

芒果果实 *MiERF20* 基因的克隆、定位及表达分析

郭盼^{1,2}, 王鑫^{1,2}, 张莎莎^{1,2}, 马德新³, 龚艳³, 邵远志^{1,2}, 李雯^{1,2*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737; 2. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572025; 3. 海南海垦冷链发展有限公司, 海南三亚 572013

摘要: 芒果 (*Mangifera indica* L.) 是典型的呼吸跃变型水果, 其成熟衰老与乙烯密切相关。ERF 转录因子 (ethylene-responsive factor) 在植物生长发育、果实成熟和乙烯信号转导中发挥重要作用。本研究以贵妃芒果品种为试验材料, 克隆 *MiERF20* 基因, 并对其生物学功能进行分析。结果表明: *MiERF20* 基因全长 492 bp, 编码 163 个氨基酸; *MiERF20* 蛋白为不稳定的亲水蛋白, 无信号肽和跨膜区, 含有 25 个磷酸化位点及 1 个 AP2 保守结构域; 其二级结构以 40.49% 的无规则卷曲为主, 还含有 33.13% 的 α -螺旋、16.56% 的延伸链和 9.82% 的 β -转角, 三级结构符合 AP2 结构域特征; *MiERF20* 与漆树科开心果的 ERF20 蛋白同源性达 83.89%。亚细胞定位显示 *MiERF20* 位于细胞核, 且具有转录激活活性。原核表达实验表明该蛋白在原核系统中能被诱导表达。实时荧光定量分析结果显示, *MiERF20* 基因受乙烯诱导表达, 表明其在乙烯调控果实成熟中发挥重要作用。本研究为进一步解析 ERF 转录因子在果实采后成熟过程中的功能和调控机制提供基础。

关键词: 芒果; ERF 转录因子; 乙烯信号; 基因表达; 表达分析

中图分类号: S667.7

文献标志码: A

Cloning, Localization and Expression Analysis of *MiERF20* Gene in Mango Fruit

GUO Pan^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, ZHANG Shasha^{1,2}, MA Dexin³, GONG Yan³, SHAO Yuanzhi^{1,2}, LI Wen^{1,2*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Sanya Institute of Southern Propagation, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 3. Hainan Haiken Cold Chain Development Co., Ltd., Sanya, Hainan 572013, China

Abstract: Mango (*Mangifera indica* L.), as a typical climacteric fruit, undergoes ripening and senescence processes closely related to ethylene. Ethylene-responsive factors (ERF) play crucial roles in plant growth, fruit ripening and ethylene signaling transduction. Mango variety Guifei was used, *MiERF20*, 492 bp long and encoding 163 amino acids, was cloned and analyzed. Bioinformatics analysis revealed that *MiERF20* was an unstable, hydrophilic protein without signal peptides or transmembrane regions, containing 25 phosphorylation sites and one AP2 conserved domain. The secondary structure was dominated by 40.49% irregular coils, 33.13% α -helices, 16.56% extensions and 9.82% β -rotations. Its secondary structure comprised irregular coils, α -helices, extended chains, and β -turns, consistent with AP2 domain features. *MiERF20* showed 83.89% homology with ERF20 of *Lacertidae pistachio*. Subcellular localization indicated that *MiERF20* was located in the nucleus and possessed transcriptional activation activity. Prokaryotic expression assays demonstrated that the protein could be inducibly expressed in a prokaryotic system. Real-time fluorescence quantification showed that *MiERF20* was ethylene-inducible, suggesting its role in ethylene-regulated fruit ripening. This study would provide a foundation for further analysis of the functions and regulatory mechanisms of ERF transcription factors during postharvest fruit ripening.

Keywords: mango; ERF transcription factor; ethylene signaling; gene expression; expression analysis

收稿日期 2024-11-19; 接受日期 2024-12-18

基金项目 海南农垦联合创新科研项目 (No. HKKJ202432); 海南大学芒果产业体系建设项目。

作者简介 郭盼 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 热带果蔬采后保鲜。*通信作者 (Corresponding author): 李雯 (LI Wen), E-mail: liwen9-210@163.com。

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.002

AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor) 转录因子家族是植物中最大且重要的转录因子家族之一, 广泛参与调控植物的生长发育、逆境响应以及激素信号传导等生物学过程。ERF 基因家族成员含有高度保守的 AP2/ERF 结构域, 通常由约 60~70 个氨基酸组成, 具有 YRG 和 RAYD 等特征性序列元件, 这些元件是 AP2/ERF 家族成员结合目标 DNA 位点的重要特征^[1]。ERF 基因家族不仅响应内源乙烯信号, 还能参与植物对干旱、盐分、低温等多种非生物胁迫的应答调控, 且能够与其他激素 (如脱落酸、茉莉酸等) 信号通路交叉作用, 因此在植物的生长发育调控中发挥重要作用^[2-3]。ERF 基因家族通常分为若干亚组, 如 ERF 亚族、DREB 亚族等。ERF 亚族主要响应乙烯和茉莉酸等激素信号, 而 DREB 亚族通常参与非生物胁迫反应。研究表明, 这些转录因子可以通过结合下游基因的启动子区特定顺式元件来激活或抑制其表达, 从而实现目标基因的调控^[4]。

不同植物中的 ERF 家族基因因其保守性和广泛的生物功能而被关注。辣椒 *CaERF70* 基因在耐盐处理下显著表达, 并具有转录激活活性, 表明其可能在辣椒应对盐胁迫过程中发挥作用^[5]。西瓜中的 *CIERF039* 基因在果实早期发育阶段对冷害、干旱、盐等非生物胁迫呈现负调控趋势, 其可能在西瓜果实发育和抗逆性方面具有潜在功能^[6]。玉米 *ZmEREB180* 基因在玉米根系生长和耐逆性调控中起到了积极作用, 尤其在低氮和干旱胁迫下显著上调, 表现出较强的抗逆性, 表明 *ZmEREB180* 可能有助于提高作物的抗逆性^[7]。在桃果实的成熟过程中, *PpERF1.B* 基因的表达水平与果实成熟呈正相关, 表明 *PpERF1.B* 基因在果实成熟过程中可能通过激活目标基因启动子发挥调控作用^[8]。黄瓜 *CsERF025L* 基因也在不同胁迫条件下表达, 推测该基因可能在黄瓜的抗逆性方面发挥关键作用^[9]。此外, 过表达水稻 *OsERF71* 基因, 转基因水稻表现出显著的抗旱能力。研究表明, *OsERF71* 通过编程基因表达网络, 将能量优先分配至氧化反应和 DNA 复制等生存相关机制, 同时抑制光合作用等高能量消耗过程, 这种能量优化延长了水稻在干旱条件下的生存时间^[10]。结缕草 *ZjERF10* 基因在水稻中过表达后, 表现出

