

龙眼 *ERF* 家族成员鉴定及其在体胚发生早期的表达

陈燕, 吕科良, 厉雪, 高玉莹, 林玉玲, 赖钟雄*

(福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

摘要: 为了解龙眼 *ERF* 家族的基本性质以及在体胚发生早期的表达规律, 该研究对龙眼基因组鉴定出 108 个 *ERF* 家族成员进行基本理化性质分析与进化树构建, 并结合龙眼转录组及 miRNA、lncRNA 数据库对 *DlERF* 家族成员与 lncRNA、miRNA 之间的关系预测与表达模式分析。结果显示: (1) 理化性质及进化树分析表明, AP2/*ERF* 结构域在龙眼相对最为保守, *DlERF* 对龙眼的抗胁迫能力以及对病菌的防御能力可能起着重要作用。(2) RNA-Seq 中的表达量分析可知, 95 个 *ERF* 基因在转录组中检测到表达, 在愈伤组织 (EC)、不完全胚性紧实结构 (ICpEC) 与球形胚 (GE) 阶段中分别存在 31、11 与 53 个 *ERF* 基因高表达。(3) qRT-PCR 结果显示, 在龙眼体胚发生早期显著表达 5 个 *ERF* 基因中, *Dlo_008317.1ERF15-2*、*Dlo_022310.1ERF1-1* 与 *Dlo_009939.1ERF98* 在 GE 阶段表达量显著高于 EC 与 ICpEC 阶段, *Dlo_009070.1ERF106-3* 与 *Dlo_022634.1ERF22-1* 则分别在 EC 与 ICpEC 阶段高表达。(4) *DlERF* 家族成员与相关 lncRNA、miRNA 表达量分析显示, LTCONS_00013739 对靶基因 *Dlo_008317.1ERF15-2* 为正调控关系; *Dlo_miR413* 与 *Dlo_miR1510a* 共同靶向 *Dlo_009070.1ERF106-3*, 从 EC 到 GE 阶段均表现出显著负调控关系, 而 *Dlo_miR413* 与 *Dlo_008317.1ERF15-2* 的表达量表现出正相关, 推测相比于 *Dlo_008317.1ERF15-2*, *Dlo_miR413* 更倾向于调控 *Dlo_009070.1ERF106-3*; 调控 *Dlo_009939.1ERF98* 相关的 *Dlo_miR408* 与 *Dlo_miR774b*, 从表达趋势来看, *Dlo_miR774b* 在龙眼体胚发生早期过程能够负调控 *Dlo_009939.1ERF98*; *Dlo_miR399c* 与 *Dlo_022310.1ERF1-1* 在 EC 到 GE 阶段可能存在负调控关系。(5) 不同梯度浓度的乙烯处理使得 *DlERF* 基因表达显著下调。这些发现提供了有关龙眼体胚发生早期 *DlERF* 的重要见解, 从而为将来对龙眼体胚发生早期过程中 *DlERF* 的功能分析奠定了基础。

关键词: 龙眼; 体胚发生早期; *ERF*; qRT-PCR

中图分类号: Q786; S667.2 **文献标志码:** A

Identification of *ERF* Gene Family and Their Expression Analysis during Early Somatic Embryogenesis in *Dimocarpus longan*

CHEN Yan, LÜ Keliang, LI Xue, GAO Yuying, LIN Yuling, LAI Zhongxiong*

(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to understand the basic properties of the longan *ERF* family and the expression of early embryogenesis, this study identified 108 *ERF* family members for basic physicochemical properties and phylogenetic tree construction in the longan genome. The relationship between *DlERF* family members

收稿日期: 2018-08-13; 修改稿收到日期: 2018-11-05

基金项目: 国家自然科学基金(31572088, 31672127); 福建省自然科学基金杰出青年项目(2015J06004); 福建农林大学科技创新专项基金(KF2015108, CXZX2017314, CXZX2016118, CXZX2016119, CXZX2017189, CXZX2017351)

作者简介: 陈燕(1994—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事生物技术研究。E-mail: Spencer_cy@163.com

* 通信作者: 赖钟雄, 研究员, 博士生导师, 主要从事园艺植物生物技术与遗传资源研究。E-mail: laizx01@163.com

and lncRNA and miRNA was predicted and expressed in combination with longan transcriptome, miRNA and lncRNA database. The results showed that: (1) the physicochemical properties and phylogenetic tree analysis of the family indicated that the AP2/ERF domain is relatively the most conservative in longan, and *DlERF* may play an important role in the long-term stress resistance and defense ability of the pathogen. (2) Analysis of expression levels in RNA-Seq revealed that 95 *ERF* genes were detected in the transcriptome, and there were 31, 11 and 53 *ERF* genes highly expressed in the callus, incomplete embryonic compact structure and globular embryo stage, respectively. (3) qRT-PCR results showed that among the five *ERF* genes that were significantly expressed early in the longan somatic embryo, the expression levels of *Dlo_008317.1ERF15-2*, *Dlo_022310.1ERF1-1* and *Dlo_009939.1ERF98* in GE stage were significantly higher than those of EC and ICpEC, *Dlo_009070.1ERF106-3* and *Dlo_022634.1ERF22-1* were highly expressed in the EC and ICpEC phases, respectively. (4) Analysis of *DlERF* family members and related lncRNA and miRNA expression levels showed that LTCONS_00013739 has a positive regulatory relationship with the target gene *Dlo_008317.1ERF15-2*; *Dlo_miR413* and *Dlo_miR1510a* target *Dlo_009070.1ERF106-3* together, showing a significant negative regulatory relationship from EC to GE, while *Dlo_miR413* and *Dlo_008317.1ERF15-2* expression were positively correlated, presumably compared to *Dlo_008317.1ERF15-2* *Dlo_miR413* is more inclined to regulate *Dlo_009070.1ERF106-3*; *Dlo_miR408* and *Dlo_miR774b* regulate *Dlo_009939.1ERF98*. From the expression trend, *Dlo_miR774b* can negatively regulate *Dlo_009939.1ERF98* in the early stage of longan somatic embryogenesis; *Dlo_miR399c* and *Dlo_022310.1ERF1-1* may have negative regulation relationship in EC to GE stage. (5) Ethylene treatment with different gradient concentrations significantly down-regulated *DlERF* gene expression. These findings provide important insights into *DlERF* during somatic embryogenesis in longan, and lay a foundation for further functional analysis of *DlERF* during somatic embryogenesis in longan.

Key words: longan; early embryogenesis; *ERF*; qRT-PCR

乙烯响应因子(ethylene response factors, *ERF*)家族是植物特异性转录因子 APETALA2/ethylene responsive factor (*AP2/ERF*)超家族中的亚家族。在 *AP2/ERF* 转录因子超家族中,家族成员都具有 *AP2/ERF* 保守结构域。根据 *AP2/ERF* 结构域的数量,亚家族可分为 3 类:仅包含 1 个 *AP2/ERF* 结构域的 *ERF* 家族;含有 2 个重复 *AP2/ERF* 结构域的 *AP2* 家族;含有 1 个 *AP2/ERF* 结构域和 B3 结构域的 *RAV* 家族^[1-2]。从 1994 年在拟南芥中分离的第 1 个与花发育相关的 *AP2* 基因^[3]开始,涌现了大量对 *AP2/ERF* 转录因子全基因组家族分析,其中包括:玉米^[4]、粟^[5]、甜橙^[6]以及葡萄^[7]等。*ERF* 家族作为 *AP2/ERF* 转录因子超家族中的重要一员,已经有大量的深入研究对 *ERF* 家族基因功能进行验证。研究表明,*ERF* 能够在各种生物胁迫与非生物胁迫下响应,包括病害^[8]、干旱^[9]、盐胁迫^[10]以及通过乙烯和 ABA 信号通路介导各种生理过程^[11]等发挥作用。除此之外,*ERF* 在植物体胚发生过程中的调控作用也做了相关研究。Mantiri 等^[12]在蒺藜苜蓿体胚发生过程中,发现 *MtSERF1* 在球形胚以及心型胚分生组织中高表达;Piyatrakul 等^[13]首次揭示了 *AP2/*

ERF 基因在体细胞胚胎发生过程中具有调节作用,为鉴定 *AP2/ERF* 功能开辟了道路。而关于龙眼 *ERF(DlERF)* 家族的系统分析未见报道。

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)原产于中国南部和越南南部的亚热带区域,是重要的经济作物。龙眼具有丰富的药理作用,具有抗氧化作用、降血糖作用以及神经系统调节作用等^[14]功能。研究表明,龙眼胚胎发育状态与其果实的产量和品质有着密切关系,因此对龙眼胚胎发育机理开展深入研究对龙眼产业的发展意义重大^[15]。赖钟雄等^[16]建立的龙眼体胚发生系统被认为是木本植物优良的模式系统之一,是开展植物胚胎发育研究良好的替代材料。到目前为止,本实验室完成了龙眼全基因组测序^[17],为龙眼 *ERF* 全基因组分析提供了基础。根据前人研究表明,在龙眼体胚发生过程中乙烯可能起着诱导体胚发生以及维持生长发育过程的作用^[18]。李惠华等^[19]鉴定了 2 个乙烯受体基因(*Dl-ETR1* 和 *Dl-ERS1*),发现 *Dl-ETR1* 在胚性愈伤组织阶段的表达量最高,心形胚阶段的表达量最低,而 *Dl-ERS1* 基因在子叶形胚的表达量最高;陈秋金等^[20]分离了龙眼 *ERF1* 基因 cDNA 全长序列,并发现 *DlERF1* 的表达量随果实的发育逐渐上升,且施

