detected in yeast strain AH109. The yeast expression vectors including full length and deletion fragment of those two genes, *MaERF25*, *MaERF25*-N/*MaERF25*-C and *MaERF27*, *MaERF27*-N/*MaERF27*-C, were respectively constructed on the basis of the vector pBKGT7 (pBD) carrying the His and LacZ reporter genes. Then, the expression vectors were transformed into yeast competent cells to detect its transcriptional activating activity and to confirm its transcriptional activating region. Finally, the expression level of *MaERF25* and *MaERF27* under different abiotic stress and ABA treatment were verified by Mx3005P quantitative real-time PCR. 【Results】The study acquired 110 gene expression information from the transcriptome results. The result of heatmap analysis showed that AP2/ERF super family get the higher gene expression level (90.91%) under cold stress treatment compared with that under other abiotic stress treatments, the up-regulated genes accounted for 73.64% under cold treatment. In addition, under high-salt treatment, the differential expression genes accounted for 82.72%, and the up-regulated genes possessed 45.45%. Under mannitol treatment, the differential expression genes accounted for 79.54%, and the up-regulated genes had the proportion of 42.27%. *MaERF25* (GSMUA_Achr2T20280) and *MaERF27* (GSMUA_Achr10T15510) were chosen as the research objects according to the results of heatmap analysis, and their CDS sequences were cloned. Sequence analysis confirmed that their CDS sequences had higher consistence with *Elaeis*, *Phoenix dactylifera*, *Nelumbo nucifera* and *Vitis vinifera*. The conserved domain analysis by NCBI showed that the amino acid sequence of *MaERF25* and *MaERF27* were respectively located in the 52-110 and 68-126 amino acids both harboring a single AP2 domain, which were consistent with the ERF families' features and indicated that *MaERF25* and *MaERF27* were AP2/ERF transcription factors. *MaERF25* and *MaERF27* full-length sequences respectively inserted into the plant expression vector of 35S: GFP (pCAMBIA1302-GFP). Subcellular localization analysis revealed that *MaERF25* and *MaERF27* were located in the nucleus. *MaERF25*, *MaERF25*-N, *MaERF25*-C, *MaERF27*, *MaERF27*-N and *MaERF27*-C full-length sequences inserted into pBKGT7 vector, and then transformed into AH109 yeast strains, respectively. Yeast one-hybrid assays demonstrated the presence of transcriptional activity in the *MaERF25* and *MaERF27* proteins and their C-terminal domains. The transcription response of the two TFs in response to mannitol, salinity, low temperature and the treatment of abscisic acid (ABA), showed *MaERF25* and *MaERF27* were involved in the response to freezing, drought, salinity and abscisic acid, and were induced in different degrees. The highest level of induction of the two genes was found when treated with low temperature. 【Conclusion】Two ERF transcription factor family genes, *MaERF25* and *MaERF27*, were isolated from banana. Their proteins were all located in nuclear and had transcriptional activating activity, being involved in the responses to abiotic stresses.

Key words: Banana (Musaceae, *Musa*); AP2/ERF; Gene clone; Subcellular localization; Transcriptional activation; Quantitative real-time PCR

前人研究表明多个转录因子家族在响应植株的胁迫应答中起关键性的作用。AP2/ERF (APETEL-LA2/Ethylene Responsive Element Binding Factor) 超家族是植物最大的转录因子之一, 基于 AP2/ERF 结构域的数目和是否出现其他 DNA 结合域, 将其划分为 AP2、ERF、RAV 和 soloist 4 个家族^[1-2]。其中 ERF 家族蛋白包含单独的 AP2/ERF 结构域, 是目前研究较深入的一个转录因子家族, 它在花器官的发育、细胞增生、次生代谢产物合成、ABA 和乙烯信号响应及生物和非生物胁迫应答中发挥重要的作用。近年来, 科研工作者对 ERF 家族基因响应非生物逆境胁迫的研究越来越深入。冯萌等^[3]通过对拟南芥 ERFy 功能缺失突变体 (*erfy*) 幼苗在 ATP 处理条件下主根的生长状况进行研究, 初步确认 ERFy 在 eATP 调控幼苗根系生长发育过程中发挥作用。Wang 等^[4]发现杨树根中的 PthERF99、-110、-119 和 -168 基因在干旱和 ABA 信号处理下下调表达, 但在高盐处理下却特异上调表达。Yang 等^[5]报道麻疯树的 *JcERF1* 基因在转基因番茄中的过表达增强了对高盐的耐受性。花生 *AhERF019* 在转基因拟南芥中过表达增强了植株对干旱、高温和高盐的耐受性^[6]。荷花 *LcERF054* 和麻疯树 *JcERF1* 的表达被高盐诱导, 其分别在转基因拟南芥和转基因烟草中的过表达增强了植株对高盐的耐受性^[5,7]。芝麻中的 AP2si16 基因显著响应了干旱的胁迫, 用于改造芝麻对干旱的耐受性^[8]。水稻的 OsERF71 基因改变了水稻根的结构和水稻对干旱的耐受性^[9]。

香蕉 (*Musaceae*, *Musa*) 是热带、亚热带发展中国家重要的农作物之一, 根据基因型被划分为 AA、AAA、AAAA、AAB、AAAB、AABB、AB、ABBBB、BBB 等组, 而主要栽培品种多为三倍体的巴西蕉 (AAA)、粉蕉 (AAB) 和大蕉 (ABB)^[10-11], 特别是巴西蕉, 因具有较高的商业价值, 很受收购商和蕉农的欢迎, 被大面积种植。然而香蕉是多年生常绿大型草本单子叶植物, 对低温、干旱、高盐等非生物逆境胁迫异常敏感, 在生产过程中经常会受到病虫害、低温、干旱和高盐等生物和非生物因素的影响, 严重影响香蕉产量和果实品质^[12-14]。为了提高香蕉对各种非生物胁迫的耐受性, 深入挖掘关键 ERF 转录因子并对其进行功能研究显得尤为必要。

因此笔者基于本实验室前期巴西蕉幼苗不同非生物胁迫处理后巴西蕉叶片的转录组表达谱数据,

筛选出显著受低温胁迫诱导的 *MaERF25* 和 *MaERF27* 基因进行克隆, 并对其功能进行初步探究。该研究将为巴西蕉 ERF 家族关键转录因子的筛选和鉴定以及其功能的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