矮化、结实率降低和耐盐性增强。*ZjERF10* 与 GA 信号通路相关蛋白的相互作用, 表明其通过调控 ABA 和 GA 串扰信号通路, 影响植物的发育和抗盐反应^[11]。*PaERF38* 基因在转基因杨树中过表达后, 显著增强了植物的耐盐和耐渗透性, 通过提高抗氧化酶的活性, 从而减少活性氧积累, 表明 *PaERF38* 在调控抗氧化能力方面的作用^[12]。

芒果 (*Mangifera indica* L.) 是热带和亚热带地区的重要经济作物, 深受消费者的喜爱。然而, 芒果作为一种典型的呼吸跃变型水果, 其采后成熟过程伴随着乙烯的释放, 易导致果实软化、衰老, 缩短了货架期, 影响芒果的市场供应和经济效益。因此, 如何延缓芒果的采后衰老、提高其贮藏稳定性成为当前重要的研究方向^[13]。ERF 转录因子作为乙烯信号通路中的关键成分, 在芒果的采后成熟调控中发挥着重要作用。陈明敏等^[14]在芒果中鉴定出多个 ERF 基因家族成员, 其中 *MiERF-AP2-5*、*MiERF-AP2-6* 等在外源乙烯处理下表现出显著上调趋势, 这些基因可能对乙烯的代谢起到正向调控作用。此外, 窦雅琪等^[15]的研究进一步揭示了 *MiERF3* 在采后芒果果皮色泽调控中的作用, 其在芒果贮藏期间的表达量呈先增后降的趋势, 其可能在芒果果实成熟和转色过程中起到重要的正向调控作用。芒果中的其他 ERF 基因, 如 *MiERF113* 在采后贮藏过程中的表达量逐渐增加, 在果皮和果肉中均有较高的表达水平, 表明其在采后成熟过程中具有重要作用, 该基因可能通过响应内源乙烯信号, 进一步影响果实成熟相关的基因表达, 延缓或加速成熟进程^[13]。此外, *MiERF2* 基因在乙烯处理下表现出复杂的表达模式, 不同成熟度的芒果果实对乙烯处理的响应不同, 其可能在芒果采后成熟过程中扮演双重调控的角色^[16]。

AP2/ERF 转录因子家族在植物的响应逆境胁迫、果实发育成熟以及乙烯信号传导中起着至关重要的调控作用。芒果作为一种重要的热带水果, 其采后成熟过程中乙烯释放引发的一系列生理变化直接影响了果实的货架期和品质。ERF 基因家族的不同成员在芒果采后成熟过程中的表达模式各异, 且可能通过响应乙烯信号通路实现对果实成熟和衰老过程的调控。因此, 为进一步解析芒果 ERF 家族基因在果实成熟衰老中的作用, 本研

究基于芒果转录组数据克隆 *MiERF20* 基因, 利用生物信息学方法对该基因编码蛋白理化性质, 系统进化、多序列比对等进行分析; 并通过 qPCR 分析 *MiERF20* 在果实贮藏期间表达水平的变化, 通过酵母验证了其转录激活活性, 以及原核诱导该蛋白的表达。该研究有助于揭示芒果采后成熟调控的分子机制, 并为延长芒果果实的保鲜期提供理论依据。同时, 利用基因编辑和转基因技术对芒果 *ERF* 基因进行改良, 可望提高芒果的贮藏稳定性, 延缓衰老, 为热带水果的保鲜技术提供新思路和新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为八成熟的贵妃芒果, 采自海南省东方市八所镇南尧村。挑选大小、颜色相对一致、无病虫害、无机械损伤的芒果果实为试验材料。剪留 0.5 cm 果柄, 用 0.1% 次氯酸钠、0.05% 施保功浸泡处理并晾干。将果实分为 2 组, 实验组经 0.5 mg/L ETH 溶液浸泡 5 min, 密闭存放 24 h 后取出, 标记为 ETH 处理果实; 对照组 (CK) 果实不作任何处理, 将果实装入 PE 保鲜袋中, 9 个果实为 1 袋, 贮藏在湿度为 85%~90%, 温度为 20 °C 的培养箱中。分别在 0、6、12、18、24 d 取样, 3 个果实为 1 次重复, 每个处理重复 3 次。将果肉样品用液氮速冻, 保存于 -80 °C 冰箱, 用于后续 RNA 提取与基因克隆。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取与 cDNA 合成 采用改良型 CTAB 法提取芒果果实 RNA, 使用 Nanodrop 2000 测定 RNA 的浓度, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 使用 NOVA All-in-One First-Strand Synthesis Master Mix 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 *MiERF20* 克隆 从芒果转录组数据库中筛选得到 *MiERF20* 基因, 通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库与 TBtools 软件分析 *MiERF20* 基因序列。使用 Primer 5.0 软件设计 qPCR 引物 (表 1), 使用 NCBI Primer-BLAST 工具检测克隆引物特异性。对目的基因进行 qPCR 扩增, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 492 bp 大小凝胶条带, 连接 pMD19-T 克隆载体, 转化 DH5 α 大肠杆菌, 随后进行菌落 PCR 验证, 将阳性克隆菌液送至北京擎科生物技术有限公司进

行测序, 测序结果使用 SnapGene 软件进行序列比对。

1.2.3 生物信息学分析 利用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具分析 *MiERF20* 蛋白理化性质; 利用 SignalP-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)、TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)、NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 在线工具分析 *MiERF20* 蛋白信号肽、跨膜区以及磷酸化位点; 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopm.html)、SWISS-MODEL (<https://www.expasy.org/resources/swiss-model>) 在线工具预测 *MiERF20* 蛋白质的二级结构与三级结构。使用 DNAMAN 6.0 软件进行多物种序列比对, 探究 *MiERF20* 在不同物种中的保守性与进化关系。使用 MEGA-X 软件构建系统进化树, 进行蛋白同源性分析。利用 NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)、MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 在线工具预测不同物种 *ERF20* 蛋白的保守结构域以及分析 10 个 motif 结构, 并使用 TBtools 软件进行可视化分析。

1.2.4 亚细胞定位分析 利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 在线工具预测蛋白的定位。采用洋葱内表皮转化法进行亚细胞定位分析。首先, 选用 *Nco* I 和 *Spe* I 酶切位点设计特异性引物 GFP-*MiERF20* (表 1), PCR 扩增出目的片段, 使用限制性内切酶切割载体和插入片段, 通过 T4 DNA 连接酶将目的片段构建至 pCambia1302-GFP (35S::GFP) 表达载体中, 生成 35S::*MiERF20*-GFP 融合表达载体。随后将重组质粒转化至 GV3101 农杆菌, 挑取阳性克隆摇至 OD₆₀₀=0.8, 离心收集菌体, 使用重悬液 (10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES、100 μ mol/L AS) 重悬菌体至 OD₆₀₀=0.8。将洋葱内表皮浸泡于该重悬液 10 min 后, 使用滤纸吸去洋葱内表皮过多的重悬液, 转移到铺有滤纸的 MS 固体培养基上培养 48 h。培养结束后制作玻片样本, 使用 DAPI 对细胞核进行染色后, 通过倒置荧光显微镜观察蓝色、绿色荧光信号并拍照。

