



# 大豆 ERF 家族基因生物信息学分析及其对低磷胁迫的响应

孙崇源,崔瑞凡,王瑞阳,刘小倩,许焕青,杨宇明,吕海燕,张 丹

(河南农业大学 农学院,河南 郑州 450002)

**摘 要:**为分析大豆乙烯响应因子(Ethylene Response Factor,ERF)基因家族的特征及其在低磷胁迫下的响应作用,本研究首先利用生物信息学方法从大豆基因组数据库中鉴定获得 ERF 家族基因,进行进化分析、染色体分布和基因结构分析,并研究其在大豆发育过程中不同组织的表达模式及在低磷胁迫下的表达情况。结果显示:59 个大豆 ERF 家族基因分布在除 4 号染色体外的整个大豆染色体组上,其中 3 号、10 号、13 号、18 号和 19 号染色体分布较多。基因结构分析显示整个家族具有典型的 AP2 结构域。同源序列比对和进化分析将该家族的基因分为 4 组,分别包括 15,5,19 和 20 个基因。基于 Soybase 数据库的组织表达分析表明该家族基因在大豆的不同组织中均有表达;qRT-PCR 结果表明该家族基因低磷胁迫条件下的大豆根、茎和叶中均被诱导表达。结果说明大豆 ERF 基因结构较保守,能够参与低磷胁迫响应。

**关键词:**大豆;ERF 基因家族;生物信息学;低磷胁迫

## Bioinformatics Analysis on Soybean ERF Family Genes and Their Response to Low Phosphorus Stress

SUN Chong-yuan, CUI Rui-fan, WANG Rui-yang, LIU Xiao-qian, XU Huan-qing, YANG Yu-ming, LYU Hai-yan, ZHANG Dan

(Agricultural College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to analyze the characteristics of soybean Ethylene Response Factor (ERF) genes and their response to low phosphorus stress, this study identified ERF family genes from soybean genome database by bioinformatics methods. And then we analyzed the evolution, chromosome distribution and gene structure of the family genes and their gene expression patterns in different tissues during soybean development, and the expression of the family genes under low phosphorus stress. The results showed that the gene family was distributed in the whole soybean genome except chromosome 4, among which chromosome 3, 10, 13, 18 and 19 were more distributed. The gene structure analysis showed that the whole family had a typical AP2 domain. Homologous sequence alignment and evolutionary analysis divided the genes of this family into 4 groups, including 15, 5, 19 and 20 genes, respectively. Tissue expression analysis based on Soybase database showed that the family genes were expressed in different tissues of soybean. qRT-PCR results showed that the family genes were induced in soybean roots, stems and leaves under low phosphorus stress. The results showed that the structure of soybean ERF genes were conservative, and were involved in the response to low phosphorus stress.

**Keywords:** *Glycine max*; ERF gene family; Bioinformatics; Low-phosphorus stress

磷是构成大豆体内各种有机化合物的重要成分,参与大豆整个生命周期所经历的各种生理生化过程(如光合作用、根瘤固氮和新陈代谢等)。大豆是一种需磷量较大的作物,其吸收的磷主要来自土壤,但是磷在土壤中的含量非常低(约  $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[1]</sup>,为了能够更好吸收和利用磷,大豆产生了许多适应性反应。当土壤中的有效磷含量不能满足其需求时,大豆将表现出植株生长迟缓、植株矮小、叶片变小、易脱荚和不实籽粒变多等症状<sup>[2]</sup>。目前,低磷胁迫已经成为限制大豆产量提高的主要原因。因此,充分挖掘大豆的遗传潜力,通过分子生物学技术手段研究大豆的磷效率分子机制,从而提高大豆对土壤

磷素的吸收利用率成为提高大豆产量的重要途径。

植物遭受逆境胁迫刺激时,会激发体内的信号级联系统并诱导乙烯的生物合成,启动其他相关基因发生应激反应,进而调控植物的生长发育和多种生理生化反应<sup>[3]</sup>。调控这些适应性反应分子机制的决定因素之一就是转录因子(Transcription Factor, TF),它们在转录调控中发挥重要作用。植物受到低磷胁迫时,转录因子与功能基因的启动子相结合,调控其表达水平,进而激活胁迫应答反应<sup>[4]</sup>。乙烯响应因子(Ethylene Response Factor, ERF)是调节激素和胁迫信号的关键枢纽<sup>[5]</sup>,是乙烯信号转导途径中的下游调控因子<sup>[6]</sup>,在植物逆境反

收稿日期:2021-03-17

基金项目:国家自然科学基金(32072088);河南省科技攻关项目(202102110005)。

第一作者:孙崇源(1995—),男,在读硕士,主要从事大豆分子遗传与分子生物学研究。E-mail:13183019220@163.com。

通讯作者:张丹(1982—),女,博士,教授,主要从事大豆品质与抗逆重要基因的发掘与分子机制研究。E-mail:zhangd@henau.edu.cn。

应中起着非常重要的作用<sup>[7-8]</sup>。ERF 基因家族与植物响应非生物胁迫关系密切,如冷害<sup>[9-11]</sup>、干旱<sup>[12]</sup>、高盐<sup>[13-16]</sup>、病害<sup>[17-19]</sup>和激素<sup>[20-21]</sup>等。很多研究证明乙烯在低磷胁迫诱导的根的重塑中发挥着重要作用<sup>[22]</sup>。ERF 基因家族结构简单,内含子较少,同时具有单一的 AP2 结构域。AP2 结构域由 60~70 个氨基酸组成,能够直接结合靶基因启动子上的乙烯响应元件<sup>[23]</sup>。有研究表明 ERF 基因的不同表达水平能够激活或抑制乙烯介导的转录<sup>[24]</sup>,但是关于 ERF 基因与植物低磷胁迫相关的报道并不多。尽管在拟南芥中有研究证明 ERF 在维持磷稳态方面发挥作用<sup>[25]</sup>,但其在大豆中是否参与维持磷稳态及其参与响应磷胁迫的分子机制在大豆与模式作物中有何异同并不清楚。对该家族基因表达模式和磷饥饿响应情况进行分析有利于探究大豆 ERF 家族基因与磷胁迫之间的关系。

在最近的研究中,有许多响应激素信号和逆境胁迫的 ERF 家族成员被克隆,如拟南芥 *AtERF1* 通过调控 *ASAI* 基因表达影响生长素和乙烯的生物合成进而抑制根的生长<sup>[26]</sup>;在烟草中过量表达大豆 *GmERF9* 基因能够增强转基因烟草对干旱和寒冷的耐受性<sup>[27]</sup>;在大豆中过表达 ERF 转录因子 *GmERF5* 和 *GmERF113* 能够增加大豆对疫霉病的抗性<sup>[28]</sup>;Lestari 等<sup>[29]</sup>在巴西橡胶树中过量表达乙烯响应因子基因 *HbERF-IXc5*,巴西橡胶树对盐胁迫和冷胁迫的耐受性显著增强;拟南芥 *AtERF070* 通过调节根系发育响应磷饥饿<sup>[30]</sup>。另外,一些转录组数据显示,在磷饥饿诱导的拟南芥根中 *ERF1*、*ERF2* 和 *ERF5* 的表达会发生显著变化<sup>[31]</sup>;在磷饥饿响应因子的双重突变体中,至少有 8 个 AP2/ERF 基因的表达量显著降低<sup>[32]</sup>。这些结果表明 ERF 基因参与植物非生物胁迫及磷饥饿的响应,并与其它磷饥饿响应基因存在相互作用。但是,对 ERF 基因参与维持磷稳态的研究仅局限在拟南芥中,其在大豆中是否参与,以及与模式植物有何异同尚不清楚。

