

# 芒果 AP2/ERF 转录因子 *MiERF2* 基因的克隆及表达分析

魏 玲<sup>1,2</sup>, 寇明睿<sup>1,2</sup>, 李 雯<sup>1,2\*</sup>

1. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572025; 2. 海南大学园艺学院, 海南海口 570228

**摘 要:** 芒果 (*Mangifera indica* L.) 是热带地区主要的经济作物之一, 也是典型的呼吸跃变型水果, 其成熟衰老与乙烯有关。AP2/ERF 转录因子在植物中广泛存在, 研究发现这类转录因子参与果实内源乙烯合成的信号转导, 是乙烯信号通路中的关键基因, 在植物生长发育、逆境胁迫响应及贮藏运输过程中发挥重要作用。为了探究 AP2/ERF 转录因子对采后芒果成熟衰老的影响, 本研究以贵妃芒果品种为研究对象, 通过 PCR 技术克隆得到了 1 个长度为 915 bp, 编码 305 个氨基酸的 *MiERF2* 基因。通过生物信息学分析得知: *MiERF2* 蛋白分子式为  $C_{1449}H_{2259}N_{433}O_{470}S_{11}$ , 分子量为 33 618.16 Da, 总原子数为 4622, 理论等电点为 7.66, 带 30 个正电残基, 带 29 个负电残基, 蛋白具有亲水性, 结构不稳定; *MiERF2* 蛋白不含信号肽, 不含跨膜区域, 磷酸化修饰以苏氨酸为主, 包含 1 个 AP2 保守结构域; 二级结构以 66.12% 的无规则卷曲为主, 还含有 24.67% 的  $\alpha$ -螺旋、1.32% 的  $\beta$ -折叠、7.89% 的延长链, 其三维结构模型包含有  $\beta$ -折叠 3 个和  $\alpha$ -螺旋 1 个, 符合 AP2 结构域的特征。motif 分析和多序列比对结果表明 *MiERF2* 蛋白属于 ERF 亚家族成员。系统进化分析发现与 *MiERF2* 蛋白亲缘关系最近的是同为漆树科植物的阿月浑子 PvERF109-like。洋葱亚细胞定位结果显示 *MiERF2* 蛋白定位于细胞核。实时荧光定量分析表明, *MiERF2* 基因的表达量在不同采收成熟度下通过 400  $\mu\text{g/mL}$  乙烯利处理后表达情况不同: 在 6 成熟芒果中, 处理组 *MiERF2* 基因的表达量在 9 d 达到峰值, 之后显著低于对照组; 在 8 成熟芒果中, 除 18 d 以外, 对照组中 *MiERF2* 基因的表达量在贮藏过程中均显著高于处理组, 推测该基因在乙烯调控果实成熟过程中起负调控作用。本研究为揭示 ERF 转录因子在芒果采后成熟衰老过程中的调控作用提供理论依据。

**关键词:** 芒果; ERF 转录因子; 生物信息学分析; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S667.7 文献标识码: A

## Cloning and Expression Analysis of *MiERF2*, an AP2/ERF Transcription Factor in Mango

WEI Ling<sup>1,2</sup>, KOU Mingrui<sup>1,2</sup>, LI Wen<sup>1,2\*</sup>

1. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

**Abstract:** Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the major cash crops in the tropics and a typical respiratory leap fruit, whose ripening senescence is associated with ethylene. AP2/ERF transcription factors are widely present in plants, and it is found that the transcription factors are involved in the signal transduction of endogenous ethylene synthesis in fruits, and are key genes in the ethylene signaling pathway, playing an important role in plant growth and development, response to adversity stress and storage and transportation. To investigate the effect of AP2/ERF transcription factor on post-harvest mango ripening and senescence, a *MiERF2* gene of 915 bp in length, encoding 305 amino acids, was cloned by PCR using Guifei mango as the target of this study. The molecular formula of *MiERF2* protein was  $C_{1449}H_{2259}N_{433}O_{470}S_{11}$ . The molecular weight was 33 618.16 Da, the total atomic number was 4622. The theoretical isoelectric point was 7.66, with 30 positively charged residues and 29 negatively charged residues. The protein was hydrophilic and structurally unstable. *MiERF2* didn't contain a signal peptide, didn't contain a transmembrane region, and

收稿日期 2022-12-12; 修回日期 2023-01-03

基金项目 国家自然科学基金面上项目 (No. 32072275)。

作者简介 魏 玲 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 园艺产品采后科学。\*通信作者 (Corresponding author): 李 雯 (LI Wen), E-mail: liwen9-210@163.com。

phosphorylation modification was mainly threonine. MiERF2 contained a conserved structural domain of AP2, the secondary structure was dominated by 66.12% of random curl, also contained 24.67% of  $\alpha$ -helix, 1.32% of  $\beta$ -fold, 7.89% of the extended chain. Its three-dimensional structure model contained three  $\beta$ -fold and one  $\alpha$ -helix, consistent with the characteristics of the AP2 structural domain. The results of motif analysis and multiple sequence matching indicated that MiERF2 protein belonged to the ERF subfamily. Phylogenetic analysis showed that the closest relative to MiERF2 was the pistachio PvERF109-like, which is also a member of the Lacertidae family. Onion subcellular localization results showed that MiERF2 was localized in the nucleus. Quantitative real-time fluorescence analysis showed that the expression of *MiERF2* differed after 400  $\mu\text{g/mL}$  ethephon treatment at different harvest maturity. In 60% maturity mango, the expression of *MiERF2* in the treatment group peaked at 9 d and then was significantly lower than that in the control group. In 80% maturity mango, the expression of *MiERF2* in the control group was significantly higher than that in the treatment group during storage, except for 18 d. It is suspected that this gene would play a negative regulatory role in ethylene regulation of fruit ripening. This study would provide a theoretical basis for revealing the regulatory role of ERF transcription factors in postharvest ripening and senescence of mango.