生长正常的五叶一心时期巴西蕉 (*Musa* AAA Cavendish ‘Brazilian’) 幼苗取自中国热带农业科学院儋州组培中心。

氯仿、异戊醇、乙醇等各种分析纯试剂购自广州化学试剂公司; pMD18-T 载体、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; T4 连接酶购自 BioLab 试剂公司, 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 试剂生物公司, PCR 试剂购自康为试剂生物公司。

1.2 方法

1.2.1 AP2/ERF 超家族转录组数据表达谱分析 基于本实验室前期对巴西蕉进行 RNA-seq 测序的结果, 获得巴西蕉叶片不同非生物胁迫下 AP2/ERF 超家族基因的表达数据, 运用 MeV 软件, 制作 AP2/ERF 超家族的表达热图 (Heatmap), 对其表达谱进行分析。

1.2.2 巴西蕉 *MaERF25* 和 *MaERF27* 基因的克隆和序列分析 基于巴西蕉 AP2/ERF 超家族基因的表达谱聚类分析结果, 从中筛选出显著响应低温胁迫的 *MaERF25* (GSMUA_Achr2T20280) 和 *MaERF27* (GSMUA_Achr10T15510) 基因, 根据 ORF 序列设计 2 对克隆引物 (表 1), 以正常生长的巴西蕉幼苗叶片提取 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 扩增 *MaERF25* 和 *MaERF27* 的 cDNA 全长序列。PCR 扩增产物回收、连接、转化后, 挑取单克隆在 LB 液体培养基中培养并进行 PCR 鉴定。对已鉴定的阳性克隆进行测序分析。

在 NCBI 中对 *MaERF25* 和 *MaERF27* 编码的氨基酸保守结构域进行分析, 同时在 ExPASy 中对推导的 MaERF 蛋白进行分子质量和等电点基本特征分析。利用 Blastx 进行序列同源性分析, 并从中下载 5 个与 *MaERF25* 和 *MaERF27* 基因编码蛋白序列相似性较高的其他单子叶植物 ERF 家族同源序列, 用 DNAMAN 软件对氨基酸序列的多重同源性进行分

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

基因名称 Gene name	引物用途 Primer uses	大小 Size/bp	引物序列 Primer sequence(5'-3')
<i>MaERF25</i>	克隆 Cloning	684	F:ATGGAGTTCGAGGAATCGTC R:TTCATCGTTCCACAGTGGCG
<i>MaERF27</i>	克隆 Cloning	750	F:ATGGATTTTGAGGATTCCTC R:GTCCGCCCATACGACAGGT
<i>MaERF25</i>	qReal-time PCR	174	F:GCCCTCTTCCTCCTCCT R:GGCTCCCTCACCTCACA
<i>MaERF27</i>		145	F:GCCATCCGCTTTGTTTGTG R:CAGGTCCATGTGGTGTTCC
<i>MuRPS2</i>		325	F:TAGGGATTCCGACGATTGT R:TAGCGTCATCATTGGCTGGGA
<i>MaERF25</i>	表达载体构建 Construction of expression vectors in plant	684	F:CATGCCATGGCGATGGAGTTCGAGGAATCGTC R:GGACTAGTTTCATCGTTCCACAGTGGCG
<i>MaERF27</i>		750	F:CATGCCATGGCGATGGATTTTGAGGATTCCTC R:GGACTAGTGTCCGCCCATACGACAGGT
<i>MaERF25</i>	酵母表达载体构建 Construction of expression vectors in yeast	684	F:GGAATTCCATATGATGGAGTTCGAGGAATCGTCGTCGT R:CGGGATCCTTATTCATCGTTCCACAGTGGCG
<i>MaERF25-N</i>		324	F:GGAATTCCATATGATGGAGTTCGAGGAATCGTCGTCGT R:CGGGATCCCGGGAAGTTGAGCAGGGCCGACT
<i>MaERF25-C</i>		363	F:GGAATTCCATATGGACCTCGCCGGGACTCTGCC R:CGGGATCCTTATTCATCGTTCCACAGTGGCG
<i>MaERF27</i>		753	F:GGAATTCCATATGATGGATTTTGAGGATTCCTCCTCC R:CGGGATCCTTAGTCCGCCCATACGACAGGT
<i>MaERF27-N</i>		372	F:GGAATTCCATATGATGGATTTTGAGGATTCCTCCTCC R:CGGGATCCTGGGAAAGTTGAGGTGGGCCGATTCTC
<i>MaERF27-C</i>		381	F:GGAATTCCATATGGACTCGGCCTGGGTTCTG R:CGGGATCCTTAGTCCGCCCATACGACAGGT

注:加粗为限制性酶切位点及保护碱基。

Note:Blod fonts are restriction site and protective bases.

析比对。

1.2.3 *MaERF25* 和 *MaERF27* 亚细胞定位分析 根据目的基因 *MaEFR25* 和 *MaEFR27* 的 CDS 序列设计带有酶切位点 *Nco* I / *Spe* I 的载体引物(表 1)进行扩增,扩增产物回收后连接到克隆载体 pMD18-T 上,获得重组质粒,阳性克隆测序正确后,用 *Nco* I / *Spe* I 进行双酶切并回收目的片段。利用 T4 连接酶连接载体和目的片段,连接产物转化大肠杆菌 DH5α 后,挑取单克隆扩大培养,经 PCR、质粒双酶切和测序验证后,构建成植物表达载体 pCAMBIA1302- *MaERF25*- GFP 和 pCAMBIA1302- *MaERF27*-GFP。将测序正确的阳性克隆载体质粒和 pCAMBIA1302 空载体质粒,用液氮冷冻法的方法将其均转入农杆菌菌株 LBA4404 后,利用瞬时转化法将 pCAMBIA1302- *MaERF25*- GFP、pCAMBIA1302- *MaERF27*-GFP 和 pCAMBIA1302-GFP 导入洋葱表皮细胞中。随后将洋葱表皮放在铺有滤纸的 MS 培养基上,25 ℃ 暗培养 16~24 h,制作装片,通过

