

药用植物转录因子 AP2/ERF 研究与展望

季爱加^①, 罗红梅^①, 徐志超^①, 张鑫^①, 宋经元^{①②*}, 陈士林^{①③*}

① 中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

② 重庆市药物种植研究所, 重庆 408435;

③ 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

* 联系人, E-mail: jysong@implad.ac.cn; slchen@implad.ac.cn

2014-07-07 收稿, 2014-10-14 接受, 2015-03-24 网络版发表

国家科技支撑计划(2012BAI29B01)和国家自然科学基金(81373916)资助

摘要 药用植物作为中药和世界传统药物的主要来源, 面临着资源稀缺和活性成分含量低等问题。通过转录水平调控发育相关基因及活性成分合成途径酶基因表达是实现定向、高效调节药用植物生长及活性成分合成的有效手段之一。因此, 近年来转录因子调节药用植物发育及活性成分合成的研究备受关注。转录因子AP2/ERF家族是植物最大转录因子家族之一, 家族成员均包含保守AP2结构域, 根据结构域数量和识别序列不同, AP2/ERF家族被分为5个亚家族: AP2 (APETALA2), ERF (ethylene-responsive factor), DREB (dehydration-responsive element binding proteins), RAV (related to ABI3/VP1)和Soloist。本文重点综述转录因子AP2/ERF调控药用植物活性成分生物合成、发育、胁迫响应的研究进展, 阐述了转录因子AP2/ERF调控靶基因和自身受到调控的作用机制, 同时总结转录因子AP2/ERF研究方法, 提出组学和生物信息学方法成为分离、筛选转录因子, 预测转录因子功能的强大工具, 为分析、预测、验证药用植物AP2/ERF家族成员的功能和阐明AP2/ERF的调控机制提供理论基础和方法指导。转录因子AP2/ERF的功能研究及其作用机制的揭示将有助于利用代谢调控手段提高药用植物活性成分产量, 有利于药用植物优良品种的培育, 为满足人们对天然药物的需求奠定基础。

关键词

转录因子
AP2/ERF
药用植物
活性成分
生长发育

20世纪80年代末90年代初, *Cell*和*Plant Cell*分别发表了关于转录因子AP2在拟南芥中参与调控花发育过程的研究^[1-3], 引起学术界对该类转录因子的极大兴趣。随后研究发现转录因子AP2不仅与花器官发育有关, 而且调控根、叶、果实、种子等器官的生长发育和胁迫响应^[4-7], 研究对象从经典模式植物(拟南芥^[3,8]、烟草^[9]等)扩展到农作物(水稻^[10]、玉米^[11]、大麦^[12]、番茄^[13]等)、药用植物(长春花^[14]、青蒿^[15]、红豆杉^[16]等)。药用植物作为中药和世界传统药物的最重要资源受到政府、公众和研究人员的高度关注, 由于药用植物含有多种活性作用的天然产物, 如治疗疟疾的倍半萜类物质青蒿素^[17], 治疗癌症的吲哚

生物碱类物质长春碱、长春新碱^[18]及治疗心血管疾病的二萜醌类化合物丹参酮II-A^[19]等, 因此转录因子AP2/ERF调控药用植物生长发育及活性成分的生物合成已成为近年来的研究热点。本文概述了转录因子AP2/ERF基因家族的结构、分类、起源和生物学功能, 在此基础上, 重点综述转录因子AP2/ERF调控药用植物活性成分生物合成、生长发育、胁迫响应等研究进展, 并详细阐述转录因子AP2/ERF作用机制和主要研究方法。对转录因子AP2/ERF的深入研究有助于利用分子调控机制优化药用植物代谢工程方案, 提高药用植物活性成分生物合成效率, 同时有助于药用植物的优良品种培育, 为遗传育种研究奠定

