

基因编辑 *MeERF127* 提高木薯抗旱和耐盐性

张兴龙^{1,2,3,4}, 张亚文^{1,2,3,4}, 王晓彤^{1,2,3,4}, 唐湘宁^{1,2,3,4}, 郭建春^{2,3,4}, 闵 义^{1*},
刘 姣^{2,3,4*}

1. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101; 3. 海南热带农业资源研究院/海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 海南海口 571101; 4. 中国热带农业科学院三亚研究院/热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572025

摘 要: 干旱、高盐和低温严重损害植物的细胞, 抑制其生长, 显著降低作物产量。AP2/ERF 超家族中的乙烯响应因子 (ERF) 在植物的生长发育和逆境应答中起关键作用。为了研究 *MeERF127* 在木薯响应非生物胁迫中的作用, 本研究从木薯中克隆 *MeERF127* 基因, 对其进行序列比对、亚细胞定位、转录活性分析、表达模式分析, 构建 *MeERF127* 基因编辑载体获得转基因木薯, 对其在干旱、盐和低温胁迫处理后的表型和生理指标进行分析, 并且分析胁迫响应基因的表达。结果显示: *MeERF127* 基因 CDS 全长为 711 bp, 氨基酸序列的 N 端和 C 端分别包含 YRG 和 RAYD 元件, 第 14 位和第 19 位的氨基酸是丙氨酸和天冬氨酸, 表明 *MeERF127* 属于 ERF 亚家族; *MeERF127* 蛋白亚细胞定位于细胞核, 具有转录因子活性; *MeERF127* 在茎中的表达量最高, 在愈伤组织中的表达量最低, 在块根形成期 (植后 80 d) 的表达量最高, 在干旱和盐胁迫后的表达水平上升, 在低温胁迫后略下降; 构建基因编辑载体, 通过农杆菌侵染木薯愈伤组织, Hi-TOM 高通量测序结果表明得到了 22 个碱基缺失和 3 个碱基缺失的 *MeERF127* 基因编辑株系; 在干旱和盐胁迫处理后, 基因编辑木薯未萎焉, 野生型木薯明显萎焉, 基因编辑木薯的 SOD、POD 活性和 Pro 含量均显著高于野生型木薯, MDA 含量显著低于野生型, 基因编辑木薯的叶片颜色更浅, 胁迫响应基因 *SOD* 和 *WRKY31* 在基因编辑木薯中的表达量显著高于野生型; 在低温胁迫后, 基因编辑木薯和野生型木薯均萎焉, SOD 活性、POD 活性、MDA 含量、叶片颜色和胁迫响应基因在基因编辑木薯与对照差异不显著。以上结果表明, 基因编辑 *MeERF127* 提高了木薯的抗旱性和耐盐性, 但对低温胁迫不响应, 推测 *MeERF127* 可能调控 *SOD* 和 *WRKY31* 基因以响应干旱和盐胁迫。本研究结果为揭示 *MeERF127* 基因在木薯响应干旱和盐胁迫中的作用提供参考。

关键词: 木薯; *MeERF127*; 基因编辑; 干旱胁迫; 盐胁迫

中图分类号: S533 文献标志码: A

Gene Editing *MeERF127* Enhances Drought and Salt Tolerance in Cassava

ZHANG Xinglong^{1,2,3,4}, ZHANG Yawen^{1,2,3,4}, WANG Xiaotong^{1,2,3,4}, TANG Xiangning^{1,2,3,4}, GUO Jianchun^{2,3,4},
MIN Yi^{1*}, LIU Jiao^{2,3,4*}

1. School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572025, China

收稿日期 2023-02-26; 修回日期 2023-03-07

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 323MS087); 国家自然科学基金项目 (No. 32001602); 现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-11-HNGJC)。

作者简介 张兴龙 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 木薯分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 闵 义 (MIN Yi), E-mail: 992601@hainanu.edu.cn; 刘 姣 (LIU Jiao), E-mail: liujiao@itbb.org.cn。

Abstract: Drought, high salinity and low temperature severely damage plant cells, inhibit plant growth, and significantly reduce crop yields. Ethylene-responsive factors (ERFs) in the AP2/ERF superfamily play a key role in plant growth and development, and in stress responses. To investigate the role of *MeERF127* in the response of cassava to abiotic stress, this study cloned the *MeERF127* gene from cassava and conducted sequence alignment, subcellular localization, transcriptional activity analysis, and expression pattern analysis. A gene-edited vector for *MeERF127* was constructed to obtain transgenic cassava, and the phenotype and physiological indicators after drought, salt and cold stress treatments were analyzed, along with the expression of stress-responsive genes. The results showed that the full-length CDS region of the *MeERF127* gene was 711 bp, and the amino acid sequence contained YRG and RAYD elements at the N- and C-termini, respectively, with alanine and aspartic acid at positions 14 and 19, indicating that *MeERF127* belonging to the ERF subfamily. *MeERF127* was localized in the nucleus and had transcription factor activity. *MeERF127* was most highly expressed in stems, with the lowest expression in callus tissues, and its expression peaks during the tuber formation stage (80 days after planting). Its expression level increased after drought and salt stress and slightly decreased after cold stress. A gene-edited vector was constructed, and *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava callus tissues resulted in *MeERF127* gene-edited lines with 22 and 3 base pair deletions, as confirmed by Hi-TOM high-throughput sequencing. After drought and salt stress treatments, the gene-edited cassava did not wilt, while the wild-type cassava showed significant wilting. The gene-edited cassava had significantly higher SOD and POD enzyme activities and Pro content, and significantly lower MDA content compared to the wild-type cassava. The leaf color of the gene-edited cassava was lighter, and the expression levels of stress-responsive genes *SOD* and *WRKY31* were significantly higher in the gene-edited cassava than those in the wild-type. After cold stress, both gene-edited and wild-type cassava wilted, with no significant differences in SOD and POD enzyme activities, MDA content, leaf color and stress-responsive gene expression between the gene-edited and wild-type cassava. These results suggest that the gene-edited *MeERF127* enhances the drought and salt tolerance of cassava but does not respond to cold stress, indicating that *MeERF127* may regulate the *SOD* and *WRKY31* genes to respond to drought and salt stress. The findings of this study would provide insights into the role of the *MeERF127* gene in cassava's response to drought and salt stress.