加外源乙烯能够抑制处于果肉快速生长期 *ERF1* 的表达。此外,研究发现拟南芥 lncRNA(DRIR)能够通过调节参与应激反应的一系列基因的表达来调节植物对非生物胁迫的反应^[21]; miRNVL5 与 *ERF4* 共同参与拟南芥对盐胁迫的反应调节^[22]; 以及在玉米中 AP2/*ERF* 转录因子被预测为 miRNA 的靶基因^[23]。通过以上研究,推测 lncRNA、miRNA 能够与 *ERF* 基因共同参与植物体的调节作用。

因此,本研究对龙眼 *DIERF* 家族成员进行系统分析。首先,对龙眼基因组所有 *ERF* 家族成员进行系统命名,分析其基本理化性质、保守基序与系统进化树等基本结构与性质,以及所有 *ERF* 家族在龙眼体胚发生早期的 RNA 测序中的表达量。其次,通过龙眼体胚发生早期胚性愈伤组织、不完全胚性紧实结构与球形胚 3 个阶段的富集分析,筛选出 5 个表达差异显著的 *ERF* 基因,验证其在 3 个阶段的表达谱以及在外源乙烯处理的 EC 中表达模式。最后,结合本实验室构建的龙眼体胚发生早期过程 3 个阶段(EC、ICpEC 与 GE)的 lncRNA 库以及龙眼 miRNA 文库^[24],预测 *DIERF* 家族基因与 lncRNA、miRNA 之间的调控网络,并利用 qRT-PCR 技术验证其在体胚发生早期过程中的表达模式。以期为后续 *DIERF* 不同成员在龙眼生长发育过程中的功能鉴定提供信息。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为福建农林大学园艺植物生物工程研究所提供的龙眼胚性愈伤组织^[25]。参照赖钟雄等^[16]培养方法,获得龙眼体胚发生早期胚性愈伤组织(embryonic callus, EC)、不完全胚性紧实结构(incomplete embryonic compact structure, ICpEC)、球形胚(globular embryo, GE)。参照王亚婷等^[26]的处理方法,在 MS 液体培养基中加入不同浓度的乙烯,处理浓度分别为 0、25、50、75、100 和 125 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,再接入 0.15 g 生长状态良好的龙眼 EC,3 次生物学重复。培养条件为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、115 r/min 摇床上培养 24 h,过滤冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于 RNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 龙眼 *ERF* 家族成员鉴定与基本理化性质分析 从 GIGADB(<http://gigadb.org>)中获取龙眼基因组氨基酸序列以及全长核苷酸序列,并通过 Pfam 软件分析其结构域,鉴定出 115 个 *DIERF* 家

族候选成员,删除冗余序列,最终确定 108 个 *DIERF* 家族成员。根据拟南芥 *ERF* 家族成员在龙眼基因组中的查找注释,参考拟南芥 *ERF* 命名方法,对龙眼 *ERF* 家族成员进行命名鉴定。利用 ExPasy(https://web.expasy.org/compute_pi/)分析 *DIERF* 家族成员的基本理化性质。

1.2.2 进化树分析 利用 MEGA5.2 软件构建系统进化树,该软件基于龙眼中 *ERF* 基因编码的氨基酸序列比对,通过邻接法和泊松校正等,进行 Bootstrap 分析,设置参数为 1 000 次重复检验。使用 Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)识别 *ERF* 的 AP2 结构域的精确位置,DNA-MAN 对龙眼 *ERF* 基因保守结构域核苷酸序列进行比对,区分 *ERF* 家族中的亚家族。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 采用 Tripure 试剂盒提取总 RNA,参照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit TransScript miRNA First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 使用说明书进行 cDNA 合成。以 cDNA 10 倍稀释液为模板进行扩增,于罗氏 LightCycler 480 仪器中进行 qRT-PCR 检测。

采用 SYBR premix Ex TaqTM II kit (TaKaRa)进行 qRT-PCR,反应体系为 20 μL ,应用 2 \times SYBR 10 μL ,cDNA 模版 1 μL ,上下引物各 0.8 μL ,ddH₂O 7.4 μL 。程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,40 次循环。miRNA qRT-PCR 采用 TransStart Tip Green qPCR SuperMix,反应体系为 20 μL ,应用 Tip 10 μL ,cDNA 模版 1 μL ,特异与通用引物各 0.8 μL ,ddH₂O 7.4 μL ,程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s,40 次循环。lncRNA 与 mRNA 以 *ELF-1 α* 为内参基因,miRNA 以 miR172a 为体胚发生早期表达内参基因,*U6* 为乙烯处理表达内参基因。利用 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 方法来计算基因的相对表达量。每个取样点设 3 个技术重复,试验共设 3 次生物学重复。

1.2.4 龙眼体胚发生早期 lncRNAs、miRNA 与 *DIERF* 关系预测以及特异性表达 为了预测 *DIERF* 基因与 lncRNA、miRNA 之间的关系,将龙眼的 *ERF* 基因序列和 miRNAs 文库提交到 psRNA-Target (<http://plantgrn.noble.org/psRNA-Target/>),期望值 ≤ 5 ,预测出 *DIERF* 基因可能作为 miRNA 靶基因。再通过 lncRNA 邻近的 mRNA 以及计算结合能的方法,筛选作为 lncRNA 靶基因的 *DIERF* 家族成员。最后将预测结果通过 Cyto-

scape 软件绘制调控网络图。

为进一步了解龙眼 *ERF* 家族各成员在龙眼体胚发生早期可能发挥的功能特点,结合龙眼转录组数据库 *DIERF* 家族基因在不同体胚发生早期阶段特异表达的 FPKM 值,分析 *DIERF* 家族各成员的表达情况,并对表达差异显著的 5 个 *DIERF* 基因的 FPKM 值与 qRT-PCR 表达量进行对比分析,同时采用 SPSS 24 软件进行不同表达水平之间的差异显著性分析。利用在线网站 Omicshare(<http://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/heatmap>)绘制热图、Graphpad 绘制折线图。

2 结果与分析

2.1 龙眼 *ERF* 家族成员鉴定与基本理化性质分析

为了鉴定龙眼中 *ERF* 家族基因,通过 Pfam 软件分析其结构域,筛选出只有 1 个 AP2/*ERF* 结构域的 *DIERF* 家族。在‘红核子’龙眼基因组^[17]中分别获得了 115 个 *ERF* 的全长核苷酸序列以及氨基酸序列,除去 CDS 相同的冗余序列,最终确定 108 个 *ERF* 基因的全长核苷酸序列以及氨基酸序列。

经 TAIR 在线网站 Blast 比对,与拟南芥 *ERF* 家族成员进化分析,对其进行命名(表 1)。

为进一步揭示龙眼 *ERF* 家族的功能以及结构特点,对 *DIERF* 家族氨基酸序列进行基本理化性质分析。结果(表 1)表明,该家族的蛋白分子量为 13.15 kD~63.49 kD,等电点 4.53~10.82 之间,不稳定系数为 31.44~96.1,亲水性为 -1.120~-0.284 之间。龙眼 *ERF* 家族大部分氨基酸个数在 300 aa 以下,其中 *Dlo_000585.2AIL6* 氨基酸个数最多(575 aa)。96 条 *DIERF* 基因的氨基酸序列比对到拟南芥的 *ERF* 家族成员,其中包括 *AtDREB26*、*AtTINY* 与 *AtWIND1* 等。值得注意的是,*DIERF* 家族中 9 个成员注释到 *AtERF38*,8 个成员注释到 *AtERF22*,5 个成员注释到 *AtERF13* 等。研究表明,*AtERF38* 与胁迫相关^[27],并且被认为是次生代谢壁的候选调节剂^[28]; *AtERF13* 位于 SA、JA、ET 和 ABA 信号通路的交界处,并通过协调这些激素增强植物防御反应^[29]。以上均可说明, *DIERF* 成员对龙眼的抗胁迫能力以及对病菌的防御能力可能起着重要作用。