随着大豆基因组信息的不断完善,原有基因预测的数量和基因结构发生了较大变化<sup>[33]</sup>,利用最新的数据库对大豆 ERF 基因家族进行分析和鉴定,将有助于进一步研究该基因家族成员在大豆生长发育、生物胁迫和非生物胁迫中的作用。魏海超等<sup>[34]</sup>对大豆的 AP2/ERF 基因家族进行了进化分析,并利用种子不同发育时期的转录组对该家族的表达模式进行探讨。本研究利用同源序列比对、ERF 序列模型和 Pfam 结构域预测相结合的方法获得了大豆

ERF 家族的基因序列,分析了大豆 ERF 家族成员序列的相似性和进化关系。对大豆 ERF 家族基因在不同组织中和不同供磷条件下的表达模式进行分析,同时对该家族基因低磷胁迫响应情况进行研究,以期为进一步克隆和鉴定大豆 ERF 基因提供依据,同时为深入解析大豆 ERF 基因响应低磷胁迫的分子机制提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试大豆品种为 Williams 82。

### 1.2 方法

1.2.1 基因序列查找 以已报道的大豆 ERF 基因蛋白序列作为查询序列,利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 Phytozome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库查询获得大豆 ERF 家族基因的序列信息。

1.2.2 基因结构和特性分析 利用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 在线软件对筛选到的 ERF 基因进行结构域判定,获得非冗余的 ERF 序列结构,最终确定大豆基因组中 ERF 家族基因序列。*GmERF* 基因名称按照从数据库中获得的序列位置从高到低命名。利用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具分析大豆 ERF 家族氨基酸序列的氨基酸长度和等电点 (pI)。用 PSORT (<https://psort.hgc.jp/>) 网站预测氨基酸序列的亚细胞定位。

1.2.3 基因染色体定位分析 根据从 Phytozome 中获得的 ERF 家族基因的位置信息和大豆各染色体长度信息,利用 MapChart (<https://www.wur.nl/en/show/Mapchart.htm>) 软件绘制 *GmERF* 家族基因的染色体定位图。

1.2.4 蛋白序列比对及系统进化树分析 利用 ClustalX (<http://www.clustal.org/>) 程序对 ERF 蛋白进行多重序列比对,然后利用 MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>),采用最大似然法 (Maximum-Likelihood, ML),对获得的 ERF 蛋白保守结构域构建系统发育树。

1.2.5 基因结构和蛋白保守结构分析 从大豆基因组数据库下载 ERF 家族基因的外显子和内含子信息,利用 TBtools 软件<sup>[35]</sup>绘制 ERF 家族基因的 CDS-UTR 结构,使用 MEME Suite web (<http://meme-suite.org/>) 服务器预测氨基酸序列的保守 Motif,其中 Motif 的最大数目设为 10。

1.2.6 基因组织表达及低磷胁迫表达分析 生物信息学预测:从 SoyBase(<http://soybase.org/>)下载大豆 ERF 家族基因的表达数据,选取大豆发育的几个关键部位和时期:根、叶、花、1 cm 荚、10、21 和 35 d 种子,根据表达量进行 ERF 基因表达分析。使用 TBtools 绘制热图。

根据前期正常供磷( $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ )和低磷胁迫( $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ )处理 7 d 的极端耐低磷大豆(B18、B20、H99 和 H100)幼苗的根和叶组织转录组测序数据<sup>[33]</sup>,筛选 ERF 家族成员的 FPKM 值,使用 R Studio(<https://rstudio.com/>)绘制热图。

qRT-PCR 分析:分别以正常供磷( $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ )和低磷胁迫( $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ )处理,采集 7、14 d 幼苗的根、茎、叶,每种材料取 3 个样品,每个样品进行 3 次重复。采用总 RNA 提取试剂盒(天根,DP419)提取 RNA,使用反转录试剂盒(翊圣,NO. 11123ES)将 RNA 反转录成第一链 cDNA。从大豆 ERF 家族的各 Group 中共选取 10 个差异表达大的基因进行 qRT-PCR,检测大豆 ERF 家族基因的表达情况。根据大豆 ERF 家族基因的 cDNA 序列,利用 Primer 5.0 设计特异性引物(表 1),扩增片段为 200 bp 左右。内参基因为 *Tubulin* (GenBank 编号 AY907703)<sup>[36]</sup>。qRT-PCR 总反应体系为  $20.0\text{ }\mu\text{L}$ ,其中 cDNA  $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\times\text{FAST SYBR Mix}$   $10.0\text{ }\mu\text{L}$ 、上下游引物( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各  $1\text{ }\mu\text{L}$ 、RNase-Free  $\text{H}_2\text{O}$   $7\text{ }\mu\text{L}$ 。在 CFX96 Touch 系统进行 qRT-PCR,反应程序为: $94\text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $2\text{ min}$ ; $95\text{ }^\circ\text{C}$  变性  $20\text{ s}$ , $56\text{ }^\circ\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ , $72\text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $40\text{ s}$ ,40 个循环。按照  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法<sup>[37]</sup>计算基因的相对表达量,计算每个样品的平均值和标准差。

1.3 数据分析

使用 Excel 2010 计算并分析基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 大豆 ERF 家族成员基因特性分析

从 NCBI 和 Phytozome 数据库中的大豆基因组数据提取大豆 ERF 候选基因,通过结构域判定,最终筛选到 59 个 ERF 基因,分别命名为 *GmERF1* ~ *GmERF59*(表 2)。大豆 ERF 家族基因的氨基酸长度为 91 ~ 285,理论等电点为 4.83 ~ 11.19。对于各成员亚细胞定位预测表明,46 个 *GmERF* 定位在细胞核上,9 个定位在叶绿体,定位在细胞质、高尔基体、线粒体和过氧化物酶体上的 *GmERF* 均为 1 个(表 2)。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 The qRT-PCR primers	
引物名称 Primer name	碱基序列(5'-3') Oligonucleotide sequence(5'-3')
Tublin-F	GCAGTTACAGAGGCAGAG
Tublin-R	CACTTACGCATCACATAGCA
ERF2-F	GAGTGGGCCTTGAACCTAC
ERF2-R	GCTTTGTTTTCGAGCCGTGT
ERF38-F	CCTTCAACGAGAACGACCCA
ERF38-R	ATGTTTCTGGTGGGCTGAGG
ERF41-F	CGGAGATTCGAGATCCGTGG
ERF41-R	GGGGAAGGAGGGGAAATTGG
ERF46-F	ACTCTTCAGGTATTGTTTCAGA
ERF46-R	TGTCAGGTAAGCGTTAATGCAA
ERF49-F	GGGAAGTTCGCAGCAGAGAT
ERF49-R	TTGCCACGCATGTTGAAAG
ERF50-F	TGACTCACGTGTGAAAAGCAC
ERF50-R	ACGAATTTTCCCATGGCCT
ERF53-F	TCACCTTCTCTTTTGTCGGCT
ERF53-R	ACCAACCATCTTGAAGTACACA
ERF57-F	GCTTTCAAGATGAGGGGGCA
ERF57-R	ACTTGTGGCAGCTCCAATTC
ERF59-F	TGGGAAAAGTATGCATAGGATTGT
ERF59-R	GCCATTCAGAAAAGGAGCACT