**Keywords:** mango; ERF transcription factor; bioinformatics analysis; subcellular localization; expression analysis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.001

AP2/ERF 转录因子超家族存在于众多植物中, 在植物生长发育方面具有重要功能, 该家族蛋白特征明显, 含有典型的 AP2/ERF 结构域, 具有结合 DNA 的功能<sup>[1]</sup>。ERF 最早是从烟草中分离发现的, 功能域主要由 4 个部分构成, 依次为转录调控功能域、DNA 结合功能域、寡聚化位点功能域和核定位信号功能域<sup>[1]</sup>。AP2/ERF 转录因子与其他转录因子区分的主要依据是该家族成员均包含有 1 个或多个由 60~70 个高度保守的氨基酸组成的 AP2/ERF 结构域, 该结构域是 ERF 行使转录调控的关键<sup>[2]</sup>。AP2/ERF 家族转录因子根据其含有的结构域数量和是否含有其他类型结构域这 2 个依据, 将其分为 4 个亚族 (AP2、DREB、ERF、RAV) 和单独成员 (Soloist)<sup>[3-5]</sup>。AP2 亚家族划分的依据是氨基酸序列中含有 2 个串联的相似度很高的 AP2/ERF 结构域; DREB 和 ERF 亚家族相似度很高, 序列中均只含有 1 个 AP2/ERF 保守结构域, 主要区分依据是 ERF 亚家族第 14 位是丙氨酸, 第 19 位是天冬氨酸, 而 DREB 亚家族则分别是缬氨酸和谷氨酸; RAV 亚家族中含有 2 个不同的结构域, 分别是 AP2/ERF 结构域和 B3 结构域, 可以结合不同元件发挥多种调控作用; 而 Soloist 亚家族中虽然也包含 1 个 AP2/ERF 结构域, 但与其他几类亚家族的结构域差异很大, 对 Soloist 亚家族的研究报道也很少<sup>[3, 6-7]</sup>。AP2 亚家族成员的基因主要参与植物侧根形成和开花等过程, ZHANG 等<sup>[8]</sup>研究发现油菜 *BrAP2a* 和 *BrAP2b* 能够修复拟南芥 *ap2-5* 突变体花冠缺陷。DREB 亚家族可以参与调控植物干旱及低温等非生物胁迫响应, 田文等<sup>[9]</sup>的研究表

明小麦 *TaDREB27-A-2* 等 5 个基因参与了小麦的热胁迫反应; 王雷立等<sup>[10]</sup>研究发现基于玉米转录水平分析结果显示与胁迫响应相关的 DREB 亚家族基因多数下调表达。ERF 亚家族参与调控乙烯应答机制, 也参与植物非生物胁迫响应。研究表明香蕉 *MaERF9* 与乙烯合成正相关, 并且可以通过调控乙烯合成促进香蕉果实成熟<sup>[11]</sup>, 而猕猴桃 *AcERF1* 则与其果实成熟负相关<sup>[12]</sup>。RAV 亚家族在植物开花、种子发育等方面起重要调控作用, 研究表明拟南芥 *RAV1* 与种子发育和开花时间成负相关, 此外, 过表达 *AtRAV1* 还能延缓拟南芥侧根和莲座叶的发育<sup>[13, 14]</sup>, 而在拟南芥中过表达白菜 *NGA1* 则可以显著抑制拟南芥根、花、子叶和叶片的发育<sup>[15]</sup>。

芒果是漆树科芒果属植物<sup>[16]</sup>, 果香沁人心脾, 果皮色泽艳丽, 果形饱满, 果肉细腻香甜, 营养物质丰富, 维生素含量高, 具有较高的营养价值, 被誉为“热带果王”, 深受人们喜爱。世界粮农组织 (FAO, 2020 年) 统计数据显示, 全球芒果种植面积约为  $6.543 \times 10^6 \text{ hm}^2$ , 位居世界第五, 芒果产量约为  $5.502 \times 10^7 \text{ t}$ , 仅次于柑橘、香蕉、葡萄、苹果, 是热带地区主要的经济作物之一。芒果作为典型的呼吸跃变型水果, 在贮藏及销售过程中会释放大量的乙烯, 使得果实容易腐烂, 导致贮藏期短, 不易保存, 对芒果的商品价值造成影响, 制约了芒果产业的发展。挖掘与芒果成熟衰老相关的 AP2/ERF 转录因子家族基因并对其功能进行解析, 为研究果实采后成熟衰老的调控机制提供理论依据。因此, 本研究通过 PCR 扩增技术, 以采后贵妃芒果为试材, 克隆获得 1 个 AP2/ERF 转

