

## 红花 ERF1 转录因子的克隆及植物表达载体的构建

刘秀明<sup>1,2</sup>, 吕彦曦<sup>2</sup>, 杨龙宇<sup>2</sup>, 杜卫红<sup>2</sup>, 宫彦红<sup>3</sup>, 刘建雨<sup>1</sup>, 董园园<sup>1</sup>, 姚娜<sup>1\*</sup>, 李海燕<sup>1,2\*</sup>

1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

3. 长春市一三七中学, 吉林 长春 130118

**摘要:** 目的 克隆 1 条红花 AP2/ERF 家族转录因子编码区序列, 并构建植物表达载体。方法 在红花转录组测序基础上, 利用 RT-PCR 方法克隆 1 条红花 AP2/ERF 家族转录因子编码区序列 (CtERF1) 并进行生物信息学分析, 利用 ClustalW 1.83 软件构建系统进化树, 在 CtERF1 基因序列两端引入 *Spe* I 和 *Xba* I 酶切位点, 构建含有 35 S 启动子的植物超表达载体 pBASTA-CtERF1。结果 CtERF1 基因编码 297 个氨基酸, 且具有典型的 AP2/ERF 基因的功能结构域, 含有 1 个 AP2 区域, 为 ERF 亚族蛋白, 亚细胞定位分析推测其定位在细胞质和细胞核上。系统进化分析表明, CtERF1 基因编码氨基酸与其他物种氨基酸具有一定的同源性, 其中与杨树和人参的亲缘关系最近。通过分子生物学方法, 成功构建 pBASTA-CtERF1 植物表达载体。结论 成功克隆了 1 条红花 AP2/ERF 家族转录因子编码区基因 CtERF1, 并构建了植物表达载体 pBASTA-CtERF1。  
**关键词:** 红花; AP2/ERF 转录因子; 黄酮合成; 基因克隆; 植物表达载体

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0963-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.026

## Cloning of ERF1 transcription factor from *Carthamus tinctorius* and construction of plant expression vector

LIU Xiu-ming<sup>1,2</sup>, LV Yan-xi<sup>2</sup>, YANG Long-yu<sup>2</sup>, DU Wei-hong<sup>2</sup>, GONG Yan-hong<sup>3</sup>, LIU Jian-yu<sup>1</sup>, DONG Yuan-yuan<sup>1</sup>, YAO Na<sup>1</sup>, LI Hai-yan<sup>1,2</sup>

1. Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development of Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. Changchun 137th Secondary School, Changchun 130118, China

**Abstract: Objective** To clone a coding region sequence of AP2/ERF transcription factor family from *Carthamus tinctorius*, and construct a plant expression vector. **Methods** A gene (CtERF1) of AP2/ERF family transcription factor was cloned by RT-PCR based on the sequence of *C. tinctorius* transcription sequencing, the phylogenetic tree was constructed by ClustalW 1.83 software, *Spe* I and *Xba* I restriction sites were introduced to construct over-expression vector pBASTA-CtERF1 containing 35S promoter. **Results** CtERF1 gene had a functional domain of a typical AP2/ERF gene encoding 297 amino acids, and contained an AP2 region speculated to be located in cytoplasm and nucleus, which was ERF subprotein. Systematic evolution analysis showed that CtERF1 gene had some homology with other plant species, among which the relationship with *Populus deltoides* and *Panax japonicus* were the closest. The pBASTA-CtERF1 plant expression vector was constructed successfully by molecular biology. **Conclusion** A CtERF1 gene of *C. tinctorius* AP2/ERF transcription factor family was cloned and the plant expression vector pBASTA-CtERF1 was constructed successfully.

