

芒果 *MiERF3* 基因的克隆及表达分析

窦雅琪^{1,2}, 王倩^{1,2}, Muhammad Muzammal Aslam^{1,2}, 邵远志^{1,3}, 李雯^{1,2*}

1. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572025; 2. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 3. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228

摘要: 芒果 (*Mangifera indica* L.) 是海南省重要的热带水果之一, 是典型的呼吸跃变型水果, 乙烯在芒果后熟过程中扮演着至关重要的角色。ERF 转录因子是乙烯信号通路的关键下游成分, 作为最大的转录因子家族之一, 起到调节信号传导和生理反应的作用。为了探究 ERF 转录因子对采后芒果果皮色泽的影响, 本研究以贵妃芒果为研究对象, 通过 PCR 克隆得到 *MiERF3* 基因, 利用生物信息学方法分析 *MiERF3* 的基本理化特征、保守结构域、蛋白质结构、进化关系等, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分别对 *MiERF3* 基因在芒果不同组织部位和采后贮藏时期的特异性表达进行分析。结果表明: *MiERF3* 基因全长 717 bp, 编码 238 个氨基酸, 蛋白分子式为 $C_{1130}H_{1763}N_{339}O_{355}S_9$, 分子量为 26.066 kDa, 理论等电点为 8.62, 带 30 个正电残基和 27 个负电残基, 蛋白具有亲水性, 结构不稳定; *MiERF3* 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 61.67% 的无规卷曲为主, 还含有 27.75% 的 α -螺旋、3.96% 的 β -折叠、6.61% 的延长链, 其三维结构模型包含有 3 个 β -折叠和 1 个 α -螺旋, 符合 AP2 结构域的特征; 多序列比对和 motif 分析结果表明, *MiERF3* 蛋白属于 ERF 亚家族成员; 系统进化树分析结果表明, 与 *MiERF3* 蛋白亲缘关系最近的是同为漆树科植物的阿月浑子 PvERF3-like; 洋葱亚细胞定位及转录自激活检测结果显示, *MiERF3* 蛋白定位于细胞核且具有转录自激活活性; 实时荧光定量分析表明, *MiERF3* 基因的表达量在不同芒果部位表达情况不同, 在芒果果实阳面果皮的表达量最高, 且在芒果贮藏期间, 其表达量呈明显的先增后减的趋势, 故而推测 *MiERF3* 在果实成熟转色过程中起正调控作用。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; 表达分析

中图分类号: S31 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *MiERF3* Gene in Mango

DOU Yaqi^{1,2}, WANG Qian^{1,2}, Muhammad Muzammal Aslam^{1,2}, SHAO Yuanzhi^{1,3}, LI Wen^{1,2*}

1. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Mango (*Mangifera indica* L.) is an important tropical fruit in Hainan province. Ethylene plays a vital role in the ripening process of mango. ERF transcription factors are key downstream components of the ethylene signaling pathway, and as one of the largest families of transcription factors, they play a role in regulating signal transduction and physiological responses. To investigate the impact of ERF transcription factors on the coloration of postharvest mango peels, this study focused on the Guifei mango as the research subject. Through PCR cloning, the *MiERF3* gene was obtained, and bioinformatics methods were used to analyze its basic physicochemical characteristics, conserved domains, protein structure, and evolutionary relationships. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) technology was then employed to analyze the specific expression of the *MiERF3* gene in different tissues of mango and during postharvest storage periods. The results indicated that *MiERF3* was 717 bp in length, encoding 238 amino acids. The protein had a molecular formula of $C_{1130}H_{1763}N_{339}O_{355}S_9$, a molecular weight of 26.066 kDa, and a theoretical isoelectric point of 8.62, with 30

收稿日期 2024-04-15; 修回日期 2024-05-13

基金项目 海南省院士创新平台科研专项 (No. YSPTZX202213); 海南省院士团队创新中心建设项目 (No. SQ2021YSPTJXRWS0074)。

作者简介 窦雅琪 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 芒果采后保鲜。*通信作者 (Corresponding author): 李雯 (LI Wen), E-mail: liwen9-210@163.com。

positively charged residues and 27 negatively charged residues. The protein exhibited hydrophilic properties and a structurally unstable nature. *MiERF3* protein had no a signal peptide and transmembrane region, with threonine being the primary site for phosphorylation modification. It contained an AP2 conserved domain, and its secondary structure was primarily composed of 61.67% random curl, along with 27.75% α -helix, 3.96% β -fold, and 6.61% extended chain. The three-dimensional structural model of *MiERF3* contained three β -fold and one α -helix, consistent with the characteristics of the AP2 structural domain. Multi-sequence alignment and motif analysis suggested that *MiERF3* belonged to the ERF subfamily. Based on phylogenetic analysis, the protein most closely related to *MiERF3* was *PvERF3*-like from *Pistacia vera*, a plant belonging to the same family as mango. Onion subcellular localization and transcriptional self-activation assays showed that *MiERF3* was localized in the nucleus and had transcriptional self-activating activity. Quantitative real-time fluorescence analysis showed that the expression of *MiERF3* varied among different mango tissues, with the highest expression observed in the sunny side peel of mango fruit. During storage, the expression of *MiERF3* showed a clear trend of initial increase followed by decrease, suspecting that *MiERF3* may play a positive regulatory role in the process of fruit ripening and color change. 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; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.005

芒果, 素有“热带水果之王”之美誉, 具有很高的营养和经济价值。其中贵妃芒果以其黄、红相间的果皮以及核薄肉厚的特点深受人们喜欢^[1]。果皮色泽是最直观的果实品质性状, 花色苷是贵妃芒果最重要的色素物质^[2], 使果实展现为与其他芒果品种不同的红色。乙烯是一种重要的植物激素, 对果实的后熟生理变化和次生代谢具有重要的调控作用^[3]。伴随生物学技术的发展, 关于乙烯对果实后熟生理变化的影响及次生代谢的调控研究取得了显著的进展^[4]。

