

## 三七 AP2/ERF 基因家族鉴定及 *PnDREB84* 基因功能初探

张双华<sup>1,2</sup>, 侯 聪<sup>2</sup>, 程宇飞<sup>2</sup>, 宁 康<sup>2</sup>, 汪鋈植<sup>1</sup>, 董林林<sup>2\*</sup>

(1. 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**摘要:** AP2/ERF 基因家族是植物界中的最大转录因子家族之一, 在响应生物与非生物胁迫、参与对植物激素的应答及植物生长发育过程具有重要的作用。本研究利用生物信息学方法对三七 AP2/ERF 家族进行鉴定, 并分析该家族的蛋白理化性质与结构、系统进化关系、表达模式及 *PnDREB4* 基因的功能。结果表明, 在三七中鉴定到 140 个 AP2/ERF 家族成员, 分为 DREB、ERF、AP2、RAV、Soloist 五个亚族, 各亚族间蛋白理化性质和基序分布相似。尖孢镰刀菌侵染三七植株, 其 AP2/ERF 家族基因中有 34 个差异表达基因, 19 个基因表达上调, 其中 *PnDREB84* 在 0~96 h 范围内随着尖孢镰刀菌侵染时间的延长表达量上调。低温 4 °C 胁迫后, 超表达 *PnDREB84* 基因的三七植株, 其 ABA 和 SA 激素的含量增加。结果表明, *PnDREB84* 基因在生物胁迫和非生物胁迫过程中发挥双重调控作用, *PnDREB84* 基因可作为三七抗逆新品种培育的潜在分子标记。三七 AP2/ERF 转录因子的鉴定及 *PnDREB84* 基因功能分析为三七抗逆机制解析及新品种培育提供数据支撑。

**关键词:** 三七; AP2/ERF 家族; 尖孢镰刀菌; 低温胁迫; *PnDREB84* 基因

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3428-11

## Identification and analysis of AP2/ERF gene family of *Panax notoginseng* and function of *PnDREB84* gene

ZHANG Shuang-hua<sup>1,2</sup>, HOU Cong<sup>2</sup>, CHENG Yu-fei<sup>2</sup>, NING Kang<sup>2</sup>, WANG Jun-zhi<sup>1</sup>, DONG Lin-lin<sup>2\*</sup>

(1. College of Biological & Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract:** The AP2/ERF gene family is one of the largest transcription factor families in the plant kingdom, and plays an important role in response to biological and abiotic stresses, plant hormone responses, and plant growth and development. In this study, the AP2/ERF family of *Panax notoginseng* was identified by bioinformatics methods, and the physicochemical properties, structure, phylogenetic relationship, expression pattern and function of *PnDREB4* gene of the family were analyzed. The results showed that 140 AP2/ERF family members were identified in *P. notoginseng*, which were divided into DREB, ERF, AP2, RAV and Sololit subgroups. The physicochemical properties and motifs of proteins were similar among the subgroups. There were 34 differentially expressed genes in the AP2/ERF family of *Fusarium oxysporum* infected *P. notoginseng* plants, and 19 genes were up-regulated. The expression level of *PnDREB84* was up-regulated with the extension of *Fusarium oxysporum* infection time in the range of 0–96 h. The content of ABA and SA in *P. notoginseng* plants overexpressing *PnDREB84* gene increased after 4 °C stress. The results showed that *PnDREB84* gene plays a dual regulatory role in the process of biological stress and abiotic stress. *PnDREB84* gene can be used as a potential molecular marker for the breeding of new varieties of *P. notoginseng*. The identification of AP2/ERF transcription factor and function analysis of *PnDREB84* gene of *P. notoginseng* provided data support for the analysis of stress resistance mechanism of

收稿日期: 2023-02-21; 修回日期: 2023-03-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82274044); 国家重点研发计划项目 (2022YFC3501804); 云南省重大科技专项计划 (202102AA3100481).

\*通讯作者 Tel: 18911917789, E-mail: lldong@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0203

*P. notoginseng* and the breeding of new varieties.

**Key words:** *Panax notoginseng*; AP2/ERF family; *Fusarium oxysporum*; low temperature stress; *PnDREB84* gene

AP2/ERF(APETALA2/ethylene response factor) 基因家族是主要存在于植物界中的最大转录因子家族之一, 在物种遗传改良与育种方面具有重要应用价值<sup>[1]</sup>。AP2/ERF 转录因子家族成员至少包含 1 个高度保守的 AP2 结构域, 该结构域由 60~70 个氨基酸组成, 该结构域可以直接与顺式作用元件相互作用来调节靶基因表达<sup>[2]</sup>。根据保守结构域数量和序列的相似性, AP2/ERF 超基因家族分为 5 个亚家族: DREB (脱水反应元件结合)、ERF (乙烯反应元件结合蛋白)、AP2 (APETALA2) 和 RAV (ABI3/VP 相关), 以及 Soloist (少数未分类因子)<sup>[3]</sup>。DREB 亚家族与 ERF 亚家族都只包括 1 个 AP2 结构域, 两者之间的差别首先在于 DREF 亚家族 AP2 结构域的第 14 和 19 位氨基酸分别是缬氨酸和谷氨酸, 而 ERF 亚家族相应位置上分别是丙氨酸和天冬氨酸<sup>[3]</sup>。此外, 两个亚家族对 DNA 亲和力和特异性也不同, DREB 蛋白可以特异性与 A/GCCGAC 元件结合; 而 ERF 亚家族的成员可以特异性结合 GCC-box (AGCCGCC 元件)<sup>[4]</sup>。AP2 亚家族蛋白包含两个重复的 AP2 结构域。RAV 亚家族除了拥有一个 AP2 结构域外还有一个 B3 结构域。Soloist 类 AP2/ERF 转录因子也拥有 1 个 AP2 结构域, 此类 AP2/ERF 转录因子与其他亚家族之间的区别在于其基序与基因结构同其他亚家族的序列存在较大的差异<sup>[5]</sup>。

随着生物信息学和生物技术的发展, 关于对 AP2/ERF 家族基因的全基因组鉴定和分析已广泛在植物中进行, 包括拟南芥<sup>[6]</sup>、小麦<sup>[7]</sup>、葡萄<sup>[8]</sup>、黄瓜<sup>[9]</sup>、高粱<sup>[10]</sup> 等单双子叶植物。据报道 AP2/ERF 转录因子能够提高对生物胁迫的抗性, 在番茄中 *SIERF.A.1*、*SIERF.B.4*、*SIERF.C.3* 和 *SIERF.A.3* 基因在抵抗灰霉病菌侵染过程中必不可少<sup>[11]</sup>; 在拟南芥中, 过表达 *AtERF1* 可以提高植株对包括葡萄球菌和黄瓜枯萎菌在内的坏死性真菌的抗性; *AtERF2* 或 *AtERF14* 的功能丧失突变体使植株对尖孢镰刀菌更敏感<sup>[12]</sup>。同时研究发现 AP2/ERF 转录因子在非生物胁迫过程中发挥着重要作用, 拟南芥中的 *AtERF98*、水稻中的 *JCERF011* 和苜蓿中的 *MsERF8* 能够提高其耐盐性<sup>[13-15]</sup>; 苹果中转录因子 *MdERF38* 促进干旱胁迫诱导的苹果花青素生物合成<sup>[16]</sup>; 番茄中的 *ERF.D7* 基因可以激活生长素反应因子, 调节果实成熟<sup>[17]</sup>, 番茄中的 *ERF15* 转录因子能够响应低温胁迫<sup>[18]</sup>。此外, AP2/ERF 家族成员能参与除乙烯信号途径外的

