

# ‘砀山酥梨’褐皮芽变中两个 *ERF* 基因的克隆与表达分析

王孟东, 杨金宇, 黄海娜, 朱立武, 衡伟\*

(安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

**摘要:** 为了解梨(*Pyrus bretschneideri*)中 *ERF* 基因的功能, 采用 3' RACE 和 PCR 技术从‘砀山酥梨’中克隆了两个 *ERF* 基因, 并对其表达进行了分析。克隆的两个 *ERF* 基因都具有典型的 AP2/ERF 结构域, 属于 *ERF* 基因家族, 分别命名为 *PbERF2* 和 *PbERF4*, GenBank 登录号分别为 KJ623716 和 KJ623718。系统进化分析表明, *PbERF2* 与枇杷 *ERF1*, *PbERF4* 与黄瓜 *ERF1* 的亲缘关系较近。表达分析表明, *PbERF2* 和 *PbERF4* 在叶片中几乎不表达, 果皮中的表达量高于果肉; ‘锈酥’果皮 3 个发育时期的 *PbERF2* 和 *PbERF4* 表达量均显著高于‘砀山酥梨’, 且均呈现先上升后下降的趋势。这为深入研究梨 *ERF* 基因家族的作用机理提供了理论依据。

**关键词:** 梨; *ERF* 基因; 实时荧光定量反转录 PCR

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.003

## Cloning and Expression Analysis of Two *ERF* Genes in Pericarp of Russet Mutant of ‘Dangshansuli’ Pear

WANG Meng-dong, YANG Jin-yu, HUANG Hai-na, ZHU Li-wu, HENG Wei\*

(School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** The aim was to understand the function of ethylene responsive factor (ERF) in *Pyrus bretschneideri*. Two *ERF* genes were cloned from pericarp of ‘Dangshansuli’ and its russet mutant ‘Xiusu’ by using 3' RACE and PCR methods. Both of genes had typical conserved domain of AP2/ERF, named as *PbERF2* and *PbERF4*, with GenBank accession No. of KJ623716 and KJ623718, respectively. The phylogenetic tree showed that *PbERF2* had closed correlation with *ERF1* in loquat (*Eriobotrya japonica*) and *PbERF4* was closed to *ERF1* in cucumber (*Cucumis sativus*). Semi-quantitative RT-PCR indicated that expressions of *PbERF2* and *PbERF4* in pericarps were higher than those in sarcocarps, and both hardly expressed in leaves. Real-time RT-PCR showed that expressions of *PbERF2* and *PbERF4* in pericarps of ‘Xiusu’ was significant higher than those in ‘Dangshansuli’, and expression trend of them was upgrade at first and then descend. These would provide theory foundation for further study on mechanism of *ERF* family genes in pear.

**Key words:** Pear; *ERF* gene; Realtime RT-PCR

梨(*Pyrus bretschneideri*)褐色果皮具有抵御病虫害和不良环境的能力<sup>[1]</sup>。在安徽省砀山县发现 1 株 50 年生‘砀山酥梨’的 1 个枝条发生变异, 暂定

名为‘锈酥’。‘砀山酥梨’和‘锈酥’幼果的果皮均为绿色, 从花后 75 d 开始, ‘锈酥’果皮逐渐褐变; 果实成熟时, ‘砀山酥梨’果皮黄绿, 而‘锈酥’果皮为褐

收稿日期: 2015-01-09

接受日期: 2015-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101519); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29-14)资助

作者简介: 王孟东(1989~), 男, 硕士研究生, 研究方向为果树种质资源利用与创新。E-mail: wangmengdong1989@sina.cn

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: hengwei@ahau.edu.cn

色。经 RAPD、AFLP、ISSR 分子标记研究,确定为遗传性变异<sup>[2-4]</sup>。

在非生物胁迫中,干旱、冷害和盐胁迫等逆境对梨产业造成的损失始终高于其它逆境危害<sup>[5]</sup>,因此,研究梨的抗逆基因具有重要意义。AP2/ERF 家族转录因子普遍存在于各种植物中,广泛参与植物逆境诱导信号传导<sup>[6]</sup>。乙烯应答因子(Ethylene responsive factor, ERF)属于 AP2/ERF 家族中重要的一个亚族,是该家族中成员最多的一类结合蛋白,参与植物体的生物、非生物胁迫信号传导过程<sup>[7-8]</sup>。干旱、低温和盐胁迫可以诱导水稻(*Oryza sativa*)的 *OsBIERF1*、*OsBIERF3* 和 *OsBIERF4* 表达<sup>[9]</sup>。*ERF* 基因在番茄(*Lycopersicon esculentum*)中过量表达,植株的抗旱或耐盐能力不同程度提高<sup>[10]</sup>。烟草(*Nicotiana tabacum*)中超表达 *GmERF3* 基因可诱导 *PR* 基因上调表达,增强对青枯病菌、烟草花叶病毒的抗性以及抗盐抗旱能力<sup>[11]</sup>。香蕉(*Musa paradisiaca*)在受到病菌侵染和低温胁迫时,根和叶片中 *MaERF* 基因表达明显升高<sup>[12]</sup>。

