

• 农业生物技术 •

# 钩吻 *GeERF4B-1* 转录因子的鉴定与功能分析

尤垂淮<sup>1</sup>, 陈睿琪<sup>1</sup>, 孙欣路<sup>2</sup>, 李莹莹<sup>2</sup>, 苏亚春<sup>2\*</sup>

1 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州 350002

2 福建农林大学 农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室, 福建 福州 350002

尤垂淮, 陈睿琪, 孙欣路, 李莹莹, 苏亚春. 钩吻 *GeERF4B-1* 转录因子的鉴定与功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4198-4210.

YOU Chuihuai, CHEN Ruiqi, SUN Xinlu, LI Yingying, SU Yachun. Identification and functional analysis of the transcriptional factor *GeERF4B-1* in *Gelsemium elegans*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4198-4210.

**摘要:** 钩吻(*Gelsemium elegans*)为马钱科钩吻属藤本植物, 具有药用和禽畜饲用功效, 但其在生长过程中易受低温危害的影响, 因此挖掘低温响应基因对钩吻抗寒育种具有重要意义。乙烯响应因子(ethylene responsive factor, ERF)属于 AP2/ERF 转录因子超家族成员, 在植物逆境胁迫应答反应中发挥关键作用。本研究基于钩吻转录组数据库挖掘到的响应低温胁迫的 *GeERF* 的 unigene 序列, 利用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术从钩吻叶片克隆获得 *GeERF4B-1* 转录因子的 cDNA 全长序列。生物信息学分析表明, *GeERF4B-1* 基因开放阅读框长度为 759 bp, 编码 252 个氨基酸, 蛋白相对分子量为 27 kDa, 预测为不稳定的碱性亲水性蛋白。系统进化树分析结果显示, *GeERF4B-1* 属于 ERF 家族的 B-4 亚族成员。亚细胞定位实验结果表明, *GeERF4B-1* 定位在细胞核。实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)分析表明, *GeERF4B-1* 基因在钩吻根、茎、叶中均有表达, 在根中的表达量最高。经 4 °C 低温、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和脱落酸(abscisic acid, ABA)处理后, 相比于对照, *GeERF4B-1* 基因均被诱导上调表达, 分别在 24 h 或 48 h 达到峰值, 表明该基因积极响应低温、MeJA 和 ABA 胁迫; 而氯化钠(sodium chloride, NaCl)和干旱处理后, *GeERF4B-1* 基因均被诱导下调表达。此外, 构建 *GeERF4B-1* 基因的原核表达载体, 诱导获得大小约 52 kDa 的融合蛋白。平板胁迫验证结果显示, 与对照相比, 转入 *GeERF4B-1* 的原核表达菌株能增强对低温的耐受性, 但对盐胁迫和甘露醇胁迫较敏感。本研究为钩吻的抗逆性育种提供了潜在的基因资源和理论参考。

**关键词:** 钩吻; ERF 转录因子; 生物学功能; 逆境胁迫; 表达分析

资助项目: 福建农林大学科技创新专项基金(KFB23076)

This work was supported by the Fujian Agriculture and Forestry University Science and Technology Innovation Special Fund (KFB23076).

\*Corresponding author. E-mail: syc2009mail@163.com

Received: 2024-07-23; Accepted: 2024-09-04; Published online: 2024-09-05

# Identification and functional analysis of the transcriptional factor *GeERF4B-1* in *Gelsemium elegans*

YOU Chuihuai<sup>1</sup>, CHEN Ruiqi<sup>1</sup>, SUN Xinlu<sup>2</sup>, LI Yingying<sup>2</sup>, SU Yachun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** *Gelsemium elegans*, a vine plant of Loganiaceae, has both medicinal and forage values. However, it is susceptible to low temperatures during growth. Exploring low temperature response genes is of great significance for cold resistance breeding of *G. elegans*. Ethylene response factors (ERFs) are the transcription factors of the AP2/ERF superfamily and play a crucial role in plant stress response. In this study, based on the unigene *GeERF* involved in the response to low temperature stress in the transcriptome of *G. elegans*, a full-length cDNA sequence of the transcription factor *GeERF4B-1* was cloned from the leaves of *G. elegans* by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Bioinformatics analysis showed that *GeERF4B-1* had an open reading frame of 759 bp, encoding a protein composed of 252 amino acid residues and with a relative molecular weight of 27 kDa. The deduced protein was predicted to be an unstable, alkaline, and hydrophilic protein. The phylogenetic tree showed that *GeERF4B-1* was in the same clade as the B-4 subfamily of the ERF family. The results of the subcellular localization experiment revealed that *GeERF4B-1* was located in the nucleus. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis indicated that *GeERF4B-1* was expressed in the root, stem, and leaf of *G. elegans*, with the highest expression level in the root. Compared with the control, the treatments with a low temperature (4 °C), methyl jasmonate (MeJA), and abscisic acid (ABA) up-regulated the expression level of *GeERF4B-1*, which reached the peak at 24–48 h. This result revealed that *GeERF4B-1* actively responded to low temperature, MeJA, and ABA stresses. However, both sodium chloride (NaCl) and drought treatments down-regulated the expression of *GeERF4B-1*. In addition, a prokaryotic expression vector of *GeERF4B-1* was constructed, and a fusion protein of approximately 52 kDa was yielded after induced expression. The results of the plate stress assay showed that compared with the control, the prokaryotic strain expressing *GeERF4B-1* demonstrated enhanced tolerance to low temperatures and sensitivity to salt and mannitol stresses. This study provides theoretical references and potential genetic resources for breeding *G. elegans* varieties with stress resistance.

**Keywords:** *Gelsemium elegans*; ERF transcription factor; biological function; adverse stress; expression analysis

钩吻(*Gelsemium elegans*)为马钱科藤本植物,在民间又被称为断肠草、大茶药、野葛等<sup>[1]</sup>,

其全株都可入药,是我国传统的药用植物,民间常用于治疗跌打损伤、皮肤溃疡、风湿等疾

病。近年研究发现钩吻能有效改善免疫功能,具有抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、镇痛<sup>[4]</sup>、抗焦虑<sup>[5]</sup>、抑菌<sup>[6]</sup>、治疗神经疼痛<sup>[7]</sup>等功效。在养殖行业,钩吻可以促进禽畜生长,提高禽畜的抗病能力<sup>[8]</sup>。钩吻还能作为植物源杀菌剂、杀虫剂等,对柑橘溃疡病<sup>[9]</sup>、褐飞虱<sup>[10]</sup>等病虫害起到防治作用。随着人们对钩吻药用价值认识的不断深入,对其野生资源的过度开采已导致其储量严重减少<sup>[11]</sup>。此外,钩吻植株在生长过程中对低温的耐受性较差,当环境温度低于 5 °C 时,其幼叶褐变,长时间处于低温环境下植株无法正常生长<sup>[12]</sup>。因此,研究钩吻在低温胁迫下的分子机制对钩吻资源的开发和可持续利用具有重要意义。

