

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0025

雷雨晴, 张业猛, 王海庆. 扁蓿豆 *MrERF1* 的转录激活活性、亚细胞定位及表达分析. 草业科学, 2021, 38(6): 1119-1127.

LEI Y Q, ZHANG Y M, WANG H Q. Transcriptional activation, subcellular localization, and expression analysis of *MrERF1* from *Medicago ruthenica*. Pratacultural Science, 2021, 38(6): 1119-1127.

扁蓿豆 *MrERF1* 的转录激活活性、 亚细胞定位及表达分析

雷雨晴^{1,2}, 张业猛^{1,2}, 王海庆^{1,3}

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室 / 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海省作物分子育种重点实验室, 青海 西宁 810001)

摘要: 乙烯应答因子 (ethylene responsive factor, ERF) 广泛存在于植物中, 在植物生长、发育和逆境胁迫响应的调节中具有重要作用。本研究根据扁蓿豆 (*Medicago ruthenica*) 低温胁迫转录组测序信息, 设计特异性引物, 利用反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术克隆了一个受低温胁迫诱导表达的 ERF 转录因子基因 *MrERF1*。序列分析表明, *MrERF1* 基因包含了一个 948 bp 的开放阅读框, 编码由 316 个氨基酸组成的序列中含有一个高度保守的 AP2 结构域, 具有典型的 ERF 转录因子特征。遗传进化分析表明其与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) MtABR1 蛋白的同源性最高。构建表达 *MrERF1* 融合增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的载体, 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶片下表皮细胞瞬时表达结果证明 *MrERF1* 蛋白定位于细胞核。结果表明, 构建 pGBKT7-*MrERF1* 载体转化 AH109 酵母感受态细胞具有转录激活活性。对 *MrERF1* 在不同组织中的表达分析发现, 该基因在扁蓿豆的茎、叶、芽和花序中均有表达, 但在根中不表达。进一步分析发现, *MrERF1* 基因的转录与光周期和生物节律无关。此外, *MrERF1* 的表达受高盐、干旱、水淹、低温和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 诱导。本研究表明, *MrERF1* 能够响应多种非生物胁迫, 为进一步分析 *MrERF1* 的功能奠定了基础。

关键词: 扁蓿豆; ERF 转录因子; 亚细胞定位; 转录激活; 表达分析; 半定量反转录聚合酶链式反应; 非生物胁迫

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2021)06-1119-09

Transcriptional activation, subcellular localization, and expression analysis of *MrERF1* from *Medicago ruthenica*

LEI Yuqing^{1,2}, ZHANG Yemeng^{1,2}, WANG Haiqing^{1,3}

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota / Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, Qinghai, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Xining 810001, Qinghai, China)

Abstract: Ethylene responsive factors (ERFs) are widespread in plants and play a critical role in plant growth, development, and stress response. Here, based on RNA-sequence data of *Medicago ruthenica* under low temperature stress, we designed specific primers and cloned the *MrERF1* gene by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence analysis showed that the *MrERF1* gene contained a 948 bp open reading frame, encoding 316 amino acids. One highly conserved AP2 domain was found in *MrERF1*, indicating that it is a typical ERF transcription factor. Phylogenetic analysis

收稿日期: 2021-01-14 接受日期: 2021-04-06

基金项目: 青海省应用基础研究项目 (2017-ZJ-784); 国家自然科学基金 (31770365)

第一作者: 雷雨晴 (1996-), 女, 河南平顶山人, 在读硕士生, 研究方向为豆科牧草抗逆改良。E-mail: leiyuqing@nwipb.cas.cn

通信作者: 王海庆 (1971-), 男, 青海湟中人, 研究员, 博士, 研究方向为豆科牧草资源评价与抗逆改良。E-mail: wanghq@nwipb.cas.cn

<http://cykx.lzu.edu.cn>

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

showed that MrERF1 had the highest homology with MtABR1 in *M. truncatula*. A 35S::MrERF1:EGFP vector was constructed. Transient expression analysis in *Nicotiana benthamiana* demonstrated that MrERF1 is located in the nucleus. A pGBKT7-MrERF1 vector was constructed, and its transcriptional activation activity was verified in AH109 yeast cells. Spatial expression analysis revealed that *MrERF1* was expressed in the stems, leaves, buds, and inflorescences, but not in the roots. Further analysis showed that the transcription of *MrERF1* was not related to photoperiod or biological rhythm. The expression of *MrERF1* was induced under cold, salinity, dehydration, submergence, and abscisic acid (ABA) treatment. The present study demonstrates that *MrERF1* can respond to a variety of abiotic stresses, which paves the way for further study of the functions of *MrERF1*.

Keywords: *Medicago ruthenica*; ERF transcription factor; subcellular localization; transcriptional activity; expression analysis; semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; abiotic stress

Corresponding author: WANG Haiqing E-mail: wanghq@nwipb.cas.cn

干旱、寒冷、高盐和水淹等非生物胁迫是影响植物生长发育和地理分布的重要环境胁迫因子。当受到外界环境的胁迫时,植物会启动多种信号途径,激活转录因子的表达^[1]。转录因子通过调控一系列下游靶基因的表达在植物应对不利环境胁迫时发挥重要作用^[2]。植物在进化的过程中产生了脱落酸(abscisic acid, ABA)、钙离子和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等信号转导途径^[3]。ABA与植物干旱、高盐 and 寒冷等胁迫密切相关,除了通过调节植物的气孔和促进植物体内渗透调节物质的积累来帮助植物适应逆境胁迫外,还参与植物体内离子浓度平衡的调节^[4]。ABA信号转导途径可通过激活下游转录因子参与植物逆境胁迫调控^[5]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtABR1转录因子是参与调控ABA信号途径的乙烯应答因子(ethylene responsive factor, ERF)亚家族成员,Choi等^[6]研究表明MAP3K16可通过磷酸化激活AtABR1转录因子。

