

香蕉 AP2/ERFs 超家族的重新鉴定及在果实采后成熟过程中的差异

表达特性

张海波^{1,2}, 郑云柯^{2,3}, 付毛妮³, 张建斌^{2,3}, 贾彩红³, 李新国^{1*}, 刘菊华^{2,3*}

(¹海南大学热带农林学院·热带作物生物育种全国重点实验室, 海口 570228; ²中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572000; ³中国热带农业科学院热带生物技术研究所·农业农村部热带生物技术重点实验室, 海口 571101)

摘要:【目的】在全基因组水平上重新鉴定香蕉 A 基因组中的 AP2/ERF 家族成员组成及其在香蕉果实采后成熟过程中的差异表达特性, 明确可能参与香蕉果实成熟调控的关键基因。【方法】对香蕉 A 基因组中 AP2/ERF 家族成员进行系统进化、结构特征、蛋白质特性、保守结构域分析和两大类主栽品种巴西蕉(AAA)和粉蕉(ABB)果实采后成熟不同阶段的转录组分析。【结果】发现共有 317 个家族成员, 分为 AP2 (49 个), ERF (253) 和 RAV (15) 三个亚家族, 它们不均匀地分布在染色体上。根据保守结构域和基因结构特征, ERF 又分为 a, b, c, d, e, f, h, i, j 和 k 共 10 个亚类。转录组分析结果表明在巴西蕉果实采后成熟过程中差异表达的有 77 个, 其中高水平表达的有 MaERF15, 36, 42 和 AP2-28。在粉蕉果实采后成熟过程中差异表达的有 74 个, 其中高水平表达的有 MaERF42 和 AP2-28。同时在巴西蕉和粉蕉果实成熟过程中差异表达的基因有 57 个, 其中高水平表达的基因有 MaERF15, 42 和 AP2-28。只在巴西蕉果实中特异表达的有 20 个。只在粉蕉中特异表达的有 17 个。【结论】重新鉴定了香蕉 AP2/ERFs 超家族成员及其在果实后熟过程中的差异表达特性, 为系统深入解析香蕉 AP2/ERF 基因功能奠定基础, 为调控香蕉果实成熟提供靶标基因, 具有一定的理论意义。

关键词: 香蕉; AP2/ERFs; 全基因组分析; 果实成熟; 差异表达分析

中图分类号: S668.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)05-0001-08

Re-identification of MaAP2/ERFs and Their Differential Expression

Characteristics During Postharvest Banana Fruit Ripening

ZHANG Haibo^{1,2}, ZHENG Yunke^{2,3}, FU Maoni³, ZHANG Jianbin^{2,3}, JIA Caihong³, LI Xinguo^{1*}, LIU Juhua^{2,3*}

(¹School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University & National Key Laboratory of Tropical Crop Breeding, Haikou 570228, China; ²Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya 572000; ³Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101)

Abstract: 【Objective】 APETALA2/ethylene response factors (AP2/ERFs) is a super transcription factor family located in the terminal of ethylene signal transduction pathway which plays important regulatory roles in plant growth and development, stress response, fruit ripening,

收稿日期: 2023-11-02 接受日期: 2024-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172269); 国家香蕉产业技术体系(CARS-31); 热带作物生物育种全国重点实验室科研项目(NKLTCB202301)

作者简介: 张海波, 男, 硕士研究生, 研究方向: 香蕉遗传改良。Tel: 17755040787, E-mail: 3519266095@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: juhua69@126.com; E-mail: lixinguo13@163.com

quality formation and other biological processes. However, there is no systematically re-identification of *Musa acuminata* AP2/ERFs (MaAP2/ERFs). With the rapid development of sequencing technology, the quality of whole genome assembly is improving. The aims of the present study were to re-identify the MaAP2/ERFs family members in the whole genome-wide level and to determine the key genes involved in the regulation of banana fruit ripening.

【 Methods 】 MaAP2/ERFs family members were genome-widely analyzed. The whole AP2/ERFs protein sequences of banana and tomato were obtained from the Banana Genome Hub released January 2016 and reference's report, respectively. To identify the *MaAP2/ERFs* family genes, BLAST searches were performed to check the predicted MaAP2/ERFs in banana database with all the tomato AP2/ERFs as queries. All candidate protein sequences were further examined by the CDD and PFAM databases. Then, multiple sequence alignments were applied to confirm the conserved domains of predicted MaAP2/ERFs proteins. Additionally, sequence alignments of the full-length MaAP2/ERFs proteins from banana and tomato were performed by Clustal X 2.0. The bootstrap neighbor-joining evolutionary tree was created by MEGA 5.0 software with 1000 bootstrap replicates based on the sequence alignments. The ExPASy proteomics server and TBtools were employed to detect the molecular weight and isoelectric points and gene structure, respectively. 0 day postharvest (DPH) two main cultivars BaXi Jiao (BX) and Fen Jiao (FJ) fruits were obtained from the Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology banana plantation (Chengmai, Hainan, 20N, 110E). Postharvest banana hands having a similar developmental stage were selected and allowed to ripen naturally. The 8 DPH and 14 DPH fruits for BX and the 3 DPH and 6 DPH fruits for FJ were obtained according to the ethylene production as it is faster for FJ reaching full yellow degree than that of BX after harvesting. Samples were collected to extract total RNA using plant RNeasy extraction kit for transcriptome analysis. The sequencing was performed with an Illumina GAII following manufacturer's instructions. Gene expression levels were calculated as Fragments per Kilobase of exon model per Million mapped reads (FPKM).

【 Results 】 A total of 317 MaAP2/ERFs family members were identified. The 317 predicted MaAP2/ERFs proteins varied from 68 (MaERF68) to 716 (MaAP2-41) amino acid residues and the relative molecular mass ranged from 7.5 (MaERF68) to 76.6 (MaAP2-34) kDa, with isoelectric points in the range of 4.6–10.3. The instability index varied from 44.0 (MaERF218) to 83.5 (MaERF240), with hydropathicity ranged from -1.3 (MaERF52) to -0.2 (MaERF134). MaAP2/ERFs could be divided into three subfamilies: AP2 (49), ERF (253) and RAV (15). ERFs were further divided into 10 subgroups, including a,b,c,d,e,f,h,i,j and k, according to the conserved domain and gene structure characteristics. The 317 AP2/ERFs are unevenly distributed on 11 chromosomes. The maximum number of 41 genes (12.9%) localized on chromosome 4, followed by 37 (11.7%) on chromosome 3 and 33 (10.4%) on chromosomes 6 and 10, whereas chromosomes 1 had only 12 (3.8%). The gene structure characteristics of MaAP2/ERFs are similar among different members of the same subfamily. AP2 subfamily members contained 7-10 exons and 6-9 introns. 14 of a total of 15 MaRAVs contained only one exon. In ERF subfamily, most of the intronless genes were clustered in a, b, c, d, f, i, h and j subgroups and only 2 genes with single intron. The pattern of two exons with one intron was clustered in all members in k subgroup. Most of genes in e subgroup had 6 introns. This suggested that similar exon-intron organizations of MaAP2/ERFs exist in the same group and the gene structure might be meaningful for gene evolution and function. Conservative domain analysis showed that all AP2/ERFs family