乙烯响应因子(ethylene-responsive factor, ERF)为 AP2/ERF 转录因子家族成员,在植物中广泛分布。ERF 属多基因家族,该家族可以分为 DREB 转录因子(dehydration responsive element binding protein, DREB) (A-1-A-6)与 ERF (B-1-B-6)<sup>[13-14]</sup>两个亚组。研究结果显示,ERF 转录因子参与调节植物应对低温、高盐、干旱、病虫害等逆境的胁迫响应<sup>[15-17]</sup>。受非生物胁迫后,ERF 通过调控与非生物逆境胁迫相关基因的表达,进而调节植物对逆境的适应性<sup>[16]</sup>。在低温胁迫条件下,梅花(*Chimonanthus praecox*) *PmERF109* 和 *PmERF109-like* 基因表达量上升<sup>[18]</sup>。番茄(*Solanum lycopersicum*) *ERF15* 通过直接结合 *CBF1*、*WRKY6* 和 *SAG21-like* 基因的启动子以促进其表达,从而调节番茄抗低温的能力,而敲除 *ERF15* 基因后的植株对低温耐受性下降<sup>[19]</sup>。在青海茄参(*Mandragora caulescens*)<sup>[20]</sup>、蝴蝶兰(*Phalaenopsis Aphrodite*)<sup>[21]</sup>、芹菜(*Apium graveolens*)<sup>[22]</sup>等多种植物中也有关于 ERF 转录因子的鉴定及其在低温胁迫下的表达分析。此外,ERF 转录因子还参与调节水杨酸(salicylate,

SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ET)和脱落酸(abscisic acid, ABA)等信号通路,使植物能够应对低温、干旱、高盐等胁迫环境,做出适应性的调节<sup>[23]</sup>。

目前,关于钩吻 *ERF* 基因的研究较少。为了探究钩吻 *GeERF* 基因的生物学功能,本研究基于课题组转录组数据中鉴定到的应答低温胁迫的钩吻 *GeERF* 转录因子序列,从钩吻叶片中克隆获得 *GeERF4B-1* 基因的全长 cDNA 序列,并对该基因进行组织特异性表达、低温和激素胁迫下的表达、亚细胞定位、原核表达和平板胁迫验证,以期为钩吻的抗逆性分子育种提供参考和基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

实验室所用的钩吻材料采集自福建省龙岩永定县,经福建农林大学张重义教授鉴定为马钱科钩吻属常绿木质藤本钩吻。采集野生钩吻不同组织(根、茎、叶)后,置于-80 °C 保存。将龙岩采集来的钩吻幼苗置于实验室培养一段时间后,取长势一致的幼苗,分别进行 4 °C 低温胁迫处理、100 μmol/L 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和 100 μmol/L ABA 喷施钩吻幼苗叶片处理以及 400 mmol/L NaCl 和干旱(土壤含水量保持在田间持水量的(55±5)%,每天 17:00-18:00 使用土壤水分测定仪测定盆栽土壤含水量,并用烘干法校正)胁迫处理。在低温处理的 0、6、12、24 h 收集叶片,MeJA 和 ABA 处理于 0、6、12、24、48 h 收集叶片,NaCl 和干旱处理于 0、3、5、7 d 收集叶片,材料置于-80 °C 保存。每个处理均设置 3 个生物学重复。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法对所有钩吻样品进行总 RNA 提取,RNA 浓度测定及 cDNA 合成参考尤垂淮等<sup>[12]</sup>方法。

### 1.3 钩吻 *GeERF4B-1* 基因的克隆及序列分析

基于课题组前期构建的转录组数据库挖掘的响应低温胁迫的 *GeERF4B-1* 基因序列 (GenBank 登录号: PQ274242), 通过 NCBI 网站设计克隆引物(表 1)。以钩吻叶片 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增、胶回收、连接转化、测序分析<sup>[12]</sup>。使用 ProParam、SignalP 4.1 Serve、TMHMM-2.0、NCBI Blast、DNAMAN7 软件对钩吻 *GeERF4B-1* 基因编码蛋白的理化性质、信号肽、跨膜结构域和同源序列进行分析。采用 MEGA7 软件中的邻接法 (neighbor-joining) (bootstrap=1 000), 将 *GeERF4B-1* 与 NCBI 检索到的同源序列长春花 (*Catharanthus roseus*) CrERF (GenBank 登录号: KAI5674761.1)、野生林烟草 (*Nicotiana glauca*) NsERF (GenBank 登录号: XP\_009770784.1) 和咖啡 (*Coffea arabica*) CaERF (GenBank 登录号: XP\_027063176.1), 以及已报道的水稻 (*Oryza sativa*)、高粱 (*Sorghum bicolor*) 和玉米 (*Zea mays*) DREB (A-1-A-6) 与 ERF (B-1-B-6) 蛋白序列<sup>[13-14]</sup> 构建系统进化树。

### 1.4 亚细胞定位分析

参考苏亚春的方法<sup>[24]</sup>, 构建 *GeERF4B-1* 基因的亚细胞定位载体 pFAST-R05-*GeERF4B-1-GFP* (35S::*GeERF4B-1*::GFP)。将阳性重组质粒和空载质粒 pFAST-R05-*GFP* (35S::*GFP*) 分别转入农

杆菌 GV3101 感受态细胞(上海唯地生物技术有限公司), 经 PCR 验证后, 在含壮观霉素和利福平抗性的 LB 液体培养基中扩繁。当菌液  $OD_{600}$  为 0.6–0.8 时, 5 000 r/min 离心 5 min 后去除上清液, 加入含 10 mmol/L 甲基磺酸乙酯、10 mmol/L 氯化镁和 200 mmol/L 乙酰丁香酮的侵染液, 将农杆菌重悬至  $OD_{600} \approx 0.8$ , 暗处静置 3 h。随后, 与细胞核 marker 基因 *NbH2B* (组蛋白 H2B) 的侵染液等比例混匀, 用注射器从背面注射本氏烟叶片, 暗培养 10 h 后, 在 28 °C 下光照 16 h/黑暗 8 h 培养 2 d。剪取注射叶制备装片, 于激光共聚焦显微镜 (Leica) 下观察亚细胞定位情况。

### 1.5 RT-qPCR 分析

根据已克隆的 *GeERF4B-1* 基因序列, 利用 Beacon Designer 8 软件设计定量检测引物(表 1)。以逆转录合成的 cDNA 样品作为模板, 进行实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 反应, 分析 *GeERF4B-1* 基因在钩吻不同组织、4 °C 低温、ABA、MeJA 胁迫下的表达水平。每个处理设置 3 个生物学重复和 3 次技术重复, 并以无菌水为模板作阴性对照。RT-qPCR 反应程序: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 45 个循环。利用 ABI PRISM7500 Real-time PCR System 进行

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer name   | Primer sequence (5'→3')                                | Usage                                   |
|---------------|--|---|
| GeERF4B-1-F   | ATTCCTCACCCAAACTCAC                                    | Gene cloning                            |
| GeERF4B-1-R   | GGACTAATAGCAGACCGACCAA                                 |   |
| GeERF4B-1-G-F | GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCGGAGAGGCAG<br>AGCAGC | Construction of<br>gateway entry vector |
| GeERF4B-1-G-R | GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGAGACATAGAGCTGTG<br>CAGT  |   |
| GeERF4B-1-Q2F | GACGGAGATTGCGACATAGC                                   | RT-qPCR                                 |
| GeERF4B-1-Q2R | TTCATCCATCCATCCATCAGAGA                                |   |
| GeCUL-F       | CAAATTGGGCAGAGGCCACC                                   |   |
| GeCUL-R       | TCTGGGGCTGGCTGTAGAAT                                   |   |

