

## 桂花番茄红素 $\beta$ -环化酶基因 *LCYB* 上游 B2 亚组 ERF 转录因子的筛选和鉴定

李莉<sup>1,2,3</sup>, 庞天虹<sup>1,2,3</sup>, 付建新<sup>1,2,3</sup>, 张超<sup>1,2,3</sup>

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质创新与利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 3. 浙江农林大学 南方园林植物种质创新与利用国家林业和草原局重点实验室, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 【目的】筛选并鉴定参与调控桂花 *Osmanthus fragrans* 番茄红素  $\beta$ -环化酶 *OjLCYB* 基因的 B2 亚组 ERF 转录因子。【方法】以桂花品种‘堰虹桂’ *O. fragrans* ‘Yanhong Gui’ 为材料, 从桂花转录组数据库筛选 B2 亚组 *OjERF* 基因, 通过生物信息学分析、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 以及酵母单杂交技术, 对 *OjERF* 基因序列和表达特性及其对 *OjLCYB* 基因启动子结合情况进行分析。【结果】*OjLCYB* 基因启动子序列含有 2 个 ATCTA 顺式作用元件; 基于桂花转录组数据库筛选出 4 个 B2 亚组 ERF 基因, 均包含 1 个 AP2 保守结构域; RT-qPCR 结果表明: *OjERF72a* 与 *OjERF72b* 基因表达量均随着开花进程逐渐下降, 与 *OjLCYB* 基因表达显著负相关, *P* 分别为 0.033 8、0.029 6; 酵母单杂交结果证明: *OjERF72b* 与 *OjLCYB* 启动子之间存在物理结合。【结论】*OjERF72b* 可能通过调控 *OjLCYB* 的转录参与桂花类胡萝卜素的代谢。图 7 表 3 参 25

**关键词:** 桂花; 类胡萝卜素; ERF 转录因子; 基因功能

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2024)00-0001-08

## Screening and identification of ERF transcription factors of B2 subgroup involved in regulating lycopene $\beta$ -cyclase gene *LCYB* in *Osmanthus fragrans*

LI Li<sup>1,2,3</sup>, PANG Tianhong<sup>1,2,3</sup>, FU Jianxin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Chao<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Landscape and Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] This study aims to screen and identify ERF transcription factors of B2 subgroup involved in regulating lycopene  $\beta$ -cyclase *OjLCYB* gene of *Osmanthus fragrans*. [Method] ‘Yanhong Gui’, a cultivar of *O. fragrans*, was used as the material to screen *OjERF* genes of B2 subgroup from the *O. fragrans* transcriptome database. Bioinformatic analysis, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and yeast one-hybridization were used to analyze the sequence and expression characteristics of the *OjERF* gene and its binding to the *OjLCYB* gene promoter. [Result] The promoter of the *OjLCYB* gene contained two ATCTA *cis*-acting elements. Four *OjERF* genes of B2 subgroup were screened based on the *O. fragrans* transcriptome

收稿日期: 2024-04-25; 修回日期: 2024-07-30

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LY19C160002)

作者简介: 李莉 (ORCID: 0009-0009-5083-5149), 从事观赏植物花色花香研究。E-mail: [lily05270806@163.com](mailto:lily05270806@163.com)。通信作者: 张超 (ORCID: 0000-0001-8118-5251), 副教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: [zhangc@zafu.edu.cn](mailto:zhangc@zafu.edu.cn)

database, all of which contained an AP2 conserved structural domain. The RT-qPCR results showed that the expression levels of *OfERF72a* and *OfERF72b* genes gradually decreased with the flowering process, and were significantly negatively correlated with the expression of *OfLCYB* gene, with *P* values of 0.033 8 and 0.029 6, respectively. The results of yeast one-hybridization proved that there was a physical binding between *OfERF72b* and the *OfLCYB* promoter. [Conclusion] *OfERF72b* may participate in the metabolism of carotenoid in *O. fragrans* by regulating the transcription of *OfLCYB*. [Ch, 7 fig. 3 tab. 25 ref.]

**Key words:** *Osmanthus fragrans*; carotenoid; ERF transcription factors; gene function

桂花 *Osmanthus fragrans* 为木犀科 Oleaceae 木犀属 *Osmanthus*, 是中国十大传统名花之一, 也是园林造景常用植物。根据开花时间不同, 桂花可以分为秋桂和四季桂; 根据花色差异, 秋桂又可以分为丹桂、金桂和银桂。已有研究分析了桂花不同花色品种呈色物质成分, 证实类胡萝卜素的种类及其质量分数是决定桂花花色的最主要因素<sup>[1-2]</sup>。目前, 桂花类胡萝卜素的定性定量及其代谢途径中相关催化酶基因已被陆续分离得到<sup>[3-5]</sup>。桂花不同花色品种花瓣所含的类胡萝卜素中,  $\beta$ -胡萝卜素相对含量最高<sup>[1]</sup>。桂花番茄红素  $\beta$ -环化酶 *OfLCYB* 具备使番茄红素两端环化转化为  $\beta$ -胡萝卜素的能力, 且 *OfLCYB* 对番茄红素的底物亲和性强于其他番茄红素环化酶, 是桂花类胡萝卜素代谢途径中的关键催化酶<sup>[6-7]</sup>。沈子又等<sup>[8]</sup>分离得到了 *OfLCYB* 基因启动子, 发现其启动子序列均包含有 TATA-box、CAAT-box 响应元件及水杨酸、赤霉素、脱落酸等激素响应元件等, 但目前有关桂花 *OfLCYB* 基因上游转录因子的筛选及鉴定鲜见报道。