其他激素的应答, 例如负调控赤霉素的生物合成, 调节脱落酸生物合成相关基因的表达水平, 茉莉酸响应防御基因的调控<sup>[19]</sup>等。简言之 AP2/ERF 转录因子是整合各种植物激素信号的关键调节剂, 响应环境胁迫及非生物胁迫, 这些发现极大地促进对 AP2/ERF 转录因子的功能的理解。

三七 [*Panax notoginseng* (Burk) F.H.Chen] 为五加科人参属草本植物, 其根、茎入药, 具有散瘀止血、消肿定痛等功效, 在我国已有 600 多年的种植历史<sup>[20]</sup>。随着对三七药用价值研究的不断深入, 对三七的应用范围不断扩大, 其市场需求量也在不断增加, 但是由于真菌病害的发生, 以及三七自身对生长环境要求的严苛, 三七的产量和品质受到严重影响。其中, 根腐病是三七生长过程中最严重的病害, 尖孢镰刀菌是三七根腐病的重要致病菌之一<sup>[21-23]</sup>。作为一种喜温植物, 三七生长适宜温度为 13~20 °C, 每年秋冬时期的低温是影响三七产量与品质的重要因素, 持续低温会导致三七苗冻害, 影响发芽率和发芽质量以及活性成分含量<sup>[24-26]</sup>。根腐病及低温成为影响三七生长及品质的关键障碍因子, 因此三七抗逆机制的研究及抗性品种的选育迫在眉睫。AP2/ERF 转录因子通过调控激素信号转导, 响应环境的胁迫因子, 提升植物的抗逆性, 而三七中 AP2/ERF 转录因子家族的鉴定及功能研究较为薄弱。因此通过解析三七中 AP2/ERF 基因响应根腐病及低温的分子机制, 发掘病原菌及低温响应的关键基因, 为三七抗逆新品种的培育及种质创新提供数据基础, 保障三七药材的产量及质量。

本研究基于三七转录组数据, 以生物信息学技术手段鉴定 AP/ERF 家族基因, 分析其理化性质分析、结构域、系统进化树、表达模式等, 并通过瞬时表达体系解析该家族 *PnDREB84* 基因在三七抗逆中的功能。通过三七 AP2/ERF 转录因子的鉴定及功能分析为三七抗病机制解析及抗病新品种培育提供数据支撑。

## 材料与方法

**三七 AP2/ERF 转录因子家族的筛选及鉴定** 利用 Pfam 数据库 (<https://pfam.xfam.org/>) 下载含有 AP2/ERF 家族结构域的隐马尔可夫模型文件 PF00847, 通过 HMME Rv3.1b1 软件中的 hmmsearch 命令在已发表三七转录组数据 (PRJCA005472) 中进行搜索得  $E \leq e^{-5}$

的蛋白序列,并构建三七本地蛋白信息库。从TAIR数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)中获得的拟南芥AP2/ERF蛋白序列为探查序列,使用本地BLASTP程序进行序列比对,合并HMMER和BLASTP结果删除冗余序列,得三七AP2/ERF基因蛋白候选序列。将蛋白序列导入Pfam(<https://pfam.xfam.org/>)、InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)、SMART(<https://smart.embl.de/>)等在线工具进行结构域预测分析,去除其中结构域不完整的序列,得到三七具有AP2结构域的蛋白序列。

**三七AP2/ERF转录因子理化性质分析** 利用在线网站Expasy-ProtParam(<https://web.expasy.org/prot-param/>)对三七AP2/ERF进行理化性质分析,包括氨基酸数量、分子质量、理论等电点、不稳定系数和亲水性系数,利用CELLO v2.5(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)进行亚细胞定位分析。

**三七AP2/ERF转录因子系统进化分析** 利用Clustal W程序对三七和拟南芥AP2/ERF基因家族的蛋白序列进行多序列比对,参数为默认值。根据多序列比对结果,利用MEGA软件采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,Bootstrap值设置为1 000,借助在线工具EvolView(<https://www.evolgenius.info/evolview/#/>)绘制进化树图。

**三七AP2/ERF转录因子保守基序分析** 利用MEME在线工具(<https://meme-suite.org/meme/>)对三七基因蛋白序列上的保守基序进行预测,保守基序数量设置为10,其他参数为默认设置,并采用TBtools软件绘制保守基序图。

**尖孢镰刀菌诱导下三七AP2/ERF转录因子表达分析** 将来源于云南省三七植株移植于本实验室标准培养室(温度为25℃,16 h光照,8 h黑暗,相对湿度为65%~70%),并制备尖孢镰刀菌孢子悬浮液(每毫升 $2 \times 10^6$  conidia)。感染前两周将三七植株洗净,移植于MS培养液水培,选择长势良好的植株放入装有250 mL孢子悬浮液培养瓶中进行接种,8 h后移入水培环境<sup>[27]</sup>。接种后0、12、24、48、72和96 h对根部进行取样,3次生物学重复,样品置于液氮中保存。通过TRIplant RNA分离试剂盒(Bioteke, 中国)提取总RNA,并由安诺基因公司进行RNA测序。利用本课题组已发表转录组数据(PRJCA005472),取FPKM的平均值,利用联川云生物平台(<https://www.omicstudio.cn/index>)绘制热图,分析三七AP2/ERF家族的基因表达模式,数据处理方法为Log<sub>2</sub>,数据处理按行处理。

**低温条件下三七中PnDREB84基因表达分析** 随机将一年生三七植株分成2组,实验组置于4℃恒

温标准培养室(16 h光照,8 h黑暗,相对湿度为65%~70%)进行低温处理,以25℃作为对照组。低温处理后0、2、6、12、24、48 h对叶部进行取样,3次生物学重复,样品置于液氮中保存。

**低温条件下三七中瞬时转化PnDREB84基因** 利用同源重组方法构建OE-PnDREB84过表达载体,并转化农杆菌GV3101以及空载GV1300,将鉴定为阳性的含有重组质粒的农杆菌划线,挑单克隆于加有相应抗生素的LB培养基中,28℃、200 r·min<sup>-1</sup>培养过夜;将2 mL菌液转入到50 mL的LB液体培养基中,相同条件下培养至OD<sub>600</sub>为0.5~0.6;3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min收集菌体,弃上清后用重悬液(10 mmol·L<sup>-1</sup> MES、10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮)调整OD值为0.8左右,室温下静置3 h待用;取已灭菌注射器,依靠压力将菌液注入三七叶片的叶脉之间,在黑暗条件下保温、保湿培养24 h之后恢复正常光照培养24 h(16 h光照,8 h黑暗)。对所有注射过的三七进行冷胁迫处理,处理时间为0、6、12、48 h;在不同处理时间点取样,3次生物学重复,样品置于液氮中保存。