引用格式: 季爱加, 罗红梅, 徐志超, 等. 药用植物转录因子 AP2/ERF 研究与展望. 科学通报, 2015, 60: 1272-1284

Ji A J, Luo H M, Xu Z C, et al. Research and perspectives on AP2/ERF transcription factors in medicinal plants (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 1272-1284, doi: 10.1360/N972014-00697

重要基础。

1 转录因子AP2/ERF基因家族概述

1.1 转录因子AP2/ERF的结构和分类

转录因子AP2/ERF至少具有一个高度保守约60~70个氨基酸组成的AP2结构域,根据AP2结构域数量和识别序列不同,该家族被分为5个亚家族(表1): AP2 (APETALA2), ERF (ethylene-responsive factor), DREB (dehydration-responsive element binding proteins), RAV (related to ABI3/VP1)和Soloist^[36,37]. Allen 等人^[38]以拟南芥AtERF1为例分析AP2结构域的二级结构特征: 包含3个反向平行的 β 折叠和一个几乎与之平行的 α 螺旋(图1), 通过 β 折叠上的精氨酸和色氨酸残基与靶基因双螺旋结构大沟上8个碱基相连实现与识别序列GCC box的结合. 这种DNA结合特征与以前预测AP2结构域 α 螺旋参与DNA的结合明显不同^[8,39,40]. 以下详细阐述5个亚家族的结构和分类.

AP2亚家族有2个重复的AP2结构域,分别为AP2-R1和AP2-R2. 根据2个结构域是否含有插入序列将AP2亚家族分为ANT和euAP2组, ANT组在R1结构域中有10个氨基酸插入, 在R2结构域中有1个氨基酸插入, 而euAP2组结构域中不存在氨基酸插入, 但是euAP2组含有microRNA172的结合位点. ANT组可进一步分为euANT和basalANT亚组, euANT亚组除了在R1中包含10个氨基酸插入(euANT1基序: NSC[K/R][K/R]EGQ[T/S]R), 在R1结构域的N端还有3个插入基序(euANT2, 3,和4基序分别为: WLGFSLs, PKLEDFLG和TFGQR), 而basalANT结构域N端序列较短, 不包含3个插入基序^[41,42]. AP2亚家族有1个

较长的识别序列 GCAC(A/G)N(A/T)TCCC(A/G)ANG(C/T)元件, 体外实验证明, 2个结构域都参与DNA的结合^[43], 酵母体内激活实验证实AP2与识别序列结合后能够激活报告基因的表达, 缺失任意一个结构域都无法激活报告基因, 再次证明与DNA结合的过程中AP2的2个结构域缺一不可^[44].

ERF亚家族和DREB亚家族均仅含有1个AP2结构域, 这2个亚家族的基因几乎不含内含子^[37], 2个亚家族的主要区别是AP2结构域的第14位和第19位氨基酸残基不同, ERF是丙氨酸和天冬氨酸, 而DREB是缬氨酸和谷氨酸^[37]. 另外, 二者结合元件不同, ERF亚家族结合AGCCGCC序列, 即GCC box^[9], DREB亚家族可以识别干旱响应和冷诱导响应的DRE/CRT(A/GCCGAC)元件. 转录因子DREB亚家族的某些成员会识别一些特殊元件, 比如大麦中的HvDRF1能够识别T(T/A)ACCGCCTT序列^[45], 玉米中的ABI4识别CE1序列, 即CACCG基序^[46]. 2002年, Sakuma等人^[37]根据序列同源性把拟南芥中DREB和ERF每个亚家族分为6个亚组(A1~A6; B1~B6). 2006年, Nakano等人^[36]根据拟南芥和水稻的内含子-外显子结构和其他基序特征进一步把拟南芥DREB和ERF亚家族分为12个亚组(I~X, VI-L, Xb-L). Licausi等人^[41]认为, 重新分组可基本概括DREB/ERF成员的进化关系, 并将具有相似功能的成员聚为一组.