**Key words:** *Carthamus tinctorius* L.; AP2/ERF transcription factor; flavonoids synthesis; gene cloning; plant expression vector

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31771868); 国家自然科学基金资助项目 (31101172); 国家自然科学基金资助项目 (31501366); 吉林省科技厅 (20150623024TC-11); 吉林省科技厅 (20170520089JH); 吉林农业大学大学生创新创业训练计划项目 (2017472)

作者简介: 刘秀明, 高级实验师, 研究方向为生物反应器与代谢调控。Tel: (0431)84533428 E-mail: xiuming1211@163.com

\*通信作者 姚娜, 硕士, 研究方向为生物技术。Tel: (0431)84533428 E-mail: 52730630@qq.com

李海燕, 教授, 研究方向为生物反应器。Tel: (0431)84532885 E-mail: hlyi99@163.com

红花 *Carthamus tinctorius* L., 别名红蓝花、刺红花, 为菊科、红花属植物, 干燥的管状花, 橙红色, 花管狭细, 主产于河南、湖南、四川、新疆、西藏等地。红花作为中国传统中药材之一, 是一种集药用、工业、油用于一身的重要植物资源<sup>[1]</sup>。红花中的黄酮类化合物是红花的主要有效成分之一<sup>[2]</sup>, 具有活血化瘀、活络止痛、抗氧化、调血脂等功效, 具有重要的药理作用<sup>[3-4]</sup>。黄酮的生物合成过程是目前研究较为深入的次生代谢途径, 而在植物的次生代谢过程中, 由于其代谢途径非常复杂, 由结构基因(各种酶类)和调节基因(转录因子)共同调控表达, 而调节基因是控制结构基因表达及蛋白质合成方式的一类重要因子<sup>[5]</sup>。

AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor) 家族转录因子是在所有植物中都存在的一类重要的转录因子, 其参与植物整个生命周期的生长发育过程及调节多种植物生理功能。AP2/ERF 家族成员在结构上至少含有 1 个非常保守的 DNA 结合区, 即 AP2/ERE BP 结合域, 大约由 60 个氨基酸组成, 不同植物含有的 AP2/ERF 类转录因子基因的数量和种类不尽相同<sup>[6]</sup>。研究表明, AP2/ERF 转录因子对植物生长<sup>[7-8]</sup>、果实发育<sup>[9]</sup>、花发育<sup>[10]</sup>、种子发育<sup>[11]</sup>等具有重要作用, 主要调控植物的生长发育、繁殖、对激素的应答以及对外界生物胁迫的适应过程等<sup>[12]</sup>。目前, 在利用大规模测序挖掘一些关键酶基因和调控基因研究的同时, 转录因子也成为通过基因工程手段生产植物次生代谢活性成分的重要工具<sup>[13-15]</sup>。

本课题组在前期的工作中进行了不同开花时期的红花黄色素含量变化研究<sup>[16]</sup>, 发现不同开花时期红花黄色素含量存在显著差异, 因此推测, 红花的花发育程度与黄色素含量可能存在一定的相关性。AP2/ERF 类转录因子在植物次生代谢及生长发育方面具有重要作用, 关于此方面的研究多集中在黄瓜<sup>[17]</sup>、水稻<sup>[18]</sup>、油菜<sup>[19]</sup>、拟南芥<sup>[20]</sup>、玉米<sup>[21]</sup>、大豆<sup>[22]</sup>上, 而在红花的研究上还未见报道。本研究拟在红花转录组测序基础上, 克隆 1 条红花黄酮生物合成途径相关的转录因子 AP2/ERF 基因全长片段, 该项目的研究, 一方面为研究 AP2/ERF 转录因子在红花花发育过程中的调控作用机制奠定基础, 另一方面为深入研究红花黄色素代谢合成的调控机制提供理论依据。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

样品经笔者鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L.

吉红一号, 于吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程中心基地种植, 采集盛花期花瓣, 锡箔纸包好, 经液氮处理后保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。植物表达载体 pBASTA 载体由实验室保存。

### 1.2 试剂

RNASiso PLUS 试剂, LA Taq 酶, *Spe* I、*Xba* I 等内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 反转录试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; 克隆所用载体为 pEASY-T1 Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司; 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自爱思进生物技术有限公司; T4 连接酶购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。

## 2 方法

### 2.1 RNA 提取及 cDNA 合成

利用 RNASiso PLUS 试剂提取红花花瓣总 RNA, 然后用反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 反转录 cDNA 作为红花 CtERF1 基因克隆模板。

