

引用格式: 武金月, 李雪, 王月鑫, 等. 梅花 *PmERF011* 转录因子克隆与功能验证[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(X): 1–10.
WU Jinyue, LI Xue, WANG Yuexin, et al. Cloning and functional validation of the transcription factor *PmERF011* in *Prunus mume*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 42(X): 1–10.

梅花 *PmERF011* 转录因子克隆与功能验证

武金月, 李雪, 王月鑫, 张启翔, 郑唐春

(北京林业大学 园林学院/花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室/国家花卉工程技术研究中心/城乡生态环境
北京实验室/园林环境教育部工程研究中心, 北京 100083)

摘要: 【目的】揭示梅花 *Prunus mume* 株型性状形成的分子机制, 明确 AP2/ERF 转录因子家族在梅花分枝调控中的作用, 以为梅花株型改良提供理论依据和候选基因。【方法】通过基因克隆技术获得 *PmERF011* 基因序列, 采用生物信息学方法分析其系统进化关系及启动子顺式作用元件; 利用实时荧光定量 PCR 检测该基因在梅花不同组织 (根、茎、叶) 中的时空表达模式; 构建过表达载体并转化拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, 通过表型观察和统计分析验证其转基因功能。【结果】*PmERF011* 属于 AP2/ERF 转录因子家族, 与蔷薇科 Rosaceae 近缘物种 (桃 *P. persica*、杏 *P. armeniaca*) 高度同源, 但与拟南芥、水稻 *Oryza sativa* 等差异显著; 启动子顺式作用元件分析发现: *PmERF011* 含茉莉酸甲酯与生长素响应元件; 组织特异性检测结果显示: *PmERF011* 在根与茎木质部中表达量最高, 叶片中表达量较低。转基因拟南芥结果表明: 过表达 *PmERF011* 显著增加了拟南芥侧枝数量 ($P < 0.05$)。【结论】*PmERF011* 具有促进分枝增多的功能, 是梅花和李属 *Prunus* 植物株型改良的候选基因。图 7 表 2 参 46

关键词: AP2/ERF; *PmERF011*; 梅花; 株型; 转录因子

中图分类号: S722; S685.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)00-0001-10

Cloning and functional validation of the transcription factor *PmERF011* in *Prunus mume*

WU Jinyue, LI Xue, WANG Yuexin, ZHANG Qixiang, ZHENG Tangchun

(School of Landscape Architecture/Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding/National Engineering Research Center for Floriculture/Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment/Engineering Research Center of Landscape Environment Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] This study aims to reveal the molecular mechanism of plant architecture in *Prunus mume* and clarify the role of AP2/ERF transcription factor family in branching regulation, so as to provide theoretical basis and candidate genes for the improvement of plant architecture in *P. mume*. [Method] *PmERF011* gene sequence was obtained via gene cloning technology, and bioinformatics methods were employed to analyze its phylogenetic relationship and promoter cis-acting elements. The spatiotemporal expression patterns of *PmERF011* in different tissues (roots, stems, and leaves) of *P. mume* were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). An overexpression vector was constructed and transformed into *Arabidopsis thaliana*, followed by phenotypic observation and statistical analysis to verify its transgenic function. [Result] *PmERF011* belonged to the AP2/ERF transcription factor family, which was highly

收稿日期: 2025-07-05; 修回日期: 2025-08-31

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (QNTD202503); 云南省科技人才与平台计划 (202405AF140078); 国家自然科学基金资助项目 (32371947)

作者简介: 武金月 (ORCID: 0009-0000-8790-4093), 从事观赏植物分子生物学研究。E-mail: wujinyue2024@163.com。通信作者: 郑唐春 (ORCID: 0000-0001-8612-7659), 副教授, 从事观赏植物育种研究。E-mail: zhengtangchun@bjfu.edu.cn

homologous to related species in Rosaceae family (*P. persica* and *P. armeniaca*), but significantly different from *A. thaliana* and *Oryza sativa*. The analysis of promoter cis-acting elements revealed that it contained methyl jasmonate and auxin response elements. The results of tissue-specific assay showed that *PmERF011* had the highest expression level in roots and stem xylem, but lower expression level in leaves. The results of transgenic *Arabidopsis* showed that overexpression of *PmERF011* significantly increased the number of lateral branches in *Arabidopsis* ($P < 0.05$). [Conclusion] *PmERF011* has the function of promoting branch growth, which is candidate genes for the improvement of plant architecture in *P. mume* and other *Prunus* species. [Ch, 7 fig. 2 tab. 46 ref.]

Key words: AP2/ERF; *PmERF011*; *Prunus mume*; plant architecture; transcription factor

梅花 *Prunus mume* 为蔷薇科 Rosaceae 李属 *Prunus* 落叶乔木, 其独特的观赏特性与深厚的文化内涵使它成为重要的景观树种^[1]。在观赏树木评价体系中, 树体构型与枝姿形态特征两者与花器官具有同等重要的观赏价值^[2]。树形结构的形成与分枝特性密切相关^[3]。然而, 目前关于梅花分枝性状的遗传调控机制仍不清晰, 这限制了梅花品种改良与应用的进程。

植物分枝作为决定株型建成的关键因素, 其腋芽发育过程表现出显著的表型可塑性^[4]。腋芽的激活受多层级网络调控^[5], 涉及内源激素信号通路、遗传调控模块与环境因子的协同互作^[6]。现有研究表明: 生长素^[7]、细胞分裂素^[8]和独脚金内酯^[9]构成调控腋芽激活的核心激素调控系统, 同时受光照强度^[10]、营养状况^[11]、水分条件^[12]、温度波动^[13]及生物胁迫^[14]等环境信号的显著调节。植物分枝形成的分子调控机制十分复杂, 近年来已经确定了几个调节腋芽分枝的转录因子, 其中 *BRC1*^[15]、*BRC2*^[16]、*MYB2*^[17]、*TB1*^[18]、*SPL*^[19] 在腋芽生长和分枝中起抑制作用, *NAC*^[20]、*WOX*^[21]、*WRKY*^[22] 刺激腋芽形成并促进分枝。