1.2.5 *MiERF20* 转录激活活性分析 选用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切位点设计特异性引物 DBD-*MiERF20* (表 1), 以测序正确的 pMD19-*MiERF20*

质粒为模板,扩增目的片段,酶切片段与载体后,通过 T4 DNA 连接酶将目的片段插入 pGBKT7 载体,构成重组质粒。将 pGBKT7-MiERF20 重组质粒与阴性对照质粒 pGBKT7 分别转化 AH109 感受态细胞,涂布于 SD/-Trp 培养基,28 ℃ 培养 2~3 d。挑取阳性单菌落分别点板到 SD/-Trp、SD/-Trp/-His、SD/-Trp/-His+X-α-gal 培养基进行验证,28 ℃ 培养 3~5 d,根据菌落长势分析结果。

1.2.6 MiERF20 原核表达分析 选用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点设计特异性引物 GST-MiERF20 (表 1),以测序正确的 pMD19-MiERF20 质粒为模板,扩增目的片段,酶切片段与载体后,通过 T4 DNA 连接酶将目的片段插入 pGEX-6P-1 载体,构成 GST-MiERF20 重组质粒。将重组质粒转化至原核表达菌株 BL21,挑取阳性克隆摇至 OD₆₀₀=0.8,取 1 mL 作为诱导前菌液,剩余菌液加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG 终浓度为 1 mmol/L),37 ℃ 摇床诱导表达 6 h,诱导结束后取 1 mL 作为诱导后菌液,将诱导前和诱导后菌液离心后使用 PBS 重悬菌体,再次离心后加入 2×Protein Loading Buffer,95 ℃ 水浴 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳,结束后进行染色、脱色、拍照、分析。

1.2.7 MiERF20 表达量分析 利用 Primer 5.0 软件设计 qPCR 引物 (表 1),使用 NCBI Primer-BLAST 检测定量引物特异性。选择芒果 *MiActin7* 基因作为内参,使用 TOLOBIO 试剂盒 (2×Q3 SYBR qPCR Master mix) 进行 qPCR 扩增,采用 2^{-ΔΔCt} 计算基因的相对表达量。每个样品 3 次生物学重复。按试剂盒说明书配制 10 μL 反应体系,反应程序包括:预变性 3 min (95 ℃),循环包括 95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火延伸 30 s,40 次循环,熔解曲线采用仪器默认程序。

2 结果与分析

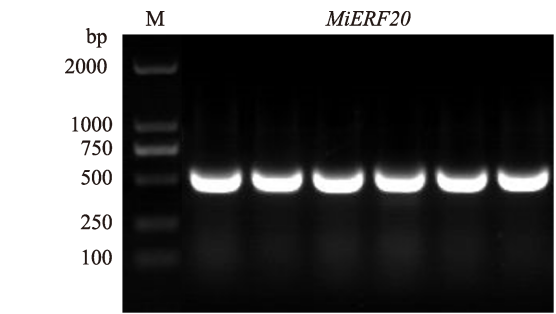
2.1 MiERF20 基因的克隆与鉴定

以芒果果肉 cDNA 为模板,使用 PCR-MiERF20 克隆引物对 *MiERF20* 基因进行 PCR 扩增,结果如图 1 所示,克隆得到的片段与 *MiERF20* 基因片段大小一致,通过测序鉴定,结果与 *MiERF20* 基因序列一致,表明成功克隆了 *MiERF20* 基因。

2.2 MiERF20 生物信息学分析

蛋白理化性质分析显示,*MiERF20* 基因编码 163 个氨基酸,蛋白分子式为 C₈₀₉H₁₂₄₂N₂₂₀O₂₅₅S₇,分子量为 18 354.5 Da,蛋白等电点为 5.15,正、

表 1 引物序列		
Tab. 1 Primers sequence		
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	用途 Purpose
qPCR-MiActin7	F: ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG R: CCAAGCAGCATGAAGATCAA	实时荧光定量
qPCR-MiERF20	F: TGGGTGTCTGAGATAAGGGTT R: ATAGAAAGCGACATCGTAGGC	
PCR-MiERF20	F: ATGATGGGTAGCAGCTCAGA R: CTAGTAATTGAGGTAACCATAATCTCAAC	基因克隆
GFP-MiERF20	F: CATGCCATGGATGATGGGTAGCAGCTCAGA R: GACTAGTGTAATTGAGGTAACCA TAATCTTCAAC	亚细胞定位
DBD-MiERF20	F: GGAATTCATGATGGGTAGCAGCTCAGA R: CGGGATCCCTAGTAATTGAGGTAACCATAATCTTCAAC	转录激活验证
GST-MiERF20	F: GGAATTCATGATGGGTAGCAGCTCAGA R: CCGCTCGAGCTAGTAATTGAGGTAACCATAATCTTCAAC	原核表达



M: DL2000 DNA marker.
图 1 *MiERF20* 基因克隆
Fig. 1 *MiERF20* gene cloning

负电荷氨基酸残基总数分别为 19 个和 22 个,不稳定系数为 62.63,亲水性为 -0.612,推测 MiERF20 蛋白为不稳定的亲水蛋白。MiERF20 蛋白无信号肽 (图 2A),属于非分泌蛋白,无跨膜区 (图 2B),不属于膜结构蛋白。磷酸化位点预测显示, MiERF20 分别含有 Ser (15 个)、Thr (5 个)、Tyr (5 个) 共 25 个磷酸化位点 (图 2C)。MiERF20 蛋白的二级结构预测发现,其无规则卷曲为 66 个氨基酸 (40.49 %)、α-螺旋为 54 个氨基酸 (33.13 %)、延伸链为 27 个氨基酸 (16.56 %),β-转角为 16 个氨基酸 (9.82 %) (图 2D); MiERF20 蛋白三级结构 (图 2E) 与二级结构预测一致,符合 AP2 结构域典型的结构特征。

MiERF20 蛋白结构域预测结果显示, MiERF20 在第 17~82 位氨基酸处含有 1 个 65 氨基酸的 AP2 结构域 (图 3A),说明 MiERF20 属于 AP2/ERF