### 2.2 基因的克隆

根据红花转录组测序结果, 获得红花多条 AP2/ERF 基因的候选序列, 将部分序列与 NCBI 上数据库其他植物进行同源性比对, 将同源性高的序列 CCG000141.1 作为候选基因, 在编码区两侧设计特异性引物, 上游引物的序列为 ERF1f: 3'-ATGCA ACAAACAATGGAAAC-5', 下游引物的序列为 ERF1r: 3'-TCAGTTTGCTAGAACTTCC-5', 以红花花瓣 cDNA 为模板进行编码区序列的扩增, 首先进行梯度 PCR, 获得最佳退火温度, PCR 总反应体系为 50  $\mu\text{L}$ : cDNA 1  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture 8  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ LA Buffer 5  $\mu\text{L}$ , LA Taq 0.5  $\mu\text{L}$ , ERF1f (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ERF1r (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 水 33.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55~60  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s (间隔 1  $^{\circ}\text{C}$ ), 72  $^{\circ}\text{C}$ 、90 s, 30 次循环。凝胶电泳检测是否出现目的条带并确定最佳退火温度。扩增产物凝胶回收后连接 pEASY-T1 克隆载体进行测序。

### 2.3 红花 ERF1 (CtERF1) 基因的生物信息学分析

利用 WOLF PSORT 进行亚细胞定位分析, 利用 EXPASY-SOPMA 软件进行蛋白质二级结构分析, 利用 EXPASY-phyre2 进行三级结构分析。利用 DNAMAN 软件进行多序列比对分析, 用 Conserved Domains Search (InterProScan) 预测蛋白质序列的功能结构域, 利用 CLSTAL X1.81 进行系统进化树分析。利用 Tmpred 预测蛋白的跨膜结构, 利用 ProtFun202 进行功能预测<sup>[23]</sup>, ProtParam 软件

(<http://web.expasy.org/>)分析编码蛋白的氨基酸序列的组成、相对分子质量、等电点等理化性质。

### 2.4 CtERF1 基因植物表达载体的构建

以 pBASTA 载体 (图 1) 作为植物表达载体骨架, 将测序正确的 CtERF1 基因两端分别引入酶切位点 *Spe* I 和 *Xba* I, 以获得的 CtERF1 基因的 pEASY-T1 载体质粒为模板, 扩增产物凝胶回收后连接 pEASY-T1 载体进行测序。对连有酶切位点的 CtERF1 基因的 pEASY-T1 载体和 pBASTA 植物表达载体分别进行双酶切, 建立 200  $\mu$ L 酶切体系, 酶切反应体系如下: 200  $\mu$ L 反应体系中, DNA 1  $\mu$ g, *Spe* I 10  $\mu$ L, *Xba* I 10  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer M 20  $\mu$ L, 0.1% BSA 20  $\mu$ L, Rnase Free H<sub>2</sub>O 补齐。酶切 4 h, 将酶切产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收 CtERF1 目的基因片段和 pBASTA 载体片段。将获得的 CtERF1 目的基因片段和 pBASTA 载体用 T4 DNA Ligase 酶 (Promega) 连接过夜。连接后将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 过夜培养。次日, 挑取白斑至 LB 液体培养基中, 进行菌液 PCR 和质粒酶切鉴定, 酶切鉴定正确的菌液送金唯智生物科技有限公司测序。

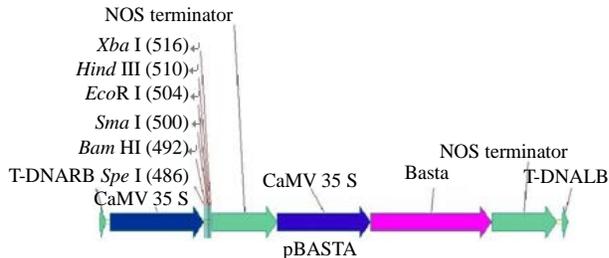


图 1 植物表达载体 pBASTA 载体结构

Fig. 1 Structure of plant expression pBASTA vector

### 2.5 工程农杆菌的转化

将构建成功的 pBASTA 植物表达载体重组质粒 1  $\mu$ L, 加入到制备好的农杆菌感受态细胞 EHA105 中, 冰浴 30 min 后放于液氮中冷冻 5 min, 37  $^{\circ}$ C 水浴中热击 5 min。然后置于 1 mL 无抗生素的 YEP 液体培养基, 混匀后放于摇床中, 28  $^{\circ}$ C, 150 r/min, 离心 6 min。离心后加入 200  $\mu$ L 液体培养基中进行重悬。将重悬后的菌体涂在含有 10 mg/L 利福平的固体培养基中, 28  $^{\circ}$ C 培养 2~3 d。待长出菌落后, 挑取单菌落, 于 YEP 液体培养基中过夜培养, 菌液 PCR 验证正确的菌液加入甘油, -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