目前,有关梨 *ERF* 基因的克隆与表达研究还尚未见报道。本研究主要以‘砀山酥梨’和‘锈酥’不同发育时期果皮为材料,利用 RACE 技术克隆了两个抗逆相关基因 *ERF* 类转录因子,并进行相关生物信息学分析;利用半定量 PCR 分析两个基因在不同组织中的表达;利用 Real-time RT-PCR 检测两个基因在 3 个发育时期果皮中的表达,从而为深入了解 *ERF* 基因家族在梨树的功能提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料‘砀山酥梨’(*Pyrus bretschneideri* ‘Dangshansuli’)和‘锈酥’(‘Xiusu’)采自安徽省砀山县园艺场。2013 年分别在花后 25 d、75 d 和 150 d 随机摘取果实各 10 个,分别切取果肉和 1 mm 厚的果皮。果皮、果肉和叶片用液氮处理,混合均匀后保存于 -80℃ 冰箱中。

### 1.2 药品、试剂和引物

RNA 提取试剂盒(StarSpin Plant RNA Mini Kit)和感受态细胞(DH5 $\alpha$  Chemically Competent Cells)购自 Genstar 公司,反转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase)、载体(pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems I)、

PCR MIX (GoTaq<sup>®</sup> GreenMaster Mix)购自 Promega 公司。Real-time 试剂(PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser)和 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 购自 Taraka 公司。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers tested

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
ERF2-5F	ATGTGTGGTGGTGTATCATTTCCG
ERF2-5R	ATCCAGCATCCACAGGTCCAAC
ERF2-R	GTTACTATTAACATAAACAC
ERF2-3F1	CTCTTCACCGCTTCCATCTCTG
ERF2-3F2	CTCAACCGAGTTTCCAGACC
ERF4-5F	ATGGCGACTGCAGCTGCTCCGTCT
ERF4-5R	ACTGCCGAAACCCGAACCTT
ERF4-R	GCCTCTCTAATAATTAA
ERF4-3F1	TCAACGCTCCCTCCGCCGCC
ERF4-3F2	AGCGGCACTTCCACGAATGATAC
ERF2-BDL-F	CCCTCTCACCGCTTCCAT
ERF2-BDL-R	GCTAGAACAATTCCGCTGCCT
ERF4-BDL-F	CCAAGACCAACTTCCCTGCG
ERF4-BDL-R	TATCCTCATACATCCGAAACG
YgERF2-F	GAGTCAGGTGGTGAGTGGAAGC
YgERF2-R	CAAACAGCACACGGTACACAAAC
YgERF4-F	GGCGGTAATGCCACGGTC
YgERF4-R	AACCAGCGATGAGAGGGAAA
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTT- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
UPM long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT- ATCAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Actin-F	TGGTGTATGTTGGTATGG
Actin-R	CAGGAGCAACACGAAGTCA

### 1.3 基因克隆和测序

采用 StarSpin Plant RNA Mini Kit 提取‘砀山酥梨’和‘锈酥’的果皮 RNA,用 M-MLV Reverse Transcriptase 反转录酶,以 3'-CDS 为引物合成 cDNA,按说明书操作。根据‘砀山酥梨’和‘锈酥’转录组中获得两个 *ERF* 差异表达基因的片段,设计 5' 端特异性引物 ERF2-5F 和 ERF2-5R, ERF4-5F 和 ERF4-5R,以果皮 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析、回收,

连接到 pGEM-T 载体,将含有目标片段的阳性单克隆送至深圳华大有限公司分别测序验证,得到两个基因的 5' 端序列。设计 3' RACE 引物 ERF2-3F1 和 ERF2-3F2, ERF4-3F1 和 ERF4-3F2, 分别和 UPM long、NUP 进行巢式 PCR 扩增,克隆出两个基因的 3' 端序列。根据 5' 端和 3' 端的重叠序列,利用 DNAMAN 软件进行拼接,从而获得 2 个基因的全长序列。再根据两个基因 3' 端序列设计下游引物 ERF2-R 和 ERF4-R,结合 5' 端上游引物 ERF2-5F 和 ERF4-5F 进行 PCR 扩增,验证拼接结果。所得结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,利用 DNAMAN、BioEdit 等软件进行分析。