研究指出, 乙烯可以影响苯丙氨酸转氨酶 (PAL) 和查尔酮异构酶 (CHI) 的活性, 从而实现花青素生成的促进或抑制^[5]。ERF 转录因子是乙烯信号通路的关键下游成分, 作为最大的转录因子家族之一, 起到调节信号传导和生理反应的作用^[6]。AP2/ERF 转录因子超家族存在于众多植物中, 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^[7]。AP2/ERF 最早从烟草和拟南芥中分离发现, 功能域主要由转录调控功能域、DNA 结合功能域、寡聚化位点功能域和核定位信号功能域 4 个部分构成^[8]。AP2/ERF 转录因子家族成员包含 AP2/ERF 结构域, 该结构域是 ERF 行使转录调控的关键, 也是与其他转录因子区分的主要依据^[9-10]。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为依据, 将其分为 4 个亚族 (AP2、DREB、ERF、RAV) 和单独成员 (Soloist) ^[11-13]。

大量文献表明, 在许多水果中已经发现 ERF 转录因子作为与果实色泽转变相关的激活因子或抑制因子, 在果实成熟的过程中, ERF 转录因子因其多样性, 可能发挥多种功能^[14-17]。研究表明, 番茄果实中的 *SlERF6* 能够参与调控类胡萝卜素合成途径和乙烯代谢途径, 在成熟过程中发挥重要的调控作用^[18]。经乙烯处理后, *SlERF-E1*、*SlERF-E2* 和 *SlERF-E4* 能够有效调控番茄果实成熟转色^[19]。WANG 等^[20]的研究结果表明, 6 个 *ERF* 基因在桃子成熟过程中显著上调, 表现出与成熟相关的表达模式。有研究表明, 乙烯信号转导过程中, AP2/ERF 转录因子能够结合乙烯合成相关基因启动子从而调控果实成熟与发育, 也可以激活新受体的合成或受体的降解来调控乙烯反应的转导^[6]。如, 在梨中, 转录因子 *PbERF24* 可以结合 *PbACO54* 的启动子参与梨果实成熟^[21]; 在苹果中, *MdERF2/3* 可以通过结合 *MdACS1* 启动子中的 DRE 结合位点参与果实成熟^[22-23]; *CpERF9* 作为转录抑制因子, 通过结合 *CpPME1/2* 和 *CpPG5* 启动子中的 GCC box 来控制木瓜果实成熟^[24-25]; 在香蕉中, *MaERF9* 和 *MaERF11* 也可作为转录激活物或抑制物, 在转录过程中结合乙烯合成相关基因启动子达到调控果实成熟的作用^[26]。因此, 本研究结合前期报道及本课题组转录组测序数据, 以采后贵妃芒果为材料, 通过 PCR 扩增技术, 获得 1 个 AP2/ERF 转录因子 *MiERF3*, 并进行不同层面的生物信息学分析, 随后对其在芒果不同组织部位以及芒果贮藏阶段的基因表达量进行检

测。本研究旨在进一步探讨 ERF 在芒果乙烯信号传导过程中的作用, 以及其在芒果采后贮藏保鲜应用中的功能, 为相关领域提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究采用产自海南省陵水县英州镇芒果基地 (18°25'N, 109°51'E) 的贵妃芒果 (*Mangifera indica* L. var.) 作为试材。在果实达到八成熟阶段时, 立即进行采摘并运送至实验室。在培养箱恒温恒湿条件下, 将采摘后的芒果分别贮藏 0 (即采摘当天)、3、6、9、12 d, 温度 25 °C, 湿度为 95%。随后, 采集芒果阴面的果皮样本, 经过液氮速冻处理后, 保存于-80 °C 的冰箱, 以备后续的基因克隆及 qRT-PCR 分析使用。

大肠杆菌 DH5 α 感受态、农杆菌 GV3101 感受态、酵母菌 Y2H 感受态购自海口基睿生物科技有限公司提供。DL 2000 DNA marker、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Spe* I、*Bgl* II、琼脂糖、*T₄* DNA 连接酶、氨苄青霉素、卡那霉素等购自海南合辉实业有限公司。引物合成与测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 通过 CTAB 法提取芒果果皮基因组 RNA 后, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 质量进行严格检测。使用超微量分光光度计 (Implen, Germany) 对 2 μ L 的 RNA 样本进行浓度和纯度的精确测定。参照 MonScript RTIII All-in-One Mix with dsDNase 试剂盒说明书进行逆转录 RNA。所有合格的样品保存于-20 °C 备用。

1.2.2 *MiERF3* 基因克隆与序列分析 结合实验室前期结果与对芒果转录组数据的分析, 筛选出 *MiERF3* 基因。随后, 利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>)、Uniprot (<https://www.uniprot.org/blast/>) 在线工具以及 TBtools 等专业软件工具, 对 *MiERF3* 基因序列进行深入分析。使用 Primer 5 软件设计全长引物 (表 1), 利用 PCR 技术扩增目标基因。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收约 720 bp 大小的目的条带。将回收的片段与 pMD19-T 载体在 4 °C 条件下进行过夜连接, 并将连接产物转入 DH5 α , 随后进行菌落 PCR 验证。将阳性克隆菌液送至生工生物工程 (上海) 股份有限公

司进行测序, 测序结果使用 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对。

利用 NCBI Blast 程序对克隆得到的 *MiERF3* 基因的 CDS 序列进行比对分析。此外, 利用在线软件 NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 预测 *MiERF3* 蛋白质的保守结构域。利用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、NetPhos 3.1 (Server <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)、SignalP-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 和 TMHMM Server v 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 等在线软件进行序列分析。同时, 通过 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件对 *MiERF3* 蛋白的结构进行分析。