members had two conserved AP2 domains, which can further support the phylogenetic analyses. The expression patterns of *MaAP2/ERFs* were detected in fruits sampled from different ripening stages of the BX and FJ. The results indicate 24.3% and 23.3% of *MaAP2/ERFs* were differentially expressed during postharvest ripening process of BX and FJ fruits, respectively. For BX, there were 77 *MaAP2/ERFs* differentially expressed. Specially, 14 genes (*MaERF15*, 36, 42, 44, 103, 115, 132, 156, 180, 181, 222, 242, *AP2-28* and *MaRAV2*) were highly expressed (FPKM value > 50). Among them, 4 genes of *MaERF15*, 36, 42, and *AP2-28* displayed super expression levels (FPKM value > 100). For FJ, there were 74 *MaAP2/ERFs* differentially expressed. Among them, 4 genes (*MaERF15*, 42, *AP2-28* and *MaRAV2*) were highly expressed with the expression levels (FPKM value > 50). Among them, 2 genes of *MaERF42* and *AP2-28* displayed super expression levels (FPKM value > 100). 57 *MaAP2/ERFs* simultaneously expressed in BX and FJ. 20 and 17 *MaAP2/ERFs* specially expressed in BX and FJ, respectively. Among those differentially expressed genes, the expression patterns of 34 genes (*MaERF5*, 15, 22, 32, 42, 49, 63, 72, 77, 103, 109, 111, 131, 139, 140, 141, 142, 143, 165, 167, 174, 179, 180, 185, 193, 207, 213, 222, 228, 234, 242, 250, *MaRAV2* and *MaRAV4*) were closely related to BX fruits ripening process, whose expression levels were quickly increased at 8 DPH and were 2-fold higher than those at 0 DPH. The expression patterns of 29 genes (*MaERF11*, 32, 36, 45, 49, 50, 70, 72, 73, 97, 103, 111, 120, 122, 140, 142, 143, 164, 165, 174, 193, 204, 240, 242, 247, 250, 252, *AP2-44* and *MaRAV4*) were closely related to FJ fruits ripening process, whose expression levels were quickly increased at 3 DPH and were 2-fold higher than those at 0 DPH. These results suggested that these genes play important roles in BX and FJ fruits ripening. **【Conclusion】** 317 *MaAP2/ERFs* family members were genome-widely re-identified. The key genes involved in BX and FJ fruits ripening were detected. These findings laid a foundation for the systematic and in-depth analysis of the function of *MaAP2/ERFs*, and provided target genes for the regulation of fruit ripening.

key words: Banana (*Musa* spp.); AP2/ERFs; Genome wide analysis; Fruit ripening; Differential expression

APETALA2/ethylene response factor (AP2/ERF) 转录因子处于乙烯信号通路下游, 广泛参与果实生长、成熟软化、叶绿素降解、类黄酮及芳香物质的合成, 对植物生长发育、逆境响应和其他生物学过程具有重要调控作用^[1-6]。香蕉 *MaERFs* 通过调控与乙烯生物合成相关的基因表达来调控果实成熟过程^[7], 进一步研究发现 *MaDof23* 能与 *MaERF9* 结合作为抑制子调控果实成熟^[8]。

AP2/ERF 转录因子家族因含有 1-2 个约由 60 个氨基酸组成的 AP2/ERF 结构域而得名, 根据保守结构域特征和数目分为 AP2, ERF, RAV, 和 Soloist 四个亚家族^[9]。自 Jofuku 等^[10] 首次从拟南芥中分离出 APETALA2 (AP2) 转录因子后, 经过近三十年的发展, 已有 20 种植物中的 AP2/ERF 家族成员被分离鉴定。其中数目最多的油菜含 531 个^[11], 其次是烟草 375 个^[12], 然后是玉米 214 个^[13], 水稻 170 个^[14], 拟南芥 147 个^[15], 番茄 134 个^[16], 最少的菠萝也有 97 个^[17]。

在全球大食物观的背景下, 香蕉是世界重要的果粮兼用作物, 是全球近 20 亿人碳水化合物的主要来源。现有的香蕉栽培品种均来源于两个原始祖先种即尖叶蕉 A 基因组 (*Musa*

acuminata, A genome) 和长梗蕉 B 基因组 (*M. balbisiana*, B genome) [18]。然而到目前为止,除了 Jourda 等[19]和候晓婉等[20]在第一版香蕉 A 基因组测序背景下报道了香蕉 A 基因组和栽培品种巴西蕉中分别有 122 和 117 个成员外,没有在全基因组水平上对香蕉 AP2/ERF 基因家族进行系统分离鉴定的更新报道。随着测序技术的飞速发展和大数据分析技术的逐步完善,原有的分析结果已适应不了新的发展需求,需要及时更新。本研究对香蕉 A 基因组中的 AP2/ERF 家族成员进行全基因组分析,包括系统进化、在染色体上的分布、基因结构、理化特性,分析了它们在两个主栽品种巴西蕉 (AAA) 和粉蕉 (ABB) 果实采后成熟过程中的差异表达特性,筛选出可能参与香蕉果实成熟和品质调控的关键基因。研究结果为深入解析 AP2/ERF 家族在香蕉果实成熟过程中的作用奠定基础,为香蕉品质改良和生物育种提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 植物材料和处理

盛花期后 80 d (80 DAF), 即采收后 0 d (0 DPH) 的香蕉 (*M. spp.*) 果实来自中国热带农业科学院热带生物技术研究所香蕉种植园 (海南澄迈, 20N, 110E)。选择处于相似发育阶段的香蕉果实并使其自然成熟。由于果实采后粉蕉果实的乙烯释放量迅速上升使其比巴西蕉果实更快地达到全黄色,因此巴西蕉 (BX) 的果实分别在采后第 8 天和第 14 天达到乙烯生物合成启动期和高峰期,而粉蕉 (FJ) 的果实分别在采后第 3 天和第 6 天达到乙烯生物合成启动期和高峰期。将果实样品在液氮中迅速冷冻并储存在 -80 °C, 用于总 RNA 提取和转录组分析。

1.2 基因鉴定和进化分析

香蕉 MaAP2/ERFs 蛋白序列来自香蕉全基因组测序数据库 (<http://banana-genome-hub.Southgreen.fr/download>) [21], 番茄的 AP2/ERFs 序列来自 Yang 等[16] 报道。为了鉴定 MaAP2/ERFs 超家族成员基因,以已知的 MaAP2/ERFs 去搜索香蕉全基因组数据库[21]。随后,将从香蕉全基因组数据库中得到的所有 MaAP2/ERFs 与番茄的 AP2/ERF 进行比对。所有候选蛋白序列通过 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 和 PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 数据库进行检验。最后,使用多个序列比对确认预测的 MaAP2/ERF 蛋白的保守域。使用 Clustal X V.2.0 对香蕉与番茄的 AP2/ERFs 全长序列进行多序列比对。采用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树[22]。