植物中抵抗逆境胁迫相关的转录因子有AP2(APETALA 2)/ERF、WRKY、MYB、NAC和bZIP等^[7]。AP2/ERF转录因子超家族是植物中最大的转录因子家族之一,包括AP2、ERF、RAV(Related to ABI3/VP1)、DREB(dehydration-responsive element binding protein)和Soloist亚家族。ERF亚家族仅包含一个保守的AP2结构域,可与下游基因启动子的GCC-box结合^[8],在植物响应病原菌侵染、高盐、干旱、损伤、低氧和高低温等胁迫时发挥重要调控作用^[9-10]。例如,外源性内皮素、ABA和钙离子可诱导簇毛麦(*Haynaldia villosa*) *ERF1-V*的表达,在小麦(*Triticum aestivum*)中过表

达*ERF1-V*提高了小麦对白粉菌的抗性和对盐、干旱胁迫的耐受性,表明*ERF1-V*通过参与生物和非生物胁迫的不同信号转导途径发挥作用^[11];Zhuo等^[12]从黄花苜蓿(*Medicago falcata*)中克隆到*MjERF1*基因,*MjERF1*的过表达增强了转基因植株的抗寒性和抗氧化活性,进一步研究表明*MjERF1*可通过调节多胺转运、提高抗氧化酶活性和促进脯氨酸积累来提高转基因植株的抗寒性。此外,ERF亚家族还参与植物的生长发育和代谢调控。例如,SmERF115是丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中次级代谢产物酚酸生物合成的正向调节转录因子,SmERF115通过与*SmRAS1*基因启动子中的GCC-box结合激活其表达来控制酚酸的生物合成^[13];拟南芥中的ERF亚家族成员AtABR1转录因子能够响应创伤信号并诱导生长素的合成,促进根的再生^[14]。解析ERF转录因子亚家族成员在植物逆境响应中的功能,对于揭示植物适应逆境机制和农作物抗逆改良具有重要的理论价值和应用前景。

扁蓿豆(*Medicago ruthenica*)为豆科(Leguminosae)苜蓿属矩荚苜蓿组的多年生草本植物^[15],分布于西伯利亚、蒙古国和我国北方高纬度高寒地区^[16-17]。其枝叶繁茂,叶片柔软,营养价值高,适口性好,与黄花苜蓿和紫花苜蓿(*Medicago sativa*)相比,扁蓿豆对包括干旱、寒冷等不利环境具有更强的耐受性,是有望在紫花苜蓿等苜蓿属栽培种无法越冬地区人工驯化利用的优质豆科牧草资源^[18]。赵丽丽等^[19]通过相对发芽率、相对活力指数和半致死渗透胁迫强度3个指标对扁蓿豆和黄花苜蓿进行抗旱性鉴定,结果表明在种子萌发期4份扁蓿豆种质材料的

抗旱性均强于黄花苜蓿;于洁等^[20]利用复盐溶液模拟盐胁迫对 10 份不同地区的野生紫花苜蓿和扁蓊豆材料进行耐盐性综合评价,通过灰色关联分析法和加权隶属函数法等分析表明,扁蓊豆萌芽期的耐盐性较紫花苜蓿强。

目前对扁蓊豆的抗逆性研究多集中在形态解剖、生长发育以及生理生化水平^[21-22],在分子水平上解释扁蓊豆适应极端逆境的机制,发掘逆境适应相关基因,对于苜蓿属栽培种的抗逆改良具有重要的参考价值。过去 10 年中,高通量测序技术的快速发展和检测成本的不断下降,为分离和分析非模式植物中逆境相关基因的功能提供了方便。本研究根据此前低温胁迫转录组测序分析结果,在对青藏扁蓊豆中的一个编码 AP2/ERF 转录因子基因 *MrERF1* 转录激活活性和亚细胞定位分析的基础上,对其在多种非生物胁迫下的表达模式进行了分析。所获得的结果为今后鉴定该基因在非生物胁迫下的功能提供了信息。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

扁蓊豆种子由中国农业科学院草原研究所孙启忠研究员提供。将种子用 98% 浓硫酸处理 8 min, 无菌水冲洗多次去除残余的硫酸后,置于铺有湿滤纸的培养皿上于 4 °C 暗处理 24 h, 而后转移到 21 °C、16 h 光照/8 h 黑暗条件下萌发。3 d 后将发芽种子移栽于蛭石:营养土(3:1)的混合基质中培养。生长 3 周后对幼苗进行非生物胁迫和脱落酸处理。将幼苗置于 4 °C、16 h 光照/8 h 黑暗条件的培养箱中进行低温处理;将整株幼苗洗净后,转移到铺有多层吸透 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液的吸水纸的培养皿中进行高盐胁迫处理;脱落酸处理将整株幼苗转移到铺有多层吸水纸的培养皿中,用含有 0.05% Tween20 (V/V) 的 50 μmol·L⁻¹ 脱落酸溶液喷雾后,封盖以防植株脱水;干旱处理将整株幼苗转移到培养皿中,在室温条件下进行自然脱水;水淹处理将整株幼苗转移到培养皿中并淹没于水中;对照组将整株幼苗转移到铺有多层吸水纸的培养皿中。上述处理在不同时间分别对整株幼苗、幼苗地上部分和根进行取样,液氮速冻后于 -80 °C 冰箱中保存备用。此外,将处于

开花期的扁蓊豆植株于 4 °C 处理 8 h 后,收集根、茎、叶、顶芽和花序样品,用于不同器官中的基因转录水平检测。

1.2 *MrERF1* 基因 cDNA 克隆与序列分析

总 RNA 提取使用 TRIzol 试剂进行,提取的总 RNA 按照说明利用 Recombinant DNase I (TaKaRa, 大连) 处理去除基因组 DNA, cDNA 第一链的合成按照 M-MuLV 逆转录试剂盒(生工,上海)的说明操作。根据本实验室前期扁蓊豆低温胁迫转录组测序结果,设计正向引物 MrERF-F(5'-TGAAGAGGGACAAG AACTATCG-3') 和反向引物 MrERF-R(5'-AATCA TAACGGAAGTAGGGACC-3'),以 4 °C 处理 8 h 幼苗的 cDNA 为模板,使用 *Pyrobest* DNA 聚合酶(TaKaRa, 大连)进行扩增,扩增产物胶回收后,连接到 pBluescript II SK+/-载体进行测序。