Keywords: cassava; *MeERF127*; gene editing; drought stress; salt stress

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.002

AP2/ERF 转录因子是一类主要存在于植物中的转录因子大家族，其包括 5 个亚族：AP2（*APETALA2*）、乙烯响应因子（ERF）、脱水响应元件结合蛋白（DREB）、RAV 和 Soloist^[1]。AP2/ERF 转录因子包含约 60 个氨基酸的 AP2 DNA 结合域，能与目标基因启动子处的脱水响应元件 DRE/C-repeat 元件和 GCC box 元件结合互作。AP2/ERF 超家族转录因子调控植物的多种发育过程，在激素调控和逆境应答中发挥重要作用^[2]。目前，在很多植物中已鉴定出大量的 ERF 家族成员，如水稻中存在 170 个 *ERF* 基因^[3]，拟南芥中存在 147 个 *ERF* 基因^[4]，小麦中存在 238 个 *ERF* 基因^[5]，木薯中存在 155 个 *ERF* 基因^[6]。

植物通过激活各种防御机制来抵御不同来源的生物（如昆虫和病原体的攻击）和非生物胁迫（如干旱、高盐和极端温度）。AP2/ERF 家族转录因子主要存在于植物中，在植物逆境响应中发挥着重要作用。大量的研究表明，AP2/ERF 型转录因子是植物生长发育和激素调节的重要调控因子，如控制花的生长、发育和衰老^[7]，小穗分生组

织的命运^[8]，根的萌生和发育^[9]，叶的大小^[10]，籽粒发育^[11]，果实发育和成熟等^[12]。大豆 *GmERF057* 在受到激素（SA、JA、ABA）和非生物胁迫（盐、干旱）处理后，其表达会显著增加，并且在烟草中过表达该基因还可以提高植物的耐盐性^[13]。在盐胁迫下，过表达 *PagERF072* 的转基因杨树具有较高的耐盐性，转基因杨树的过氧化物酶（POD）、超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（CAT）活性显著高于野生型杨树，而丙二醛（MDA）含量则表现出相反的趋势^[14]。在干旱和盐胁迫下，过表达 *SlERF.B1* 番茄明显萎焉，脯氨酸含量显著低于对照，丙二醛含量显著高于对照，而基因沉默株系恰好相反，说明 *SlERF.B1* 负调控番茄的抗旱和耐盐性^[15]。

木薯（*Manihot esculenta* Crantz）又名树薯、木番薯，是大戟科木薯属双子叶植物，因其根部富含淀粉而被广泛种植。在南美洲、非洲和亚洲的热带地区，约有 10 亿人以木薯为生存的能量来源^[16]。已有研究发现逆境胁迫导致木薯的品质和产量受到一定的影响^[17]。但是，*ERF* 基因在木薯

逆境胁迫中的研究还很少, 主要集中于木薯作为饲料的价值研究^[18]、采后生理性变质的研究^[19-20]和木薯抵抗病虫害的研究^[21]。因此, 本研究从华南 8 号 (SC8) 木薯中克隆获得 *MeERF127* 基因, 对其进行生物信息学分析、亚细胞定位、转录活性和表达模式分析, 构建基因编辑载体获得 *MeERF127* 基因编辑木薯, 并研究 *MeERF127* 基因编辑木薯在干旱、盐和低温胁迫下的形态学和生理学特征, 为探究 *MeERF127* 转录因子在木薯抗逆中的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 为华南 8 号 (SC8) 木薯品种, 来源于国家木薯种质资源圃。取生长于组培瓶中 50 d 的木薯组培苗, 一部分用 300 mmol/L 甘露醇溶液、400 mmol/L NaCl 溶液浸没木薯的根, 另外一部分置于 4 °C 冰箱, 处理 0、12、24、48 h 取材, 将其中一半样品立即置于液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱待用, 另外一半取材后直接进行氧化产物检测和染色。每个样品 3 个重复。

DH5 α 大肠杆菌菌株、AH109 酵母菌株、LBA4404 菌株和 GV3101 菌株均购自上海唯地生物技术有限公司; pMD19-T 载体、pCambia1300-GFP 载体、pGBKT7 诱饵载体、基因编辑载体由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *MeERF127* 基因克隆和序列结构分析 从木薯基因组数据网站 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 下载 *MeERF127* (Manes. 15G066800) 的序列, 设计该基因的克隆引物 (*MeERF127*-F: ATGAGGAGAGGAAGGGGAG, *MeERF127*-R: TTAAGCCATAGAGCAGTAC)。以 SC8 木薯组培苗 cDNA 为模板, PCR 扩增 *MeERF127* 编码区片段, 反应程序: 94 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物切胶回收, 得到纯化产物连接 pMD19-T 载体并转化 DH5 α 大肠杆菌感受态, PCR 检测挑选阳性菌落送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。使用 DNAMAN 软件将测序成功的木薯 *MeERF127* 基因序列所对应的蛋白序列与其他物种中已鉴定的且同源性较高的 AP2/ERF 蛋白进行序列比对, 分析其保守结构。

1.2.2 *MeERF127* 亚细胞定位分析 以测序成功的 *MeERF127*-19T 载体为模板, 采用同源重组法将 *MeERF127* 基因构建到 pCambia1300-GFP 载体, 构建 pCambia1300-*MeERF127*-GFP 重组质粒 [*MeERF127*-F (*Sal* I): tgatacatatgcccgctgcacATGAGGAGAGGAAGGGGAG, *MeERF127*-R (*Bam*H I): acgtcgtatgggtaggatccTTAAAGCCATAGAGCAGTACAATG], 然后转入农杆菌 GV3101。成功转化的菌株在 YEP (50 mg/L 利福平+50 mg/L 卡那霉素) 液体培养基中过夜培养至 OD₆₀₀ 为 1.0, 5000 r/min 离心 10 min 去上清, 用烟草侵染液重悬菌体至 OD₆₀₀=0.6, 室温避光放置 2 h 后用注射器缓慢注入烟草叶片背面进行瞬时侵染表达, 注射后的烟草于 25 °C 培养 2~3 d 后取材制片, 在激光共聚焦显微镜下进行荧光观察。

1.2.3 *MeERF127* 转录活性分析 以测序成功的 *MeERF127*-19T 载体为模板, 采用同源重组法将 *MeERF127* 基因构建到酵母双杂交载体 pGBKT7 上, 构建 pGBKT7-*MeERF127* 重组质粒 [*MeERF127*-F (*Bam*H I): ggccgaattcccggggagtcATGAGGAGAGGAAGGGGAG, *MeERF127*-R (*Sal* I): tgcggccgctgcaggtcgacTTAAAGCCATAGAGCAGTACAATG]。将 pGBKT7-*MeERF127*、pGBKT7-p53+pGADT7-*largeT* (阳性对照) 和 pGBKT7 (阴性对照) 分别转化酵母感受态 AH109。涂布于 SD/-Trp 固体培养基, 待其长出菌斑, 随机挑选 10 个菌斑进行阳性检测。转化成功的菌液在 SD/-Trp 液体培养基中培养至 OD₆₀₀=0.6 时, 各取 5 μ L 菌液点到含 10 mg/mL X- α -gal 的 SD/-Trp 固体培养基上, 30 °C 培养 2 d 后观察菌落生长情况及菌落颜色, 以此判断 *MeERF127* 蛋白的转录活性。

