

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.09.008

引用格式:杨玉娇,贺朝鑫,周洁,等.象草ERF基因家族鉴定及其对低温胁迫的响应分析[J].草地学报,2026,34(9):3223—3233

YANG Yu-jiao, HE Chao-xin, ZHOU Jie, et al. Identification of the ERF Gene Family in elephant grass and Analysis Its Response to Low-Temperature Stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(9):3223—3233

象草ERF基因家族鉴定及其对低温胁迫的响应分析

杨玉娇,贺朝鑫,周洁,李林菊,张新全*,彭燕*

(四川农业大学草业科技学院,四川成都611300)

摘要:乙烯响应因子(ERF)是植物响应非生物胁迫的核心调控蛋白,本研究基于象草基因组数据,鉴定出53个PpERF基因家族成员,其编码的氨基酸数量、等电点和分子量范围分别为191~1145 aa、4.75~11.79和20 536.11~124 866.3 Da,其中3个基因未定位到染色体,其余分布于8条染色体上。系统发育分析将其分为3个进化分支,多数蛋白包含高度保守的Motif 1,2,4,启动子区域存在多种胁迫响应相关顺式作用元件。表达分析显示,11个PpERF基因在低温胁迫下具有时空表达特异性,PpERF17, PpERF21, PpERF32在24 h显著上调,烟草瞬时过表达实验进一步证实这3个基因可显著增强植物低温耐受性。本研究为解析象草低温响应机制及抗寒牧草育种提供了理论依据与基因靶点。

关键词:象草;ERF转录因子;低温胁迫;基因表达分析

中图分类号:S813.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)09-3223-11

Identification of the ERF Gene Family in *Pennisetum Purpureum* and Analysis its Response to Low-Temperature Stress

YANG Yu-jiao, HE Chao-xin, ZHOU Jie, LI Lin-ju, ZHANG Xin-quan*, PENG Yan*

(College of Grassland Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan Province 611300, China)

Abstract: Ethylene response factors (ERFs) are key regulatory proteins involved in plant responses to abiotic stresses. In this study, based on the genome data of *Pennisetum purpureum*, 53 members of the PpERF gene family were identified. The encoded proteins ranged from 191 to 1145 amino acids in length, with predicted isoelectric points ranging from 4.75 to 11.79 and molecular weights ranging from 20 536.11 to 124 866.3 Da. Among these genes, three were not mapped to the chromosomes, whereas the remaining genes were unevenly distributed across eight chromosomes. Phylogenetic analysis classified the PpERF genes into three evolutionary clades. Most PpERF proteins contained highly conserved Motifs 1, 2, and 4, and multiple stress-responsive cis-acting elements were identified in their promoter regions. Expression analysis showed that 11 PpERF genes exhibited spatiotemporal expression specificity under low-temperature stress, among which PpERF17, PpERF21, and PpERF32 were significantly upregulated after 24 h of cold treatment. Transient overexpression assays in tobacco further demonstrated that these three genes significantly enhanced plant tolerance to low-temperature stress. This study provides a theoretical basis for elucidating the molecular mechanisms underlying low-temperature responses in *Pennisetum purpureum* and offers potential candidate genes for the breeding of cold-tolerant forage grasses.

Key words: *Pennisetum purpureum*; ERF transcription factor; Low-temperature stress; Gene expression analysis

象草(*Pennisetum purpureum*)是著名的C₄多年生饲草,生长迅速,直立高度约为3~5 m,在温暖气候条件下,一年可收割四次^[1],有良好的生物量积累能力,干物质产量可达40~60 t·hm⁻²·a⁻¹,叶片中粗

蛋白含量可达10.8%^[2-3]。除产量高外,象草对养分的需求低、抗旱和抗热胁迫能力强^[4],是南方地区的重要主推饲草^[5]。然而,象草对低温很敏感,这严重限制了它的应用和分布。研究表明,象草在气温

收稿日期:2026-02-23;修回日期:2026-04-14

作者简介:杨玉娇(2000-),汉族,女,四川都江堰人,硕士研究生,主要从事草类植物抗逆生理与分子机制方向研究,E-mail:yangyujiao0419@163.com,*通信作者 Author for correspondence, E-mail:zhangxq@sicau.edu.cn;pengyanlee@163.com

12℃~14℃时开始生长,23℃~35℃时生长迅速,5℃~10℃生长受抑,5℃以下时停止生长,持续低温冻害会造成严重损伤^[6-7]。

AP2/ERF 家族是植物特有最大的转录因子家族之一,该家族与植物生长发育、生物与非生物胁迫应答以及生物合成等过程密切相关^[8]。JOFUKU 等^[9]于1994年首次从模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离出 APETALA2(AP2)转录因子,该转录因子参与调控拟南芥花和种子的发育。随后 OHME-TAKAGI 等^[10]于1995年从烟草(*Nicotiana tabacum*)中得到第一个 EREBPs(ERF)转录因子,该转录因子具有 GCC-box 特异性结合活性。KAGAYA 等^[11]于1999年首次报道了拟南芥中的 RAV 亚家族成员 RAV1 和 RAV2,该亚家族包含一个 B3-like 结构域和一个 AP2 DNA 结合结构域。有研究表明,一些 AP2/ERF 基因异位表达可以提高植物体应对胁迫的能力,包括抵抗高盐、干旱、缺氧及低温胁迫等,拟南芥中部分 AP2/ERF 转录因子诱导编码脯氨酸合成关键酶的表达,促进脯氨酸的合成,游离的脯氨酸含量增加能够增强植物的耐寒性^[12]。在水稻(*Oryza sativa*)中,*OsERF52*能增强水稻耐寒性^[13];番茄中,*SlERF15*通过介导 ABA 合成途径提高其耐寒性^[14];此外,在葡萄(*Vitis vinifera*)^[15]、苜蓿(*Medicago sativa*)^[16]、柑橘(*Poncirus trifoliata*)^[17]等植物中的研究进一步表明,ERF 家族在进化上具有保守性,且成员在胁迫调控中表现出物种特异性,目前,已从多种植物中鉴定出 AP2/ERF 转录因子,如玉米(*Zea mays*)、水稻和小麦(*Triticum aestivum*)等作物,数量因物种而异,表明该家族在植物界中广泛存在,然而象草 ERF 家族的鉴定及对低温胁迫的响应还未见报道。

本研究基于象草基因组数据,对象草 ERF 基因家族展开全面解析,重点涵盖基因家族系统发育、染色体定位、基因结构、保守基序及共线性关系。分析该家族成员的组织表达特异性和响应低温胁迫的表达模式。为象草抗寒性分子育种及品种改良提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用材料为三份低温敏感型材料(YM, RY4, LG1)和两份低温耐受型材料(DH, G1),采用1/2

霍格兰溶液进行水培培养,材料放置于光照培养箱中(白天25℃,夜晚23℃,相对湿度60%,光照周期为16小时(光照)/8小时(黑暗)进行培养;每隔2d换一次培养液。培养32d后对试验材料进行4℃低温胁迫处理,设置0h,12h,24h三个时间梯度处理,对象草叶片进行取样,随机选4个单株取混样于离心管,一管为一个重复,取4个重复样储存于-80℃超低温冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 象草 ERF 基因家族成员鉴定 从海南大学发布的象草基因组数据库获取其基因组数据和蛋白序列文件^[18],从 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)中获取 AP2/ERF 保守结构域(PF00847)进行 HMMER 分析。通过分析 HMMER 结果初步确定候选象草 AP2/ERF 基因家族成员,手动剔除重复序列。