利用 DNAMAN8.0 软件分析核酸序列、编码的氨基酸序列以及开放阅读框;通过 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行蛋白序列相似性检索,利用网址 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 查找保守结构域;利用 WoLF PSORT 网站 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 进行核定位信号预测^[23];ExPASy 的 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 用于对蛋白质理化性质进行分析;通过 SignalP5.0 Server 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测该蛋白是否有信号肽;在拟南芥网站 (<https://www.arabidopsis.org>) 进行 MrERF1 保守结构域序列的相似性检索;通过 MEGA7.0 软件中 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,对各个节点的检验使用自举法(Bootstrapping),程序重复 1 000 次,其他参数默认。

1.3 转录激活活性验证

根据已测序的 *MrERF1* cDNA 序列设计含 *EcoR* I 位点的正向引物 ERF1 (5'-GAATTCGGATCCATGCCATTGCCAATGATGTT-3') 和反向引物 ERF2 (5'-GAATTCGAGCTCTCACCTGAGGGAGAGGAGCT-3'),扩增 *MrERF1* 基因编码区。扩增的片段测序确认后用 *EcoR* I 酶切,将酶切后的片段插入到经 *EcoR* I 酶切后并使用热敏磷酸酶(NEB, 北京)处理的 pGBKT7 (BD Biosciences, 美国)酵母表达载体内,转化 DH5α 大肠杆菌感受态,挑选阳性克

隆提取质粒,酶切鉴定后,获得重组的酵母表达载体 pGBKT7-MrERF1。

通过 PEG/LiAc 法^[24]将 pGBKT7-MrERF1 转化进入酵母 AH109 感受态细胞 (Clontech, 美国),同时转化 pGBKT7 空质粒为阴性对照,涂布在 SD/-Trp 固体培养基中。培养 3 d 后挑取单菌落重悬于 100 μ L 灭菌 ddH₂O 中,分别取 2 μ L 重悬液点在 SD/-Trp 及含 X- α -gal (Solarbio, 北京)的 SD/-His 固体培养基上,根据菌落生长情况及是否变蓝来验证 *MrERF1* 的转录激活活性。

1.4 亚细胞定位分析

根据已测序的 *MrERF1* cDNA 序列设计含 *Bam*H I 位点的正向引物 MrERF1 (5'-GAATTCGGATCCATGCCATTGCCAATGATGTTT-3') 和含 *Kpn*I 位点的反向引物 MrERF2 (5'-GAATTCGGTACCTGAGGGAGAGGAGCTATATC-3'), 扩增 *MrERF1* 基因编码区。扩增的片段测序确认后用 *Bam*H I 和 *Kpn*I 双酶切,将酶切后的片段插入到经 *Bam*H I/*Kpn*I 双酶切的 PBI121-EGFP 载体内,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态,挑选阳性克隆提取质粒,酶切鉴定后,获得重组表达载体 35S::MrERF1:EGFP。

将构建好的 35S::MrERF1:EGFP 重组载体及 35S::EGFP 阴性对照载体分别转化农杆菌 C₅₈C₁ 感受态细胞。挑选阳性单克隆菌落于含 50 μ g·mL⁻¹ Kan 和 25 μ g·mL⁻¹ Gent 的 LB 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 震荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6。离心收集菌体,用 0.5 mol·L⁻¹ 的 2-N-吗啡乙磺酸 (2-morpholinoethanesulfonic acid, MES) (pH = 5.7)、1 mol·L⁻¹ 的 MgCl₂ 和 100 mmol·L⁻¹ 的乙酰丁香酮 (pH = 5.7) 配制的溶液重悬菌体使重悬液 OD₆₀₀ 为 0.5。用无针头注射器吸取重悬液于叶背面注入生长 3 周的本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶片内,在黑暗条件下培养 3 d 后于荧光显微镜下观察叶片细胞中荧光的分布。

1.5 *MrERF1* 基因的表达分析

在不同非生物胁迫和 ABA 处理下分别用整株扁蓿豆幼苗、幼苗的地上部分和根为样品分析 *MrERF1* 的表达。将材料中所述样品合成 cDNA,稀释至 100 ng· μ L⁻¹ 为模板,用 *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, 大连) 进行半定量 RT-PCR,反应体系 20 μ L。扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退

火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共计 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。*MrERF1* 基因的上游引物和下游引物分别为 MrERF-F (5'-TGAAGAGGGACAAGAAGTATCG-3') 和 MrERF-R (5'-AATCATAACGGAAGTAGGGACC-3'), *Actin* 基因的上游引物和下游引物分别为 MrActin-F (5'-TGCTTCTAACTGAGGCTCCACT-3') 和 MrActin-R (5'-AAAGGACTTCTGGGCAACG-3')。反应完成后使用浓度为 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *MrERF1* 基因的克隆和生物信息学分析

根据已有的扁蓿豆转录组测序数据设计引物,采用反转录聚合酶链式反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法从低温处理 8 h 的扁蓿豆幼苗中扩增得到约 1 200 bp 的特异片段,将其命名为 *MrERF1* (GenBank 登录号:MW600721)。测序结果显示该 cDNA 长 1 225 bp,开放阅读框为 948 bp,编码 316 个氨基酸。*MrERF1* 的氨基酸序列在 NCBI 网站上查询,发现 *MrERF1* 含有 1 个 AP2 保守结构域 (图 1A),具有 ERF 转录因子亚家族成员的特性,与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、大豆 (*Glycine max*)、红车轴草 (*Trifolium pratense*)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) 等豆科植物 ERF 家族成员高度同源;对 *MrERF1* 的核定位序列预测表明,在 78~81 位 (KRRR)、141~147 位 (PKRKYRG) 存在核定位信号 (图 1A);用 DNAMAN8.0 软件进行的氨基酸序列比对结果显示 (图 1A),比对的序列均含有一个 AP2 保守结构域,其中与蒺藜苜蓿同源蛋白的相似性达 91%。采用 ProtParam 工具预测 *MrERF1* 蛋白的分子量为 35.05 kDa、理论等电点为 6.45,其中阴性氨基酸 (Asp + Glu) 30 个、阳性氨基酸 (Arg + Lys) 28 个,总平均亲水性 -0.81,属于亲水性蛋白。信号肽预测结果表明,*MrERF1* 不含信号肽。