表 1 *DIERF* 家族基本理化性质分析

Table 1 Basic parameters analysis of *DIERF* family

基因 ID Gene ID	注释到拟南芥成员 Annotated in <i>Arabidopsis thaliana</i>	氨基酸个数 Number of amino acids	分子量 Molecular weight /kD	等电点 pI	不稳定系数 Instability coefficient	亲水性 Gravy
<i>Dlo_000083.1ERF73-1</i>	<i>AtERF73</i>	180	20.38	9.99	40.53	-1.074
<i>Dlo_000247.1ERF4-1</i>	<i>ATERF4</i>	186	20.73	5.15	42.23	-0.678
<i>Dlo_000250.1ERF4-2</i>	<i>ATERF4</i>	192	21.77	5.29	42.19	-0.958
<i>Dlo_000290.1ERF70-1</i>	<i>AtERF70</i>	193	21.06	9.27	37.98	-0.666
<i>Dlo_000585.2AIL6</i>	<i>AtAIL6</i>	575	63.49	6.35	44.24	-0.524
<i>Dlo_002067.1ERF70-2</i>	<i>AtERF70</i>	285	31.97	6.93	70.10	-0.724
<i>Dlo_026157.1ERF73-2</i>	<i>AtERF73</i>	387	43.68	4.69	60.51	-0.841
<i>Dlo_028566.1DREB26</i>	<i>AtDREB26</i>	225	24.41	5.22	66.71	-0.284
<i>Dlo_030750.1ERF7</i>	/	152	17.67	9.87	70.15	-0.999
<i>Dlo_032680.1ERF115-1</i>	<i>AtERF115</i>	316	35.02	6.80	45.22	-0.501
<i>Dlo_005616.1CBF3</i>	<i>ATCBF3</i>	241	26.77	6.24	51.78	-0.593
<i>Dlo_005618.1ERF27</i>	/	237	25.57	5.36	58.80	-0.571
<i>Dlo_015407.1WIN1</i>	<i>AtWIN1</i>	229	25.64	6.80	45.75	-0.855
<i>Dlo_015474.1ESE3</i>	<i>AtESE3</i>	204	22.77	8.72	59.08	-0.526
<i>Dlo_018981.1TINY2-1</i>	<i>AtTINY2</i>	255	27.96	4.91	64.71	-0.592
<i>Dlo_007513.1ERF70-3</i>	<i>AtERF70</i>	403	43.53	6.46	61.53	-0.606
<i>Dlo_023411.1ERF38-8</i>	<i>AtERF38</i>	227	25.33	5.60	43.51	-0.758
<i>Dlo_013069.1ERF48-1</i>	<i>AtERF48</i>	334	37.44	6.44	46.30	-0.825
<i>Dlo_025714.2ERF53-1</i>	<i>AtERF53</i>	354	39.11	6.33	56.16	-0.655
<i>Dlo_025861.1TINY2-2</i>	<i>AtTINY2</i>	255	28.30	5.35	62.74	-0.626
<i>Dlo_022309.1WIND1-1</i>	<i>AtWIND1</i>	280	31.58	5.91	49.14	-0.867

续表 1 Continued Table 1

基因 ID Gene ID	注释到拟南芥成员 Annotated in <i>Arabidopsis thaliana</i>	氨基酸个数 Number of amino acids	分子量 Molecular weight /kD	等电点 pI	不稳定系数 Instability coefficient	亲水性 Gravy
<i>Dlo_022310.1</i> ERF1-1	<i>AtERF1</i>	197	21.90	6.98	65.38	-0.747
<i>Dlo_022353.1</i> ERF9-1	<i>AtERF9</i>	240	25.70	9.18	51.68	-0.588
<i>Dlo_022355.1</i> ERF12	<i>AtERF12</i>	184	20.17	9.62	54.62	-0.616
<i>Dlo_019916.1</i> ERF71-1	<i>AtERF71</i>	253	28.94	6.84	50.27	-0.826
<i>Dlo_018664.1</i> WIND1-2	<i>AtWIND1</i>	430	46.45	5.95	53.40	-0.581
<i>Dlo_019371.1</i> ERF2-1	<i>AtERF2</i>	212	23.59	7.02	66.74	-0.724
<i>Dlo_022612.1</i> ERF1-2	<i>AtERF1</i>	265	28.37	7.69	59.19	-0.455
<i>Dlo_022613.1</i> ERF5-1	<i>AtERF5</i>	332	37.04	6.29	48.46	-0.618
<i>Dlo_022634.1</i> ERF22-1	<i>AtERF22</i>	256	28.38	5.79	49.69	-0.938
<i>Dlo_023666.1</i> ERF8	/	418	46.51	8.76	51.62	-0.794
<i>Dlo_025226.1</i> ERF70-4	<i>AtERF70</i>	375	41.41	5.51	49.26	-0.562
<i>Dlo_025295.1</i> ERF38-9	<i>AtERF38</i>	166	18.98	9.33	47.20	-0.975
<i>Dlo_030328.1</i> ERF22-3	<i>AtERF22</i>	180	19.95	6.73	50.14	-0.697
<i>Dlo_005429.1</i> ERF115-2	<i>AtERF115</i>	241	27.08	9.71	64.74	-0.918
<i>Dlo_007774.3</i> RAP2.7-1	<i>AtRAP2.7</i>	275	29.79	8.76	47.84	-0.457
<i>Dlo_033259.1</i> ERF2-2	<i>AtERF2</i>	232	25.86	8.80	48.62	-0.735
<i>Dlo_033261.1</i> ERF105	<i>AtERF105</i>	270	29.80	5.62	42.58	-0.627
<i>Dlo_033262.1</i> ERF6-1	<i>AtERF6</i>	202	22.89	5.15	71.23	-0.682
<i>Dlo_006180.1</i> ERF86	/	191	21.15	8.37	43.09	-0.535
<i>Dlo_006200.1</i> ERF3-1	/	198	22.28	7.79	67.62	-0.903
<i>Dlo_001352.1</i> ERF95	<i>AtERF95</i>	338	36.73	4.53	48.91	-0.551
<i>Dlo_010734.1</i> ERF3-2	<i>AtERF3</i>	235	26.06	8.99	53.17	-0.715
<i>Dlo_014817.1</i> ERF9-2	<i>AtERF9</i>	243	27.28	5.03	57.43	-0.655
<i>Dlo_004403.1</i> ERF2-3	<i>AtERF2</i>	254	27.62	8.58	46.51	-0.772
<i>Dlo_005211.1</i> ERF48-2	<i>AtERF48</i>	288	32.60	6.21	49.31	-0.701
<i>Dlo_017325.1</i> ERF87	/	308	33.78	7.82	57.00	-0.744
<i>Dlo_007316.1</i> ERF38-1	<i>AtERF38</i>	221	23.31	4.81	65.37	-0.684
<i>Dlo_007317.1</i> ERF38-2	<i>AtERF38</i>	228	25.13	5.31	52.39	-0.467
<i>Dlo_015183.1</i> ERF6-2	<i>AtERF6</i>	317	35.12	5.07	53.39	-0.666
<i>Dlo_007909.1</i> ERF53-2	<i>AtERF53</i>	192	21.39	6.34	63.50	-0.749
<i>Dlo_013715.1</i> ERF10-1	<i>AtERF10</i>	123	13.15	10.82	50.50	-0.433
<i>Dlo_014296.1</i> ERF13-1	<i>AtERF13</i>	246	27.19	6.23	56.62	-0.508
<i>Dlo_014298.1</i> ERF13-2	<i>AtERF13</i>	258	28.09	6.34	56.75	-0.557
<i>Dlo_014299.1</i> ERF13-3	<i>AtERF13</i>	238	26.34	5.80	71.90	-0.655
<i>Dlo_014300.1</i> ERF13-4	<i>AtERF13</i>	215	24.19	6.39	72.94	-0.718
<i>Dlo_009842.1</i> ERF110-1	<i>AtERF110</i>	322	35.63	5.33	55.86	-0.629
<i>Dlo_009877.1</i> ERF61	/	331	36.56	8.29	48.62	-0.572
<i>Dlo_010824.1</i> ERF9-3	<i>AtERF9</i>	240	25.86	9.69	61.41	-0.685
<i>Dlo_012769.1</i> ERF106-4	<i>AtERF106</i>	132	15.13	6.72	96.10	-0.837
<i>Dlo_013163.1</i> DREB2	<i>AtDREB2</i>	363	40.07	4.81	64.74	-0.707
<i>Dlo_014085.1</i> ERF38-3	<i>AtERF38</i>	163	18.89	5.53	44.87	-0.675
<i>Dlo_014678.1</i> ERF4-3	<i>AtERF4</i>	192	21.17	9.71	71.69	-0.664
<i>Dlo_014727.1</i> ERF72	<i>AtERF72</i>	169	19.00	8.50	69.62	-0.683