1.3 基因结构特征分析

利用香蕉基因组数据库 (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/>) 获取香蕉 A 基因组的 gff 功能注释文件,而后利用 TBtools 软件中的 Visualize Gene Structure 功能对 MaAP2/ERFs 家族成员的基因结构进行可视化分析:首先在 set input .gff3 界面导入香蕉 A 基因组 .gff 注释文件,而后在 set input ID list 界面导入 MaAP2/ERF 家族成员基因编号,即可得到 MaERF 家族成员基因结构。

1.4 蛋白质特性和保守结构域分析

采用ExPASy软件 (<http://expasy.org/>) 检测预测的MaAP2/ERF蛋白的分子质量和等电点。利用NCBI在线网站的CD-Search Tool功能 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 对目标蛋白序列进行保守结构域分析, 并下载在线分析结果。而后将在线分析结果导入Tbtools, 利用Visualize NCBI CDD Domain Pattern功能对目标蛋白保守结构域进行可视化分析。

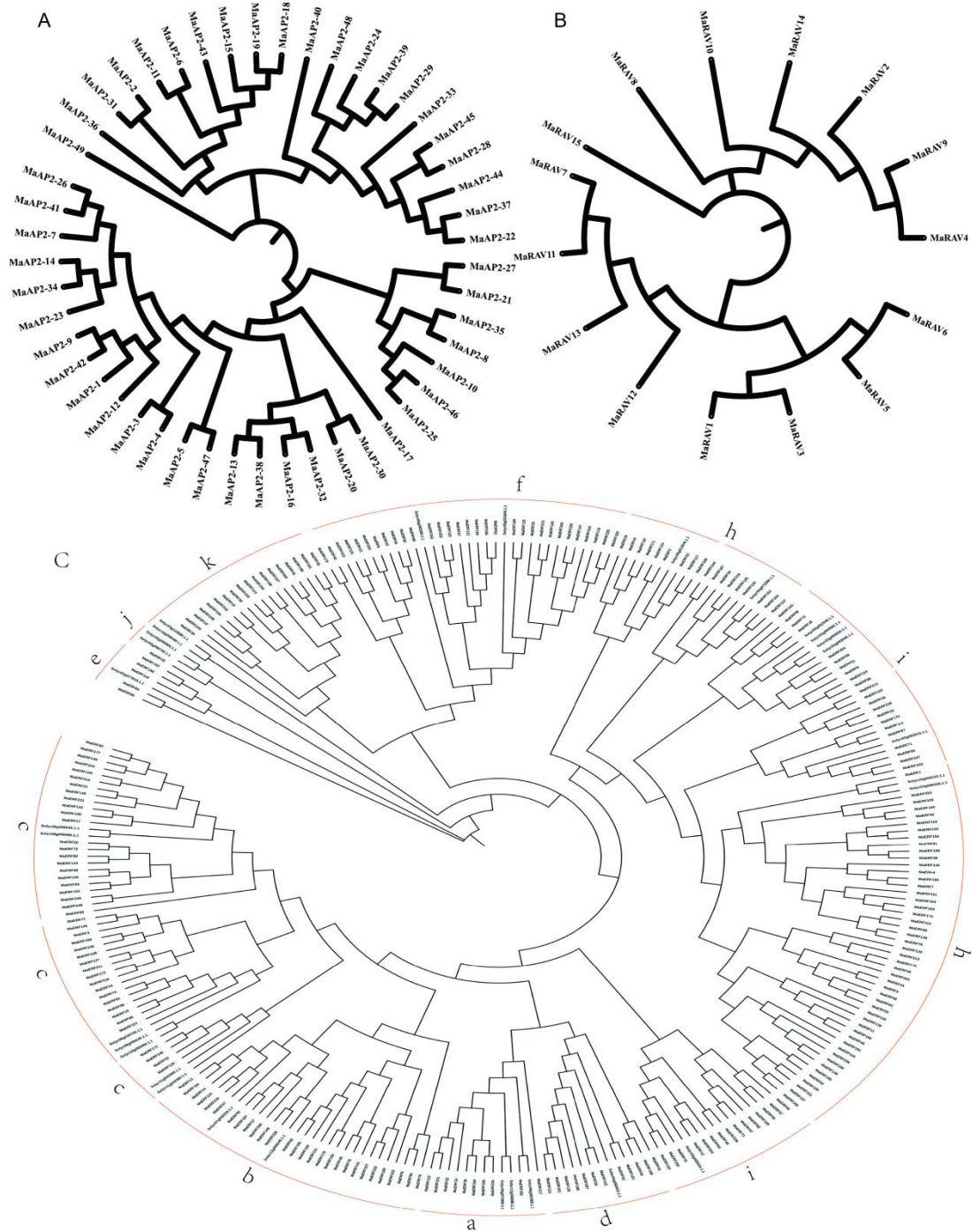
1.5 转录组分析

选取80 DAF (0 DPH)、BX 8 DPH和14 DPH、FJ 3 DPH和6 DPH的香蕉果实, 用植物RNeasy提取试剂盒(天根, 北京, 中国)提取总RNA, 进行转录组分析。按照说明书, 用Illumina GAII进行测序。每个样本2次重复。测序深度平均为5.34X。使用FASTX软件去除原始序列中的接头序列。用FastQC去除低质量序列。用TopHat v.2.0.10软件将高质量的序列与参考基因组DH-Pahang (*M. acuminata*, A-Genome, $2n = 22$) 进行比对^[20]。转录组使用Cufflinks^[23]进行组装。基因表达水平计算为每百万映射读取的外显子模型每千碱基读取数(FPKM)。DEGseq用于鉴定差异表达的基因。RNAseq数据登陆在NCBI-SRA数据库中(登录号: PRJNA343716)。

2 结果与分析

2.1 香蕉 AP2/ERFs 超家族的鉴定和系统进化分析

为了准确地鉴定出香蕉AP2/ERFs超家族成员, 采用BLAST和Hidden Markov Mode两个软件将从香蕉A基因组数据库 (<http://banana-genome.cirad.fr/>) (2019年发布版) 中得到的AP2/ERFs超家族成员进行比对和鉴定, 共得到317个家族成员, 分为AP2 (49个), ERF (253) 和RAV (15) 三个亚家族。它们编码蛋白的氨基酸数量从68到716个, 分子质量从7.5到76.67 kD, 等电点从4.6到10.34, 不稳定系数从31.63到108.56, 脂溶指数从44.03到83.47, 亲水系数从-1.29到-0.18。与番茄中的AP2/ERFs家族构建系统进化树, 发现ERF亚家族又分为a, b, c, d, e, f, h, i, j和k, 10个亚类, 其中h亚类所含的基因数目最多, 为67个基因。其次是c亚类, 为44个基因。再次是i亚类为37个, 所含基因数目最少的是j亚类, 仅含有1个基因。AP2亚家族被分为3个亚类, 所含的基因数目最多的有28个基因, 其次是含有20个基因, 所含基因数目最少的只有1个基因。RAV亚家族也被分为3个亚类, 所含的基因数目最多的有8个基因, 其次是含有6个基因, 所含基因数目最少的也只有1个基因(图1)。