录因子 *MiERF2* 基因, 对其进行生物信息学分析和亚细胞定位研究, 并对其在不同采收成熟度下乙烯利处理后的基因表达量进行检测, 为进一步分析 *MiERF2* 转录因子在芒果采后成熟过程中的功能以及芒果贮藏保鲜研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试芒果品种为贵妃, 采摘于海南省陵水黎族自治县英州镇万丰村景鹏万丰基地种植园。分 2 次采摘 6 成熟芒果 (花后 100 d) 和 8 成熟芒果 (花后 130 d)。选取大小均匀一致、无机械损伤、无病虫害的芒果, 立即运回实验室。芒果剪留 0.5 cm 果柄, 用 0.1% 的氯消净清洗并浸泡 20 min, 晾干, 用 400  $\mu$ g/mL 乙烯利 (ETH) 溶液浸泡 5 min, 报纸包裹密封于塑料桶中 24 h 后取出晾干。以不做任何处理的芒果为对照, 随机选取 10 个芒果为 1 组, 装入保鲜袋中, 贮藏在 25( $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 85%~90% 的培养箱中, 每 3 d 取 1 次样, 用液氮将所取样品速冻后保存在 -80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 提取与 *MiERF2* 基因全长克隆 以芒果果肉为材料提取 RNA 并逆转录成 cDNA, 果肉 RNA 提取采用改良的 CTAB 法<sup>[17]</sup>, cDNA 的合成使用逆转录试剂盒 (MonScript<sup>TM</sup> RTIII All-in- One Mix With dsDNase)。利用 DNAMAN 6.0 软件设计 *MiERF2* 的特异性引物 (*MiERF2*-F: 5'-ATGCA-GAAGTCCTCCAAGCG-3', *MiERF2*-R: 5'-TTAA-GAACTATGACAATTTCCAGTTG-3')。参照 TOYOBO 高保真酶说明书, 利用 PCR 扩增得到 *MiERF2* 的 ORF 序列, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用胶回收试剂盒 (中科瑞泰琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒) 回收目标条带, 得到纯化产物。纯化产物连接 pMD19-T 载体 (Takara pMD 19-T Vector Cloning Kit) 并转化大肠杆菌感受态 (吐露港, *E. coli* DH5 $\alpha$ ), 挑选阳性菌落送中美泰和生物技术 (北京) 有限公司测序。

1.2.2 *MiERF2* 生物信息学分析 利用 ExPASy ProtParam、NetPhos 3.1 Server、SignalP-4.1、TMHMM Server v. 2.0 等软件分析蛋白理化性质、磷酸化位点、信号肽及跨膜结构; 利用 SMART、SOPMA、SWISS-MODEL 软件分析 *MiERF2* 蛋白的结构; 利用 DNAMAN 6.0 软件进行多序列比

对; 利用 MEME 5.5.0 分析 motif 结构, motif 数设为 10; 利用 MEGA 11.0.8 软件构建系统进化树, 构建方法采用邻接法。

1.2.3 亚细胞定位 采用洋葱内表皮转化法进行亚细胞定位分析<sup>[18]</sup>, 略有修改。采用双酶切法构建到 PCAMBIA1302-GFP (35S::GFP) 载体上, 生成 35S::MiERF2-GFP 融合表达载体, 酶切位点选用 *Nco* I 和 *Bgl* II, 将重组质粒转化 GV3101 农杆菌制备 OD<sub>600</sub> 为 0.8~1.0 的悬浮液, 将洋葱内表皮 (1.5 cm $\times$ 1.5 cm) 浸泡在悬浮液中减压 10 min, 用滤纸吸去洋葱内表皮上多余的菌液, 将其转移到铺有滤纸的 MS 固体培养基上, 放置在 25  $^{\circ}$ C 培养箱中避光培养 2 d 后制成玻片, 在荧光生物摄像显微镜下观察荧光信号。

1.2.4 *MiERF2* 的表达分析 利用 DNAMAN 6.0 软件设计定量引物 (*qMiERF2*-F: 5'-CGCAACA-ACATTAACGAGTCA-3', *qMiERF2*-R: 5'-CCAC-TTTCCTCCCAAATTCA-3'), 内参基因为 *Actin* (*Actin*-F: 5'-ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG-3', *Actin*-R: 5'-CCAAGCAGCATGAAGATCAA-3'), 使用试剂盒 (MonAmp<sup>TM</sup> ChemoHS qPCR Mix) 进行 RT-qPCR 扩增, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算基因的相对表达量。

### 1.3 数据处理

使用 WPS Office 2022 软件进行数据统计与计算, 使用 SPSS 26 软件进行显著分析, 使用 GraphPad Prism 8 进行相对表达量作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MiERF2* 基因的克隆及其蛋白的理化性质分析