续表 1 Continued Table 1

基因 ID Gene ID	注释到拟南芥成员 Annotated in <i>Arabidopsis thaliana</i>	氨基酸个数 Number of amino acids	分子量 Molecular weight /kD	等电点 pI	不稳定系数 Instability coefficient	亲水性 Gravy
<i>Dlo_014729.1ERF22-4</i>	<i>AtERF22</i>	153	16.94	5.63	52.79	-0.505
<i>Dlo_014745.1ERF38-4</i>	<i>AtERF38</i>	189	20.64	5.29	68.57	-0.663
<i>Dlo_014747.1ERF38-5</i>	<i>AtERF38</i>	198	21.37	5.76	68.01	-0.562
<i>Dlo_014756.1ERF22-5</i>	<i>AtERF22</i>	176	19.62	5.59	51.16	-0.508
<i>Dlo_023455.1AP2</i>	<i>AtAP2</i>	364	40.13	5.70	43.91	-0.681
<i>Dlo_015023.1ERF96-3</i>	<i>AtERF96</i>	355	37.93	7.74	49.61	-0.689
<i>Dlo_015606.1RAP2.1</i>	<i>AtRAP2.1</i>	256	28.38	5.82	38.53	-0.632
<i>Dlo_031750.1ERF5-2</i>	<i>AtERF5</i>	275	30.56	5.98	61.94	-0.784
<i>Dlo_039227.1ERF106-1</i>	<i>AtERF106</i>	138	15.92	9.04	94.10	-0.908
<i>Dlo_024437.1ERF110-2</i>	<i>AtERF110</i>	240	26.87	5.34	60.52	-0.978
<i>Dlo_015669.1TINY</i>	/	183	20.41	7.69	73.43	-0.616
<i>Dlo_016787.1ERF38-6</i>	<i>AtERF38</i>	167	18.56	6.17	59.88	-0.589
<i>Dlo_016788.1ERF22-6</i>	<i>AtERF22</i>	156	17.54	5.90	61.72	-0.560
<i>Dlo_016794.1ERF22-7</i>	<i>AtERF22</i>	150	16.59	5.62	54.34	-0.501
<i>Dlo_029125.1ERF6-3</i>	<i>AtERF6</i>	415	44.38	6.26	67.31	-0.729
<i>Dlo_018830.1ERF73-3</i>	<i>AtERF73</i>	421	45.81	5.00	31.44	-0.641
<i>Dlo_026624.1ERF110-3</i>	<i>AtERF110</i>	337	37.57	4.76	55.41	-0.752
<i>Dlo_023983.1ERF115-3</i>	<i>AtERF115</i>	278	30.24	6.29	68.98	-0.615
<i>Dlo_022579.1ERF38-7</i>	<i>AtERF38</i>	172	19.14	5.27	70.12	-0.645
<i>Dlo_023524.1ERF71-2</i>	<i>AtERF71</i>	323	35.47	5.02	45.39	-0.798
<i>Dlo_023742.1ERF107</i>	<i>AtERF107</i>	197	21.10	5.20	63.00	-0.452
<i>Dlo_027012.1ERF106-2</i>	<i>AtERF106</i>	407	46.85	4.90	55.86	-0.757
<i>Dlo_027111.1ERF96-1</i>	<i>AtERF96</i>	328	36.00	6.49	48.46	-0.636
<i>Dlo_028757.1ERF24</i>	/	211	23.71	5.60	56.74	-0.752
<i>Dlo_029889.1ERF119</i>	/	394	44.07	4.58	58.89	-0.811
<i>Dlo_030601.1ERF71-3</i>	<i>AtERF71</i>	251	27.75	5.09	50.61	-0.639
<i>Dlo_030665.1ERF22-8</i>	<i>AtERF22</i>	236	25.84	5.17	58.22	-0.670
<i>Dlo_031266.1ERF53-3</i>	<i>AtERF53</i>	446	49.75	8.51	47.95	-0.688
<i>Dlo_031619.1ERF1B</i>	<i>AtERF1B</i>	242	27.10	5.14	56.79	-0.819
<i>Dlo_031681.1ERF11</i>	/	153	16.45	9.78	52.63	-0.685
<i>Dlo_004486.1ERF53-4</i>	<i>AtERF53</i>	449	49.35	5.25	63.12	-0.755
<i>Dlo_002336.1ERF15-1</i>	<i>AtERF15</i>	265	28.48	10.46	44.62	-0.485
<i>Dlo_008317.1ERF15-2</i>	<i>AtERF15</i>	226	25.38	5.24	67.56	-0.669
<i>Dlo_002919.1ERF22-9</i>	<i>AtERF22</i>	176	19.62	5.59	51.16	-0.508
<i>Dlo_003511.1ERF13-5</i>	<i>AtERF13</i>	271	30.07	5.42	56.94	-0.726
<i>Dlo_008555.1WRI1</i>	/	309	35.06	5.18	52.24	-0.617
<i>Dlo_009069.1ERF96-2</i>	<i>AtERF96</i>	138	15.51	6.98	45.62	-1.112
<i>Dlo_009070.1ERF106-3</i>	<i>AtERF106</i>	164	18.68	8.80	78.28	-1.120
<i>Dlo_009234.2RAP2.7-2</i>	<i>AtRAP2.7</i>	516	56.18	8.25	50.29	-0.624
<i>Dlo_009939.1ERF98</i>	<i>AtERF98</i>	274	30.40	4.93	70.02	-0.760
<i>Dlo_012177.1ERF15-3</i>	<i>AtERF15</i>	364	40.82	6.03	52.41	-0.284
<i>Dlo_012821.1RAP2.7-3</i>	<i>AtERFRAP2.7</i>	293	32.46	9.17	54.26	-0.825
<i>Dlo_017387.1ERF17</i>	<i>AtERF17</i>	204	22.74	4.78	55.85	-0.575
<i>Dlo_017388.1ERF10-2</i>	<i>AtERF10</i>	160	16.81	9.92	46.04	-0.323

2.2 *DIERF* 家族的系统进化树分析

对基因组鉴定出的 108 个 *DIERF* 基因, 构建系统进化树以研究 *DIERF* 基因系统亲缘关系。如图 1 所示, 根据 Nakano 等^[30]对拟南芥的分组方式, 将龙眼 *ERF* 家族分为 2 个亚家族: *CBF/DREB* (A1~A6) 和 *ERF* (B1~B6)。*CBF/DREB* 和 *ERF* 亚家族主要区别在于 AP2/*ERF* 结构域中 2 个位置上氨基酸残基, *CBF/DREB* 亚家族第 14 位和第 19 位氨基酸分别是缬氨酸和谷氨酸, 而 *ERF* 亚家族是丙氨酸和天冬氨酸^[31]。其中 *CBF/DREB* 亚家族包括 55 个成员, *ERF* 亚家族包括 53 个成员。虽然对应于 12 组的节点的自展值都不高, 但是这种分支聚类可靠性是通过内含子的位置以及除 AP2/*ERF* 结构域外的保守基序支撑的。

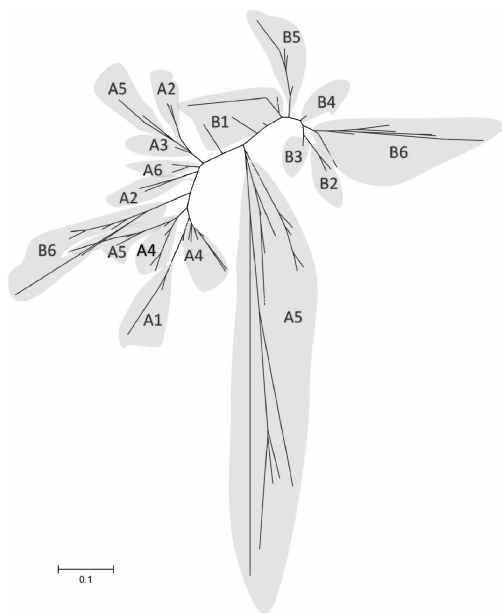
对龙眼转录组数据库中的 103 个 *DIERF* 基因进行外显子分析, 结果表明, 103 个 *DIERF* 基因中, 81 个基因仅包含 1 个外显子, 13 个 *DIERF* 基因包含 2 个外显子, 包含 3 个外显子的有 3 个 *DIERF* 基因, 其余包含 4~9 个外显子的 *DIERF* 基因均只有 1 个。由此可见, 大部分 (78.6%) 龙眼 *ERF* 家族成员不含有内含子, 仅有 22 个 *DIERF* 基因具有内含子, 且这 22 个 *DIERF* 基因集中在其中 4 组中 (A5、B2、B4 与 B6)。在 A5 组存在内含子的成员中, 除

Dlo_013069.1ERF48-1 外其余的成员内含子数量均 ≥ 2 , B6 组存在内含子的成员中, 则除 *Dlo_012177.1ERF15-3* 外其余的成员均只包含 1 个内含子。其余的 8 个组中 *DIERF* 基因都不含有内含子, 这也验证了 *DIERF* 家族的保守性。

2.3 *DIERF* 家族基因 RNA-Seq 表达量分析

为进一步了解龙眼 *ERF* 家族在龙眼体胚发生早期过程中的表达情况, 本研究结合龙眼体胚发生早期过程中 3 个阶段 (EC、ICpEC 与 GE) 的转录组数据库, 对转录组数据库中所有注释为 *DIERF* 基因的 FPKM 值进行分析, 并制作热图 (图 2)。除了在龙眼体胚早期 3 个阶段不表达的 13 个 *ERF* 成员外, 其余的 95 个 *DIERF* 成员均检测到表达。

RNA-Seq 分析结果显示, *DIERF* 家族成员在龙眼体胚发生早期过程 3 个阶段表现出不同的表达模式。表达模式总体分为三大类: 第一类, 31 个 *DIERF* 基因在 EC 阶段表达量最高, 其中 *Dlo_013069.1ERF48-1*、*Dlo_025861.1TINY2-2*、*Dlo_017325.1ERF87*、*Dlo_004486.1ERF53-4*、*Dlo_015407.1WIN1*、*Dlo_022579.1ERF38-7*、*Dlo_014678.1ERF4-3*、*Dlo_027111.1ERF96-1*、*Dlo_030328.1ERF22-3*、*Dlo_002336.1ERF15-1* 与 *Dlo_009842.1ERF110-1* 在 ICpEC 至 GE 阶段表达量递减, *Dlo_001352.1ERF95*、*Dlo_022634.1ERF22-1*、*Dlo_016788.1ERF22-6*、*Dlo_022353.1ERF9-1* 与 *Dlo_030665.1ERF22-8* 在 ICpEC 至 GE 阶段表达量递增, 而其余的成员在 ICpEC 到 GE 阶段表达量变化不大, 说明其余的 15 个 *DIERF* 基因在 EC 阶段高表达, 可能对胚性愈伤组织的维持起作用。第二类, 11 个 *DIERF* 在 ICpEC 阶段表达量最高, 除 *Dlo_019371.1ERF2-1*、*Dlo_018664.1WIND1-2* 与 *Dlo_004403.1ERF2-3* 外, 其余的 8 个在 EC 与 GE 阶段的表达量无明显变化, 说明了在 ICpEC 阶段的调控作用最为明显。第三类, 53 个 *DIERF* 基因在 GE 阶段表达量最高, *Dlo_026157.1ERF73-2*、*Dlo_014299.1ERF13-3*、*Dlo_022613.1ERF5-1*、*Dlo_023524.1ERF71-2*、*Dlo_005616.1CBF3*、*Dlo_023666.1ERF8*、*Dlo_022612.1ERF1-2* 与 *Dlo_007317.1ERF38-2* 在 EC 至 ICpEC 阶段表达量递减, *Dlo_013163.1DREB2*、*Dlo_010734.1ERF3-2*、*Dlo_007513.1ERF70-3*、*Dlo_025226.1ERF70-4*、*Dlo_017388.1ERF10-2*、*Dlo_000290.1ERF70-1* 与 *Dlo_000247.1ERF4-1* 在 EC 至 ICpEC 阶段表达量递增, 其余的在 EC 与 ICpEC 阶段表达量变化不