用 MEGA7.0 对豆科同源 ERF 蛋白氨基酸序列构建系统进化树 (图 1B),表明 *MrERF1* 与蒺藜苜蓿 ERF 蛋白的亲缘关系最近。在拟南芥网站对 *MrERF1* 保守结构域进行序列相似性检索,用 MEGA7.0 对拟南芥同源蛋白的 AP2 保守结构域序列构建系统进化树 (图 1C),表明 *MrERF1* 与拟南芥中 AtABR1 同源性最高。

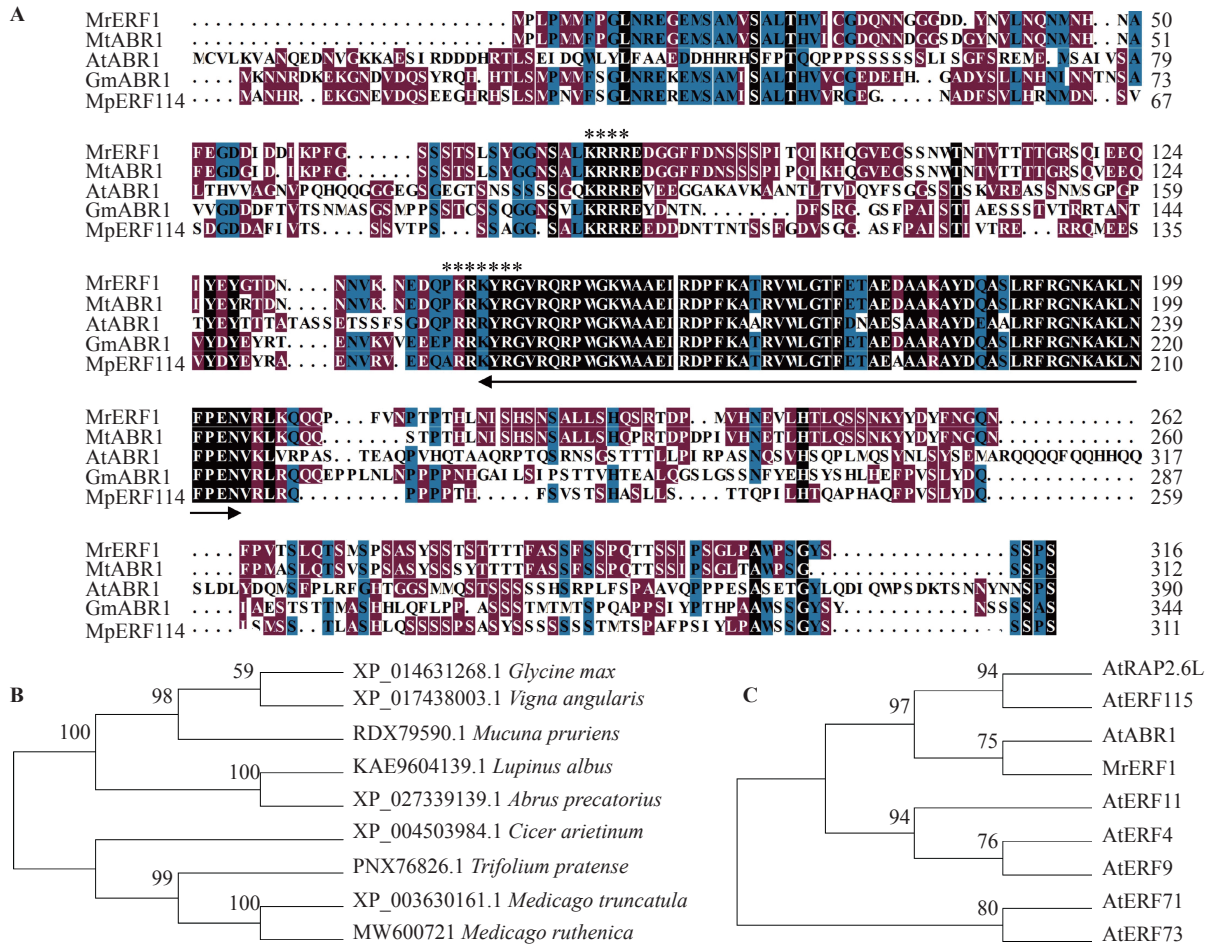


图 1 MrERF1 序列分析

Figure 1 Sequence analysis of MrERF1

(A) MrERF1 和豆科同源 ERF 蛋白的氨基酸序列比对。其中蛋白登录号为 MrERF1: 扁蓿豆 (MW600721); MtABR1: 蒺藜苜蓿 (XP_003630161.1); AtABR1: 拟南芥 (OAO91942.1); GmABR1: 大豆 (XP_014631268.1); MpERF114: 刺毛黧豆 (RDX79590.1); 双箭头标注的为 AP2 保守结构域; 星形标注的为 MrERF1 预测的核定位序列。(B) MrERF1 和豆科同源 ERF 蛋白基于全长氨基酸序列构建的系统进化树, 其中 *Glycine max*: 大豆; *Vigna angularis*: 赤豆; *Mucuna pruriens*: 刺毛黧豆; *Lupinus albus*: 白羽扇豆; *Abrus precatorius*: 相思子; *Cicer arietinum*: 鹰嘴豆; *Trifolium pratense*: 红车轴草; *Medicago truncatula*: 蒺藜苜蓿; *Medicago ruthenica*: 扁蓿豆。(C) MrERF1 与同源的仅含 AP2 结构域的拟南芥 ERF 蛋白构建的系统进化树。其中蛋白登录号为 AtRAP2.6L: OAO93644.1; AtERF71: NP_182274.1; AtABR1: OAO91942.1; AtERF11: ANM58405.1; AtERF4: AAM98171.1; AtERF9: NP_199234.1; AtERF73: NP_001077812.1; AtERF115: NP_196348.1。