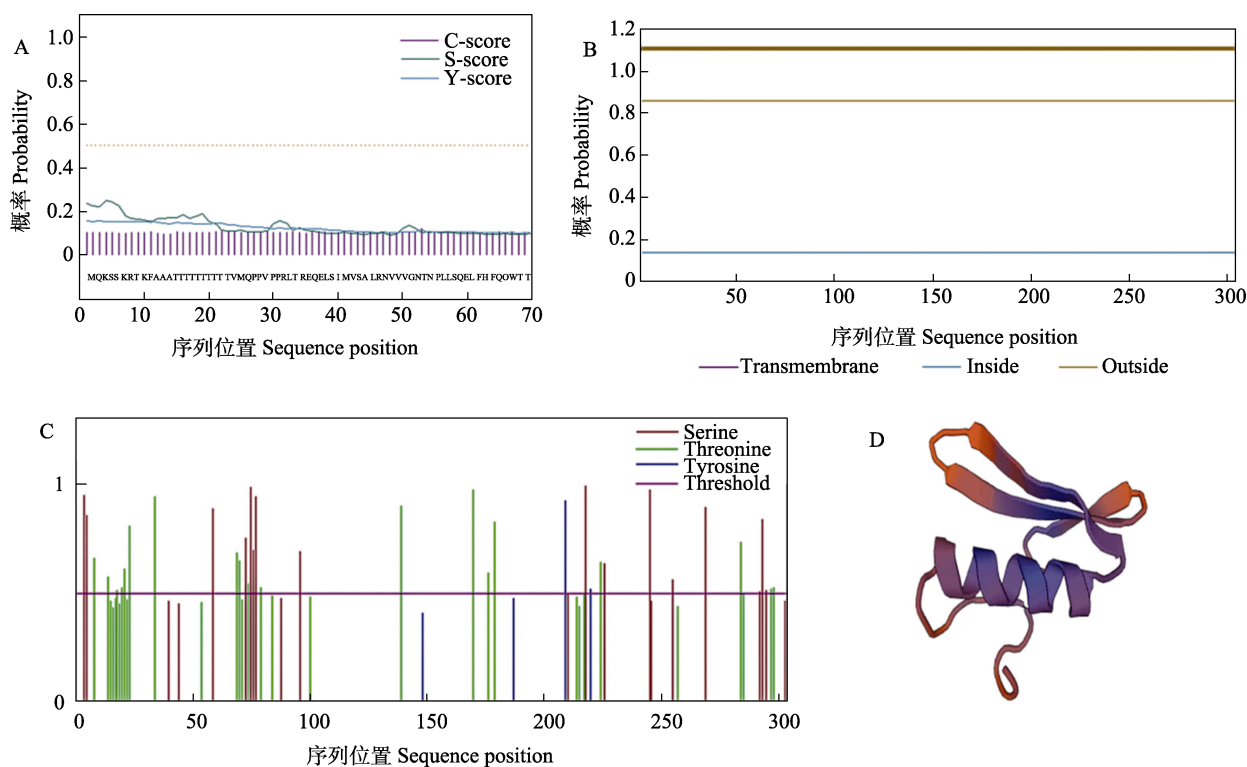
克隆得到 1 个开放阅读框 (ORF) 长度为 915 bp 的基因, 该基因编码 305 个氨基酸, 命名为 *MiERF2*。对 *MiERF2* 蛋白理化性质进行预测, 结果显示, *MiERF2* 蛋白分子式为 C<sub>1449</sub>H<sub>2259</sub>N<sub>433</sub>O<sub>470</sub>S<sub>11</sub>, 分子量为 33 618.16 Da, 总原子数为 4622, 理论等电点为 7.66。由氨基酸组成可以得知带负电残基数量 (Asp+Glu) 为 29 个, 带正电残基数量 (Arg+Lys) 为 30 个, 脂肪族氨基酸指数为 52.66, 亲水性总平均值 (GRAVY) 为 -0.796, 为亲水蛋白, 不稳定性指数为 47.13, 为不稳定蛋白。

### 2.2 *MiERF2* 蛋白结构分析

预测结果显示, *MiERF2* 蛋白中不存在信号肽 (图 1A), 也并未发现跨膜区域 (图 1B)。*MiERF2*

蛋白的磷酸化可能发生在丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸 (Tyr) 位点上 (图 1C), 主要为苏氨酸位点, 说明此蛋白发挥调控功能可能是以苏氨酸位点的磷酸化修饰为主。MiERF2 包含 1 个 AP2 保守结构域, 属于 AP2/ERF 家族转录因

子, 其二级结构以无规则卷曲为主, 占比为 66.12%, 其余为  $\alpha$ -螺旋占 24.67%、延长链占 7.89%、 $\beta$ -折叠占 1.32%。蛋白的三级结构模型中包含有 3 个  $\beta$  折叠和 1 个  $\alpha$ -螺旋 (图 1D), 此为 AP2 结构域的典型三维结构。



A: MiERF2 信号肽; B: MiERF2 跨膜结构; C: MiERF2 磷酸化位点; D: MiERF2 三级结构。  
A: Signal peptide of MiERF2; B: Transmembrane structure of MiERF2; C: Phosphorylation site of MiERF2;  
D: Tertiary structure of MiERF2.

图 1 MiERF2 蛋白结构

Fig. 1 Structure of MiERF2 protein

### 2.3 MiERF2 蛋白 motif 分析及同源序列比对

选取 9 个与 MiERF2 同源性较高的 ERF 转录因子进行 motif 分析, 结果显示, 所有 motif 结构相似, 有 4 种 motif 在所有蛋白中都含有, 与 MiERF2 所含的 motif 数目和种类一致的有 3 种, 分别为阿月浑子、木油桐、皱皮婆罗双 (图 2A)。氨基酸同源序列比对结果显示, 它们的氨基酸序列中仅含有 1 个 AP2 保守结构域, 且在该结构域中的第 14 位和第 19 位氨基酸为丙氨酸 (A) 和天冬氨酸 (D) (图 2B)。上述结果表明 MiERF2 蛋白属于 ERF 亚家族成员。