1.2.2 理化性质分析 使用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线工具对 ERF 基因家族成员的理化性质进行分析,使用 WOLF-PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>)在线工具对各个 ERF 基因家族成员进行亚细胞定位预测分析。

1.2.3 ERF 基因家族系统进化树构建 为解析 ERF 转录因子的进化关系,将象草、拟南芥 ERF 蛋白序列导入 MEGA 11.0 软件,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)进行系统进化分析(Bootstrap=1000),使用 Evolview (<http://www.evolgenius.info/evolview>)在线网站对进化树进行美化。

1.2.4 ERF 基因染色体定位与 Motif 分析 基于象草基因组的注释数据集,借助 TBtools 软件完成 ERF 基因家族成员的染色体定位分析,并对其分布特征进行可视化呈现。此外,利用 MEME Suite 在线平台(<https://meme-suite.org/meme/>)开展 ERF 蛋白的保守基序(motif)挖掘,分析过程中设定基序预测数量为10,其余参数均保持系统默认。

1.2.5 象草 ERF 基因家族的共线性分析 通过 TBtools 软件对象草 ERF 基因家族进行种内共线性分析。同时,选取拟南芥、水稻、玉米作为参考物种,进行物种间共线性分析。

1.2.6 象草 ERF 家族成员的表达模式分析 为解析 ERF 基因家族成员在低温胁迫下的表达模式,选取11个 ERF 亚家族基因作为研究对象。以低温处理0, 12, 24h的象草叶片为实验材料,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,并反转录合成 cDNA。以 *PpUBC-E2* 基因作为内参,利用 Primer 3.0 软件设

计基因特异性引物(表 1)。采用荧光定量 PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 分析,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量,并使用 GraphPad Prism 10.0 软件绘制表达图谱。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
<i>PpERF17</i>	CGTCGTGGTGACTGGTGAG	AATGCCAAGTTCCTTCGTC
<i>PpERF18</i>	GAGGAGGAGGTGGATTTTG	TACTGGGTCTTTTCGCTTCC
<i>PpERF19</i>	GGAGGAGGTGGATTTTGAG	TACTGGGTCTTTTCGCTTCC
<i>PpERF21</i>	GGGCTCCAACCTCAAGAAAG	TCTTCCACCTCCTCGTCAAA
<i>PpERF22</i>	GGGACTGAAGACGAACGGA	CAACGAAGCACATCGGAAAC
<i>PpERF27</i>	GAGTGCCAGTTTCCTCCCT	GTCTCATCATCCCACCCAA
<i>PpERF29</i>	GGCTCTTCTGACTTTGGGT	TTCCTCATTCTCTTTGATGCT
<i>PpERF31</i>	TCTCCACTCAAGGAAAATGGT	CTGCCTCCTCTGCTGTCTC
<i>PpERF32</i>	AGCCAAAAGGAAGAGAAAGAA	TACCAAGCCAGACACGAAC
<i>PpERF51</i>	GCCCTGATGCTAAGAAGAAAA	GAGCCAGACACGAACACCT
<i>PpERF52</i>	GGAAAAATGGTACAGCCAAAGA	CTCCTCTGCCGTCTCAAAG
<i>PpUBC-E2</i>	ACCGCCTGACAATCCCTATG	GGGATAGTCTGGCGGAAAATG

1.2.7 烟草瞬时过表达分析 基于 RT-qPCR 分析结果,选取 3 个表达水平较高的 ERF 家族基因作为候选基因,以象草 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将产物与 XbaI 和 HindIII 双酶切的线性化载体 pML-CAMBIA3300 重组。随后,将重组质粒及空

载体对照分别转化至根癌农杆菌 GV3101 菌株中,将活化后的菌液注射至生长 40 天的本氏烟草叶片中进行瞬时转化,于正常条件下培养 3 天后,将烟草植株转移至 4℃ 培养箱中进行低温胁迫处理,并观察叶片表型变化。

表 2 载体构建所用引物

Table 2 Primers used for vector construction

基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
<i>PpERF17</i>	ATGTGTCATGTGTGAACGTCCATG	TTATTGTACGCACGCGATGCC
<i>PpERF21</i>	ATGTGCGGAGGCGCCATCCT	TGGCCGGCAGCGCGGCGGG
<i>PpERF32</i>	ATGTGCGGCGGTGCGATCC	TCAATAGATATCGCCAGCCATGGG

2 结果与分析

2.1 象草 ERF 基因家族成员鉴定及其理化性质

通过对象草基因组数据分析,共鉴定出 53 个象草 ERF 基因家族成员,将其依次命名为 *PpERF01*~*PpERF53*,对 *PpERF* 蛋白进行理化性质分析,氨基酸数目在 191~1145 之间;分子量在 20536.11~124866.3Da;理论等电点(pI)4.75~11.79(>50% 为碱性蛋白,pI>7.0);不稳定系数(II)28.8~79.23,表明部分蛋白稳定性较低;脂肪族指数(AI)48.35~83.43;平均亲水性(GRAVY)-1.09~-0.16,这说明这些蛋白均为亲水性蛋白。根据亚细胞定位预测,多数蛋白位于细胞核内,部分蛋白位于细胞核外。

2.2 象草 ERF 基因家族系统发育树构建

以拟南芥 *AP2/ERF* 基因家族为参考,利用 MEGA11.0 软件,构建了包含象草和拟南芥 ERF 基因家族蛋白序列的系统发育树,如图 1 所示,AP2/ERF 家族分为 AP2, ERF, DREB, RAV 和一个 Soloist 序列 4 个亚家族。系统进化树显示,2 个

成员属于 DREB 亚家族,19 个成员属于 ERF 亚家族,32 个成员属于 RAV 亚家族。AP2 亚族更接近 RAV 亚族,ERF 亚族更接近 DREB 亚族。

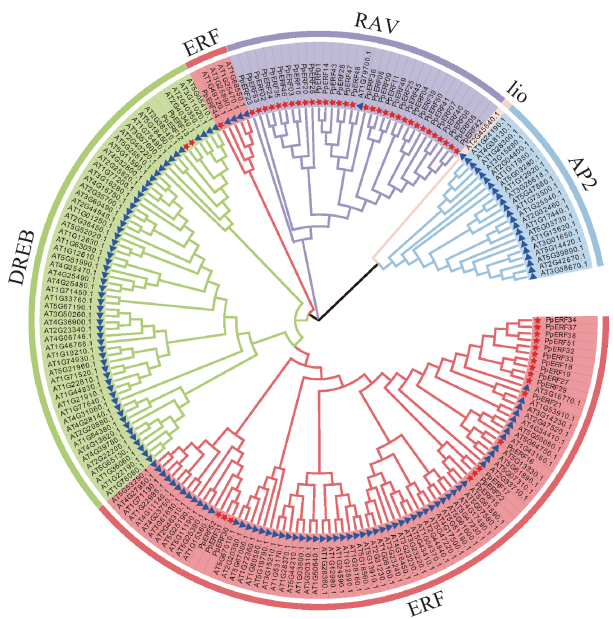


图 1 象草和拟南芥 AP2/ERF 基因家族系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of AP2/ERF gene family in *Pennisetum purpureum* and *Arabidopsis thaliana*

表 3 象草 ERF 基因家族成员基本信息

Table 3 Basic information of the ERF gene family members in *Pennisetum purpureum*