A. AP2 亚家族; B. RAV 亚家族; C. ERF 亚家族。NJ 树使用 MEGA 5.0 绘制, bootstrap 为 1000。

A. AP2 group; B. RAV group; C. ERF group. The Neighbor-joining (NJ) tree was drawn using MEGA 5.0 with 1000 bootstrap.

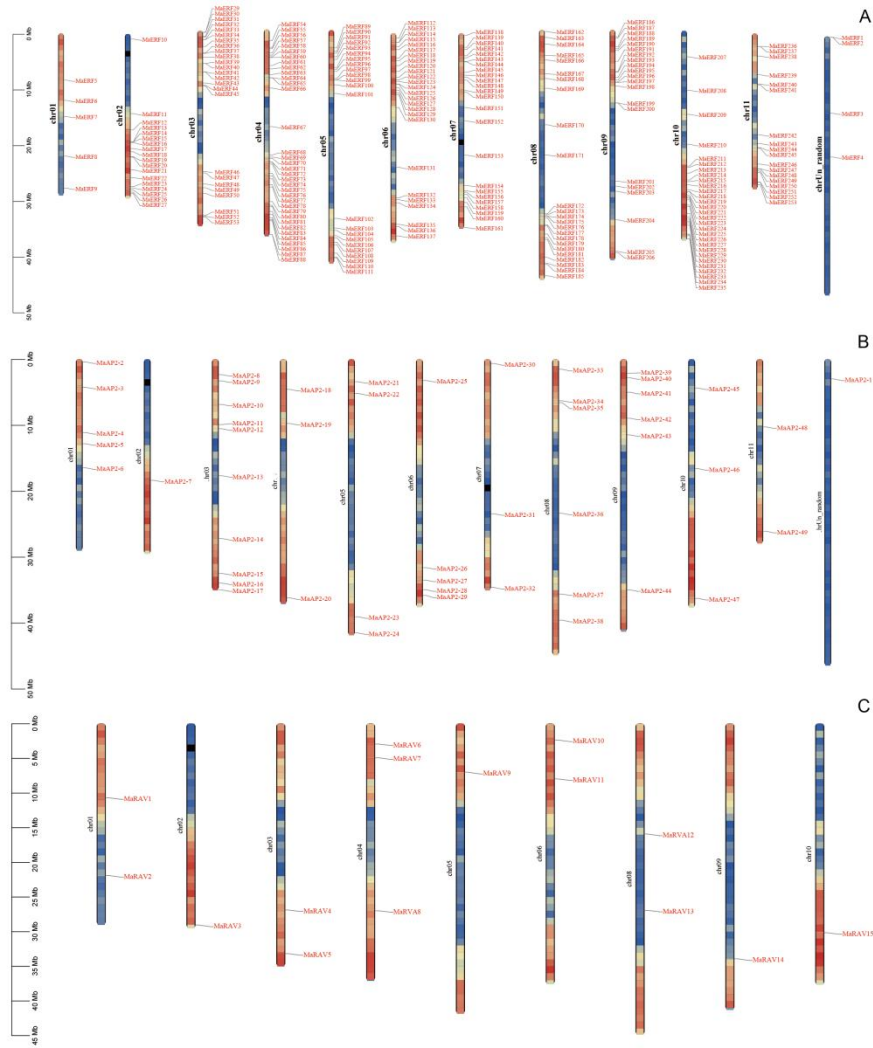
图 1 香蕉 A 基因组与番茄 AP2/ERFs 家族成员的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the AP2/ERFs from tomato and banana

2.2 香蕉 AP2/ERFs 超家族成员在染色体上的分布特征

香蕉 AP2/ERFs 的 317 个家族成员不均衡地分布在 11 条染色体上, 其中数量最多的是 4 号染色体, 41 个, 占 12.93%, 其中 AP2 家族 3 个, RAV 家族 3 个, ERF 家族 35 个。其次

是3号染色体，37个，占11.67%，其中AP2家族10个，RAV家族2个，ERF家族25个。再次是6号和10号染色体，均为33个，占10.41%。6号染色体上分布5个AP2，2个RAV，26个ERF；10号染色体上分布3个AP2，1个RAV，29个ERF。数量最少的是1号染色体，仅12个，占3.8%，其中AP2家族5个，RAV家族2个，ERF家族5个（图2）。从253个ERF亚家族成员在染色体上的分布规律来看，除了1号和random染色体外，其余的10条染色体上都存在一个或多个由于串联重复引起的基因簇，这些基因簇的出现为香蕉更好地适应多变的环境奠定了基因资源的基础。



A, B, C 分别代表 ERF, AP2 和 RAV 亚家族。

A, B, C represent ERF, AP2 and RAV subfamily, respectively.