RAV亚家族首次从拟南芥中分离, 含有2个不同的DNA结合结构域: AP2和B3^[31]. B3结构域为另一类转录因子B3家族成员所共有^[47](图1), RAV亚家族既属于转录因子AP2/ERF家族也属于B3家族. 研究表明, RAV亚家族的AP2结构域识别CAACA序列, B3结构域识别CACCTG序列, 2个结构域既能与靶基因单独结合,

表1 转录因子 AP2/ERF 5 个亚家族识别序列与主要功能

Table 1 Recognition sequence and main function of each subfamily of AP2/ERF family

亚家族	结构域	识别序列	主要功能	参考文献
AP2	AP2+AP2	GCAC(A/G)N(A/T)TCCC(A/G)ANG(C/T)	生长发育	[6,10,20,21]
DREB	AP2	DRE/CRT 元件: (A/G)CCGAC T(T/A)ACCGCCTT ^{a)} CE1 元件: CACCG ^{a)}	非生物胁迫响应	[22~24]
ERF	AP2	GCC box 元件: AGCCGCC	胁迫响应, 次生代谢	[9,14,25~30]
RAV	AP2+B3	CAACA	生长发育, 胁迫响应	[31~34]
Soloist	AP2		生物胁迫响应	[35]

a) DREB 亚家族特殊识别序列

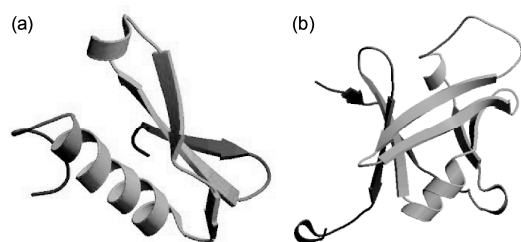


图1 经核磁共振实验验证的保守结构域AP2(a)和B3(b)的三维空间结构

Figure 1 The 3D structure of AP2 and B3 conserved domains verified by NMR spectra

又能与靶基因同时结合,当AP2与B3结构域同时结合靶基因时可以显著提高与DNA结合的亲和力^[31].

Soloist亚家族含有一个ERF-like蛋白,但与其他亚家族相比同源性非常低,识别序列尚不清楚,所以单独归为一类.

1.2 转录因子AP2/ERF的起源和功能

由于转录因子AP2最初在拟南芥中发现,随后研究主要集中在植物界.但自2004年,在嗜热四膜虫、顶复门原虫、蓝藻、病毒中相继发现含有AP2结构域的同源蛋白^[48-50],这些蛋白被鉴定为归巢核酸内切酶(homing endonucleases),其中包含AP2结构域和一个归巢核酸内切酶结构域.非植物中的AP2结构域与植物AP2结构域具有相似的二级结构,二者与DNA的结合方式也相似.Yamasaki等人^[5,51-53]将3个归巢核酸内切酶LAGLIDADG家族的PI-SceI, HNH家族的I-HmuI, His-Cys家族的I-Ppo与拟南芥AtERF1结构域比对后发现,归巢内切酶PI-SceI的二级结构与拟南芥AP2结构域最相似,表明归巢内切酶PI-SceI与植物转录因子AP2/ERF的祖先最相近.研究推测携带着AP2结构域的归巢核酸内切酶通过蓝藻与植物的内共生或病毒感染等基因横向转移事件进入植物基因组,通过置换和复制过程在基因组中广泛分布,推测有些归巢核酸内切酶可能发生分化,归巢核酸内切酶结构域丢失,但AP2结构域保留并在进化过程中产生新的功能.随着内含子进化事件产生AP2, Soloist和部分ERF家族成员,新结构域的插入导致RAV家族产生,内含子进化和新DNA结构域插入不利于归巢核酸内切酶的置换和归巢过程(homing processes),所以AP2, RAV, Soloist亚家族的成员数较少^[48].