基因编号 Accession number	基因名称 Gene name	氨基酸数量 Number of amino acids	分子量 Molecular weight/Da	等电点 Isoelectric point	不稳定指数 Instability index	脂溶系数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular localization
PenpuB10014875.g	<i>PpERF01</i>	408	45 152.62	5.12	63.14	59.63	−0.78	细胞核
PenpuA70032218.g	<i>PpERF02</i>	509	53 709.20	9.66	70.25	66.50	−0.41	叶绿体
PenpuA50061973.g	<i>PpERF03</i>	516	54 947.25	9.99	54.46	54.11	−0.61	细胞核
PenpuB50031092.g	<i>PpERF04</i>	945	102 881.55	9.14	55.21	69.03	−0.51	叶绿体
PenpuB30074165.g	<i>PpERF05</i>	436	47 132.34	6.14	49.99	64.63	−0.57	细胞核
PenpuB50027437.g	<i>PpERF06</i>	464	49 994.98	5.81	48.79	54.18	−0.57	细胞核
PenpuA60065320.g	<i>PpERF07</i>	698	73 062.65	6.43	38.66	64.77	−0.35	细胞核
PenpuA40021999.g	<i>PpERF08</i>	321	34 696.09	8.80	47.93	72.15	−0.48	细胞外
PenpuB60002678.g	<i>PpERF09</i>	483	52 901.81	10.61	63.65	64.72	−0.69	液泡
PenpuB50027291.g	<i>PpERF10</i>	536	57 874.97	8.18	57.32	64.25	−0.43	液泡
PenpuA30053765.g	<i>PpERF11</i>	287	32 314.98	7.64	63.21	60.24	−0.87	细胞核
PenpuB10010202.g	<i>PpERF12</i>	334	36 036.97	5.17	58.69	53.26	−0.68	细胞核
PenpuA10020363.g	<i>PpERF13</i>	310	33 473.19	5.10	60.24	53.90	−0.70	叶绿体
PenpuA50060874.g	<i>PpERF14</i>	310	34 811.01	8.84	61.48	66.16	−0.61	细胞核
PenpuB10010115.g	<i>PpERF15</i>	206	21 190.61	11.08	73.06	49.17	−0.63	细胞核
PenpuA30057192.g	<i>PpERF16</i>	260	27 995.51	10.30	52.92	58.00	−0.57	细胞核
PenpuB70040918.g	<i>PpERF17</i>	509	53 715.21	10.89	67.40	69.14	−0.25	细胞核
PenpuA70035453.g	<i>PpERF18</i>	325	36 273.93	4.92	52.01	51.42	−0.79	细胞核
PenpuB70042101.g	<i>PpERF19</i>	325	36 305.83	4.75	48.82	53.78	−0.76	细胞核
PenpuB70038699.g	<i>PpERF20</i>	492	52 317.51	9.58	77.41	61.46	−0.51	叶绿体
PenpuB50031394.g	<i>PpERF21</i>	225	24 564.59	9.99	43.69	53.20	−0.73	细胞核
PenpuB50031392.g	<i>PpERF22</i>	377	40 756.74	8.80	55.81	64.14	−0.60	叶绿体
PenpuA10016649.g	<i>PpERF23</i>	492	53 894.22	8.15	28.80	83.43	−0.17	叶绿体
PenpuB20052711.g	<i>PpERF24</i>	656	71 800.90	9.55	64.86	75.44	−0.34	质膜
PenpuA50059253.g	<i>PpERF25</i>	245	27 168.42	9.36	69.59	64.29	−0.62	细胞核
PenpuA20043475.g	<i>PpERF26</i>	557	60 812.95	8.51	68.80	64.6	−0.52	细胞核
PenpuA70033844.g	<i>PpERF27</i>	474	50 537.47	5.67	45.86	62.81	−0.54	叶绿体
PenpuA40021848.g	<i>PpERF28</i>	249	27 813.14	10.29	73.74	48.35	−1.03	细胞核
PenpuB70040420.g	<i>PpERF29</i>	498	54 067.97	5.52	42.35	64.24	−0.42	叶绿体
PenpuA20047506.g	<i>PpERF30</i>	235	25 618.84	9.83	75.36	68.21	−0.55	细胞核
PenpuB40070590.g	<i>PpERF31</i>	246	26 802.13	9.95	71.06	65.16	−0.55	叶绿体
PenpuB40073560.g	<i>PpERF32</i>	371	70 088.39	4.78	55.97	60.57	−0.73	细胞核
PenpuScaffoldUN0063927.g	<i>PpERF33</i>	372	33 495.13	4.82	56.95	60.40	−0.74	细胞核
PenpuA20045807.g	<i>PpERF34</i>	472	57 805.67	8.84	54.13	80.44	−0.37	叶绿体
PenpuB10008247.g	<i>PpERF35</i>	644	31 181.91	7.08	61.24	64.81	−0.58	细胞核
PenpuA70033806.g	<i>PpERF36</i>	293	124 866.30	10.14	45.21	67.99	−0.69	线粒体
PenpuA20045808.g	<i>PpERF37</i>	523	42 848.78	7.51	57.56	73.37	−0.49	叶绿体
PenpuScaffoldUN0064411.g	<i>PpERF38</i>	285	40 825.92	5.34	57.27	65.09	−0.53	细胞核
PenpuA50059725.g	<i>PpERF39</i>	1145	39 688.12	8.59	55.71	66.88	−0.43	细胞核
PenpuB60007106.g	<i>PpERF40</i>	404	49 879.09	9.88	36.72	61.98	−0.49	细胞核
PenpuA30056573.g	<i>PpERF41</i>	373	47 926.03	8.79	50.31	52.14	−0.81	细胞核
PenpuA30054583.g	<i>PpERF42</i>	368	22 938.73	5.41	56.24	67.26	−0.40	细胞核
PenpuB10014781.g	<i>PpERF43</i>	448	79 338.14	8.77	42.99	83.39	−0.16	叶绿体
PenpuA70033363.g	<i>PpERF44</i>	432	31 611.78	5.27	53.80	83.33	−0.34	叶绿体
PenpuB50030509.g	<i>PpERF45</i>	207	42 221.22	8.67	57.81	75.02	−0.53	叶绿体
PenpuA10015938.g	<i>PpERF46</i>	728	35 949.12	8.75	62.27	67.80	−0.53	细胞核
PenpuA10016738.g	<i>PpERF47</i>	287	118 144.67	9.84	67.69	66.03	−0.64	叶绿体
PenpuB70040371.g	<i>PpERF48</i>	386	39 437.70	11.79	79.23	54.53	−1.09	叶绿体
PenpuA30053793.g	<i>PpERF49</i>	320	20 536.11	5.33	58.66	67.09	−0.61	细胞质
PenpuA20043074.g	<i>PpERF50</i>	1114	51 265.07	9.72	64.22	67.08	−0.42	细胞核
PenpuB20049262.g	<i>PpERF51</i>	365	70 088.39	5.83	57.92	57.04	−0.71	细胞核
PenpuA20047588.g	<i>PpERF52</i>	191	33 495.13	9.66	67.96	73.19	−0.49	细胞核
PenpuScaffoldUN0063423.g	<i>PpERF53</i>	475	57 805.67	9.95	65.17	56.53	−0.61	过氧化物酶体

2.3 象草 ERF 家族成员定位分析

基于象草染色体注释信息,对 53 个 *AP2/ERF* 基因进行染色体定位分析。结果如图 2 所示,上述基因不均匀分布于象草 A、B 两个亚基因组的 14 条染色体上,其中还有三个基因位于 scaffold 区域。此外,部分

染色体区域存在 ERF 基因的簇集分布现象,暗示这些区域可能发生过基因复制事件,从而推动了 ERF 基因家族的扩张。同时,ERF 基因在染色体末端的分布密度普遍高于着丝粒附近区域,这一分布特征与许多植物基因家族在染色体上的分布规律一致。