FluoView™ FV1000 激光扫描共聚焦显微镜观察荧光信号。

1.2.4 *MaERF25* 和 *MaERF27* 蛋白转录激活活性验证 以带有报告基因 His 和 LacZ 的酵母表达载体 pBKGT7(pBD)为基础,设计 7 个带有 *Nde* I / *Bam* H I 酶切位点,且包含全长或片段的酵母表达载体引物(表 1),送至深圳华大基因研究院合成。分别以 pMD18-T-*MaERF25* 和 pMD18-T-*MaERF27* 克隆载体质粒为模板,进行扩增,扩增产物回收后连接到克隆载体 pMD18-T 上,获得重组质粒,送上海生工进行测序检测。抽提测序正确的重组阳性克隆质粒,用 *Nde* I / *Bam* H I 限制性内切酶分别双酶切酵母表达载体 pBKGT7 和 pMD18-T,对酶切产物跑胶,并回收目的基因片段和载体大片段。利用 T4 连接酶连接目的片段和载体片段,成功构建 7 个酵母表达载体系统 pBKGT7、pBKGT7-*MaERF25*、pBKGT7-*MaERF25*- N/C 和 pBKGT7- *MaERF27*、pBKGT7- *MaERF27*-N/C。参见陆平利^[15]的方法和 Make Your Own

Mate Plate™ Library System 说明书进行后续酵母单杂交显色验证。

1.2.5 不同非生物胁迫下 *MaERF25* 和 *MaERF27* 的表达分析 根据 TaKaRa 实时荧光定量标准说明书分别设计 2 对 qRT-PCR 引物(表 1),为了保证引物的特异性,引物设计在序列 3' 端的非翻译区且避开 ERF 家族基因的保守区域,并将 PCR 长度维持在 300 bp 以内,确保扩增结果反应的就是 *MaERF25* 和 *MaERF27* 基因的特异性表达结果,所有引物交由上海生工生物工程有限公司合成。分别以 4 °C 低温、300 mmol·L⁻¹ 甘露醇(Mannitol)、300 mmol·L⁻¹ NaCl (高盐)和 100 μmol·L⁻¹ ABA 溶液喷洒处理不同时间的巴西蕉叶片 RNA 反转录的 cDNA 为模板,以 MuRPS2 基因为内参进行 qRT-PCR 分析。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR GreenI 试剂盒,SYBR Premix Ex Taq (2×)5 μL、Rox reference Dye II (50×)(TaKaRa)0.2 μL、5 μmol·L⁻¹ 的引物各 0.25 μL,cDNA 样品 1 μL,然后用灭过菌的去离子水补至 10 μL,在 Mx3005P 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。扩增的反应程序为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 10 s,50 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,循环 35 次。每个样品设置 2 个生物学重复,结果分析采用 2^{-ΔΔCt} 定量方法:
$$\Delta\Delta C_t = (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ x} - (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ 0}^{[16]}$$

2 结果与分析

2.1 巴西蕉不同非生物胁迫下 AP2/ERF 超家族基因表达谱分析

本研究共获得了低温、甘露醇和高盐处理后巴西蕉叶片 AP2/ERF 超家族 110 个基因的表达数据,对其进行 Heatmap 表达分析(图 1),结果显示,巴西蕉对低温胁迫的响应更加显著。与高盐和甘露醇胁迫相比,低温胁迫下差异表达的 *MaERF* 基因数最多,占总基因数的 90.91% (100/110),其中 73.64% (81/110) 显著上调,17.27% (19/110) 显著下调;而甘露醇和高盐胁迫下差异表达的基因数分别为 84.55% (93/110) 和 82.73% (91/110),差异显著上调的基因数分别为 42.27% 和 45.45%,差异表达基因数和显著上调的基因数均较低温胁迫下少。具体数据统计见表 2。此外,3 种非生物胁迫处理下部分 *MaERF* 基因表达情况一致。如 33.64% 的基因均被诱导表达;8.18% 的基因(*MaERF28*, -35, -37, -58, -71, -98, -101, -110, -115)均被抑制,呈下

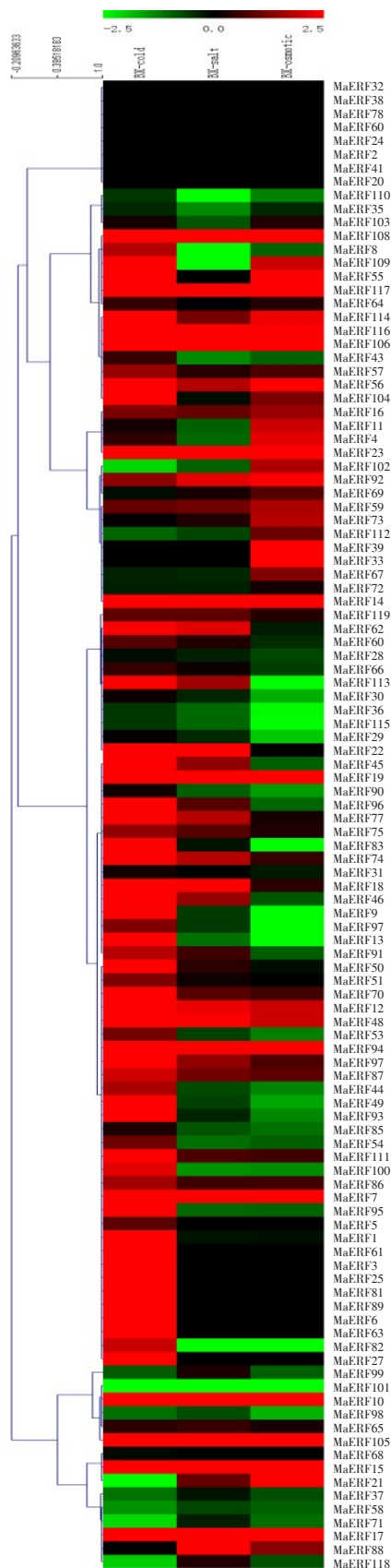


图 1 不同非生物胁迫后巴西蕉叶片中 AP2/ERF 超家族基因表达谱分析

Fig. 1 Expression heatmap of gene from AP2/ERF super family under different abiotic stress in banana leaves

表2 不同非生物胁迫下差异基因所占比例

Table 2 The ratio of differential genes under different abiotic stresses

	显著差异基因 Significant differences of gene	上调基因 Up- regulated gene	下调基因 Down- regulated gene	无显著变 化基因 No significant changes
低温 Cold	90.91	73.64	17.27	9.09
甘露醇 Mannitol	84.55	45.45	37.27	17.27
高盐 High Salt	82.73	42.27	37.27	15.45