转录因子AP2/ERF同一个亚家族的大部分成员

具有相似功能.AP2亚家族主要参与植物生长发育过程,对花发育的调控研究最多^[1-3,6,8,22],同时,对根的生长、果实和种子发育的调控作用也有报道^[10,21].Aya等人^[10]分离到一个水稻转录因子AP2亚家族成员SMOS1,外源生长素能够诱导SMOS1的表达,微阵列分析发现突变体smos1能够抑制一些与微管运动和DNA复制相关的基因表达,同时突变体的各个器官缩小,表明生长素依赖型调控因子SMOS1能够控制水稻器官的生长.Zhou等人^[54]分离到2株不落粒水稻突变株shat1和shat2,通过图位克隆和遗传转化发现调控水稻落粒的SHAT1基因编码一个AP2转录因子,并在离层部位高丰度表达.DREB亚家族成员在植物响应干旱、低温、盐分等非生物胁迫过程中起重要作用^[22-24].植物在受到非生物胁迫时,DREB亚家族成员基因受到诱导,与DRE/CRT顺式作用元件结合,激活下游防御基因的表达,提高植物抗逆性^[55].水稻OsDREB2A受到干旱、低温、盐胁迫的诱导,在大豆中过表达OsDREB2A发现转基因植株通过积累渗透压调节物质(如可溶性糖和游离脯氨酸)提高植株耐盐性,下游一些胁迫响应相关基因表达水平也增加,转基因植株的生长状态优于野生大豆^[23].一些ERF亚家族成员能够结合病程相关蛋白启动子上的GCC box元件^[9,25],激活病程相关基因表达,同时参与乙烯、茉莉酸、水杨酸等信号途径提高植物抗病性^[26-28].白菜中分离得到一个ERF亚家族转录因子BrERF11,它受外源水杨酸、茉莉酸甲酯、乙烯和过氧化氢的诱导,转化烟草后发现植株对青枯雷尔氏菌的抗病性增强^[28],还有一部分ERF亚家族成员与DREB亚家族的主要功能相同,在植物响应非生物胁迫过程中起作用^[29,30].RAV亚家族成员对植物的生长发育、胁迫响应都起调控作用.在叶片成熟后期,拟南芥RAV1的表达量增加,在叶片衰老早期表达量最高,而在叶片衰老后期表达量开始降低.同时过表达RAV1使植株叶片提前衰老,进一步证明RAV1在叶片衰老过程中起正调控作用^[7].辣椒中分离到的CaRAV1在生物与非生物胁迫下受到强烈诱导,在拟南芥中过表达CaRAV1不仅对丁香假单胞菌抗性增强,而且对高盐和干旱胁迫的耐受力增加^[56].Soloist家族通常在每个物种中仅有1个成员,目前仅拟南芥APD1的功能已被报道,APD1在病原菌侵入和外源水杨酸、茉莉酸甲酯处理下表达量增加,实验证明APD1正调控水杨酸的合成,同时正向调控因子

APD1对病原菌入侵起基础防御作用^[35]。

每个亚家族拥有多种功能,各亚家族之间的功能存在交叉,同时,多个转录因子之间也存在功能冗余,尚需深入研究阐明转录因子结构与功能之间的关系。

2 转录因子AP2/ERF调控药用植物发育及活性成分合成研究

转录因子AP2/ERF在经典模式植物和重要作物中的调控作用已被广泛研究,近年来,以长春花为主的许多药用植物转录因子AP2/ERF被分离鉴定。转录因子AP2/ERF不仅在药用植物生长发育过程中发挥调控作用,而且还与药用植物的活性成分生物合

成和抗逆反应密切相关(表2),以下详细阐述国内外相关研究进展。

2.1 转录因子AP2/ERF调控药用植物活性成分生物合成

药用植物活性成分生物合成调控不仅对其自身具有显著的生物学意义,而且对人类健康至关重要。转录因子AP2/ERF对抗肿瘤有效成分长春碱、长春新碱,抗疟疾活性物质青蒿素和烟草活性成分尼古丁等生物合成途径调控的研究已有报道。