**三七RNA提取和qRT-PCR** 采用快速RNA提取试剂盒(北京华越洋生物科技有限公司),按照生产厂家的说明书来提取总RNA。使用KR118反转录试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]通过一步法合成cDNA。采用Primer 5.0软件设计引物,以Actin基因作为内参基因,引物合成由擎科生物科技有限公司完成(表1)。使用Star Lighter SYBR Green qPCR Mix试剂盒(北京启衡星生物科技有限公司)进行qRT-PCR实验。反应程序为:95℃酶激活5 min,95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 s,循环次数为40。基因的相对表达量采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算。

**Table 1** Sequence of primers used in the test

Primer	Sequence (5'-3')
<i>PnDREB84-F</i>	TATCAAACACTTCCCAAGACCCCT
<i>PnDREB84-R</i>	CCGTATTCCGACACCCATT
<i>Actin-F</i>	TTTTGGATTCTGGTGATGGTGT
<i>Actin-R</i>	CCGCTCAGCAGTTGTGGTAA

**内源植物激素ABA和SA含量的测定** 采用液相色谱-质谱联用技术(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)测定三七中内源激素脱落酸(abscisic acid, ABA)和水杨酸(salicylic acid, SA)含量。

**标准品** ABA(≥98%,批号S08A9J67031)和SA(≥98%,批号H31A10B96366)均来自上海源叶生物科技有限公司。

内源激素提取 精密称取三七叶片样品 150 mg 置 2 mL Ep 管中, 加入 1 mL 甲醇/水/甲酸 (75:20:5, v/v/v) (MWA), 9 000 r·min<sup>-1</sup> 涡旋研磨 30 s, 重复 3 次, 14 000 r·min<sup>-1</sup> (4 °C) 条件下离心 10 min, 吸取上清液, 0.22 μm 尼龙针头滤器过滤, 取续滤液于棕色进样瓶中供 LC-MS 分析。

测定条件 液相条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse plus C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相为 A: 水 (0.1% 甲酸); B: 乙腈, 梯度洗脱: 0 min, 30% B; 0~5 min, 30%~40% B; 5~7 min, 40%~60% B; 7~10 min, 60%~100% B; 10~12 min, 100% B。流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 10 μL, 柱温 30 °C。质谱条件: ESI 离子源, MRM 模式。离子源条件为干燥气温度 (gas temp): 300 °C, 干燥气流量 (gas flow): 10 L·min<sup>-1</sup>, 雾化器压力 (nebulizer): 45 psi, 毛细管电压 (capillary): 4 000 V。

## 结果与分析

### 1 AP2/ERF 基因家族的筛选鉴定及理化性质分析

从三七转录组数据库中获得 73 273 条抗性蛋白序列, 构建成三七抗性蛋白数据库, 通过 HMMER 和 BLASTP 比对分别鉴定到了 145 个和 150 个 AP2/ERF 基因, 将两次鉴定的结果合并、去除重复序列后提交到 Pfam、Inter Pro、SMART 数据库中验证 AP2 结构域, 去除没有 AP2 结构域且结构不完整的序列, 最终得到 140 个三七 AP2/ERF 蛋白序列。

三七 AP2/ERF 蛋白序列进行理化性质分析 (表 2), 结果表明, 三七 AP2/ERF 家族成员之间存在较大差

异, 氨基酸长度变化范围在 99~672 个氨基酸之间, 平均长度为 252 个氨基酸。此外, 蛋白质分子质量介于 11.423~74.651 kDa, 理论等电点介于 4.02~10.68, 等电点的平均值为 7.12, GRAVY 均为负值, 表明三七 AP2/ERF 蛋白均为亲水性蛋白。亚细胞定位结果显示, 54 个 AP2/ERF 蛋白定位在细胞质中, 58 个 AP2/ERF 蛋白定位在细胞外、12 个 AP2/ERF 蛋白定位在细胞外膜, 16 个 AP2/ERF 蛋白定位在周质中。

### 2 AP2/ERF 转录因子的系统发育分析

由 149 条拟南芥 AP2/ERF 氨基酸序列与 140 条三七 AP2/ERF 氨基酸序列构建的系统进化树。结果显示: 三七 AP2/ERF 转录因子可分为 DREB、ERF、AP2、RAV 以及 Soloist 在内的 5 个亚家族, 并可进一步分成 6 个进化枝 (图 1)。三七 AP2/ERF 基因家族在各亚家族中的分布并不均匀, 其中 DREB 亚家族包含 36 个基因, 占基因总数的 25.71%; ERF 亚家族包含 87 个基因, 占三七 AP2/ERF 基因家族总数 62.14%; AP2 亚家族包含 12 个基因, 占基因总数的 8.57%; RAV 亚家族包含 3 个基因, Soloist (未明确分类) 仅有 2 个基因。

### 3 三七 AP2/ERF 转录因子保守基序分析

利用 MEME 进行结构域 motif 组成分析, 在 140 个三七 AP2/ERF 蛋白中鉴定到了 10 个保守的 motif 结构, 同一亚家族蛋白成员之间的 motif 分布相似 (图 2)。结果表明, motif1 和 motif2 普遍存在于所有 PnAP2/ERF 蛋白中, 代表着高度保守的 AP2 结构域, 不同亚家族 motif 组成有差异, 且每个成员 motif 的个数在 3~6 个, 如 AP2 亚家族中含有特异性 motif5, DREB 中含有 motif7, RAV 亚家族中含有 motif 4, 猜想是 B3 结构域。

**Table 2** Analysis of physicochemical properties of AP2/ERF transcription factors of *Panax notoginseng*

No.	Protein ID	Amino acid (aa)	Molecular weight/kD	Isoelectric point	Instability index	GRAVY	Subcellular localization
1	Pn-01ERF	117	13.14	10.68	26.54	-0.898	Periplasmic
2	Pn-02ERF	204	23.02	9.27	42.71	-0.982	Cytoplasmic
3	Pn-03DREB	202	22.47	6.83	54.11	-0.545	Extracellular
4	Pn-04ERF	314	34.78	5.64	58.85	-0.678	Extracellular
5	Pn-05DREB	162	17.07	4.02	50.99	-0.027	Cytoplasmic
6	Pn-06ERF	204	22.49	9.01	53.65	-0.517	Extracellular
7	Pn-07ERF	158	17.90	5.73	62.07	-0.62	Cytoplasmic
8	Pn-08ERF	105	11.84	10.02	42.3	-0.647	Periplasmic
9	Pn-09ERF	178	20.14	9.77	62.01	-0.512	Cytoplasmic
10	Pn-10DREB	169	18.85	6.21	35.21	-0.447	Cytoplasmic
11	Pn-11ERF	179	20.16	4.66	42.2	-0.684	Cytoplasmic
12	Pn-12ERF	179	20.39	6.16	49.98	-0.749	Cytoplasmic
13	Pn-13AP2	547	60.44	6.11	46.93	-0.709	Extracellular
14	Pn-14ERF	278	31.12	5.34	33.43	-0.665	Extracellular
15	Pn-15DREB	179	19.80	4.96	59.25	-0.646	Extracellular
16	Pn-16ERF	223	24.95	5.13	64.9	-0.643	Extracellular
17	Pn-17ERF	124	14.45	10.07	33.58	-0.71	Cytoplasmic
18	Pn-18DREB	268	29.87	5.33	51.96	-0.359	Cytoplasmic
19	Pn-19ERF	277	30.55	7.89	78.06	-0.581	Extracellular
20	Pn-20ERF	239	27.22	5.91	66.75	-0.6	Outer membrane