调表达趋势;而7.27%基因(MaERF2,-20,-24,-32,-38,-41,-60和-78)表达均无显著变化。

2.2 MaERF25和MaERF27的克隆及生物信息学分析

2.2.1 MaERF25和MaERF27的克隆和蛋白基本特征分析 以正常生长的巴西蕉幼苗叶片cDNA为模版,克隆了2个ERF家族基因MaERF25和MaERF27,其ORF分别为684 bp和750 bp。ExPASy分析蛋白基本特征表明,MaERF25编码228个氨基酸,蛋白大小为24.852 6 ku,等电点为5.10;MaERF27编码250个氨基酸,蛋白相对分子质量为26.939 9 ku,等电点为6.61。NCBI中保守结构域分析(图2)表明,MaERF25和MaERF27基因编码蛋白的氨基酸序列都具有单个AP2保守结构域,分别位于第52~110和68~126氨基酸上,符合ERF家族特征,是AP2/

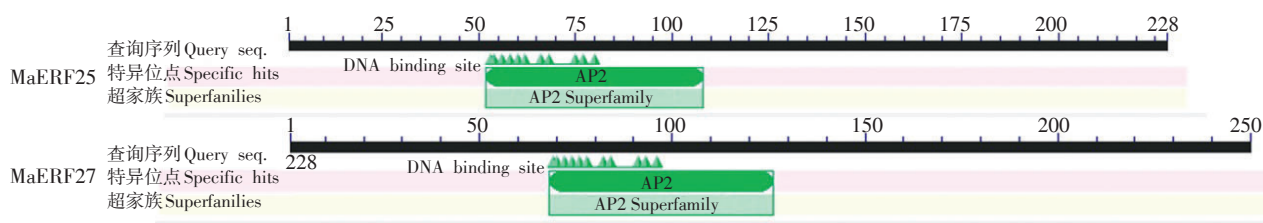


图2 MaERF25和MaERF27蛋白保守结构域分析

Fig. 2 Conserved domains analysis of MaERF25 and MaERF27

ERF转录因子。

2.2.2 MaERF25和MaERF27氨基酸序列分析和结构功能预测 通过Blastx软件对同源性进行比对,选取了与MaERF25一致性均为86%、与MaERF27一致性均为79%的油棕(EaDREB,登录号:XP_010940400.1)、海枣(PdDREB,XP_008807522.1)、荷花(NnDREB1和NnDREB2,登录号分别为:XP_010243826.1,XP_010242642.1)和葡萄(VvERF,CAN79383.1)植物中的ERF氨基酸序列,进行多重序列比对。序列比对结果(图3)显示,MaERF25和MaERF27基因编码的氨基酸序列与其他物种中的ERF蛋白氨基酸序列具有较高的一致性,并且含有ERF家族高度保守的AP2/ERF区域。另外,在AP2/ERF保守结构域的N端和C端分别含有YRG和RAVD保守元件,分布有3个 β 折叠和1个 α 螺旋。

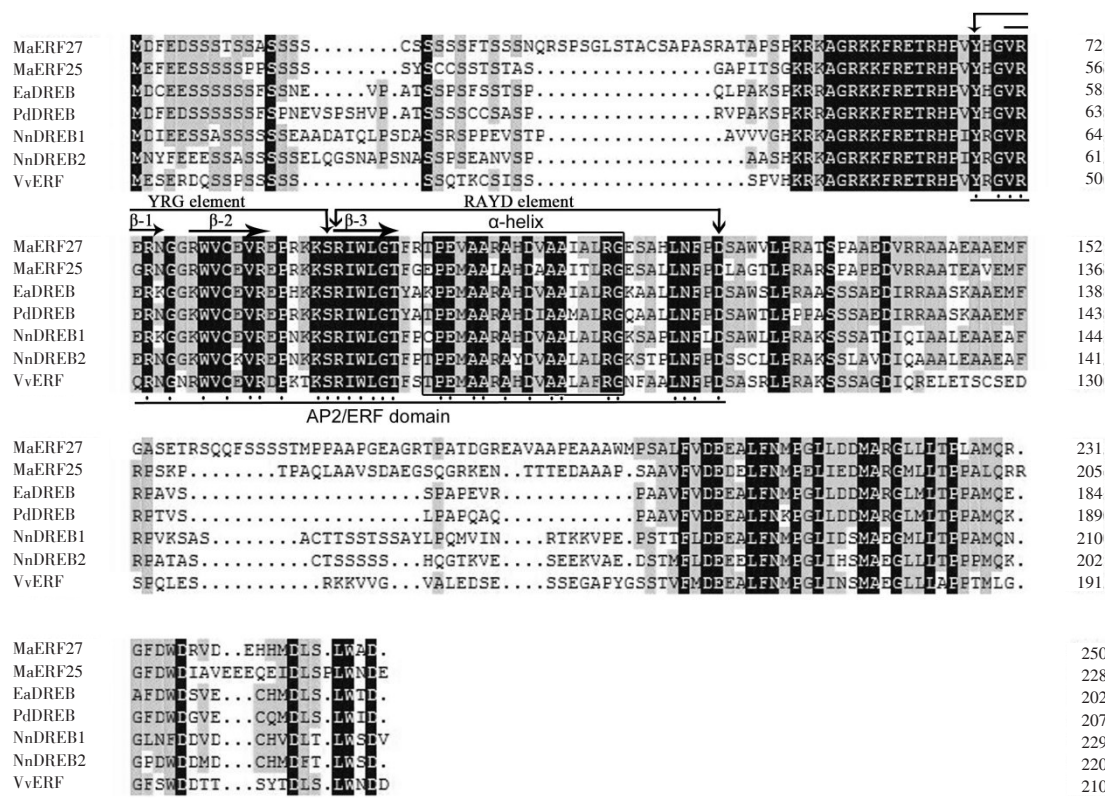
2.3 MaERF25和MaERF27蛋白的亚细胞定位分析

本研究将MaERF25和MaERF27基因全长融合到了带有GFP绿色荧光蛋白的植物表达载体中,并通过重组质粒双酶切得到验证(图4),成功构建植

物瞬时表达载体pCAMBIA1302-MaERF25-GFP和pCAMBIA1302-MaERF27-GFP;通过农杆菌介导的洋葱表皮的亚细胞定位试验,观察绿色荧光蛋白信号在细胞内的分布。结果显示,35S:GFP绿色荧光蛋白在洋葱表皮细胞的细胞质、细胞核和细胞膜上均有表达,而35S:MaERF25-GFP和35S:MaERF27-GFP洋葱表皮细胞仅在细胞核内观察到绿色荧光信号(图5),表明MaERF25和MaERF27基因编码的蛋白均定位在细胞核上。