## 3 结果与分析

### 3.1 红花花瓣的总 RNA 提取

红花花瓣总 RNA 提取如图 2 所示。通过 Nanogrop 检测发现, 提取的 RNA 质量浓度在 1 000 ng/ $\mu$ L 左右。通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, 由图 2 可以看到 28 S 和 18 S 2 条清晰带, 说明 RNA 提取质量较好, 无降解现象, 可以满足后续实验需要。

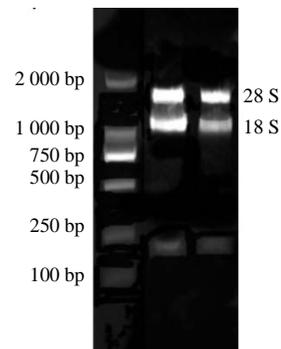
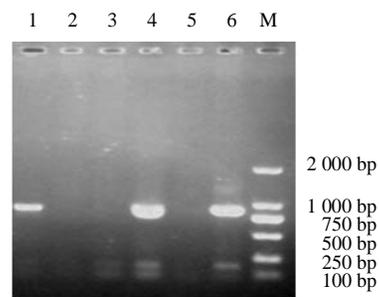


图 2 红花花瓣总 RNA 提取电泳图

Fig. 2 Total RNA of *C. tinctorius*

### 3.2 CtERF1 基因编码区的获得

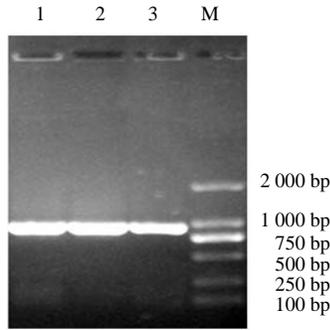
根据红花转录组测序中获得 CtERF1 基因的编码区 (ORF) 序列, 以红花花瓣 cDNA 为模板, 进行梯度 PCR 检测 (图 3), 结果发现退火温度 58  $^{\circ}$ C, 条带较亮且特异, 因此将最终的退火温度定为 58  $^{\circ}$ C。利用 ERF1f 和 ERF2r 特异性引物进行 PCR 扩增, 结果显示, 在 1 000 bp 左右位置扩增出目的片段 (图 4)。将目的基因片段连接到 pEASY-T1 克隆载体上, 并转化大肠杆菌, 菌液 PCR 电泳验证 (图 5) 有目的条带出现, 对含有目的条带的大肠杆菌提取质粒, 用 *Spe* I 和 *Xba* I 酶过夜双酶切, 酶切产物电泳检测有特异性目的条带出现 (图 6), 将鉴定正确的菌液送去测序, 测序结果获得 894 bp 的目的序列, 测序结果与原序列吻合, 因此将其命名为 CtERF1。



M-Marker 1—6-55、56、57、58、59、60  $^{\circ}$ C

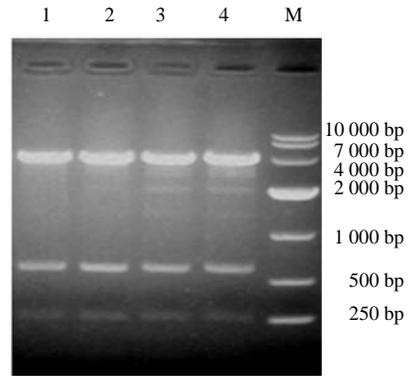
图 3 CtERF1 基因的梯度 PCR 验证

Fig. 3 Gradient PCR of CtERF1



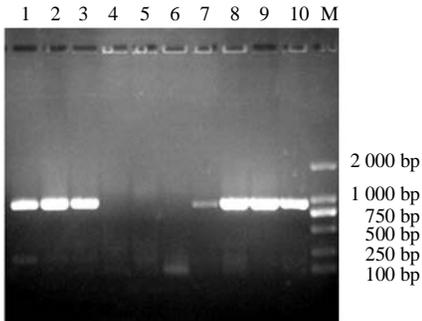
M-Marker 1~3-目的条带  
M-Marker 1—3-target bands