1.2.4 *MeERF127* 基因在各组织器官和块根不同发育时期的表达分析 根据已获得的 SC8 木薯 9 个组织器官 (脆性愈伤、体胚、块根、块根韧皮部、块根木质部、须根、茎、成熟叶和嫩叶) 的转录组测序结果, 提取 *MeERF127* 的 FPKM 值 (每千个碱基的转录每百万映射读取的片段), 对其进行不同组织的表达分析。根据已获得的 SC8 木薯种植后 5 个发育时期 (S₁: 块根形成期, 80 d; S₂: 块根膨大前期, 130 d; S₃: 块根膨大后期, 180 d; S₄: 块根成熟前期, 230 d; S₅: 块根成熟后期, 80 d) 木薯块根的转录组测序结果, 提取 *MeERF127* 的 FPKM 值, 对其进行木薯块根不同发育时期的表达分析。

1.2.5 *MeERF127* 在干旱、盐、低温胁迫下的表达分析 选取生长状态良好且长势一致的 8~10 周 SC8 木薯组培苗, 分别用 300 mmol/L 甘露醇 (干旱胁迫)、400 mmol/L NaCl 溶液 (盐胁迫) 和 4 °C (低温胁迫) 处理 0、12、24、48 h 后取材, 每个样品取 3 个重复。提取 RNA 并逆转录成 cDNA。设计 *MeERF127* 定量 PCR 引物 (qPCR-F: CTG-TGGAGTCATTACAGCGGT, qPCR-R: CACAAAGACGACGACGATGC), 以 *Tublin* 为内参基因 (Tublin-F: ATGCGGTTCTTGATGTTGTTC, Tublin-R: TCGGTGAAGGGAATACAGAGA), 对 *MeERF127* 基因进行荧光定量 PCR 检测。反应体系: Mon-AmpTM ChemoHS qPCR Mix 5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 上/下游引物各 0.2 μ L, H₂O 3.6 μ L。反应程序: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 58 °C 10 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 15 s, 95 °C 15 s 作溶解曲线。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对表达量, 每个样品 3 次重复, 利用 SPSS 软件进行数据显著性分析, 用 Graphpad 软件作图。

1.2.6 *MeERF127* 基因编辑木薯的转化及鉴定 参照耿沙等^[22]方法, 利用 CRISPR-P 2.0 网站设计 *MeERF127* 基因的靶点, 送金斯瑞生物科技有限公司合成 pCambia1301-Cas9-*MeERF127*-gRNA 基因编辑载体, 然后转入 LBA4404 农杆菌并转化 SC8 木薯脆性愈伤组织。待转基因木薯出芽后, 用 15 mg/L 潮霉素进行生根筛选, 再选取生根苗的叶片进行 PCR 分子检测是否转化成功。用叶片裂解液提取叶片 DNA 后用 2 $\times$ M5 Hiper 超光速 mix 进行 PCR, 所用引物为 Cas 9 通用检测引物 (Cas 9-F: GCTGGGCCGTGATCACCGAC, Cas 9-R: CACTCTCAGGATGTCGCTCAGC), PCR 反应程序如下: 95 °C 3 min; 94 °C 25 s, 59 °C 25 s, 72 °C 50 s, 32 个循环; 72 °C 5 min。提取阳性株系的基因组 DNA, 用 *MeERF127* 基因靶点引物 (target-F: GAGGAGAGGAAGGGGAGGAG, target-R: ATCTCAGCGGCGTATCTTCC) 扩增 *MeERF127* 基因靶点区域上、下游 200 bp 的序列, 用 Hi-TOM 接头引物 (F: GGAGTGAGTACGGTGTGC, R: GAGTTGGATGCTGGATGG) 进行新一轮 PCR 后送至广州诺禾生物科技有限公司进行高通量测序, 检测靶点是否成功编辑。

1.2.7 *MeERF127* 基因编辑木薯胁迫后生理特性研究 选取生长状态良好且长势一致的 8~10 周的 *MeERF127* 基因编辑木薯组培苗和未转基因的 SC8 木薯组培苗 (对照, WT), 分别用 300 mmol/L

甘露醇、400 mmol/L NaCl 溶液和 4 °C 低温处理 48 h。参照苏州科铭生物技术有限公司生理指标测定试剂盒的操作步骤, 检测胁迫处理前后各木薯株系叶片的超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 的酶活, 丙二醛 (MDA)、脯氨酸 (Pro) 的含量, 用酶标仪测定吸光值。每个样品设 3 次重复。

1.2.8 超氧阴离子染色 取 1.2.7 中干旱、盐和低温胁迫处理前后的 *MeERF127* 基因编辑木薯组培苗和未转基因的 SC8 木薯组培苗叶片, 洗净后浸没于 NBT 染色液 (武汉赛维尔生物科技有限公司) 中, 室温避光染色 12 h。取出叶片用纯净水洗净后滤纸吸干, 置于 95%乙醇中 40 °C 处理 12 h, 让叶片中的叶绿素溶于酒精, 每隔 2~3 h 更换 1 次 95%乙醇。当叶片中的叶绿素被全部去除后取出木薯叶片, 用纯净水洗净吸干后置于 NBT 样本保存液 30 min 即可取出拍照。每个样本取 6~8 个叶片进行染色。

1.2.9 逆境胁迫相关基因的表达分析 取 1.2.7 中干旱、盐和低温胁迫处理前后的 *MeERF127* 基因编辑木薯组培苗和未转基因的 SC8 木薯组培苗, 提取 RNA, 逆转录成 cDNA。以 *Tublin* 为内参基因, 对逆境响应基因 *MeSOD*、*MeWRKY31* 进行荧光定量 PCR。*MeSOD* 引物为 qMeSOD-F (CGCTATGGAGAAGGGCGATT) 和 qMeSOD-R (GTCAATAGCCCGAGCGAGAG), *MeWRKY31* 引物为 qMeWRKY31-F (TCTCAAGAAACGGTGCCCTC) 和 qMeWRKY31-R (TTGTGGGCATTAGTGCTGGT)。反应体系: MonAmpTM ChemoHS qPCR Mix 5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 上/下游引物各 0.2 μ L, H₂O 3.6 μ L。反应程序: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 58 °C 10 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 15 s, 95 °C 15 s 作溶解曲线。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对表达量, 每个部位进行 3 次重复。利用 SPSS 软件进行差异显著性分析, 并采用 Graphpad 软件制图。