### 2.4 MiERF2 蛋白质的系统进化分析

选取漆树科植物、模式植物、热带植物等不同物种 ERF 基因构建进化树, 结果显示, 芒果 MiERF2 与同为漆树科的阿月浑子 ERF109-like 聚

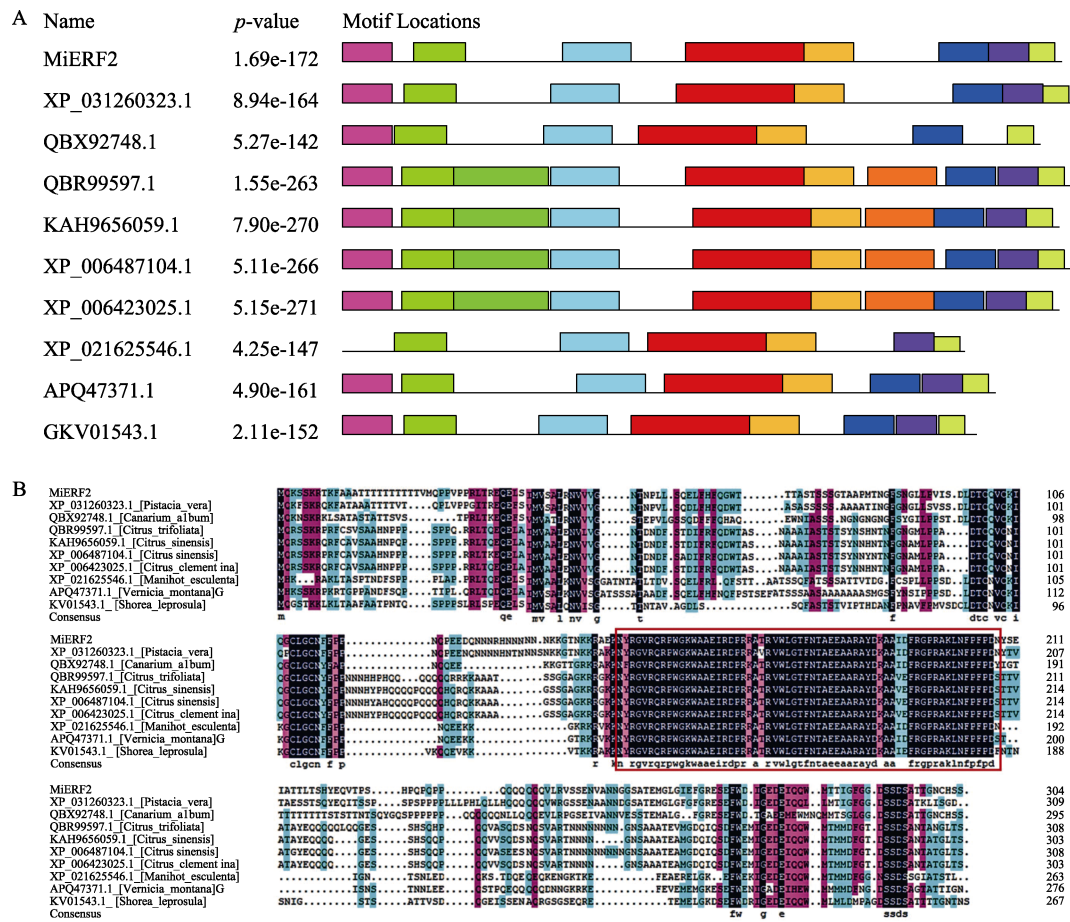
在一起, 亲缘关系最近, 其次是橄榄、枳和甜橙, 而热带植物番木瓜、菠萝以及模式植物番茄则与芒果 MiERF2 亲缘关系较远 (图 3)。

### 2.5 亚细胞定位结果分析

35S::GFP 对照洋葱内表皮细胞中的细胞核和细胞壁都检测到了绿色荧光信号, 而 35S::MiERF2-GFP 融合蛋白的绿色荧光信号仅出现在细胞核中 (图 4), 这表明芒果 MiERF2 蛋白在洋葱内表皮细胞中定位于细胞核, 符合转录因子所具有的核定位特征。

### 2.6 MiERF2 基因的表达特征分析

在乙烯利处理下不同采收成熟度中的 MiERF2 基因表达结果显示, 在 6 成熟芒果中 MiERF2 基因的表达量总体呈现先上调后下调的趋势, 对照组在 15 d 达到最大值, 而 ETH 处理组在 9 d 时达



红色方框为 AP2 保守结构域。

Red box is an AP2 conserved domain.

图 2 MiERF2 蛋白 motif 分析 (A) 和同源序列比对 (B)