图 4 CtERF1 基因的 PCR 扩增结果  
Fig. 4 PCR amplification of CtERF1



M-Marker 1~4-酶切结果  
M-Marker 1—4-enzyme digestion results

图 6 CtERF1 基因的酶切鉴定结果  
Fig. 6 Enzyme restriction of CtERF1



M-Marker 1~10-目的条带  
M-Marker 1—10-target bands

图 5 CtERF1 基因的菌液 PCR 结果  
Fig. 5 Bacterial PCR identification of CtERF1 in *E. coli*

### 3.3 CtERF1 基因的生物信息学分析

将测序正确的 CtERF1 基因进行生物信息学分析。序列分析表明, CtERF1 基因的 ORF 为 894 bp, 编码 297 个氨基酸 (图 7-A), 相对分子质量为 33 243.11, 理论等电点为 9.12, 蛋白的三维结构如图 7-B 所示。用 Conserved Domains Search (InterProScan) 预测蛋白质序列的功能结构域, 结果显示, CtERF1 基因具有典型的 AP2/ERF 基因的功能结构域 (图 8), 且含有 1 个 AP2 区域, 为 ERF 亚族蛋白。基于蛋白质数据库, 应用 WoLFPSORT 在线分析软件, 对 CtERF1 基因蛋白质进行亚细胞

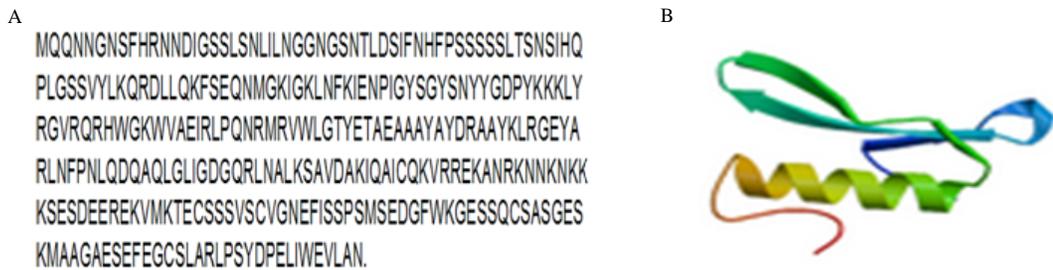


图 7 CtERF1 基因的氨基酸 (A) 组成及三维结构 (B)  
Fig. 7 Amino acids (A) and three-dimensional structure (B) of CtERF1

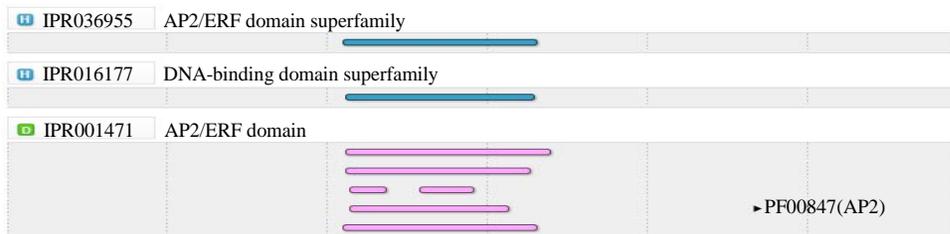


图 8 CtERF1 基因的功能结构域分析  
Fig. 8 Functional domain analysis of CtERF1

定位分析, 推测其在细胞中的位置, 结果显示, 其定位在细胞质和细胞核的可能性最大。

### 3.4 CtERF1 基因的发育树构建及同源性分析

在 NCBI 上搜索到拟南芥、烟草等其他 14 个物种的 ERF 类转录因子进行比对, 研究 CtERF1 基因的进化关系。利用 clustalW1.83 软件构建系统进化树, 结果 (图 9) 显示, CtERF1 与人参、杨树的亲缘关系最近, 在进化树上聚为一类, 与拟南芥、烟草等模式植物亲缘关系较远。