(A) Amino acid sequence alignment of MrERF1 and homologous ERF proteins in Leguminosae. MrERF1: *Medicago ruthenica* (MW600721); MtABR1: *Medicago truncatula* (XP_003630161.1); AtABR1: *Arabidopsis thaliana* (OAO91942.1); GmABR1: *Glycine max* (XP_014631268.1); MpERF114: *Mucuna pruriens* (RDX79590.1); The AP2 domain is labeled by a double arrow; the predicted nuclear localization sequence of MrERF1 is labeled by asteroids. (B) Phylogenetic tree based on the full-length amino acid sequence of MrERF1 and homologous ERF proteins of Leguminosae. (C) Phylogenetic tree based on the AP2 domain-only proteins of MrERF1 and homologous ERF proteins of *Arabidopsis thaliana*. AtRAP2.6L: OAO93644.1; AtERF71: NP_182274.1; AtABR1: OAO91942.1; AtERF11: ANM58405.1; AtERF4: AAM98171.1; AtERF9: NP_199234.1; AtERF73: NP_001077812.1; AtERF115: NP_196348.1.

2.2 MrERF1 转录激活活性分析

将转 pGBKT7-MrERF1 质粒和 pGBKT7 质粒的酵母菌液分别点在 SD/-Trp 和含 X-α-gal 的 SD/-His 固体培养基上培养 3 d 后, 酵母生长情况如图 2 所示。在 SD/-Trp 固体培养基上, 转化质粒的两个酵母均能够正常生长; 在含 X-α-gal 的 SD/-His 固体培

养基上, 转 pGBKT7 质粒的酵母不能正常生长, 而转 pGBKT7-MrERF1 质粒的酵母能够正常生长并且变蓝。

2.3 MrERF1 蛋白的亚细胞定位

本氏烟草叶片瞬时表达结果显示 (图 3), 35S 驱动下的增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent

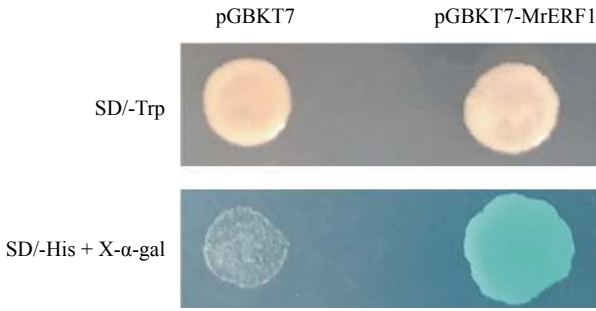


图 2 MrERF1 转录激活活性验证

Figure 2 Validation of MrERF1 transcriptional activation activity

protein, EGFP) (35S::EGFP) 的荧光信号分布于整个叶片细胞中, 而 MrERF1 与 EGFP 的融合蛋白 (35S::MrERF1:EGFP) 其荧光信号分布于叶片细胞核上。亚

细胞定位结果表明, MrERF1 转录因子定位于细胞核。

2.4 MrERF1 表达模式分析

2.4.1 MrERF1 在不同组织中及光周期下的表达

此前转录组测序分析发现 *MrERF1* 受到低温诱导表达, 为了揭示不同组织中 *MrERF1* 的表达情况, 以 4 °C 处理 8 h 的扁蓊豆各组织为样品进行半定量 RT-PCR 分析。结果显示 (图 4A), *MrERF1* 不在根中表达, 在茎、叶、芽和花序中均有表达。由于植株地上部分易受到光刺激, 为了探究 *MrERF1* 的表达是否受光周期或者生物节律的影响, 对室温下正常生长的扁蓊豆植株地上部分组织进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明 (图 4B), *MrERF1* 的表达不受光周期或生物节律的调节。

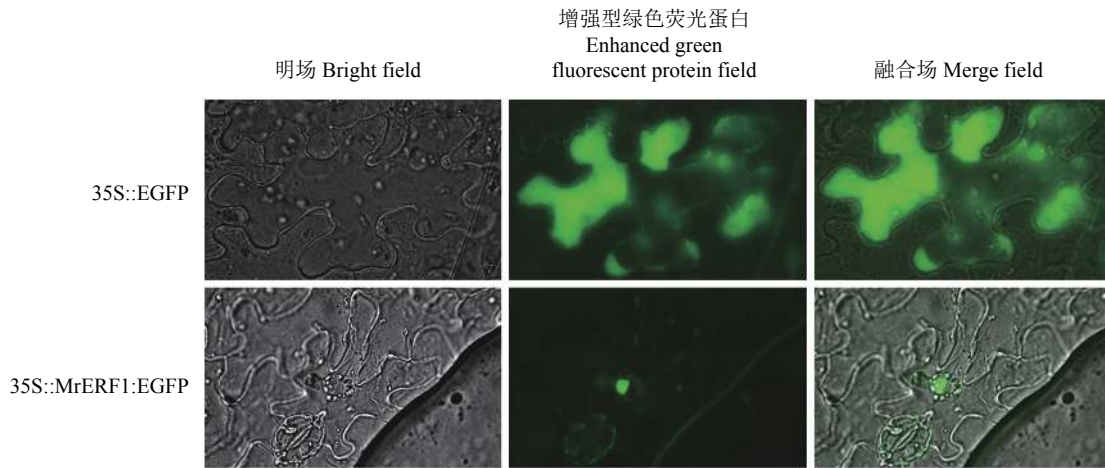


图 3 MrERF1 的亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of MrERF1

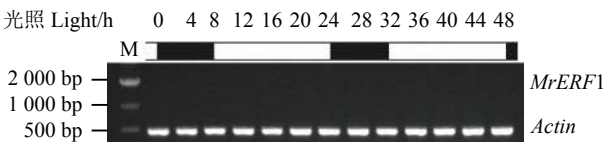
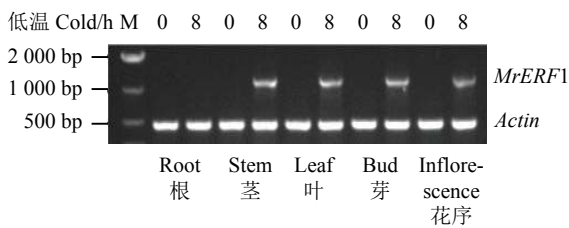