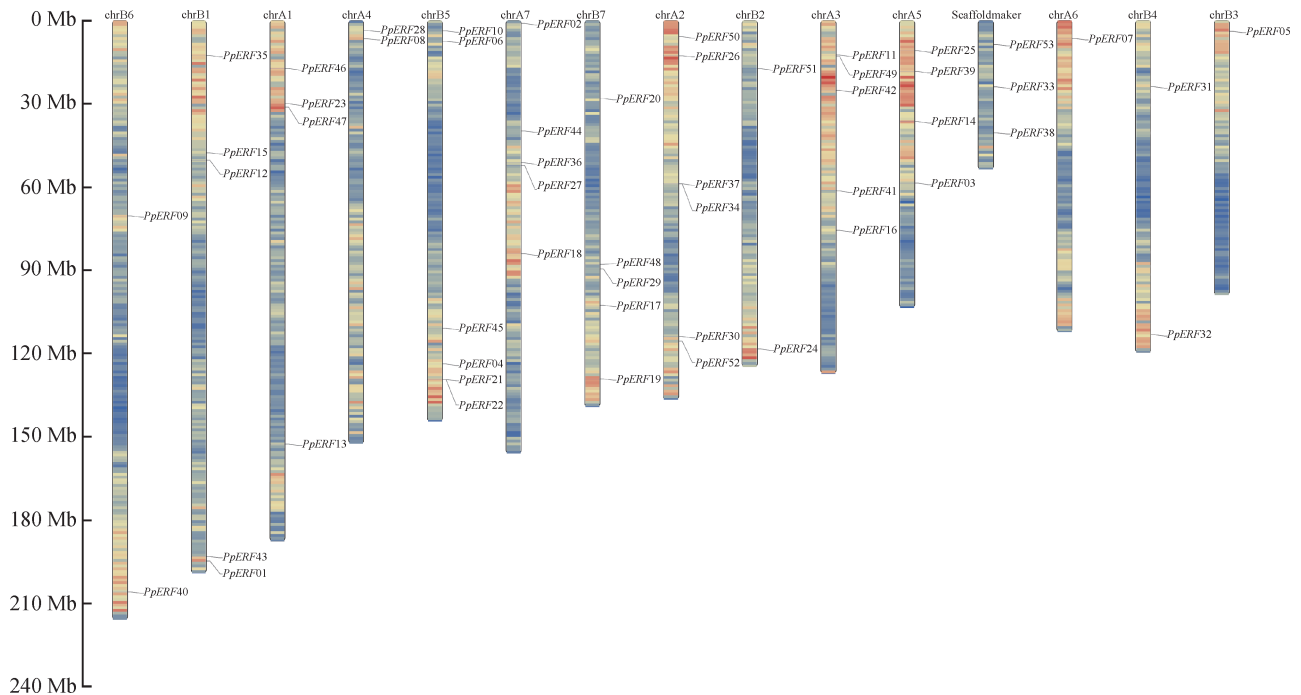


图2 象草 ERF 基因家族染色体定位及分布

Fig. 2 Chromosomal localization and distribution of the ERF gene family in *Pennisetum purpureum*

2.4 象草 ERF 家族成员 Motif、结构域及基因结构分析

为进一步揭示象草 ERF 家族的分子特征,基于其蛋白序列开展系统发育分析并构建进化树(图 3A),结果显示,序列高度同源的基因在进化树上呈现明显的聚类特征,且彼此间具有高度保守的蛋白结构。通过 MEME 工具鉴定出 10 个保守的 Motif (图 3B),绝大多数 PpERF 成员均包含 Motif 1, Motif 2, Motif 3 和 Motif 4,这些 Motif 集中分布于蛋白质的 N 端区域。此外,部分成员在 C 端还包含其他 Motif (如 Motif 5~8),这些差异可能与功能分化、亚细胞定位或蛋白质互作相关,提示不同亚群之间可能存在功能特异性。保守结构域分析结果(图 3C)显示,所有 PpERF 蛋白均包含一个典型的 *AP2/ERF* 结构域,符合 *AP2/ERF* 家族的典型特征,该结构域位于蛋白质的中前部,长度约 60~70 个氨基酸,是 ERF 转录因子识别并结合 GCC-box 顺式作用元件的关键区域。此外,进一步对 *AP2/ERF* 家族的基因结构进行分析(图 3D),PpERF 成员在外显子

一内含子结构上具有较高的多样性,大多数基因含有 1~4 个外显子,其中部分成员 (*PpERF03*, *PpERF15*, *PpERF16*, *PpERF17*, *PpERF18*, *PpERF19*, *PpERF20*) 基因结构较为简单,仅含 1~2 个外显子;而另一些成员 (*PpERF30*, *PpERF31*, *PpERF32*, *PpERF25*, *PpERF2* 等) 则含有多个外显子与较长的内含子。

2.5 象草 ERF 家族成员共线性分析

为解析象草 *AP2/ERF* 基因家族的进化特征,对其进行了种内与种间共线性分析。种内共线性结果显示(图 4A),在 53 个象草 ERF 基因中,共鉴定出 35 对共线性基因对,提示这些基因可能起源于基因复制事件,并在长期进化过程中发生功能分化,进而参与调控不同的生物学过程。种间共线性分析结果表明(图 4B),象草与水稻、玉米之间的共线性基因数量显著多于拟南芥,说明 *AP2/ERF* 家族基因在单子叶植物进化过程中具有较高的保守性。