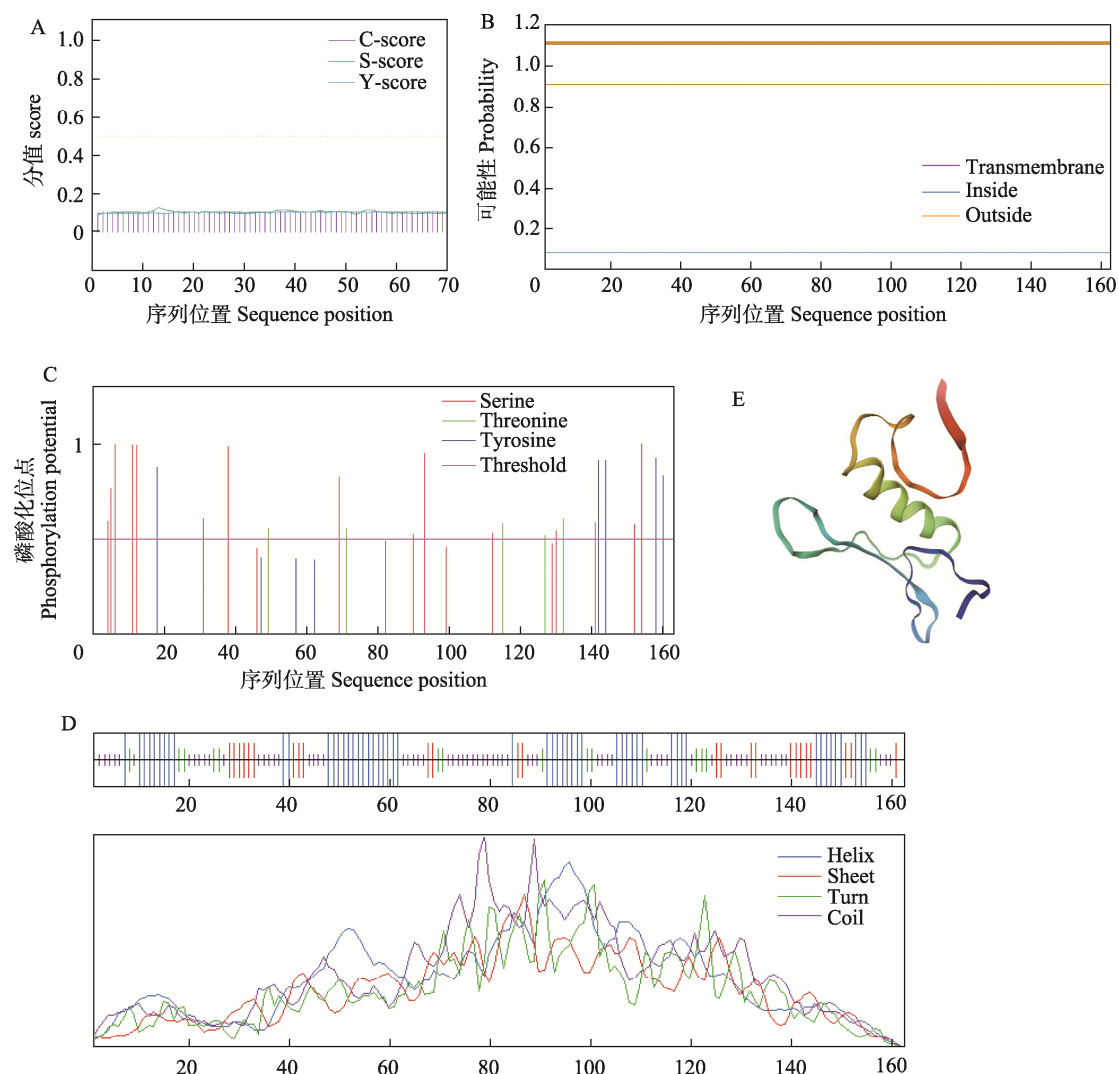


图 2 MiERF20 蛋白的信号肽 (A)、跨膜区 (B)、磷酸化位点 (C)、二级结构 (D)、三级结构 (E)

Fig. 2 Signal peptide (A), transmembrane region (B), phosphorylation site (C), secondary structure (D), tertiary structure (E) of MiERF20 protein

家族成员。

从 NCBI 数据库中下载其他 9 个已知物种的 ERF20 蛋白序列, 与 MiERF20 蛋白序列进行同源性分析 (图 3B), 发现 MiERF20 与漆树科多年生落叶果树开心果 (*Pistacia vera*, XP_031253116.1) 的 ERF20 蛋白氨基酸序列同源性最高, 为 83.89%, 表明 MiERF20 蛋白与开心果 ERF20 蛋白亲缘关系近, 该基因在功能上的作用可能更为相似。此外, 与柑橘 (*Citrus sinensis*, KAH9781553.1)、榴莲 (*Durio zibethinus*, XP_022719809.1) 同源性也较高, 为 64.78% 和 62.58%。与可可 (*Theobroma cacao*, XP_007019844.2)、雪槿 (*Hibiscus syriacus*, XP_039003247.1)、棉花 (*Gossypium hirsutum*, XP_016675456.1)、桤木 (*Alnus glutinosa*, XP_062152869.1)、黑杨 (*Populus nigra*, XP_

061987813.1) 的氨基酸序列相似性分别为 61.59%、61.49%、59.15%、58.68%、55.36 %。

对以上 9 个物种的 ERF20 基因构建进化树, 结果表明, 芒果 MiERF20 与漆树科开心果 PvERF20 聚为一类, 亲缘关系最近, 其次与雪槿、棉花的亲缘关系较近, 与桤木、黑杨的亲缘关系较远 (图 4A)。蛋白结构域预测结果显示, 9 个物种的 ERF20 蛋白均含有 AP2 结构域 (图 4B)。MEME 软件分析表明, 芒果与亲缘关系最近的开心果的 motif 一致, 均含有 motif1、motif3、motif2、motif5、motif4、motif8、motif9。与 MiERF20 同源性较高的不同物种的 ERF 基因的 motif 结构相似 (图 4C), 其中所有蛋白中均含有 4 种 motif (图 4D)。以上结果表明, ERF20 蛋白均含有 AP2 结构域, 且蛋白结构域是由 1 个或几个特定的保守元件构成。