Fig. 2 Motif analysis(A) and homologous sequence alignment (B) of MiERF2

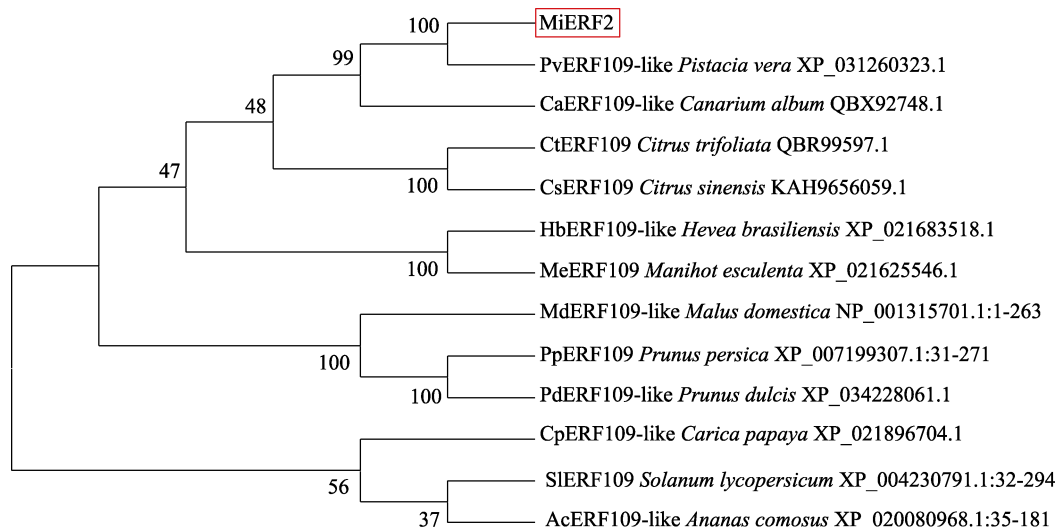


图 3 MiERF2 的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of MiERF2

到最大值后迅速下降, 且处理组中 *MiERF2* 基因的表达量只在 6 d 时显著高于对照组, 在 12 d 后

均显著低于对照组；在 8 成熟芒果中对照组 *MiERF2* 基因的表达量呈现先上调后下调的趋势，

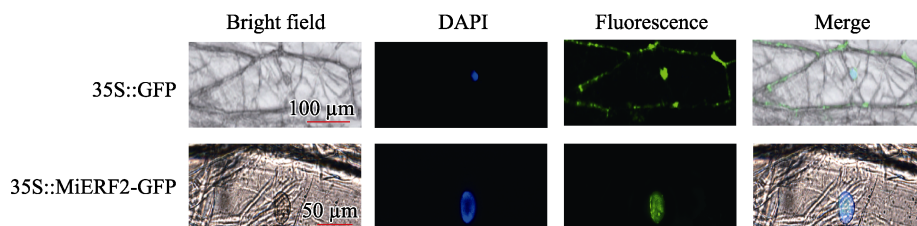
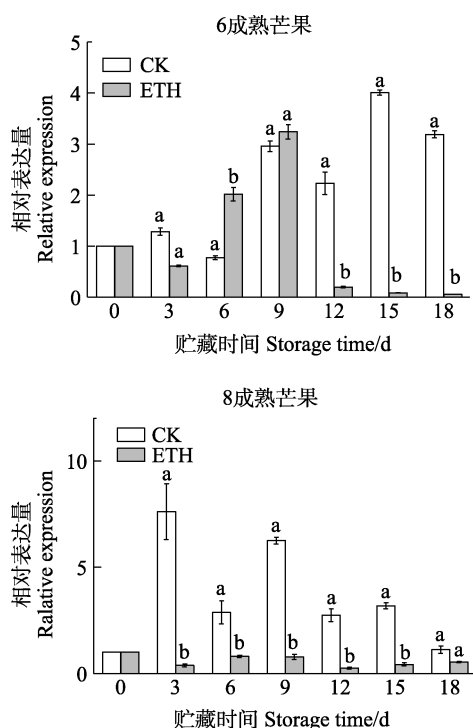


图 4 MiERF2 蛋白亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of MiERF2

而 ETH 处理组呈波动趋势, 对照组在 3 d 达到最大值, 处理组则不明显, 相较于对照组, 除 18 d 外, 处理组 *MiERF2* 基因的表达水平在整个贮藏期中始终显著低于对照组 (图 5)。*MiERF2* 基因不同成熟度中表达模式不同, 在对照和处理中存在明显差异, 表明 *MiERF2* 基因可能在芒果采后成熟衰老过程中发挥负调控作用。



不同字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

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

图 5 *MiERF2* 基因在乙烯利处理下不同采收成熟度中的表达特征分析

Fig. 5 Expression characteristics of *MiERF2* gene in different harvest maturity under ethephon treatment

### 3 讨论

新的研究发现蓝藻、线虫和病毒中也存在着 AP2 结构域<sup>[19]</sup>, 但 AP2/ERF 转录因子在植物中的研究最为广泛。AP2/ERF 转录因子能够识别和结

合多种不同的顺式作用元件, 从而发挥调控作用。ZHAO 等<sup>[20]</sup>研究发现了 1 个水稻 *ERF3* 基因, *OsERF3* 基因能够促进水稻根冠的形成; 腾飞<sup>[21]</sup>研究发现影响拟南芥合子胚发育的 *OsERF055* 基因能导致胚胎发育滞后, 从而无法形成正常的合子胚。AP2/ERF 转录因子还能加速叶片衰老<sup>[22]</sup>、加速果实褪绿<sup>[23]</sup>、防止果实提前软化<sup>[24]</sup>以及果实木质化<sup>[25]</sup>等。目前已经在许多物种中鉴定到 AP2/ERF 转录因子, 如在苹果中鉴定了 259 个 ERFs<sup>[26]</sup>; 桃中鉴定了 131 个 ERFs<sup>[27]</sup>; 柑橘中鉴定到 126 个<sup>[28]</sup>。ERF 亚家族是 AP2/ERF 超家族中最大的一个家族, 在乙烯信号转导的最后一步作为反式作用因子发挥着重要调控作用, 它可以结合启动子中多种顺式元件, 如 DRE/CRT、GCC-box、ERE 和 ATCTA 元件<sup>[29-31]</sup>。易萍等<sup>[32]</sup>在台农 1 号芒果中鉴定了 1 个 *MiERF113* 基因, 该基因属于 ERF 亚家族成员, 其蛋白不存在信号肽和跨膜结构, 与阿月浑子亲缘关系最近, 该研究与本研究结果相似。本研究鉴定的 *MiERF2* 基因也属于 ERF 亚家族, 蛋白具有亲水性, 性质不稳定, 不存在信号肽, 也没有跨膜结构; *MiERF2* 蛋白的二级和三级结构预测其包含  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、延长链及无规则卷曲, 以无规则卷曲为主, 并且具有 AP2 结构域的典型三维结构, 系统进化分析发现其与同为漆树科的阿月浑子 ERF109-like 亲缘关系最近。

果实采收成熟度是影响果实品质的主要因素之一, 采收偏早, 易造成果实品质和风味欠佳; 采收偏晚, 易使果实硬度下降, 运输效果和耐贮性变差。高豪杰等<sup>[33]</sup>研究结果显示 1-MCP 处理同一品种芒果后, 相比采收成熟度低的果实, 采收成熟度高的果实病情指数高、色度值高、果实硬度低, 不耐贮藏。生产上往往采用乙烯利进行催熟, 乙烯利处理会促进果实成熟, 加速果实变软, 使果实硬度降低, 如甜瓜<sup>[34]</sup>等, 因此本研究选取了 6 成熟和 8 成熟 2 种采收成熟度芒果, 分别用