2.4 转录激活活性分析

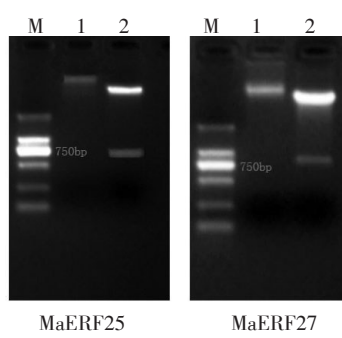
将7个酵母表达载体分别成功转入AH109酵母菌株中,观察酵母菌株在各种不同缺失培养基上的生长状况。结果(图6)显示,在缺失色氨酸(SD/-Trp)的培养基上,转化有7个载体的对应酵母均能正常生长,表明其均成功转入到了AH109菌株中。而在SD/-His的培养基上,仅pBKGT7-MaERF25、pBKGT7-MaERF25-C、pBKGT7-MaERF27、pBKGT7-MaERF27-C能正常生长,表明这些基因的转入激活了酵母报告基因His的表达,而pBKGT7(pBD)、MaERF25-N和MaERF27-N不能激活His报



MaERF25. 香蕉; MaERF27. 香蕉; EaDREB. 油棕; PdDREB. 海枣; NnDREB1. 荷花; NnDREB2. 荷花; VvERF. 葡萄(CAN79383.1)。单横线. AP2/ERF 保守结构域; 箭头. 3 个 β 折叠; 方框. α 螺旋; 横向方括号. YRG 元件和 RAYD 元件。

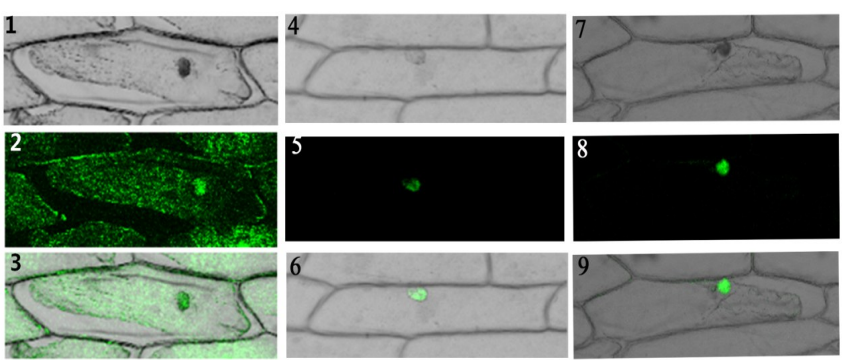
MaERF25. *Musa* AAA Cavendish ‘Brazilian’; MaERF27. *Musa* AAA Cavendish ‘Brazilian’; EaDREB. *Elaeis*; PdDREB, *Phoenix dactylifera*; NnDREB1. *Nelumbo nucifera*; NnDREB2. *Nelumbo nucifera*; VvERF. *Vitis vinifera*. Single line. AP2/ERF conservative domain; Arrow. three β folding; Box. α helix; Horizontal Brackets. YRG element and RAYD element.

图 3 MaERF 与其他物种 ERF 同源氨基酸序列的比对
Fig. 3 Comparison of the homology sequences of MaERF and other proteins



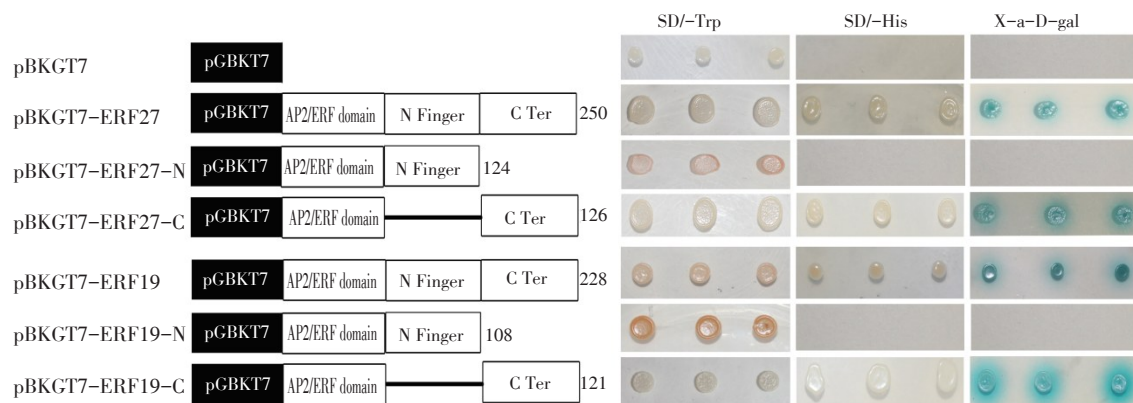
M. Marker; 1. 质粒; 2. 双酶切结果。
M. Marker; 1. Plasmid; 2. The results of double-enzyme.

图 4 *MaERF25* 和 *MaERF27* 的植物表达载体重组质粒酶切验证
Fig. 4 Results of the recombinant plasmids digested by restriction enzymes



1, 4, 7. 洋葱内表皮细胞外观; 2, 5, 8. 激光共聚焦显微镜下的绿色荧光信号; 3. 1 与 2 叠合; 6. 4 与 5 叠合; 9. 7 与 8 叠合。
1, 4, 7. Out-look of onion epidermal cells; 2, 5, 8. Green fluorescent signal under FluoView™ FV1000; 3. Overlap of 1 and 2; 6. Overlap of 4 and 5; 9. Overlap of 7 and 8.