#### 1.4 基因生物信息学分析

使用 ProtParam 网站(<http://web.expasy.org/prot-param/>),预测 *PbERF2* 和 *PbERF4* 两个基因编码蛋白的理化性质。采用 MEGA5.0 软件对预测的 *PbERF2* 和 *PbERF4* 两个蛋白的氨基酸序列和 NCBI 已经登录 ERF 蛋白的氨基酸序列进行聚类分析。

#### 1.5 特异表达

分别提取‘砀山酥梨’和‘锈酥’花后 150 d 的果皮、果实和同时期叶片的总 RNA,反转录第一链,设计特异性引物 ERF2-BDL-F 和 ERF2-BDL-R, ERF4BDL-F 和 ERF4-BDL-R,使用浓度一致的反转录产物为模板,以梨 *Actin* 基因为内标,进行半定量 RT-PCR。

#### 1.6 基因表达分析

分别提取‘砀山酥梨’和‘锈酥’花后 25 d、75 d 和 150 d 果皮的总 RNA,反转录第一链,设计特异性引物 YgERF2-F 和 YgERF2-R, YgERF4-F 和 YgERF4-R,以梨 *Actin* 基因为内参,引物为 Actin-F 和 Actin-R,3 次重复。使用 STEPONE 荧光定量 PCR 仪进行定量分析,试剂采用 TaKaRa 公司的 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II,按照试剂说明书进行操作。

## 2 结果和分析

### 2.1 ERF 基因全长的克隆

根据‘砀山酥梨’和‘锈酥’转录组中获得的两

个 *ERF* 差异表达基因的片段,设计 5' 端特异性引物 ERF2-5F 和 ERF2-5R, ERF4-5F 和 ERF4-5R,以果皮 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析、回收,连接到 pGEM-T 载体,将含有目标片段的阳性单克隆送至深圳华大有限公司分别测序验证,得到两个基因的 5' 端序列。设计 3' RACE 引物 ERF2-3F1 和 ERF2-3F2, ERF4-3F1 和 ERF4-3F2, 分别和 UPM long、NUP 进行巢式 PCR 扩增,克隆出两个基因的 3' 端序列。其中 1 个基因的 5' 端和 3' 端分别有 765 bp (图 1: A) 和 482 bp (图 1: B) 核苷酸,通过拼接得到 1020 bp 的全长 cDNA 序列(图 3),其中开放阅读框为 816 bp,3' 端非编码区长 204 bp,命名为 *PbERF2*, GenBank

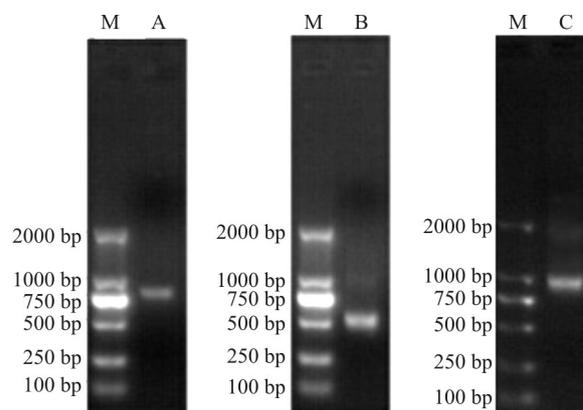


图 1 *PbERF2* 基因的 PCR 扩增。A: 5' RACE; B: 3' RACE; C: 全长序列验证; M: DNA Marker。

Fig. 1 PCR amplification of *PbERF2*. A: 5' RACE; B: 3' RACE; C: Verification of full length sequence; M: DNA Marker.