表 2 大豆 ERF 家族成员基因特性

Table 2 The characteristics of ERF gene family members in <i>Glycine max</i>					
基因名称 Gene name	序列号 Sequence number	染色体位置 Chromosome location	氨基酸数目 Amino acid number	pI	亚细胞定位预测 Subcellular location prediction
<i>GmERF1</i>	Glyma.01G206600	Chr01:52991945..52993448	274	7.71	细胞核
<i>GmERF2</i>	Glyma.01G206700	Chr01:53004461..53005302	275	5.93	细胞核
<i>GmERF3</i>	Glyma.02G006200	Chr02:669869..671254	203	6.32	细胞核
<i>GmERF4</i>	Glyma.02G267400	Chr02:48256852..48257499	215	5.38	细胞核

续表 2

基因名称	序列号	染色体位置	氨基酸数目	pI	亚细胞定位预测
Gene name	Sequence number	Chromosome location	Amino acid number		Subcellular location prediction
GmERF5	Glyma.02G294100	Chr02;50328203..50329807	222	8.38	细胞核
GmERF6	Glyma.03G111800	Chr03;31723004..31723999	168	6.51	细胞质
GmERF7	Glyma.03G112600	Chr03;31927870..31928756	159	9.54	细胞核
GmERF8	Glyma.03G111700	Chr03;33741053..33742110	195	9.60	细胞核
GmERF9	Glyma.03G112000	Chr03;33804471..33805477	197	9.14	细胞核
GmERF10	Glyma.03G112100	Chr03;33876782..33877516	197	9.83	细胞核
GmERF11	Glyma.03G112400	Chr03;33922077..33922688	189	10.18	细胞核
GmERF12	Glyma.03G112700	Chr03;33966555..33967738	223	9.18	细胞核
GmERF13	Glyma.03G112800	Chr03;33970662..33971351	151	5.61	细胞核
GmERF14	Glyma.03G159800	Chr03;39502588..39507310	172	9.68	线粒体
GmERF15	Glyma.03G162500	Chr03;39739652..39740651	231	6.83	细胞核
GmERF16	Glyma.03G162700	Chr03;39770187..39771230	242	5.66	细胞核
GmERF17	Glyma.05G063500	Chr05;4417010..4418544	278	6.48	细胞核
GmERF18	Glyma.05G063600	Chr05;4460844..4462512	255	6.01	叶绿体
GmERF19	Glyma.05G092800	Chr05;22620556..22621483	150	8.71	细胞核
GmERF20	Glyma.06G236400	Chr06;37768273..37769515	183	9.56	叶绿体
GmERF21	Glyma.07G114300	Chr07;13337040..13337762	240	9.77	细胞核
GmERF22	Glyma.07G114000	Chr07;13436536..13437981	205	9.26	细胞核
GmERF23	Glyma.07G113800	Chr07;13446148..13446645	155	6.30	细胞核
GmERF24	Glyma.08G320700	Chr08;43138192..43139880	210	5.97	细胞核
GmERF25	Glyma.09G041500	Chr09;3447207..3449640	237	6.85	细胞核
GmERF26	Glyma.09G242600	Chr09;43261014..43262184	203	7.79	细胞核
GmERF27	Glyma.10G007000	Chr10;692186..693376	167	8.79	细胞核
GmERF28	Glyma.10G036300	Chr10;3159560..3160081	173	8.72	细胞核
GmERF29	Glyma.10G036700	Chr10;3211796..3213252	270	5.45	细胞核
GmERF30	Glyma.10G186800	Chr10;41430263..41431854	219	5.58	细胞核
GmERF31	Glyma.11G036400	Chr11;2611616..2612860	276	6.05	细胞核
GmERF32	Glyma.11G036500	Chr11;2621248..2622901	269	7.69	叶绿体
GmERF33	Glyma.12G226600	Chr12;38675213..38676429	193	9.65	叶绿体
GmERF34	Glyma.13G122600	Chr13;21988760..21989483	213	6.97	细胞核
GmERF35	Glyma.13G122700	Chr13;22001514..22002176	220	5.34	细胞核
GmERF36	Glyma.13G122800	Chr13;22015613..22016218	201	7.65	细胞核
GmERF37	Glyma.13G122900	Chr13;22047491..22048027	178	8.64	叶绿体
GmERF38	Glyma.13G123100	Chr13;22080811..22082357	259	5.74	细胞核
GmERF39	Glyma.13G233900	Chr13;33247690..33248688	147	9.83	细胞核
GmERF40	Glyma.13G274100	Chr13;36417204..36418397	193	9.65	叶绿体
GmERF41	Glyma.13G289700	Chr13;38981708..38982920	95	7.92	高尔基体
GmERF42	Glyma.14G020100	Chr14;1430045..1431949	222	6.89	叶绿体
GmERF43	Glyma.14G050100	Chr14;3918903..3920202	211	5.37	细胞核
GmERF44	Glyma.15G079100	Chr15;6084974..6087570	270	8.86	细胞核
GmERF45	Glyma.15G152000	Chr15;12571496..12573825	223	9.08	细胞核
GmERF46	Glyma.16G040000	Chr16;3728322..3730935	285	7.59	叶绿体
GmERF47	Glyma.17G145300	Chr17;12194564..12195937	275	7.79	细胞核
GmERF48	Glyma.17G145400	Chr17;12209108..12210493	251	5.60	细胞核

续表 2

基因名称	序列号	染色体位置	氨基酸数目	pI	亚细胞定位预测
Gene name	Sequence number	Chromosome location	Amino acid number		Subcellular location prediction
<i>GmERF49</i>	Glyma. 18G091600	Chr18;9132680..9134339	212	5.96	细胞核
<i>GmERF50</i>	Glyma. 18G252200	Chr18;58167323..58167817	164	6.52	过氧化物酶体
<i>GmERF51</i>	Glyma. 18G252300	Chr18;58176771..58177740	202	7.01	细胞核
<i>GmERF52</i>	Glyma. 18G252400	Chr18;58181564..58182572	211	7.00	细胞核
<i>GmERF53</i>	Glyma. 19G163800	Chr19;42255438..42256575	189	11.07	叶绿体
<i>GmERF54</i>	Glyma. 19G163900	Chr19;42262310..42262948	209	6.61	细胞核
<i>GmERF55</i>	Glyma. 19G164100	Chr19;42295387..42296581	253	4.83	细胞核
<i>GmERF56</i>	Glyma. 19G248900	Chr19;49383386..49384986	197	5.97	细胞核
<i>GmERF57</i>	Glyma. 20G070100	Chr20;23762132..23763201	209	7.74	细胞核
<i>GmERF58</i>	Glyma. 20G203700	Chr20;42943921..42945130	214	5.45	细胞核
<i>GmERF59</i>	Glyma. 20G196400	Chr20;43434221..43435410	91	11.19	细胞核