Continued

No.	Protein ID	Amino acid (aa)	Molecular weight/kD	Isoelectric point	Instability index	GRAVY	Subcellular localization
21	Pn-21ERF	208	23.59	5.87	57.63	-0.79	Extracellular
22	Pn-22ERF	346	38.93	5.61	66.02	-0.416	Outer membrane
23	Pn-23DREB	301	33.57	6.97	48.89	-0.639	Outer membrane
24	Pn-24ERF	250	28.47	5.2	56.27	-0.72	Cytoplasmic
25	Pn-25DREB	200	22.37	5.19	53.96	-0.547	Cytoplasmic
26	Pn-26ERF	404	45.29	4.63	53.02	-0.779	Extracellular
27	Pn-27ERF	343	39.16	5.19	40.92	-0.633	Cytoplasmic
28	Pn-28ERF	296	32.59	5.92	53.77	-0.719	Extracellular
29	Pn-29DREB	241	26.57	5.2	47.49	-0.56	Extracellular
30	Pn-30ERF	128	14.07	5.12	31.48	-0.722	Cytoplasmic
31	Pn-31RAV	380	42.49	9.27	48.33	-0.728	Outer membrane
32	Pn-32DREB	369	40.54	6.6	74.42	-0.717	Periplasmic
33	Pn-33DREB	345	38.78	8.71	54.2	-0.609	Periplasmic
34	Pn-34DREB	379	42.65	8.19	54.74	-0.587	Extracellular
35	Pn-35DREB	365	40.05	6.26	49.96	-0.503	Extracellular
36	Pn-36RAV	352	40.43	6.34	43.54	-0.527	Outer membrane
37	Pn-37ERF	111	12.17	9.07	76.71	-0.621	Periplasmic
38	Pn-38ERF	119	13.15	9.3	61.14	-0.637	Cytoplasmic
39	Pn-39ERF	275	30.05	7.9	57.22	-0.626	Extracellular
40	Pn-40AP2	557	62.31	6.97	55.09	-0.867	Extracellular
41	Pn-41DREB	154	17.46	8.93	54.38	-1.056	Cytoplasmic
42	Pn-42ERF	430	46.46	6.27	46.96	-0.543	Extracellular
43	Pn-43ERF	204	23.16	8.23	63.73	-0.705	Cytoplasmic
44	Pn-44ERF	206	23.25	7.91	60.38	-0.698	Extracellular
45	Pn-45ERF	188	21.32	6.53	55.84	-0.724	Cytoplasmic
46	Pn-46ERF	220	24.48	8.98	58.82	-0.637	Outer membrane
47	Pn-47ERF	134	15.35	5.19	33.34	-0.915	Cytoplasmic
48	Pn-48ERF	212	24.22	4.82	42.41	-0.588	Cytoplasmic
49	Pn-49ERF	135	15.76	6.96	28.37	-1.187	Cytoplasmic
50	Pn-50ERF	158	17.86	6.63	43.61	-0.96	Cytoplasmic
51	Pn-51RAV	225	25.37	5.38	58.99	-0.583	Extracellular
52	Pn-52ERF	384	43.33	4.97	52.22	-0.824	Cytoplasmic
53	Pn-53ERF	293	31.96	9.23	46.06	-0.41	Extracellular
54	Pn-54ERF	244	27.70	8.9	42.79	-0.978	Periplasmic
55	Pn-55S	256	29.33	8.73	58.17	-0.498	Extracellular
56	Pn-56ERF	235	25.96	5.28	70.62	-0.401	Cytoplasmic
57	Pn-57AP2	672	74.65	6.47	50.38	-0.763	Extracellular
58	Pn-58AP2	299	33.47	6.6	50.31	-0.642	Extracellular
59	Pn-59AP2	577	63.69	6.48	58.21	-0.653	Extracellular
60	Pn-60AP2	541	60.54	6.09	57.76	-0.877	Outer membrane
61	Pn-61AP2	671	74.00	5.85	45.97	-0.765	Extracellular
62	Pn-62ERF	379	41.92	4.91	36.84	-0.669	Periplasmic
63	Pn-63ERF	155	17.66	8.65	60.32	-1.126	Cytoplasmic
64	Pn-64AP2	154	17.57	9.89	60.83	-1.11	Periplasmic
65	Pn-65ERF	227	24.43	6.51	60.55	-0.512	Extracellular
66	Pn-66ERF	160	17.52	9.97	60.73	-0.5	Cytoplasmic
67	Pn-67ERF	301	32.85	9.67	46.68	-0.492	Extracellular
68	Pn-68ERF	221	23.70	8.01	45.4	-0.313	Cytoplasmic
69	Pn-69ERF	227	24.43	6.51	60.55	-0.512	Extracellular
70	Pn-70ERF	160	17.52	9.97	60.73	-0.5	Cytoplasmic
71	Pn-71ERF	221	23.70	8.01	45.4	-0.313	Cytoplasmic
72	Pn-72ERF	301	32.85	9.67	46.68	-0.492	Extracellular
73	Pn-73ERF	340	37.78	5.06	55.19	-0.646	Outer membrane
74	Pn-74ERF	310	35.15	5.47	47.46	-0.815	Extracellular
75	Pn-75ERF	251	28.21	5.49	35.77	-0.891	Extracellular
76	Pn-76DREB	238	25.99	5.99	63.53	-0.606	Extracellular
77	Pn-77DREB	260	28.02	5.04	52.6	-0.527	Extracellular
78	Pn-78DREB	257	27.84	4.88	54.94	-0.513	Extracellular
79	Pn-79DREB	255	28.15	6.47	45.23	-0.713	Extracellular
80	Pn-80ERF	199	22.06	7.71	57.97	-0.8	Cytoplasmic