反应, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算基因相对表达量。通过 IBM SPSS Statistics 24 软件分析数据显著性水平, 采用 Graphpad Prism 9.5.0 软件作图。实验所得结果以平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较。

### 1.6 原核表达分析

以 *GeERF4B-1* 的阳性克隆质粒为模板, 利用 Gateway 入门载体引物 GeERF4B-1-G-F/R (表 1) 进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳后回收纯化, 并通过 BP 反应[Gateway<sup>®</sup> BP Clonase<sup>™</sup> II Enzyme Mix (Invitrogen)] 连接入门载体 pDONR-207 和转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。将测序验证的 pDONR-207-*GeERF4B-1* 质粒经 LR 反应[Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>™</sup> II Enzyme Mix (Invitrogen)] 构建到原核表达载体 pEZYHb。经过菌液 PCR 和测序验证后, 将阳性重组质粒 pEZYHb-207-*GeERF4B-1* 和空载质粒 pEZYHb 转入大肠杆菌感受态细胞 Rossetta (DE3), 在含有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中扩繁至菌液  $OD_{600}=0.6$ , 加入 100  $\mu$ L 0.8 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D- 硫代半乳糖苷 (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 于 37  $^{\circ}$ C 振荡培养。重组菌分别于诱导 0、4、10、20 h 取样, 空白和阴性对照在诱导 0 h 和 20 h 取样。所有样品于 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 每管加入 100  $\mu$ L 1 $\times$ protein loading buffer, 沸水浴 7 min 后, 12 000 r/min 离心 5 min。取 10  $\mu$ L 上清液点样于 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳, 并用考马斯亮蓝染色液染色拍照。

### 1.7 平板胁迫验证

挑取 Rossetta+pEZYHb-207-*GeERF4B-1* 和 Rossetta+pEZYHb 菌株的单菌落于氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基培养至菌液  $OD_{600}=0.6$ , 加入 IPTG 诱导过夜后, 用 LB 液体培养基将菌

液稀释至  $OD_{600}=1.0$ , 再进行  $10^{-3}$  和  $10^{-4}$  稀释。取 10  $\mu$ L 菌液点样于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 在 4  $^{\circ}$ C 下培养 0、3、7、14 d 后, 37  $^{\circ}$ C 培养 14 h 后拍照。将 10  $\mu$ L 菌液点样于含 150、300、450 mmol/L NaCl 的氨苄青霉素抗性 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h 后拍照。另将 10  $\mu$ L 菌液点样于含 100、200、300 mmol/L 甘露醇的氨苄青霉素抗性 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h 后拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 钩吻 *GeERF4B-1* 基因的克隆与序列分析

基于前期挖掘到的在 4  $^{\circ}$ C 低温胁迫 24 h 时显著高表达(log<sub>2</sub> FC = 4.39)的 *GeERF4B-1* 基因的 unigene 序列(unigene ID: c23872.graph\_c1), 设计克隆引物。利用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术, 从钩吻叶片中分离获得 1 条与 *GeERF4B-1* 基因(GenBank 登录号: PQ274242) 预期条带大小(1 239 bp)吻合的特异性片段(图 1)。生物信息学分析结果表明, *GeERF4B-1* 基因的开放阅读框长度为 759 bp, 编码 252 个氨基酸, 蛋白相对分子量为 27 kDa, 等电点为 8.31, 不稳定系数为 60.33, 平均疏水性为-0.62 (<0), 推测 GeERF4B-1 为不稳定的碱性亲水性蛋白。NCBI 检索结果显示, GeERF4B-1 与长春花 CrERF (GenBank 登录号: KAI5674761.1)、野生林烟草 NsERF (GenBank 登录号: XP\_009770784.1)和咖啡 CaERF (GenBank 登录号: XP\_027063176.1)的氨基酸序列相似性分别为 81.75%、66.93%和 66.22% (图 2)。*GeERF4B-1* 基因的编码蛋白含有 1 个 AP2 保守结构域(图 2), 无跨膜螺旋结构和信号肽。系统进化树分析结果显示, GeERF4B-1 属于 ERF 家族的 B-4 亚族成员(图 3)。

### 2.2 *GeERF4B-1* 基因的表达模式

RT-qPCR 检测结果显示, *GeERF4B-1* 基因在钩吻根、茎、叶均有表达, 其在根中的表达

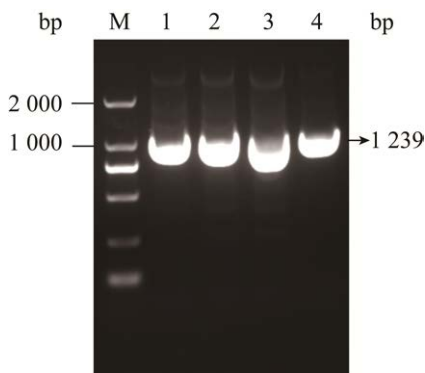


图 1 钩吻 *GeERF4B-1* 基因的 RT-PCR 扩增产物  
M: 2 000 bp DNA marker. Lane 1–4: RT-PCR 扩增产物

Figure 1 RT-PCR amplification products of *Gelsemium elegans GeERF4B-1* gene. M: 2 000 bp DNA marker. Lane 1–4: RT-PCR amplification products.

量最高, 是叶中的 1.31 倍, 在茎和叶中的表达量差异不显著(图 4A)。在 4 °C 处理 6–12 h 时, *GeERF4B-1* 的表达水平与对照差异不显著, 但在 24 h 时表达量显著增加, 为对照的 4.00 倍(图 4B)。在 MeJA 处理 6 h 和 24 h 时, *GeERF4B-1* 基因的表达量显著上调, 分别为对照的 1.64 和 3.69 倍(图 4C), 其余时间点与对照相当。经 ABA 处理 6–24 h 时, *GeERF4B-1* 基因的表达量显著下降, 但在 48 h 时显著上升且达到峰值, 为对照的 1.45 倍(图 4D)。与 0 d 相比, 干旱处理 3、5、7 d 后, *GeERF4B-1* 基因的表达量均显著下降(图 4E)。受到 NaCl 胁迫后, 与对照相比, 随着处理时间的延长, *GeERF4B-1* 基因的表达量在 3 d 和 5 d 均显著下降(图 4F)。上述结果表明, *GeERF4B-1* 基因在钩吻组织中组成型表达, 且可以被低温、MeJA 和 ABA 诱导上调表达, 但在干旱及盐胁迫下被诱导下调表达。



图 2 钩吻 *GeERF4B-1* 蛋白与其他物种 ERF 蛋白的氨基酸多序列比对 红色方框为 AP2 结构域。  
CrERF: 长春花 ERF (GenBank 登录号: KAI5674761.1); NsERF: 野生林烟草 ERF (GenBank 登录号: XP\_009770784.1); CaERF: 咖啡 ERF (GenBank 登录号: XP\_027063176.1)

Figure 2 Amino acid multi sequence alignment of *Gelsemium elegans GeERF4B-1* protein and ERF proteins from other species. AP2 domain was marked by the red boxes. CrERF: *Catharanthus roseus* ERF (GenBank accession number: KAI5674761.1); NsERF: *Nicotiana sylvestris* ERF (GenBank accession number: XP\_009770784.1); CaERF: *Coffea arabica* ERF (GenBank accession number: XP\_027063176.1).