为了探究 *MiERF3* 在不同物种中的保守性和进化关系, 使用 DNAMAN 6.0 软件进行了多序列比对, 并利用 MEME 5.5.0 软件分析其 motif 结构, 将 motif 数设为 10。使用 MEGA-X 软件构建系统进化树。

1.2.3 亚细胞定位 采用洋葱内表皮转化法^[31]进行亚细胞定位分析, 在原方法上进行了适度优化。首先, 设计特异性引物 (表 1), 并运用双酶切技术, 将目的片段构建至 pCambia1302-GFP (35S::GFP) 表达载体中, 生成 35S::*MiERF3*-GFP 融合表达载体。选用 *Spe* I 和 *Bgl* II 作为酶切位点。将重组质粒转化至 GV3101 农杆菌, 并制备 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0 的悬浮液。将洋葱内表皮 (2 cm×2 cm) 浸泡于该悬浮液中, 减压处理 10 min。使用滤纸缓慢吸取洋葱内表皮过多的液体, 确保其干燥后, 再转移到铺有滤纸的 MS 固体培养基上培养 48 h。培养结束后, 制作玻片样本, 并通过倒置荧光显微镜观察并记录荧光信号。

1.2.4 *MiERF3* 毒性及自激活检测 运用双酶切构建表达载体, 引物序列见表 1。利用 *T₄* DNA 连接酶将启动子序列插入到载体上, 构建重组质粒。将 pGBKT7-*MiERF3* 重组质粒、pGADT7 空载质粒与 Y2H 酵母感受态 (50 μ L)、Carrier DNA (10 μ L) 以及 PEG/LiAc buffer (500 μ L) 充分混匀。30 °C 水浴 30 min 后 42 °C 水浴 15 min, 5000 r/min 离心 40 s 弃上清, ddH₂O 400 μ L 重悬, 离心 30 s 弃上清。用 ddH₂O 50 μ L; 重悬, 涂至

DDO 培养基上，29 ℃ 培养 48~96 h。挑取正常生长的酵母菌落用 0.9% NaCl 溶液将其梯度稀释，点至 QDO、QDO/X- α -Gal/AbA (1000 ng/mL) 培养基上，观察酵母菌生长状况。pGBKT7-*Lam*、pGADT7-T 为阴性对照，pGBKT7-*p53*、pGADT7-T 为阳性对照。

1.2.5 *MiERF3* 的表达分析 用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术，分析芒果在采后贮藏期和不同组织部位中 *MiERF3* 基因的表达。芒果 *Actin1* 基因为内参基因，采用 Primer 5 软件设计引物 (表 1)。参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, 中国) 试剂盒进行 qRT-PCR。PCR 反应体系 10 μ L，反应程序为：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 5 s，进行 40 次循环。每个样品设置 3 次生物学重复，基因相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法，以 0 d 为参照，设其相对表达量为 1。数据统计与分析使用 WPS Office 2022 软件，相对表达量可视化图形使用 GraphPad Prism 8 软件绘制。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primer used in this study

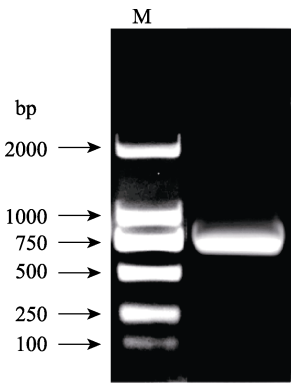
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	功能 Function
MiERF3-F	ATGAGGAGAGGGAGAGGAG	基因全长克隆
MiERF3-R	TCAGAGACATAGGCGGTG	
qMiERF3-F	GGTGGATCTGCGTCGAGAAA	实时荧光定量 PCR
qMiERF3-R	TTCGCTTAGGTCCACGGAG	
yMiERF3-F	C-AGATCT-ATGAGGAGAGGG AGAGGAGTTGTG	亚细胞定位
yMiERF3-R	G-ACTAGT-GAGACATAGGGC GGTG	
BD-MiERF3-F	GAATTC-ATGAGGAGAGGGA GAGGAG	酵母双杂 BD 载体
BD-MiERF3-R	GGATCC-TCAGAGACATAGGG CGGTG	
Actin-F	ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG	实时荧光定量 PCR
Actin-R	CCAAGCAGCATGAAGATCAA	

2 结果与分析

2.1 *MiERF3* 基因的克隆及生物信息学分析

以贵妃芒果阴面果皮 cDNA 为模板，用 MiERF3-F/R 引物对其编码区序列进行 PCR 扩增，扩增产物与目的基因大小一致 (图 1)。*MiERF3* (XP_044473973.1) 基因 CDS 序列全长为 717 bp，编码 238 个氨基酸。*MiERF3* 蛋白分子式 C₁₁₃₀H₁₇₆₃N₃₃₉O₃₅₅S₉，相对分子量 26.066 kDa，等电点 (pI) 为 8.62，正、负电荷的氨基酸残基总数分别为 30 个和 27 个，脂肪系数为 51.10，不稳

定系数为 59.70，总平均亲水性为 -0.655，由此推测 *MiERF3* 蛋白为不稳定的亲水蛋白。对 *MiERF3* 蛋白进行磷酸化位点预测 (图 2A)，*MiERF3* 含有 Ser (22 个)、Thr (16 个)、Tyr (6 个) 共 44 个磷酸化位点。*MiERF3* 蛋白无信号肽 (图 2B)、不含跨膜区域 (图 2C)，在细胞膜内，不属于分泌型蛋白。采用 SOPMA 软件预测 *MiERF3* 蛋白的二级结构，发现无规则卷曲为 150 个氨基酸