Continued

No.	Protein ID	Amino acid (aa)	Molecular weight/kD	Isoelectric point	Instability index	GRAVY	Subcellular localization
81	Pn-81DREB	185	19.98	7.68	47.23	-0.891	Extracellular
82	Pn-82DREB	109	11.98	9.83	41.86	-0.714	Cytoplasmic
83	Pn-83DREB	210	23.34	6.9	33.18	-1.024	Extracellular
84	Pn-84DREB	292	31.03	4.99	53.48	-0.523	Extracellular
85	Pn-85ERF	109	11.87	10.12	31.71	-0.971	Extracellular
86	Pn-86ERF	155	17.10	10.16	47.55	-0.375	Cytoplasmic
87	Pn-87AP2	157	18.15	10.47	42.21	-1.124	Cytoplasmic
88	Pn-88ERF	291	32.36	8.84	52.68	-0.53	Extracellular
89	Pn-89ERF	344	38.04	5.66	56.23	-0.809	Extracellular
90	Pn-90ERF	140	15.83	10.09	34.54	-0.788	Cytoplasmic
91	Pn-91DREB	240	26.38	4.95	62.31	-0.536	Extracellular
92	Pn-92ERF	177	19.78	9.98	64.59	-0.783	Periplasmic
93	Pn-93DREB	261	28.87	4.41	44.47	-0.59	Extracellular
94	Pn-94DREB	274	30.83	6.05	57.63	-0.557	Extracellular
95	Pn-95DREB	172	19.51	10.13	49.04	-0.725	Periplasmic
96	Pn-96ERF	157	17.12	5.06	43.82	-0.497	Periplasmic
97	Pn-97AP2	410	46.48	5.36	56.53	-0.879	Extracellular
98	Pn-98ERF	205	23.50	5.32	67.32	-0.935	Cytoplasmic
99	Pn-99ERF	211	23.76	5.6	65.92	-0.782	Cytoplasmic
100	Pn-100ERF	231	26.61	4.73	63.01	-0.628	Cytoplasmic
101	Pn-101ERF	209	23.35	5.01	64.9	-0.67	Outer membrane
102	Pn-102ERF	154	17.05	9.59	55.38	-0.417	Cytoplasmic
103	Pn-103ERF	202	22.38	8.69	62.41	-0.766	Periplasmic
104	Pn-104ERF	287	32.91	5.45	57.85	-0.733	Cytoplasmic
105	Pn-105ERF	373	41.88	4.86	51.11	-0.603	Cytoplasmic
106	Pn-106ERF	375	41.64	4.9	52.02	-0.589	Cytoplasmic
107	Pn-107ERF	213	23.81	4.97	57.19	-0.618	Cytoplasmic
108	Pn-108ERF	226	24.50	9.85	47.88	-0.435	Periplasmic
109	Pn-109ERF	206	22.20	9.03	61.88	-0.537	Cytoplasmic
110	Pn-110S	215	23.68	5.11	54.32	-0.489	Extracellular
111	Pn-111ERF	260	28.61	4.2	49.59	-0.515	Cytoplasmic
112	Pn-112ERF	265	29.35	7.11	66.25	-0.808	Extracellular
113	Pn-113ERF	317	36.04	6.3	73.96	-1.086	Extracellular
114	Pn-114DREB	235	26.03	6.32	49.55	-0.678	Cytoplasmic
115	Pn-115DREB	189	20.92	5	38.73	-0.407	Cytoplasmic
116	Pn-116DREB	269	29.51	5.32	46.68	-0.709	Extracellular
117	Pn-117DREB	452	50.48	5.45	67.06	-0.827	Extracellular
118	Pn-118ERF	205	22.96	6.97	69.37	-0.624	Extracellular
119	Pn-119DREB	108	12.02	9.44	49.94	-0.536	Cytoplasmic
120	Pn-120DREB	334	37.28	5.6	38.04	-0.875	Extracellular
121	Pn-121ERF	168	18.86	9.57	60.1	-0.786	Cytoplasmic
122	Pn-122ERF	167	18.58	9.42	43.89	-0.829	Outer membrane
123	Pn-124ERF	418	47.43	10.16	47.81	-1.041	Extracellular
124	Pn-125ERF	214	23.89	8.22	62.02	-0.729	Cytoplasmic
125	Pn-126ERF	136	15.31	9.99	47.07	-0.651	Cytoplasmic
126	Pn-127ERF	170	18.99	8.08	42.12	-0.709	Cytoplasmic
127	Pn-128DREB	200	22.20	9.88	53.13	-0.695	Extracellular
128	Pn-129DREB	254	28.18	6.33	48.58	-0.261	Periplasmic
129	Pn-130ERF	335	37.27	4.64	47.47	-0.73	Extracellular
130	Pn-131DREB	144	16.15	9.33	29.25	-0.814	Periplasmic
131	Pn-132DREB	151	16.90	8.96	31.42	-0.919	Cytoplasmic
132	Pn-133DREB	155	16.84	8.7	40.57	-0.33	Cytoplasmic
133	Pn-134ERF	331	36.33	5.56	53.14	-0.502	Extracellular
134	Pn-135ERF	379	40.65	8.77	66.35	-0.603	Extracellular
135	Pn-136ERF	106	11.75	5.82	40.02	-0.581	Periplasmic
136	Pn-137ERF	326	36.66	6.13	27.32	-0.423	Outer membrane
137	Pn-138ERF	280	30.58	8.89	37.29	-0.795	Extracellular
138	Pn-139AP2	382	43.03	9.28	54.8	-0.614	Outer membrane
139	Pn-140AP2	99	11.42	10.23	36.34	-1.027	Cytoplasmic
140	Pn-123ERF	144	16.12	9.05	43.67	-0.625	Cytoplasmic

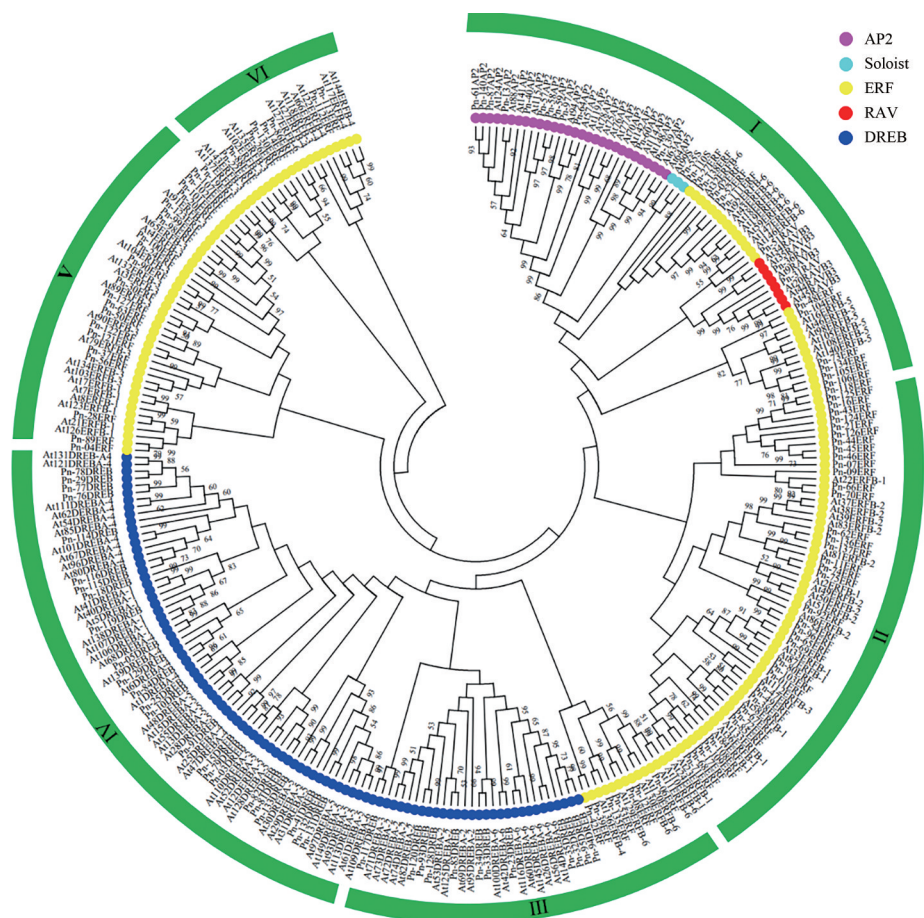


Figure 1 Phylogenetic analysis of *Panax notoginseng* and *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor family