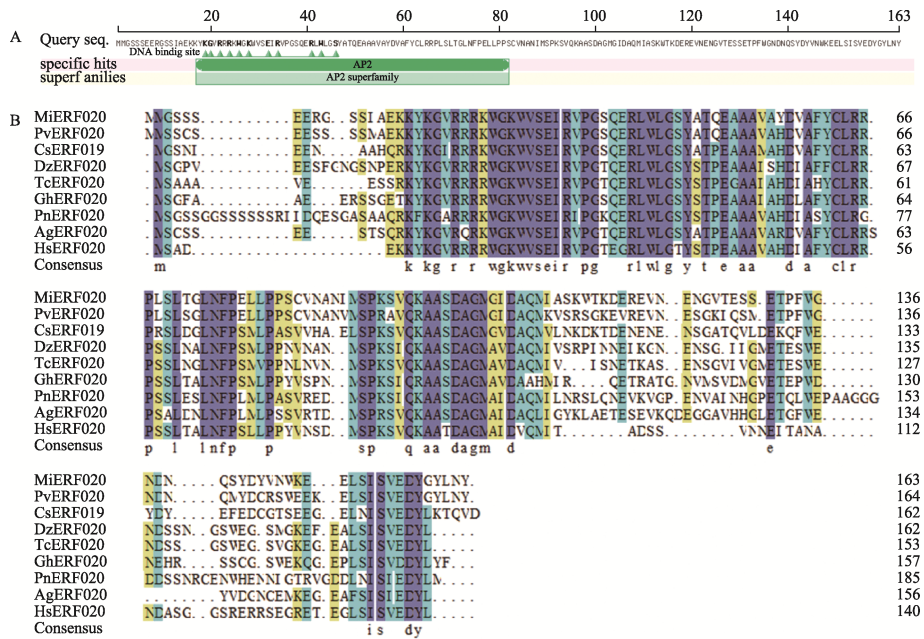


图 3 *MiERF20* 蛋白保守结构域 (A)、同源序列比对 (B)

Fig. 3 Conserved structural domains of *MiERF20* (A), homologous sequence comparison (B)

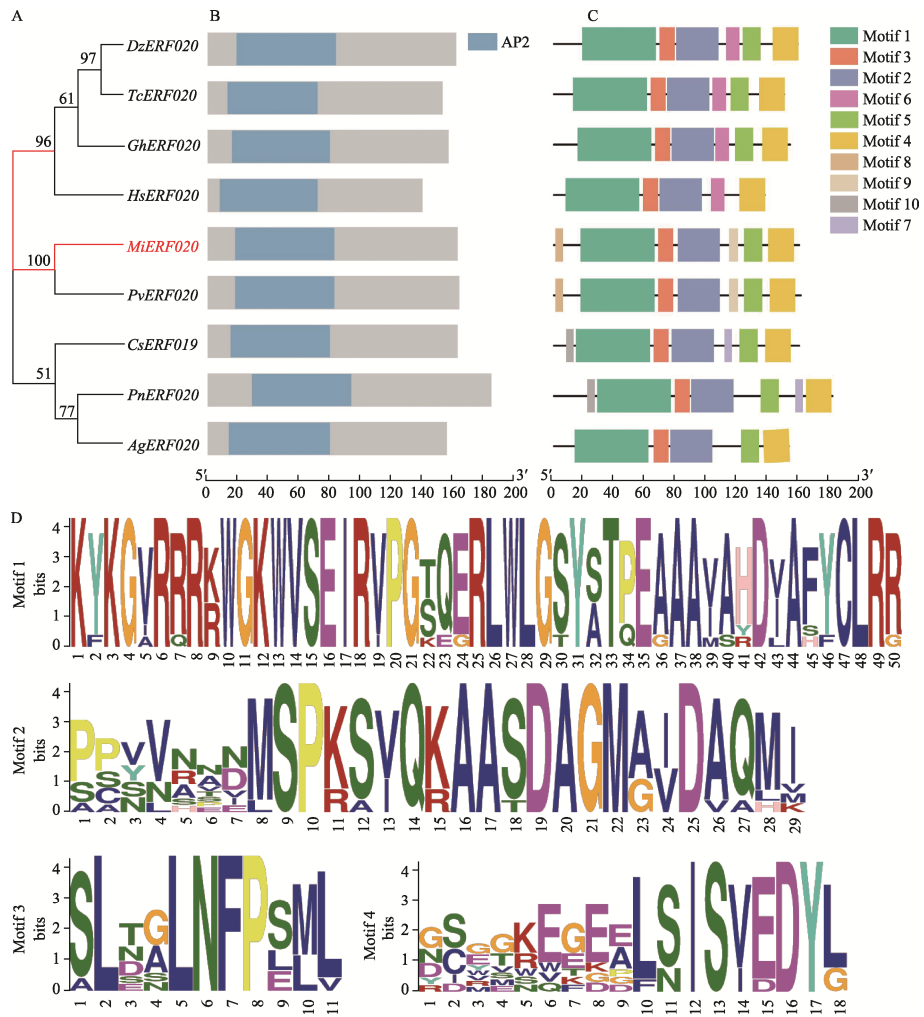


图 4 *ERF20* 进化树 (A)、保守结构域 (B)、Motif 分析 (C)、Motif (D)

Fig. 4 *ERF20* evolutionary tree (A), Conserved structural domains (B), Motif analysis (C), Motif (D)

2.3 MiERF20 亚细胞定位分析

亚细胞预测结果显示, MiERF20 蛋白定位于细胞核。将构建好的 pCAMBIA1302-MiERF20 载体通过农杆菌介导法侵染洋葱内表皮进行瞬时表达, 使用倒置荧光显微镜观察, 对照组 35S::GFP 在洋葱内表皮细胞的细胞核和细胞壁上均检测到

绿色荧光信号, 实验组 35S::MiERF20-GFP 融合蛋白仅在细胞核中出现绿色荧光信号 (图 5), 结果表明芒果 MiERF20 蛋白定位于洋葱内表皮细胞的细胞核, 与预测结果一致, 符合转录因子通常所具有的核定位信号特征, 并在细胞核中发挥其功能。