AP2/ERF 是植物中广泛存在的一类转录因子超家族, 该家族蛋白含有 AP2/ERF 结构域, 第 1 个 AP2 基因是在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中被发现的^[23]。根据 AP2/ERF 类转录因子结构域的数量及结合序列, 将其分为 5 个亚家族: AP2、ERF、DREB、RAV 和 Soloist^[24], 各亚家族呈现显著的功能分化。AP2/ERF 家族主要在植物抵御寒冷^[25]、干旱^[26]、盐碱^[27]、高温^[28] 等非生物胁迫以及生物胁迫^[29] 等方面发挥重要作用, 同时在植物生长发育调控方面的作用也正在被挖掘。例如水稻 *Oryza sativa* *DSP* 基因调控分蘖和穗型发育^[30], *OsEATB* 影响植株高度和穗长^[31]。杨树 *Populus trichocarpa* *PtAIL1* 促进不定根发生^[32]。此外, AP2/ERF 成员通过整合激素与代谢信号调控芽器官发育。卷丹 *Lilium lancifolium* *LIERF12* 通过感知乙烯信号调控珠芽形成^[33]。烟草 *Nicotiana tabacum* *NtESR2* 则通过维持生长素运输稳态保障叶芽形态建成^[34]。拟南芥 *EBE* 基因通过调控细胞增殖影响腋芽发育和芽分枝^[35]。黑杨 *P. nigra* *PnANTL1* 和 *PnANTL2* 刺激细胞扩增使叶长增加^[36]; *ERF114* 在欧洲油菜 *Brassica napus* 中通过重塑顶端生长素梯度增加分枝数^[37]; *ERF115* 则通过茉莉酸-细胞分裂素信号互作抑制拟南芥不定根发生^[38], *ERF109* 在拟南芥中由损伤诱导调节根再生^[39], 表明该家族在分生组织调控中的功能多样性。上述研究阐释了 AP2/ERF 转录因子通过时空特异性调控激素网络、代谢通路及分生组织活性从而协调植物发育可塑性的分子机制。

梅花作为重要的早春木本观赏植物, 以直枝类为主, 垂枝类和龙游类品种极少, 因此株型是梅花育种的重要方向。AP2/ERF 转录因子家族在植物分枝调控中具有重要作用, 前期研究在梅花中鉴定出了 116 个 AP2/ERF 家族成员, 细分为 3 个家族 (AP2、ERF 和 RAV) 及 1 个单独成员 Soloist, *PmERF011* 属于 ERF 家族的成员之一^[40]。在其他物种中的同源基因被发现参与植物生长发育, 但梅花 *PmERF011* 的生物学功能仍不清楚。为此, 本研究克隆了梅花 *PmERF011* 基因并进行基因时空表达模式、转基因功能验证分析, 以明确它在梅花分枝调控中的作用。

1 材料与方法

1.1 植物材料

梅花 ‘早绿萼’ ‘Zao Lve’ 1 年生枝条取自北京林业大学温室; 用于 RNA 提取的茎段、叶片等材

料经液氮速冻后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。野生型拟南芥(Col-0)和 pCAMBIA2300 载体由北京林业大学园林学院花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室保存。

1.2 研究方法

1.2.1 *PmERF011* 生物信息学分析 通过龙游梅基因组获取 *PmERF011* 的核酸和蛋白序列(<https://www.rosaceae.org/Analysis/13114608>)；通过 ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam/>) 网站分析其分子量 [molecular mass(kDa)]、氨基酸长度 [length(aa)]、理论等电点 (isoelectric point)、不稳定指数 (instabilty index) 和亲水指数 (grand average of hydropathicity) 等，并利用 Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线分析工具对 *PmERF011* 转录因子进行亚细胞定位预测。通过 Sopma(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构，观察 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲等的组成比例；利用 Swiss model(<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质三级结构。提取 *PmERF011* 上游 2 000 bp 作为启动子序列，利用在线软件 PlantCARE(<https://www.plantcare.co.uk/>) 对 *PmERF011* 启动子序列进行顺式作用元件的预测分析，进而推测目的基因主要功能。通过美国生物技术信息中心 (NCBI) 网站对 *PmERF011* 蛋白序列进行 Blast 操作，找到梅花近缘物种 ERF 家族中与 *PmERF011* 蛋白相近的序列，使用 ESPript 3.0(<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 软件将 *PmERF011* 蛋白序列与通过 NCBI-blast 操作得到的蛋白序列进行多重比对，确定相似区域和变异位点。同时使用 MEGA 7.0(<https://www.megasoftware.net/>) 软件构建系统发育树，生成算法采用邻接法 (neighbor-joining, NJ)。

1.2.2 梅花不同组织样品收集、RNA 提取和 cDNA 合成 为检测梅花 *PmERF011* 基因在不同组织的表达水平，选取长势健壮且一致的‘早绿萼’3 株，收集幼叶、成熟叶、老叶、根、树皮、木质部、形成层、韧皮部、嫩茎、半木质茎、完全木质茎 11 种组织材料，其中形成层组织分离方法：枝条剥去外层树皮后，在荧光体视显微镜 (Leica M165FC) 下，使用无菌解剖刀沿去皮木质部交界处轻轻刮取形成层薄壁细胞 (厚度为 0.2~0.5 mm)，尽量避免木质部组织污染。样品分离后立即置于液氮中速冻，确保 RNA 完整性。液氮速冻后分为 2 个部分：一部分送广州基迪奥生物科技有限公司利用 Illumina HiSeq 2500 进行转录组测序，另一部分保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 检测。利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441, 天根生物技术公司) 提取梅花上述 11 种组织总 RNA，并利用 NanoDrop-1000 测定样品 RNA 浓度和质量，进一步使用质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测样品 RNA 的完整性。参照 PrimeScript RT reagent Mix with gDNA Eraser 试剂盒操作流程将梅花总 RNA 反转录为 cDNA。

1.2.3 不同组织中 *PmERF011* 基因表达水平分析 根据转录组测序数据结果，使用 TBtools 绘制组织特异性表达热图。同时利用 IDT 在线软件 (<https://sg.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) 设计梅花 *PmERF011* 基因特异性引物 (表 1)。TB Green 嵌合荧光法用于 RT-qPCR。使用 PikoReal 系统 (Thermo Fisher Scientific) 进行 RT-qPCR 分析。反应体系为：TB Green Premix Ex Taq II(2 $\times$)10.0 μL ，上游引物 0.8 μL ，下游引物 0.8 μL ，cDNA 2.0 μL 和 ddH₂O 6.4 μL ；反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s；95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s，40 个循环；溶解曲线 60~95 $^{\circ}\text{C}$ 。选用梅花 *PmPP2A* 基因作为内参基因。实验采用 3 个生物学重复和 3 个技术重复，目的基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.2.4 引物设计与基因克隆 根据梅花参考基因组^[41]，获得 *PmERF011* 基因序列。利用在线软件 Primer Premier 5(<https://www.premierbiosoft.com/prim erdesign/>) 设计特异性克隆引物，送至北京擎科生物工程股份有限公司合成，引物序列见表 1。克隆模板为‘早绿萼’cDNA，使用 TaKaRa Prime Star Max 高保真酶进行 PCR 反应，琼脂糖凝胶电泳检验条带正确，使用购自天根生化科技有限公司 (北京) 的普通