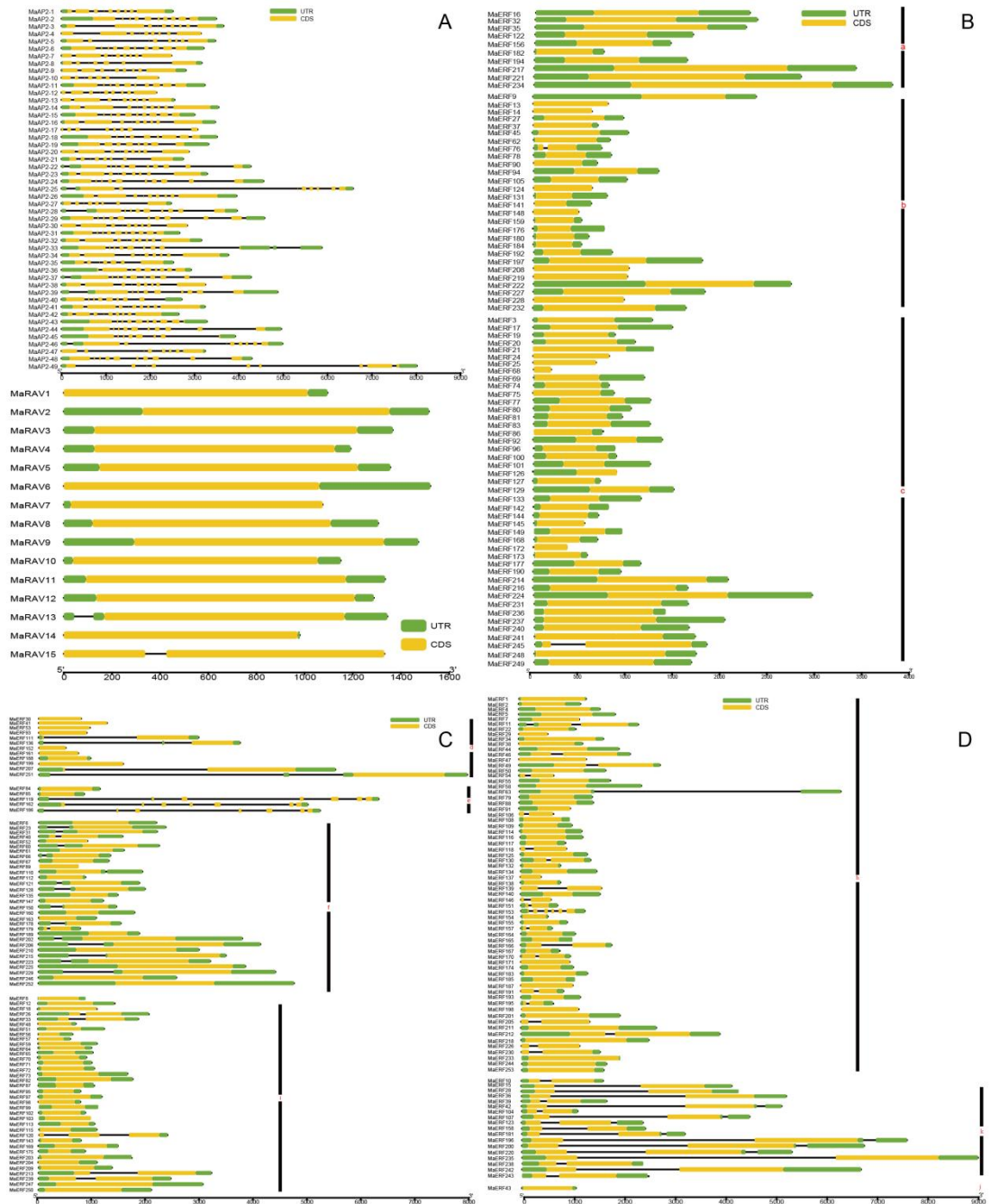
图2 香蕉 AP2/ERFs 超家族成员在染色体上的分布特征

Fig. 2 Distribution of MaAP2/ERFs subfamilies across chromosomes

2.3 香蕉 AP2/ERFs 超家族成员的基因结构特征

AP2 亚家族具有 7~10 个外显子，6~9 个内含子。RAV 亚家族 15 个成员中 14 个都是单外显子，2 个具有单内含子。ERF 亚家族 a, b, c, j 亚类中只有 2 个具有单内含子，其余的

都是单外显子无内含子结构；d, f, i, h 亚类中大多数也是单外显子，少数有单内含子；k 亚类全都具有 2 个外显子 1 个内含子；e 亚类中绝大多数具有 6 个内含子（图 3）。以上结果表明同一亚族不同成员之间具有相似的基因结构，决定其在香蕉生长发育、成熟和对环境适应性等方面可能具有类似作用。



外显子-内含子结构采用 GSDS 软件在线分析。A. 上为 AP2，下为 RAV；B. ERF 亚家族的 a, b, c 三个亚类；C. d, e, f 和 i 四个亚类；D. h, k 和 j 三个亚类。绿色盒代表上/下游结构域，黄色盒代表外显子，黑线代表内含子。

Exon-intron structure analyses were performed by GSDS database. A. the up represents AP2, the down represents RAV; B. a, b, c subgroup of ERF subfamily; C. d, e, f and i subgroup of ERF subfamily; D. h, k and j subgroup of ERF subfamily. The blue boxes indicate upstream/downstream, the yellow boxes indicate exons, and

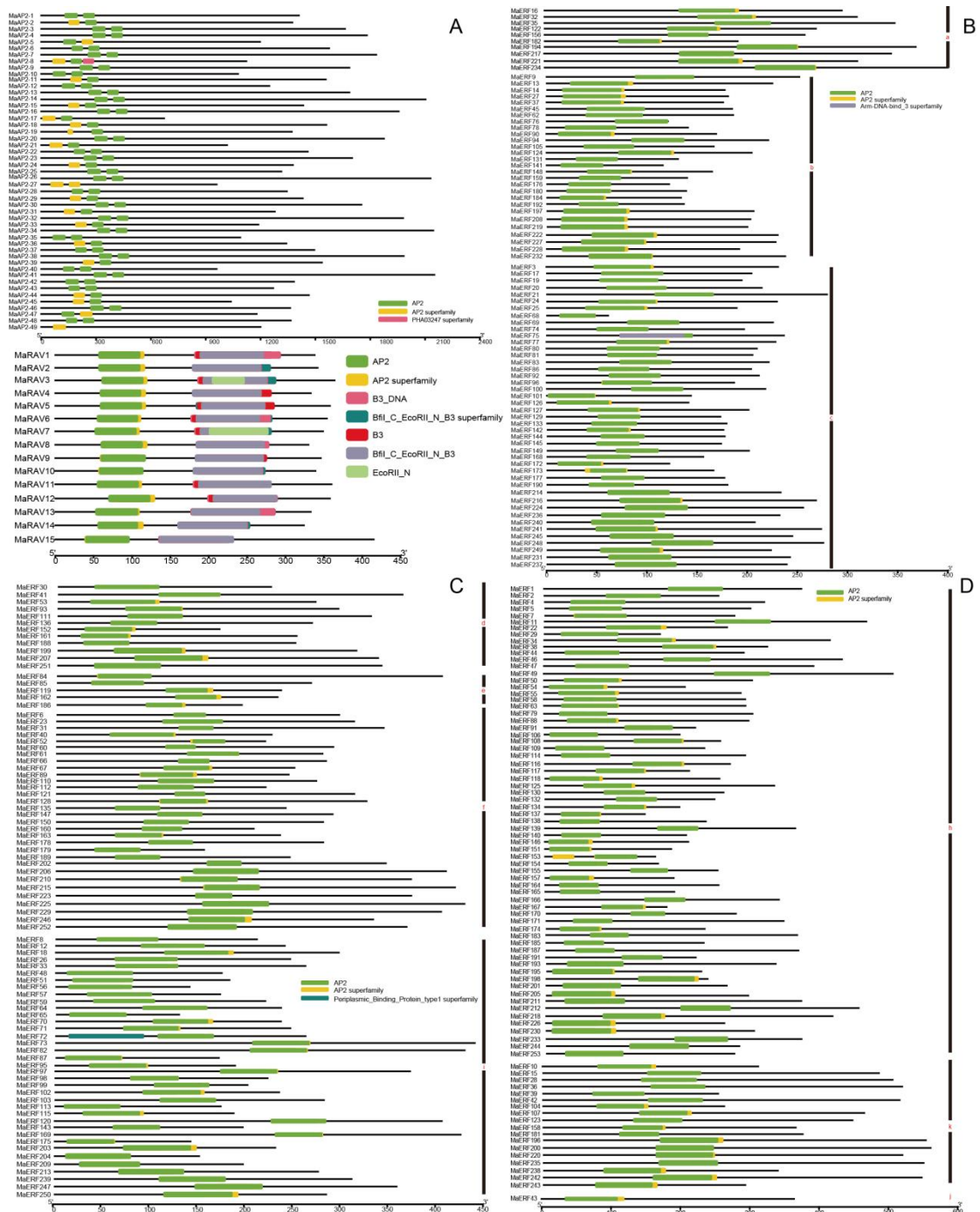
the black lines indicate introns.