2.2 大豆 ERF 家族基因染色体分布分析

大豆 ERF 基因在染色体上的分布如图 1 所示, 59 个基因分布于除 4 号外的 19 条大豆染色体上, 其中 3 号染色体上分布最多, 有 11 个基因; 其次是

13 号染色体, 为 8 个; 10、18 和 19 号染色体上各分布 4 个; 2、5、7 和 20 号染色体上各分布 3 个; 1、9、11、14、15 和 17 号染色体上各分布 2 个; 其余 4 条染色体上各分布 1 个。

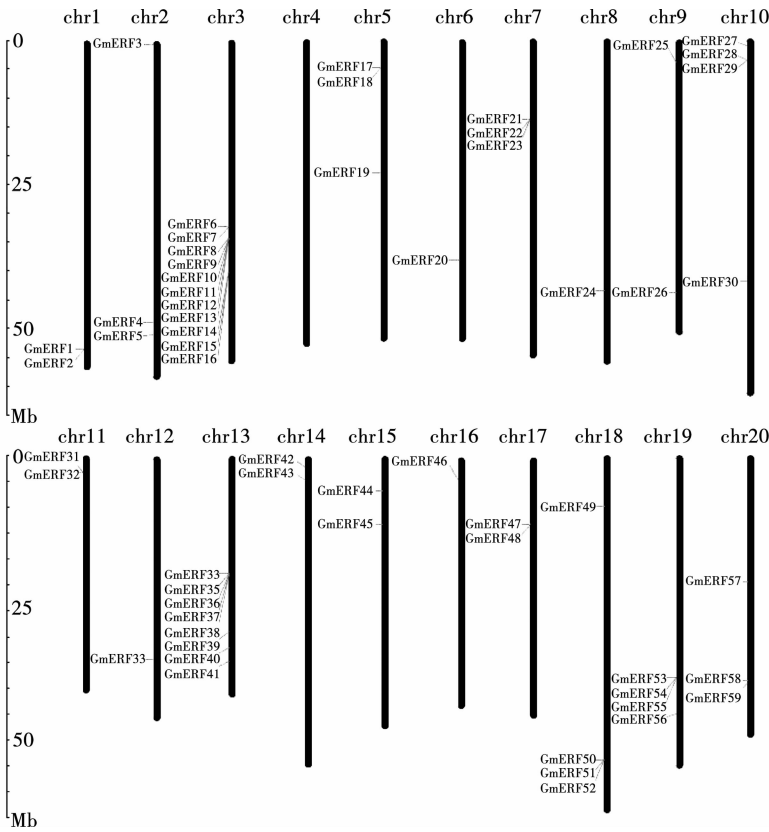


图 1 大豆 ERF 家族基因染色体定位图

Fig.1 The genomic location of ERF genes on Glycine max chromosomes

2.3 大豆 ERF 家族多重序列比对

大豆 ERF 家族基因编码蛋白的氨基酸序列的

多重序列比对结果如图 2 所示, 各大豆 ERF 家族氨基酸序列均存在 AP2 结构域特征序列(x)GRR(x)EI

(x) RWLG (x) AA (x) D (x) G (x) N (x)<sup>[37]</sup>, 除 GmERF6 和 GmERF41 外, 其余基因编码的氨基酸片段均包含完整 AP2 结构。GmERF6、GmERF7 和 GmERF41 的前端氨基酸序列缺失, GmERF59 的前端氨基酸序列发生变化。