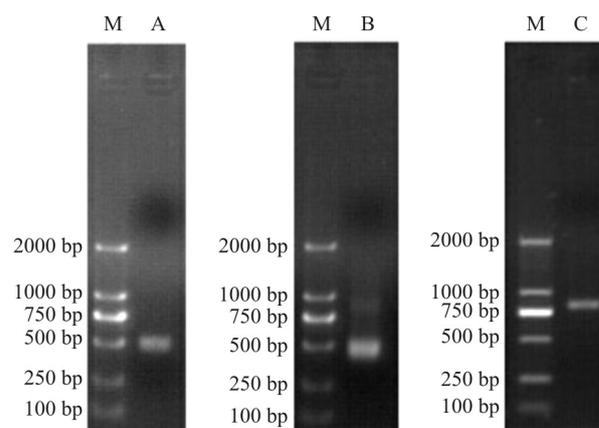


图 2 *PbERF4* 基因的 PCR 扩增。A: 5' RACE; B: 3' RACE; C: 全长序列验证; M: DNA Marker。

Fig. 2 PCR amplification of *PbERF4*. A: 5' RACE; B: 3' RACE; C: Verification of full length sequence; M: DNA Marker.

```

1   ATG TGTGGTGGTGTCTATCATTTCGACTTCATCGCCGCCAAGCGCGGCCGGAAGCTGACGGCCGAGGACCTCTGG
1   M C G G A I I S D F I A A K R G R K L T A Q D L W
76  TCAGATCTTGGCACCATTCTGACCTCCTCGGCATAGACCACTCCAACAGCATCAACAAACAGCCAGAGAATCAC
26  S D L G T I S D L L G I D H S N S I N K Q P E N H
151 AAGGTGGTCCAAAAGCCCAAACCATCTATCACCAAAAGTAGTACAAGTGATGAGAAAACCAAGAAGCGGAGCGGG
51  K V V Q K P K P S I T K V V T S D E K P K K A S G
226 TCTGCTGCTGCCGCTGAAGGCAAGAGAGTGAAGAAAACGTGTACAGAGGAATAAGCCAGAGGCCGTGGGGCAA
76  S A A A A E G K R V R K N V Y R G I R Q R P W G K
301 TGGCGGCTGAGATTGCGGACCCCAAAAGGCGTCCGGGCTCGGCTCGGCACCTATGACACCGCTGAGGAAGCC
101  W A A E I R D P H K G V R V W L G T Y D T A E E A
376 GCCCGCGCTTACGATGAAGCCGCGCTGCCCATCCGCGGGACAAGGCCAAGCTCAACTTTGCCCAACCACCC
126  A R A Y D E A A V R I R G D K A K L N F A Q P P P
451 TCTTCACCGCTTCCATCTCTGGCTCCGGATACGCGCCGCGGACGAAGAGGAGGTGCATTGTTGAGTCAACT
151  S S P L P S L A P D T P P P T K R R C I V A E S T
526 CGGGTGGAGCCGACTCAACCGAGTTTCCAGACCGGTTCTTACTATTATGATCCATTATAACAGCGCGTGGTGGT
176  R V E P T Q P S F Q T G S Y Y Y D P L Y H G G G G
601 GGGGAGATGTATGCTAAGAATGAGGTGTTGGGTGGGGACGGCAGGTATGAGCTGAAGGAGCAGATATGGAGCTTG
201  G E M Y A K N E V L G G D G R Y E L K E Q I W S L
676 GAGTCGTTCTTGGGGCTGGACGAGGTGGTGGTAGAGCAGCCGAGTCAGGTGGTGGTGGAGCGGCTGAGTCGGAC
226  E S F L G L D E V V V E Q P S G V V S G S G E S D
751 TCGTTGGACCTGTGGATGCTGGATGACCTTGGCATATCGGCAACAAGGGCAGCTTCTGTATTAAAGCCAGCGGA
251  S L D L W M L D D L V A Y R Q Q L L Y *
826 ATTGTTCTAGCTAAATATTTGCAATGCCAGGAATAAAAACATATTAATTAATTAATGATACGTTTAAATTTACGTGT
901  GTGAAATGTGAGTGTGAGTATGTATATGACTGGGTTTGTGTACCGTGTGCTGTTTGGCTTCGGTGTATGTTA
976 ATAGTAACGGCTTTTGTCTTAAAAA

```

图 3 *PbERF2* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。ATG: 起始密码子; TAA: 终止密码子。

Fig. 3 cDNA sequence of *PbERF2* and deduced amino acid sequence. ATG: Start codon; TAA: Stop codon.