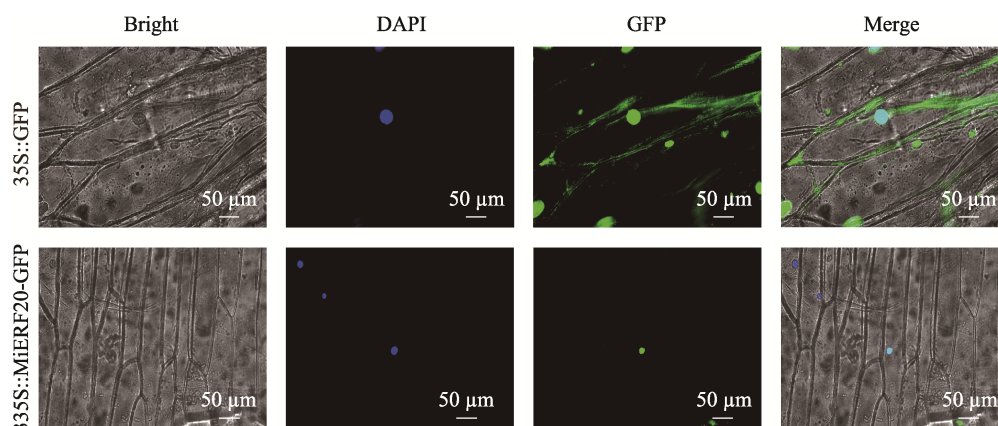


图 5 MiERF20 蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of MiERF20

2.4 MiERF20 转录激活活性分析

为了确定 MiERF20 蛋白是否具有转录激活活性, 将 *MiERF20* 基因重组到酵母表达载体 pGBKT7 中, 构成 pGBKT7-MiERF20 诱饵质粒作为实验组, 以空载体 pGBKT7 作为阴性对照组, 分别转化 AH109 感受态细胞, 涂布于 SD/-Trp 平板培养, 挑取阳性单菌落分别点板到 SD/-Trp、SD/-Trp/-His、SD/-Trp/-His+X-α-gal 平板验证。结果显示 (图 6), 2 组酵母菌在 SD/-Trp 平板上均能正常生长, 转化 pGBKT7 的阴性对照组不能在 SD/-Trp/-His 平板上生长, 转化 pGBKT7-MiERF20 诱饵目的基因质粒的实验组可以在 SD/-Trp/-His 平板上正常生长, 并在添加 X-α-gal 的平板上变蓝, 表明 *MiERF20* 基因具有转录激活活性, 能够特异性结合到 DNA 序列上, 从而激活下游基因的转录, 参与调控基因表达, 并在细胞的生理与发育过程中发挥作用。

2.5 MiERF20 原核表达分析

为了验证 MiERF20 蛋白的诱导表达, 将 *MiERF20* 基因插入到 pGEX-6P-1 载体中, 构建 GST-MiERF20 重组质粒并转化 BL21 菌株。结果显示 (图 7), 1 mmol/L IPTG 诱导的 GST-MiERF20 融合蛋白在 40~55 kDa 处差异明显, 符合 GST-MiERF20 融合蛋白的大小, 表明其成功诱导表达。上述结果表明, MiERF20 蛋白在原核系统中正确

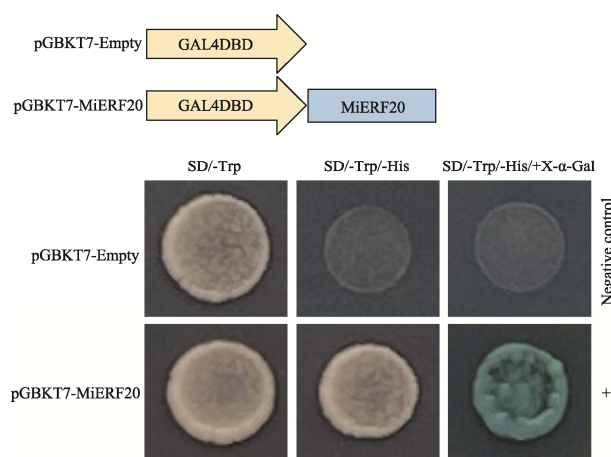


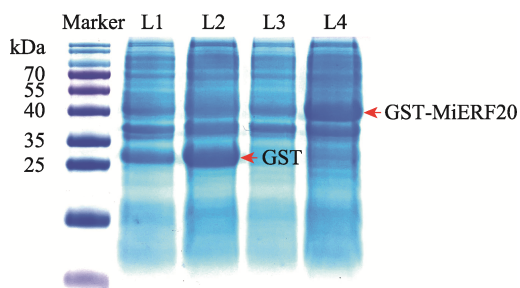
图 6 MiERF20 转录激活活性分析

Fig. 6 Analysis of MiERF20 transcriptional activation activity

折叠, 具备良好转录和翻译适应性, 为研究其功能和在植物中的作用奠定实验基础。

2.6 MiERF20 相对表达量分析

芒果果实贮藏过程中, *MiERF20* 基因的表达量呈先上升后下降的变化趋势 (图 8)。乙烯利处理能够显著提高 *MiERF20* 基因的表达水平, 且于 12 d 达到峰值, 与 0 d 相比其表达量升高了 6.14 倍, 且处理组 *MiERF20* 基因的表达水平在整个贮藏期中始终高于对照组。表明 *MiERF20* 基因可能响应乙烯信号, 并在芒果采后成熟与衰老过程中发挥调控作用。

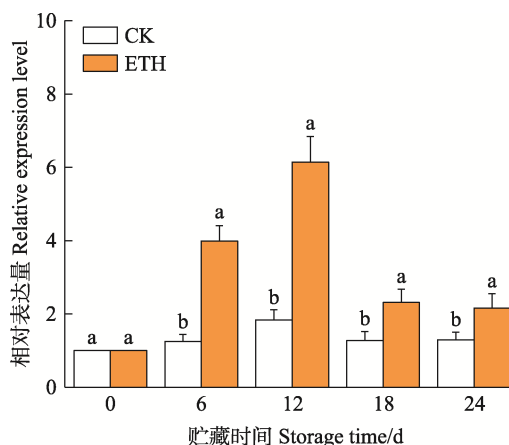


L1: 未诱导的 GST 蛋白; L2: 1 mmol/L IPTG 诱导的 GST 蛋白;
L3: 未诱导的 GST-MiERF20 融合蛋白; L4: 1 mmol/L IPTG
诱导的 GST-MiERF20 融合蛋白。

L1: Uninduced GST protein; L2: 1 mmol/L IPTG-induced GST
protein; L3: Uninduced GST-MiERF20 fusion protein; L4:
1 mmol/L IPTG-induced GST-MiERF20 fusion protein.

图7 *MiERF20* 原核表达分析

Fig. 7 *MiERF20* prokaryotic expression analysis



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant
difference ($P < 0.05$).