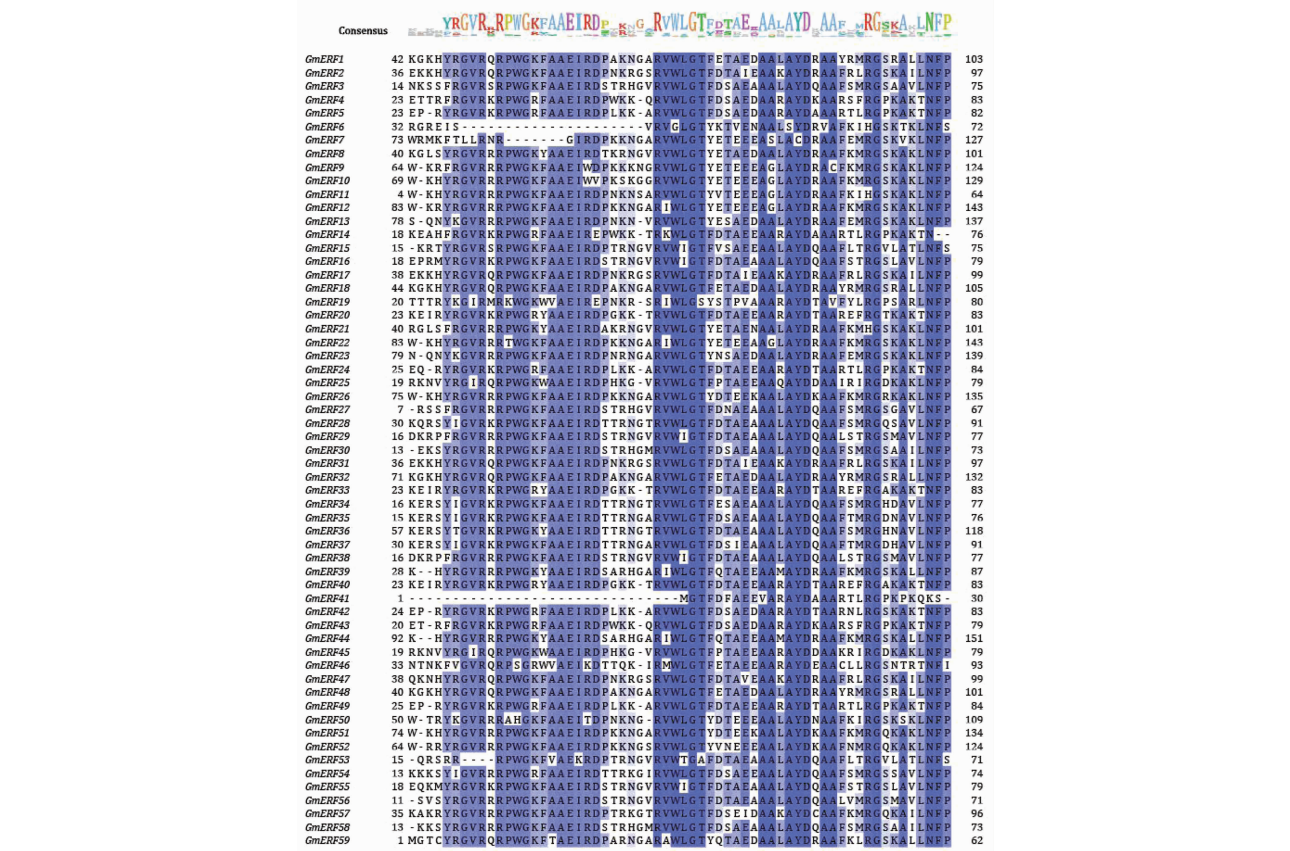


图 2 大豆 ERF 家族基因的氨基酸序列比对

Fig. 2 The amino acid sequence alignment of soybean ERF family genes

2.4 大豆 ERF 家族进化分析

大豆 ERF 家族蛋白序列进化分析树如图 3 所示, 该家族基因分为 A、B、C 和 D 组, 其中 D 组是最

大的进化分支, 包括 20 个 ERF 家族成员; B 组是最小的分支, 只有 5 个成员; A 和 C 组分别包含 15 和 19 个家族成员。

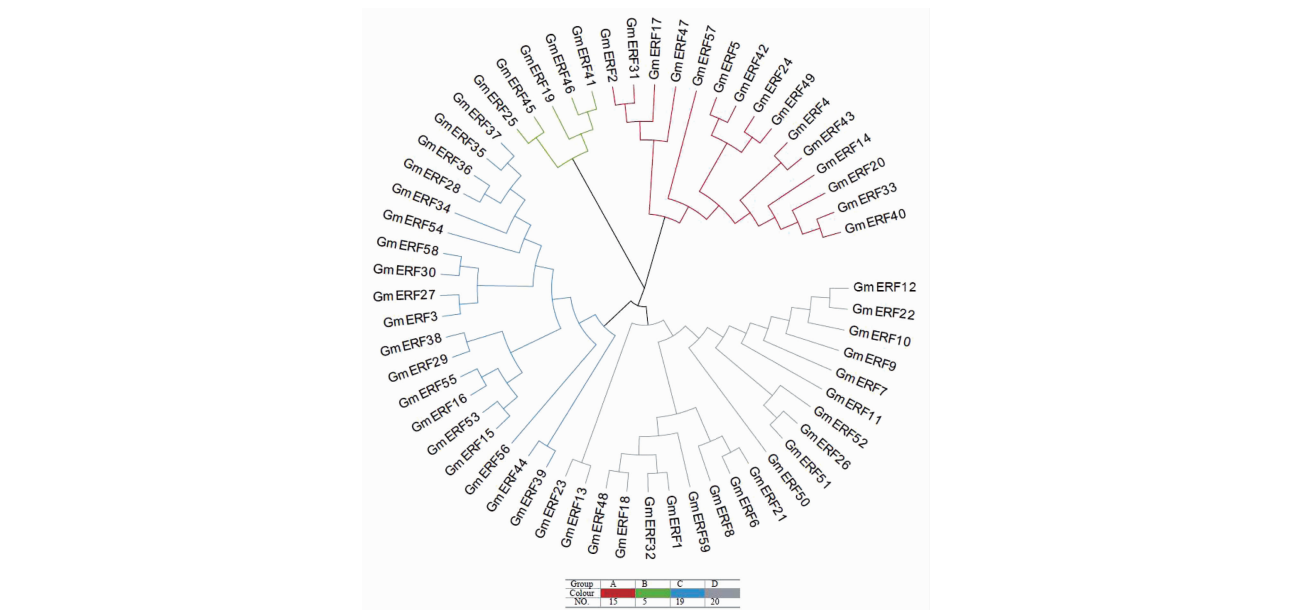


图 3 大豆 ERF 基因家族的最大似然树分析

Fig. 3 The maximum likelihood tree analysis of soybean ERF family genes



2.5 大豆 ERF 家族基因结构和蛋白保守结构分析

大豆 ERF 家族的基因结构分析显示,整个 ERF 家族结构比较紧密,51 个 GmERF 基因不存在内含子,直接由外显子组成,其中 6 个基因仅包含编码区(CDS);8 个存在内含子的 GmERF 基因中有 3,2 和 3 个分别分布在 B、C 和 D 组中(图 4A)。

大豆 ERF 家族 Motif 分析显示,*GmERF41* 不含有任何 Motif 结构域,*GmERF59* 只含有 Motif1 结构域,*GmERF6* 含有 Motif1 和 Motif5 结构域,*GmERF7*

含有 Motif1 和 Motif6 结构域,其余 ERF 基因均含有 Motif1 和 Motif2 两个结构域,并且 Motif1 和 Motif2 结构域以串联形式重复出现(图 4B)。

Motif2 的特征序列(x)GRR(x)EI(x)和 Motif1 的特征序列 RWLG(x)AA(x)D(x)G(x)N(x)两部分刚好构成 ERF 家族的 AP2 结构域的完整特征保守序列(x)GRR(x)EI(x)RWLG(x)AA(x)D(x)G(x)N(x)(图 2 和图 4C)。