乙烯利进行处理, 以研究 *MiERF2* 基因的表达模式。而陈明敏等<sup>[35]</sup>检测了 6 个芒果 ERF 转录因子在不同浓度乙烯利处理下的表达情况, 发现处理后有 5 个基因表达量高于对照, 1 个基因表达量低于对照; 陈勇萍等<sup>[36]</sup>通过番木瓜转录组分析发现, 差异表达的 ERF 家族成员基因中, 乙烯利处理后有 5 个 ERF 转录因子表达量高于对照, 2 个 ERF 转录因子的表达量低于对照, 与本研究结果相似。本研究鉴定的 *MiERF2* 基因定量结果表明, 在不同成熟度中表达模式并不相同, 且 *MiERF2* 的表达量在乙烯利处理后与对照相比差异显著。在 6 成熟芒果贮藏后期, 对照组 *MiERF2* 基因表达量显著高于处理组, 在 8 成熟芒果采后贮藏过程中, 对照组 *MiERF2* 的表达量相对较高, 处理组 *MiERF2* 的表达量则一直处于较低水平。上述结果表明 *MiERF2* 可能在芒果成熟过程中发挥着负调控作用, 而关于 *MiERF2* 基因后续的功能验证还有待更深入的研究。

## 参考文献

- [1] 张麒, 陈静, 李俐, 赵明珠, 张美萍, 王义. 植物 AP2/ERF 转录因子家族的研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(8): 7-13.  
ZHANG L, CHEN J, LI L, ZHAO M Z, ZHANG M P, WANG Y. Research progress on plant AP2/ERF transcription factor family[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(8): 7-13. (in Chinese)
- [2] 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.
- [3] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET J G, ABE H, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(3): 998-1009.
- [4] ZHUANG J, CAI B, PENG R H, ZHU B, JIN X F, XUE Y, GAO F, FU X Y, TIAN Y S, ZHAO W, QIAO Y S, ZHANG Z, XIONG A S, YAO Q H. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(3): 468-474.
- [5] ZHUANG J, PENG R H, CHENG Z M, ZHANG J, CAI B, ZHANG Z, FENG G, ZHU B, FU X Y, JIN X F. Genome-wide analysis of the putative AP2/ERF family genes in *Vitis vinifera*[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 123(1): 73-81.
- [6] 张计育, 王庆菊, 郭忠仁. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展[J]. 遗传, 2012, 34(7): 835-847.  
ZHANG J Y, WANG Q J, GUO Z R. Progresses on plant AP2/ERF transcription factors[J]. Hereditas, 2012, 34(7): 835-847. (in Chinese)
- [7] 丛楠, 程治军, 万建民. 控制花器官发育的 ABCDE 模型[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 124-128.  
CONG N, CHENG Z J, WAN J M. The ABCDE model of floral organ development[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(7): 124-128. (in Chinese)
- [8] ZHANG Y F, HUANG S H, WANG X F, LIU J W, GUO X P, MU J X, TIAN J X, WANG X F. Defective *APETALA2* genes lead to sepal modification in *Brassica* crops[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 367.
- [9] 田文, 郭启平, 李梓彰, 丁宁, 张珊, 闻珊珊. 普通小麦 DREB 基因家族的全基因组鉴定及热胁迫下的表达模式分析[J]. 麦类作物学报, 2018, 38(10): 1146-1156.  
TIAN W, GUO Q P, LI Z Z, DING N, ZHANG S, WEN S S. Genome-wide identification and expression analysis under heat stress of the DREB transcription factor family in bread wheat[J]. Journal of Triticeae Crops, 2018, 38(10): 1146-1156. (in Chinese)
- [10] 王雷立, 董柯清, 张严玲, 刘青青, 王翠玲. 玉米 DREB 转录因子家族的全基因组鉴定与分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(3): 270-281.  
WANG L L, DONG K Q, ZHANG Y L, LIU Q Q, WANG C L. Genome-wide identification and analysis of DREB transcription factor family in maize[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition), 2022, 48(3): 270-281. (in Chinese)
- [11] 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.
- [12] 王妍. *ERF1* 调控猕猴桃果实成熟和香石竹切花衰老的分子机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.  
WANG Y. The molecular mechanism of *ERF1* in regulating kiwifruit ripening and carnation flower senescence[D]. Wuhan: Huangzhong Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [13] HU Y X, WANG Y X, LIU X F, LI J Y. *Arabidopsis* *RAV1* is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development[J]. Cell Research, 2004(1): 8-15.
- [14] SHIN H Y, NAM K H. *RAV1* negatively regulates seed development by directly repressing *MINI3* and *IKU2* in *Arabidopsis*[J]. Molecules and Cells, 2018, 41(12): 1072-1080.
- [15] KWON S H, LEE B H, KIM E Y, SEO Y S, LEE S, KIM W T, SONG J T, KIM J H. Overexpression of a *Brassica rapa*