已有研究认为: ERF<sup>[9]</sup>、MYB<sup>[10]</sup>、NAC<sup>[11]</sup>等转录因子参与调控植物类胡萝卜素代谢。AP2/ERF 转录因子家族具有众多的家族成员。根据 AP2/ERF 结构域的数目和序列特征, AP2/ERF 家族转录因子分为 AP2、ERF、CBF/DREB、RAV 和 Soloist 这 5 个亚组, 其中 ERF 类转录因子仅含有 1 个 AP2/ERF 结构域。ERF 转录因子通过结合下游靶基因的 GCC (GCCGCC) 或 DRE (CCGAC) 序列<sup>[12]</sup>调节基因的表达, 参与调节植物生长发育、生物或非生物胁迫应答、调控果实成熟等。此外, 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*<sup>[9]</sup>、番茄 *Solanum lycopersicum*<sup>[13]</sup> 和苹果 *Malus domestica*<sup>[14]</sup> 中还发现 B2 亚组的 ERF 转录因子具有调控植物类胡萝卜素合成的功能。拟南芥 B2 亚组 ERF 转录因子包括 At3g16770.1 (AtERF72/AtRAP2.3)、At1g72360.2 (AtERF73)、At1g53910.1 (AtERF74/AtRAP2.2) 等 5 个成员。AtRAP2.2 蛋白可以结合到拟南芥 *AtPSY* 启动子和 *AtPDS* 启动子的 ATCTA 元件上, 从而调控相关基因的表达<sup>[15]</sup>。在苹果 *MdPSY1* 和 *MdPSY2* 基因启动子中也存在多个 ATCTA 顺式作用元件, 能被 AtRAP2.3 的同源基因蛋白 AP2D15 强烈激活表达<sup>[14]</sup>。在黄龙胆 *Gentiana lutea*<sup>[16]</sup> 中, *GILCYB*、*GILCYE*、*GIZEP*、*GIPDS*、*GIZDS*、*GIBCH* 基因的启动子上均存在 ATCTA 作用元件, 说明 ATCTA 元件广泛存在于类胡萝卜素合成基因启动子上, 表明 B2 亚组的 ERF 转录因子可能对一系列类胡萝卜素代谢基因具有调控作用。

本研究以桂花丹桂品种‘堰虹桂’ *O. fragrans* ‘Yanhong Gui’ 为材料, 首先对 *OfLCYB* 基因启动子的 ATCTA 顺式作用元件进行分析, 再对桂花 B2 亚组的 ERF 转录因子基因进行序列分析和表达分析, 利用酵母单杂交技术筛选和鉴定与 *OfLCYB* 互作的关键 B2 亚组的 *OfERF* 转录因子, 不仅可以扩展桂花花色研究领域, 同时为揭示桂花类胡萝卜素代谢的调控网络提供理论依据, 为桂花品种培育和种质创新提供新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

选择浙江农林大学桂花资源圃生长状况良好的地栽桂花品种‘堰虹桂’为材料, 分别采集‘堰虹桂’的新鲜嫩叶以及顶壳期 (S1)、铃梗期 (S2)、初花期 (S3)、盛开期 (S4) 的花瓣样品<sup>[17]</sup>, 每个样品 3 次生物学重复, 取样时间一致, 均为 10:00。上述叶片与花瓣样品快速采集后放入液氮冷冻, 随后保存于 -80 °C 超低温冰箱, 供后续使用。

## 1.2 方法

1.2.1 *OfLCYB* 启动子序列分析、克隆及 *OfLCYB* 基因表达分析 根据诺禾致源的 Ultraclean plant DNA purification Kit 试剂盒操作说明提取‘堰虹桂’的嫩叶鲜样 DNA。借助 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子顺式作用元件。根据 *OfLCYB* 的启动子序列信息<sup>[8]</sup> 设计引物，以‘堰虹桂’嫩叶 DNA 为模板扩增得到其启动子。以‘堰虹桂’不同时期的花瓣 cDNA 为模板，以 *OfLCYB* 基因序列设计表达引物，以桂花 *OfACT* 基因<sup>[18]</sup> 为内参基因，按照 TB Green® Premix Ex TM Tap II 说明进行实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 分析。引物序列见表 1。利用参照基因的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
LCYB-PRO-GW-F	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcCTGCTTCTTGTGTGTACG
LCYB-PRO-GW-R	ggggaccacttgtacaagaagctgggtcCAATTTTGGCATGTTCTTAG
<i>OfLCYB</i> -qF	GAAAGGAGACGCCAAAGGGAG
<i>OfLCYB</i> -qR	GGAAGAAATAGCCGAGATGATAAGA