A1~A6 属于 *CBF/DREB* 亚家族; B1~B6 属于 *ERF* 亚家族。

图 1 龙眼 *ERF* 家族成员氨基酸序列系统进化分析

A1-A6 belong to the *CBF/DREB* subfamily;

B1-B6 belong to the *ERF* subfamily

Fig. 1 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of longan *ERF* family members

大。以上结果表明, 不同的 *DIERF* 基因可能参与龙眼体胚发生早期不同阶段的维持。

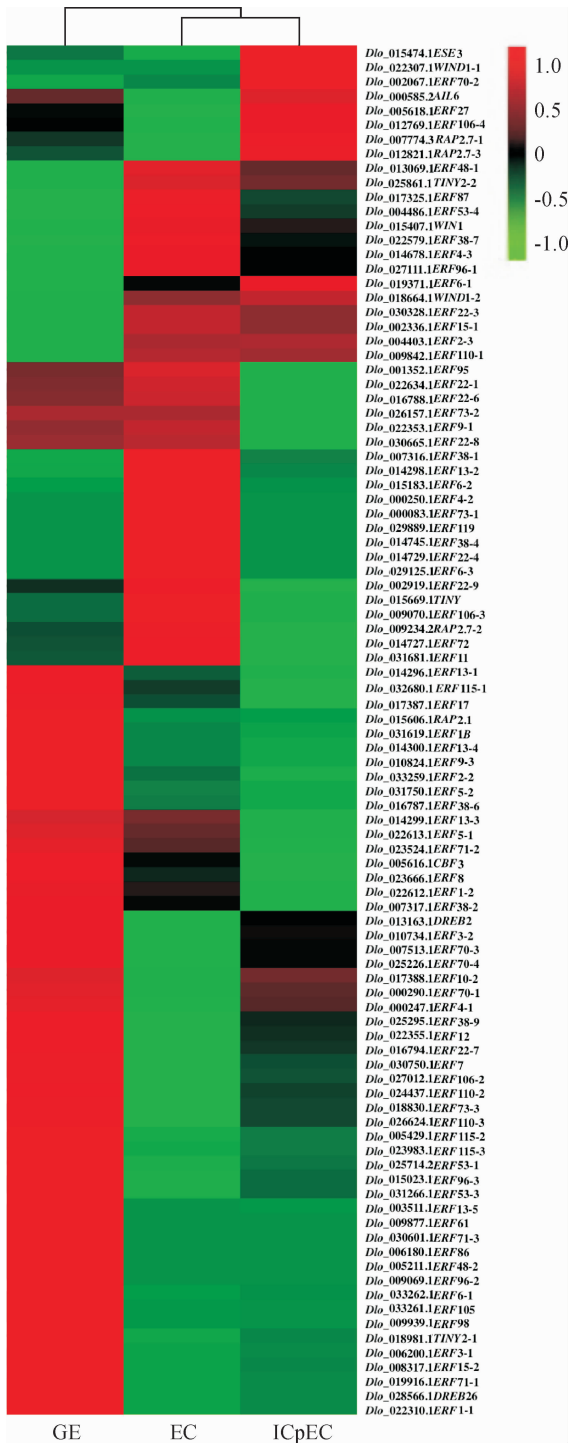


图 2 龙眼 *ERF* 家族在龙眼体胚早期 3 个阶段的特异表达分析

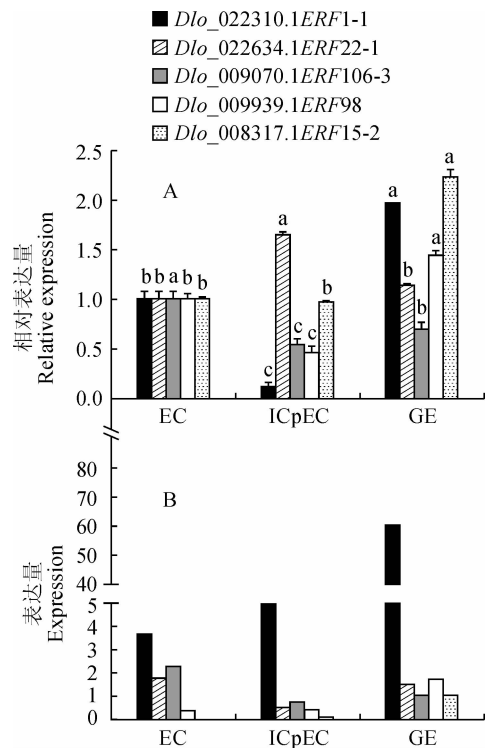
EC. Embryogenic callus; ICpEC. Incomplete embryonic compact structure; GE. Globular embryo

Fig. 2 Specific expression analysis of longan *ERF* family in three stages of early longan somatic embryo

总体而言, 龙眼 *ERF* 家族成员在龙眼体胚发生早期的形态建成中发挥重要作用, 大部分成员在 GE 阶段高表达, 特别是在个别阶段表现出阶段特异性的 *DIERF* 基因, 可能在该阶段对形态功能等的维持起到了一定作用。

2.4 龙眼体胚发生早期 *DIERF* 基因表达的 qRT-PCR 分析及乙烯处理下的表达

为了更好地了解 *ERF* 家族在龙眼体胚发生早期的可能调控作用, 通过在龙眼体胚发生早期 3 个阶段 (EC, ICpEC 与 GE) RNA-Seq 表达两两对比, 筛选出在龙眼体胚发生早期表达差异显著的 5 个 *ERF* 基因 (*Dlo_008317.1ERF15-2*、*Dlo_009070.1ERF106-3*、*Dlo_022634.1ERF22-1*、*Dlo_009939.1ERF98* 与 *Dlo_022310.1ERF1-1*)。qRT-PCR 分析 5 个 *DIERF* 的表达趋势 (图 3, A) 与 RNA-Seq 的表达结果 (图 3, B) 进行对比。由图 3 可以看出, 除 *Dlo_*



A. 实时荧光定量 PCR; B. RNA 测序; EC. 胚性愈伤组织; ICpEC. 不完全胚性紧实结构; GE. 球形胚; 不同小写字母表示阶段间差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 *DIERF* 在龙眼体胚发生早期 3 个阶段的表达 A. qRT-PCR; B. RNA Seq; EC. Embryogenic callus; ICpEC. Incomplete embryonic compact structure; GE. Globular embryo; The normal letters indicate significant differences among different stages ($P < 0.05$)

Fig. 3 Expression of *DIERF* in the early three stages of longan somatic embryogenesis

022634.1*ERF22-1*外,其余4个*DIERF*从EC到GE阶段, RNA-Seq与qRT-PCR中的整体表达趋势一致。*Dlo_008317.1ERF15-2*、*Dlo_022310.1ERF1-1*与*Dlo_009939.1ERF98*在GE阶段qRT-PCR中的表达量显著高于EC与ICpEC阶段; *Dlo_009070.1ERF106-3*则在EC阶段qRT-PCR中的表达量最高,显著高于GE与ICpEC阶段; *Dlo_022634.1ERF22-1*在ICpEC阶段表达量显著高于EC与GE阶段。从不同表达趋势来看,*DIERF*在龙眼体胚发生早期过程不同阶段都发挥了作用。

使用qRT-PCR研究了*DIERF*在不同浓度乙烯处理下的表达(图4)。在不同乙烯浓度24h处理下,5个*DIERF*基因均表现出差异的表达模式。与对照(CK)相比,不同梯度浓度的乙烯处理使得*DIERF*基因显著下调,虽然*Dlo_022310.1ERF1-1*、*Dlo_009939.1ERF98*与*Dlo_022634.1ERF22-1*在乙烯处理浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及*Dlo_008317.1ERF15-2*乙烯处理浓度为 $125 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时表达量显著上升,但总体仍为负调控趋势。

2.5 *DIERF* 家族成员与 lncRNA、miRNA 之间的关系预测与表达模式分析

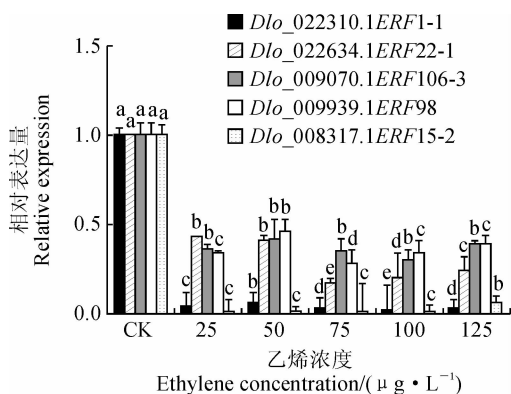
通过对 lncRNA 邻近的 mRNA 以及计算结合能的方法对 lncRNA 靶基因进行预测,本次对 108 个 *DIERF* 进行 lncRNA 的靶基因预测。5 个不同的 *DIERF* 基因分别被预测为 LTCONS_00052840、LTCONS_00055212、LTCONS_00016255、LTCONS_00013739 与 LTCONS_00043464 的靶基因。5 个 *DIERF* 基因都属于 lncRNA 的顺式调控靶基