表 1 引物序列

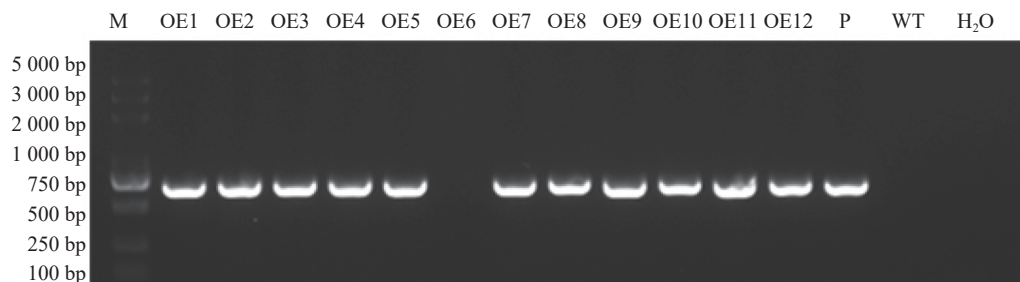
Table 1 Primer sequences

类别	序列(5'→3')	类别	序列(5'→3')
克隆正向引物	TGCTCTCAGGAATTGCAAGTG	RT-qPCR反向引物	TCTAATCTCAGCCACCCACTTC
克隆反向引物	TGAATCCTTGTCATCCTTGATGA	卡那霉素基因正向引物	AAGATGGATTGCACGCAGGT
RT-qPCR正向引物	AAACCAGCAGCAACAGCAAC	卡那霉素基因反向引物	TCACGGGTAGCCAACGCT

DNA产物纯化试剂盒 (DP 204) 对目的片段纯化回收。与 pTOPO 克隆载体连接, 转化至大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞。将感受态细胞涂布于含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 于 37 °C 恒温培养箱中倒置过夜培养。挑取阳性单菌落进行鉴定, 经菌落检测后送至北京擎科生物工程股份有限公司测序, 测序正确的菌株保存为 pTOPO-*PmERF011* 载体。

1.2.5 构建植物过表达载体 利用本课题组保存的 pCambia 2300 载体构建 *PmERF011* 过表达载体。用 TaKaRa 限制性内切酶 *Xba* I Quickcut、*Sac* I Quickcut 进行双酶切, 使其线性化。利用带有同源臂的克隆引物, 以 pTOPO-*PmERF011* 质粒作为模板, 进行 PCR 反应, 对产物进行分离纯化, 将双酶切线性化后的载体与 DNA 片段进行重组, 转化大肠埃希菌, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定。将阳性 PCR 菌液进行送测, 最后获得正确的重组质粒。采用液氮冻融法将测序成功的质粒转化至农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 感受态中, 进行菌液 PCR 检测, 将成功转化的农杆菌于 -80 °C 保存。

1.2.6 拟南芥转基因以及表型观察 将构建好的植物表达载体 pCambia2300-*PmERF011* 转入农杆菌 GV3101 感受态, 选取初花期拟南芥植株, 利用花序浸染法转化拟南芥。收集 T₀ 代种子后, 播种于含 50 μ g·mL⁻¹ 卡那霉素的 1/2 MS 培养基, 获得了 12 株抗性苗, 命名为 OE1~OE12, 10 d 后移栽至基质。取健壮植株叶片, 通过液氮研磨提取 DNA, 以 *PmERF011* 克隆引物和卡那霉素基因引物分别进行 PCR 鉴定阳性植株, 发现 OE6 为假阳性 (图 1)。后续结合 RT-qPCR 分析 *PmERF011* 基因表达量, 筛选出高表达转基因株系用于后续表型观察。比较 T₂ 代各株系与野生型 (WT) 的叶片数量和分支数量, 每株系至少测量 10 株, 计算平均值 $\pm$ 标准差, 与 WT 进行 *t* 检验 ($P < 0.05$)。



M. DL5000; OE1~OE12. 转基因株系; P. 阳性对照; WT. 野生型; H₂O. 空白对照。

图 1 *PmERF011* 转基因拟南芥阳性植株的 PCR 鉴定

Figure 1 PCR identification of positive *PmERF011* transgenic *Arabidopsis* plants

2 结果与分析

2.1 梅花 *PmERF011* 转录因子生物信息学分析

2.1.1 *PmERF011* 理化性质及亚细胞定位分析 通过 ExPASy 在线分析平台对 *PmERF011* 蛋白进行生物信息学预测, 结果表明: 该蛋白由 175 个氨基酸组成, 其理论分子质量为 19.844 kDa, 理论等电点为 9.39。氨基酸组成分析显示: 丝氨酸 (Ser, 11.4%) 与谷氨酰胺 (Gln, 8.6%) 为该蛋白的主要组成氨基酸。根据 Guruprasad 不稳定系数评估标准 (阈值 40), *PmERF011* 的不稳定指数为 58.88, 表明其属于不稳定蛋白。电荷特性分析发现: 该蛋白含 20 个带负电荷残基 [天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu)] 与 26 个带正电荷残基 [精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys)], 净电荷为 +6, 符合碱性蛋白特征。此外, 其总平均亲水性 (GRAVY 指数) 为 -1.107, 这证实 *PmERF011* 为典型亲水性蛋白。Cell-PLoc 2.0 在线分析工具进行亚细胞定位分析结果表明: *PmERF011* 位于细胞核和细胞质中。

2.1.2 *PmERF011* 蛋白结构分析 通过 NCBI 网站对 *PmERF011* 蛋白结构域分析, 发现 48~111 位氨基酸有 1 个 AP2/ERF 保守结构域。进一步利用 Sopma 在线网站预测其二级结构发现: α -螺旋与延伸链集中于 58~134 位氨基酸, 占比为 24%; 无规则卷曲结构分布其中及两侧, 占比最高约 76%。未预测到 β -转角及 β -折叠。基于 Swiss model 网站预测的蛋白质三级结构 (图 2) 可知: *PmERF011* 具有 3 个显著的 α -螺旋, 与二级结构预测结果一致, 进一步支持它为典型 AP2/ERF 家族成员。

2.1.3 *PmERF011* 启动子顺式元件预测 利用在线软件 PlantCARE 对 *PmERF011* 基因启动子的顺式作用

元件进行预测。除常见的启动子和增强子区域中核心的顺式作用元件 TATA-box、CAAT-box 外，启动子序列包含多个参与光反应、生长发育及厌氧诱导的元件；植物激素响应元件包括参与脱落酸反应及茉莉酸甲酯响应的元件 (表 2)。