登录号为 KJ623716, 其全长验证片段长 983 bp (图 1: C), 序列构成与拼接结果一致。另 1 个基因的 5' 端和 3' 端分别有 462 bp (图 2: A) 和 450 bp (图 2: B) 核苷酸, 拼接后得到 780 bp 的全长 cDNA 序列(图 4), 其中开放阅读框为 537 bp, 3' 端非编码区长 243 bp, 命名为 *PbERF4*, GenBank 登录号为 KJ623718, 其全长验证片段长 748 bp (图 2: C), 序

列构成与拼接结果一致。测序结果表明, ‘锈酥’ 果皮中 *PbERF2* 和 *PbERF4* 的 cDNA 序列与 ‘砀山酥梨’ 的无差异。

### 2.2 生物信息学分析

编码蛋白的理化性质 用 ProtParam 预测 *PbERF2* 和 *PbERF4* 编码蛋白的理化性质, 推测

```

1   ATGCGGACTGCAGCTGCTCCGTCTTCTCCTCCCGGAGGGCCACTACAGGGGGGTGAGGAAGCGTCCATGGGGCCGG
1   M A T A A A P S S S R E G H Y R G V R K R P W G R
76  TACGCCGAGAAATCCGGGACCCATGGAAGAAGACGAGGGTCTGGCTCGGCACATTGACACCGCCGGAGGAAGCC
26  Y A A E I R D P W K K T R V W L G T F D T P E E A
151 GCCCTCGCTACGACGGCGCCGCGCAGGACGCTCCGCGGCGCCAAGGCCAAGACCAACTTCCCTGCGCCGATCCCC
51  A L A Y D G A A R T L R G A K A K A T N F P A P I P
226 AGCGGCATATCCCTCGACCTCAACGCTCCCTCCGCGCCCACTGGGCCACTCACTCCGCGCCGCTCGTCEAATTC
76  S G I S L D L N A P S A A H W A T H S G R L V E F
301 CTCCACACCGGCTCCTCAACGACATGGGCAGCGGCACTTCCACGAATGATACGCTGCCGTTGATGGCGAGGAGG
101  L H T G V L N D M G S G T S T N D T L P L M A R R
376 GAACCTCAGCAAACCTCCAGTTGGTGTGGCGGAAATGTCGGCGGCGCGGTAATGCCACGGTCCGCGAAGGTTCC
126  E P Q Q T P V G V A G N V G G G G N A T V A E G S
451 GGTTCGGCAGTACGGCGTCTTTTCTGGGACTGGTCCGGCGTGGCTTCCGATTGATCTCAATGAGCCTCCTCCC
151  G F G S T A S F L G L V R R G G L P I D L N E P P P
526 TTGTGGCTGTGAGAGTAGCATTAAATCGTCCGCGCGTCTGTGTTTTTCCCTCTCATCGCTGGTCTAATTA
176  L W L *
601 TCTCTCGCCATAATTTTTCTTTTTTATTTAGTATTTTCACTAATTATCTAAAGAAAATCTTCACTGTTACGTTTC
676 GGATGTATGAGGATATTAATATTTGAGAGAGGAAAAATAATGTTGTTAAAATTAATTTATTAGAGAGGCTT
751 TTTCTTTGTA

```

图 4 *PbERF4* 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列。ATG: 起始密码子; TGA: 终止密码子。

Fig. 4 cDNA sequence of *PbERF4* and deduced amino acid sequence. ATG: Start codon; TGA: Stop codon.