图 5 *MaERF27* 和 *MaERF25* 亚细胞定位
Fig. 5 The subcellular localization of *MaERF25* and *MaERF27*

图6 *MaERF25* 的酵母转录激活活性分析Fig. 6 Transcriptional activation activity of *MaERF25* in yeast cells

告基因的表达。在含有 X- a-D-Galactoside 的培养基上,在 SD/-His 上正常生长的酵母也都能够变成蓝色,表明 pBKT7-*MaERF25*、pBKT7-*MaERF25*-C、*MaERF27* 和 *MaERF27*-C 不仅激活了 His 报告基因,还激活了酵母上的 Lac 报告基因。这些结果说明 *MaERF25* 和 *MaERF27* 基因分别包含转录激活区域,并且其转录激活区域均位于对应基因的 C 端,碱基顺序分别为 372~750 和 324~684,而 N 末端则没有转录激活活性。

2.5 不同非生物胁迫下 *MaERF25* 和 *MaERF27* 的表达分析

利用实时定量 PCR 的方法对 *MaERF25* 和 *MaERF27* 基因在低温、甘露醇、高盐 and ABA 处理下的表达模式进行分析。结果表明,与对照相比, *MaERF25* 和 *MaERF27* 基因在低温处理下的绝对表达值均显著高于甘露醇、高盐 and ABA 的绝对表达值。低温处理下,和对照相比, *MaERF25* 基因的表达呈持续上调趋势,在恢复 5 d (R5d) 后达到最大值; *MaERF27* 在处理 10 h 时显著上调,并达到最大值,10 h 后表达量下降,在 R5d 后下降到最小值。甘露醇处理下,和对照相比, *MaERF25* 在处理 0~17 d 均持续上调表达,17 d 时达到最大值; *MaERF27* 在处理 0~7 d 出现轻微下调,之后 7~15 d 表达量没有显著变化,处理 17 d 后表达显著上调,远大于对照组的表达量。高盐处理下,和对照相比, *MaERF25* 和 *MaERF27* 均上调表达。 *MaERF25* 在处理 0~24 d 持续上调表达,但整体表达量均较低; *MaERF27* 在处理 8 d 时下降,8~24 d 持续上升,达到最大值。ABA 喷洒处理后,和对照相比, *MaERF25* 在处理 0~24 h 过程中,

先上升后下降,在处理 6 h 达到最大值,整体呈诱导趋势; *MaERF27* 在处理的 0~2 h 显著上调,6 h 时表达显著下降,但仍高于对照组表达量,6~24 h 呈持续上调趋势,并达到最大值(图 7)。

3 讨论

为了研究巴西蕉 AP2/ERF 基因在不同非生物胁迫处理下的表达情况,本研究共获得 110 个 ERF 基因的表达数据,其中响应低温胁迫最敏感,差异基因数占基因总数 90.91%,其次是甘露醇和高盐,分别占 84.55% 和 82.73%。此外,差异显著上调的基因也是低温胁迫下的最多,占 73.64%,而甘露醇和高盐分别为 45.45% 和 42.27%。植株感知不同非生物胁迫的位置是不同的,甘露醇和高盐主要作用于植株的根部,而低温信号则首先被植株的叶片感知,这可能是低温胁迫下基因变化比甘露醇和高盐多的原因。这一结果表明,巴西蕉叶片中的 *MaERF* 基因响应低温胁迫的应答比响应甘露醇和高盐胁迫的更加敏感,它们在植物响应各种非生物胁迫的过程中起着重要作用。前人已经广泛报道转录因子 ERF 蛋白通过调控植物各种生理代谢途径参与响应干旱、高盐 and 低温的渗透胁迫^[17-19]。本研究运用实时荧光定量 PCR 的方法对 *MaERF25* 和 *MaERF27* 在转录水平对甘露醇、低温、高盐 and ABA 的应答进行验证。结果表明,与对照相比, *MaERF25* 和 *MaERF27* 均不同程度被诱导,特别是低温胁迫下显著上调。这一结果与转录组表达谱数据分析结果基本一致,均是对低温胁迫最敏感。花生 *AhERF6* 和拟南芥 *RAP2.6* 在低温和甘露醇胁迫下,杨树 *PhERF80* 在 NaCl 胁迫