2.1.4 *PmERF011* 与同源蛋白序列对比及进化分析 为探究 *PmERF011* 的进化关系及保守性，通过 NCBI-BLAST 对其与近缘物种的 ERF 家族蛋白进行同源性分析，涵盖杏 *Prunus armeniaca*、桃 *Prunus persica*、草莓 *Fragaria × ananassa*、毛白杨 *Populus trichocarpa*、欧洲甜樱桃 *Prunus avium*、枇杷 *Eriobotrya japonica*、西洋梨 *Pyrus communis*、苹果 *Malus domestica*、白梨 *Pyrus × bretschneideri*、尖齿黑莓 *Rubus argutus*、月季 *Rosa chinensis*、水稻、拟南芥、玉米 *Zea mays*、小麦 *Triticum aestivum* 共 15 个物种。同源序列比对结果显示：梅花 *PmERF011* 与桃、杏、欧洲甜樱桃的 ERF011 蛋白序列完全相同，表明蔷薇科李属内该基因高度保守，与拟南芥、水稻、草莓、毛白杨、水稻、枇杷、西洋梨、苹果、白梨、尖齿黑莓、月季、玉米、小麦蛋白序列的 AP2/ERF 结构域同源性较高 (图 3)。

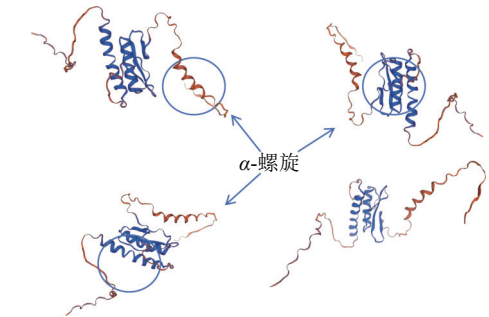


图 2 *PmERF011* 蛋白三级结构预测
Figure 2 Protein tertiary structure prediction of *PmERF011*

表 2 启动子顺式作用元件分析

Table 2 Analysis of promoter cis-acting elements

元件名称	核心序列	数量	生物学功能	元件名称	核心序列	数量	生物学功能
ABRE	ACGTG	1	参与脱落酸反应	GATA-motif	AAGGATAAGG	2	光响应元件的一部分
ARE	AAACCA	3	参与厌氧诱导	GC-motif	CCCCCG	1	参与缺氧特异性诱导
Box 4	ATTAAT	2	参与光反应	MRE	AACCTAA	1	MYB结合位点(参与光响应)
Box II	ACACGTAGA	1	光响应元件的一部分	O2-site	GATGACATGG	1	参与玉米蛋白代谢调控
CAT-box	GCCACT	1	参与分生组织表达	P-box	CCTTTTG	1	赤霉素响应元件
CGTCA-motif	CGTCA	1	参与茉莉酸甲酯响应	Sp1	GGGCGG	1	光响应元件的一部分
G-box	CACGAC	2	参与光反应	TGA-element	AACGAC	1	生长素响应元件
G-box	TAACACGTAG	1	参与光反应	TGACG-motif	TGACG	1	参与茉莉酸甲酯响应
G-box	TACGTG	1	参与光反应				

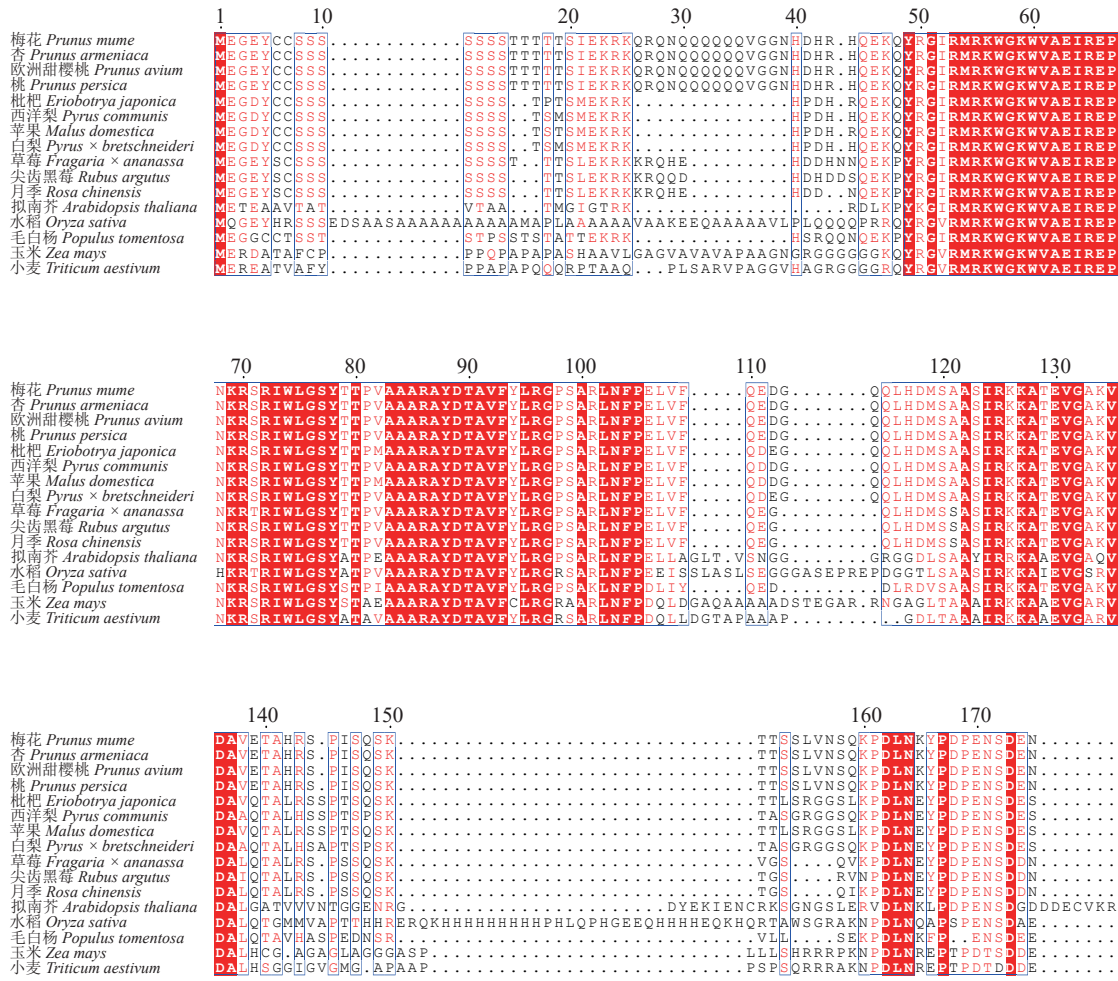
利用 MEGA 7.0 软件，采用邻接法构建 *PmERF011* 同源蛋白的多物种进化树，结果显示：*PmERF011* 与杏 ERF011 处于进化树的同一分支上，两者亲缘关系最为接近，次之的是欧洲甜樱桃和桃，证实了蔷薇科李属内该基因的高度保守性；而与其他蔷薇科属 (如草莓属 *Fragaria*、梨属 *Pyrus*、苹果属 *Malus* 等) 及非蔷薇科物种 (拟南芥、水稻、毛白杨等) 的 ERF011 蛋白亲缘关系较远，反映了该基因在长期进化过程中可能产生的科属特异性分化 (图 4)。