图 4 MrERF1 基因在各组织中及光周期下的表达

Figure 4 Expression of MrERF1 in various tissues and photoperiod

M, Marker; this is applicable for Figure 5 as well.

2.4.2 MrERF1 在不同非生物胁迫和 ABA 处理下的表达

为了进一步探讨不同非生物胁迫和 ABA 处理对 *MrERF1* 表达的影响, 对低温、高盐、干旱、水淹和 ABA 处理以及对照组的整株扁蓊豆幼苗进行半定量 RT-PCR 分析。结果显示 (图 5A), 除对照组外 *MrERF1* 的表达均受到了诱导, 并且其表达均呈现先上调后下调的趋势; 在 ABA、水淹、高盐、干旱和低温处理后 *MrERF1* 受到诱导开始表达的时间分别为 0.5、0.5、1、1、8 h。

此外, 之前的研究表明, 在低温处理下 *MrERF1* 不在根中表达, 因此对扁蓊豆幼苗进行除低温外的 ABA、高盐、干旱和水淹处理后, 分别以幼苗的根和地上部分为样品对 *MrERF1* 转录本检测发

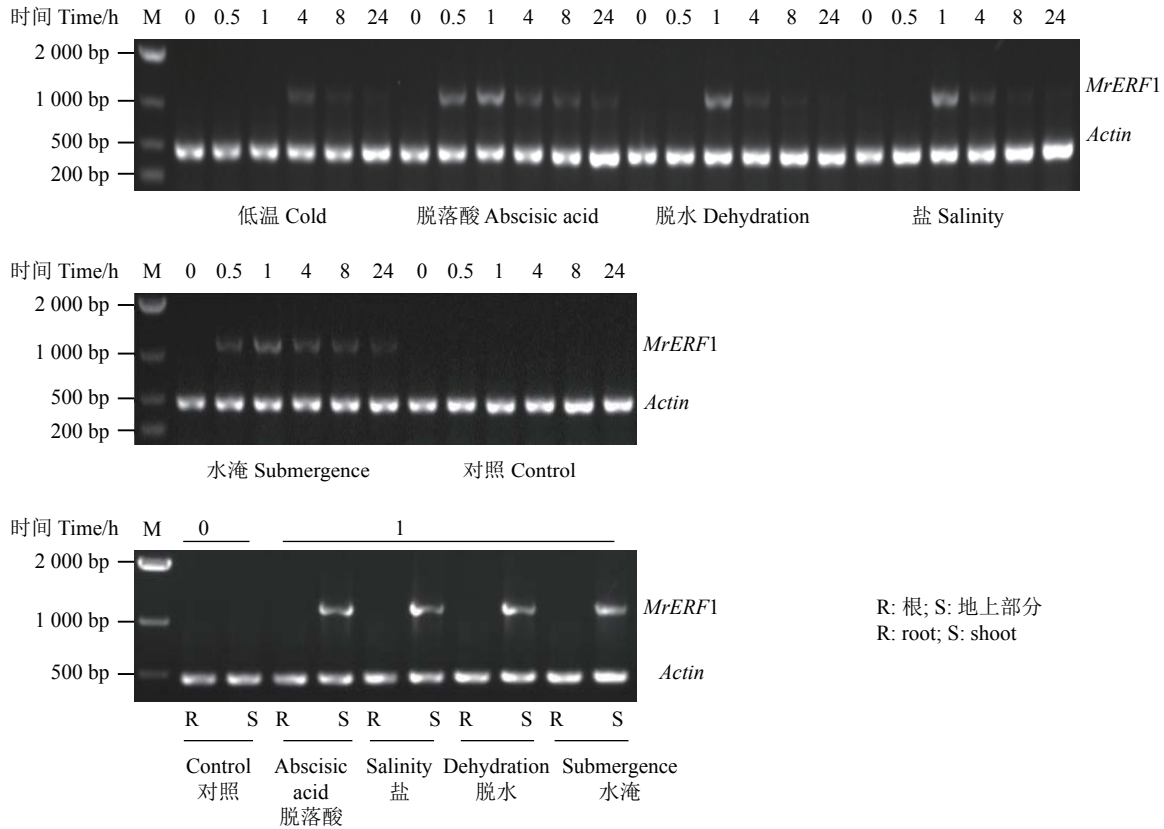


图 5 *MrERF1* 基因在不同非生物胁迫和 ABA 处理下的表达
 Figure 5 Transcription response of *MrERF1* gene to abiotic stress and ABA treatment

现 (图 5B), 不同处理下 *MrERF1* 在扁蓿豆幼苗的地上部分表达, 不在根中表达。

3 讨论与结论

本研究从低温处理 8 h 的扁蓿豆中克隆到了 *MrERF1* 基因, 对其编码的蛋白序列进行同源比对分析, 结果表明其含有一个保守的 AP2 结构域, 属于 ERF 亚家族。与拟南芥中同源 ERF 蛋白的 AP2 结构域构建系统进化树表明, *MrERF1* 与拟南芥中 *AtABR1* 同源性最高。在酵母中的研究结果表明, 报告基因 *HIS* 和 *LacZ* 的转录被激活, *MrERF1* 与拟南芥 *AtABR1*^[25] 相同且具有转录激活活性, 而其激活活性序列在 N 端或 C 端有待进一步研究。亚细胞定位结果表明 *MrERF1* 属于核定位蛋白, 与 *AtABR1* 蛋白的亚细胞定位结果一致^[26], 具有典型的转录因子特性。