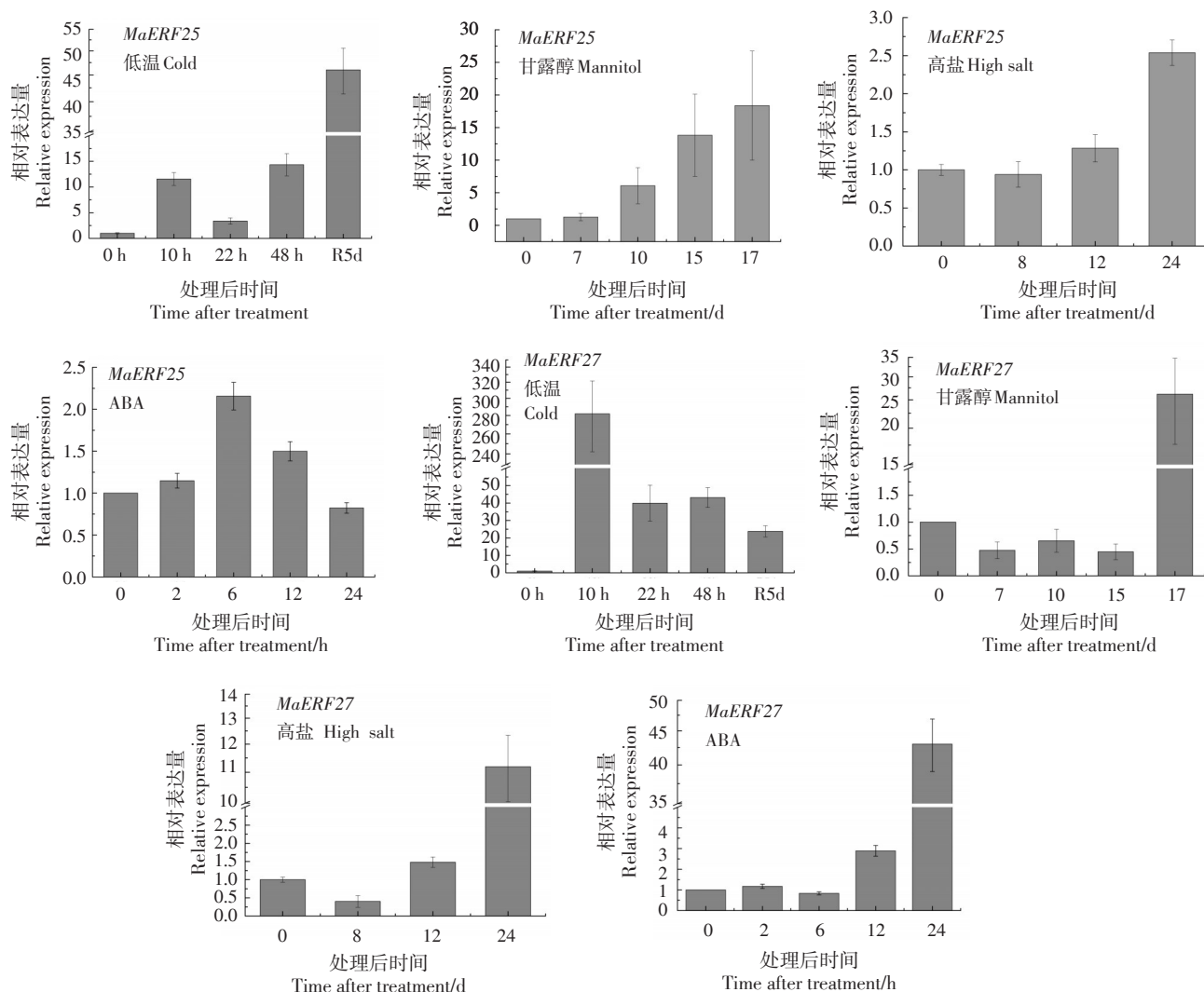


图7 不同胁迫处理下 *MaERF25* 和 *MaERF27* 实时荧光定量 PCR 表达分析
Fig. 7 Q-RT-PCR of *MaERF25* and *MaERF27* under different stress treatments

下、荷花 *LcERF054*、麻风树 *JcERF1* 在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理下的表达情况均与 *MaERF25* 和 *MaERF27* 在相应胁迫处理下的表达情况一致^[4-5,7,17,20]。此外, ERF 基因的过表达也增强了植株的耐受性。如拟南芥 *RAP2.6* 在转基因烟草中的过表达增强了对干旱的耐受性^[17]。Zhang 等^[21]报道番茄 *TERF2* 的过表达增强了番茄和转基因烟草对低温胁迫的耐受性。*CpRap2.4a* 和 *CpRap2.4b* 的过表达,提高了番木瓜对低温的耐受性^[22]。以上结果显示,转录组表达谱结果与 q-PCR 体外验证的结果基本一致,均对低温胁迫的响应最显著。ERF 基因的过表达提高了转基因植株对非生物胁迫的耐受性,从而提高了植株的抗逆性。因此表明克隆的 2 个 ERF 基因参与了巴西蕉对低温的响应,并可能在巴西蕉抵御低温胁迫过程中发挥重要作用。

细胞区分对转录因子而言是一个重要的调节机制。大豆 *GmERF6* 和 *GmERF7* 基因的 GFP 融合蛋白只在洋葱表皮的细胞核中检测到荧光^[23]。Sun 等^[5]通过聚乙二醇转染法将 35S: *LcERF054*-GFP 转入到拟南芥原生质体,并在核中检测到了荧光信号。Gao 等^[24]分离了菊花 6 个 ERF 基因,并通过瞬时表达证实 6 个 ERF 基因均定为在细胞核上。本研究通过农杆菌介导的亚细胞定位研究巴西蕉 ERF 蛋白的分布,发现 *MaERF25* 和 *MaERF27* 转录因子均位于细胞核,属核蛋白。前人研究证实 ERF 转录因子作为转录激活子或者抑制子存在于细胞中,如烟草的 *NtERF3* 和拟南芥的 *AtERF3/4* 和 *AtERF7-12*, *AtERF4* 通过负调节植物防卫基因 *PDF1.2* 的表达调控茉莉素和乙烯反应^[25-26]。烟草 *NtERF2/4*、拟南芥 *AtERF1/2/5*、长春花 *ORCA3*、番茄的 *Pti4*、小麦 *TaE-*

RF3、大麦 HvRAF、荷花 LcERF054、麻疯树 JcERF1、拟南芥 AtERF15 和 PAP2.6 作为激活子,行使转录激活功能^[5, 7, 17, 27-29]。Zhu 等^[17]发现不仅含 pYF503-RAP2.6 酵母能使加有 X-gal 的 SD/-Trp/-Ura 培养基变成蓝色,含 pYF503-RAP2.6-C 的酵母也能使其变成蓝色。表明 RAP2.6 的转录激活区域位于序列 C 端。一些 ERF 基因之所以行使抑制子功能,是因为其含有 EAR 结构域。本研究发现 MaERF25 和 MaERF27 基因均仅含有 AP2 结构域,所以并未检测出其行使抑制子的功能,而是在氨基酸序列的 C 端检测到其转录激活的功能,表明其以激活子形式在巴西蕉响应各种非生物胁迫的过程中发挥作用,并且其激活区域也位于 C 端。

本研究基于转录组表达谱数据对响应非生物胁迫下的功能基因进行挖掘,较其他基因的筛选方法更具有研究依据,并且为后续深入的研究 *MaERF25* 和 *MaERF27* 在同源和异源植株中的耐受性奠定了基础,有助于筛选与之互作的功能蛋白,对于后续互作功能蛋白功能的研究奠定基础,为抗逆育种提供基因资源参考。

4 结 论

克隆了显著受低温诱导的 MaERF25 和 MaERF27 两个 ERF 家族基因,并对其功能进行初步研究,发现其编码的核蛋白具有转录激活活力, MaERF25 和 MaERF27 参与非生物逆境胁迫应答。

参考文献 References :