因,其中除了 LTCONS_00043464 与对应 *DIERF* 基因位置关系为 lncRNA 位于 mRNA 上游 10 k 内外,其余的 4 个均为 lncRNA 位于 mRNA 下游 20 k 内。

利用 psRNATarget 在线预测(期望值 ≤ 5),预测龙眼 miRNA 数据库中靶向调控 *DIERF* 家族成员的 miRNA。结合 *DIERF* 与相关 lncRNA、miRNA 的关系预测,构建了龙眼体胚发生早期差异显著的 *ERF*-lncRNA-miRNA 的调控网络(图 5, A)。分析结果表明, *Dlo_009070.1ERF106-3*、*Dlo_009939.1ERF98*、*Dlo_008317.1ERF15-2* 与 *Dlo_022310.1ERF1-1* 均同时被 2 个 miRNA 调控,且 *Dlo_008317.1ERF15-2* 能作为 LTCONS_00013739 的靶基因。值得注意的是, *Dlo_miR413* 能够同时调控 *Dlo_009070.1ERF106-3* 与 *Dlo_008317.1ERF15-2*。

使用 qRT-PCR 分析了 5 个 *DIERF* 以及相关 lncRNA、miRNA 在 EC、ICpEC 与 GE 中的表达模式(图 5, B)。结果表明, LTCONS_00013739 对靶基因 *Dlo_008317.1ERF15-2* 为正调控关系,从 EC 到 GE 阶段表达量显著升高;在 EC 至 ICpEC 阶段以及 ICpEC 至 GE 阶段, *Dlo_miR164a* 通过靶向 *Dlo_022634.1ERF22-1* 负调控其表达; *Dlo_miR413* 与 *Dlo_miR1510a* 共同靶向 *Dlo_009070.1ERF106-3*, 从 EC 到 GE 阶段均表现出显著负调控关系,而 *Dlo_miR413* 与 *Dlo_008317.1ERF15-2* 的表达量表现出正相关,推测相比于 *Dlo_008317.1ERF15-2*, *Dlo_miR413* 更倾向于调控 *Dlo_009070.1ERF106-3*; 调控 *Dlo_009939.1ERF98* 相关的 *Dlo_miR408* 与 *Dlo_miR774b*, 从表达趋势来看, *Dlo_miR774b* 在龙眼体胚发生早期过程能负调控 *Dlo_009939.1ERF98*; *Dlo_miR399c* 与 *Dlo_022310.1ERF1-1* 在 EC 到 GE 阶段可能存在负调控关系。

使用 qRT-PCR 研究了 *DIERF* 及其相关的 miRNA、lncRNA 在不同浓度乙烯处理下的表达(图 6)。结果表明, *Dlo_miR413* 在不同浓度乙烯处理均没有差异。乙烯处理对 LTCONS_00013739 与其靶基因 *Dlo_008317.1ERF15-2* 表现出显著抑制作用; *Dlo_022634.1ERF22-1* 及 *Dlo_miR164a* 在从 75、100 至 $125 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯处理下表现为负调控关系;与对照(CK)相比, *Dlo_miR1510a* 在 $75 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯处理下表达量显著上升,与其靶基因 *Dlo_009070.1ERF106-3* 则表现相反趋势;除 CK 外, *Dlo_009939.1ERF98* 在 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯处理



不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

图 4 不同乙烯浓度处理下 *DIERF* 的表达模式

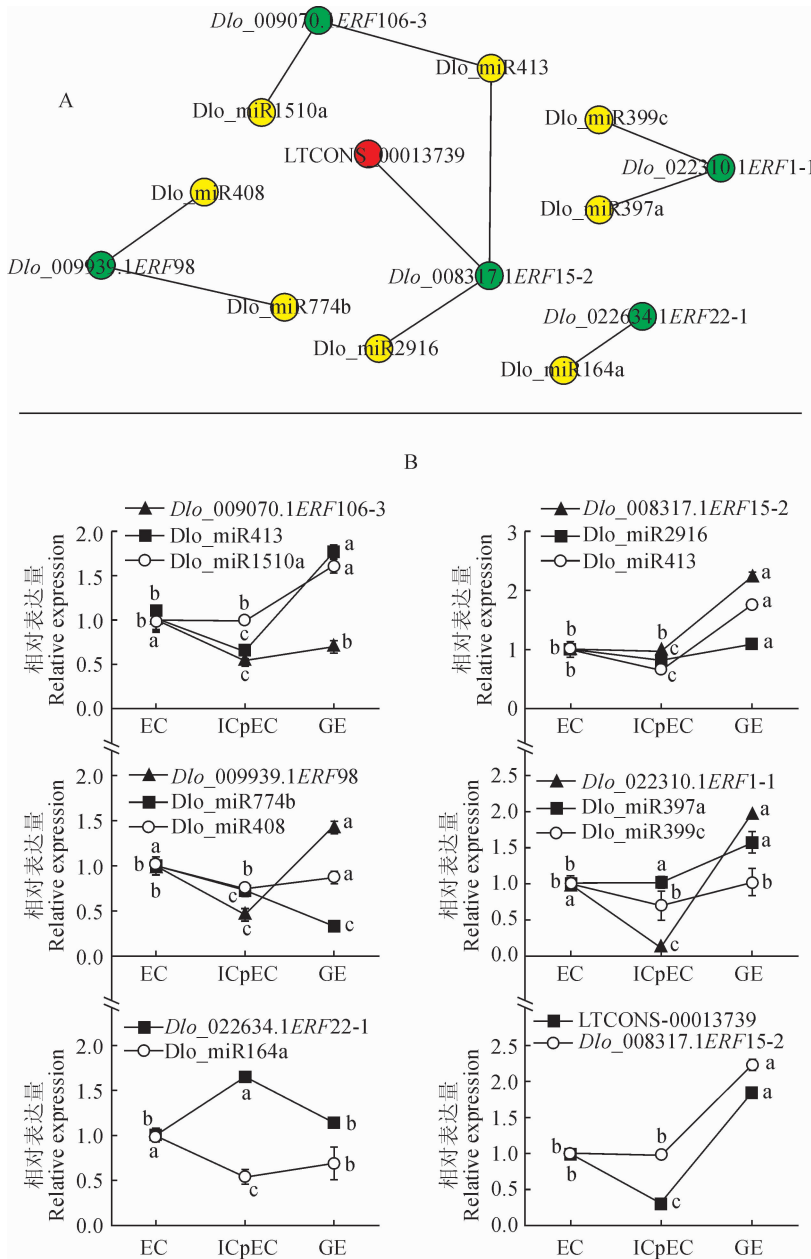
The normal letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$)

Fig. 4 Relative expression pattern of *DIERF* in different ethylene concentrations

下表达量最高,与其相关的 *Dlo_miR774b* 则在 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯处理下表达量最低,表现出显著的抑制作用;与 CK 相比,*Dlo_022310.1ERF1-1* 在 125 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯处理下表达量显著下降,与其相关的 *Dlo_miR399c* 则显著上升。根据前面对 *DlERF* 及其相关的 miRNA、lncRNA 在体胚发生早期的表达趋势分析对比可知,大部分的 *DlERF* 及其相关的

miRNA、lncRNA 在不同浓度乙烯处理下仍然表现出相同的调控趋势。

龙眼体胚发生早期过程中,*ERF* 基因及可能对其起到调控作用的 miRNA、lncRNA 的不同作用模式,以及在不同阶段、不同浓度乙烯处理中的差异表达,表明了 *DlERF* 在龙眼体胚发生早期过程中可能存在复杂的调控机制。



EC. 胚性愈伤组织; ICpEC. 不完全胚性紧实结构; GE. 球形胚

图 5 龙眼体胚发生早期差异表达的 *ERF* 基因与其相关的 miRNA、lncRNA 的表达趋势
 EC. Embryogenic callus; ICpEC. Incomplete embryonic compact structure; GE. Globular embryo
 Fig. 5 Trends of expression of *ERF* genes and their associated miRNAs and lncRNAs
 in the early stage of longan somatic embryogenesis