AP2/ERF调控长春花活性成分合成的机制研究最为深入,不同转录因子AP2/ERF在不同培养体系下,对关键酶基因的调控已被阐明(表3)^[81]。1999年,

表2 药用植物中部分已鉴定的转录因子 AP2/ERF 基因
Table 2 AP2/ERF genes with characterized functions in medicinal plants

亚家族	基因名	药用植物	基因功能	参考文献
AP2	CAP2	鹰嘴豆(<i>Cicer arietinum</i> Linn.)	抗盐、干旱胁迫	[57]
AP2	NnAP2	莲(<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.)	调控花发育	[58]
AP2	NsAP2	睡莲(<i>Nymphaea</i> sp. Linn.)	调控花发育、株高	[59]
AP2	Pp30	黏果酸浆(<i>Physalis philadelphica</i> Lamarck)	调控花、果实发育	[60]
AP2	EgAP2-1	油棕(<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)	调控合子和体细胞胚发育	[61]
DREB	TcAP2	红豆杉(<i>Taxus cuspidata</i> Sieb. et Zucc.)	调控萜类代谢途径	[16]
DREB	TcDREB	红豆杉(<i>T. cuspidata</i> Sieb. et Zucc.)	调控萜类代谢途径	[62]
DREB	OjDREB	麦冬(<i>ophiopogon japonicus</i> (Linnaeus f.) Ker Gawler)	抗盐胁迫	[63]
DREB	BpDREB2	构树(<i>Broussonetia papyrifera</i> (Linn.) Vent.)	抗盐、冻害胁迫	[64]
DREB	EguCBF1	桉树(<i>Eucalyptus gunnii</i> J. D. Hooker)	抗冻害胁迫	[65]
DREB	BjDREB1B	芥菜(<i>Brassica juncea</i> (Linn.) Czern. et Coss.)	抗盐、干旱胁迫	[66]
ERF	ORCA2	长春花(<i>Catharanthus roseus</i> (Linn.) G. Don)	调控生物碱代谢途径	[14]
ERF	ORCA3	长春花(<i>C. roseus</i> (Linn.) G. Don)	调控生物碱代谢途径	[67]
ERF	AaERF1	青蒿(<i>Artemisia annua</i> Linn.)	调控萜类代谢途径	[15]
ERF	AaERF2	青蒿(<i>A. annua</i> Linn.)	调控萜类代谢途径	[15]
ERF	AaORA	青蒿(<i>A. annua</i> Linn.)	调控萜类代谢途径	[68]
ERF	LeERF-1	紫草(<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc.)	调控萜类代谢途径	[69]
ERF	NIC2-locus ERFs	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i> Linn.)	调控生物碱代谢途径	[70]
ERF	NtERF32	烟草(<i>N. tabacum</i> Linn.)	调控生物碱代谢途径	[71]
ERF	ORC1	烟草(<i>N. tabacum</i> Linn.)	调控生物碱代谢途径	[72]
ERF	Tsi1	烟草(<i>N. tabacum</i> Linn.)	抗盐胁迫、抗丁香假单胞菌	[25]
ERF	OPBP1	烟草(<i>N. tabacum</i> Linn.)	抗盐胁迫、抗丁香假单胞菌	[73]
ERF	NtERF5	烟草(<i>N. tabacum</i> Linn.)	抗烟草花叶病毒	[74]
ERF	NtCEF1	烟草(<i>N. tabacum</i> Linn.)	抗番茄细菌性叶斑病	[75]
ERF	BKERF1	高氏柴胡(<i>Bupleurum kanoi</i> Liu, Chao & Chuang)	抗灰霉菌	[76]
ERF	BKERF2.2	高氏柴胡(<i>B. kanoi</i> Liu, Chao & Chuang)	抗灰霉菌	[76]
ERF	OjERF	麦冬(<i>ophiopogon japonicus</i> (Linnaeus f.) Ker Gawler)	抗盐、干旱胁迫	[77]
ERF	ThERF1	柽柳(<i>Tamarix hispida</i> Willd.)	非生物胁迫敏感	[78]
ERF	LjERF1	百脉根(<i>Lotus japonicus</i> Linn.)	调控根结瘤	[79]
ERF	JcERF	麻疯树(<i>Jatropha curcas</i> Linn.)	抗盐、冻害胁迫	[80]
RAV	CARAV1	辣椒(<i>Capsicum annuum</i> Linn.)	抗番茄细菌性叶斑病, 抗盐、干旱胁迫	[56]