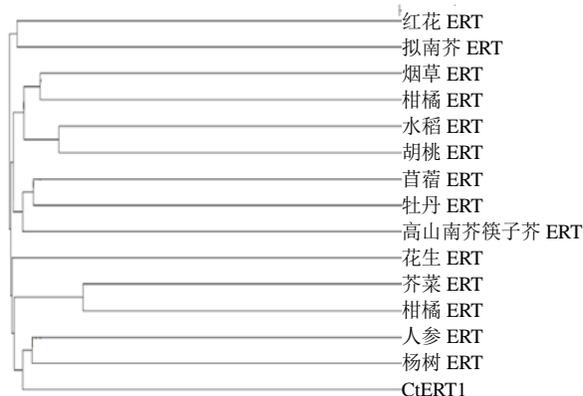


图 9 CtERF1 基因与其他物种的系统进化树分析

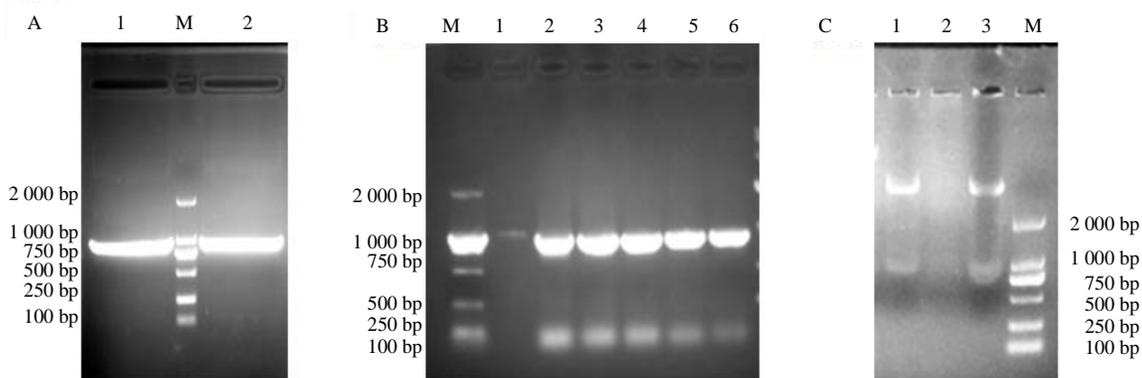
Fig. 9 Phylogenetic relationship between CtERF1 genes of *C. tinctorius* and other species

### 3.5 CtERF1 基因植物表达载体的构建

在 CtERF1 基因 2 端引入酶切位点 *Spe* I 和 *Xba* I, 以前期验证成功的含有 CtERF1 基因的 pEASY-T1 载体质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 获得带有含 *Spe* I 和 *Xba* I 双酶切位点的 CtERF1 基因 (图 10-A), 重新连接 pEASY-T1 克隆载体, 命名为 pEASY-T1-CtERF1。将植物表达载体 pBASTA 和 pEASY-T1-CtERF1 质粒分别用 *Spe* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 将 CtERF1 目的片段与酶切后的 pBASTA 载体用 T4 连接酶连接后, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 对重组质粒进行菌液 PCR 验证 (图 10-B) 和酶切验证 (图 10-C), 获得预期大小为 894 bp 的目的片段, 测序结果与预期一致, 证明植物表达载体构建成功。将酶切测序正确的植物表达载体 pBASTA-CtERF1 质粒, 利用冻融法转化根癌农杆菌 EHA105, 转化后涂板, 对挑取的 6 个单菌落进行农杆菌菌液 PCR 鉴定 (图 11), 其中有 5 条特异性目的条带出现, 说明农杆菌转化成功, 为下一步进行 CtERF1 基因在植物中的功能鉴定奠定基础。

## 4 讨论

AP2/ERF 类转录因子因其广泛参与植物抵抗



A-带有酶切位点的 CtERF1 基因 B-菌液 PCR C-植物表达载体的酶切鉴定 1~6-目的片段

A-CtERF1 gene with restriction enzyme cutting site B-bacterial PCR C-enzyme identification of plant expression vector 1~6-target genes