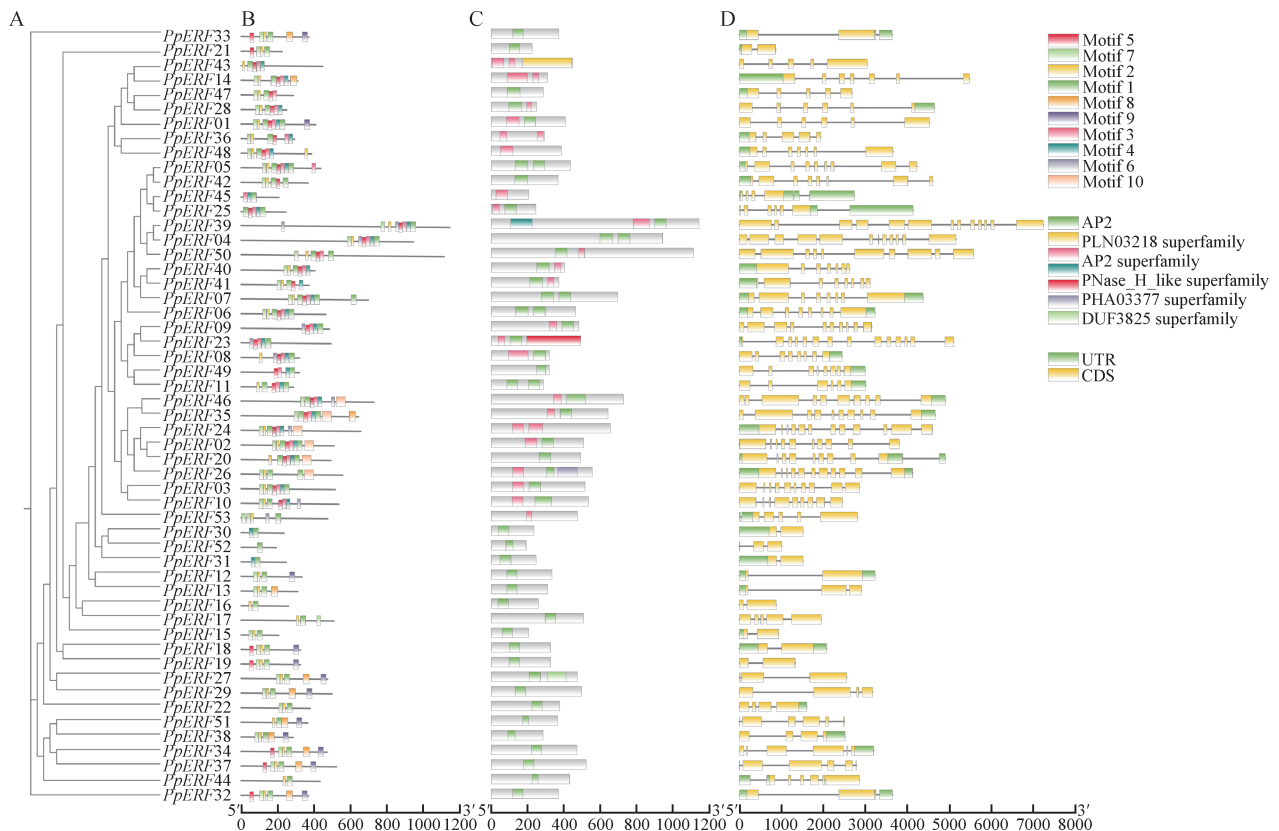


图3 象草AP2/ERF基因家族的系统发育树(A)、保守基序图(B)、保守结构域(C)、基因结构(D)

Fig. 3 Phylogenetic tree (A), conserved motif pattern (B), conserved domain distribution (C), and gene structure (D) of the AP2/ERF gene family in *Pennisetum purpureum*

2.6 象草ERF基因家族启动子顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 网站提取了象草 AP2/ERF 基因起始位点上游 2000 bp 的启动子序列并鉴定, 结果如图 5 所示, 共鉴定出超过 30 类顺式作用元件, 这些元件主要参与激素响应、胁迫应答、光响应及组织特异性表达调控。此外还可能与光响应通路、昼夜节律调控、胚乳表达、分生组织表达等相关。然而, 值得注意的是, 部分基因(如 *PpERF33*, *PpERF38*, *PpERF53*)的启动子区未能预测到任何已知的典型顺式作用元件。这些缺乏预测元件的基因均定位在基因组组装中的 scaffold 序列上, 而非已锚定的染色体。这一关联性提示, 预测结果的缺失可能与这些基因组区域的注释完整性和序列可靠性有关。

2.7 象草ERF基因家族的表达模式分析

为了研究 AP2/ERF 基因响应低温胁迫的表达模式, 筛选 11 个与低温胁迫响应相关的 ERF 亚族成员并分析了该亚族基因在不同材料中低温胁迫前后的表达动态变化, 结果如图 6 所示, 各基因胁迫

处理后其表达量随时间呈现明显差异, 且具有显著的基因型特异性。在 DH 材料中, 多数 *PpERF* 基因在低温胁迫 12 h 变化不明显, 至 24 h 表达量大幅上调, 其中 *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF31*, *PpERF32* 等基因较 0 h 上调数倍至数十倍, 表现出强烈的低温诱导响应; RY4 和 LG1 材料中多数基因在胁迫后仅呈中等程度上调, 与 DH 材料相比响应强度明显偏弱; YM、G1 材料中多数 ERF 基因胁迫后上调幅度较低, 部分基因(如 *PpERF17*, *PpERF18*, *PpERF22*, *PpERF31*, *PpERF52*)甚至出现表达下调, 整体低温响应能力较弱。上述结果表明, 这些 *PpERF* 基因在不同材料及不同胁迫时间点的表达模式差异显著, 具有明显的时空特异性和基因型特异性, 可能在象草抵御低温胁迫的过程中发挥重要调控作用。

2.8 烟草瞬时过表达表型鉴定

为评估候选基因对低温胁迫的耐受能力, 本研究采用同一烟草叶片分区域注射的方式, 将过表达载体 pML-CAMBIA3300-*PpERF17*, pML-CAMB-

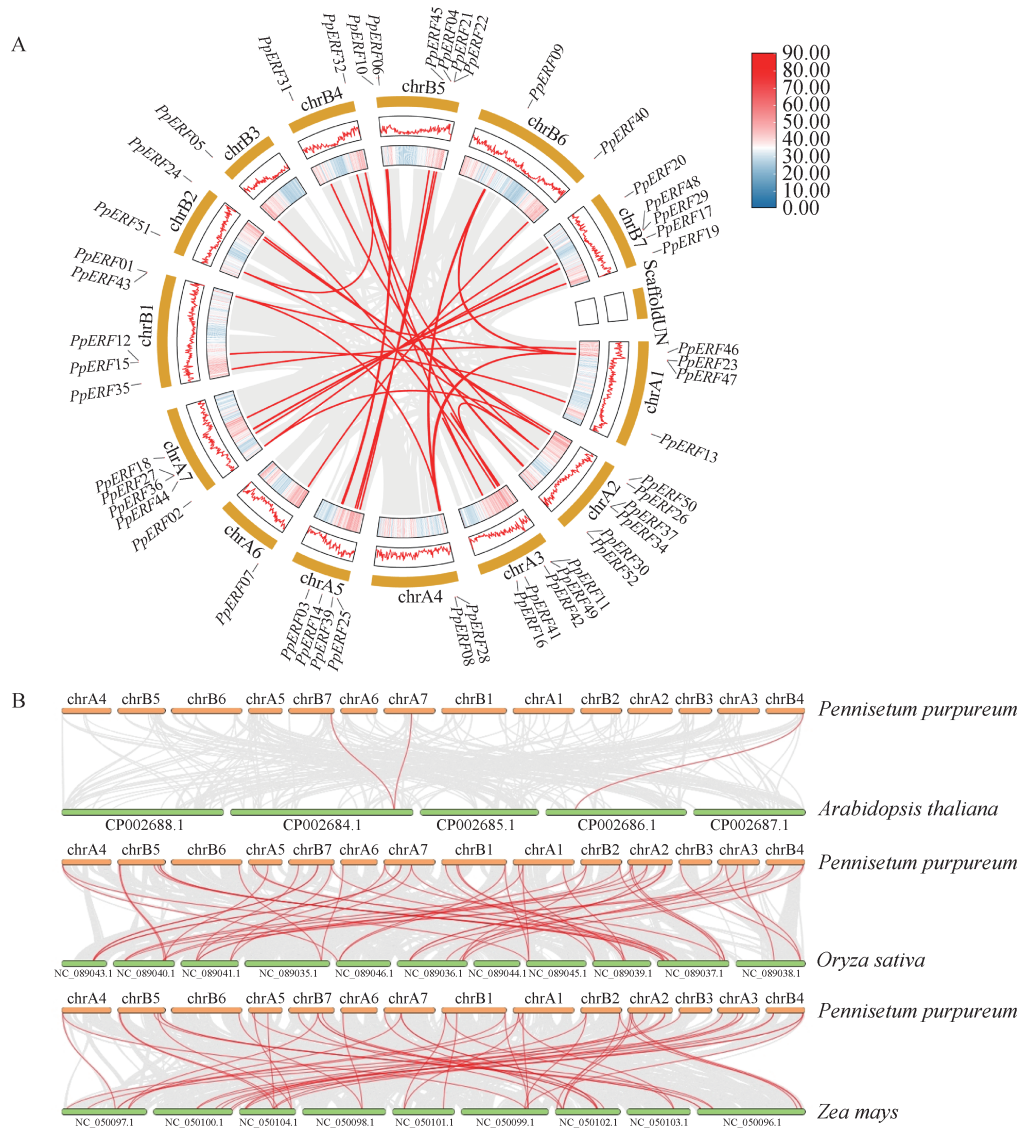


图 4 象草 ERF 基因之间共线性分析(A); 象草与拟南芥、水稻、玉米 ERF 基因共线性分析(B)