说明：小写字母表示部分 *attB* 序列。

1.2.2 B2 亚组 *OfERFs* 生物信息学分析 使用天根公司 RNA perp Pure Plant Kit 试剂盒，根据产品说明提取‘堰虹桂’不同时期的花瓣 RNA。随后用紫外分光光度计和质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 浓度和质量。按照 PrimeScript™ RT Master Mix 说明书将检验合格的盛花期 RNA 进行反转录。

应用 Prot-Param 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测所编码蛋白的分子量、理论等电点、不稳定系数等；采用 MEGAX 软件中的邻位相邻法 (NJ) 进行同源聚类，建立系统发育树，并采用 Bootstrap 法 (重复 1 000 次) 评估检测系统进化树。运用 DNAMAN 7.0 对 4 个 *OfERF* 基因推测所得的序列进行多序列比对分析。

1.2.3 B2 亚组 *OfERFs* 表达分析 以‘堰虹桂’不同时期的花瓣 cDNA 为模板，以筛选得到的桂花 B2 亚组 *OfERFs* 序列设计引物，以桂花 *OfACT* 为内参基因。分析方法参照 1.2.1。引物序列见表 2。

表 2 *OfERFs* 基因 RT-qPCR 引物序列

Table 2 RT-qPCR primer sequences of *OfERFs*

引物名称	引物序列(5'→3')	引物名称	引物序列(5'→3')
<i>OfERF73a</i> -qF	CTGAAGAGAAACCGCCAACAA	<i>OfERF72a</i> -qR	GGGTAGTAAACTTCTTGTGCTGCGTA
<i>OfERF73a</i> -qR	TTAACGCCATCAGAAGACACAAGT	<i>OfERF72b</i> -qF	CAAATATCCTATGTTCAGAGG
<i>OfERF73b</i> -qF	AATTGGGATGCCGCCTCA	<i>OfERF72b</i> -qR	ATAGCATACCATAACATACCA
<i>OfERF73b</i> -qR	TTAAATCCCACCAACATAGCACT	<i>OfACT</i> -qF	CCCAAGGCAAACAGAGAAAAAAT
<i>OfERF72a</i> -qF	CCAACCCACCGGCTC	<i>OfACT</i> -qR	ACCCCATCACCAGAATCAAGAA

1.2.4 *OfERFs* 与 *OfLCYB* 启动子酵母互作验证 通过 Gateway 方法构建 pAbAi-*OfLCYB*-pro 载体，之后利用限制性内切酶 *Bst*B I 线性化质粒 pAbAi-*OfLCYB*-pro、阳性对照 p53-AbAi 以及阴性对照 pAbAi 载体。按照 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 User Manual 产品说明制备酵母感受态，并将线性化的质粒转入感受态细胞中，涂布于尿嘧啶缺陷培养基 (SD/-Ura) 酵母板筛选培养基上，28 °C 倒置培养 2~3 d。挑取单菌落扩大培养，提取酵母 DNA。以粗提酵母 DNA 为模板，进行 PCR 检验。用质量分数为 0.9% 的无菌氯化钠溶液稀释菌液， $D(600)=0.002$  时，均匀涂布于金担子素 A (AbA) 不同浓度的 SD/-Ura 固体培养基上，倒置于 28 °C 培养箱内培养 2~3 d，以检测 AbAr 基因本底表达水平。将 pGADT7-*OfERF72a*、pGADT7-*OfERF72b*、pGADT7-*OfERF73a*、pGADT7-*OfERF73b* 和 pGADT7-53、pGADT7 分别转入诱饵菌株 pAbAi-*OfLCYB*-pro 和阳性对照 p53-AbAi、阴性对照 pAbAi 的酵母感受态细胞，悬浮液均匀涂布于 SD/-Leu 缺陷培养基上，倒置于 30 °C 培养箱内培养 3~5 d，再将长出的单菌落分别在亮氨酸

缺陷培养基 (SD/-Leu) 与含 300 μg·L<sup>-1</sup> 的亮氨酸缺陷培养基 [SD/-Leu/AbA(300 μg·L<sup>-1</sup>)] 点斑检测其互作情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 *OFLCYB* 启动子序列分析及表达分析

由图 1 可见：桂花 *OFLCYB* 基因启动子序列含有 2 个 ATCTA 顺式作用元件。

通过荧光定量检测 ‘堰虹桂’ 不同发育时期花瓣中 *OFLCYB* 的表达水平 (图 2)，发现 *OFLCYB* 的表达量从顶壳期到盛开期逐渐升高，在盛开期表达量最高。

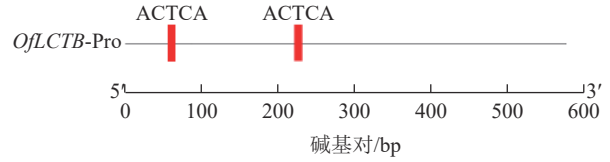
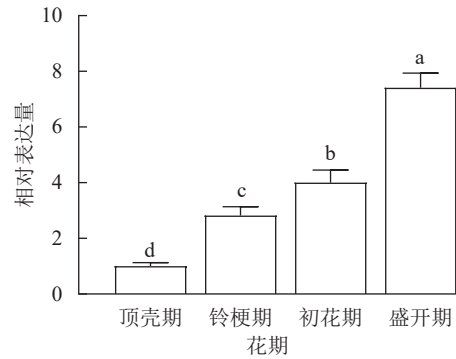