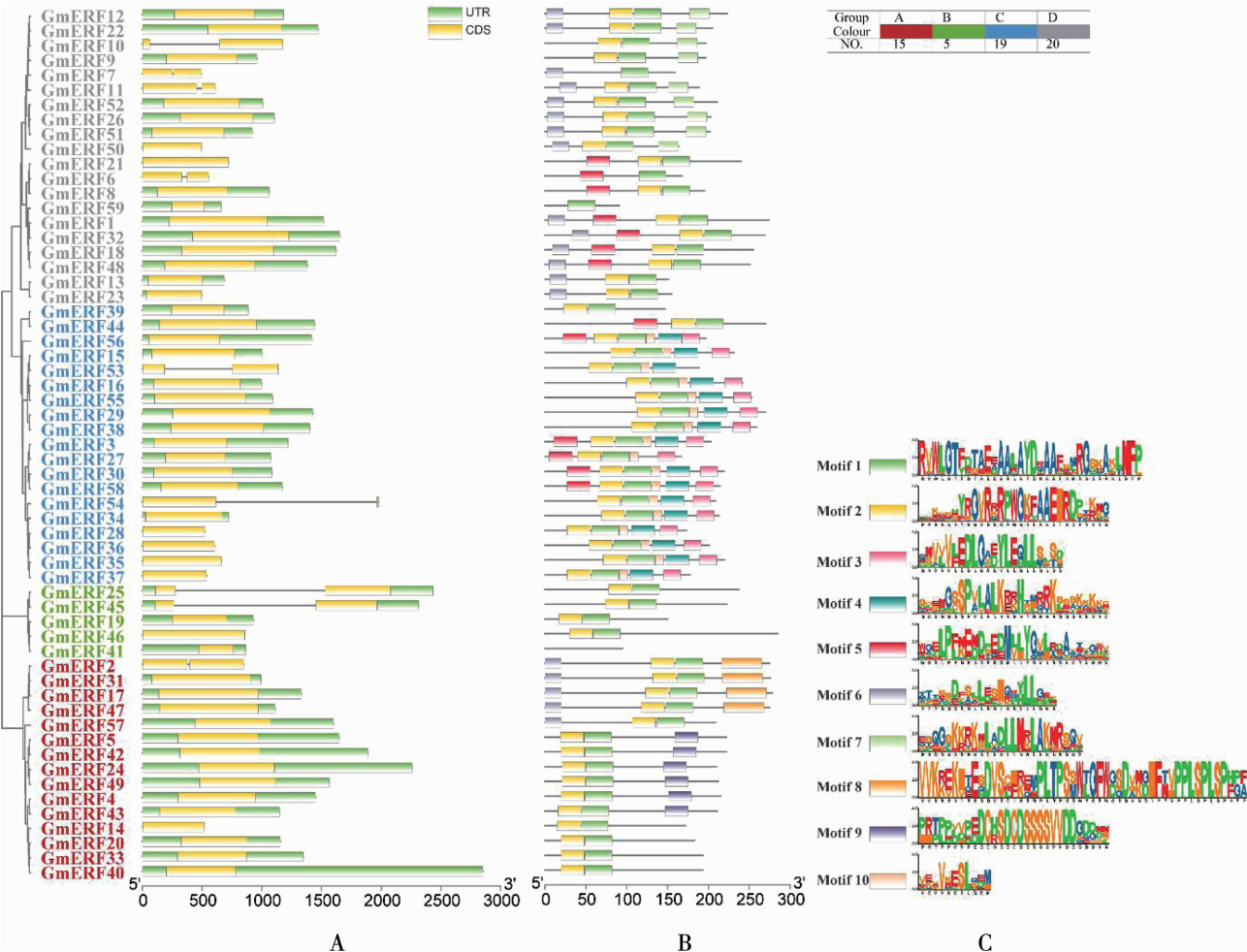


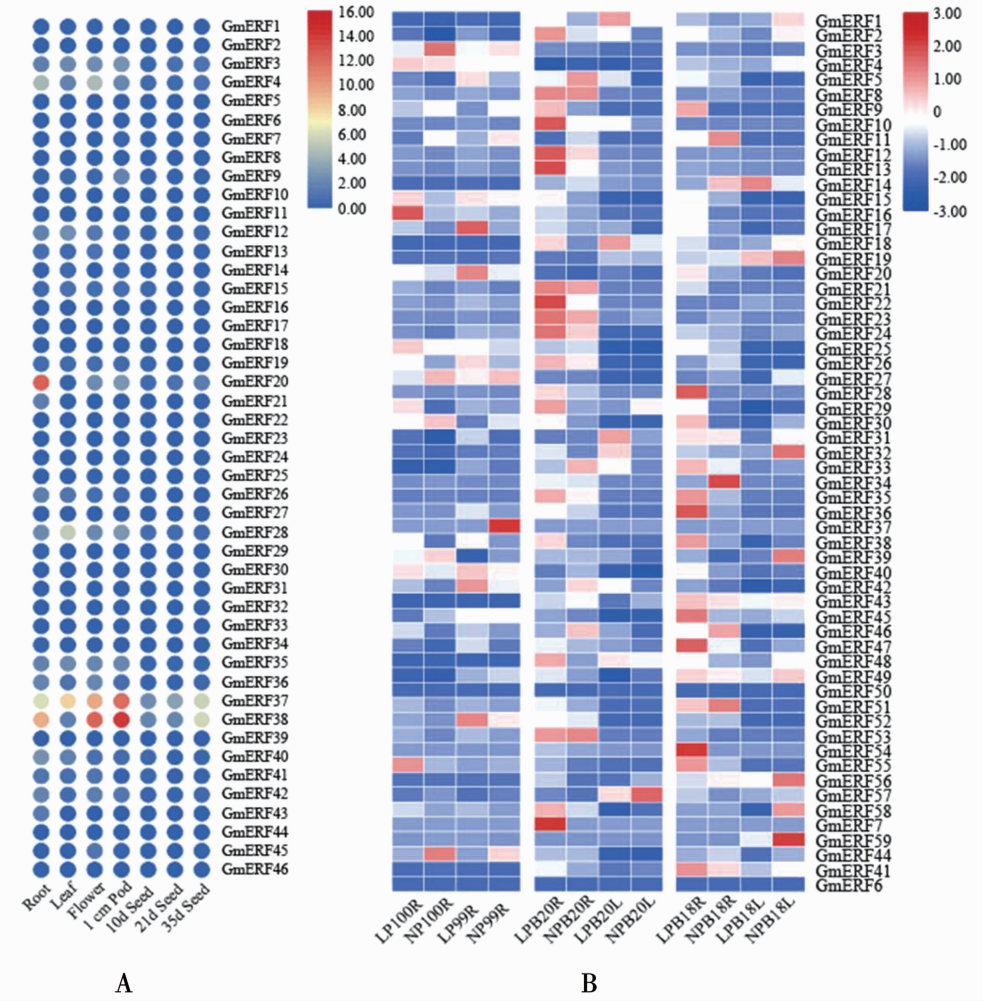
图 4 大豆 ERF 家族基因结构(A)、保守 Motif(B)和 Motif 氨基酸序列(C)分析

Fig.4 The gene architecture(A), conserved motif(B) and amino acid sequence(C) analysis of soybean ERF family genes

2.6 大豆 ERF 家族基因组织表达分析

2.6.1 生物信息学预测 利用 SoyBase 网站中大豆 ERF 家族基因的组织表达数据进行的可视化结果显示,该家族基因在大豆整个发育过程中的各个组织均有表达,但表达量普遍不高。

利用极端耐低磷材料经过正常处理和低磷处理 7 d 的根和叶的转录组测序结果,对 ERF 家族基因进行低磷响应表达模式可视化,结果显示该家族的基因在根和叶中的表达量不高,该家族基因响应低磷胁迫,其中根对低磷响应更为明显(图 5)。



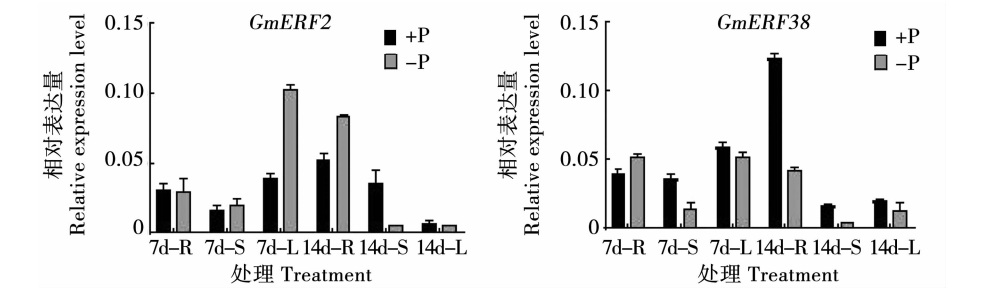
LP. 低磷处理;NP. 正常磷处理;99. H99;100. H100;L. 叶;R. 根。  
LP. Low phosphorous; NP. Normal phosphorous; 99. H99; 100. H100; L. Leave; R. Root.