2 结果与分析

2.1 *MeERF127* 基因的克隆和序列结构分析

为克隆木薯 *MeERF127* (Manes.15G066800) 基因, 本研究提取 SC8 木薯总 RNA 逆转录得到 cDNA 为模板, PCR 扩增 *MeERF127* 基因 CDS 片段, 获得总长为 711 bp 的 *MeERF127* 基因 (图 1)。

将木薯 *MeERF127* 与其他物种中已鉴定的且同源性较高的 *AP2/ERF* 基因的蛋白序列进行比

将植后 180 d 的 SC8 木薯的脆性愈伤、体胚、块根、块根韧皮部、块根木质部、须根、苓、嫩

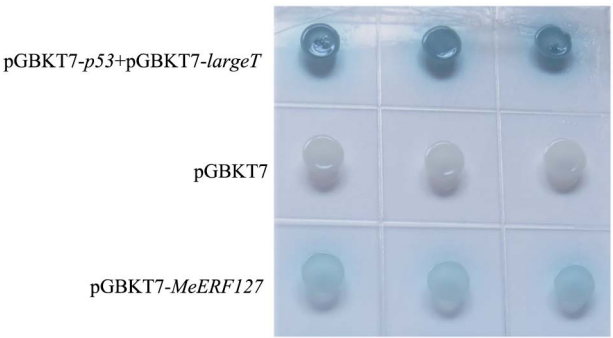


图 4 *MeERF127* 的转录激活活性
Fig. 4 Transcriptional activity of *MeERF127*

叶和成熟叶等 9 个组织器官进行转录组测序，发现 *MeERF127* 在各组织器官中均有表达，在茎中的表达量最高，其次为嫩叶和块根木质部，在愈伤组织中的表达量最低（图 5）。

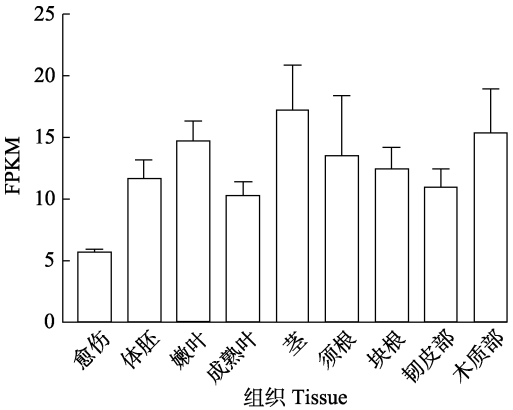
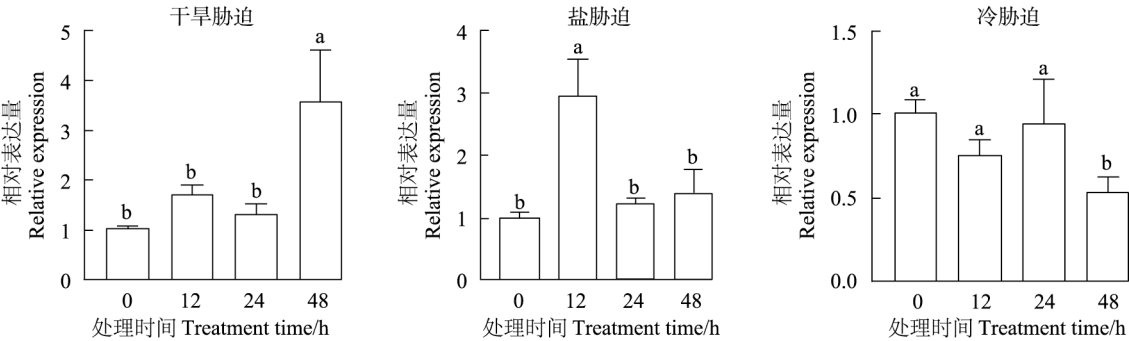


图 5 *MeERF127* 在木薯不同组织器官中的表达分析
Fig. 5 Expression analysis of *MeERF127* in different cassava tissues

2.5 *MeERF127* 在木薯块根发育过程中的表达模式分析

对植后不同发育时期的木薯块根进行表达分



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between different treatment time in the same treatment ($P<0.05$).

图 7 *MeERF127* 在干旱、盐和低温胁迫下的表达模式

Fig. 7 Expression analysis of *MeERF127* under drought, salt and cold stress

析，发现 *MeERF127* 在块根发育前期如形成期（ S_1 ）和膨大前期（ S_2 ）的表达量较高，在块根发育后期表达水平趋于平缓（图 6）。推测 *MeERF127* 主要在木薯块根发育的前期发挥作用，促进木薯块根的形成和膨大。

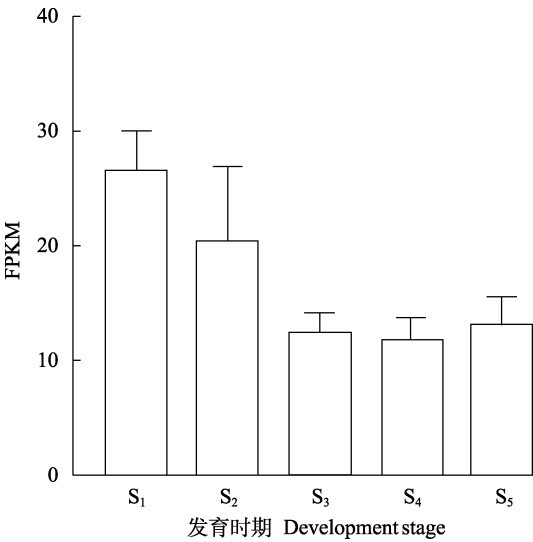


图 6 *MeERF127* 在木薯块根发育过程中的表达分析
Fig. 6 Expression analysis of *MeERF127* in cassava storage roots development

2.6 *MeERF127* 在干旱、盐和低温胁迫下的表达分析

为了研究干旱、盐和低温胁迫是否会影响 *MeERF127* 在木薯中的表达，采用实时荧光定量 PCR 分析 *MeERF127* 基因在干旱、盐和低温胁迫下的表达情况。结果如图 7 所示，在干旱胁迫 48 h 后，*MeERF127* 的表达显著上升；在盐胁迫 12 h 后，*MeERF127* 表达量上调至显著水平；在 4℃ 低温胁迫后，*MeERF127* 的表达变化不大，仅在 48 h 时稍有下降。