图 1 *OFLCYB* 启动子的 ATCTA 顺式作用元件分析  
Figure 1 Analysis of ATCTA *cis*-acting elements of the *OFLCYB* promoter

### 2.2 B2 亚组 OfERFs 生物信息学分析

通过对桂花转录组数据库分析，筛选获得 4 个 B2 亚组 ERF 有关的 Unigene 序列。利用 MEGAX 软件对 4 个桂花 OfERFs 氨基酸全长和拟南芥 ERF 家族的 122 个成员的氨基酸序列构建系统进化树，结果显示：4 个桂花 OfERFs 与 5 个拟南芥 ERF 序列聚集在 B2 亚组 (图 3)。其中 CL2088.Contig2 和 CL2088.Contig3 聚为一小支，与拟南芥 At3g16770.1 (AtERF72) 的关系最为接近，将 CL2088.Contig2 和 CL2088.Contig3 分别命名为 OfERF72a 和 OfERF72b。此外，CL550.Contig3、Unigene4342 与拟南芥 At1g72360.2 (AtERF73) 关系较近，将 CL550.Contig3 和 Unigene4342 分别命名为 OfERF73a 和 OfERF73b。



不同字母表示不同花期差异显著 (P0.05)。

图 2 *OFLCYB* 在 ‘堰虹桂’ 不同花期的表达  
Figure 2 Expression of *OFLCYB* at different flowering stages in *O. fragrans* ‘Yanhong Gui’

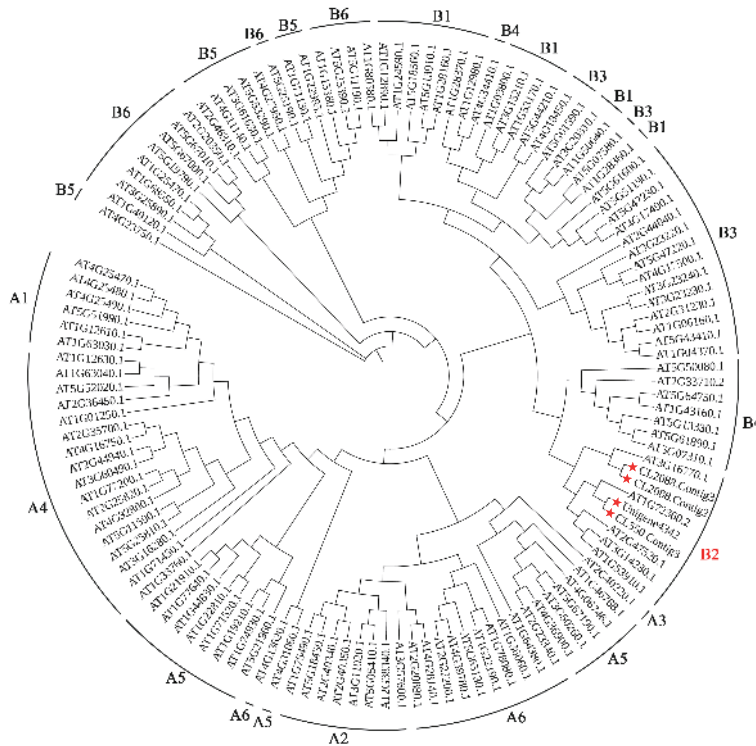


图 3 桂花 B2 亚组 OfERFs 系统发育分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of OfERFs in subgroup B2 of *O. fragrans*

多序列比对分析发现 (图 4)：4 个 *Oferf* 基因均包含 1 个 AP2 保守结构域。4 个 *Oferf*s 蛋白序列的基本理化性质 (表 3) 分析发现：*Oferf72a* 基因的氨基酸数目为 232 个，分子量为 26 144 Da；*Oferf72b* 基因的氨基酸数目为 228 个，分子量为 25 841 Da；*Oferf73a* 基因的氨基酸数目为 386 个，分子量为 43 632 Da；*Oferf73b* 基因的氨基酸数目为 375 个，分子量为 41 607 Da。4 个 *Oferf* 的理论等电点为 4.63~5.33，均属于偏酸性蛋白质；总平均亲水指数均为负值，都属于亲水性蛋白。*Oferf72a*、*Oferf72b*、*Oferf73a* 不稳定系数分别为 43.67、54.42、43.21，判断为不稳定的蛋白质；*Oferf73b* 不稳定系数为 38.40，判断为稳定的蛋白质。