M: DL2000 DNA marker.
图 1 *MiERF3* 基因克隆
Fig. 1 Gene cloning of *MiERF3*

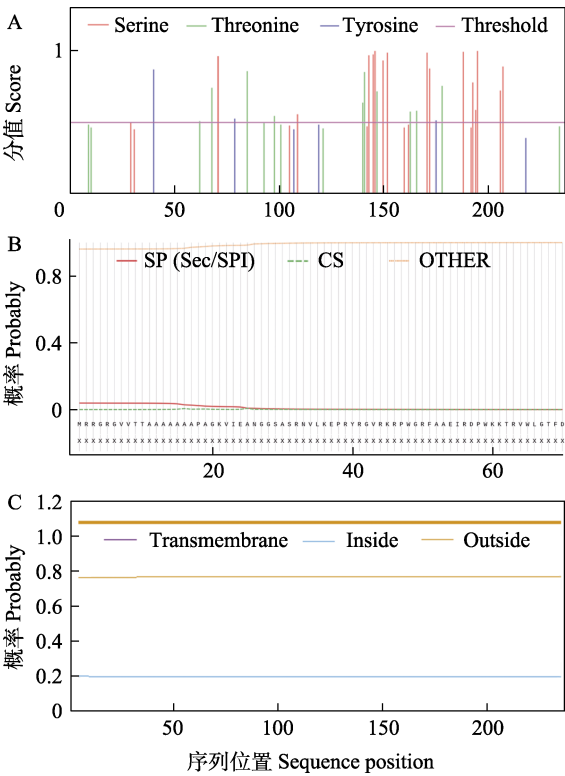


图 2 *MiERF3* 蛋白的磷酸化位点 (A)、信号肽 (B) 及跨膜结构 (C) 预测
Fig. 2 Phosphorylation site (A), signal peptide (B), transmembrane structure (C), prediction of *MiERF3* protein

(61.67%)、 α -螺旋为 49 个氨基酸 (20.9%)、延伸链为 19 个氨基酸 (12.18%) β -折叠为 10 个氨基酸 (4.20%) (图 3A)。利用 SWISS-MODEL

预测该蛋白的三级结构 (图 3B), MiERF3 蛋白含有 3 个反平行的 β -折叠和 1 个 α -螺旋结构, 符合 AP2 结构域典型的结构特征。

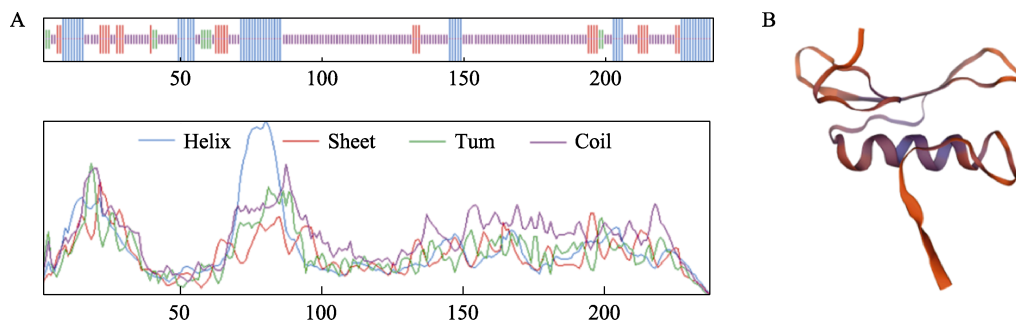


图 3 MiERF3 蛋白的二级结构 (A)、三级结构 (B)

Fig. 3 Secondary structure (A) and tertiary structure (B) of MiERF3 protein

2.2 MiERF3 氨基酸同源序列比对及 motif 分析

ERF 蛋白关键保守结构域是其发挥功能的基础。使用 NCBI 网站的 CD-Search 工具预测 MiERF3 蛋白功能结构域, 结果显示 (图 4A), MiERF3 蛋白 N 端第 39 位至 98 位是 1 个含 59 个氨基酸的 AP2 结构域。

选取与 MiERF3 同源性较高的 9 个物种的 ERF 转录因子进行 motif 分析, 结果显示, 这些 motif 结构相似, 有 4 种 motif 在所有蛋白中均含有, 与 MiERF3 所含的 motif 数目和种类一致的有 3 种, 分别为阿月浑子、楝、克莱门柚 (图 4B)。

经氨基酸同源性比对发现, 芒果 MiERF3 与楝 (*Melia azedarach*, KAJ4725160.1)、克莱门柚 (*Citrus x clementina*, XP_006452450.1)、番木瓜 (*Carica papaya*, XP_021906162.1)、阿月浑子 (*Pistacia vera*, XP_031286524.1)、雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*, XP_038689087.1)、水银草 (*Mercurialis annua*, XP_050215426.1) 氨基酸序列的相似性分别为 68.67%、78.22%、66.54%、92.02%、63.93% 和 59.76%。将上述氨基酸序列通过 DANMAN 5.0 软件进行多重比对, 结果显示 (图 4C), MiERF3 与其他物种的 ERF 蛋白序列相似, AP2 结构域高度保守, 在该结构域中, 第 14 位氨基酸为丙氨酸 (A), 而天冬氨酸 (D) 则位于第 19 位, 表明 MiERF3 蛋白具有 ERF 亚家族的序列特征, 属于 AP2/ERF 家族中的 ERF 亚族成员。

选取漆树科植物、模式植物、热带植物等不同物种 ERF 蛋白构建进化树, 结果显示 (图 4D), 芒果 MiERF3 与同样是漆树科的阿月浑子 ERF3-like 聚在一起, 亲缘关系最近, 其次是木薯、

甜橙, 而热带植物番木瓜、菠萝以及模式植物番茄则与芒果 MiERF3 亲缘关系较远。

2.3 MiERF3 亚细胞定位

荧光倒置显微镜下观察到, 35S:GFP 对照洋葱内表皮细胞中的细胞核和细胞壁均检测到了绿色荧光信号, 而 35S:MiERF3-GFP 融合蛋白仅在细胞核中出现绿色荧光信号 (图 5), 这表明芒果 MiERF3 蛋白定位于洋葱细胞细胞核中, 符合转录因子所具有的核定位特征。