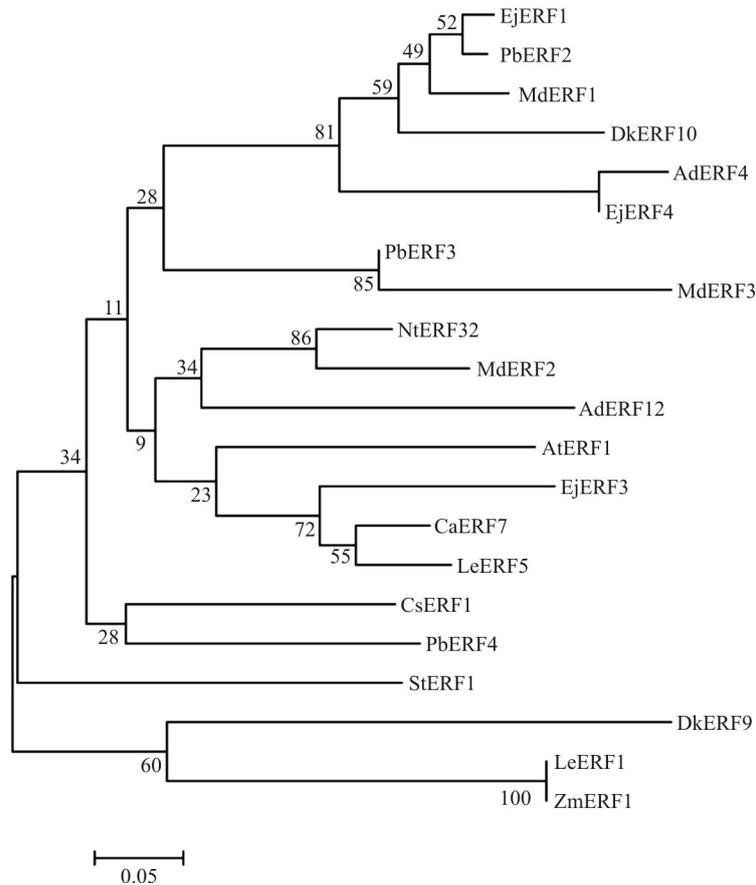


图5 *PbERF2* 和 *PbERF4* 与其他植物 ERF 蛋白的系统进化树。分支节点上的数值为自举支持率。EjERF: 枇杷; MdERF: 苹果; AdERF: 猕猴桃; LeERF: 番茄; AtERF: 拟南芥; CsERF: 黄瓜; ZmERF: 玉米; StERF: 马铃薯; CaERF: 咖啡树; NtERF: 烟草; PbERF: 白梨; DkERF: 柿。

Fig. 5 Phylogenetic tree of *PbERF2* and *PbERF4* with ERF proteins in other plants. Data upon branch nodes are bootstrap. EjERF: *Eriobotrya japonica*; MdERF: *Malus x domestica*; AdERF: *Actinidia deliciosa*; LeERF: *Lycopersicon esculentum*; AtERF: *Arabidopsis thaliana*; CsERF: *Cucumis sativus*; ZmERF: *Zea mays*; StERF: *Solanum tuberosum*; CaERF: *Coffea arabica*; NtERF: *Nicotiana tabacum*; PbERF: *Pyrus bretschneideri*; DkERF: *Diospyros kaki*.

两个蛋白的分子式分别为  $C_{1320}H_{2078}N_{374}O_{405}S_5$  和  $C_{831}H_{1301}N_{247}O_{247}S_3$ , 相对分子质量分别为 29827.5 和 18800.1, 等电点分别为 7.71 和 9.76。理论推导半衰期均大于 10 h, 不稳定参数分别为 41.57 和 43.83, 两个蛋白均属于不稳定蛋白。总的带负电荷的残基(Asp+Glu)分别为 35 和 15, 总的带正电荷的残基(Arg+Lys)分别为 36 和 19。亲水指数分别为 -0.609 和 -0.349, 预测均为水溶性蛋白。

**系统进化分析** 利用 MEGA5.0 软件的 Neighbor-Joining 方法, 将 *PbERF2* 和 *PbERF4* 蛋白与 GenBank 中已经登录的其他物种 ERF 蛋白进行系统进化树分析。从图 5 可看出, *PbERF2* 与枇杷(*Eriobotrya japonica*)的 *EjERF1* 亲缘关系较近, *PbERF4* 则是与黄瓜(*Cucumis sativus*)的 *CsERF1* 比较接近。

### 2.3 基因的组织特异性表达

从图 6 可见, *PbERF2* 和 *PbERF4* 在叶片中几乎不表达, 果皮中的表达量高于果肉, 且‘锈酥’两个基因的表达量都高于‘砀山酥梨’。

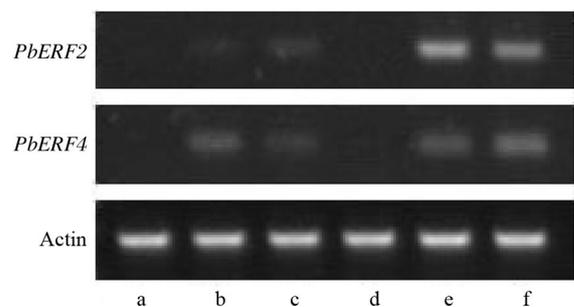


图6 *PbERF2* 和 *PbERF4* 基因在不同组织中的表达。a-c: ‘砀山酥梨’; d-f: ‘Xiusu’; a,d: 叶片; b,e: 果肉; c,f: 果皮。

Fig. 6 Expressions of *PbERF2* and *PbERF4* in different tissues. a-c: ‘Dangshansuli’; d-f: ‘Xiusu’; a,d: Leaf; b,e: Sarcocarp; c,f: Pericarp.