图 3 MaAP2/ERFs 的基因结构分析。

Fig. 3 Gene structure analyses of MaAP2/ERFs.

2.4 香蕉 AP2/ERFs 超家族成员的保守结构域分析

所有 AP2/ERFs 超家族成员都具有 AP2 和 AP2 superfamily 两个保守结构域，因此，AP2 结构域是该家族成员执行生物学功能的结构基础。除此之外，AP2 亚家族还具有 PHA03247 superfamily，RAV 亚家族还具有 B3 superfamily，ERF 亚家族的 a, b, c, d, e, f, i 具有 DNA-bind superfamily（图 4）。这些亚家族成员具有的特异性保守结构域为香蕉 AP2/ERFs 超家族成员的功能分化奠定了结构基础。



A. 上为 AP2, 下为 RAV; B. ERF 亚家族的 a, b, c 三个亚类; C. d, e, f 和 i 四个亚类; D. h, k 和 j 三个亚类。

A. The up was AP2, the down was RAV; B. a, b, c subgroup of ERF subfamily; C. d, e, f and i subgroup of ERF subfamily; D. h, k and j subgroup of ERF subfamily.

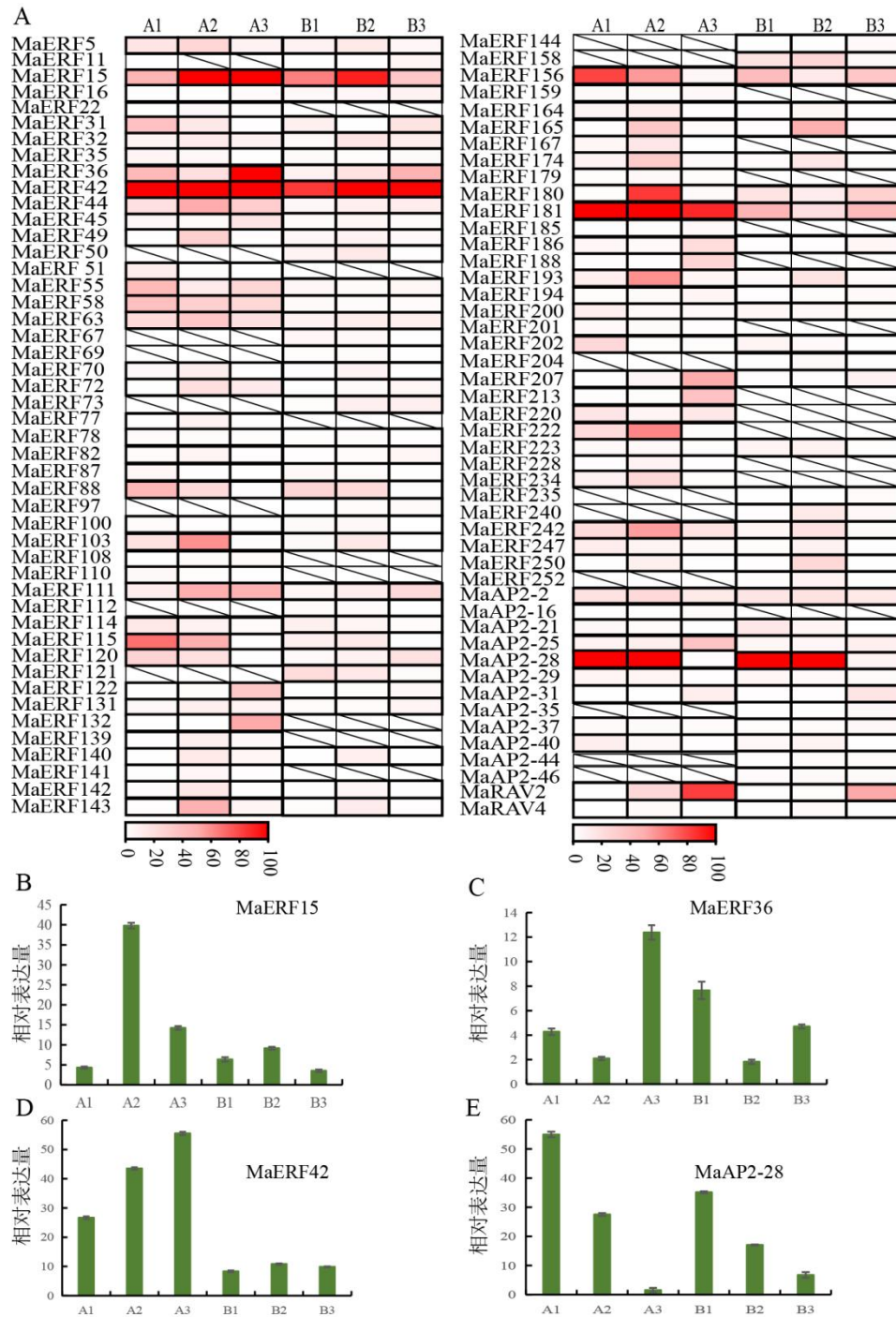
图 4 香蕉 MaAP2/ERFs 超家族保守结构域分析

Fig. 4 Conserved motifs analyses of banana MaAP2/ERFs superfamilies

2.5 香蕉 AP2/ERFs 超家族成员在香蕉果实采后成熟过程中的差异表达分析

为了解AP2/ERFs超家族成员在不同香蕉果实采后成熟过程中的作用, 采用转录组学研究了它们在巴西蕉和粉蕉果实采后成熟过程中的差异表达特性(图5-A)。结果表明, AP2/ERFs超家族的317个成员中, 在巴西蕉果实采后成熟过程中差异表达的有77个, 占24.3%, 其中FPKM值大于10的有45个, 大于50的有14个, 它们分别为*MaERF15*, 36, 42, 44, 103, 115, 132, 156, 180, 181, 222, 242, *AP2-28*和*MaRAV2*。FPKM值大于100的有4个, 它们分别是*MaERF15*, 36, 42和*AP2-28*。在粉蕉果实采后成熟过程中差异表达的有74个, 占23.3%, 其中FPKM值大于10的有32个, 大于50的有4个, 它们分别为*MaERF15*, 42, *AP2-28*和*MaRAV2*。FPKM值大于100的有2个, 它们分别是*MaERF42*和*AP2-28*。同时在巴西和粉蕉果实成熟过程中差异表达的有57个。只在巴西蕉果实中特异表达的有20个。只在粉蕉中特异表达的有17个。在上述差异表达的基因中, 与巴西蕉果实成熟过程密切相关的有34个, 它们分别是*MaERF5*, 15, 22, 32, 42, 49, 63, 72, 77, 103, 109, 111, 131, 139, 140, 141, 142, 143, 165, 167, 174, 179, 180, 185, 193, 207, 213, 222, 228, 234, 242, 250, *MaRAV2*和*MaRAV4*, 它们在巴西蕉果实采后乙烯生物合成启动期(8 DPH)表达量迅速上升, 为采收时(0 DPH)果实的2倍以上。推测它们在巴西蕉果实采后成熟过程中具有重要调控作用。在上述差异表达的基因中, 与粉蕉果实成熟过程密切相关的有29个, 它们分别是*MaERF11*, 32, 36, 45, 49, 50, 70, 72, 73, 97, 103, 111, 120, 122, 140, 142, 143, 164, 165, 174, 193, 204, 240, 242, 247, 250, 252, *AP2-44*和*MaRAV4*, 它们在粉蕉果实采后乙烯生物合成启动期(3 DPH)表达量迅速上升, 为采收时(0 DPH)果实的2倍以上。推测它们在粉蕉果实采后成熟过程中具有重要调控作用。