2.4 MiERF3 毒性及自激活检测

将 pGBKT7 (空载) 和 pGBKT7-MiERF3 重组质粒转入 Y2H Gold 感受态, 酵母菌在 SDO 培养基上生长正常且与对照菌斑生长大小基本一致 (图 6A), 证明 MiERF3 蛋白没有毒性。

将 pGBKT7-MiERF3 重组质粒、pGADT7 空载质粒转入 Y2H Gold 感受态, 菌株可在 DDO 培养基上正常生长。进一步观察发现, 实验组 (pGBKT7-MiERF3+pGADT7) 和阳性对照 (pGBKT7-p53+pGADT7-T) 在 QDO 和 QDO/X- α -Gal/AbA 培养基上的菌斑大小基本一致, 且在 QDO/X- α -Gal/AbA 培养基上的菌斑为蓝色, 而阴性对照 (pGBKT7-lam+pGADT7-T) 在 QDO 和 QDO/X- α -Gal/AbA 培养基上均未生长出菌斑 (图 6B)。表明 MiERF3 蛋白具有较强转录自激活活性。

2.5 MiERF3 在芒果组织中的特异性分析

为了探究 MiERF3 基因在芒果不同组织部位表达情况, 采用实时荧光定量方法对贵妃芒果同一时期的核、叶、花、茎、果肉、阴面果皮和阳面果皮组织样品进行检测。结果显示 (图 7A),

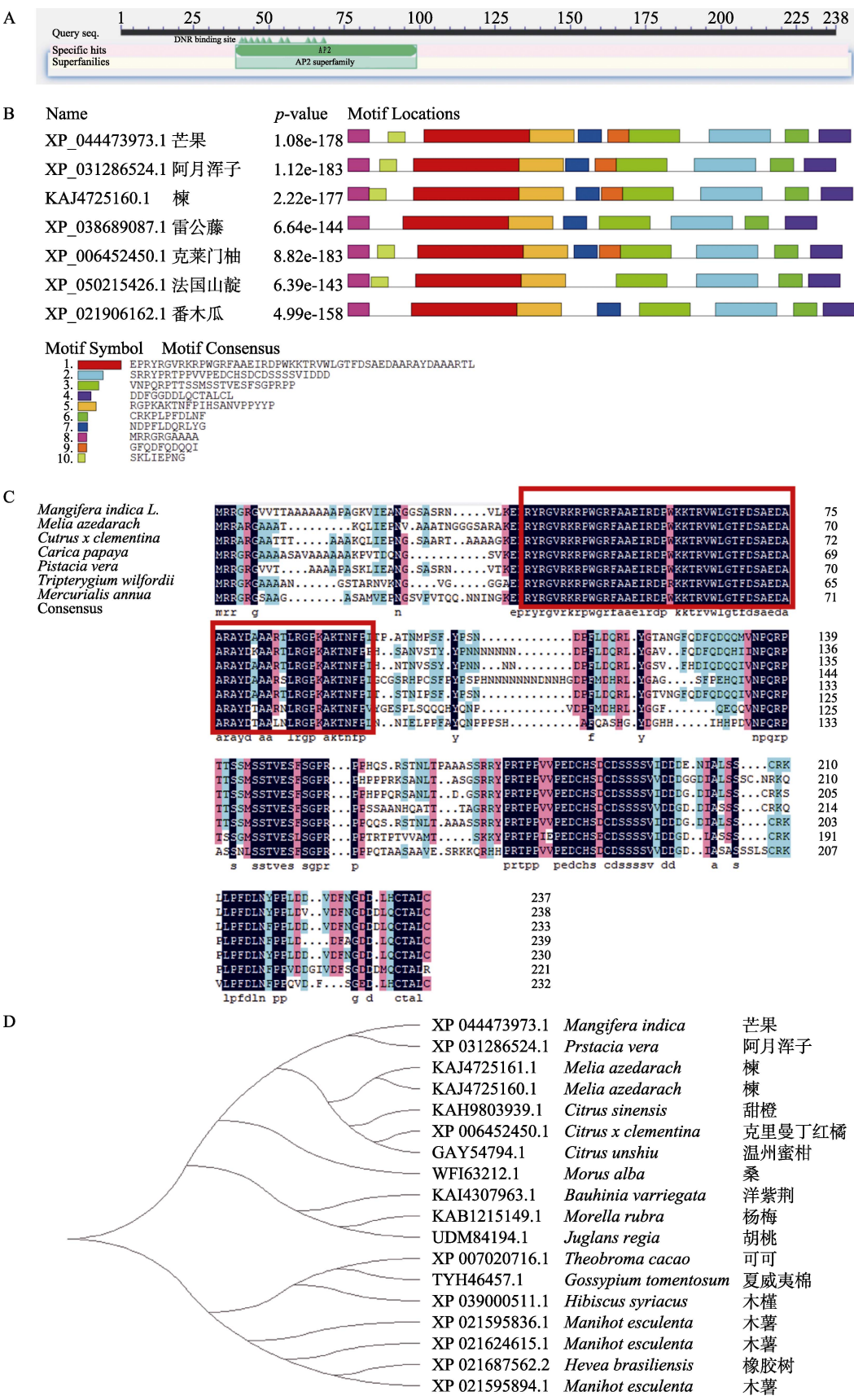


图 4 *MiERF3* 蛋白结构域分析 (A)、motif 分析 (B)、同源序列比对 (C) 和系统进化树 (D) 分析

Fig. 4 Domain analysis (A), motif analysis (B), homologous sequence alignment (C), and phylogenetic tree (D) analysis of *MiERF3* protein