图5 GmERF 家族基因组织的表达分析 (A) 和不同磷处理材料的组织表达分析 (B)

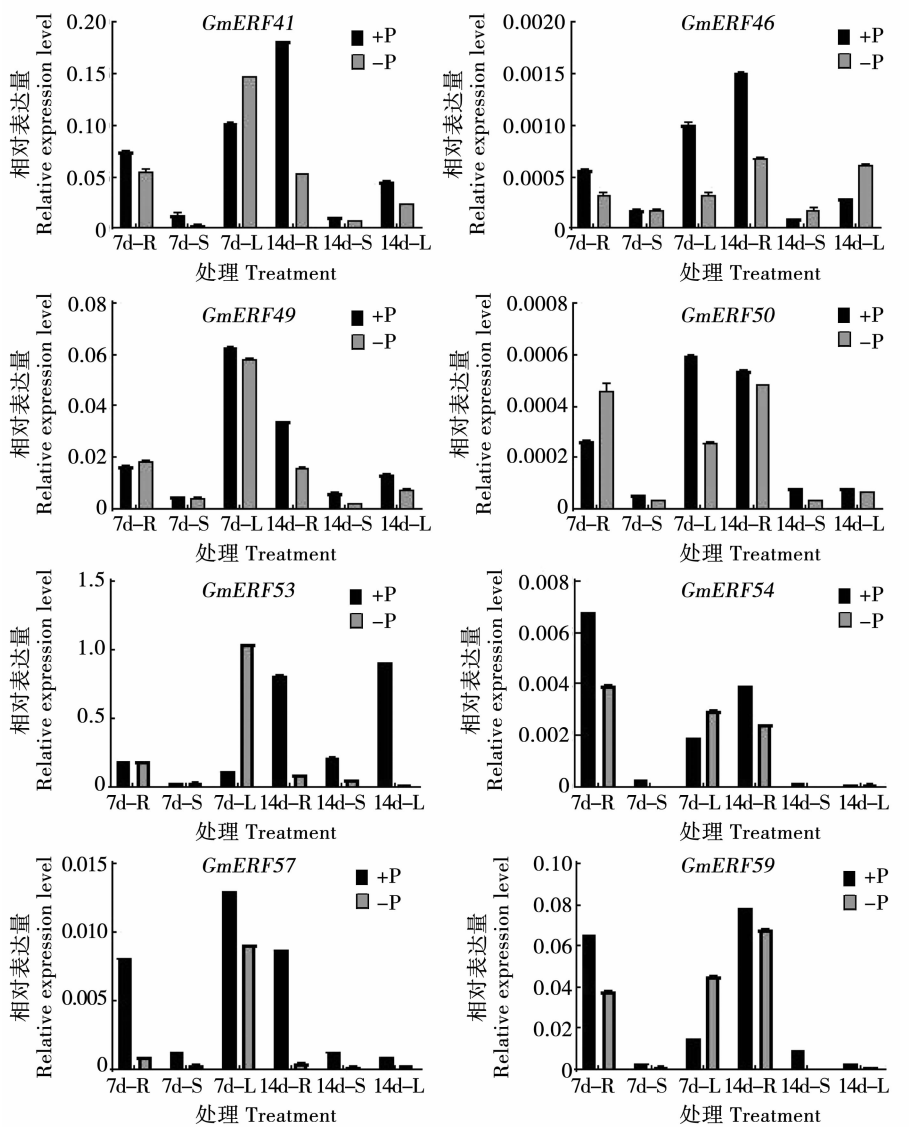
Fig.5 The tissue expression of GmERF family genes (A) and tissue expression of different phosphorus treatment materials (B)

2.6.2 qRT-PCR 分析 对 10 个表达量差异大的大豆 ERF 基因的 qRT-PCR 结果显示,该家族基因的表达量普遍不高,与之前的组织表达预测结果和转录组数据结果相一致;10 个 ERF 基因对低磷胁迫的响应程度不同,其中 *GmERF2*、*GmERF41*、*GmERF50*、*GmERF53*、*GmERF54* 和 *GmERF59* 在胁

迫第 7 天表达量差异最大, *GmERF38*、*GmERF46*、*GmERF49* 和 *GmERF57* 在胁迫第 14 天表达量差异最大(图 6)。这些结果不仅验证了转录组测序结果的可靠性,也说明大豆 ERF 家族基因参与了大豆对低磷胁迫的响应。







7d. 处理 7 d; 14d. 处理 14 d; R. 根; S. 茎; L. 叶。  
7d. Treatment for 7 d; 14d. Treatment for 14 d; R. Root; S. Steam; L. Leave.

图6 qRT-PCR 分析  
Fig. 6 qRT-PCR analysis

3 讨论

ERF 转录因子在植物生长发育和应对植物胁迫中发挥着非常重要的作用<sup>[38]</sup>。在拟南芥、水稻、番茄和胡萝卜等作物中,其成员的功能大多与作物发育和激素调节、生物胁迫和非生物胁迫相关<sup>[39-40]</sup>。关于该家族成员与磷胁迫关系的研究并不多,Zhang 等<sup>[41]</sup>在拟南芥中证明了 ERF 家族基因 *AtERF070* 通过调节根系发育响应磷饥饿。在大豆中 ERF 家族基因虽然也有报道<sup>[42-43]</sup>,但关于大豆 ERF 家族基因和磷胁迫的研究并不多。本研究从整个大豆 ERF 家族基因出发,通过对整个 ERF 家族进行生物信息学分析了解该家族基因的基本特

征,根据 59 个大豆 ERF 基因家族成员在染色体上的位置将其命名为 *GmERF1 ~ GmERF59*。理化性质分析发现大豆 ERF 家族基因主要定位于细胞核,且分子质量和等电点也有所差异。基因结构、UTR 和内含子的数量对基因表达具有重要意义。系统进化表明大豆 ERF 家族基因分为 A、B、C 和 D 4 个进化分支,其中 Group D 是最大的一个进化分支,Group A 和 Group C 次之,Group B 是最小的一个分支。基因结构分析表明整个大豆 ERF 基因保守性较高,多数有 Motif1 和 Motif2 两个结构域以串联重复形式出现的保守结构域。

在本研究中,通过对大豆 ERF 家族基因的组织表达分析发现该家族基因广泛参与各个组织的表

达,由于该家族基因的高效性,表达量普遍不高。利用耐低磷材料和磷敏感材料在不同磷水平处理条件下的转录组数据对大豆 ERF 基因家族进行表达分析,发现大部分 ERF 家族基因在转录水平上差异表达,差异甚至达到显著水平,说明其可能在大豆应对低磷胁迫中发挥着重要作用。对 10 个 ERF 基因进行不同磷处理时期 qRT-PCR 试验,发现 10 个 ERF 基因均对低磷胁迫有不同程度的响应。该结果验证了转录组测序结果的可靠性,同时也表明大豆 ERF 家族基因参与了大豆对低磷胁迫的响应。本研究仅挑选了部分 ERF 家族基因进行 qRT-PCR 试验,整个家族对磷胁迫的响应情况还有待进一步研究。

4 结 论

研究结果显示大豆 ERF 家族基因共有 59 个成员,分布在除 4 号染色体外的 19 条染色体上,根据基因序列结构可分为 A、B、C 和 D 组;整个家族结构保守,大多基因含有以 Motif1 和 Motif2 串联形式构成的大豆 AP2 结构域;ERF 家族基因在大豆的各个组织均有表达,同时能够响应低磷胁迫。本研究为大豆 ERF 家族基因功能的研究和大豆耐低磷分子机制研究提供线索,并有助于进一步研究 ERF 基因家族成员在大豆低磷胁迫中的作用。

参考文献

[1] 沈鸣,陈受宜,张劲松. 乙烯对豆科植物生长发育和根瘤形成的影响[J]. 大豆科学, 2016, 35(2): 330-336. (Shen M, Chen S Y, Zhang J S, et al. Effects of ethylene on growth and development and nodule formation of legume plants[J]. Soybean Science, 2016, 35(2): 330-336. )

[2] Zhang J, Xu M, Dwiyantri M S, et al. A soybean deletion mutant that moderates the repression of flowering by cool temperatures [J]. Front Plant Science, 2020(11): 429.