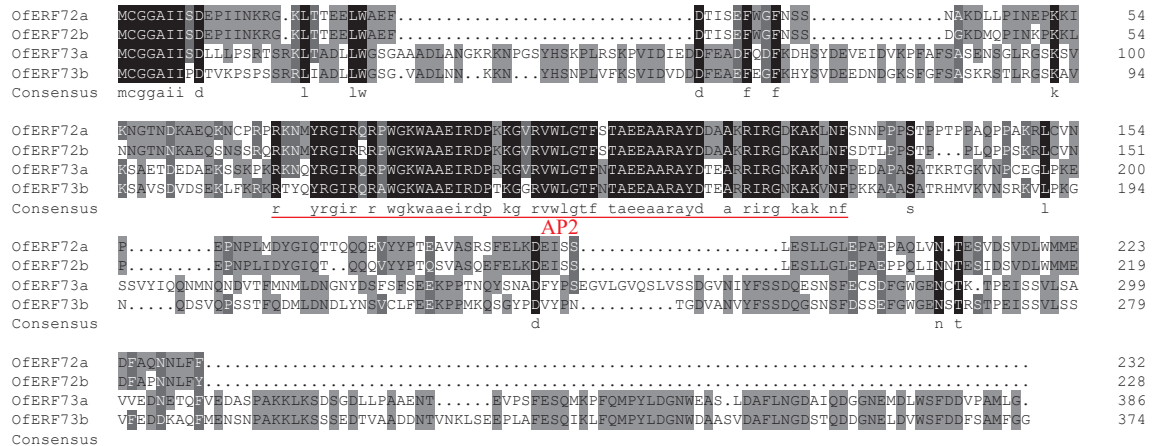


图 4 B2 亚组 OfERFs 氨基酸序列比对分析

Figure 4 Amino acid multiple sequence alignment analysis of OfERFs of subgroup B2

表 3 B2 亚组 OfERFs 基本理化性质分析

Table 3 Analysis of basic physicochemical properties OfERFs of subgroup B2

基因名称	氨基酸数量/个	分子量/Da	理论等电点	不稳定系数	总平均亲水指数
<i>Oferf72a</i>	232	26 144	5.33	43.67	-0.744
<i>Oferf72b</i>	228	25 841	5.30	54.42	-0.796
<i>Oferf73a</i>	386	43 632	4.63	43.21	-0.739
<i>Oferf73b</i>	375	41 607	5.01	38.40	-0.710

### 2.3 B2 亚组 *Oferf*s 表达分析

利用 RT-qPCR 技术分析 ‘堰虹桂’ 不同发育时期花瓣中 *Oferf72a*、*Oferf72b*、*Oferf73a* 与 *Oferf73b* 相对表达量 (图 5) 发现：从顶壳期到盛花期，*Oferf72a*、*Oferf72b* 的相对表达量基本呈现逐渐下降的趋势，*Oferf73a* 的相对表达量在顶壳期、铃梗期与盛花期之间差异较小，在初花期相对表达量略有下降。*Oferf73b* 的相对表达量在顶壳期、铃梗期较高，随后在初花期相对表达量显著下降 ( $P < 0.05$ )。

为了验证 *Oferf*s 与 *Oflcyb* 之间的关系，用  $y$  表示 *Oferf*s 的相对表达量取以 10 为底的对数，用  $x$  表示 *Oflcyb* 相对表达量取以 10 为底的对数进行相关性分析 (图 6)。其中，*Oferf72a* 直线回归方程为  $y = -0.9876x - 0.0100$ ，决定系数 ( $R^2$ ) 为 0.9336， $P = 0.0338$ ；*Oferf72b* 直线回归方程为  $y = -1.2080x - 0.0779$ ， $R^2 = 0.9416$ ， $P = 0.0296$ 。*Oflcyb* 的表达水平与 *Oferf72a*、*Oferf72b* 呈显著负相关。

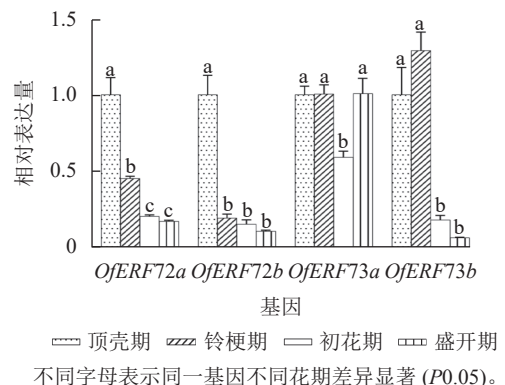
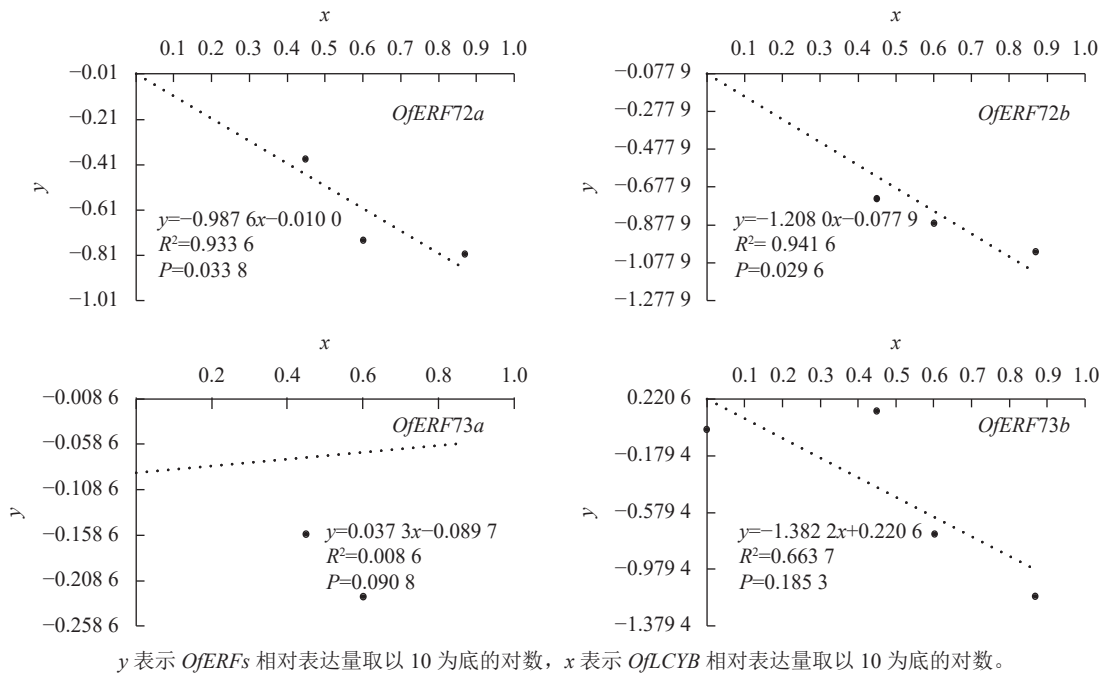