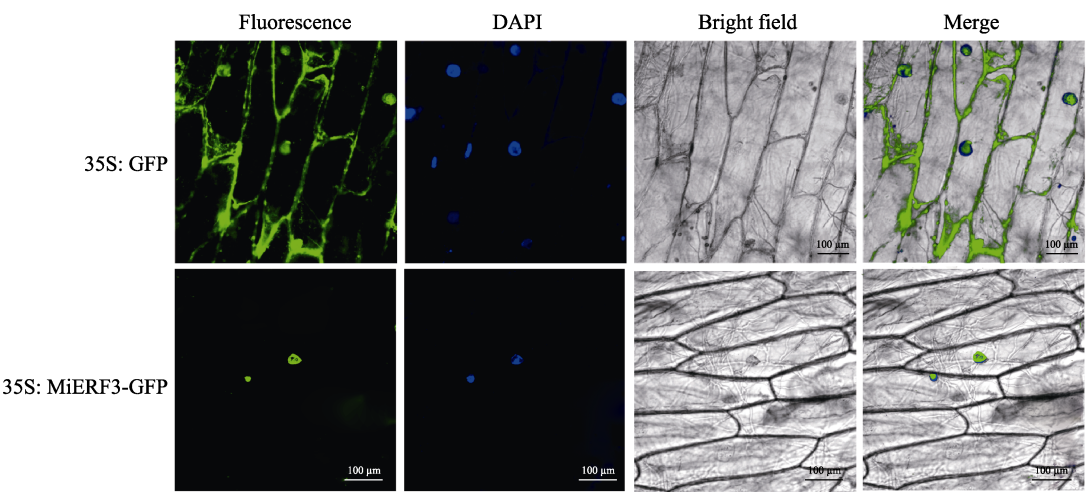


图 5 *MiERF3* 蛋白亚细胞定位
Fig. 5 Subcellular localization of *MiERF3* protein

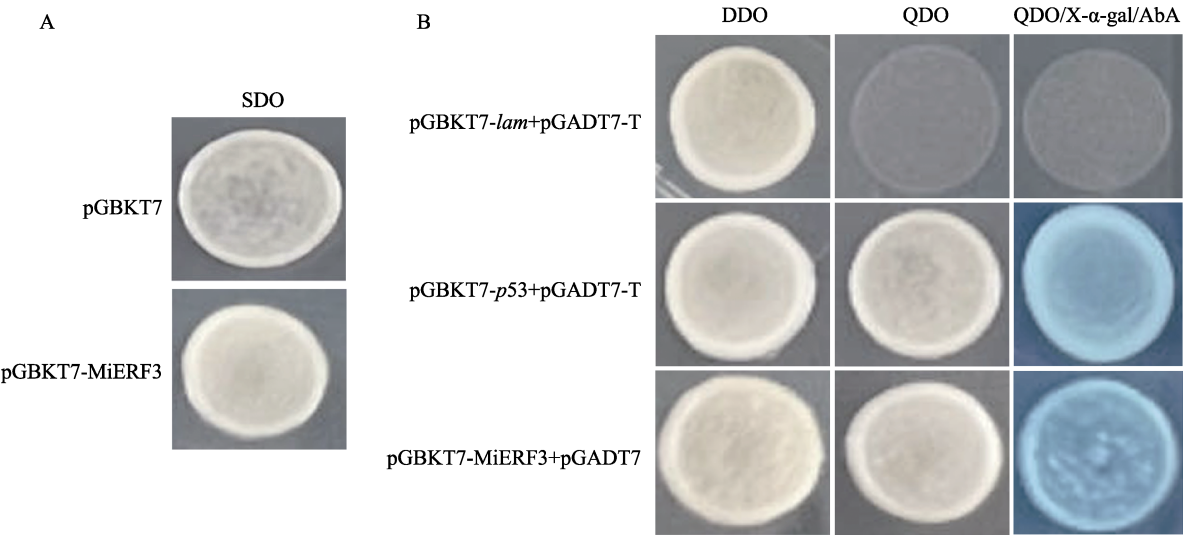
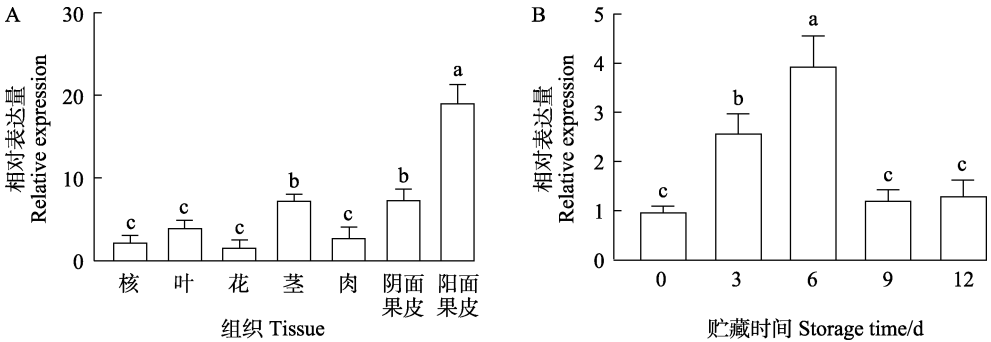


图 6 *MiERF3* 毒性 (A) 及自激活检测 (B)
Fig. 6 Toxicity detection (A) and autoactivation detection (B) of *MiERF3* protein



不同小写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 7 *MiERF3* 基因的表达水平分析
Fig. 7 Expression profile analysis of *MiERF3* gene