2.2 *PmERF011* 基因表达模式分析

转录组数据表达热图和 RT-qPCR 检测结果显示：*PmERF011* 基因在幼叶、成熟叶、老叶、根、树皮、木质部、形成层、韧皮部、嫩茎、半木质茎、完全木质茎 11 种组织中均有表达。值得注意的是，*PmERF011* 的表达水平存在显著的组织差异：在根和茎木质部中表达量最高，在嫩茎和茎韧皮部表达量次之，而在叶片中表达量最低 (图 5)。这种表达模式说明 *PmERF011* 主要参与根部发育和茎次生长相关的调控过程。

2.3 *PmERF011* 功能验证

2.3.1 *PmERF011* 转基因拟南芥的鉴定 去除假阳性苗，对获得的 11 个转基因拟南芥过表达株系进行 RT-qPCR 检测，以分析 *PmERF011* 基因的表达水平。结果表明：不同转基因株系间表达水平存在显著差异，其中 OE2 表达量最低，OE5、OE3、OE8 表达量较高 (图 6)。最终筛选出 OE3、OE5 和 OE8 这 3 个高表达株系用于后续表型观察。



数字表示氨基酸位点，蓝色框表示保守区域。

图3 PmERF011及其近缘物种蛋白同源序列对比分析

Figure 3 Comparison analysis of the protein homologous sequences of PmERF011 and its close relatives

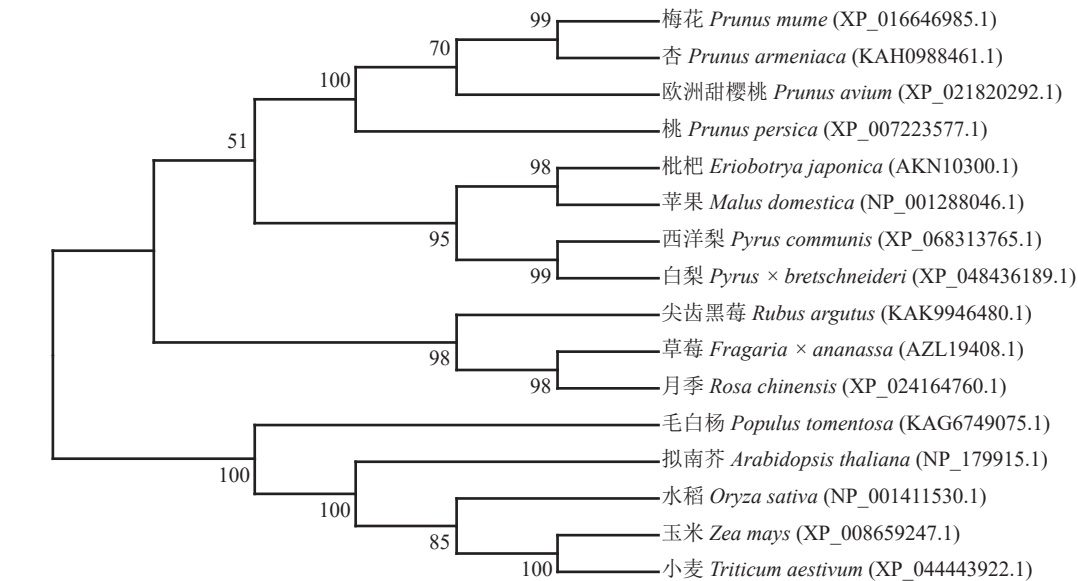
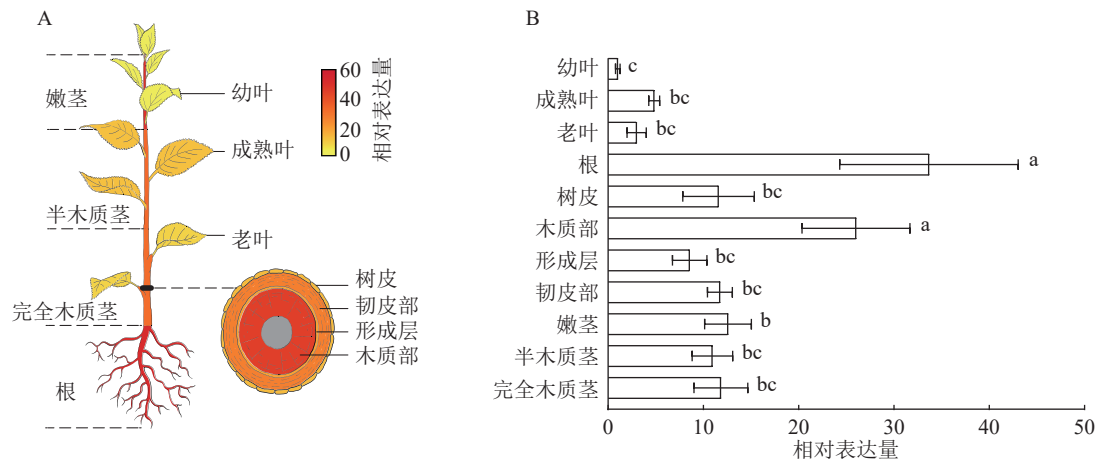


图4 PmERF011及其同源蛋白的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree for PmERF011 and its homologous proteins

2.3.2 *PmERF011* 过表达拟南芥表型观察 选择表达量高的 T_2 代 3 个株系 (OE3、OE5 和 OE8) 进行播种并观察表型。拟南芥幼苗移栽 40 d 后，野生型和过表达植株均进入花期。对比野生型和 *PmERF011* 转



A. *PmERF011* 基因在不同组织表达热图; B. *PmERF011* 基因在不同组织中的 RT-qPCR 结果。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 *PmERF011* 在不同组织中的表达模式分析