表 3 不同培养体系下长春花转录因子 ERF 亚家族成员 ORCA3 对关键酶基因的调控作用^{a)}

Table 3 The genes coding key enzymes regulated by ERF subfamily member ORCA3 in different culture systems of *Catharanthus roseus*

基因	悬浮细胞(ORCA3) ^[67]	毛状根(ORCA3) ^[82]	植株(ORCA3) ^[83]	毛状根(ORCA3-G10H) ^[84]	植株(G10H-ORCA3) ^[83]
<i>ASa</i>	+	+	+	+	+
<i>TDC</i>	+	无变化	+	+	+
<i>DXS</i>	+	+	无变化	未报道	无变化
<i>CPR</i>	+	无变化	未报道	+	未报道
<i>G10H</i>	无变化	无变化	无变化	+	+
<i>SLS</i>	未报道	+	未报道	+	未报道
<i>STR</i>	+	+	+	+	+
<i>SGD</i>	+	-	未报道	未报道	未报道

a) “+”, 表示上调; “-”, 表示下调; “*”, 基因的表达变化是 *G10H* 本身过表达引起

在长春花中用酵母单杂交方法分离出 ERF 亚家族成员 *ORCA2*, 将其转化长春花悬浮细胞后, 检测到生物碱合成途径关键酶基因 *STR* 启动子被 *ORCA2* 显著激活, 这是首次将转录因子 AP2/ERF 的功能扩展到茉莉酸(Jamunate, JA)参与的植物活性成分合成途径中^[14]. 2000年, 用 T-DNA 激活标签技术从长春花细胞中分离出 *ORCA3* 基因, 转化悬浮细胞后发现, *ORCA3* 能够调控 TIAs (Terpenoid Indole Alkaloids) 代谢途径中的多步反应, *TDC*, *STR*, *CPR* 和 *D4H* 基因表达上调, 说明 *ORCA3* 是 TIAs 途径的核心调控因子^[67]. *ORCA3* 能够与关键酶基因 *STR* 启动子 JERE 元件直接结合, 激活 *STR* 的表达^[85]. 过表达 *ORCA3* 增加了色氨酸和色胺的积累, 但检测不到 TIAs, 说明萜类化合物的支路被抑制^[67]. 这种抑制归因于一个编码细胞色素 P450 单加氧酶基因 *G10H* 不受到 *ORCA3* 的调控作用^[86]. 2010年, Wang 等人^[84]将 *G10H* 和 *ORCA3-G10H* 融合基因转化长春花毛状根, 检测长春新碱产量最高为阴性对照的 6.5 倍. 2012年, Pan 等人^[83]首次将 *ORCA3* 和 *G10H-ORCA3* 融合基因转化长春花植株, 过表达 *ORCA3* 使 *ASa*, *TDC*, *STR* 和 *D4H* 转录水平提高, 但是对 *CRMYC2* 和 *G10H* 无影响. 当过表达 *G10H-ORCA3* 时, 异胡豆苷、文多灵、长春质碱、阿玛碱产量显著增加, 但限制了脱水长春碱和长春碱的产量. 同时代谢组学研究发现, 转基因植株中单体吲哚生物碱的含量较高, 说明过表达 *G10H-ORCA3* 会改变长春花其他代谢途径进而促进单体吲哚生物碱的生物合成.