MrERF1 的组织特异性表达分析结果与 *AtABR1* 不同。*MrERF1* 不在根中表达, 在茎、叶、芽和花序中均有表达且不受光周期或生物节律的调节; 而 *AtABR1* 在拟南芥所有器官中均表达, 在角果和种子

中的表达量非常低^[27]。张文慧等^[28]对白桦 (*Betula platyphylla*) *bERF1/2/3* 的 3 个基因研究表明, 在高盐胁迫下, *bERF1* 基因在根、茎、叶中的表达均呈下调趋势; *bERF2* 的表达在叶中呈上调趋势、根中呈下调趋势而在茎中无明显变化; *bERF3* 的表达在茎和叶中呈上调趋势, 在根中无明显变化。这表明, 尽管这些基因均属于 ERF 亚家族成员, 但在不同植物组织中的表达模式存在差异, 在植物生长发育过程中发挥着不同的功能。

拟南芥 *AtABR1* 蛋白最初被 Pandey 等^[27] 报道为 ABA 信号通路负调控因子, 在拟南芥中 *AtABR1* 蛋白是与 *MrERF1* 同源性最高的 ERF 蛋白。本研究表明在 ABA、脱水、高盐和低温处理下, *MrERF1* 的表达均受到了诱导, 这与 Pandey 等^[27] 对相同处理下 *AtABR1* 表达的研究结果一致, 表明 *MrERF1* 蛋白与 *AtABR1* 蛋白可能具有同源功能。最近 Bäumlner 等^[29] 研究表明 *AtABR1* 还受到水淹诱导表达。与 Pandey 等^[27] 研究结果不同的是, Bäumlner 等^[29] 认为 *AtABR1* 不参与 ABA 信号转导并且与干旱胁迫响应无关, 而是幼苗从花盆中取出时受到损伤诱导其表

达,因此本研究在对扁蓿豆进行处理时使用整株幼苗且轻柔操作避免幼苗受到损伤胁迫,高盐和 ABA 处理的幼苗避免受到水淹胁迫。半定量 RT-PCR 结果显示,对照组中 *MrERF1* 的表达没有受到诱导,这表明不同处理下 *MrERF1* 的表达没有受到损伤诱导的影响,因此推测 *MrERF1* 基因参与了依赖于 ABA 的逆境胁迫信号转导途径,这更倾向于 Pandey 等^[27] 的研究结果。水淹是一种复合胁迫,除了会引发低氧胁迫外还可能引起植物营养缺乏、机械胁迫和增加感染风险等^[30]。当植物遭受水淹时会迅速积累高水平的植物激素乙烯引发进一步的信号级联^[31],因此还可对扁蓿豆进行乙烯、茉莉酸甲酯和水杨酸等处理进一步分析 *MrERF1* 的表达。

综上所述,本研究克隆了扁蓿豆 ERF 转录因子基因 *MrERF1*, 开放阅读框为 948bp, 编码 316 个氨基酸。*MrERF1* 编码的蛋白定位于细胞核且具有转录激活活性。半定量 RT-PCR 结果表明 *MrERF1* 的转录与光周期和生物节律无关且存在组织特异性表达;*MrERF1* 受到高盐、干旱、水淹、低温和脱落酸的诱导表达。尽管 *MrERF1* 在扁蓿豆的发育过程中的调控作用仍未知,但可以推测 *MrERF1* 在调节扁蓿豆抵抗干旱、高盐、低温等非生物胁迫中行使了一定的功能。本研究为 *MrERF1* 转基因功能验证奠定了基础,有助于进一步揭示扁蓿豆非生物胁迫响应的分子机制,对扁蓿豆抗逆种质资源的进一步应用及苜蓿属牧草的抗逆育种具有重要意义。

参考文献 References:

- [1] GONG Z Z, XIONG L M, HUA Z S, SHI H Z, YANG S H, HERRERA-ESTRELLA L R, XU G H, CHAO D Y, LI J Y, WANG P Y, QIN F, LI J J, DING Y L, SHI Y T, WANG Y, YANG Y Q, GUO Y, ZHU J K. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Science*, 2020, 63(5): 635-674.
- [2] SHU Y J, LIU Y, ZHANG J, SONG L L, GUO C H. Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily genes and their responses to abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1247.
- [3] GOLLDACK D, LI C, MOHAN H, PROBST N. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 1-10.
- [4] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324.
- [5] ANYONI R, CHINNUSAMY V, RODRIGUES A, RUBIO S, ANTONI R, PARK S Y, CUTLER S R, SHEEN J, RODRIGUEZ P L, ZHU J K. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*, 2009, 462: 660-664.
- [6] CHOI S W, LEE S B, NA Y J, JEUNG S G, KIM S Y. *Arabidopsis* MAP3K16 and other salt-inducible MAP3Ks regulate ABA response redundantly. *Molecules and Cells*, 2017, 40(3): 230-242.
- [7] PEREZ-RODRIGUEZ P, RIANO-PACHON D M, CORREA L G G, RENSING S A, KERSTEN B, MUELLER-ROEBER B. PlnTFDB: Updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(S1): D822-D827.
- [8] SHOJI T, MISHIMA M, HASHIMOTO T. Divergent DNA-binding specificities of a group of ethylene response factor transcription factors involved in plant defense. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 977-990.
- [9] MULLER M, MUNNE-BOSCH S. Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 32-41.
- [10] MIZOI J, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1819(2): 86-96.
- [11] XING L P, DI Z C, YANG W W, LIU J Q, LI M N, WANG X J, CUI C F, WANG X Y, WANG X E, ZHANG R Q, XIAO J, CAO A Z. Overexpression of ERF1-V from *Haynaldia villosa* can enhance the resistance of wheat to powdery mildew and increase the tolerance to salt and drought stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1-14.
- [12] ZHUO C L, LIANG L, ZHAO Y Q, GUO Z F, LU S Y. A cold responsive ethylene responsive factor from *Medicago falcata* confers cold tolerance by up-regulation of polyamine turnover, antioxidant protection, and proline accumulation. *Plant Cell and Environment*, 2018, 41(9): 2021-2032.
- [13] SUN M, SHI M, WANG Y, HUANG Q, YUAN T, WANG Q, WANG C, ZHOU W, KAI G. The AP2/ERF transcription factor