#### 4 尖孢镰刀菌诱导下三七 AP2/ERF 转录因子表达分析

尖孢镰刀菌侵染 0、12、24、48、72、96 h, 三七 AP2/ERF 转录因子表达存在差异 (图 3)。基于转录组数据, 以  $|\log_2\text{Foldchange}| \geq 1$ ,  $\text{padj} < 0.05$  为标准进行差异基因的筛选, 从 140 个 *PnAP2/ERF* 基因中筛选出 34 个差异表达基因, 其中 *PnDREB* 亚家族成员 13 个, *PnERF* 亚家族成员 18 个, *PnAP2* 亚家族成员 1 个, *PnRAV* 亚家族成员 1 个, *PnSoloist* 亚家族成员 1 个。该家族表达模式大致可聚为 2 类: 随着侵染时间的延长表达下调和上调两种表达模式。 *PnERF* 亚家族 18 个差异表达基因中有 9 个基因在尖孢镰刀菌感染后表现为下调 (如 *PnERF9*、*PnERF21*、*PnERF26*、*PnERF42*); *PnDREB* 亚家族差异基因成员 6 个下调表达 (如 *PnDREB33*、*PnDREB78*、*PnDREB94*、*PnDREB115*), 7 个基因上调表达 (如 *PnDREB18*、*PnDREB29*、*PnDREB84*、*PnDREB91*); *PnAP2*、*PnRAV*、*PnSoloist* 亚族的差异基因表达均上调。其中 *PnDREB84* 基因在 0~96 h 范围内随着尖孢镰刀菌侵染时间的延长表达量持续增加, 选择该基因进行后续功能分析。

#### 5 低温胁迫下三七 *PnDREB84* 基因的表达分析

为了明确低温胁迫下三七 *PnDREB84* 基因表达情况, 运用 qRT-PCR 技术分析了低温条件下 (4 °C) *PnDREB84* 基因表达量。与对照相比 (25 °C 组), 4 °C 处理 6 h 后, 三七 *PnDREB84* 的表达量显著高于对照组; 低温处理 12 h 三七 *PnDREB84* 的表达量显著高于对照组 34 倍; 低温处理 24 h 三七 *PnDREB84* 的表达量显著高于对照组 20 倍; 而低温处理 48 h *PnDREB84* 相对表达量与对照组无显著差异 (图 4)。结果表明, *PnDREB84* 能快速响应 4 °C 低温胁迫, 且表达量依赖处理时间, 并且在低温处理 12 h 时 *PnDREB84* 表达量达到最高。

#### 6 低温胁迫下超表达 *PnDREB84* 基因的三七植株中 ABA 和 SA 含量升高

为了探究 *PnDREB84* 是否通过影响 ABA 或者 SA 的含量来增加三七的低温抗性, 分析低温处理下三七植株超表达 *PnDREB84* 基因的表达情况及 ABA 和 SA 内源激素的含量。结果表明, 低温胁迫处理 (4 °C) 0~48 h, 与对照组相比 (未表达基因植株, CK) 及表达空载的幼苗组 (P+1300), 超表达目的基因的三七幼苗



Figure 2 Analysis of conserved motifs of *P. notoginseng* and AP2/ERF transcription factor family

*PnDREB84* 基因表达量显著高于对照组 (图 5A)。超表达目的基因的三七幼苗内源激素 ABA 含量显著高出对照组及表达空载幼苗组 (P+1300) 的 45%~90% (图 5B)。低温处理后三七幼苗叶片中 SA 含量有明显积累 (图 5C), 超表达目的基因的三七植株中 SA 含量比对照组和空载组显著高 60%~80%。结果表明, *PnDREB84* 基因的高表达, 增加三七植株 SA 及 ABA 的含量。

## 讨论

本研究共鉴定到 140 个三 AP2/ERF 转录因子家族基因, 将其分为 5 个亚家族, 其中 DREB 类基因 36 个、ERF 类 87 个、AP2 类 12 个、RAV 类 3 个以及 Soloist 类

2 个基因。本结果与拟南芥、水稻、玉米等物种的研究结果类似, ERF 亚家族成员最多, 然后依次是 DREB、AP2、RAV 亚族, Soloist 类成员少数存在<sup>[6-9]</sup>。三七 AP2/ERF 转录因子家族成员的亚细胞定位与多数转录因子的情况一样, 大部分三七 AP2/ERF 蛋白位于细胞核内, 少部分存在于叶绿体、细胞质和细胞膜, 表明三七 AP2/ERF 蛋白的多个成员可能在三七的生长发育过程中行使不同功能。系统进化分析结果表明, PnAP2/ERF 转录因子家族成员在进化树上大致可以分为 8 个分支, 其中 ERF 亚家族成员并没有完整的聚集在一起而是分成了两部分, 这可能是因为各个转录因子功能不同而导致进化速度不同, 从而没有聚集在一起。Motif 预测分析结果表明, 三七 AP2/ERF 转录因子家族成员的 Motif 较多且较为复杂, 每个三七 AP2/ERF