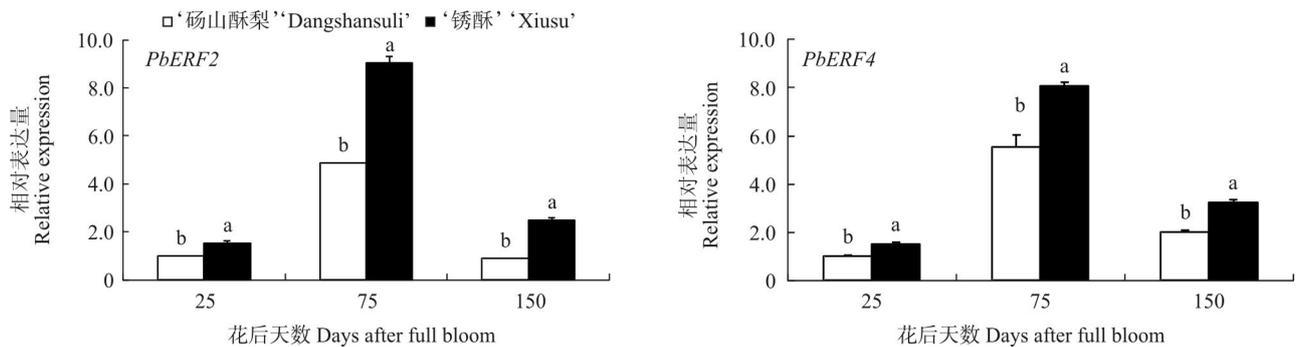


图7 *PbERF2* 和 *PbERF4* 基因在‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中的表达。柱上不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 7 Expression of *PbERF2* and *PbERF4* in pericarp of ‘Dangshansuli’ and ‘Xiusu’. Different letters above column indicate significant difference at 0.05 level.

## 2.4 基因的定量表达分析

荧光定量 PCR 结果表明, *PbERF2* 和 *PbERF4* 基因在‘砀山酥梨’和‘锈酥’花后 3 个时期果皮中的表达存在差异。‘锈酥’3 个时期果皮中 *PbERF2* 和 *PbERF4* 的表达量均显著高于‘砀山酥梨’, 且随发育的进程, 两个基因的表达规律均为先升高后降低(图 7)。

## 3 讨论

ERF 转录因子是仅存在于高等植物中的一类大基因家族, 最早是作为 GCC-box 结合蛋白从烟草中分离得到的<sup>[13]</sup>。Tang 等把辣椒(*Capsicum annuum*)的 *CaPF1* 转入东部白松(*Pinus strobus*)基因组后发现该植株对于干旱等逆境的耐受性明显增加<sup>[14]</sup>; 陆地棉(*Gossypium hirsutum*)的 ERF 亚家族中 *GhERF4*、*GhERF2*、*GhERF3*、*GhERF6* 和 *GhERF1* 在响应盐、低温和干旱胁迫及受乙烯和 ABA 处理后, 能一定程度提高抗非生物逆境的能力<sup>[15-16]</sup>。烟草的 *TERF2* 通过乙烯信号途径来调控对低温胁迫的抗性<sup>[10]</sup>, 过量表达 *TERF2* 或 *JERF3* 的转基因植株中活性氧水平显著下降, 从而提高了对低温胁迫的耐受力<sup>[17-19]</sup>, 烟草过表达 *GmERF3* 后, 组织的可溶性糖和脯氨酸等渗透保护物的含量提高, 植株不但表现出显著增强的抗旱耐盐能力, 而且对某些病虫害等生物胁迫的抵抗力也有提升<sup>[11]</sup>。

本研究克隆的 *PbERF2* 和 *PbERF4*, 经对比及聚类分析确定为 ERF 家族基因, 半定量显示 *PbERF2* 和 *PbERF4* 在果肉和果皮中均有表达, 而叶片中几乎不表达, 表明这两个基因的表达具有一