采用qRT-PCR的技术对*MaERF15*, 36, 42和*AP2-28*在巴西蕉和粉蕉果实采后成熟过程中的差异表达特性进行验证, 结果表明, 这4个基因在巴西蕉果实采后成熟过程中的表达水平均高于粉蕉, 且*MaERF15*, 36和42的表达与果实采后成熟过程正相关, *MaAP2-28*的表达与果实采后成熟过程负相关(图5-B~E)。这些结果与转录组的结果相符, 表明转录组的结果是较为准确的。



A 基于 MaAP2/ERFs 的 FPKM 值绘制热图，颜色深浅代表基因表达水平高低，红色越深代表基因表达水平越高；B, C, D, E 分别为 MaERF15, MaERF36, MaERF42 和 MaAP2-28 的 qRT-PCR 验证。A1, A2, A3 分别为巴西蕉果实采后 0DPH, 8DPH, 14DPH; B1, B2, B3 分别为粉蕉果实采后 0 DPH, 3 DPH, 6 DPH。

A The heat map was created based on the FPKM value of MaAP2/ERFs. The darker the red color, the higher the gene expression level. B, C, D, E represent qRT-PCR identification of MaERF15, MaERF36, MaERF42 and MaAP2-28, respectively. A1, A2 and A3 represent postharvest BX fruits at 0DPH, 8DPH, 14DPH, respectively; B1, B2 and B3 represent postharvest FJ fruits at 0DPH, 3DPH, 6DPH, respectively.

图 5 巴西蕉和粉蕉果实采后成熟过程中 MaAP2/ERFs 的差异表达特性

Fig. 5 Expression patterns of MaAP2/ERFs at different ripening stages of BX and FJ banana

3 讨论

3.1 AP2/ERFs 是植物中超大基因家族，不同植物中的成员数量各不相同

通过全基因组分析，发现香蕉中有 317 个成员，比 Jourda 等^[19]报道的香蕉 A 基因组中 AP2/ERFs 多 195 个，比候晓婉等^[20]报道的巴西蕉中 AP2/ERFs 多 200 个。更丰富的 MaAP2/ERFs 超家族成员的获得离不开全基因组测序及分析技术的高质量发展，本研究中分离的 MaAP2/ERFs 是建立在第二版分析结果的基础上，与第一版相比质量更高。在已报道的植物中，其数目仅次于油菜和烟草，排第三位。香蕉 AP2/ERFs 分为 AP2, RAV, ERF 三个亚家族，这与大多数植物 AP2/ERFs 家族的分类是一致的，然而香蕉中并未见到 Soloist 这一个亚类，这与悦曼芳等^[9]的报道不一致，这可能是因为香蕉 AP2/ERFs 家族基因的结构一致性较高。ERF 亚家族又细分为为 a, b, c, d, e, f, h, i, j 和 k 共 10 个亚类，这是与番茄中的 ERF 亚家族构建系统进化树而得到的，选择番茄 AP2/ERFs 全基因家族进行比较的原因是香蕉与番茄同属典型的呼吸跃变型果实，乙烯在果实成熟过程中具有非常重要的作用，而 AP2/ERFs 又是乙烯信号途径下游重要的乙烯响应因子。

3.2 MaAP2/ERFs 在染色体上的不均匀分布及基因结构的差异性

317 个 MaAP2/ERFs 超家族成员不均衡地分布在 11 条染色体和 random 染色体上，特别是 253 个 MaERFs，从其在染色体上的分布规律来看，除了 1 号和 random 染色体外，其余的 10 条染色体上都存在一个或多个由于串联重复事件引起的基因簇，说明香蕉在漫长的进化过程中，MaERFs 家族在数量上显著扩张，这与 Wang 等^[18]的研究结果类似。这些基因簇的出现为香蕉更好地适应多变的环境奠定基础。

3.3 MaAP2/ERFs 在不同品种果实采后成熟过程中差异表达

巴西蕉（基因型 AAA）和粉蕉（基因型 ABB）是目前生产上两大类主栽品种，它们均是由两个野生的二倍体祖先种通过种内或种间杂交后，经过漫长的进化和选择而形成的^[24-25]。从转录组分析 MaAP2/ERFs 超家族成员在巴西蕉和粉蕉果实采后成熟过程的差异表达特性来看，有 24.3%和 23.3%的 AP2/ERFs 超家族成员分别在巴西蕉和粉蕉果实采后成熟过程中差异表达。有趣的是，它们中有 57 个同时在巴西蕉和粉蕉中差异表达，有 20 个只在巴西蕉中差异表达，有 17 个只在粉蕉中差异表达，表明它们在巴西蕉和粉蕉果实采后成熟过程中虽然都具有重要作用，但扮演的角色随着品种基因型不同有差异。特别是与巴西蕉和粉蕉果实成熟过程密切相关的 34 个和 29 个 MaAP2/ERFs 以及在巴西蕉和粉蕉果实成熟过程中超高水平表达的 *MaERF15*, *36*, *42* 和 *AP2-28* 等基因，qRT-PCR 对这 4 个基因的验证结果也证明了这一点，对其功能及作用机制的深入研究，将为香蕉果实成熟品质的形成调控提供重要的基因资源。

4 结论

从香蕉 A 基因组中共鉴定到 317 个 AP2/ERFs 家族成员，归为 AP2 (49 个), ERF (253) 和 RAV (15) 三个亚家族。根据保守结构域和基因结构特征，ERF 又分为 a, b, c, d, e,

f, h, i, j 和 k 共 10 个亚类。转录组分析结果表明在巴西蕉果实采后成熟过程中高水平表达的有 *MaERF15*, 36, 42 和 *AP2-28*。在粉蕉果实采后成熟过程中高水平表达的有 *MaERF42* 和 *AP2-28*。同时在巴西蕉和粉蕉果实成熟过程中高水平表达的基因有 *MaERF15*, 42 和 *AP2-28*。只在巴西蕉果实中特异表达的有 20 个。只在粉蕉中特异表达的有 17 个。

参考文献 References:

- [1] LIU M C, GOMES B L, MILA I, PURGATTO E, PERES L E P, FRASSE P, MAZA E, ZOUINE M, ROUSTAN J P, BOUZAYEN M, PIRRELLO J. Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated *ERF* genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(3): 1732-1744.
- [2] GU C, GUO Z H, HAO P P, WANG G M, JIN Z M, ZHANG S L. Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm[J]. *Botanical Studies*, 2017, 58(1): 6.
- [3] CHEN T, QIN G Z, TIAN S P. Regulatory network of fruit ripening: current understanding and future challenges[J]. *The New Phytologist*, 2020, 228(4): 1219-1226.
- [4] ZHOU H, ZHAO L, YANG Q R, AMAR M H, OGUTU C, PENG Q, LIAO L, ZHANG J Y, HAN Y P. Identification of EIL and *ERF* genes related to fruit ripening in peach[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 2846.
- [5] DANG Q Y, SHA H Y, NIE J Y, WANG Y Z, YUAN Y B, JIA D J. An apple (*Malus domestica*) AP2/ERF transcription factor modulates carotenoid accumulation[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8: 223.
- [6] ZHAI Y L, FAN Z Y, CUI Y Y, GU X J, CHEN S W, MA H Q. APETALA2/ethylene responsive factor in fruit ripening: Roles, interactions and expression regulation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 979348.
- [7] XIAO Y Y, CHEN J Y, KUANG J F, SHAN W, XIE H, JIANG Y M, LU W J. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(8): 2499-2510.
- [8] FENG B H, HAN Y C, XIAO Y Y, KUANG J F, FAN Z Q, CHEN J Y, LU W J. The banana fruit Dof transcription factor MaDof23 acts as a repressor and interacts with MaERF9 in regulating ripening-related genes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(8): 2263-2275.
- [9] 悦曼芳,张春,吴忠义. 植物转录因子 AP2/ERF 家族蛋白结构和功能的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(12): 11-26.
YUE Manfang, ZHANG Chun, WU Zhongyi. Research progress in the structural and functional analysis of plant transcription factor AP2/ERF protein family[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(12): 11-26.
- [10] JOFUKU K D, DEN BOER B G, VAN MONTAGU M, OKAMURO J K. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(9): 1211-1225.
- [11] GHORBANI R, ZAKIPOUR Z, ALEMZADEH A, RAZI H. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors family in *Brassica napus*[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(7): 1463-1476.
- [12] GAO Y, HAN D, JIA W, MA X H, YANG Y X, XU Z C. Molecular characterization and systematic analysis of NtAP2/ERF in tobacco and functional determination of NtRAV-4 under drought stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 156: 420-435.
- [13] ZHANG J, LIAO J Y, LING Q Q, XI Y, QIAN Y X. Genome-wide identification and expression profiling

- analysis of maize AP2/ERF superfamily genes reveal essential roles in abiotic stress tolerance[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 125.
- [14] RASHID M, HE G Y, YANG G X, HUSSAIN J, YAN X. AP2/ERF transcription factor in rice: Genome-wide canvas and syntenic relationships between monocots and eudicots[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2012, 8: 321-355.
- [15] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, SHINSHI H. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [16] YANG H H, SUN Y G, WANG H X, ZHAO T T, XU X Y, JIANG J B, LI J F. Genome-wide identification and functional analysis of the *ERF2* gene family in response to disease resistance against *Stemphylium lycopersici* in tomato[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 72.
- [17] ZHANG H N, PAN X L, LIU S H, LIN W Q, LI Y H, ZHANG X M. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors in pineapple reveals functional divergence during flowering induction mediated by ethylene and floral organ development[J]. *Genomics*, 2021, 113(2): 474-489.
- [18] WANG Z, MIAO H X, LIU J H, XU B Y, YAO X M, XU C Y, ZHAO S C, FANG X D, JIA C H, WANG J Y, ZHANG J B, LI J Y, XU Y, WANG J S, MA W H, WU Z Y, YU L L, YANG Y L, LIU C, GUO Y, SUN S L, BAURENS F C, MARTIN G, SALMON F, GARSMEUR O, YAHIAOUI N, HERVOUET C, ROUARD M, LABOUREAU N, HABAS R, RICCI S, PENG M, GUO A P, XIE J H, LI Y, DING Z H, YAN Y, TIE W W, D'HONT A, HU W, JIN Z Q. *Musa balbisiana* genome reveals subgenome evolution and functional divergence[J]. *Nature Plants*, 2019, 5: 810-821.
- [19] JOURDA C, CARDI C, MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ D, BOCS S, GARSMEUR O, D'HONT A, YAHIAOUI N. Expansion of banana (*Musa acuminata*) gene families involved in ethylene biosynthesis and signalling after lineage-specific whole-genome duplications[J]. *The New Phytologist*, 2014, 202(3): 986-1000.
- [20] 侯晓婉, 胡伟, 徐碧玉, 金志强, 张鲁斌, 鹿志伟. 巴西蕉 AP2/ERF 超家族全基因组分析[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(2): 302-312.
- HOU Xiaowan, HU Wei, XU Biyu, JIN Zhiqiang, ZHANG Lubin, LU Zhiwei. Genome-wide analysis of AP2/ERF super family in Musaceae, *Musa*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(2): 302-312.
- [21] D'HONT A, DENOEUDE F, AURY J M, BAURENS F C, CARREEL F, GARSMEUR O, NOEL B, BOCS S, DROC G, ROUARD M, DA SILVA C, JABBARI K, CARDI C, POULAIN J, SOUQUET M, LABADIE K, JOURDA C, LENGELLÉ J, RODIER-GOUD M, ALBERTI A, BERNARD M, CORREA M, AYYAMPALAYAM S, MCKAIN M R, LEEBENS-MACK J, BURGESS D, FREELING M, MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ D, CHABANNES M, WICKER T, PANAUD O, BARBOSA J, HRIBOVA E, HESLOP-HARRISON P, HABAS R, RIVALLAN R, FRANCOIS P, POIRON C, KILIAN A, BURTHIA D, JENNY C, BAKRY F, BROWN S, GUIGNON V, KEMA G, DITA M, WAALWIJK C, JOSEPH S, DIEVART A, JAILLON O, LECLERCQ J, ARGOUT X, LYONS E, ALMEIDA A, JERIDI M, DOLEZEL J, ROUX N, RISTERUCCI A M, WEISSENBACH J, RUIZ M, GLASZMANN J C, QUÉTIER F, YAHIAOUI N, WINCKER P. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants[J]. *Nature*, 2012, 488: 213-217.
- [22] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [23] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, PERTEA G, KIM D, KELLEY D R, PIMENTEL H, SALZBERG

- S L, RINN J L, PACHTER L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7: 562-578.
- [24] HESLOP-HARRISON J S, SCHWARZACHER T. Domestication, genomics and the future for banana[J]. *Annals of Botany*, 2007, 100(5): 1073-1084.
- [25] WU W, YANG Y L, HE W M, ROUARD M, LI W M, XU M, ROUX N, GE X J. Whole genome sequencing of a banana wild relative *Musa itinerans* provides insights into lineage-specific diversification of the *Musa* genus[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31586.