2.7 *MeERF127* 基因编辑木薯苗的获得与鉴定

根据 *MeERF127* 基因序列信息在 CRISPR-P 2.0 在线软件上设计 *MeERF127* 的基因编辑靶点构建 PCAMBIA1301-Cas9-*MeERF127*-gRNA 基因编辑载体 (图 8), 转入 LBA4404 农杆菌并转化 SC8 木薯脆性胚性愈伤组织, 诱导出芽成苗后进行潮霉素生根筛选, 提取生根阳性苗叶片 DNA 用 Cas9 检测引物进行 PCR 分子检测, 成功获得

带有编辑表达框的阳性株系 (图 9)。

为检测获得的转基因阳性株系体内发生 *MeERF127* 的成功编辑, 分别提取 5 个阳性株系基因组 DNA 进行 Hi-TOM 高通量测序。测序结果如表 1 所示, 与 SC8 对照相比, 5 个株系均为缺失 22 个碱基和 3 个碱基的杂合突变, 且 22 个碱基缺失的概率远大于 3 个碱基缺失, 说明成功得到 *MeERF127* 基因编辑植株。

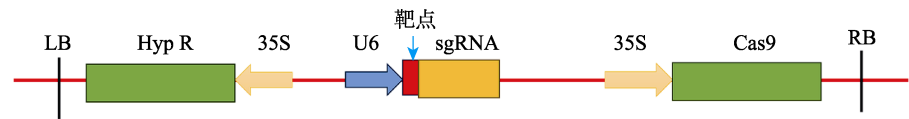
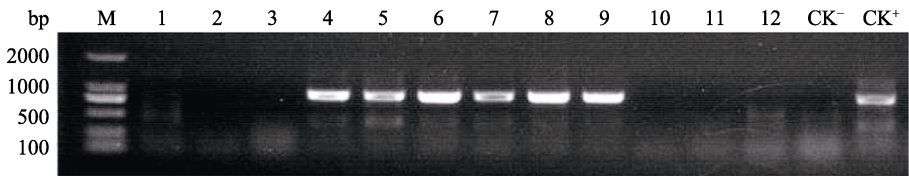


图 8 pCambia1301-Cas9-*MeERF127*-gRNA 载体结构示意图
Fig. 8 Schematic diagram of pCambia1301-Cas9-*MeERF127*-gRNA vector structure



M: DL2000 DNA marker; 1~12: 转基因株系。
M: DL2000 DNA marker; 1~12: Transgenic strains.

图 9 *MeERF127* 基因编辑木薯的 PCR 检测
Fig. 9 PCR detection of *MeERF127* gene edited cassava

表 1 *MeERF127* 基因编辑木薯的 Hi-TOM 测序结果
Tab. 1 Hi-TOM sequencing results of *MeERF127* gene edited cassava

株系	靶点附近序列	Reads 数量	Reads 比率	突变类型	突变碱基
Strain	Sequence near the target site	Number of reads	Ratio of reads/%	Mutation type	Mutated base
WT	CACTATTGCAGCTGAGCAGGTCGTGG	5069	96.79		
1#	-----G TGG	2022	62.99	22D	CACTATTGCAGCTGAGCAGGTC
	TATTGCAGCTGAGC---TCGTGG	1188	37.01	3D	AGG
2#	-----G TGG	706	57.96	22D	CACTATTGCAGCTGAGCAGGTC
	TATTGCAGCTGAGC---TCGTGG	512	42.04	3D	AGG
3#	-----G TGG	283	63.17	22D	CACTATTGCAGCTGAGCAGGTC
	TATTGCAGCTGAGC---TCGTGG	165	36.83	3D	AGG
4#	-----G TGG	199	61.04	22D	CACTATTGCAGCTGAGCAGGTC
	TATTGCAGCTGAGC---TCGTGG	127	38.96	3D	AGG
5#	-----G TGG	710	66.11	22D	CACTATTGCAGCTGAGCAGGTC
	TATTGCAGCTGAGC---TCG TGG	364	33.89	3D	AGG

注: 黄色区域代表 PAM 区, --代表缺失的碱基; D: 缺失。
Note: The yellow areas are the PAM areas; -- represent the deleted bases; D: Deletion.