- [1] SONG X M, LI Y, HOU X L. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1):1-15.
- [2] DEEPIKA L, ASHUTOSH P, YOGESHWAR V D, SUMIT K B, PRABODH K T, MEHAR H A. Genome-wide analysis of the AP2/ERF family in *Musa* species reveals divergence and neofunctionalisation during evolution [J]. Scientific Report, 2016, 6:18878
- [3] 冯萌. 乙烯反应因子在 eATP 调控拟南芥根系生长过程中的作用 [D]. 石家庄:河北师范大学, 2013.
FENG Meng. The role of ERF in extracellular ATP-regulated root growth of *Arabidopsis thaliana* [D]. Shijiazhuang: HeBei Normal University, 2013.
- [4] WANG S J, YAO W J, WEI H R, JIANG T B, ZHOU B R. Expression patterns of ERF genes underlying abiotic stresses in di-haploid *Populus simonii* × *P. nigra* [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014(2014): 745091.
- [5] YANG H, YU C, YAN J, WANG X H, CHEN F, ZHAO Y, WEI W. Overexpression of the *Jatropha curcas* JcERF1 gene coding an AP2/ERF-type transcription factor increases tolerance to salt in transgenic tobacco [J]. Biochemistry, 2014, 79(11): 1226-1236.
- [6] WAN L Y, WU Y S, HUANG J Q, DAI X F, LEI Y, YAN L Y, JIANG H F, ZHANG J C, RAJEEV K V, LIAO B S. Identification of ERF genes in peanuts and functional analysis of AhERF008 and AhERF019 in abiotic stress response [J]. Functional & Integrative Genomics, 2014, 14(3): 467-477.
- [7] SUN ZH M, ZHOU M L, XIAO X G, TANG Y X, WU Y M. Genome-wide analysis of AP2/ERF family genes from *Lotus corniculatus* shows LcERF054 enhances salt tolerance [J]. Functional & Integrative Genomics, 2014, 14(3):453-466.
- [8] DOSSA K, WEI X, LI D H, FONCEKA D, ZHANG Y X, WANG L H, YU J Y, LIAO B S, DIOUF D, NDIAGA C, ZHANG X R. Insight into the AP2/ERF transcription factor superfamily in sesame and expression profiling of DREB subfamily under drought stress [J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1):171-186.
- [9] LEE D K, JUNG H, JANG G, JONG J S, KIM Y S, HA S H, CHOI Y D, KIM J K. Overexpression of the OsERF71 transcription factor alters rice root structure and drought resistance [J]. Plant Physiology Preview, 2016, 172(1): 379.
- [10] SIMMONDS N W. Megasporogenesis and female fertility in 3 edible triploid bananas [J]. Journal of Genetics, 1961, 57(2/3):269.
- [11] 郭计华, 李绍鹏, 周丽, 桂腾琴, 谢子四, 李新国. 基于 FCM 测定的香蕉种质倍性分析 [J]. 果树学报, 2017, 34(1): 12-18.
GUO Jihua, LI Shaopeng, ZHOU Li, GUI Tengqin, XIE Zisi, LI Xinguo. Ploidy investigation of bananas (*Musa* spp.) by flow cytometry [J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(1): 12-18.
- [12] 刘菊华, 徐碧玉, 张建平, 贾彩虹, 王甲水, 张建斌, 金志强. 香蕉基因组测序及胁迫相关功能基因研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(3): 110-114.
LIU Juhua, XU Biyu, ZHANG Jianping, JIA Caihong, WANG Jia-shui, ZHANG Jianbin, JIN Zhiqiang. Research progress on banana genomics and functional genomics involved in stress resistance [J]. China Biotechnology, 2012, 32(3): 110-114.
- [13] XU Y, HU W, LIU J H, ZHANG J B, JIA C H, MIAO H X, XU B Y, JIN Z Q. A banana aquaporin gene, MaPIP1; 1, is involved in tolerance to drought and salt stresses [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 1-28.
- [14] 王卓, 徐碧玉, 贾彩虹, 李健平, 刘菊华, 张建斌, 苗红霞, 金志强. 香蕉 MYB 基因克隆和表达分析 [J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1085-1092.
WANG Zhuo, XU Biyu, JIA Caihong, LI Jianping, LIU Juhua, ZHANG Jianbin, MIAO Hongxia, JIN Zhiqiang. Molecular cloning and expression of MYB1 gene from banana (*Musa acuminata* L. AAA group, 'Cavendish') under the various stresses [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1085-1092.
- [15] 陆平利. 拟南芥 ATAF1 转录因子在干旱胁迫响应中的功能分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.

- LU Pingli. Functional analysis of *Arabidopsis* ATAF1 transcription factors in response to drought stress[D]. Beijing: China Agricultural University, 2006
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Method*, 2001, 25(4): 402–408.
- [17] ZHU Q, ZHANG J T, GAO X SH, TONG J H, XIAO L T, LI W B, ZHANG H X. The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses[J]. *Gene*, 2010, 457(1/2): 1–12.
- [18] AGARWAL P K, AGARWAL P, REDDY M K, SOPORY S K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25 (12): 1263–1274.
- [19] CHECKER V G, CHHIBBAR A K, KHURANA P. Stress-inducible expression of barley Hva1 gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress [J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(5): 939–957.
- [20] CHEN N, YANG Q L, SU M W, PAN L J, CHI X Y, CHEN M G, HE Y N, YANG Z, WANG T, WANG M, YU S L. Cloning of six ERF family transcription factor genes from peanut and analysis of their expression during abiotic stress [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 30(6): 1415–1425.
- [21] ZHANG Z, HUANG R. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor TERF2/LeERF2 is modulated by ethylene biosynthesis [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73(3): 241–249.
- [22] LUIS F Y, ALEJANDRO P S, ANA A H, ULISES R C, F S T, JORGE E A, FRANCISCO E G, FELIPE B P, ENRIQUE C, LUIS R Z. RAP2.4a is transported through the phloem to regulate cold and heat tolerance in papaya tree (*Carica papaya* cv. Maradol): implications for protection against abiotic stress[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0165030.
- [23] 瞿莹. 大豆 ERF 转录因子 GmERF6 和 GmERF7 的克隆与功能鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- QU Ying. Isolation and characterization of ERF transcription factors, Gm ERF6 and Gm ERF7, from soybean (*Glycine max* L.) [D]. Changchun: Jilin University, 2012.
- [24] GAO C Y, LI P L, SONG A P, WANG H B, WANG Y J, REN L P, QI X Y, CHEN F D, JIANG J F, CHEN S M. Isolation and characterization of six AP2/ERF transcription factor genes in *Chrysanthemum nankingense*[J]. *Molecular Sciences*, 2015, 16(1): 2025–2065.
- [25] MASARU O, KYOKO M, KELLCHIRO H, HIDEAKI S, MASARU O T. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(8): 1959–1968.
- [26] YANG Z, LI N, MARYSIA L G, DANIEL B, WU K Q. *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58(4): 585–596.
- [27] JUNG J, WON S Y, SUH S C, KIM H, WING R, JEONG Y, HWANG I, KIM M. The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2007, 225(3): 575–588
- [28] ZHANG Z Y, YAO W L, NA D, LIANG H, LIU H, HUANG R. A novel ERF transcription activator in wheat and its induction kinetics after pathogen and hormone treatments[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(11): 2993–3003.
- [29] ZHANG H, HUANG L, DAI Y, LIU S, HONG Y, TIAN L, HUANG L, CAO Z, LI D, SONG F. *Arabidopsis* AtERF15 positively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 686.