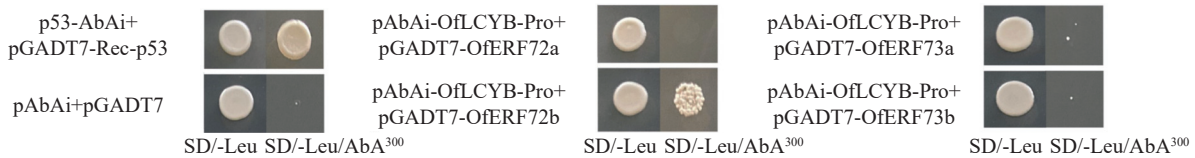
图 5 B2 亚组 *Oferf* 在 ‘堰虹桂’ 不同花期的表达

Figure 5 Expression of *Oferf* genes of subgroup B2 at different flowering stages in *O. fragrans* ‘Yanhong Gui’

图 6 *OfERFs* 与 *OfLCYB* 相对表达量的相关性分析Figure 6 Correlation analysis of relative expression levels of *OfERFs* with *OfLCYB*

#### 2.4 酵母单杂交分析 B2 亚组 *OfERFs* 与 *OfLCYB* 启动子互作

为了探究 B2 亚组 *OfERFs* 与 *OfLCYB* 启动子之间是否存在物理互作, 同时将阴性对照 pAbAi+pGADT7、阳性对照 p53-AbAi+pGADT7-Rec-p53 以及实验组 pAbAi-*OfLCYB*-Pro+AD-*OfERF* 分别接种于 SD/-Leu 与 SD/-Leu/AbA ( $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的酵母培养基上, 于  $30^\circ\text{C}$  倒置培养 3~5 d。结果发现 (图 7): 在 SD/-Leu 培养基上, 酵母均能正常生长, 而在 SD/-Leu/AbA ( $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 培养基上, 只有阳性对照与 pAbAi-*OfLCYB*-Pro+AD-*OfERF72b* 正常生长, 其余酵母菌均不能生长, 表明 *OfERF72b* 可以与 *OfLCYB* 启动子物理结合。

图 7 *OfERF* 蛋白与 *OfLCYB* 启动子互作验证Figure 7 Verification of physical interaction between *OfERF* proteins and *OfLCYB* promoter

### 3 讨论

本研究得到 4 个桂花 ‘堰虹桂’ B2 亚组的 *OfERF* 基因, 编码区长度为 687~1 161 bp, 编码 228~386 个氨基酸残基。拟南芥 B2 亚组 ERF At1g53910.1、At1g72360.2、At2g47520.1、At3g14230.1 以及 At3g16770.1 分别编码 358、262、171、397 和 248 个氨基酸残基<sup>[15]</sup>。牡丹 *Paeonia suffruticosa* ERF 家族中 B2 亚组基因 *PsERF1* 编码区长度为 1 158 bp, 编码 385 个氨基酸残基<sup>[19]</sup>。在番木瓜 *Carica papaya* 中, 属于 B2 亚组的基因 *CpERF4*、*CpERF6*、*CpERF9* 则分别编码 431、253、234 个氨基酸残基<sup>[20]</sup>。而在番茄 ERF 中, 其 B2 亚组的 *SlERF6*、*SlERF.E.1*、*SlERF90*、*SlERF91*、*SlERF.A.3* 分别编码 255、260、386、1 454 和 372 个氨基酸残基<sup>[21]</sup>。由此可以发现: 同一物种 B2 亚组 ERF 基因编码不同长度的氨基酸序列, 推测其不同成员的功能存在差异。