MiERF3 基因在芒果阳面果皮中表达量最高，其次是阴面果皮和茎，在核、叶、花和果肉等组织中的表达量则极低。

2.6 *MiERF3* 基因在采后贮藏的表达特征分析
为了探究 *MiERF3* 基因在贵妃芒果贮藏过程中的表达情况，选择采后贮藏 0、3、6、9、12 d

的阴面果皮组织,提取总 RNA 后逆转录,再进行 qRT-PCR 检测。结果表明(图 7B),在果实贮藏过程中,*MiERF3* 基因的表达量整体呈先上升后下降的趋势。在贮藏初期(0 d),该基因的表达量处于最低水平,随着果实的成熟,*MiERF3* 基因的表达量开始上调,并在第 6 天达到峰值,此时其表达量是初始时期的 4 倍。这一结果表明 *MiERF3* 基因在芒果果实采后贮藏和成熟过程中可能发挥着一定的作用。

3 讨论

芒果果皮颜色直接影响着芒果的外观和品质,与多个色泽相关物质的相对含量密切相关。这些物质的变化决定了芒果的美观度、营养价值以及保健功效^[21, 27]。果实采后保鲜技术手段的选择对于果皮颜色以及果实风味的影响巨大。由于芒果果实属于典型的呼吸跃变型,生产上往往选择在果实八成熟时采收,随后使用乙烯利进行催熟再销售。乙烯利处理会促进果实成熟,加速果皮转色,使果实硬度降低,快速到达其最佳销售状态。乙烯是 ERF 的命名来源,展现了其与 ERF 之间的密不可分关系^[28]。乙烯通过信号转导机制,在植物体内诱导 ERF 参与生长发育及胁迫防御等生理过程。在拟南芥中,乙烯与位于内质网膜上的乙烯受体结合,导致与受体相关联的激酶 CTR1 失活,进而无法对 EIN2 的 C 端进行磷酸化^[29]。非磷酸化的 EIN2 随后进入细胞核,使得转录因子 EIN3 得以稳定存在并发挥其作用。随后,EIN3 激活包括 ERF1 在内的多个转录因子的转录过程,这些转录因子调控其他乙烯响应基因,完成整个乙烯信号响应过程^[30]。因此,本研究通过课题组前期研究结果选择 *MiERF3* 作为研究对象,旨在探究其在贵妃芒果中的生理及分子层面的作用,为芒果产业生产实践提供一定的理论依据和参考。

魏玲等^[31]在贵妃芒果中成功鉴定出 1 个 *MiERF2* 基因,该基因属于 ERF 亚家族成员。经过分析发现,信号肽和跨膜结构在该基因编码的蛋白质中并不存在。在亲缘关系上,阿月浑子的 PvERF109-like 与 *MiERF2* 的关系最为接近。这一发现与本研究的結果存在一定的相似性。本研究发现,芒果中的 *MiERF3* 属于 ERF 亚家族,其编码的蛋白质具有亲水性但不够稳定,不含有信号肽,也未发现跨膜结构。在 *MiERF3* 蛋白质二级

和三级结构预测中,该蛋白质主要由无规则卷曲构成,同时包含 α -螺旋、 β -折叠和延长链等结构元。*MiERF3* 蛋白质具有典型的 AP2 结构域三维结构。通过系统进化分析,发现 *MiERF3* 与同为漆树科的阿月浑子 PvERF3-like 蛋白的亲缘关系最为接近。且亚细胞定位和转录自激活分析实验,证明 *MiERF3* 是一个定位于细胞核且具有转录自激活活性的转录因子。

为了深入研究 *MiERF3* 基因在芒果不同组织部位以及成熟阶段中的表达情况,本研究采用实时荧光定量的方法进行了详细分析。结果显示,*MiERF3* 基因主要在芒果的阳面果皮中表达,其表达量显著高于其他部位。此外,随着果实的逐渐成熟,*MiERF3* 基因的表达量也在不断增加,特别是在采后贮藏的第 6 天,该基因的表达量达到了最高峰,但随后开始呈现下降趋势。这一发现为进一步了解 *MiERF3* 基因在芒果生长发育过程中的作用提供了重要依据。郑珍珍等^[32]发现,在草莓果实成熟的过程中,*FaERF003* 的表达水平迅速上升,其变化趋势与乙烯前体 ACC 的含量变化十分相似。易萍等^[33]也观察到 *MiERF113* 基因在果皮和果肉中均有表达,并且随着果实的逐渐成熟,其表达量也在不断增加,在果实采后贮藏的第 12 天,*MiERF113* 基因的表达量达到最高,这与本研究结果具有一定的相似性。因此,推测 *MiERF3* 基因具有类似功能,在芒果成熟过程中尤其是果皮转色方面发挥着重要的作用。然而,*MiERF3* 基因在乙烯信号转导通路中的分子机制以及功能验证还有待探索。

参考文献

- [1] LE T D, VIET NGUYEN T, MUOI N V, THANH TOAN H, PHAM T N. Supply chain management of mango (*Mangifera indica* L.) fruit: a review with a focus on product quality during postharvest[J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2022, 5: 1-16.
- [2] WU X, GONG Q, NI X, ZHOU Y, GAO Z. UFGT: the key enzyme associated with the petals variegation in Japanese apricot[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 108.
- [3] DUBOIS M, VAN DEN BROECK L, INZÉ D. The pivotal role of ethylene in plant growth[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(4): 311-323.
- [4] LARSEN P B. Mechanisms of ethylene biosynthesis and response in plants[J]. *Essays in Biochemistry*, 2015, 58:

- 61-70.
- [5] 汤红, 李娜, 曾教科, 李雯. 植物激素调控果实色泽形成的分子机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(8): 2705-2711.
TANG H, LI N, ZENG J K, LI W. Advances in molecular mechanisms of phytohormone in regulating formation of fruit colour[J]. Molcecular Plant Breeding, 2019, 17(8): 2705-2711. (in Chinese)
 - [6] 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(6): 750-776.
 - [7] SHOJI T, YUAN L. ERF gene clusters: working together to regulate metabolism[J]. Trends in Plant Science, 2021, 26(1): 23-32.
 - [8] CHEN L, HAN J, DENG X, TAN S, LI L, LI L, ZHOU J, PENG H, YANG G, HE G, ZHANG W. Expansion and stress responses of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium distachyon*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21623.
 - [9] RIECHMANN J L, MEYEROWITZ E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors[J]. Biological Chemistry, 1998, 379(6): 633-646.
 - [10] 肖亮, 陈瑞兵, 吴宇, 张磊. AP2/ERF 转录因子调控次生代谢产物生物合成的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5412-5420.
XIAO L, CHEN R B, WU Y, ZHANG L. Research progress on effect of AP2/ERF transcription factors in regulating secondary[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(22): 5412-5420. (in Chinese)
 - [11] GONZALEZ A, ZHAO M Z, LEAVITT J M, LLOYD A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/MYB transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings[J]. The Plant Journal, 2008, 53(5): 814-827.
 - [12] 徐楚瑶, 周波. 温度胁迫调控植物花青素的生物合成[J/OL]. 分子植物种:1-12[2024-03-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230314.1201.012.html>.
XU C Y, ZHOU B. Temperature stress regulates the biosynthesis of anthocyanins in plants[J/OL]. Molecular Plant Breeding:1-12[2024-03-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230314.1201.012.html>. (in Chinese)
 - [13] MENG R, ZHANG J, AN L, ZHANG B H, JIANG X B, YANG Y Z, ZHAO Z Y. Expression profiling of several gene families involved in anthocyanin biosynthesis in apple (*Malus domestica* Borkh.) skin during fruit development[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2016, 35(2): 449-464.
 - [14] KHUNMUANG S, KANLAYANARAT S, WONGS-AREE C, MEIR S, PHILOSOPH-HADAS S, OREN-SHAMIR M, OVADIA R, BUANONG M. Ethylene induces a rapid degradation of petal anthocyanins in cut *Vanda* 'Sansai blue' orchid flowers[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1004.
 - [15] WANG X, PAN L, WANG Y, MENG J, DENG L, NIU L, LIU H, DING Y, YAO J L, NIEUWENHUIZEN N J, AMPOMAH-DWAMENA C, LU Z, CUI G, WANG Z, ZENG W. PpIAA1 and PpERF4 form a positive feedback loop to regulate peach fruit ripening by integrating auxin and ethylene signals[J]. Plant Science, 2021, 313: 111084.
 - [16] AN J P, ZHANG X W, BI S Q, YOU C X, WANG X F, HAO Y J. The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple[J]. The Plant Journal, 2020, 101(3): 573-589.
 - [17] 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.
 - [18] LEE J M, JOUNG J G, MCQUINN R, CHUNG M Y, FEI Z, TIEMAN D, KLEE H, GIOVANNONI J. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation[J]. The Plant Journal, 2012, 70(2): 191-204.
 - [19] LIU M, GOMES B L, MILA I, PURGATTO E, PERES L E, 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.
 - [20] WANG F, AHAMMED G J, LI G, BAI P, YAN J. Ethylene is involved in red light-induced anthocyanin biosynthesis in cabbage (*Brassica oleracea* L.)[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2019, 21: 955-963.
 - [21] HAO P P, WANG G M, CHENG H Y, KE Y Q, QI K J, GU C, ZHANG S L. Transcriptome analysis unravels an ethylene response factor involved in regulating fruit ripening in pear[J]. Physiologia Plantarum, 2018, 163(1): 124-135.
 - [22] WANG Q, LIU H, ZHANG M, LIU S, HAO Y, ZHANG Y. MdMYC2 and MdERF3 positively co-regulate α -farnesene biosynthesis in apple[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 512844.
 - [23] LI T, JIANG Z, ZHANG L, TAN D, WEI Y, YUAN H, LI T, WANG A. Apple (*Malus domestica*) MdERF2 negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing MdACS1 transcription[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2016, 88(5): 735-748.
 - [24] FU C C, HAN Y C, QI X Y, SHAN W, CHEN J Y, LU W J, KUANG J F. Papaya CpERF9 acts as a transcriptional repressor of cell-wall-modifying genes CpPME1/2 and CpPG5 involved in fruit ripening[J]. Plant Cell Reports, 2016,

- 35(11): 2341-2352.
- [25] FU C, CHEN H, GAO H, HAN Y. Histone deacetylase CPHDA3 is functionally associated with CPERF9 in suppression of *CpPME1/2* and *CpPG5* genes during papaya fruit ripening[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(32): 8919-8925.
- [26] 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.
- [27] JAAKOLA L, MÄÄTTÄ K, PIRTILÄ A M, TÖRRÖNEN R, KÄRENlampi S, HOHTOLA A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2): 729-739.
- [28] 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.
- [29] AN F, ZHAO Q, JI Y, LI W, JIANG Z, YU X, ZHANG C, HAN Y, HE W, LIU Y, ZHANG S, ECKER J R, GUO H. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-like1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(7): 2384-2401.
- [30] JU C, YOON G M, SHEMANSKY J M, LIN D Y, YING Z I, CHANG J, GARRETT W M, KESSENbrock M, GROTH G, TUCKER M L, COOPER B, KIEBER J J, CHANG C. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(47): 19486-19491.
- [31] 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 *MiERF2* gene of AP2/ERF transcription factor in mango[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(1): 1-9. (in Chinese)
- [32] 郑珍珍, 黄芸. 草莓乙烯响应因子 *FaERF003* 基因克隆与表达模式分析[J]. 北京农学院学报, 2021, 36(2): 11-15.
- ZHENG Z Z, HUANG Y. Cloning and expression pattern analysis of ethylene response factor *FaERF003* gene in strawberry[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2021, 36(2): 11-15. (in Chinese)
- [33] 易萍, 黄方, 李丽, 孙健, 胡美姣, 毕金峰, 藤建文. 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-responsive transcription factor *MiERF113* gene in mango[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(9): 1751-1758. (in Chinese)