Figure 5 Expression pattern analysis of *PmERF011* in different tissues

基因植株的表型性状,发现转基因植株的分枝数量有所增加 (图 7 A、B)。统计结果表明:野生型和转基因株系拟南芥的叶片数量相近,没有显著差异 (图 7 C);野生型拟南芥的平均分枝数为 6.00 个,3 个 *PmERF011* 过表达株系的平均分枝数量分别为 15.00、13.33、14.00 个,差异显著 ($P < 0.05$, 图 7 D)。

3 讨论

植物的侧枝在形态建成中具有核心作用,其发育调控直接影响株型结构及生物量积累。然而,木本植物分枝的分子基础仍不清晰,尤其是 AP2/ERF 转

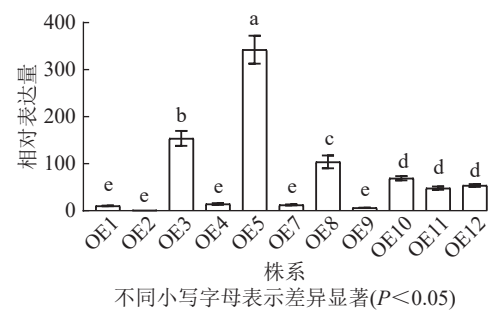
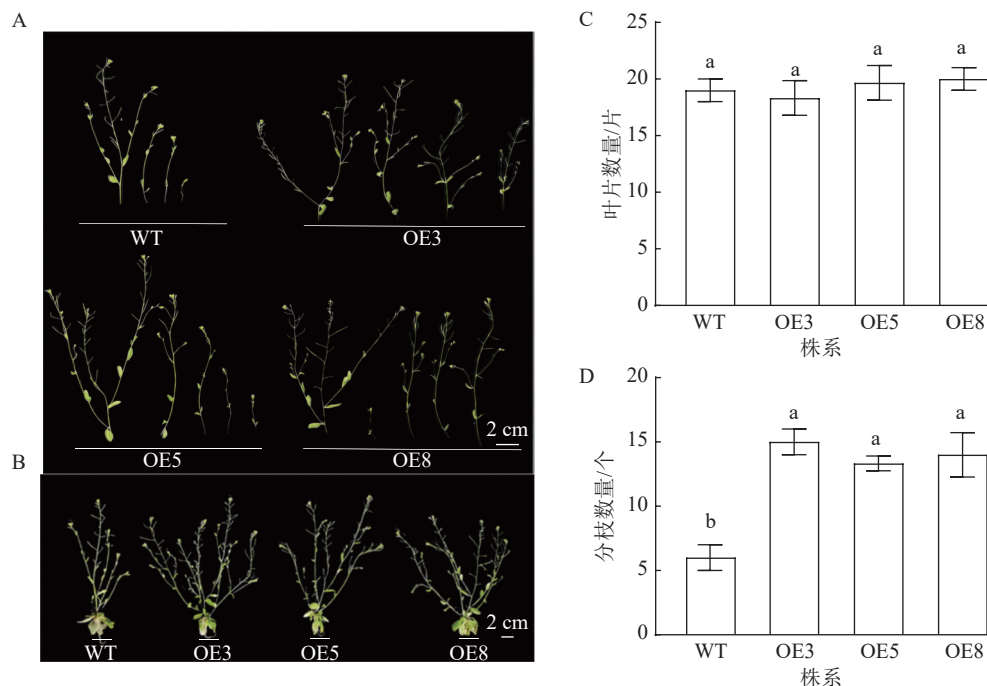


图 6 *PmERF011* 基因在拟南芥过表达株系中的相对表达量

Figure 6 Relative expression levels of *PmERF011* gene in *Arabidopsis* overexpression lines



A. 野生型(WT)与转基因植株分枝离体表型对比图; B. 野生型与转基因植株整体表型对比图; C. 野生型与转基因植株叶片数量比较分析; D. 野生型与转基因植株分枝数量比较分析。不同小写字母表示不同株系间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 *PmERF011* 过表达拟南芥表型观察

Figure 7 Phenotypic observation of *PmERF011* overexpression in *Arabidopsis*

录因子在其中的功能尚未明确。本研究以梅花为对象,通过整合生物信息学分析、组织特异性表达模式及异源转基因功能验证,明确了 *PmERF011* 基因序列特征及其在分枝调控中的作用,为梅花株型改良提供理论依据。结果表明: *PmERF011* 是一个具有典型 AP2/ERF 结构域的转录因子,与蔷薇科近缘物种桃、杏的 ERF011 蛋白高度保守,推测它在木本植物中可能具有功能保守性,而与其他科属物种(如拟南芥、水稻)的序列差异则反映出存在物种特异性调控机制。

组织特异性表达结果显示: *PmERF011* 在根和木质部中表达量最高,嫩茎和韧皮部次之,叶片中表达量最低,暗示 AP2/ERF 家族成员可能参与根系激素合成及维管组织分化。例如,拟南芥 *ESR1* 的过表达促进细胞分裂素合成,诱导芽再生^[42];在水稻中, *SNORKELs* 基因是深水稻茎间伸长的关键调节因子,乙烯在植物中积累并诱导该基因表达^[43]。菊花 *Chrysanthemum × morifolium* 去除顶芽后,其顶端优势释放,腋芽生长素减少,细胞分裂素生物合成加速,进而诱导 *CmERF053* 表达,促进侧枝发育^[44]。此外,根、茎组织的高表达暗示其可能直接调控分生组织活性,促进维管组织的分化。值得注意的是, *PmERF011* 在叶片中表达量极低,这可能与功能偏好性相关:叶片作为光合器官,其发育可能受其他转录因子(如 *KNOX*^[45] 或 *TCP*^[46] 家族)主导,而 *PmERF011* 更倾向于通过维管组织与分生组织调控株型结构。启动子顺式元件分析进一步支持这一推论,其中存在茉莉酸甲酯响应元件及生长素响应元件,暗示 *PmERF011* 可能通过整合激素信号协调分枝进程。

转基因功能验证结果显示: *PmERF011* 过表达显著增加拟南芥分枝数量,尤其是侧枝数量,但其对叶片数无显著影响,这一表型与欧洲油菜 *ERF114* 通过重塑顶端生长素梯度促进分枝的机制相似^[37]。不过, *PmERF011* 调控分枝的具体分子路径尚未明确, *PmERF011* 是否直接抑制分枝抑制因子(如 *BRC1*)或激活分生组织标记基因(如 *STM*)仍需进一步验证。