定的组织特异性, 在不同器官中可能发挥不同作用。‘锈酥’果皮 3 个发育时期 *PbERF2* 和 *PbERF4* 的表达量均显著高于‘砀山酥梨’, 且均呈现先升高后降低的趋势, 说明 *PbERF2* 和 *PbERF4* 在梨果皮中发挥协同作用。*PbERF2* 与枇杷(*Eriobotrya japonica*)的 *EjERF1* 同源性较高, *EjERF1* 受低温胁迫诱导, 在低温贮藏过程中果实 *EjERF1* 的转录本丰度呈增加的趋势<sup>[20]</sup>; *PbERF4* 与黄瓜(*Cucumis sativus*)的 *CsERF1* 高度同源, 淹涝条件下 *CsERF1* 表达量明显上升, 且乙烯利预处理可促进淹涝条件下 *CsERF1* 的表达<sup>[21]</sup>。推测 *PbERF2* 和 *PbERF4* 在梨中也参与抗逆过程, 但其作用机理还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] Inoue E, Kasumi M, Sakuma F, et al. Identification of RAPD marker linked to fruit skin color in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. *Sci Hort*, 2006, 107(3): 254–258.
- [2] Song F S, Zhu L W, Zhang S M, et al. RAPD analysis of the pear germplasm resources in protection district of Dangshansu Pear [J]. *J Anhui Agri Univ*, 2004, 31(3): 358–362.  
宋丰顺, 朱立武, 张水明, 等. 砀山酥梨自然保护区梨种质资源 RAPD 分析 [J]. *安徽农业大学学报*, 2004, 31(3): 358–362.
- [3] Zhu L W, Wang Y F, Jia B, et al. Study on the pear germplasm resources in Dangshan area, Anhui Province by AFLP technology [J]. *J Fruit Sci*, 2009, 26(2): 145–150.  
朱立武, 王艳芳, 贾兵, 等. 安徽砀山酥梨自然保护区梨种质资源 AFLP 分析 [J]. *果树学报*, 2009, 26(2): 145–150.
- [4] Zhu L W, Zhu Y D, Jia B, et al. Study on pear (*Pyrus spp.*) germplasm resources collected at the protection district of ‘Dangshansuli’ by ISSR markers [J]. *Hort Environ Biotechn*, 2009, 50(4): 334–340.
- [5] Hussain S S, Kayani M A, Amjad M. Transcription factors as

- tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, 27(2): 297–306.
- [6] Park J M, Park C J, Lee S B, et al. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(5): 1035–1046.
- [7] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(2): 173–182.
- [8] Cao Y F, Wu Y F, Zheng Z, et al. Overexpression of the rice EREBP-like gene *OsBIERF3* enhances disease resistance and salt tolerance in transgenic tobacco [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2006, 67(3): 202–211.
- [9] Cao Y F, Song F M, Goodman R M, et al. Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress [J]. *J Plant Physiol*, 2006, 163(11): 1167–1178.
- [10] Zhang Z J, Huang R F. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor *TERF2/LeERF2* is modulated by ethylene biosynthesis [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 73(3): 241–249.
- [11] Zhang G Y, Chen M, Li L C, et al. Over expression of the soybean *GmERF3* gene, an APZ/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(13): 3781–3796.
- [12] Zhang J F, Huang J S, Cong H Q, et al. Cloning and expression analysis of a new stress-resistant *ERF* gene from banana [J]. *Acta Hort Sin*, 2013, 40(8): 1567–1573.  
张俊芳, 黄俊生, 丛汉卿, 等. 香蕉抗逆相关基因 *MaERF* 的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2013, 40(8): 1567–1573.
- [13] Hao D Y, Ohme-Takagi M, Sarai A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(41): 26857–26861.
- [14] Tang W, Newton R J, Li C, et al. Enhanced stress tolerance in transgenic pine expressing the pepper *CaPFL* gene is associated with the polyamine biosynthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(1): 115–124.
- [15] Qiao Z X, Huang B, Liu J Y. Molecular cloning and functional analysis of an *ERF* gene from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(2): 122–127.
- [16] Jin L G, Li H, Liu J Y. Molecular characterization of three ethylene responsive element binding factor genes from cotton [J]. *J Inter Plant Biol*, 2010, 52(5): 485–495.
- [17] Tian Y, Zhang H W, Pan X W, et al. Overexpression of ethylene response factor *TERF2* confers cold tolerance in rice seedlings [J]. *Transgen Res*, 2011, 20(4): 857–866.
- [18] Wu L J, Zhang Z J, Zhang H W, et al. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein *JERF3* in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(4): 1953–1963.
- [19] Mo J B, Li D Y, Zhang H J, et al. Roles of ERF transcription factors in biotic and abiotic stress response in plants [J]. *Plant Physiol J*, 2011, 47(12): 1145–1154.  
莫纪波, 李大勇, 张慧娟, 等. ERF转录因子在植物对生物和非生物胁迫反应中的作用 [J]. *植物生理学报*, 2011, 47(12): 1145–1154.
- [20] Wang P. Research of loquat fruit lignification under chilling based on ethylene signal transduction elements [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011: 1–66.  
王平. 基于乙烯信号转导元件的采后枇杷果实冷害木质化机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 1–66.
- [21] Xu X W. Preliminary study of *CsERF* in regulating waterlogging tolerance in *Cucumis sativus* L. [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013: 1–51.  
许学文. *CsERF*基因调控黄瓜耐涝性的初步研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2013: 1–51.