图8 芒果贮藏期间 *MiERF20* 的表达量分析

Fig. 8 Analysis of *MiERF20* expression during
storage of mango

3 讨论

果实成熟是一个复杂的生理和生化过程,涉及多种植物激素和转录因子的调控。乙烯作为一种关键的植物激素,在更年期果实的成熟过程中起着至关重要的作用。果实成熟过程中会经历一系列变化,包括色素积累、质地软化、糖分积累和风味形成^[17-19]。这些变化不仅影响果实的感官品质,还直接影响其营养价值和市场接受度。乙烯通过与其信号传导途径中的关键因子相互作用,调节这些成熟相关的生理过程^[20-22]。

乙烯反应因子(ERF)家族是乙烯信号传导途径中的重要组成部分,参与调控果实成熟。在不同物种中,ERF基因表现出多样的功能。番茄中的 *SlERF.D7* 通过调节生长素和乙烯信号的串扰,

促进果实成熟^[23-24]。甜瓜中 *CmERF024* 被证明是乙烯介导的果实成熟的关键调节因子,其缺失会导致成熟延迟^[25]。与这些物种相比,芒果中的 ERF 基因家族尚未得到全面研究。已有的研究表明,芒果 *MiERF4* 在应对病原菌感染时发挥重要作用,并可能参与乙烯和茉莉酸信号通路^[26]。*MiERF113* 在采后贮藏过程中的表达量逐渐增加,表明其可能通过响应内源乙烯信号,影响果实成熟相关的基因表达,并延缓或加速成熟进程^[13]。以上研究表明芒果 ERF 基因可能在果实成熟和抗病方面扮演双重角色。

ERF 基因作为乙烯信号传导的下游因子,直接参与果实成熟的调控。研究表明,ERF 基因可以通过调节乙烯生物合成和信号传导途径中的关键酶基因(如 ACS 和 ACO)影响果实成熟进程^[1, 27]。在番茄中,ERF4 通过与 *TPL4* 的相互作用抑制乙烯的产生,从而影响果实硬度^[28]。类似的机制在无花果和桃子中也被发现,这些 ERF 基因通过与其他转录因子和调控因子的相互作用,调控果实成熟的多个方面^[1, 29]。ERF 基因在采后果实成熟过程中具有显著的调控潜力,通过调节乙烯信号传导,影响果实的软化、色素积累和风味形成等关键品质^[30-32]。在苹果中,ERF4 的突变影响了果实的硬度和乙烯产生,从而改变了果实的保鲜期和品质^[28];在芒果中,尽管对 ERF 基因的研究仍处于初步阶段,但猜测其可能通过类似的机制影响果实的采后成熟和保鲜。

本研究为进一步解析 ERF20 转录因子在采后芒果果实成熟与衰老方面的作用,对其理化性质、亚细胞定位、系统进化、转录激活活性、原核诱导表达和采后贮藏期间的表达模式进行分析。生物信息学分析显示, *MiERF20* 基因全长 492 bp,编码 163 个氨基酸,与克隆及原核诱导蛋白表达的结果一致。*MiERF20* 蛋白无信号肽与跨膜区,含有 1 个 AP2 结构域(65 个氨基酸),属于 AP2/ERF 家族成员。进化树与蛋白同源性分析发现, *MiERF20* 与漆树科多年生落叶果树开心果 *PvERF20* 蛋白氨基酸序列同源性最高,为 83.89%,且芒果 *MiERF20* 与漆树科开心果 *PvERF20* 聚为一类,表明 *MiERF20* 蛋白与开心果 ERF20 蛋白亲缘关系近,该基因在功能上的作用可能更为相似,这与已报道的 *MiERF2*、*MiERF3* 等的结果一致^[12-13]。亚细胞定位结果表明,芒果 *MiERF20* 蛋白定位于细胞核,与预测结果一致,符合转录因子通常所具有的核定位信号

特征,并在细胞核中发挥其功能。转录激活活性实验表明 *MiERF20* 基因具有转录激活活性,可能通过特异性结合 DNA 序列,激活下游基因的转录,参与调控基因表达。此外,qPCR 结果表明,*MiERF20* 基因可能响应乙烯介导,乙烯信号通路被激活,通过调节基因表达参与芒果采后成熟衰老与抵抗逆境的过程。

综上所述,*ERF* 基因通过调控乙烯信号传导和与其他激素的交互作用,影响果实的成熟过程。*MiERF20* 在采后芒果果实成熟过程中发挥一定的作用,未来的研究应进一步揭示芒果中 *ERF* 基因的具体功能及其在果实采后成熟中的调控机制,以期为芒果的采后保鲜技术提供新的分子靶点和策略。

参考文献

- [1] 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.
- [2] LIU J T, ZHONG H F, CAO C J, WANG Y Q, ZHANG Q R, WEN Q F, ZHU H S, LI Z L. Identification of AP2/ERF transcription factors and characterization of AP2/ERF genes related to low-temperature stress response and fruit development in luffa[J]. Agronomy, 2024, 14(11): 2509.
- [3] XU J, LIU S D, CAI L C, WANG L Y, DONG Y F, QI Z Y, YU J Q, ZHOU Y H. SPINDLY interacts with EIN2 to facilitate ethylene signalling - mediated fruit ripening in tomato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(1): 219-231.
- [4] RITONGA F N, NGATIA J N, WANG Y R, KHOSO M A, FAROOQ U, CHEN S. AP2/ERF, an important cold stress-related transcription factor family in plants: a review[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2021, 27(9): 1953-1968.
- [5] 张余, 金明伟, 任丽, 章毅颖, 赵洪, 刘昆, 邓姗, 褚云霞, 李寿国, 张靖立, 黄静艳, 陈海荣. 辣椒 *CaERF70* 的表达特征和转录自激活活性分析[J]. 浙江农业学报, 2024, 36(10): 2247-2256.
ZHANG Y, JIN M W, REN L, ZHANG Y Y, ZHAO H, LIU K, DENG S, CHU Y X, LI S G, ZHANG J L, HUANG J Y, CHEN H R. Expression characterization and transcriptional self-activation activity of *CaERF70* in *Capsicum annuum*[J]. Acta Agriculture zhejiangensis 2024, 36(10): 2247-2256. (in Chinese)
- [6] 尹萌萌, 黄战, 胡金祥, 于颖珊, 葛佳瑞, 张锐敏. 西瓜 *CIERF039* 基因的克隆、表达分析及功能预测[J]. 分子植物育种, (2024-09-19)[2024-11-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20240918.1047.002.html>.
- [7] 刘宸铭, 赵克勇, 悦曼芳, 赵延明, 吴忠义, 张春. 玉米转录因子 ZmEREB180 调控根系生长发育及耐逆的功能研究[J]. 作物学报, 2024, 50(8): 1920-1933.
LIU C M, ZHAO K Y, YUE M F, ZHAO Y M, WU Z Y, ZHANG C. Functional studies on the maize transcription factor ZmEREB180 regulating root growth and development and stress tolerance[J]. Acta Agronomica sinica, 2024, 50(8): 1920-1933. (in Chinese)
- [8] 郭正兵, 韩柏明, 赵瑞, 储睿. 桃 *PpERF1.B* 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, (2024-04-17)[2024-11-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240415.1451.008.html>.
GUO Z B, HAN B M, ZHAO R, CHU R. Cloning and expression analysis of peach *PpERF1.B* gene[J]. Molecular Plant Breeding, (2024-04-17)[2024-11-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240415.1451.008.html>. (in Chinese)
- [9] 肖雅茹, 贾婷婷, 罗丹, 武喆, 李丽霞. 黄瓜 CsERF025L 转录因子的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报, 2024, 40(4): 159-166.
XIAO Y R, JIA T T, LUO D, WU Z, LI L X. Cloning and expression analysis of CsERF025L transcription factor in cucumber[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(4): 159-166. (in Chinese)
- [10] AHN H, JUNG I, SHIN S J, PARK J, RHEE S, KIM J K, JUNG W, KWON H B, KIM S. Transcriptional network analysis reveals drought resistance mechanisms of AP2/ERF transgenic rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1044.
- [11] GUO T, WANG S M, FAN B, ZOU S H, CHEN S, LIU W, WANG S, AI L J, HAN L B. Overexpression of the *Zoysia japonica* ZjABR1/ERF10 regulates plant growth and salt tolerance in transgenic *Oryza sativa*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2023, 206: 105171.
- [12] CHENG Z H, ZHANG X M, ZHAO K, YAO W J, LI R H, ZHOU B R, JIANG T B. Over-expression of *ERF38* gene enhances salt and osmotic tolerance in transgenic poplar[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1375.
- [13] 易萍, 黄方, 李丽, 孙健, 胡美姣, 毕金峰, 滕建文. 芒果乙烯响应转录因子 *MiERF113* 基因的克隆及表达分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(9): 1751-1758.
YI P, HUANG F, LI L, SUN J, HU M J, BI J F, TENG J W. Cloning and expression analysis of the ethylene-responsive transcription factor *MiERF113* gene in mango[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(9): 1751-1758. (in Chinese)