对 4 个桂花 *OfERF* 基因的氨基酸序列进行系统进化分析, 发现 *OfERF* 与拟南芥 B2 亚组 ERF 聚集在一起, 说明它们的同源性较高。其中 2 个基因与 At3g16770.1 (AtERF72/AtRAP2.3) 聚为一支, 2 个基因与 At1g72360.2 (AtERF73/AtRAP2.2) 聚为另一小支。据此将 4 个 *OfERF* 基因分别命名 *OfERF72a* 与

*OfERF72b*、*OfERF73a* 与 *OfERF73b*。桂花 *OfERF72* 与 *OfERF73* 均存在 2 个拷贝，说明桂花 *OfERF* 基因家族成员在进化和扩张过程中基因重复事件有着紧密联系。在拟南芥中，*AtERF72* 能够与缺铁反应基因 *IRT1*、*HA2* 和 *CLH1* 的启动子区域结合，负调控拟南芥的缺铁响应。与野生型植株相比，*AtERF72* 突变体中铁和镁质量分数显著增加<sup>[22]</sup>。*AtRAP2.3* 的同源基因 *SlERF6* 被证实是番茄中类胡萝卜素合成的负调控因子<sup>[13]</sup>。此外，在苹果中也有研究证明：*AtRAP2.3* 的同源基因 *AP2D15* 可以负调控苹果 *PSY1* 和 *PSY2* 基因启动子序列中的 ATCTA 顺式作用元件<sup>[14]</sup>。拟南芥 *AtRAP2.2* 可以结合到拟南芥 *AtPSY* 启动子和 *AtPDS* 启动子的 ATCTA 元件上调控基因的表达，过表达 *AtRAP2.2* 后导致植物体内类胡萝卜素降低<sup>[15]</sup>。

桂花花瓣中主要类胡萝卜素为  $\beta$ -胡萝卜素，其生物合成由 *OFLCYB* 直接催化生成，是桂花花瓣中类胡萝卜素代谢的重要催化酶<sup>[23]</sup>。*OFLCYB* 基因启动子中存在 2 个 ATCTA 顺式作用元件，推测其响应 B2 亚组 ERF 转录因子的调控。*AtRAP2.2* 蛋白可以结合到拟南芥 *AtPSY* 启动子和 *AtPDS* 启动子的 ATCTA 元件上，从而调控相关基因的表达<sup>[15]</sup>。在苹果 *MdPSY1* 和 *MdPSY2* 基因启动子中也存在多个 ATCTA 顺式作用元件，能被 *AtRAP2.3* 的同源基因蛋白 *AP2D15* 强烈激活表达<sup>[14]</sup>。进一步研究发现：*OfERF72a* 和 *OfERF72b* 的表达趋势与 *OFLCYB* 基因呈显著负相关。酵母单杂交结果表明：*OfERF72b* 与 *OFLCYB* 启动子存在物理结合，表明 B2 亚组的 *OfERF72b* 可能通过结合 *OFLCYB* 基因启动子 ATCTA 顺式作用元件调控其表达。ATCTA 元件也存在于桂花 *OfPSY*<sup>[24]</sup> 和 *OfCCD1*<sup>[25]</sup> 等其他类胡萝卜素代谢基因的启动子上，其是否响应 B2 亚组的 ERF 转录因子的调控需要进一步研究。

## 4 结论

本研究基于桂花‘堰虹桂’转录组数据筛选了 4 个 *OfERF* 基因，*OfERF72a* 与 *OfERF72b* 基因表达量均随着开花进程逐渐下降，与 *OFLCYB* 基因的表达量显著负相关。*OFLCYB* 基因启动子含有 2 个 ATCTA 顺式作用元件，*OfERF72b* 与 *OFLCYB* 启动子之间存在互作，表明 *OfERF72b* 可能参与调控 *OFLCYB* 的表达。

## 5 参考文献

- [1] WANG Yiguang, ZHANG Chao, DONG Bin, *et al.* Carotenoid accumulation and its contribution to flower coloration of *Osmanthus fragrans* [J/OL]. *Frontiers Plant Science*, 2018, **9**: 1499 [2024-03-25]. doi: 10.3389/fpls.2018.01499.
- [2] MARHUENDA-MUÑOZ M, HURTADO-BARROSO S, TRESSERRA-RIMBAU A, *et al.* A review of factors that affect carotenoid concentrations in human plasma: differences between Mediterranean and Northern diets [J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2019, **72**(2): 18 – 25.
- [3] BALDERMANN S, KATO M, KUROSAWA M, *et al.* Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, **61**(11): 2967 – 2977.
- [4] BALDERMANN S, KATO M, FLEISCHMANN P, *et al.* Biosynthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -ionone, prominent scent compounds, in flowers of *Osmanthus fragrans* [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, **59**(1): 79 – 81.
- [5] HAN Yuanji, WANG Xiaohui, CHEN Weicai, *et al.* Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans* [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, **10**: 329 – 338.
- [6] YUAN Hui, ZHANG Junxiang, NAGESWARAN D, *et al.* Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops [J/OL]. *Horticulture Research*, 2015, **2**(1): 15036 [2024-03-25]. doi: 10.1038/hortres.2015.36.
- [7] NISAR N, LI Li, LU Shan, *et al.* Carotenoid metabolism in plants [J]. *Molecular Plant*, 2015, **8**(1): 68 – 82.
- [8] 沈子义, 张超, 董彬, 等. 桂花 *OFLCYB* 和 *OFLCYE* 启动子的克隆和活性分析 [J]. 生物技术通报, 2018, **34**(1): 137 – 143. SHEN Ziyu, ZHANG Chao, DONG Bin, *et al.* Cloning and expression analysis of the promoters of *OFLCYB* and *OFLCYE* in *Osmanthus fragrans* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, **34**(1): 137 – 143.
- [9] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, *et al.* Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(2): 411 – 432.
- [10] SAGAWA J M, STANLEY L E, LAFOUNTAIN A M, *et al.* An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in *Mimulus lewisii* flowers [J]. *New Phytologist*, 2015, **209**(3): 1049 – 1057.