2.8 *MeERF127* 基因编辑木薯在干旱、盐和低温胁迫下的生理特性研究

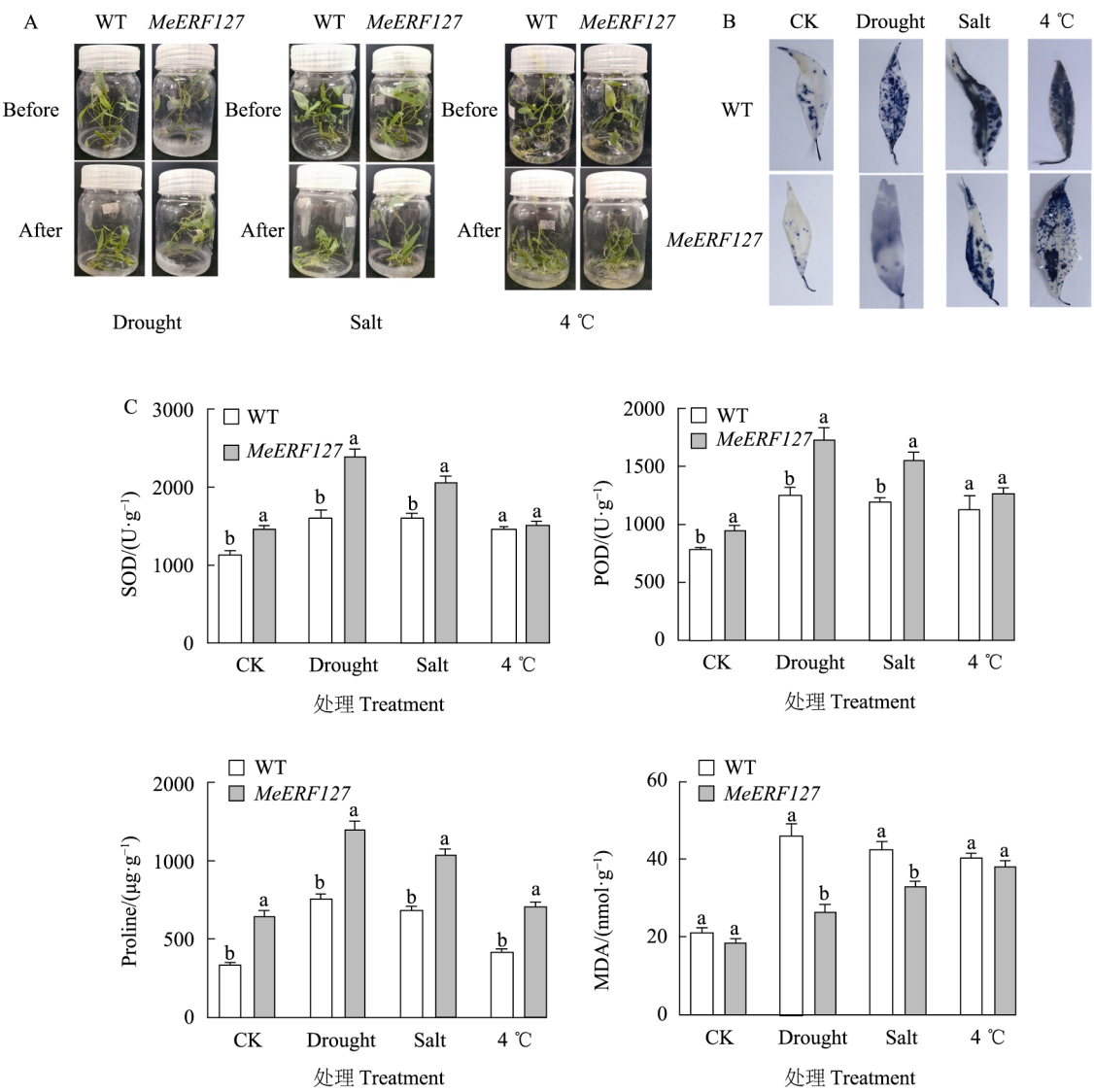
为了研究 *MeERF127* 基因编辑木薯对干旱、盐碱和低温胁迫的耐受性, 以 SC8 木薯为对照 (WT), 对 *MeERF127* 基因编辑木薯用 300 mmol/L 甘露醇、400 mmol/L NaCl 溶液和 4 ℃ 低温处理 48 h, 观察

其表型并测量其生理指标。发现在干旱和盐胁迫后, 对照 SC8 木薯植株发生明显萎焉, 叶片下垂, 而 *MeERF127* 基因编辑木薯未出现萎焉; 在低温胁迫下, 二者均出现萎焉 (图 10A)。

NBT 染色后植株呈现的蓝色深浅代表植株的超氧阴离子含量, 可用来判断植株的受损伤程度,

蓝色越深说明超氧阴离子含量越高，植株受损伤度越高。干旱、盐和低温胁迫处理后的木薯叶片的 NBT 染色结果显示，干旱和盐处理后，*MeERF127* 基因编辑木薯较对照组叶片颜色更浅，说明 *MeERF127* 基因编辑木薯的超氧阴离子含量更低，受损伤程度更小，可能更抗旱和耐盐。在低温处理后，*MeERF127* 基因编辑木薯和对照组的颜色深浅差别不大，说明受损伤程度大致相同，*MeERF127* 基因编辑木薯对低温胁迫无响应（图 10B）。进一步测定胁迫前后各株系的生理指标发现

（图 10C），在正常条件下，*MeERF127* 基因编辑木薯的 SOD、POD 活性和 Pro 含量均显著高于野生型木薯，MDA 含量则差异不显著。在干旱和盐胁迫下，*MeERF127* 基因编辑木薯的 SOD、POD 活性和 Pro 含量均显著高于野生型木薯，而 MDA 含量显著低于野生型木薯；在低温胁迫下，基因编辑木薯的 SOD、POD 酶活和 MDA 含量与野生型木薯差异不显著。以上结果说明，*MeERF127* 基因编辑木薯对于干旱和盐胁迫有一定的耐受性，而对低温胁迫不敏感。



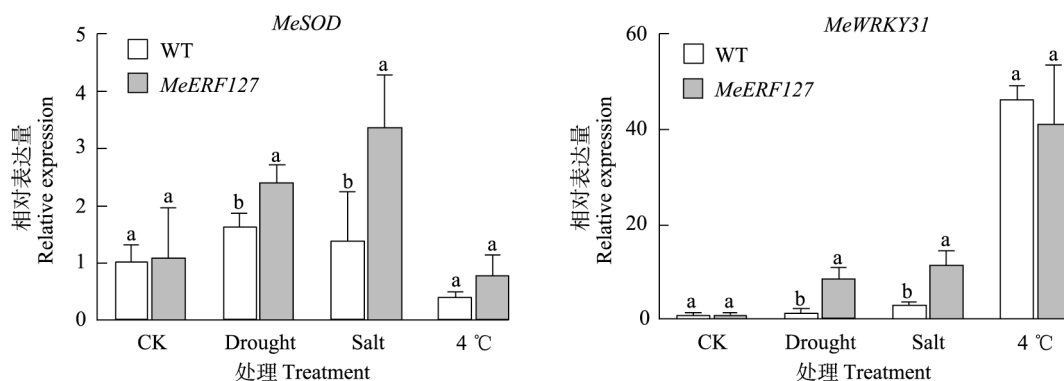
A: 胁迫处理前后表型观察；B: 胁迫处理前后 NBT 染色；C: 胁迫处理前后生理指标测定；不同小写字母表示基因编辑株系与对照株系在相同处理中差异显著（ $P<0.05$ ）。
A: Phenotypic observation before and after stress treatment; B: NBT Staining of before and after stress treatment; C: Physiological parameter measurements before and after stress treatment; Different lowercase letters indicate significant difference between gene edited cassava and SC8 in the same treatment ($P<0.05$).

图 10 干旱、盐和低温胁迫下 *MeERF127* 基因编辑木薯的表型和生理指标测定
Fig. 10 Phenotype and physiological characteristics of *MeERF127* gene edited cassava under drought, salt and cold stress

2.9 胁迫响应基因在 *MeERF127* 基因编辑木薯中的表达分析

为了进一步阐明 *MeERF127* 基因响应胁迫的具体机制,选取 *SOD* 和 *WRKY31* 这 2 个逆境响应基因,分析其在 *MeERF127* 基因编辑木薯受到干旱、盐和低温胁迫后的表达变化情况。结果如图 11 所示,在干旱和盐胁迫后,胁迫响应基因 *SOD* 和

WRKY31 在 *MeERF127* 基因编辑木薯中的表达量显著高于野生型;而在低温胁迫时二者差异不显著,表明 *MeERF127* 可能调控这些基因以响应干旱和盐胁迫。综上,基因编辑 *MeERF127* 提高了木薯的抗旱性和耐盐性,但对低温胁迫无响应。本研究结果为揭示 *MeERF127* 基因在木薯响应干旱和盐胁迫过程中的调控作用提供理论依据。



不同小写字母表示基因编辑株系与对照株系在相同处理中差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences between gene edited cassava and SC8 in the same treatment ($P < 0.05$).