图 10 CtERF1 基因植物表达载体的构建

Fig. 10 Constriction of plant expression vector of CtERF1 gene

系密切而备受关注<sup>[24]</sup>。研究表明, AP2/ERF 转录因子在器官及组织形成期也发挥着重要作用, 特别是调控花雌蕊的发育<sup>[25]</sup>、果实的发育及其他代谢调控等方面<sup>[26-27]</sup>。本研究正是结合目前课题组的研究方向, 拟分离一条红花 AP2/ERF 转录因子, 旨在研究其在红花花的发育及与黄色素含量的关系, 为研究其在红花黄酮 (黄色素) 代谢调控中对关键酶基因外界环境的胁迫, 并与生长发育相关的转录调控关

的表达调控奠定基础, 为深入研究红花黄色素合成机制提供理论依据。

本研究在红花转录组测序基础上, 克隆了 1 条 AP2/ERF 类转录因子 CtERF1 基因, 编码区为 894 bp, 且含有一个 AP2 区域, 为 ERF 亚族蛋白。CtERF1 基因编码 297 个氨基酸, 与茶树 CsERF-B3 基因编码 212 个氨基酸和甘蓝 BoAP2/ERF1 基因编码 371 个氨基酸<sup>[5,23]</sup>的数量差别较大, 原因可能是物种间

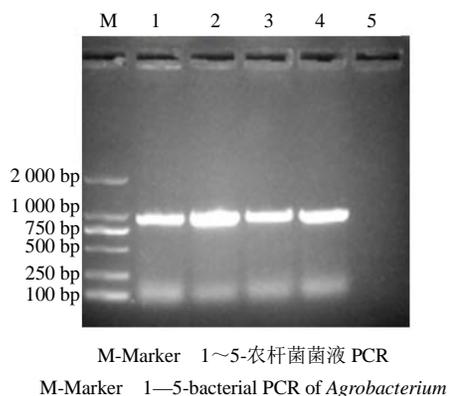


图 11 pBASTA-CtERF1 表达载体的农杆菌菌液 PCR 鉴定  
Fig. 11 PCR identification of pBASTA-CtERF1 expression vector in bacterial solution of *Agrobacterium*

的差异导致氨基酸数量的变化, 因为 AP2/ERF 类转录因子存在于所有植物中, 并且该家族转录因子在植物全部转录因子中占有较大的比例, 而且不同的物种含有 AP2/ERF 类转录因子的数量也不尽相同<sup>[28]</sup>。进化分析显示, CtERF1 转录因子与杨树<sup>[29]</sup>、人参<sup>[30]</sup>的亲缘关系最近, 进化上聚为一类, 表明其有可能起着相近的生物学功能, 也说明该转录因子在红花中可能具有重要的调控作用, 因此, 本研究后期将重点研究 CtERF1 转录因子在红花黄酮代谢调控中的作用, 及其调控的关键酶基因的功能。

红花是集药用价值、食用价值、染料价值、油料和饲料价值于一身的优良作物。而红花油是世界上的公认绿色食品, 是具有医疗、保健、美容等功用的功能性食用油, 具有极高的研究价值和医学价值。红花的化学成分复杂, 含有多种对人体有益的物质, 药理作用广且毒副作用小, 对多种疾病均有很好治疗效果<sup>[19]</sup>。红花黄色素属于植物次生代谢产物黄酮类化合物, 是红花的主要有效成分之一, 本研究运用基因工程手段克隆了 CtERF1 基因编码区序列, 为红花在黄酮化合物代谢调控方面的深入研究提供理论依据。

#### 参考文献

- [1] 官玲亮, 侯凯, 刘千, 等. 红花 ω6 脂肪酸脱氢酶基因克隆及生物信息学分析 [J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(4): 372-383.
- [2] 扈晓佳, 殷莎, 袁婷婷, 等. 红花的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2015, 31(4): 161-166.
- [3] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genomewide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice

- [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 411-432.
- [4] Zhou X, Tang L, Xu Y, et al. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharm*, 2014, 151(1): 27-43.
- [5] 吴致君, 卢莉, 黎星辉, 等. 茶树 AP2/ERF-B3 类转录因子基因的克隆与表达特性分析 [J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(4): 67-75.
- [6] 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): 835-837.
- [7] Gao C, Li P, Song A, et al. Isolation and characterization of six AP2/ERF transcription factor genes in *Chrysanthemum nankingense* [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(1): 2052-2065.
- [8] Lee S Y, Hwang E Y, Seok H Y, et al. Arabidopsis AtERF71/HRE2 functions as transcriptional activator via *cis*-acting GCC box or DRE/CRT element and is involved in root development through regulation of root cell expansion [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(2): 223-231.
- [9] Chung M Y, Vrebalov J, Alba R, et al. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SlAP2a, is a negative regulator of fruit ripening [J]. *Plant J*, 2010, 64(6): 936-947.
- [10] Huala E, Sussex I M. LEAFY interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(8): 901-913.
- [11] Niu X, Helentjaris T, Bate N J. Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(10): 2565-2575.
- [12] 吴文燕, 蒋喜红, 刘春生, 等. 丹参 ERF 转录因子 SmERF1 基因的表达分析和亚细胞定位 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 957-961.
- [13] 吴素瑞, 高珂, 刘璇, 等. AP2/ERF 转录因子调控药用植物活性成分生物合成的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1605-1613.
- [14] Gantet P, Memelink J. Transcription factors: Tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(12): 563-569.
- [15] Broun P. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(2): 202-209.
- [16] 刘秀明, 杨文婷, 陈凯, 等. 红花不同品种和不同花期黄色素含量分析 [J]. 时珍国医国药, 2014, 2(9): 2233-2235.
- [17] Wang C, Xin M, Zhou X, et al. The novel

- ethylene-responsive factor CsERF025 affects the development of fruit bending in cucumber [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 95(4/5): 519-531.
- [18] Sun W, Gao D, Xiong Y, *et al.* Hairy leaf 6, an AP2/ERF transcription factor, interacts with OsWOX3B and regulates trichome formation in rice [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(11): 1417-1433.
- [19] Owji H, Hajiebrahimi A, Seradj H, *et al.* Identification and functional prediction of stress responsive AP2/ERF transcription factors in *Brassica napus* by genome-wide analysis [J]. *Comput Biol Chem*, 2017, 11(71): 32-56.
- [20] Yu Y, Duan X, Ding X, *et al.* A novel AP2/ERF family transcription factor from *Glycine soja*, GsERF71, is a DNA binding protein that positively regulates alkaline stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 94(4/5): 509-530.
- [21] Li H, Xiao Q, Zhang C, *et al.* Identification and characterization of transcription factor ZmEREB94 involved in starch synthesis in maize [J]. *J Plant Physiol*, 2017, 216: 11-16.
- [22] Zhao Y, Chang X, Qi D, *et al.* A Novel soybean ERF transcription factor, GmERF113, increases resistance to *Phytophthora sojae* infection in soybean [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 299(8): 1-16.
- [23] 郭 慧, 金司阳, 刘 寒, 等. 甘蓝 AP2/ERF 转录因子的克隆和生物信息学分析 [J]. 中国药师, 2017, 20(1): 6-10.
- [24] 秦 捷, 王 武, 左开井, 等. AP2 基因家族的起源和棉花 AP2 转录因子在抗病中的作用 [J]. 棉花学报, 2005, 17(6): 366-370.
- [25] Durán-Medina Y, Serwatowska J, Reyes-Olalde J I, *et al.* The AP2/ERF transcription factor DRNL modulates gynoecium development and affects its response to cytokinin [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 26(8): 1841-1853.
- [26] Wang C, Xin M, Zhou X, *et al.* The novel ethylene-responsive factor CsERF025 affects the development of fruit bending in cucumber [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 95(4/5): 519-531.
- [27] Sun W, Gao D, Xiong Y, *et al.* Hairy Leaf 6, an AP2/ERF transcription factor, interacts with OsWOX3B and regulates trichome formation in rice [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(11): 1417-1433.
- [28] Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, *et al.* The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(10): 833-839.
- [29] 赵金玲, 姚文静, 王升级, 等. 杨树 AP2/ERF 转录因子家族生物信息学分析 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(10): 21-29.
- [30] 吴思阳. 非生物因素对人参皂苷生物合成途径关键酶基因表达能力的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.