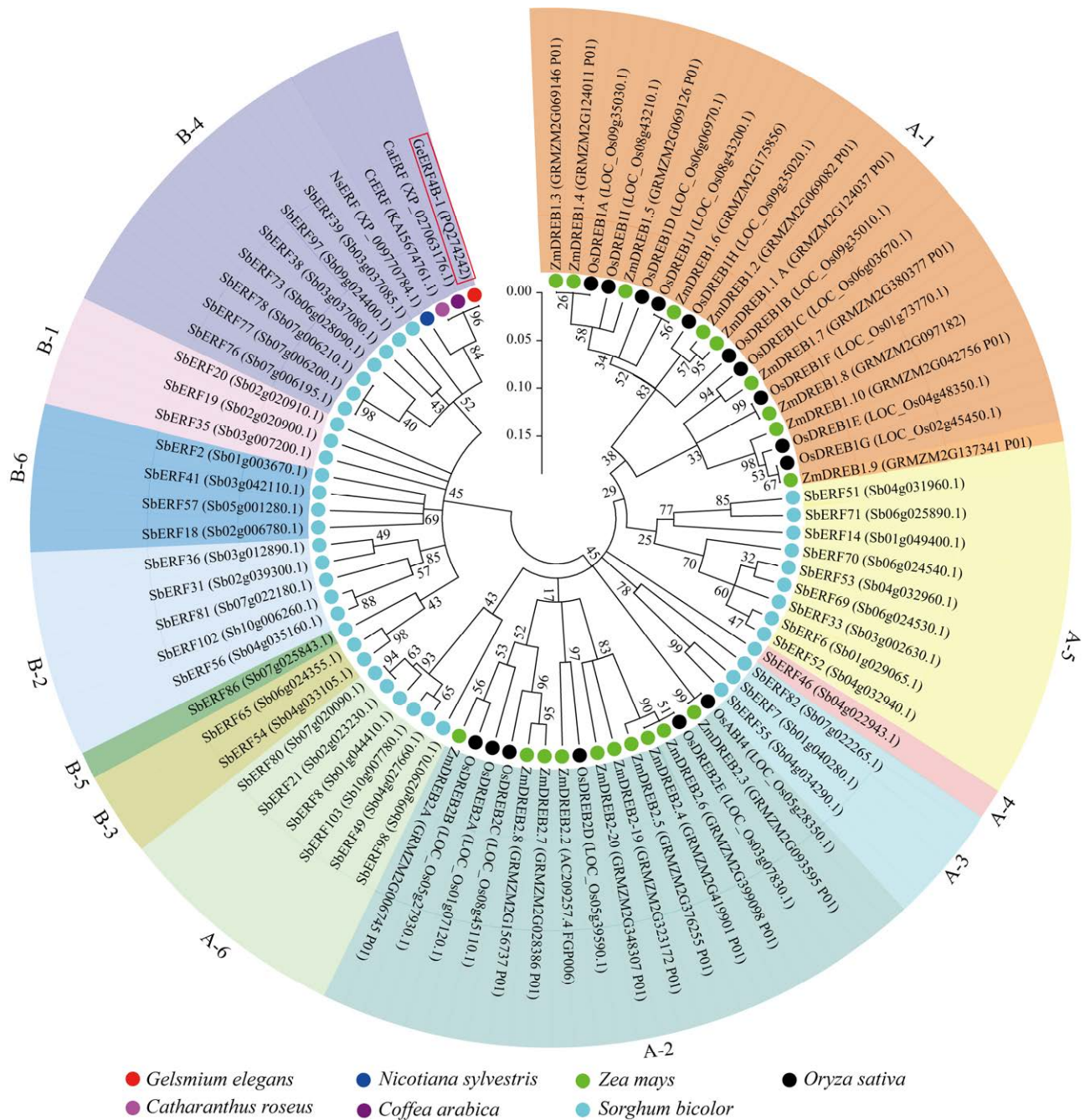


图3 钩吻 *GeERF4B-1* 蛋白与其他物种 ERF 蛋白的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Gelsmium elegans* *GeERF4B-1* protein and ERF proteins from other species.

### 2.3 *GeERF4B-1* 的亚细胞定位

构建 *GeERF4B-1* 基因的亚细胞定位载体并在烟草叶片上进行瞬时表达, 激光共聚焦显微镜观察结果显示, 对照组 35S::GFP 在本氏烟叶片下表

皮细胞中无绿色荧光, 但 35S::*GeERF4B-1*::GFP 在本氏烟叶片下表皮细胞的细胞核中可见绿色荧光(图 5), 这与 Psort 软件预测的结果一致。上述结果表明 *GeERF4B-1* 蛋白定位于细胞核。

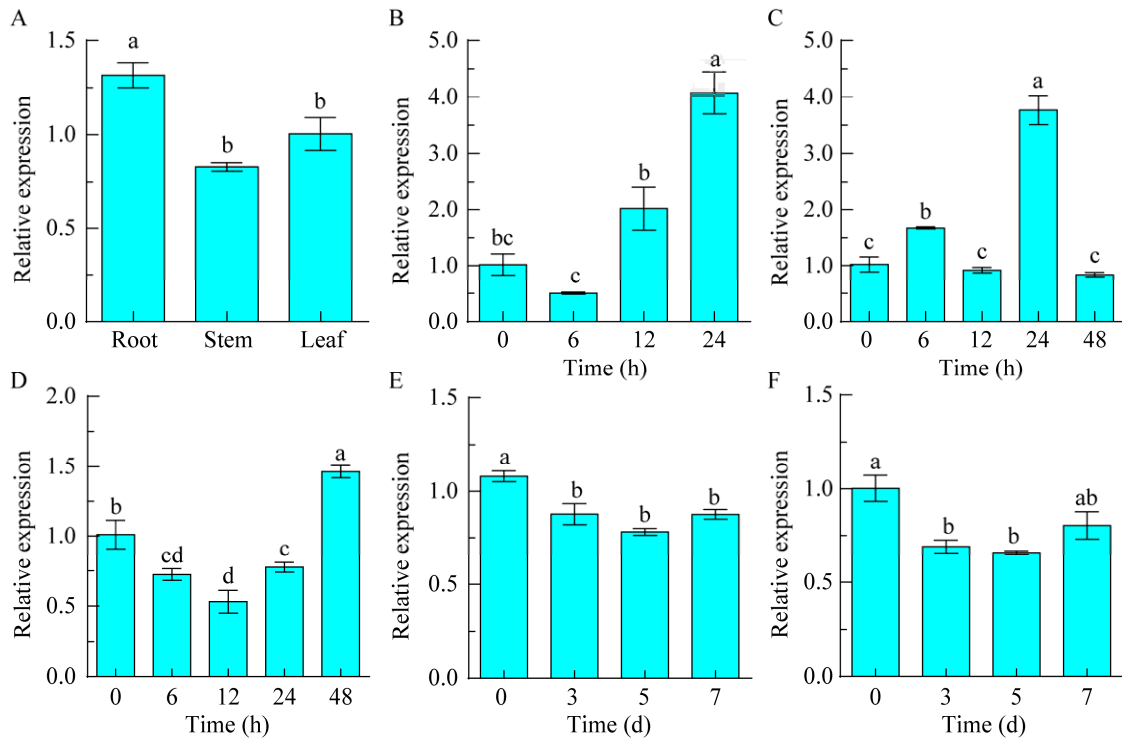


图 4 钩吻 *GeERF4B-1* 基因的表达模式分析 A: 不同钩吻组织. B: 4 °C低温处理. C: MeJA 处理. D: ABA 处理. E: 干旱处理. F: NaCl 处理. 不同小写字母代表处理间差异显著性( $P<0.05$ )