- [11] FU Changchun, HAN Yanchao, FAN Zhongqi, *et al.* The papaya transcription factor CpNAC1 modulates carotenoid biosynthesis through activating phytoene desaturase genes *CpPDS2/4* during fruit ripening [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2016, **64**(27): 5454 – 5463.
- [12] HAO Dongyun, OHME-TAKAGI M, SARAI A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(41): 26857 – 26861.
- [13] LEE J M, JOUNG J G, MCQUINN R, *et al.* Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation [J]. *The Plant Journal*, 2012, **70**(2): 191 – 204.
- [14] AMPOMAH-DWAMENA C, DRIEDONKS N, LEWIS D, *et al.* The phytoene synthase gene family of apple (*Malus domestica*) and its role in controlling fruit carotenoid content [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2015, **15**: 185 [2024-03-25]. doi: [10.1186/s12870-015-0573-7](https://doi.org/10.1186/s12870-015-0573-7).
- [15] WELSCH R, MAASS D, VOEGEL T, *et al.* Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves [J]. *Plant Physiology*, 2007, **145**(3): 1073 – 1085.
- [16] 杨青杰. 黄龙胆类胡萝卜生物合成基因启动子的功能分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2013.  
YANG Qingjie. *Functional Characterization of the Gentiana lutea Carotenoid Biosynthesis Gene Promoters* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2013.
- [17] ZHANG Chao, WANG Yiguang, FU Jianxin, *et al.* Transcriptomic analysis and carotenogenic gene expression related to petal coloration in *Osmanthus fragrans* ‘Yanhong Gui’ [J]. *Trees*, 2016, **30**: 1207 – 1223.
- [18] ZHANG Chao, FU Jianxin, WANG Yiguang, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in the quantitative real-time PCR analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour. ) [J/OL]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0136355 [2024-03-25]. doi: [10.1371/journal.pone.0136355](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136355).
- [19] 吴凡, 张超, 郭加, 等. 牡丹切花 ERF 转录因子基因的分离与表达分析[J]. 园艺学报, 2016, **43**(1): 109 – 120.  
WU Fan, ZHANG Chao, GUO Jia, *et al.* Isolation and expression analysis of ERF transcription factor genes in tree peony cut flowers [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(1): 109 – 120.
- [20] 陈永萍, 高峰, 申艳红, 等. 番木瓜 ERF 家族与果实成熟相关成员的分析[J]. 园艺学报, 2019, **46**(2): 252 – 264.  
CHEN Yongping, GAO Feng, SHEN Yanhong, *et al.* The analysis of ERFs related to fruit ripening in papaya [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, **46**(2): 252 – 264.
- [21] 徐志璇. 番茄 AP2/ERF 超家族重鉴定及 SIERF. D. 3 基因的功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.  
XU Zhixuan. *Reidentification of Tomato AP2/ERF Transcription Factor Superfamily and Functional Analysis of SIERF. D. 3* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020.
- [22] LIU Wei, LI Qiwei, WANG Yi, *et al.* Ethylene response factor AtERF72 negatively regulates *Arabidopsis thaliana* response to iron deficiency [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, **491**(3): 862 – 868.
- [23] QING Hongshen, CHEN Jiahong, JIANG Lingli, *et al.* Functional characterization of two lycopene cyclases from sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) [J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2022, **299**: 11062 [2024-03-25]. doi: [10.1016/j.scienta.2022.111062](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111062).
- [24] 周俊杰, 王艺光, 董彬, 等. 桂花 *OfPSY*、*OfPDS* 和 *OfHYB* 基因启动子克隆及表达特性分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2023, **40**(1): 64 – 71.  
ZHOU Junjie, WANG Yiguang, DONG Bin, *et al.* Cloning and expression characterization of *OfPSY*, *OfPDS* and *OfHYB* gene promoters in *Osmanthus fragrans* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, **40**(1): 64 – 71.
- [25] 刘玉成, 王艺光, 张超, 等. 桂花 *OfCCD1* 基因启动子克隆与表达特性 [J]. 浙江农林大学学报, 2018, **35**(4): 596 – 603.  
LIU Yucheng, WANG Yiguang, ZHANG Chao, *et al.* Cloning and transient expression assay of *OfCCD1* gene promoters from *Osmanthus fragrans* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2018, **35**(4): 596 – 603.