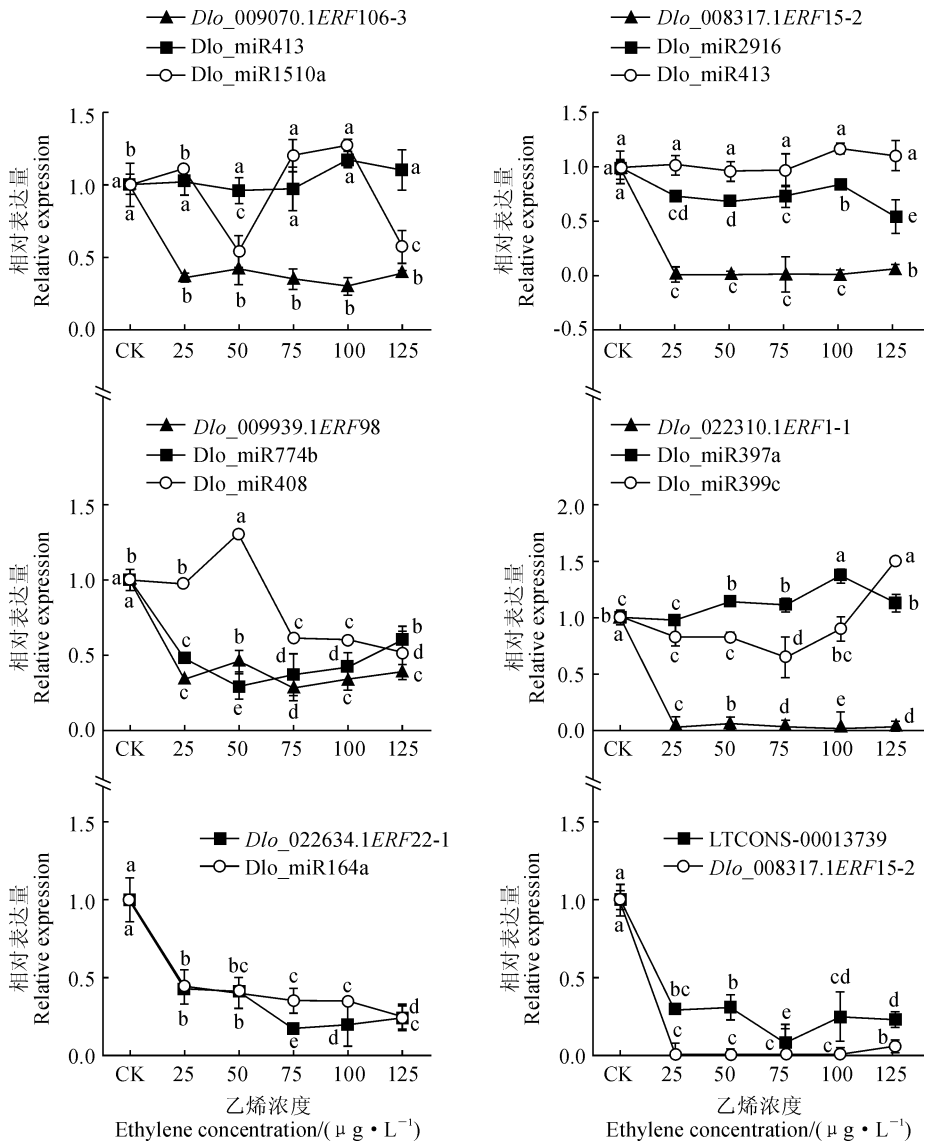


图 6 不同乙烯浓度处理下 *DIERF* 基因与其相关的 miRNA, lncRNA 的表达趋势

Fig. 6 Trends of expression of *DIERF* genes and their associated miRNAs and lncRNAs in different ethylene concentrations

3 讨论

3.1 龙眼体胚发生早期过程中大量的 *ERF* 基因在 GE 阶段高表达

AP2/ERF 是一个庞大的转录因子家族, 能够对植物生长发育^[32-33]、基因表达^[34] 以及生物^[35] 与非生物胁迫^[36] 等方面发挥重要作用, 并且在植物体胚发生过程中也起着至关重要的调控作用^[13]。然而在龙眼 *ERF* 全基因组家族还未进行系统鉴定, 大多数 *DIERF* 基因在龙眼中的功能和作用仍然未知。

Nakano 等^[30] 对拟南芥与水稻 *ERF* 家族进行全基因组分析, 包括基因结构, 系统发育, 染色体位

置和保守基序等。因此本研究对龙眼 *ERF* 家族进行系统地分析, 从龙眼数据库中鉴定了 108 个 *ERF* 家族基因, 通过系统进化树的构建以及保守基序分析表明, 108 个 *ERF* 家族基因具有相同的保守基序, *AP2/ERF* 结构域在龙眼中相对最为保守, 系统进化树节点的自展值相对较低, 基于 *DIERF* 保守基序分析, 推测除 *AP2/ERF* 结构域之外, 其余部分成员间差距较大。对 5 个在龙眼体胚发生过程中富集的 *ERF* 基因进一步分析发现, 由于 *AP2/ERF* 结构域中 2 个位置上氨基酸残基的差距, 5 个龙眼体胚发生早期差异表达 *DIERF* 基因属于 *ERF* 家族中的 2 个亚家族。研究表明在拟南芥 *ERF* 家族成员中, *AtERF1* 能够在非生物胁迫下扮演正调控的角

色^[37]; *AtERF15* 不仅是 ABA 响应的正调节因子, 并且在根与胚胎中高度表达^[38]; 以及 *AtERF98* 能够调节植物重要抗氧化剂生物合成, 有助于提高拟南芥的耐盐性^[39]。可见, 在龙眼体胚发生早期过程中差异表达的 *ERF* 基因可能对提高龙眼抗逆性起到十分重要的作用, 并且 *Dlo_022310.1ERF1-1*、*Dlo_008317.1ERF15-2* 与 *Dlo_009939.1ERF98* 在龙眼体胚发生早期过程中表达量均呈现上升趋势。这也进一步说明, 随着龙眼体胚发生早期进行, 内源激素^[40]等方面发生显著变化, 为了促进胚胎的正常发育, 需要更多的 *DlERF* 基因参与。

在本次研究中, 为了鉴定龙眼体胚发生过程中 *ERF* 基因的表达模式, 对 101 个在龙眼体胚发生早期过程检测到表达的 *ERF* 基因进行 RNA-Seq 表达分析。大部分 *DlERF* 基因在 GE 阶段表达量最高, 其次是 EC 阶段。Boutilier 等^[41]与 Tsuwamoto 等^[42]鉴定一些 *AP2/ERF* 基因能够促进胚胎发育, 并推测他们在 SE 的诱导过程中具有特定的功能。通过对 5 个在龙眼体胚发生早期差异显著表达的 *DlERF* 基因进行 qRT-PCR 与 RNA-Seq 表达结果对比发现, 大部分在龙眼体胚发生早期 3 个阶段的表达趋势一致, 且其中 3 个 *DlERF* 基因在龙眼 GE 阶段表达量最高。与蒴藜苜蓿体胚发生过程中发现的 *MtSERF1* 相同趋势, 在球形胚分生组织中高表达^[12]。由此可见, 从 EC 到 GE 阶段需要更多的 *ERF* 基因来参与 GE 阶段的维持, 也进一步说明在体胚发生早期过程中, 细胞分裂分化、抗性等方面也逐渐增强。

3.2 *DlERF* 基因与乙烯之间存在负调控关系并且可能与 miRNA、lncRNA 形成调控网络

乙烯在体胚发生过程中起着重要的作用^[43-44]。前人研究发现, 在龙眼体胚发生发育的过程中, 乙烯含量在不完全胚性紧实结构与心形胚分别出现了峰值, 松散型的胚性愈伤组织、球形胚以及子叶形胚的表达量相对较低^[18]。同样也有研究表明, 对于依赖

GCC-box 表达的 *ERF* 基因来说, 既可以是转录激活因子, 也可以是转录抑制子, 并且只有一小部分受乙烯调节^[45]。因此对龙眼 EC 使用不同浓度乙烯处理时发现, 与 CK 相比, 在不同浓度处理下 5 个 *DlERF* 基因均表现为显著下调。结果表明, 乙烯与龙眼体胚发生早期 5 个差异表达的 *ERF* 基因存在负调控关系。另一方面, 5 个 *DlERF* 基因在外源乙烯处理下的表达趋势是相似的, 这意味着这 5 个 *DlERF* 基因可能在应对外源不同浓度乙烯处理时产生类似的响应, 也进一步表明其功能保守性。

除了与基因相互作用外, *ERF* 基因也可能与 miRNA、lncRNA 相互作用。目前, lncRNA 在植物体胚发生过程调控作用的研究还未见报道, 但是关于植物中 lncRNAs 的研究已有部分研究, 多数以模式植物^[46-47]与水稻^[48]等作物为研究对象。但对于 miRNA 来说, 已经在龙眼中做了大量的研究, 例如: *Dlo_miR156* 家族成员与早期胚胎培养发育阶段相关^[49], *Dlo_miR162* 与多个 miRNA 共同调节体细胞胚胎发育的特定阶段^[50]等。分析结果显示, 一个 *DlERF* 可能被多个 miRNAs 靶向, 一个 miRNA 也可能靶向多个 *DlERF* 基因。通过对龙眼体胚发生早期过程中以及不同浓度乙烯处理下差异表达 5 个 *ERF* 基因的调控网络进行 qRT-PCR 验证, 不仅初步验证了 *DlERF* 基因与其相关的 miRNA、lncRNA 可能存在的调控关系, 同时推测对于 2 个 miRNA 同时调控同一个 *DlERF* 基因, 并且 miRNA 对 *DlERF* 的调控作用具有偏好性。因此认为可能由于存在多个调控网络, 导致其难以从表达量中发现其调控趋势。从复杂的关系网络中可以看出, 作为生物与非生物胁迫相关的基因, 在龙眼体胚发生过程中发挥着至关重要的作用, 以上研究仅仅是 *DlERF* 基因与 lncRNAs、miRNA 调控网络中的冰山一角, 在龙眼体胚发生早期过程中, *DlERF* 所发挥的功能以及调控作用需要在今后的工作中进行研究验证。

参考文献:

- [1] KAGAYA Y, OHMIYA K, HATTORI T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(2): 470-478.
- [2] LICAUSI F, GIORGI F M, ZENONI S, et al. Genomic and transcriptomic analysis of the *AP2/ERF* superfamily in *Vitis vinifera*[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 719-719.
- [3] JOFUKU K D, DEN BOER B G, VAN M M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*[J]. *Plant Cell*, 1994, 6(9): 1 211.
- [4] WU Y M, TANG Y X, ZHOU M L. Genome-wide analysis of *AP2/ERF* transcription factor family in *Zea mays*[J]. *Current Bioinformatics*, 2012, 7(3): 324-332

- [5] LATA C, MISHRA A K, MUTHAMILARASAN M, *et al.* Genome-wide investigation and expression profiling of AP2/ERF transcription factor superfamily in foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. *Plos One*, 2014, **9**(11): e113092.
- [6] ITO T M, POLIDO P B, RAMPIM M C, *et al.* Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the AP2/ERF gene superfamily in sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Genetics & Molecular Research*, 2014, **13**(3): 7 839-7 851.
- [7] JING Z, PENG R H, CHENG Z M, *et al.* Genome-wide analysis of the putative AP2/ERF family genes in *Vitis vinifera* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, **123**(1): 73-81.
- [8] ZHU X, QI L, LIU X, *et al.* The wheat ethylene response factor transcription factor pathogen-induced ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen rhizoctonia cerealis and freezing stresses [J]. *Plant Physiology*, 2014, **164**(3): 1 499-1 514.
- [9] YANG Y, DONG C, LI X, *et al.* A novel Ap2/ERF transcription factor from *Stipa purpurea* leads to enhanced drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, **35**(11): 1-13.
- [10] YANG R, LIU J, LIN Z, *et al.* ERF transcription factors involved in salt response in tomato [J]. *Plant Growth Regulation*, 2018: 1-10.
- [11] SHI Q, DONG Y, ZHOU Q, *et al.* Characterization of a maize ERF gene, *ZmERF1*, in hormone and stress responses [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, **38**(5): 126.
- [12] MANTIRI F R, KURDYUKOV S, LOHAR D P, *et al.* The transcription factor *MtSERF1* of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiology*, 2008, **146**(4): 1 622.
- [13] PIYATRAKUL P, PUTRANTO R A, MARTIN F, *et al.* Some ethylene biosynthesis and AP2/ERF genes reveal a specific pattern of expression during somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, **12**(1): 244-244.
- [14] 张晓卫, 曹蔚, 王玉琨, 等. 龙眼的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2012, **27**(5): 493-496.
- ZHANG X W, CAO W, WANG Y K, *et al.* Study of the progress on chemical constituents and pharmacological activities of longan [J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2012, **27**(5): 493-496.
- [15] 梁文裕, 陈伟, 宋瑞峰, 等. 龙眼胚胎发育研究进展 [J]. 亚热带植物科学, 2004, **33**(4): 65-68.
- LIANG W Y, CHEN W, SONG R F, *et al.* Advances in embryo development of longan [J]. *Subtropical Plant Science*, 2004, **33**(4): 65-68.
- [16] 赖钟雄. 龙眼生物技术研究 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2003.
- [17] LIN Y, MIN J, LAI R, *et al.* Genome-wide sequencing of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) provides insights into molecular basis of its polyphenol-rich characteristics [J]. *Gigascience*, 2017, **6**(5): 1-14.
- [18] 李惠华, 赖钟雄, 林玉玲, 等. 龙眼胚性愈伤组织 ACC 氧化酶基因的克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析 [J]. 中国农业科学, 2010, **43**(18): 3 798-3 808.
- LI H H, LAI Z X, LIN Y L, *et al.* Cloning of ACO gene from embryogenic calli of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) and its expression during Longan somatic embryogenesis. [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, **43**(18): 3 798-3 808.
- [19] 李惠华, 赖钟雄, 苏明华, 等. 龙眼体胚发生过程中两个乙烯受体基因的定量表达分析 [J]. 热带作物学报, 2011, **32**(7): 1 314-1 319.
- LI H H, LAI Z X, SU M H, *et al.* Quantitative expression analysis of two ethylene receptor genes from embryogenic callus in *Dimocarpus longan* Lour [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, **32**(7): 1 314-1 319.
- [20] 陈秋金. 转录因子 *Dt-ASR1* 和 *Dt-ERF1* 与龙眼果实生长发育的关系 [D]. 广州: 华南农业大学, 2009.
- [21] QIN T, ZHAO H, CUI P, *et al.* A nucleus-localized long non-coding RNA enhances drought and salt stress tolerance [J]. *Plant Physiology*, 2017, **175**(3): 1 321.
- [22] GAO S, YANG L, ZENG H Q, *et al.* A cotton miRNA is involved in regulation of plant response to salt stress [J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 19 736.
- [23] 韩素芬. 玉米纹枯病胁迫响应相关 miRNA 的功能研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
- [24] LIN Y, LAI Z. Comparative analysis reveals dynamic changes in mirnas and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. *Plos One*, 2013, **8**(4): e60337.
- [25] 赖钟雄, 潘良镇. 龙眼胚性细胞系的建立与保持 [J]. 福建农林大学学报(自然版), 1997, (2): 160-167.
- LAI Z X, PAN L Z. Establishment and maintenance of longan embryogenic cell lines [J]. *Journal of Fujian Agricultural University* (Nat. Sci. Edi.), 1997, (2): 160-167.
- [26] 王亚婷. 龙眼胚性愈伤组织中若干 microRNA 的初级体克隆及其功能分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [27] ÖVERNÄS E. Characterisation of members of the HD-Zip I and DREB/ERF transcription factor families and their functions in plant stress responses [D]. Uppsala: Uppsala University, 2010.
- [28] LASSERRE E, JOBET E, LLAURO C, *et al.* *AtERF38* (*At2g35700*), an AP2/ERF family transcription factor gene from *Arabidopsis thaliana*, is expressed in specific cell types of roots, stems and seeds that undergo suberization [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2008, **46**(12): 1 051-1 061.
- [29] CHIA K F. The *Arabidopsis* transcription factor *ERF13* negatively regulates defense against *Pseudomonas syringae* [D]. San Diego: University of California, 2013.
- [30] NAKANO T, SUZUKI K, FFJIMURA T, *et al.* Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice

- [J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(2): 411.
- [31] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET J G, *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2002, **290**(3): 998-1009.
- [32] KUNST L, KLENZ J E, MARTINEZZAPATER J, *et al.* AP2 gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 1989, **1**(12): 195-1208.
- [33] KECK E, MCSTEEN P, CARPENTER R, *et al.* Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers[J]. *Embo Journal*, 2003, **22**(5): 1058-1066.
- [34] BROWN R L, KAZAN K, MCGRATH K C, *et al.* A Role for the GCC-Box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, **132**(2): 1020-1032.
- [35] FISCHER U, DRÖGE-LASER W. Overexpression of *NtERF5*, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, **17**(10): 1162-1171.
- [36] WEI R, LIN Q, AIYUN W, *et al.* The *ERF* transcription factor *TaERF3* promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, **12**(4): 468-479.
- [37] 郭玮文. *AtERF* 及 *AIL7* 在非生物逆境耐受性上分别扮演的角色[D]. 台湾:台湾大学植物科学研究所, 2010.
- [38] LEE S B, LEE S J, KIM S Y. *AtERF15* is a positive regulator of ABA response[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, **34**(1): 71-81.
- [39] 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 Journal for Cell & Molecular Biology*, 2012, **71**(2): 273.
- [40] 赖钟雄, 陈春玲. 龙眼体细胞胚胎发生过程中的内源激素变化[J]. 热带作物学报, 2002, **23**(2): 41-47.
- LAI Z X, CHEN C L. Changes of endogenous phytohormones in the process of somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus Longan* Lour.)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2002, **23**(2): 41-47.
- [41] BOUTILIER K, OFFRINGA R, SHARMA V K, *et al.* Ectopic expression of *BABYBOOM* Triggers a conversion from vegetative to embryonic growth[J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(8): 1737-1749.
- [42] TSUWAMOTO R, YOKOI S, TAKAHATA Y. *Arabidopsis* embryonaker encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, **73**(4-5): 481-492.
- [43] PAN I, LI C W, SU R C, *et al.* Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of *SlERF3* enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato[J]. *Planta*, 2010, **232**(5): 1075-1086.
- [44] ZHANG G, MING C, CHEN X, *et al.* Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the *ERF* gene family in soybean (*Glycine max* L.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, **59**(15): 4095.
- [45] FUJIMOTO S Y, OHTA M, USUI A, *et al.* *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression[J]. *Plant Cell*, 2000, **12**(3): 393-404.
- [46] FRANCO-RANCO-ZORRILLA JM, VALLI A, TODESCO M, *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity[J]. *Nature Genetics*, 2007, **39**(8): 1033.
- [47] HEO J B, SUNG S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA[J]. *Science*, 2011, **331**(6013): 76.
- [48] WASAKI J, YONETANI R T, KAI M, *et al.* Expression of the *OsPI1* gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status[J]. *New Phytologist*, 2003, **158**(2): 239-248.
- [49] LIN Y, LAI Z, LIN Y, *et al.* Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.)[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(4): e60337.
- [50] ZHANG J, ZHANG S, HAN S, *et al.* Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis[J]. *Planta*, 2012, **236**(2): 647-657.

(编辑:宋亚珍)