Figure 4 Expression pattern analysis of *Gelsemium elegans GeERF4B-1* gene. A: Different *G. elegans* tissues. B: Low temperature treatment at 4 °C. C: MeJA treatment. D: ABA treatment. E: Drought treatment. F: NaCl treatment. Different lowercase letters represented significant differences between treatments ( $P<0.05$ ).

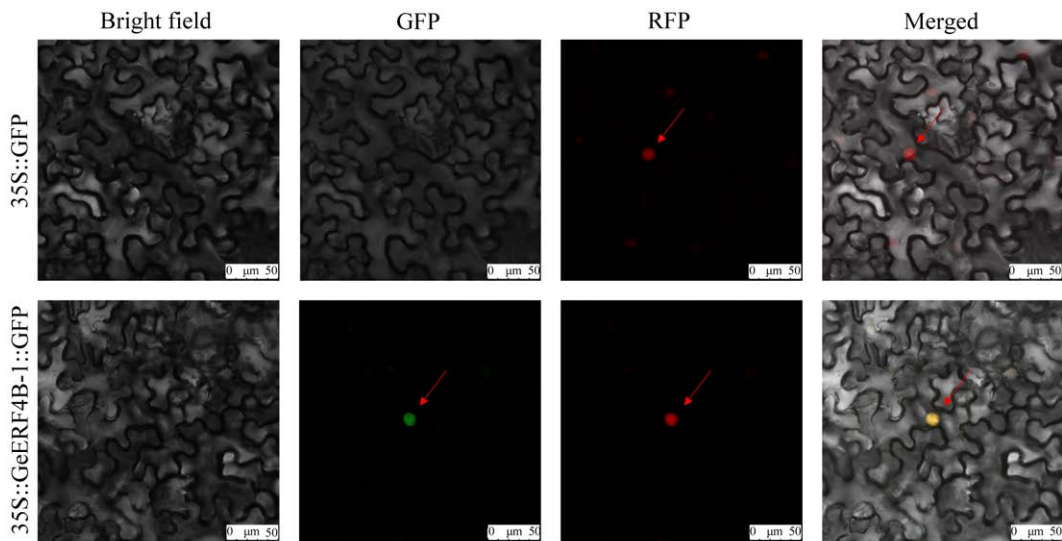


图 5 *GeERF4B-1* 蛋白的亚细胞定位 比例尺=50 μm. 红色箭头指示细胞核

Figure 5 Subcellular localization of *GeERF4B-1* protein. Bar=50 μm. Red arrows indicated the nucleus.



## 2.4 *GeERF4B-1* 基因的原核表达分析

利用 IPTG 诱导剂在 37 °C 条件下成功诱导获得 *GeERF4B-1* 的原核表达蛋白(图 6)。SDS-PAGE 检测结果显示, 诱导 4 h 时, *GeERF4B-1* 融合蛋白已有表达, 并且其表达量随着诱导时间的增长逐渐增加。由于原核表达载体 pEZYHb 含有 His 标签, 所以 *GeERF4B-1* 融合蛋白的条带比理论蛋白分子量大, 约为 52 kDa。

## 2.5 *GeERF4B-1* 基因的平板胁迫验证

以含有 pEZYHb 空载的 Rosetta (DE3) 菌株为对照, 观察含 pEZYHb-207-*GeERF4B-1* 的原核表达重组菌株在 4 °C 胁迫下的生长情况。发现对照组菌株的生长速度随低温胁迫时间的延

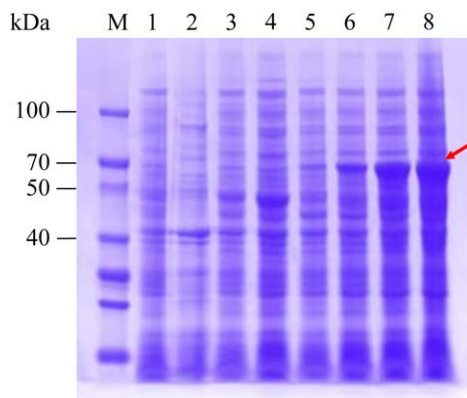


图 6 *GeERF4B-1* 的原核表达 M: Blue plus protein marker (14–100 kDa); Lane 1: 空菌 Rosetta (DE3); Lane 2: 诱导 20 h 的空菌; Lane 3: 未诱导空载体 pEZYHb; Lane 4: 诱导 20 h 的空载体 pEZYHb; Lane 5–8: 诱导 0 h、4 h、10 h、20 h 的重组菌 pEZYHb-207-*GeERF4B-1*。红色箭头代表被诱导出的重组蛋白

Figure 6 Prokaryotic expression of *GeERF4B-1*. M: Blue plus protein marker (14–100 kDa); Lane 1: Blank Rosetta (DE3) cells; Lane 2: Blank cells induction for 20 h; Lane 3: Control (Rosetta contained prokaryotic expression vector pEZYHb) without induction; Lane 4: Control induction for 20 h; Lane 5–8: pEZYHb-207-*GeERF4B-1* recombinant strains induction for 0, 4, 10, 20 h. The induced protein was showed by a red arrow.