图 11 胁迫响应基因在 *MeERF127* 基因编辑木薯的表达分析

Fig. 11 Expression analysis of stress response genes in *MeERF127* gene edited cassava

3 讨论

AP2/ERF 家族是包含 AP2/ERF 型 DNA 结合域的大型转录因子家族,该结构域首次在拟南芥同源异型基因 *APETALA2*^[23] 中被发现。木薯 ERF 家族被鉴定出 155 个成员,本研究的 *MeERF127* 基因是其中之一。AP2/ERF 家族中的 ERF 亚族存在一个 AP2/ERF 结构域,其 N 端和 C 端分别包含 YRG 和 RAYD 两个保守结构元件,且第 14 位和第 19 位的氨基酸分别是丙氨酸和天冬氨酸^[24],本研究从华南 8 号木薯中成功克隆获得的 *MeERF127* 基因的蛋白结构和 ERF 亚族一致。ERF 家族作为转录因子,大多定位于细胞核^[25],但也有定位于细胞质^[26]和叶绿体^[27]的 ERF 基因。本研究发现 *MeERF127* 定位于细胞核,转录活性分析证实其具有转录活性,说明 *MeERF127* 是一个定位于细胞核且具有转录活性的 ERF 转录因子。

已有研究表明,AP2/ERF 型转录因子在植物生长发育过程中扮演重要角色。HIROTA 等^[28]从拟南芥中鉴定出一个 AP2/ERF 家族基因 *PUCHI*,该基因参与侧根的萌生和发育。杨树 *PtaERF* 基因在韧皮部组织中表达,对杨树茎的发育具有潜在作用^[29]。本研究中的 *MeERF127* 在茎中的表达最高,在叶片和木质部也有较高的表达。并且在

块根形成期高表达,推测 *MeERF127* 可能参与木薯茎、叶和块根的生长发育。

干旱、盐碱和低温等非生物胁迫严重影响作物的生长发育并限制其产量^[30]。大量研究表明 AP2/ERF 转录因子在植物逆境响应中发挥着重要作用。例如,番茄 ERF 蛋白 JERF1 通过增加渗透脯氨酸的合成显著提高抗旱性^[31]。水稻 *OsERF922* 通过破坏 Na^+/K^+ 稳态和介导 ABA 信号通路负调控植物的耐盐性^[32]。水稻 *OsERF101* 过表达植株中脯氨酸含量和过氧化物酶活性的增加有助于提高水稻的耐旱性^[33]。刚毛柞柳 (*Tamarix hispida*) 中 *ThWRKY2* 基因在干旱胁迫下启动乙烯响应因子 *ThERF1* 基因的表达,负向调控包括干旱胁迫在内的非生物胁迫^[34]。木薯 *MeERF5* 基因能快速响应干旱、盐和低温胁迫^[35]。本研究中 *MeERF127* 基因在干旱和盐胁迫处理后表达上调,基因编辑 *MeERF127* 提高了木薯的抗旱性和耐盐性,胁迫响应基因 *SOD* 和 *WRKY31* 在 *MeERF127* 基因编辑木薯中的表达量显著高于野生型,推测 *MeERF127* 可能通过调控这些基因来参与调节木薯的抗旱和耐盐能力。本研究为揭示 AP2/ERF 基因在木薯响应干旱和盐胁迫过程中的调控作用提供理论依据,具体的调控机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [2] 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 M F, ZHANG C, WU Z Y. Research progress on the structure and function of plant transcription factor AP2/ERF family proteins[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(12): 11-26. (in Chinese)
- [3] RASHID M, HE G Y, YANG G X, HUSSAIN J, XU Y. AP2/ERF transcription factor in rice: genome-wide canvas and syntenic relationships between monocots and eudicots[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2012, 8: 321-355.
- [4] FENG K, HOU X L, XING G M, LIU J X, DUAN A Q, XU Z S, LI M Y, ZHUANG J, XIONG A S. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40: 750-776.
- [5] MAGAR M M, LIU H, YAN G J. Genome-wide analysis of AP2/ERF superfamily genes in contrasting wheat genotypes reveals heat stress-related candidate genes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 853086.
- [6] HONG Y, XIAO Y, SONG N, ZHU S, ZHAO R, LI K, GENG M, YU X, WANG H, XIA W. Identification and characterization of *MeERF* genes and their targets in pathogen response by cassava (*Manihot esculenta*)[J]. *The Crop Journal*, 2021, 9(5): 1145-1153.
- [7] LIU J, LI J, WANG H. Identification and expression analysis of ERF transcription factor genes in petunia during flower senescence and in response to hormone treatments[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(2): 825-840.
- [8] PARK M R, YUN K Y, MOHANTY B. Supra-optimal expression of the cold-regulated *OsMyb4* transcription factor in transgenic rice changes the complexity of transcriptional network with major effects on stress tolerance and panicle development[J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 33(12): 2209-2230.
- [9] KITOMI Y K, KITANO H, INUKAI Y. Molecular mechanism of crown root initiation and the different mechanisms between crown root and radicle in rice[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(9): 1270-1278.
- [10] MARSCH-MARTINEZ N, GRECO R, BECKER J D. Bolita, an *Arabidopsis* AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62(6): 825-843.
- [11] SOARES V L, RODRIGUES S M, DE OLIVEIRA T M. Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(2): 1329-1340.
- [12] HIEL J, WEIER D, SREENIVASULU N. Different hormonal regulation of cellular differentiation and function in nucellar projection and endosperm transfer cells: a microdissection-based transcriptome study of young *barley* grains[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1436-1452.
- [13] ZHANG G, CHEN M, CHEN X, XU Z, GUAN S, LI L C, LI A, GUO J, MAO L, MA Y. Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(15): 4095-4107.
- [14] ZHANG X M, CHENG Z H, YAO W J, GAO Y, FAN G F, GUO Q, ZHOU B R, JIANG T B. Overexpression of PagERF072 from poplar improves salt tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10707.
- [15] WANG Y Q, XIA D N, LI W Q, CAO X Y, MA F, WANG Q Q. Overexpression of a tomato AP2/ERF transcription factor SIERF.B1 increases sensitivity to salt and drought stresses[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 304: 111332.
- [16] LI S, CUI Y, ZHOU Y. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(8): 2282-2290.
- [17] DANIEL L Z J, TAYLOR N J, BART R. Engineering disease-resistant cassava[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2019, 11(11): 1-2.
- [18] 喻珊, 王友印, 邢晓东, 李开绵, 王志勇, 欧文军. 木薯饲料化应用研究进展[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(12): 2369-2383.
- YU S, WANG Y Y, XING X D, LI K M, WANG Z Y, OU W J. Research progress on feed application of cassava[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(12): 2369-2383. (in Chinese)
- [19] 安飞飞, 齐剑雄, 陈松笔, 罗秀芹, 蔡杰, 薛晶晶. 木薯查尔酮合酶 MeCHS 基因家族特征与表达分析[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(12): 2384-2391.
- AN F F, QI J X, CHEN S B, LUO X Q, CAI J, XUE J J. Characteristics and expression analysis of chalcone synthase MeCHS family in cassava[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(12): 2384-2391. (in Chinese)
- [20] 曾坚, 吴伟珊, 谢彩虹, 沈梓欣, 叶晓雪, 颜彦, 李冰, 陈志晟, 彭红元, 胡伟, 曾力旺. 木薯 *MeERF1.2* 基因克隆及表达分析[J]. *福建农业学报*, 2023, 38(4): 410-416.
- ZENG J, WU W S, XIE C H, SHEN Z X, YE X X, YAN Y, LI B, CHEN Z S, PENG H Y, HU W, ZENG L W. Cassava *MeERF1.2* gene cloning and expression analysis[J]. *Fu-*