4 结论

本研究成功克隆了梅花 AP2/ERF 转录因子家族成员 *PmERF011*,并揭示了 *PmERF011* 在植物分枝调控中的作用。生物信息学分析证实: *PmERF011* 编码一个典型的亲水性核蛋白并在蔷薇科李属植物(如桃、杏)中高度保守。组织特异性表达模式分析表明: *PmERF011* 主要在根和茎木质部中高表达。拟南芥异源过表达结果显示:转基因植株分枝数量显著增加,证实 *PmERF011* 具有促进植物侧枝形成的能力。

5 参考文献

- [1] LI Xue, LI Ping, ZHENG Tangchun, *et al.* Genomic insights into the important ornamental and stress resistance traits of *Prunus mume* [J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2022, **302**: 111179 [2025-06-05]. DOI: [10.1016/j.scientia.2022.111179](https://doi.org/10.1016/j.scientia.2022.111179).
- [2] 王兵,赵会纳,余婧,等.植物侧枝发育的调控研究进展[J].生物技术通报,2023, **39**(5): 14–22.
WANG Bing, ZHAO Huina, YU Jing, *et al.* Research progress in the regulation of plant branch development [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, **39**(5): 14–22.
- [3] XIONG Shifa, WANG Yangdong, CHEN Yicun, *et al.* The sucrose regulation of plant shoot branching [J/OL]. *Horticulturae*, 2024, **10**(12): 1348 [2025-06-05]. DOI: [10.3390/horticulturae10121348](https://doi.org/10.3390/horticulturae10121348).
- [4] 陈尚昱,宋雪薇,齐振宇,等.植物侧枝发育的遗传基础及激素、代谢与环境调控[J].浙江农业学报,2024, **36**(3): 690–703.
CHEN Shangyu, SONG Xuewei, QI Zhenyu, *et al.* The genetic basis of plant shoot branching and the hormonal, metabolic and environmental regulation [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2024, **36**(3): 690–703.
- [5] LUO Zhiwei, JANSSEN B J, SNOWDEN K C. The molecular and genetic regulation of shoot branching [J]. *Plant Physiology*, 2021, **187**(3): 1033–1044.
- [6] 李丽冰,李威涛,刘依柔,等.植物分枝形成及影响分枝数主要因素的研究进展[J].植物遗传资源学报,2024, **25**(12): 2009–2019.
LI Libing, LI Weitao, LIU Yirou, *et al.* Research progress on branching formation and the main factors affecting branching number in plants [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, **25**(12): 2009–2019.
- [7] CAO Da, CHABIKWA T, BARBIER F, *et al.* Auxin-independent effects of apical dominance induce changes in phytohormones correlated with bud outgrowth [J]. *Plant Physiology*, 2023, **192**(2): 1420–1434.