长逐渐变慢, 而重组菌株在 14 d 时的长势较对照组好(图 7A), 表明 *GeERF4B-1* 可以增加大肠杆菌的耐寒性。如图 7B 和图 7C 所示, 与对照组相比, 重组菌株在甘露醇和 NaCl 胁迫下的生长速度更慢, 表明 *GeERF4B-1* 会增强大肠杆菌对盐和甘露醇胁迫的敏感性。

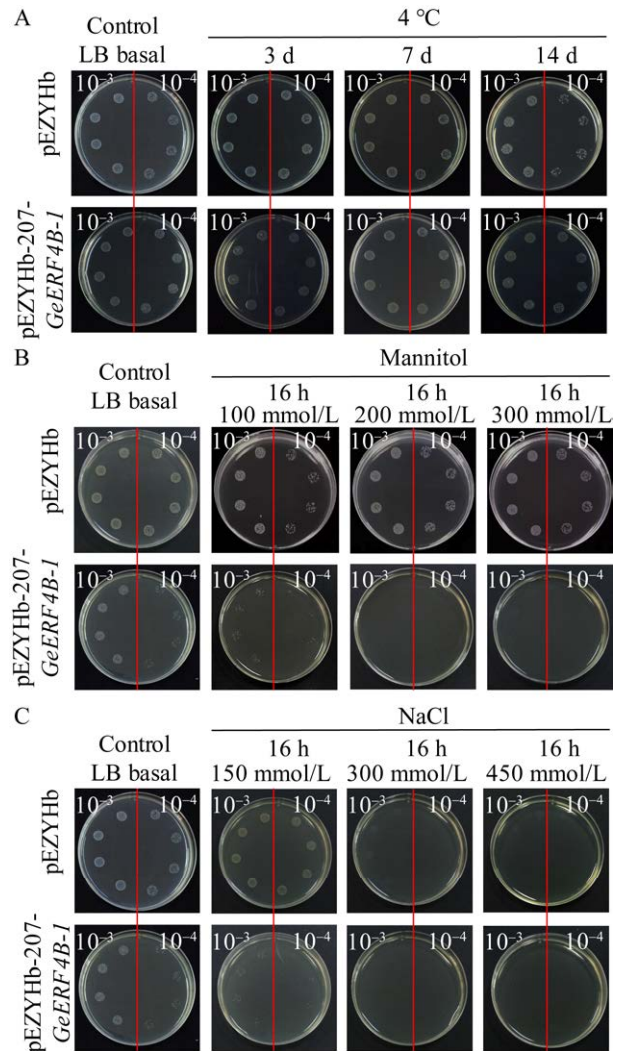


图 7 *GeERF4B-1* 原核表达重组菌在 4 °C 低温、甘露醇及 NaCl 胁迫下的生长情况 A: 4 °C 低温胁迫. B: 甘露醇胁迫. C: NaCl 胁迫

Figure 7 Growth of prokaryotic expression recombinant strains of *GeERF4B-1* under 4 °C low temperature, mannitol, and NaCl stresses. A: Low-temperature stress at 4 °C. B: Mannitol stress. C: NaCl stress.

### 3 讨论

植物在生长过程中可能会遭遇多种逆境胁迫,包括但不限于真菌、细菌、病虫害等生物胁迫以及低温、干旱、洪涝、盐碱等非生物胁迫。据报道,AP2/ERF 转录因子能够积极响应干旱、高盐、低温、低氧、重金属等多种非生物胁迫<sup>[17,25]</sup>。ERF 作为 AP2/ERF 基因家族的亚族成员,目前在番茄<sup>[19]</sup>、蝴蝶兰<sup>[21]</sup>、水稻<sup>[26]</sup>、苜蓿 (*Medicago sativa*)<sup>[27]</sup>、三七(*Panax notoginseng*)<sup>[28]</sup>、半夏 (*Pinellia ternata*)<sup>[29]</sup>、山葡萄 (*Vitis amurensis*)<sup>[30]</sup>等植物中都有关于该转录因子调节植物对低温响应的报道。4 °C低温处理后,三七 ERF 基因家族中的 *PnDREB84* 成员在处理 12 h 和 24 h 后均显著上调表达<sup>[28]</sup>,山葡萄 *VaERF095* 在处理的 12 h 后极显著上调<sup>[30]</sup>。本研究中,在 4 °C低温胁迫下,钩吻 *GeERF4B-1* 基因在 24 h 时显著上调表达(图 4B),此外,其原核表达重组菌株长势较对照好(图 7A)。在盐及干旱的胁迫下,钩吻 *GeERF4B-1* 基因被诱导下调表达(图 4E、4F)。同时,在模拟高盐及干旱环境(甘露醇)的平板胁迫实验中发现,相比于对照组,重组菌株的生长被抑制(图 7B、7C)。上述结果表明, *GeERF4B-1* 基因积极应答 4 °C低温胁迫,且可以增加大肠杆菌的耐寒性以及对 NaCl 和甘露醇的敏感性。类似地,将山葡萄 *VaERF057* 基因在拟南芥中过表达,发现能增强植株的抗寒性<sup>[31]</sup>;而盐胁迫下,黄瓜(*Cucumis sativus* L.) *CsaERF-20*、*CsaERF-37*、*CsaERF-56*、*CsaDERB-31*、*CsaDERB-45* 等基因显著下调表达<sup>[32]</sup>。

ABA、JA、SA 等植物激素信号通路以及多种激素间交叉互作在植物抵御环境胁迫中发挥重要作用,ERF 亚家族成员能够被植物激素诱导表达,以参与多种胁迫信号的交叉适应反

应<sup>[33]</sup>。Zhang 等<sup>[34]</sup>研究发现 SA、ET、JA、ABA 均可诱导 9 个来自大豆(*Glycine max*)中的 *ERF* 基因表达。杜琳颖<sup>[35]</sup>对小麦 *TaERF87* 进行 RT-qPCR 检测,表明 ABA、ET 处理能诱导 *TaERF87* 的上调表达。刘宸铭等<sup>[36]</sup>对玉米进行 ABA 胁迫处理,发现在处理 1 h 后 *ZmEREB180* 表达量呈现先少量下调后持续快速上调的趋势。王岚等<sup>[30]</sup>的研究显示,山葡萄 *VaERF095* 基因在 MeJA 处理 6 h 后,其相对表达量较对照显著升高。本研究中,不同激素(ABA、MeJA)处理下的钩吻 *GeERF4B-1* 基因表达量均被诱导上调表达(图 4C、4D),表明 *GeERF4B-1* 参与多种激素应答反应。山葡萄 *VaERF095* 基因能积极响应 4 °C低温、ABA、MeJA 的诱导<sup>[30]</sup>。那么,钩吻 *GeERF4B-1* 基因对环境中的激素变化的响应是否与其抗逆能力相关,以及其是否参与其他胁迫信号的交叉适应,还有待后续深入探讨。

*ERF* 基因的表达存在组织特异性<sup>[37]</sup>。橡胶草(*Taraxacum koksaghyz*) *TkERF3* 基因主要在根中表达<sup>[38]</sup>。水稻 *OsERF103* 基因在根中的表达量最高<sup>[39]</sup>。本研究发现,钩吻 *GeERF4B-1* 基因为组成型表达,且在根中高表达(图 4A),推测 *GeERF4B-1* 基因可能在钩吻根系生长发育中发挥重要作用。

### 4 结论

本研究从钩吻叶片中克隆获得一个核定位的 AP2/ERF 转录因子家族的新成员 *GeERF4B-1*,该编码基因在钩吻根中高表达,且能被 4 °C低温、MeJA、ABA 诱导上调表达,但在 NaCl 和干旱胁迫中下调表达。经原核诱导表达后, *GeERF4B-1* 重组蛋白大约在 52 kDa 出现目的条带,且平板胁迫实验证明 *GeERF4B-1* 基因能增强大肠杆菌的耐寒性及对