- jian Journal of Agricultural Sciences, 2023, 38(4): 410-416. (in Chinese)
- [21] 刘琳玉, 赵平娟, 符艳, 刘志昕, 任艳利, 张秀春. 木薯花叶病毒 AC4 蛋白与 AtPARN 互作研究[J]. 热带作物学报, 2024, 45(1): 197-204.
- LIU L Y, ZHAO P J, FU Y, LIU Z X, REN Y L, ZHANG X C. The interaction between *Cassava mosaic virus* AC4 protein and AtPARN[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(1): 197-204. (in Chinese)
- [22] 耿沙, 张建禹, 王晓彤, 任思杨, 毋志浩, 姚远, 李瑞梅, 郭建春, 刘姣, 罗丽娟. 基于 CRISPR/Cas9 技术创制木薯 *MeSTP7* 和 *MeSTP15* 双基因突变体[J]. 热带作物学报, 2022, 43(3): 463-472.
- GENG S, ZHANG J Y, WANG X T, REN S Y, WU Z H, YAO Y, LI R M, GUO J C, LIU J, LUO L J. Construction of *MeSTP7* and *MeSTP15* double mutants in cassava based on CRISPR/Cas9 technology[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(3): 463-472. (in Chinese)
- [23] JOFUKU K D, BOER B, MONTAGU M V, OKAMURO J K. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*[J]. Plant Cell, 1994, 6(9): 1211-1225.
- [24] 邵文靖, 敖特根白音, 郎明林. AP2/ERF 转录因子对植物非生物胁迫的应答机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2020, 18(15): 4981-4988.
- SHAO W J, AO T G B Y, LANG M L. Research advances on the mechanism of AP2/ERF transcriptional factors in response to abiotic stresses in plants[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(15): 4981-4988. (in Chinese)
- [25] 侯晓婉, 胡伟, 徐碧玉, 张鲁斌, 金志强. 巴西蕉 2 个 ERF 转录因子基因的克隆及功能研究[J]. 果树学报, 2017, 34(7): 806-816.
- HOU X W, HU W, XU B Y, ZHANG L B, JIN Z Q. Cloning and characterization of two ERF transcription factor genes in Brazil banana[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(7): 806-816. (in Chinese)
- [26] 鲁琳, 赵希胜, 刘桂云, 刘维东, 王艳婷, 吴玲莉, 任学良, 鲁黎明. 花烟草 *NaERF1* 基因的克隆及在非生物胁迫下的表达模式分析[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 1-8.
- LU L, ZHAO X S, LIU G Y, LIU W D, WANG Y T, WU L L, REN X L, LU L M. Cloning and expression profile analysis of *NaERF1* under abiotic stresses in *Nicotiana glauca*[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 1-8. (in Chinese)
- [27] 任昂彦, 孔英珍. 普通烟草 ERF 转录因子亚家族成员鉴定及表达模式分析[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(1): 18-25.
- REN A Y, KONG Y Z. Genome-wide identification and expression pattern analysis of the ERF gene subfamily in *Nicotiana tabacum*[J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(1): 18-25. (in Chinese)
- [28] HIROTA A, KATO T, FUKAKI H, AIDA M, TASAKA M. The auxin-regulated AP2/EREBP gene *PUCHI* is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2007, 19(7): 2156-2168.
- [29] VAN R D, PESQUET E, CLOQUET S. Molecular changes associated with the setting up of secondary growth in aspen[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(418): 2211-2227.
- [30] MILLER G, SUZUKI N, CIFTCI-YILMAZ S, MITTLER R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses[J]. Plant Cell Environ, 2010, 33(4): 453-467.
- [31] HANG Z, LI F, LI D, ZHANG H W, HUANG R F. Expression of ethylene response factor *JERF1* in rice improves tolerance to drought[J]. Planta, 2010, 232(3): 765-774.
- [32] LIU D, CHEN X, LIU J, YE J C, GUO Z J. The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10): 3899-3911.
- [33] JIN Y, PAN W Y, ZHENG X F, CHENG X, LIU M M, MA H, GE X C. OsERF101, an ERF family transcription factor, regulates drought stress response in reproductive tissues[J]. Plant Molecular Biology, 2018, 98(1/2): 51-65.
- [34] WANG J, TAO F, AN F, ZOU Y, TIAN W, CHEN X, XU X, HU X. Wheat transcription factor *TaWRKY70* is positively involved in high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(5): 649-661.
- [35] 吴红漫, 林世扬, 颜彦, 胡伟. 木薯 ERF 转录因子基因 *MeERF5* 克隆及表达分析[J]. 南方农业学报, 2022, 53(9): 2510-2517.
- WU H M, LIN S Y, YAN Y, HU W. Cloning and expression analysis of cassava ERF transcription factor gene *MeERF5* [J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(9): 2510-2517. (in Chinese)