Fig. 4 Collinearity analysis of ERF genes in *Pennisetum purpureum* (A); Interspecies collinearity analysis of ERF genes between *Pennisetum purpureum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Zea mays*(B)

IA3300-*PpERF21*, pML-CAMBIA3300-*PpERF32* 及空载对照 pML-CAMBIA3300, 通过农杆菌介导法瞬时转化同一叶片的不同区域。结果如图 7 所示, 正常培养条件下, 过表达三个目的基因的烟草叶片与空载对照叶片表型一致, 均呈现鲜绿均匀、舒展完整的状态, 无明显损伤、黄化或坏死现象, 表明在正常生长环境中, *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF32* 的瞬时过表达未对烟草叶片生长发育产生显著负面影响。在低温胁迫条件下, 叶片表型出现明显的分区差异, 空载对照叶片冷害症状最为严

重, 表现为大面积水渍状白斑、叶绿素大量降解、叶片整体失绿发灰, 同时伴随明显的皱缩与粗糙化, 细胞膜系统损伤显著。与之相比, 过表达 *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF32* 的烟草叶片冷害程度均得到显著缓解, 叶片绿色度更高, 完整性更好, 白化水渍斑面积与损伤程度均远低于空载对照。初步说明, 在同一叶片的同源背景下, *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF32* 基因的瞬时过表达可显著增强烟草叶片对低温胁迫的耐受性, 排除了植株个体差异对实验结果的干扰。

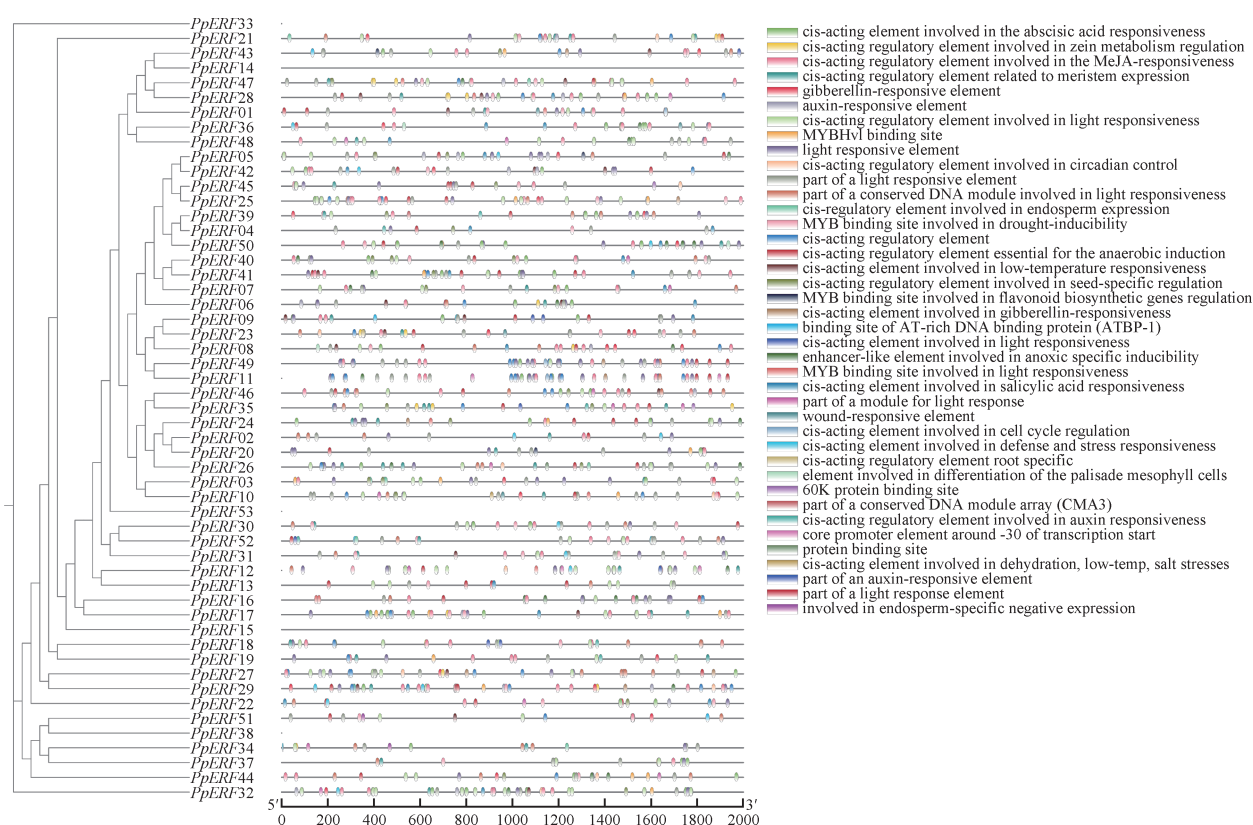
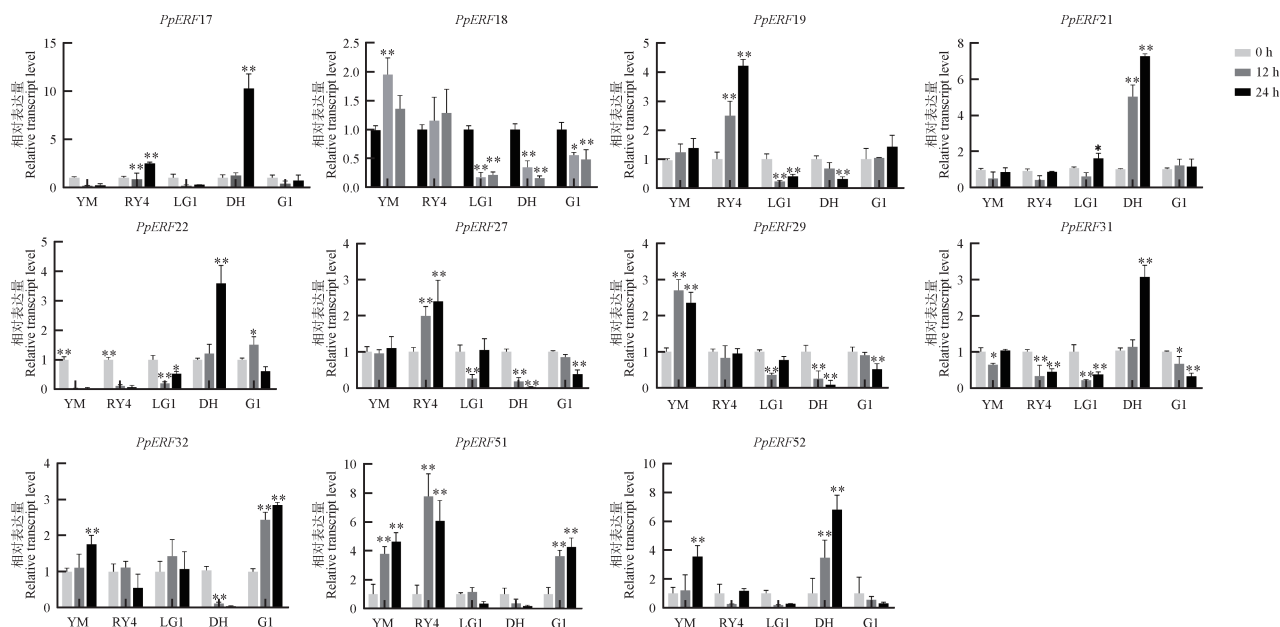