- SmERF115 positively regulates the biosynthesis of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 70(1): 243-254.
- [14] YE B B, SHANG G D, PAN Y, XU Z G, ZHOU C M, MAO Y B, BAO N, SUN L J, XU T D, WANG J W. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration. *The Plant Cell*, 2020, 32(1): 226-241.
- [15] 吴征镒. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1998: 318-320.
WU Z Y. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Beijing: Chinese Science Publishing, 1998: 318-320.
- [16] SMALL E, JOMPHE M. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany*, 1989, 67(11): 3260-3294.
- [17] CAMPBELL T A, BAO G, XIA Z L. Agronomic evaluation of *Medicago ruthenica* collected in Inner Mongolia. *Crop Science*, 1997, 37(2): 599-604.
- [18] 乌云飞, 玉柱, 石凤翎. 直立型扁蓿豆的选育及其生物学特性的研究. 内蒙古草业, 1993, 3(Z1): 51-53.
WU Y F, YU Z, SHI F L. Breeding and biological characteristics of a cultivar of *Medicago ruthenica* (L.) Sojak cv. 'Zhilixing'. *Inner Mongolia Prataculture*, 1993, 3(Z1): 51-53.
- [19] 赵丽丽, 王照兰, 杜建材, 李青丰, 王普昶. 扁蓿豆不同种质材料种子萌发期抗旱性比较. 种子, 2007, 26(12): 13-16.
ZHAO L L, WANG Z L, DU J C, LI Q F, WANG P C. Comparison on drought resistances of several *Melilotoides ruthenica* materials at seed germination and seedling stage. *Seed*, 2007, 26(12): 13-16.
- [20] 于洁, 闫利军, 冀晓婷, 穆怀斌, 米福贵, 李鸿雁. 苜蓿和扁蓿豆萌发期耐盐指标筛选及耐盐性综合评价. 植物遗传资源学报, 2017, 18(3): 449-460.
YU J, YAN L J, JI X T, MU H B, MI F G, LI H Y. Evaluation of salt tolerance and screening for salt tolerant accessions of *Medicago sativa* and *Medicago ruthenica* at germination stage. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(3): 449-460.
- [21] 李鸿雁, 李志勇, 师文贵, 李兴酉, 刘磊. 6 种豆科牧草叶片解剖性状与抗旱性关系研究. 西北植物学报, 2010, 30(10): 1989-1994.
LI H Y, LI Z Y, SHI W G, LI X Y, LIU L. Leaf anatomic indexes and the relations with drought resistance of the six forage of Leguminosae. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(10): 1989-1994.
- [22] 于洁, 米福贵, 李鸿雁, 蔡丽艳, 解永凤, 黄帆, 戴军. 五份扁蓿豆种质材料种子萌发期耐盐性鉴定. 中国草地学报, 2014, 36(5): 71-75.
YU J, MI F G, LI H Y, CAI L Y, XIE Y F, HUANG F, DAI J. Evaluation of salt resistance of five *Medicago ruthenica* accessions during seed germination. *Chinese Journal of Grassland*, 2014, 36(5): 71-75.
- [23] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, FUJITA N, HARADA H, ADAMS-COLLIER C J, NAKAI K. WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2): 585-587.
- [24] LIU J Q, CHEN X J, LIANG X X, ZHOU X G, YANG F, LIU J, HE S Y, GUO Z J. Alternative splicing of rice WRKY62 and WRKY76 transcription factor genes in pathogen defense. *Plant Physiology*, 2016, 171(2): 1427-1442.
- [25] SANYAL S K, KANWAR P, YADAV A K, SHARMA C, KUMAR A, PANDEY G K. *Arabidopsis* CBL interacting protein kinase 3 interacts with ABR1, an APETALA2 domain transcription factor, to regulate ABA responses. *Plant Science*, 2017, 254: 48-59.
- [26] SCHREIBER K J, HASSAN J A, LEWIS J D. *Arabidopsis* Abscisic Acid Repressor 1 is a susceptibility hub that interacts with multiple *Pseudomonas syringae* effectors. *The Plant Journal*, 2021, 105(5): 1274-1292.
- [27] PANDEY G K, GRANT J J, CHEONG Y H, KIM B G, LI L G, LUAN S. ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005, 139(3): 1185-1193.
- [28] 张文慧, 何青, 张潇丹. 非生物胁迫下白桦 *ERF* 基因的表达及生物信息学分析. 分子植物育种, 2020, 18(13): 4283-4289.
ZHANG W H, HE Q, ZHANG X D. Expression of *ERF* genes from *Betula platyphylla* under abiotic stress and bioinformatics analysis. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(13): 4283-4289.
- [29] BÄUMLER J, RIBER W, KLECKER M, MULLER L, DISSMEYER N, WEIG A R, MUSTROPH A. AtERF#111/ABR1 is a transcriptional activator involved in the wounding response. *The Plant Journal*, 2019, 100(5): 969-990.
- [30] LORETI E, VAN V H, PERATA P. Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 64-71.
- [31] SASIDHARAN R, HARTMAN S, LIU Z G, MARTOPAWIRO S, SAJEEV N, VAN V H, YEUNG E, VOESENEKA L. Signal dynamics and interactions during flooding stress. *Plant Physiology*, 2018, 176(2): 1106-1117.

(责任编辑 魏晓燕)