NaCl 和甘露醇的敏感性。本研究为钩吻品种的抗逆机制研究和遗传改良提供了科学参考和基因资源。

## REFERENCES

- [1] LIU YS, TANG Q, CHENG P, ZHU MF, ZHANG H, LIU JZ, ZUO MT, HUANG CY, WU CQ, SUN ZL, LIU ZY. Whole-genome sequencing and analysis of the Chinese herbal plant *Gelsemium elegans*[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10(2): 374-382.
- [2] 陈惠娴, 王文义, 檀兴慧, 李高攀, 张晓琼, 李德森, 吴水生. 钩吻总生物碱及常绿钩吻碱的体外抗肿瘤作用及机制[J]. *中国药房*, 2023, 34(12): 1437-1442. CHEN HX, WANG WY, TAN XH, LI GP, ZHANG XQ, LI DS, WU SS. Antitumor effect and mechanism of total alkaloids of *Gelsemium elegans* and sempervirine *in vitro*[J]. *China Pharmacy*, 2023, 34(12): 1437-1442 (in Chinese).
- [3] Yuan ZH, Matias FB, Wu J, Liang ZG, Sun ZL. Koumine attenuates lipopolysaccharide-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophages, coincidentally associated with inhibition of NF- $\kappa$ B, ERK and p38 pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 430.
- [4] Que WC, Wu ZY, Chen MH, Zhang BQ, You CH, Lin HL, Zhao ZC, Liu MB, Qiu HQ, Cheng Y. Molecular mechanism of *Gelsemium elegans* (Gardner and Champ.) Benth. against neuropathic pain based on network pharmacology and experimental evidence[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 12: 792932.
- [5] 黄慧慧, 刘铭, 陈超杰, 俞昌喜. 钩吻素子对大鼠焦虑行为的影响[J]. *西北药学杂志*, 2014, 29(6): 593-595. HUANG HH, LIU M, CHEN CJ, YU CX. Effects of koumine on the behavior of rat in elevated plus maze[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2014, 29(6): 593-595 (in Chinese).
- [6] 赵雅婷. 钩吻解剖结构及其生物碱抑菌作用研究[D]. 临汾: 山西师范大学硕士学位论文, 2019. ZHAO YT. Study on the anatomical structure of *Gelsemium elegans* Benth and the antibacterial action of alkaloids[D]. Linfen: Master's Thesis of Shanxi Normal University, 2019 (in Chinese).
- [7] 丘宏强. 钩吻素子抗神经病理性疼痛作用与脊髓神经活性甾体别孕烯醇酮的关系[D]. 福州: 福建医科大学博士学位论文, 2013. QIU HQ. Antagonistic effects of koumine on neuropathic pain and its relationship with the neurosteroid allopregnenolone in spinal cord[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Medical University, 2013 (in Chinese).
- [8] 王立莉, 宋诗雨, 曹宇航, 伍蓉蓉, 彭雄, 苗超, 孙志良, 伍勇. 钩吻生物碱对断奶仔猪生长性能的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(1): 136-143. WANG LL, SONG SY, CAO YH, WU RR, PENG X, MIAO C, SUN ZL, WU Y. Effects of *Gelsemium elegans* alkaloids on growth performance in weaned piglets[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(1): 136-143 (in Chinese).
- [9] 覃旭. 柑橘溃疡病防治药剂的研究[D]. 桂林: 广西师范大学硕士学位论文, 2010. QIN X. Study on the control agents of *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri[D]. Guilin: Master's Thesis of Guangxi Normal University, 2010 (in Chinese).
- [10] 覃柳燕. 植物提取物对褐飞虱生物活性筛选及作用机理初步研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2006. QIN LY. Screening for bioactivities of plant extracts against *Nilaparvata lugens* stal and pilot study on reaction mechanisms[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2006 (in Chinese).
- [11] 石冬梅, 苏燕评, 吴宏霞, 俞昌喜. 闽产钩吻资源分布及药用部位的研究[J]. *福建医科大学学报*, 2016, 50(3): 159-162, 185. SHI DM, SU YP, WU HX, YU CX. Geographical distribution of *Gelsemium elegans* in Fujian Province and the medicinal value of the parts of the plant[J]. *Journal of Fujian Medical University*, 2016, 50(3): 159-162, 185 (in Chinese).
- [12] 尤垂淮, 刘安玉, 张婷, 赵亚菲, 崔天真, 谢津津, 林海玲, 阙友雄, 苏亚春, 阙万才. 钩吻 GeERF 转录因子的鉴定及在低温胁迫下的表达[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(18): 4908-4918. YOU CH, LIU AY, ZHANG T, ZHAO YF, CUI TZ, XIE JJ, LIN HL, QUE YX, SU YC, QUE WC. Identification of GeERF transcription factors in *Gelsmium elegans* and their expression under low temperature stress[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, 47(18): 4908-4918 (in Chinese).
- [13] YAN HW, HONG L, ZHOU YQ, JIANG HY, ZHU SW, FAN J, CHENG BJ. A genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Sorghum*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(2): 2038-2055.
- [14] LIU SX, WANG XL, WANG HW, XIN HB, YANG XH, YAN JB, LI JS, TRAN LS P, SHINOZAKI K,

- YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, QIN F. Genome-wide analysis of *ZmDREB* genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(9): e1003790.
- [15] 兰孟焦, 后猛, 肖满秋, 李臣, 潘皓, 张允刚, 卢凌志, 侯隆英, 葛瑞华, 吴问胜, 李强. AP2/ERF 转录因子参与植物次生代谢和逆境胁迫响应的研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(5): 1223-1235.
- LAN MJ, HOU M, XIAO MQ, LI C, PAN H, ZHANG YG, LU LZ, HOU LY, GE RH, WU WS, LI Q. Research progress of AP2/ERF transcription factors participating in plant secondary metabolism and stress response[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(5): 1223-1235 (in Chinese).
- [16] 许世达, 耿兴敏, 王露露. 植物乙烯响应因子(ERF)的结构、功能及表达调控研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2021, 38(3): 624-633.
- XU SD, GENG XM, WANG LL. A review of the structure, function and expression regulation of ethylene response factors(ERF) in plant[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2021, 38(3): 624-633 (in Chinese).
- [17] CATINOT J, HUANG JB, HUANG PY, TSENG MY, CHEN YL, GU SY, LO WS, WANG LC, CHEN YR, ZIMMERLI L. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96 positively regulates *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate- and ethylene-responsive defence genes[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2015, 38(12): 2721-2734.
- [18] 郝晓蒙. 梅花 *PmERF109* 和 *PmERF109-like* 在低温和盐胁迫下的功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2023.
- HAO XM. Functional analysis of *PmERF109* and *PmERF109-like* in *Prunus mume* under low temperature and salt stress[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [19] 王梦琪. 番茄乙烯响应因子 ERF15 在低温抗性中的作用[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021.
- WANG MQ. The role of ethylene response factor ERF15 in cold resistance in tomato[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2021 (in Chinese).
- [20] 赵悦. 野生青海茄参对低温的生理反应及其耐寒基因的挖掘[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2022.
- ZHAO Y. Physiological response and the discovery of cold tolerance gene to low temperature of Wild *Mandragora chinghaiensis* Kuang et A. M. Ji[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2022 (in Chinese).
- [21] 崔波, 郝平安, 梁芳, 张燕, 王喜蒙, 李俊霖, 蒋素华, 许申平. 蝴蝶兰 AP2/ERF 家族基因的克隆及在低温下表达特性分析[J]. *园艺学报*, 2020, 47(1): 85-97.
- CUI B, HAO PA, LIANG F, ZHANG Y, WANG XM, LI JL, JIANG SH, XU SP. Cloning and expression analysis of AP2/ERF family gene from *Phalaenopsis* under low temperature[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(1): 85-97 (in Chinese).
- [22] LI MY, LIU JX, HAO JN, FENG K, DUAN AQ, YANG QQ, XU ZS, XIONG AS. Genomic identification of AP2/ERF transcription factors and functional characterization of two cold resistance-related AP2/ERF genes in celery (*Apium graveolens* L.)[J]. *Planta*, 2019, 250(4): 1265-1280.
- [23] 孙滨, 占小登, 曹立勇, 程式华. 水稻 AP2/ERF 转录因子的研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(11): 1860-1869.
- SUN B, ZHAN XD, CAO LY, CHENG SH. Research progress of AP2/ERF transcription factor in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(11): 1860-1869 (in Chinese).
- [24] 苏亚春. 甘蔗应答黑穗病菌侵染的转录组与蛋白组研究及抗性相关基因挖掘[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2014.
- SU YC. Transcriptomics and proteomics of sugarcane response to *Sporisorium scitamineum* infection and mining of resistance-related genes[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2014 (in Chinese).
- [25] FENG K, HOU XL, XING GM, LIU JX, DUAN AQ, XU ZS, LI MY, ZHUANG J, XIONG AS. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(6): 750-776.
- [26] SUN MZ, SHEN Y, CHEN Y, WANG Y, CAI XX, YANG JK, JIA BW, DONG WF, CHEN X, SUN XL. *Osa-miR1320* targets the ERF transcription factor OsERF096 to regulate cold tolerance via JA-mediated signaling[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(4): 2500-2516.
- [27] 王婉儿, 王炳臻, 周艳, 付佳宾, 陈玲玲, 牛一丁. 黄花苜蓿 AP2/ERF 家族 *MjERF028* 基因的表达特性与耐寒功能分析[J]. *中国草地学报*, 2023, 45(6): 15-22.
- WANG WE, WANG BZ, ZHOU Y, FU JB, CHEN LL, NIU YD. Analysis of expression characteristics and cold resistance function of *MjERF028* gene in the

- AP2/ERF family of *Medicago falcata*[J]. Chinese Journal of Grassland, 2023, 45(6): 15-22 (in Chinese).
- [28] 张双华, 侯聪, 程宇飞, 宁康, 汪黎植, 董林林. 三七 AP2/ERF 基因家族鉴定及 *PnDREB84* 基因功能初探[J]. 药学学报, 2023, 58(11): 3428-3438.  
ZHANG SH, HOU C, CHENG YF, NING K, WANG JZ, DONG LL. Identification and analysis of AP2/ERF gene family of *Panax notoginseng* and function of *PnDREB84* gene[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2023, 58(11): 3428-3438 (in Chinese).
- [29] 杨金荣, 崔婉宁, 张瑜, 伯晨, 晁秋杰, 朱艳芳, 段永波, 薛涛, 张爱民. 基于转录组数据的半夏 AP2/ERF 基因家族鉴定及逆境响应分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 176-184.  
YANG JR, CUI WN, ZHANG Y, BO C, CHAO QJ, ZHU YF, DUAN YB, XUE T, ZHANG AM. Identification and expression analysis of AP2/ERF family in stress responses of *Pinellia ternata* based on transcriptome data[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2023, 29(5): 176-184 (in Chinese).
- [30] 王岚, 许建韧. 山葡萄 *VaERF095* 基因表达及其启动子功能分析[J]. 南方农业学报, 2024, 55(1): 37-46.  
WANG L, XU JR. Gene expression of *VaERF095* and functional analysis of its promoter from *Vitis amurensis*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2024, 55(1): 37-46 (in Chinese).
- [31] SUN XM, ZHAO TT, GAN SH, REN XD, FANG LC, KARUNGO SK, WANG Y, CHEN L, LI SH, XIN HP. Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ethylene response factor 057[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24066.
- [32] 杨巍, 赵丽芬, 杨娟, 李飞, 王天文, 邓英. 黄瓜 AP2/ERF 基因家族全基因组鉴定及表达模式分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(3): 127-143.  
YANG W, ZHAO LF, YANG J, LI F, WANG TW, DENG Y. Genome-wide identification and expression analysis of the AP2/ERF gene family in *Cucumis sativus* L.[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2024, 39(3): 127-143 (in Chinese).
- [33] 张计育, 王庆菊, 郭忠仁. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展[J]. 遗传, 2012, 34(7): 835-847.  
ZHANG JY, WANG QJ, GUO ZR. Progresses on plant AP2/ERF transcription factors[J]. Journal of Distance Education, 2012, 34(7): 835-847 (in Chinese).
- [34] ZHANG GY, CHEN M, CHEN XP, XU ZS, GUAN S, LI LC, LI AL, GUO JM, MAO L, MA YZ. Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(15): 4095-4107.
- [35] 杜琳颖. 小麦转录因子 TaERF87 与 TaDi19-7 的鉴定及其在非生物胁迫响应中的功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2023.  
DU LY. Identification of wheat transcription factors TaERF87 and TaDi19-7 and their functional exploration in abiotic stress response[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2023 (in Chinese).
- [36] 刘宸铭, 赵克勇, 悦曼芳, 赵延明, 吴忠义, 张春. 玉米转录因子 ZmEREB180 调控根系生长发育及耐逆的功能研究[J]. 作物学报, 2024, 50(8): 1920-1933.  
LIU CM, ZHAO KY, YUE MF, ZHAO YM, WU ZY, ZHANG C. Functional study on the regulation of root growth and development and stress tolerance by maize transcription factor ZmEREB180[J]. Acta Agronomica Sinica, 2024, 50(8): 1920-1933.
- [37] 岳雪雪, 肖闯, 张倩雯, 陈昌婕, 周佳, 李金鑫, 李宇琨, 苗玉焕, 刘大会. 艾 AP2/ERF 基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 药学学报, 2024, 59(9): 2634-2647.  
YUE XX, XIAO C, ZHANG QW, CHEN CJ, ZHOU J, LI JX, LI YK, MIAO YH, LIU DH. Identification and expression analysis of AP2/ERF gene family in *Artemisia argyi*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 59(9): 2634-2647.
- [38] 张云川, 曹天澳, 雷骥良, 闫洁. 橡胶草 *ERF3* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(6): 1261-1270.  
ZHANG YC, CAO TA, LEI JL, YAN J. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *TkERF3* in *Taraxacum kok-saghyz*[J]. Plant Physiology Journal, 2021, 57(6): 1261-1270 (in Chinese).
- [39] 邹杰, 李生强, 刘显军, 陈刚. 水稻 *OsERF103* 基因生物信息学分析、亚细胞定位及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(12): 2130-2139.  
ZOU J, LI SQ, LIU XJ, CHEN G. Bioinformatics analysis, subcellular localization and expression analysis of *OsERF103* gene in rice (*Oryza sativa*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(12): 2130-2139.

(本文责编 郝丽芳)