图 5 象草 ERF 基因家族启动子顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis of cis-acting regulatory elements in promoters of the ERF gene family in *Pennisetum purpureum*图 6 11 个 *PpERF* 基因在不同象草材料低温胁迫前后的表达模式分析Fig. 6 Expression patterns of 11 *PpERF* genes in different *Pennisetum purpureum* materials before and after low-temperature stress注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (与 0 h 相比, t 检验)Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (compared with 0 h, Student's t-test)

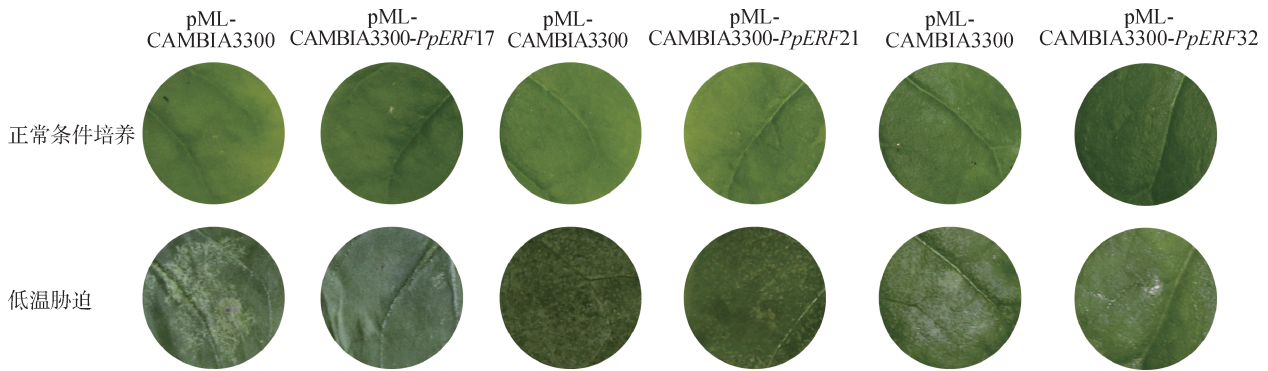


图7 瞬时过表达 *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF32* 对本氏烟草低温耐受性的影响

Fig. 7 Phenotypic effects of *PpERF17*, *PpERF21* and *PpERF32* transient overexpression on cold tolerance in *Nicotiana benthamiana*

注:pML-CAMBIA3300 为空载体对照;正常条件为 25℃常规培养,低温胁迫为 4℃处理

Note: pML-CAMBIA3300, empty vector control; normal culture at 25℃, cold stress at 4℃

3 讨论

AP2/ERF 作为植物中的一个重要转录因子家族,已被证明在植物生长发育、病菌防御、环境胁迫响应等方面发挥重要作用^[19],对该基因家族的综合分析已经在许多植物中进行,在一些其他植物中,如大豆(*Glycine max*)、胡萝卜(*Daucus carota*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)中鉴定出 129, 267 和 375 个 *AP2/ERF* 转录因子^[20]。本研究在象草基因组中共鉴定出 53 个 ERF 基因,发现象草 ERF 基因家族成员少于拟南芥、水稻,暗示其在进化过程中可能经历了基因收缩事件,以适应特定的生长环境。蛋白理化特性分析显示,象草 ERF 家族成员在理化性质上与其他物种未见显著差异。大部分成员表现为亲水蛋白,这与马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[21]、月季(*Rosa chinensis*)^[22]等物种相似。亚细胞定位预测显示,多数蛋白定位于细胞核,少量成员分布于线粒体、叶绿体等细胞器,这与玉米分布方式相似^[23]。

染色体定位显示,大部分 *PpERF* 分布于 14 条核心染色体,3 个基因位于 scaffold 区域,值得注意的是,scaffold 区域的基因在系统发育中形成独立分支,可能暗示其功能特异性,需进一步验证^[24]。对 *AP2/ERF* 基因家族保守结构域分析显示,所有成员均含 *AP2* 保守结构域,符合 *AP2/ERF* 家族的典型特征。通过 MEME 工具鉴定出 10 个保守的 Motif,绝大多数 *PpERF* 成员均包含 Motif 1, Motif 2, Motif 3 和 Motif 4,这些 Motif 集中分布于蛋白质的 N 端区域,此外,部分成员在 C 端还包含其他 Motif(如 Motif 5~8),这些差异可能与基因的生物功能相关^[25]。基因结构分析表明,外显子和内含

子的分布在不同亚家族成员中较大差异,这种结构差异可能与基因的表达调控、选择性剪接或进化过程中的外显子丢失/获得事件有关^[26]。

种内共线性分析表明 *AP2/ERF* 基因中有 35 对共线基因。种间共线性分析表明,象草与水稻、玉米的共线性基因对远多于拟南芥,该结果表明, *AP2/ERF* 家族基因在单子叶植物发育过程中表现出保守性,进一步支持单子叶植物间存在密切的系统发育关系^[27]。

基因启动子区域内的顺式作用元件是调控基因转录水平的关键序列,可直接参与基因表达的精确调控^[28]。这类调控元件与靶基因定位于同一 DNA 分子或同一条染色体上,在植物信号传导及基因表达调控网络中承担重要功能^[29]。53 个 *PpERF* 基因的启动子区域中,共识别出 30 余种顺式作用元件,主要涵盖光响应元件、生长素(IAA)、脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、低温、干旱、防御及逆境胁迫等相关调控元件。已有研究表明, *AP2/ERF* 转录因子家族在植物生长发育调控以及多种非生物与生物逆境应答过程中扮演重要角色^[30]。

根据候选基因在不同材料中的表达量分析表明,各基因在不同品种象草低温胁迫下的表达存在显著差异,推测该差异这可能是导致各品种耐寒性分化的重要原因。例如 *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF22*, *PpERF31*, *PpERF32* 这些基因在耐受型材料中表达量显著高于敏感型材料,这可能属于基因型特异性响应基因,可能与不同品种象草的遗传背景及驯化过程相关。此外, *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF32* 在 24 h 的表达高峰与 *PpERF18*, *PpERF27* 在 12 h 的表达高峰表示不同 ERF 基因可

能在低温胁迫的早期信号转导与后期损伤修复阶段分别发挥作用,共同构成象草的低温防御体系。通过同一叶片分区域注射的瞬时过表达实验,进一步验证了 *PpERF17*, *PpERF21*, *PpERF32* 的抗寒功能。在同源背景下,过表达区域的损伤程度显著低于对照,直接证实这些基因可增强植物对低温的耐受性。该结果与表达模式分析高度吻合,表明 ERF 基因的动态表达变化与其抗性功能密切相关。本研究为进一步揭示 *PpERF* 基因调控低温胁迫响应的分子机制提供了理论依据和基因资源,也为象草耐寒品种的分子育种提供了潜在靶点。

4 结论

本研究对 *PpERF* 基因家族进行了全基因组鉴定及生物信息学特征分析。在此基础上,结合实时荧光定量 RT-qPCR 分析,发现 11 个 ERF 亚族基因在低温胁迫下呈现出显著的时空表达特异性,其中 *PpERF17*, *PpERF21* 和 *PpERF32* 不仅是低温胁迫的响应基因,更在植物抵御低温逆境中承担着积极的调控功能。它们在烟草中的异源表达能够增强其耐寒性,暗示这些 ERF 亚家族成员可能通过调控下游抗寒相关基因的表达,从而减轻低温对细胞膜系统的损伤。该结果不仅为解析象草耐寒的分子机理提供了新的理论依据,也为植物抗逆遗传改良提供了优异基因资源。