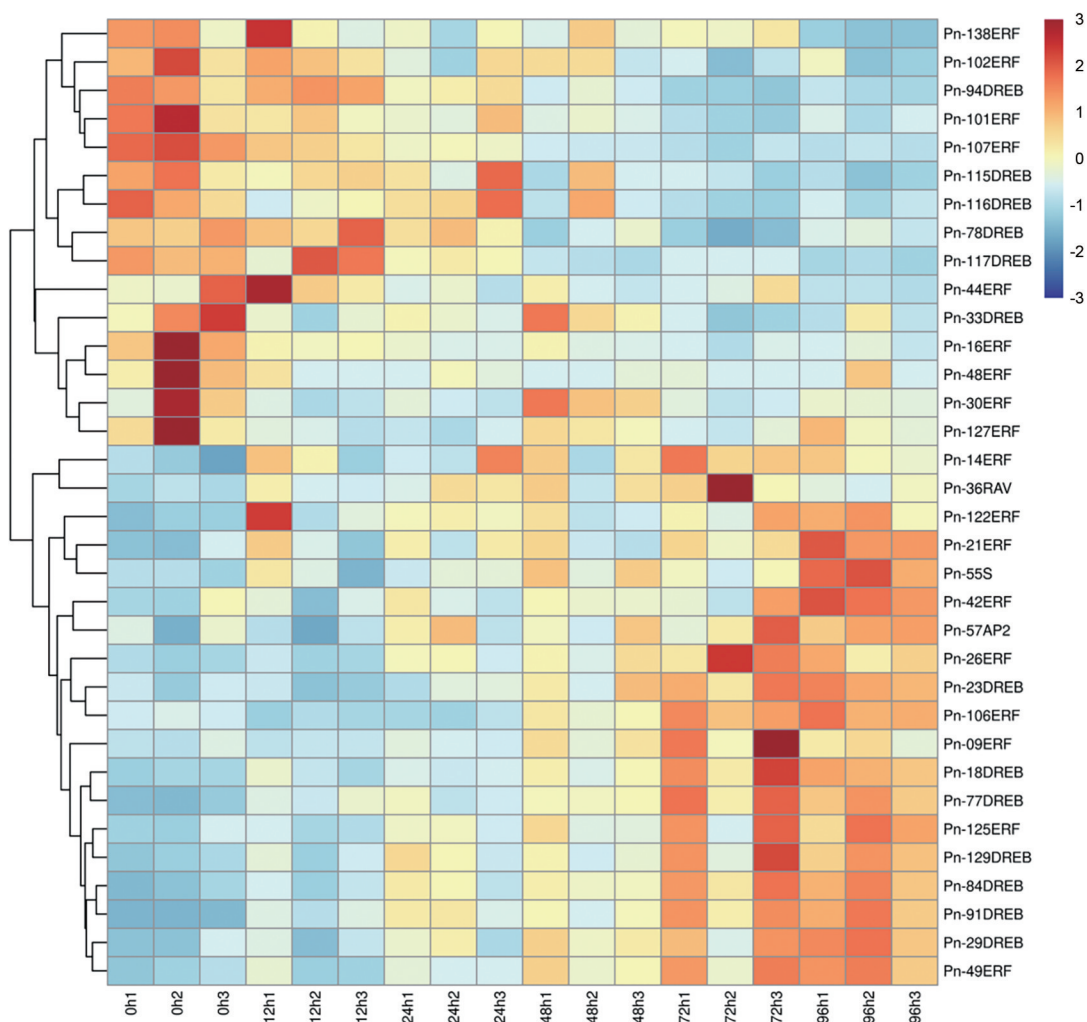


Figure 3 Heat map of AP2/ERF differential expression gene pattern of *Panax notoginseng*

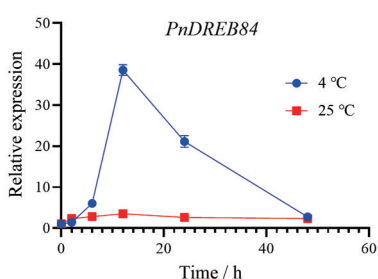


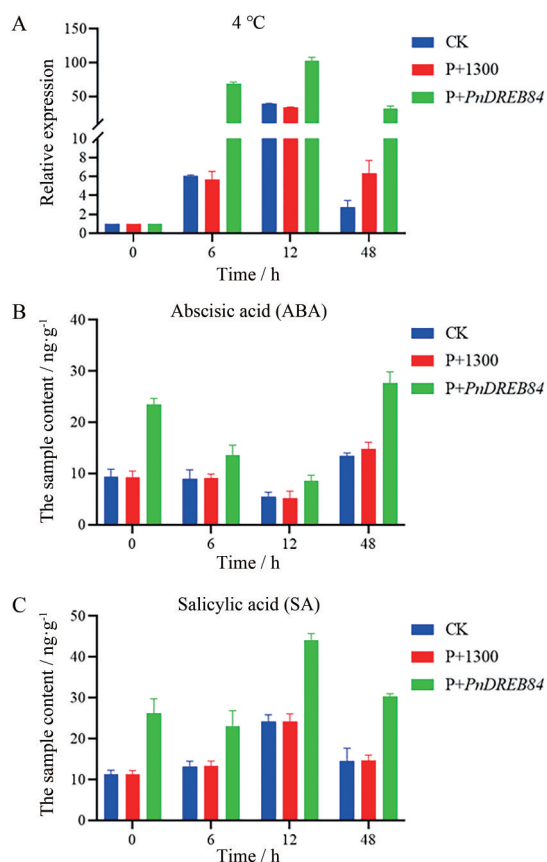
Figure 4 Expression analysis of *PnDREB84* gene in *Panax notoginseng* under low temperature stress

转录因子含有3~6个不等的保守基序, 其中Motif1和Motif2存在于所有PnAP2/ERF蛋白中, 推测Motif1和Motif2组成AP2结构域, 不同成员间保守基序的数量与分布不同可能揭示基因的不同功能。

在生物胁迫(尖孢镰刀菌)下, 三七AP2/ERF基因中有34个差异表达基因, 差异基因并没有表现出一致的上调或者下调, 暗示不同PnAP2/ERF基因在调控三七非生物胁迫过程中可能分工不同。生物胁迫下不同

AP2/ERF基因表现出差异性, 例如在番茄中AP2/ERF基因在抵抗灰霉病菌侵染过程中 *SIERF.A.1*、*SIERF.B.4*、*SIERF.C.3* 和 *SIERF.A.3* 表达量出现差异<sup>[11]</sup>, AP2/ERF家族基因在生物胁迫及非生物胁迫下功能具有多样性, 例如马铃薯中的 *ERF3* 基因参与抵抗黑胫病菌的侵染<sup>[28]</sup>, 拟南芥中的 *ERF1* 基因通过作用于乙烯信号传导上游成分参与对抗病原体<sup>[29]</sup>, *TaERF1* 结合GCC-box和DRE/CRT元件来调节小麦对非生物胁迫的反应<sup>[7]</sup>, 丹参中 *SmERF128* 基因能够调节丹参酮的合成<sup>[30]</sup>。三七中 *PnDREB84*、*PnERF49*、*PnDREB29*、*PnDREB91*、*PnERF125* 等基因随着侵染时间的延长基因表达量逐渐升高, 表明这些基因能够响应尖孢镰刀菌的侵染, 推测这些基因在三七对抗生物胁迫过程中发挥重要作用。为了探究该基因是否在三七生物胁迫和非生物胁迫中发挥双重调控作用, 选择生物胁迫下持续表达基因 *PnDREB84* 进行后续功能分析。

低温胁迫下, *PnDREB84* 基因表达量随着低温处



**Figure 5** Abscisic acid and salicylic acid contents of *PnDREB84* gene were over expressed at 4 °C. A: Changes of *PnDREB84* gene expression over time; B: Effect of *PnDREB84* on abscisic acid content at 4 °C; C: Effect of *PnDREB84* on salicylic acid content at 4 °C

理时间的延长先升高后降低,在第12 h其表达量是对照组的34倍,*PnDREB84*基因能够快速响应低温胁迫,猜想与该亚族能够和特异性元件结合有关,DREB转录因子通过识别与结合低温响应基因的启动子上顺式作用元件(A/GCCGAC)激活其表达<sup>[31]</sup>。在拟南芥中,存在3个冷诱导的DREB基因(*DREB1B*、*DREB1C*、*DREB1A*),这3个基因被认为是适应冷胁迫过程中的激活子<sup>[32]</sup>。水稻中,过表达*OSDREB6*基因增强了转基因水稻对低温的抗性。玉米的*ZmDREB1A*、*ZmDREB2A*基因也参与了低温信号转导途径<sup>[27]</sup>。