[3] 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 Molecular Biology, 2010, 73(3): 241-249.

[4] 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.

[5] Muller M, Munne-Bosch S. Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling [J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 32-41.

[6] Licausi F, Masaru O T, Pierdomenico P. Apetala 2/Ethylene responsive factor (Ap 2/ErF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs[J]. New Phytologist 2013, 199(3): 639-649.

[7] Riechmann J L, Meyerowitz E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors [J]. Biological Chemistry, 1998, 379(6): 633-646.

[8] Zhu Q, Zhang J, Gao X, et al. The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses [J]. Gene, 2010, 457(1-2): 1-12.

[9] Kitomi Y, Ito H, Hobo T, et al. The auxin responsive AP2/ERF transcription factor CROWN ROOTLESS5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of OsRR1, a type-A response regulator of cytokinin signaling[J]. Plant Journal, 2011, 67(3): 472-484.

[10] Hirota A, Kato T, Fukaki H, et al. The auxin-regulated AP2/EREBP gene PUCHI is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2007, 19(7): 2156-2168.

[11] Andriankaja A, Boisson-Demier A, Frances L, et al. AP2-ERF transcription factors mediate nod factor-dependent mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif [J]. Plant Cell, 2007, 19(9): 2866-2885.

[12] Marsch-Martinez N, Greco R, Becker J D, et al. BOLITA, an *Arabidopsis* AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 62(6): 825-843.

[13] Salvi S, Sponza G, Morgante M, et al. Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(27): 11376-11381.

[14] Chuck G, Meeley R, Hake S. Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize AP2 genes *ids1* and *sid1* [J]. Development, 2008, 135(18): 3013-3019.

[15] Komatsu M, Chujo A, Nagato Y, et al. FRIZZY PANICLE is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets [J]. Development, 2003, 130(16): 3841-3850.

[16] Liu J, Li J, Wang H, et al. Identification and expression analysis of ERF transcription factor genes in petunia during flower senescence and in response to hormone treatments [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(2): 825-840.

[17] Jofuku K D, Omidyar P K, Gee Z, et al. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(8): 3117-3122.

[18] Thiel J, Weier D, Sreenivasulu N, et al. Different hormonal regulation of cellular differentiation and function in nucellar projection and endosperm transfer cells: A microdissection-based transcriptome study of young barley grains [J]. Plant Physiology, 2008, 148(3): 1436-1452.

[19] El-Sharkawy I, Sherif S, Mila I, et al. Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(3): 907-922.

[20] Pietsch C, Sreenivasulu N, Wobus U, et al. Linkage mapping of

putative regulator genes of barley grain development characterized by expression profiling[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9(1): 4.

[21] Soares V L, Rodrigues S M, de Oliveira T M, et al. Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis[J]. Molecular Biology Report, 2011, 38(2): 1329-1340.

[22] Ramaiah M, Jain A, Raghothama K G. ETHYLENE RESPONSE FACTOR070 regulates root development and phosphate starvation-mediated responses [J]. Plant Physiology, 2014, 164 (3): 1484-1498.

[23] Karanja B K, Xu L, Wang Y, et al. Genome-wide characterization of the AP2/ERF gene family in radish (*Raphanus sativus* L.): Unveiling evolution and patterns in response to abiotic stresses[J]. Gene, 2019, 718: 144048.

[24] Song L, Liu D. Ethylene and plant responses to phosphate deficiency [J]. Front Plant Science, 2015, 6: 796.

[25] Wang G, Wang H, Zhu J, et al. An expression analysis of 57 transcription factors derived from ESTs of developing seeds in maize (*Zea mays*) [J]. Plant Cell Report, 2010, 29(6): 545-559.

[26] Wang X P, Liu S D, Tian H N, et al. The small ethylene response factor ERF96 is involved in the regulation of the abscisic acid response in *Arabidopsis* [J]. Frontiers in Plant Science, 2015(6): 1064.

[27] Zhai Y, Shao S L, Sha W, et al. Overexpression of soybean *GmERF9* enhances the tolerance to drought and cold in the transgenic tobacco [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2017, 128(3): 607-618.

[28] Zhao Y, Chang X, Qi D, et al. A novel soybean ERF transcription factor, GmERF113, increases resistance to *Phytophthora sojae* infection in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8(47): 299.

[29] Lestari R, Rio M, Martin F, et al. Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor HbERF-IXc5 enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(1): 322-336.

[30] Bustos R, Castrillo G, Linhares F, et al. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis* [J]. PLoS Genetics, 2010, 6(9): e1001102.

[31] Upadhyay R K, Soni D K, Singh R, et al. SlERF36, an EAR-motif-containing ERF gene from tomato, alters stomatal density and modulates photosynthesis and growth [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(11): 3237-3247.

[32] 张淑珍, 华彩峰, 董利东, 等. ERF 转录因子及在大豆中的研究进展 [J]. 大豆科学, 2015, 34(3): 512-517. (Zhang S Z, Hua C F, Dong L D, et al. ERF transcription factors and research progress in soybean [J]. Soybean Science, 2015, 34 (3): 512-517.)

[33] Zhang D, Zhang H, Chu S, et al. Integrating QTL mapping and transcriptomics identifies candidate genes underlying QTLs associated with soybean tolerance to low-phosphorus stress [J]. Plant Molecular Biology, 2016, 93(1-2): 137-150.

[34] 魏海超, 刘媛, 豆明珠, 等. 大豆 AP2/ERF 基因家族的分子进化分析 [J]. 植物生理学报 2015, 51 (10): 1706-1718. (Wei H C, Liu Y, Dou M Z, et al. Molecular evolution analysis of soybean AP2 / ERF gene family [J]. Plant Physiology Report, 2015, 51(10): 1706-1718.)

[35] 袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. 植物学报, 2012, 47(4): 427-436. (Yuan W, Wan H J, Yang Y J, et al. The characteristics and selection of reference genes in plant real-time fluorescence quantitative PCR [J]. Phytology, 2012, 47(4): 427-436.)

[36] Zhou Y, Tan W J, Xie L J, et al. Polyunsaturated linolenoyl-CoA modulates ERF-VII-mediated hypoxia signaling in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62(3): 330-348.

[37] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method [J] Elsevier, 2001, 25(4): 402-408.

[38] Liu M, Chen Y, Chen Y, et al. The tomato Ethylene Response Factor Sl-ERF. B3 integrates ethylene and auxin signaling via direct regulation of Sl-Aux/IAA27 [J]. New Phytology, 2018, 219(2): 631-640.

[39] Xu J J, Zhang X F, Xue H W. Rice aleurone layer specific OsNF-YB1 regulates grain filling and endosperm development by interacting with an ERF transcription factor [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(22): 6399-6411.

[40] Zhang G, Chen M, 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): 4095-4107.

[41] Zhang G, Chen M, Li L, et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(13): 3781-3796.

[42] Zhao M J, Yin L J, Liu Y, et al. The ABA-induced soybean ERF transcription factor gene *GmERF75* plays a role in enhancing osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* and soybean [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 506.

[43] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.