参考文献

- [1] FERREIRA S D, MANERA C, SILVESTRE W P, et al. Use of biochar produced from elephant grass by pyrolysis in a screw reactor as a soil amendment[J]. Waste and Biomass Valorization, 2019, 10(10): 3089-3100
- [2] DA SILVA G H, DOS SANTOS RENATO N, COELHO F F, et al. Energy potential of elephant grass broth as biomass for biogas production[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 8635
- [3] 方婷, 罗佳佳, 张语歌, 等. 象草 PHR 家族基因的鉴定及表达分析[J]. 草地学报, 2025, 33(7): 2099-2113
- [4] FANG T, LUO J J, ZHANG Y G, et al. Identification and expression analysis of the PHR gene family in *Pennisetum purpureum*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2025, 33(7): 2099-2113
- [5] KEBEDE G, FEYISSA F, ASSEFA G, et al. Agronomic performance, dry matter yield stability and herbage quality of Napier grass (*Pennisetum purpureum* (L.) Schumacher) accessions in different agro-ecological zones of Ethiopia[J]. Agricultural Crop Research, 2017, 5(4): 49-65
- [6] JIN Y R, LUO J C, YANG Y C, et al. The evolution and expansion of RWP-RK gene family improve the heat adaptability of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) [J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 510
- [7] 温晓娜, 简有志, 解新明. 象草资源的综合开发利用[J]. 草业科学, 2009, 26(9): 108-112
- [8] WEN X N, JIAN Y Z, XIE X M. The comprehensive exploitation and utilization of *Pennisetum purpureum* [J]. Pratacultural Science, 2009, 26(9): 108-112
- [9] 丁迪云, 陈卫东, 陈杰雄, 等. 狼尾草属牧草品种比较试验[J]. 广东农业科学, 2019, 46(8): 8-13
- [10] DING D Y, CHEN W D, CHEN J X, et al. Comparative test on forage grass cultivars of *Pennisetum* [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(8): 8-13
- [11] 高广春, 肖晨, 李军, 等. 西红花 AP2/ERF 基因家族鉴定及其响应激素诱导柱头脱辅基类胡萝卜素类成分生物合成的分析[J]. 中草药, 2025, 56(22): 8322-8333
- [12] GAO G C, XIAO C, LI J, et al. Identification of AP2/ERF gene family in *Crocus sativus* and analysis of de-prothetoid group apocarotenoid biosynthesis in stigmas induced by its responsive hormone [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2025, 56(22): 8322-8333
- [13] JOFUKU K D, DEN BOER B G, VAN MONTAGU M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2 [J]. The Plant Cell, 1994, 6(9): 1211-1225
- [14] OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. The Plant Cell, 1995, 7(2): 173-182
- [15] KAGAYA Y, OHMIYA K, HATTORI T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 470-478
- [16] ANDERSSON I, BACKLUND A. Structure and function of rubisco [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(3): 275-291
- [17] XU L, YANG L J, LI A P, et al. An AP2/ERF transcription factor confers chilling tolerance in rice [J]. Science Advances, 2024, 10(35): eado4788
- [18] DING F, WANG C, XU N, et al. The ethylene response factor SIERF. B8 triggers jasmonate biosynthesis to promote cold tolerance in tomato [J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 203: 105073
- [19] WANG L, ZHANG X, QU Z Y, et al. Grapevine VviERF105 promotes tolerance to abiotic stress and is degraded by the E3 ubiquitin ligase VviPUB19 [J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 201: 105001
- [20] 尤汝月. 黄花苜蓿 MfERF072 和 MfERF009 基因促进截形苜蓿花和种子发育的初步研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2023: 2-7
- [21] YOU R Y. Preliminary study of MfERF072 and MfERF009 in *Medicago falcata* promoting the development of *Medicago* trun-

- catula flowers and seeds[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2023:2-7
- [17] WANG M, DAI W S, DU J, et al. ERF109 of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) contributes to cold tolerance by directly regulating expression of Prx1 involved in antioxidative process[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(7): 1316-1332
- [18] ZHANG S K, XIA Z Q, LI C, et al. Chromosome-scale genome assembly provides insights into speciation of allotetraploid and massive biomass accumulation of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) [J]. Molecular Ecology Resources, 2022, 22(6): 2363-2378
- [19] ZHOU C, GUO J S, FENG Z H, et al. Molecular characterization of a novel AP2 transcription factor ThWIND1-L from *Thellungiella Halophila* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2012, 110(3): 423-433
- [20] 朱康. 大豆 ERF 基因家族分析及 GmERF13 耐盐抗旱功能鉴定[D]. 荆州: 长江大学, 2023: 27-36
- ZHU K. Analysis of soybean ERF gene family and identification of salt tolerance and drought resistance function of GmERF13[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2023: 27-36
- [21] 王江清, 张蝶, 王荟洁, 等. 马铃薯 AP2/ERF 基因家族鉴定及响应致病疫霉胁迫的表达分析[J]. 生物技术通报, 2022, 38(12): 11-26
- WANG J Q, ZHANG D, WANG H J, et al. Identification of the AP2/ERF gene family in potato and expression analysis in response to *Phytophthora infestans* stress [J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(12): 11-26
- [22] 姜好, 杨陈玉, 王亚男, 等. 月季 AP2/ERF 基因家族鉴定分析[J]. 山东林业科技, 2025, 55(4): 8-18
- JIANG H, YANG C Y, WANG Y N, et al. Identification of the AP2/ERF gene family in *Rosa chinensis* [J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2025, 55(4): 8-18
- [23] 赵御璋. 玉米 AP2/ERF 基因家族的分析与鉴定[D]. 雅安: 四川农业大学, 2022: 20-25
- ZHAO Y Z. Analysis and identification of AP2/ERF gene family in maize [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2022: 20-25
- [24] 祝诗词, 叶歆雅, 王净洁, 等. 美洲狼尾草 HXK 基因家族鉴定及表达[J]. 草地学报, 2023, 31(11): 3278-3288
- ZHU S C, YE X Y, WANG J J, et al. Identification and expression analysis of HXK gene family in *Pennisetum glaucum* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(11): 3278-3288
- [25] BLANC G, WOLFE K H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes[J]. The Plant Cell, 2004, 16(7): 1667-1678
- [26] 洪林, 杨蕾, 杨海健, 等. AP2/ERF 转录因子调控植物非生物胁迫响应研究进展[J]. 植物学报, 2020, 55(4): 481-496
- HONG L, YANG L, YANG H J, et al. Research advances in AP2/ERF transcription factors in regulating plant responses to abiotic stress[J]. Bulletin of Botany, 2020, 55(4): 481-496
- [27] XIE W, DING C Q, HU H T, et al. Molecular events of rice AP2/ERF transcription factors [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 12013
- [28] WANG L, XIA X, JIANG H R, et al. Genome-wide identification and characterization of novel lncRNAs in *Ginkgo biloba* [J]. Trees, 2018, 32(5): 1429-1442
- [29] ZHANG Y W, LI Z W, MA B, et al. Phylogeny and functions of LOB domain proteins in plants [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2278
- [30] YE B B, SHANG G D, PAN Y, et al. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration[J]. The Plant Cell, 2020, 32(1): 226-241

(责任编辑 彭露茜)