- [8] XIA Xiaojian, DONG Han, YIN Yanling, *et al.* Brassinosteroid signaling integrates multiple pathways to release apical dominance in tomato[J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, **118**(11): e2004384118[2025-06-05]. DOI: [10.1073/pnas.2004384118](https://doi.org/10.1073/pnas.2004384118).
- [9] WANG Lei, WANG Bing, YU Hong, *et al.* Transcriptional regulation of strigolactone signalling in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2020, **583**(7815): 277–281.
- [10] XIE Yurong, LIU Yang, MA Mengdi, *et al.* *Arabidopsis* FHY3 and FAR1 integrate light and strigolactone signaling to regulate branching[J/OL]. *Nature Communications*, 2020, **11**: 1955[2025-06-05]. DOI: [10.1038/s41467-020-15893-7](https://doi.org/10.1038/s41467-020-15893-7).
- [11] LUO Le, ZHANG Yali, XU Guohua. How does nitrogen shape plant architecture [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, **71**(15): 4415–4427.
- [12] PANDA D, MISHRA S S, BEHERA P K. Drought tolerance in rice: focus on recent mechanisms and approaches [J]. *Rice Science*, 2021, **28**(2): 119–132.
- [13] YANG Yujie, AHMAD S, YANG Qingqing, *et al.* Decapitation experiments combined with the transcriptome analysis reveal the mechanism of high temperature on *Chrysanthemum* axillary bud formation[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(18): 9704[2025-06-05]. DOI: [10.3390/ijms22189704](https://doi.org/10.3390/ijms22189704).
- [14] HOLBROOK-SMITH D, TOH S, TSUCHIYA Y, *et al.* Small-molecule antagonists of germination of the parasitic plant *Striga hermonthica* [J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, **12**(9): 724–729.
- [15] DONG Han, WANG Jiachun, SONG Xuewei, *et al.* HY5 functions as a systemic signal by integrating BRC1-dependent hormone signaling in tomato bud outgrowth[J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, **120**(16): e2301879120[2025-06-05]. DOI: [10.1073/pnas.2301879120](https://doi.org/10.1073/pnas.2301879120).
- [16] MARTÍN-TRILLO M, GRANDÍO E G, SERRA F, *et al.* Role of tomato *BRANCHED1*-like genes in the control of shoot branching [J]. *The Plant Journal*, 2011, **67**(4): 701–714.
- [17] GUO Yongfeng, GAN Susheng. AtMYB2 regulates whole plant senescence by inhibiting cytokinin-mediated branching at late stages of development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2011, **156**(3): 1612–1619.
- [18] ISHIZAKI T, UEDA Y, TAKAI T, *et al.* In-frame mutation in rice *TEOSINTE BRANCHED1* (*OsTB1*) improves productivity under phosphorus deficiency[J/OL]. *Plant Science*, 2023, **330**: 111627[2025-06-05]. DOI: [10.1016/j.plantsci.2023.111627](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111627).
- [19] WEI Hongbin, LUO Mengting, DENG Jiao, *et al.* SPL16 and SPL23 mediate photoperiodic control of seasonal growth in *Populus* trees [J]. *New Phytologist*, 2024, **241**(4): 1646–1661.
- [20] MAO Chanjuan, HE Jianmei, LIU Lina, *et al.* OsNAC2 integrates auxin and cytokinin pathways to modulate rice root development [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, **18**(2): 429–442.
- [21] HU Jie, HU Xiaotong, YANG Yang, *et al.* Strigolactone signaling regulates cambial activity through repression of WOX4 by transcription factor BES1 [J]. *Plant Physiology*, 2022, **188**(1): 255–267.
- [22] YAO Huanyu, YANG Tianyin, QIAN Jie, *et al.* Genome-wide analysis and exploration of WRKY transcription factor family involved in the regulation of shoot branching in *Petunia*[J/OL]. *Genes*, 2022, **13**(5): 855[2025-06-05]. DOI: [10.3390/genes13050855](https://doi.org/10.3390/genes13050855).
- [23] JOFUKU K D, den BOER B G, MONTAGU M V, *et al.* Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. *The Plant Cell*, 1994, **6**(9): 1211–1225.
- [24] ZHANG Jing, LIAO Jiayao, LING Qiqi, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling analysis of maize *AP2/ERF* superfamily genes reveal essential roles in abiotic stress tolerance[J/OL]. *BMC Genomics*, 2022, **23**(1): 125[2025-06-05]. DOI: [10.1186/s12864-022-08345-7](https://doi.org/10.1186/s12864-022-08345-7).
- [25] MA Shiwei, LIN Qiuxiang, WU Ti, *et al.* EjCBF₃ conferred cold-resistance through the enhancement of antioxidase activity in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) [J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2024, **337**: 113556[2025-06-05]. DOI: [10.1016/j.scienta.2024.113556](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113556).
- [26] CHENG Cheng, AN Likun, LI Fangzhe, *et al.* Wide-range portrayal of AP2/ERF transcription factor family in maize (*Zea mays* L.) development and stress responses[J/OL]. *Genes*, 2023, **14**(1): 194[2025-06-05]. DOI: [10.3390/genes14010194](https://doi.org/10.3390/genes14010194).
- [27] YU Yang, YU Ming, ZHANG Shuangxing, *et al.* Transcriptomic identification of wheat AP2/ERF transcription factors and functional characterization of *TaERF-6-3A* in response to drought and salinity stresses[J/OL]. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 2022, **23**(6): 3272 [2025-06-05]. DOI: [10.3390/ijms23063272](https://doi.org/10.3390/ijms23063272).
- [28] 黄奕孜, 钱旺, 邱姗, 等. 光皮桦 *AP2/ERF* 基因家族鉴定与表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2022, **39**(6): 1183–1193.
HUANG Yizi, QIAN Wang, QIU Shan, *et al.* Identification and expression analysis of *AP2/ERF* gene family in *Betula luminifera* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(6): 1183–1193.
- [29] ZHOU Jinggeng, MU Qiao, WANG Xiaoyang, *et al.* Multilayered synergistic regulation of phytoalexin biosynthesis by ethylene, jasmonate, and MAPK signaling pathways in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2022, **34**(8): 3066–3087.
- [30] YU Li, YAO Min, MAO Lianlian, *et al.* Rice DSP controls stigma, panicle and tiller primordium initiation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, **21**(11): 2358–2373.
- [31] QI Weiwei, SUN Fan, WANG Qianjie, *et al.* Rice ethylene-response AP2/ERF factor *OsEATB* restricts internode elongation by down-regulating a gibberellin biosynthetic gene [J]. *Plant Physiology*, 2011, **157**(1): 216–228.
- [32] RIGAL A, YORDANOV Y S, PERRONE I, *et al.* The AINTEGUMENTA LIKE1 homeotic transcription factor *PtAIL1* controls the formation of adventitious root primordia in poplar [J]. *Plant Physiology*, 2012, **160**(4): 1996–2006.
- [33] 王梦迪, 梁佳惠, 潘文强, 等. 乙烯响应因子 *LIERF12* 调控卷丹珠芽发生机制的初步解析[J]. 中国农业大学学报, 2025, **30**(2): 80–93.
WANG Mengdi, LIANG Jiahui, PAN Wenqiang, *et al.* Preliminary analysis of the mechanism of ethylene response factor *LIERF12* regulating bulbil formation in *Lilium lancifolium* [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, **30**(2): 80–93.
- [34] 卢勇杰, 夏海乾, 李永铃, 等. 烟草 AP2/ERF 转录因子 *NtESR2* 的克隆及功能分析[J]. 生物技术通报, 2025(4): 266–277.
LU Yongjie, XIA Haiqian, LI Yongling, *et al.* Cloning and expression analysis of AP2/ERF transcription factor *NtESR2* in *Nicotiana tabacum* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2025(4): 266–277.
- [35] MEHRNIA M, BALAZADEH S, ZANOR M I, *et al.* *EBE*, an AP2/ERF transcription factor highly expressed in proliferating cells, affects shoot architecture in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2013, **162**(2): 842–857.
- [36] KULUEV B R, KNIAZEV A V, IL'IASOVA A A, *et al.* Ectopic expression of the *PnANTL1* and *PnANTL2* black poplar genes in transgenic tobacco plants [J]. *Genetika*, 2012, **48**(10): 1162–1170.
- [37] LYU Jinyang, GUO Yuan, DU Chunlei, *et al.* *BnERF114. A1*, a rapeseed gene encoding APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR regulates plant architecture through auxin accumulation in the apex in *Arabidopsis* [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(4): 2210 [2025-06-05]. DOI: [10.3390/ijms23042210](https://doi.org/10.3390/ijms23042210).
- [38] LAKEHAL A, DOB A, RAHNESHAN Z, *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115 integrates jasmonate and cytokinin signaling machineries to repress adventitious rooting in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2020, **228**(5): 1611–1626.
- [39] YE Binbin, SHANG Guandong, PAN Yu, *et al.* AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration [J]. *The Plant Cell*, 2020, **32**(1): 226–241.
- [40] DU Dongliang, HAO Ruijie, CHENG Tangren, *et al.* Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Prunus mume* [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, **31**(3): 741–750.
- [41] ZHANG Qixiang, CHEN Wenbin, SUN Lidian, *et al.* The genome of *Prunus mume* [J/OL]. *Nature Communications*, 2012, **3**: 1318 [2025-06-05]. DOI: [10.1038/ncomms2290](https://doi.org/10.1038/ncomms2290).
- [42] BANNO H, IKEDA Y, NIU Q W, *et al.* Overexpression of *Arabidopsis ESR1* induces initiation of shoot regeneration [J]. *The Plant Cell*, 2001, **13**(12): 2609–2618.
- [43] HATTORI Y, NAGAI K, FURUKAWA S, *et al.* The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water [J]. *Nature*, 2009, **460**(7258): 1026–1030.
- [44] NIE Jing, WEN Chao, XI Lin, *et al.* The AP2/ERF transcription factor *CmERF053* of *Chrysanthemum* positively regulates shoot branching, lateral root, and drought tolerance [J]. *Plant Cell Reports*, 2018, **37**(7): 1049–1060.
- [45] WANG Yi, STRAUSS S, LIU Shanda, *et al.* The cellular basis for synergy between *RCO* and *KNOX1* homeobox genes in leaf shape diversity [J]. *Current Biology*, 2022, **32**(17): 3773–3784.
- [46] WANG Kaitong, ZHANG Huanhuan, WEI Han, *et al.* Roles of TCP transcription factors in plant growth and development [J/OL]. *Physiologia Plantarum*, 2025, **177**(4): e70357 [2025-06-05]. DOI: [10.1111/ppl.70357](https://doi.org/10.1111/ppl.70357).