- [14] 陈明敏, 王丽荣, 邵远志, 李蕊, 李雯. 芒果 ERF 基因家族鉴定及外源乙烯诱导下 *MiERF-AP2* 的基因表达分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(15): 4958-4966.
CHEN M M, WANG L R, SHAO Y Z, LI R, LI W. Identification of ERF gene family and gene expression analysis of *MiERF-AP2* in mango induced by exogenous ethylene[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(15): 4958-4966. (in Chinese)
- [15] 窦雅琪, 王倩, Muhammad Muzammal Aslam, 邵远志, 李雯. 芒果 *MiERF3* 基因的克隆及表达分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(10): 2044-2053.
DOU Y Q, WANG Q, ASLAM M M, SHAO Y Z, LI W. Cloning and expression analysis of *MiERF3* gene in mango[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(10): 2044-2053. (in Chinese)
- [16] 魏玲, 寇明睿, 李雯. 芒果 AP2/ERF 转录因子 *MiERF2* 基因的克隆及表达分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(1): 1-9.
WEI L, KOU M R, LI W. Cloning and expression analysis of the AP2/ERF transcription factor *MiERF2* gene in mango[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(1): 1-9. (in Chinese)
- [17] 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.
- [18] LIU Y D, TANG M F, LIU M C, SU D D, CHEN J, GAO Y S, BOUZAYEN M, LI Z G. The molecular regulation of ethylene in fruit ripening[J]. Small Methods, 2020, 4(8): 1900485.
- [19] LIU B D, XIN Q, ZHANG M, CHEN J H, LU Q C, ZHIU X Q, LI X X, ZHANG W L, FENG W, PEI H S, SUN J. Research progress on mango post-harvest ripening physiology and the regulatory technologies[J]. Foods, 2022, 12(1): 173.
- [20] LIU M C, DIRETTO G, PIRRELLO J, ROUSTAN J P, LI Z G, GIULIANO G, REGAD F, BOUZAYEN M. The chimeric repressor version of an Ethylene Response Factor (ERF) family member, *Sl-ERF.B3*, shows contrasting effects on tomato fruit ripening[J]. New Phytologist, 2014, 203(1): 206-218.
- [21] ALONSO-SALINAS R, LÓPEZ-MIRANDA S, PÉREZ-LÓPEZ A J, ACOSTA-MOTOS J R. Strategies to delay ethylene-mediated ripening in climacteric fruits: implications for shelf life extension and postharvest quality[J]. Horticulturae, 2024, 10(8): 840.
- [22] GARCÍA-SALINAS C, RAMOS-PARRA P A, DÍAZ DE LA GARZA R I. Ethylene treatment induces changes in folate profiles in climacteric fruit during postharvest ripening[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 118: 43-50.
- [23] GAMBHIR P, SINGH V, PARIDA A, RAGHUVANSHI U, KUMAR R, SHARMA A K. Ethylene response factor ERF.D7 activates *auxin response factor 2* paralogs to regulate tomato fruit ripening[J]. Plant Physiology, 2022, 190(4): 2775-2796.
- [24] GAMBHIR P, PARIDA A P, SINGH V, RAGHUVANSHI U, KUMAR R, SHARMA A K. A ripening-associated ethylene response factor ERF.D7 activates ARF2 orthologs to regulate tomato fruit ripening[J]. Plant Biology, 2022, 190(4): 2775-2796.
- [25] SANTO DOMINGO M, ORDUÑA L, NAVARRO D, MAYOBRE C, SANTIAGO A, VALVERDE L, ALEXIOU K G, MATUS J T, PUJOL M, GARCIA-MAS J. The *ethylene-responsive transcription factor ERF024* is a novel regulator of climacteric fruit ripening in melon[J]. The Plant Journal, 2024, 119(4): 1844-1858.
- [26] LEI C, DANG Z G, ZHU M, ZHANG M T, WANG H L, CHEN Y Y, ZHANG H. Identification of the ERF gene family of *Mangifera indica* and the defense response of *MiERF4* to *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*[J]. Gene, 2024, 912: 148382.
- [27] ZHANG Z, LI X G. Genome-wide identification of AP2/ERF superfamily genes and their expression during fruit ripening of Chinese jujube[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 15612.
- [28] HU Y N, HAN Z Y, SUN Y Q, WANG S, WANG T, WANG Y, XU K N, ZHANG X Z, XU X F, HAN Z H, WU T. *ERF4* affects fruit firmness through TPL4 by reducing ethylene production[J]. The Plant Journal, 2020, 103(3): 937-950.
- [29] 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.
- [30] HUANG W, HU N, XIAO Z N, QIU Y, YANG Y, YANG J, MAO X, WANG Y C, LI Z G, GUO H W. A molecular framework of ethylene-mediated fruit growth and ripening processes in tomato[J]. The Plant Cell, 2022, 34(9): 3280-3300.
- [31] WANG M M, ZHU Q G, DENG C L, LUO Z R, SUN N J, GRIERSON D, YIN X R, CHEN K S. Hypoxia-responsive *ERF*s involved in postdeastringency softening of persimmon fruit[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(11): 1409-1419.
- [32] YIN X R, ALLAN A C, CHEN K S, FERGUSON I B. Kiwifruit *EIL* and *ERF* Genes involved in regulating fruit ripening[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 1280-1292.