内源激素能响应多种非生物胁迫,是植物应对逆境压力的主要信号因子,能调节植物抵抗非生物逆境的过程<sup>[33]</sup>。超表达*PnDREB84*基因提高三七植株SA和ABA的含量,推测三七中*PnDREB84*基因可能通过参与SA和ABA的调控来响应低温进而提高其抗低温能力。有研究表明,在丹参中过表达*SmERF1L1*能够提高SA含量<sup>[34]</sup>,大豆中*GmERF75*能够响应ABA的调节提高其非生物胁迫的抗性<sup>[35]</sup>。结果表明,AP2/ERF转

录因子可参与激素调控进而提高植物的抗逆性。

综上所述,在三七中鉴定了140个AP2/ERF家族基因;尖孢镰刀菌处理三七植株,其AP2/ERF家族基因中有34个差异表达基因;*PnDREB84*基因的高表达增加三七ABA和SA激素的含量。初步表明,*PnDREB84*基因在生物胁迫和非生物胁迫过程中发挥双重调控作用,*PnDREB84*基因可作为三七抗逆新品种培育的潜在分子标记。本研究为三七抗逆机制解析、遗传育种及种质创新提供基础。

**作者贡献:** 张双华负责文章撰写及数据分析;侯聪、程宇飞负责实验设计及论文修改;宁康负责数据分析和实验材料的收集;汪鋆植指导文章撰写并提出修改意见;董林林负责论文设计及项目开展。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Feng K, Hou XL, Xing GM, et al. Advances in AP2/ERF superfamily transcription factors in plant [J]. Crit Rev Biotechnol, 2020, 40: 750-776.
- [2] Yue MF, Zhang C, Wu ZY. Advances in structure and function of plant transcription factor AP2/ERF family proteins [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2022, 38: 11-26.
- [3] Ji AJ, Luo HM, Xu ZC, et al. Research and prospect of transcription factor AP2/ERF in medicinal plants [J]. Chin Sci Bull (科学通报), 2015, 60: 1272-1284.
- [4] Zhang Q, Cheng J, Li L, et al. Advances in the AP2/ERF transcription factor family in plants [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2018, 34: 1-7.
- [5] Song X, Li Y, Hou X. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 573.
- [6] Xie Z, Nolan TM, Jiang H, et al. AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 228.
- [7] Riaz MW, Lu J, Shah L, et al. Expansion and molecular characterization of AP2/ERF gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Front Genet, 2021, 12: 632155.
- [8] Licausi F, Giorgi FM, Zenoni S, et al. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera* [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 719.
- [9] Hu L, Liu S. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the ERF gene family in cucumbers [J]. Genet Mol Biol, 2011, 34: 624-633.
- [10] Yan HW, Hong L, Zhou YQ, et al. A genome-wide analysis of the ERF gene family in sorghum [J]. Genet Mol Res, 2013, 12: 2038-2055.
- [11] Ouyang Z, Liu S, Huang L, et al. Tomato *SIERF.A1*, *SIERF.B4*, *SIERF.C3* and *SIERF.A3*, members of B3 group of ERF family,

- are required for resistance to *Botrytis cinerea* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1964.
- [12] Anderson JP, Young J, Singh KB. *AtERF14*, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143: 400-409.
- [13] Zhang Z, Wang J, Zhang R, et al. The ethylene response factor *AtERF98* enhances tolerance to salt through the transcriptional activation of ascorbic acid synthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2012, 71: 273-287.
- [14] Tang Y, Qin S, Guo Y, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in Physic Nut and overexpression of the *JcERF011* gene in rice increased its sensitivity to salinity stress [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e015-0879.
- [15] Chen T, Yang Q, Gruber M, et al. Expression of an alfalfa (*Medicago sativa* L.) ethylene response factor gene *MsERF8* in tobacco plants enhances resistance to salinity [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 6067-6075.
- [16] An JP, Zhang XW, Bi SQ, et al. The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in Apple [J]. *Plant J*, 2020, 101: 573-589.
- [17] Gambhir P, Singh V, Parida A, et al. Ethylene response factor *ERF.D7* activates auxin response factor 2 paralogs to regulate tomato fruit ripening [J]. *Plant Physiol*, 2022, 190: 2775-2796.
- [18] Wang MQ. The Role of Ethylene Response Factors 15 in Cold Resistance in Tomato (番茄乙烯响应因子ERF15在低温抗性中的作用) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [19] Hu C, Wei C, Ma Q, et al. Ethylene response factors 15 and 16 trigger jasmonate biosynthesis in tomato during herbivore resistance [J]. *Plant Physiol*, 2021, 185: 1182-1197.
- [20] Cai L, Peng P. Research progress on pharmacological action of *P. notoginseng* [J]. *Shandong Chem Ind (山东化工)*, 2021, 50: 70-71.
- [21] Wang L, Huang Y, Yin G, et al. Antimicrobial activities of Asian ginseng, American ginseng, and *P. notoginseng* [J]. *Phytother Res*, 2020, 34: 1226-1236.
- [22] Wang P, Yang L, Sun J, et al. Structure and function of rhizosphere soil and root endophytic microbial communities associated with root rot of *P. notoginseng* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 12: 752683.
- [23] Ma YN, Chen CJ, Li QQ, et al. Monitoring antifungal agents of *Artemisia annua* against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, associated with *P. notoginseng* root-rot disease [J]. *Molecules*, 2019, 24: 213.
- [24] Li JQ, Liu X, Wang S. Temperature and humidity control measures of modern *P. notoginseng* greenhouse [J]. *Heat Vent Air Condit (暖通空调)*, 2017, 47: 11-14.
- [25] Liu T, Chen J, Xu F, et al. Analysis of changes in the *Panax notoginseng* glycerolipidome in response to long-term chilling and heat [J]. *Plant Divers*, 2019, 42: 102-110.
- [26] Ou XH, Fang Y, Shi YN, et al. Double mulching application for *P. notoginseng* growing seedlings [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2014, 39: 566-571.
- [27] Velivelli SL, Lojan P, Cranenbrouck S, et al. The induction of ethylene response factor 3 (*ERF3*) in potato as a result of co-inoculation with *Pseudomonas* sp. R41805 and *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 - a possible role in plant defense [J]. *Plant Signal Behav*, 2015, 10: e988076.
- [28] Cheng MC, Liao PM, Kuo WW, et al. The *Arabidopsis* ethylene response factor1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals[J]. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1566-1582.
- [29] Zhang Y, Ji A, Xu Z, et al. The AP2/ERF transcription factor *SmERF128* positively regulates diterpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Mol Biol*, 2019, 100: 83-93.
- [30] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress [J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 251-264.
- [31] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al. 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: 998-1009.
- [32] Sobkowiak A, Jończyk M, Adamczyk J, et al. Molecular foundations of chilling-tolerance of modern maize [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 125.
- [33] Agurla S, Gahir S, Munemasa S, et al. Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1081: 215-232.
- [34] Huang Q, Sun M, Yuan T, et al. The AP2/ERF transcription factor *SmERF11* regulates the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Food Chem*, 2019, 274: 368-375.
- [35] Zhao MJ, Yin LJ, Liu Y, et al. The ABA-induced soybean ERF transcription factor gene *GmERF75* plays a role in enhancing osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* and soybean [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 506.