- NGATHA gene in *Arabidopsis thaliana* negatively affects cell proliferation during lateral organ and root growth[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(12): 2162-2173.
- [16] 张业歆, 刘家粮, 潘永贵, 高兆银, 胡美姣, 张正科. 氯吡苯脲浸泡处理延缓采后芒果成熟和软化的生理机制[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 234-241.
- ZHANG Y X, LIU J L, PAN Y G, GAO Z Y, HU M J, ZHANG Z K. Physiological mechanisms by which forchlorfenuron soaking treatment delays postharvest ripening and softening of mango fruit[J]. Food Science, 2021, 42(19): 234-241. (in Chinese)
- [17] ZENG J K, LI X, XU Q, CHEN J Y, YIN X R, FERGUSON I B, CHEN K S. *EjAP2-1*, an *AP2/ERF* gene, is a novel regulator of fruit lignification induced by chilling injury, via interaction with *EjMYB* transcription factors[J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13: 1325-1334.
- [18] SUN W, CAO Z Y, LI Y, ZHAO Y X, ZHANG H. A simple and effective method for protein subcellular localization using agrobacterium-mediated transformation of onion epidermal cells[J]. Biologia-Bratlava, 2007, 62(5): 529-532.
- [19] 付春, 刘晓伟, 王玲, 江纳, 杨瑶君. 阿拉伯岩芥 AP2 基因家族的生物信息学分析[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(8): 114-123.
- FU C, LIU X W, WANG L, JIANG N, YANG Y J. Bioinformatics analysis of AP2 gene family in *Aethionema arabicum*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(8): 114-123. (in Chinese)
- [20] ZHAO Y, CHENG S F, SONG Y L, HUANG Y L, ZHOU S L, LIU X Y, ZHOU D X. The interaction between rice *ERF3* and *WOX11* promotes crown root development by regulating gene expression involved in cytokinin signaling[J]. Plant Cell, 2015, 27(9): 2469-2483.
- [21] 滕飞. 拟南芥 AP2/ERF 基因 *ERF055* 调控茎端分生组织发育的功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- TENG F. Molecular dissection of *Arabidopsis* AP2/ERF family gene *ERF055* in regulation of the development of shoot apical meristem[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [22] TAN X L, FAN Z Q, SHAN W, YIN X R, KUANG J F, LU W J, CHEN J Y. Association of *BrERF72* with methyl jasmonate-induced leaf senescence of Chinese flowering cabbage through activating JA biosynthesis-related genes[J]. Horticulture Research, 2018, 5(1): 22.
- [23] YIN X R, XIE X L, XIA X J, YU J Q, CHEN K S. Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during *citrus* fruit degreening[J]. The Plant Journal: for cell and molecular biology, 2016, 86(5): 468-474.
- [24] FAN Z Q, KUANG J F, FU C C, WEI S, HAN Y C, XIAO Y Y, YE Y J, LU W J, PRAKASH L, DUAN X W. The banana transcriptional repressor *MaDEAR1* negatively regulates cell wall-modifying genes involved in fruit ripening[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1021-1034.
- [25] ZHANG J, YIN X R, LI H., XU M, ZHANG M X, LI S J, LIU X F, SHI Y N, GRIERSON D, CHEN K S. Ethylene response factor 39-*MYB8* complex regulates low-temperature-induced lignification of loquat fruit[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(10): 3172-3184.
- [26] GIRARDI C L, ROMBALDI C V, DAL C J, NOBILE P M, LAURENS F, BOUZAYEN M, QUECINI V. Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in apple and transcriptional evidence of ERF involvement in scab pathogenesis[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 151(2): 112-121.
- [27] ZHANG C H, SHANGGUAN L F, MA R J, SUN X, TAO R, GUO L, KORIR N K, YU M L. Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in peach (*Prunus persica*)[J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(4): 4789-4809.
- [28] XIE X L, SHEN S L, YIN X R, XU Q, SUN C D, GRIERSON D, FERGUSON I, CHEN K S. Isolation, classification and transcription profiles of the AP2/ERF transcription factor superfamily in citrus[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(7): 4261-4271.
- [29] HAO D Y, YAMASAKI K, SARAI A, OHME-TAKAGI M. Determinants in the sequence specific binding of two plant transcription factors, *CBF1* and *NtERF2*, to the DRE and GCC motifs[J]. Biochemistry, 2002, 41(13): 4202-4210.
- [30] LIU Y, ZHAO T J, LIU J M, LIU W Q, LIU Q, YAN Y B, ZHOU H M. The conserved Ala37 in the ERF/AP2 domain is essential for binding with the DRE element and the GCC box[J]. FEBS Letters, 2006, 580(5): 1303-1308.
- [31] WELSCH R, MAASS D, VOEGEL T, DEAN D P, BEYER P. Transcription factor *RAP2.2* and its Interacting partner *SINAT2*: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves[J]. Plant Physiology, 2007, 145(3): 1073-1077.
- [32] 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 ethylene response factor gene *MiERF113* in mango (*Mangnifera indica* L.)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(9): 1751-1758. (in Chinese)
- [33] 高豪杰, 贾志伟, 李雯, 李隆伟, 刘康德. 不同采收成熟度、不同品种的芒果果实对 1-MCP 处理的反应[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 293-297.
- GAO H J, JIA Z W, LI W, LI L W, LIU K D. Response of mango fruits from different maturity stages and varieties to

- 1-MCP treatment[J]. Food Science, 2013, 34(2): 293-297. (in Chinese)
- [34] 张明明, 白羽嘉, 热合满·艾拉, 王玉红, 李梦, 玛尔哈巴·帕尔哈提, 冯作山. 乙烯与 1-MCP 处理对伯谢克辛甜瓜采后生理品质的影响[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(10): 1829-1836.
- ZHANG M M, BAI Y J, RAHMAN A, WANG Y H, LI M, MAERHABA P, FENG Z S. Effects of ethylene and 1-MCP treatment on the postharvest physiological quality of Boxiekexin melon[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2018, 55(10): 1829-1836. (in Chinese)
- [35] 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 in mango and gene expression analysis of *MiERF-AP2* under exogenous ethylene induction[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(15): 4958-4966. (in Chinese)
- [36] 陈永萍, 高峰, 申艳红, 赵湾湾, 陈桂信, 王平. 番木瓜 ERF 家族与果实成熟相关成员的分析[J]. 园艺学报, 2019, 46(2): 252-264.
- CHEN Y P, GAO F, SHEN Y H, ZHAO W W, CHEN G X, WANG P. The analysis of ERFs related to fruit ripening in papaya[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(2): 252-264. (in Chinese)