青蒿素是青蒿的重要活性成分. 最新研究表明, 转录因子 AP2/ERF 参与了青蒿素的合成调控. 2012年, Yu 等人^[15]用 5 种激素处理青蒿后发现, 茉莉酸甲酯(Methyl Jasmonate, MeJA)处理样本中青蒿素合成

途径关键酶基因的表达量变化最大, 对关键酶基因启动子序列进行分析发现序列中都含有转录因子 AP2/ERF 结合位点, 从 EST 库中搜索到 7 条 AP2/ERF 序列, 定量 PCR 分析表明, 其中 2 个基因 *AaERF1* 和 *AaERF2* 受到 MeJA 诱导表达量最高, 并在不同组织部位与关键酶基因 *ADS* 和 *CYP71AV1* 协同表达. 构建 *AaERF1* 和 *AaERF2* 过表达载体转化青蒿植株, 关键酶基因 *ADS* 和 *CYP71AV1* 表达量显著升高, *DBR2* 略有升高. 高效液相分析青蒿酸和青蒿素含量均有所增加. 2013年, Lu 等人^[68]从青蒿中克隆了 6 个 AP2/ERF 转录因子, 组织部位表达分析发现, *AaOCA* 与关键酶基因 *ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2* 表达模式相似, 转基因实验证明 *AaOCA* 通过正向调控 *ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2*, *AaERF1* 的表达提高了青蒿素和青蒿酸的产量.

在烟草中, MeJA 诱导的 AP2/ERF 转录因子 *NtORC1* 和 *NtJAP1* 基因能够调控生物碱代谢途径中的关键酶基因 *PMT* 的表达^[87]. 过表达 *NtORC1* 能刺激烟草中生物碱的积累. 转录因子 bHLH 能够增强 *NtORC1* 的转录激活作用^[72]. 经典遗传学实验发现, 烟草基因组中 2 个位点 *NIC1* 和 *NIC2* 可能与烟草叶片尼古丁含量的多少相关, Shoji 等人^[70]在转基因烟草 *NIC2* 位点发现了大量具有功能性的转录因子 ERFs, 已知在此位点上至少有 7 个 ERF 基因形成基因簇, 这些 ERF 转录因子识别 GCC-box, 同时激活尼古丁合成途径上的大多数关键基因. 抑制这些 ERF 转录因子的表达导致尼古丁合成明显减少. 2014年, Sears 等人^[71]在非 *NIC2* 位点上也发现了一些 ERF 基因, 其中过表达 *NtERF32* 能够提高关键酶 *NtPMT1a* 的表达, 总生物碱含量也有所增加; 当敲除 *NtERF32* 时, 尼古丁合成途径上的多个基因受到抑制, 尼古丁和总生物碱含量减少, 证明 *NtERF32* 参与尼古丁生物合成途

径并起到重要作用。

紫草根中积累的次生代谢产物紫草素具有抗菌消炎、抗肿瘤的活性,已有报道紫草素的积累与光信号相关,紫草素仅在黑暗条件下形成。Zhang等人^[69]克隆了一个转录因子ERF亚家族成员*LeERF-1*,细胞系暗培养4 d后,*LeERF-1*表达量显著升高,在黑暗条件下培养2 d后再转至光培养,其表达量迅速降低。同时,检测其在不同部位的表达情况,*LeERF-1*在根中高表达。预测*LeERF-1*可能参与光和乙烯信号转导过程,调控活性成分紫草素的生物合成。

药用植物活性成分的生物合成途径步骤繁多,同时受到转录因子的严格调控,形成复杂的次生代谢网络,分析并阐明这些转录因子的功能对我们深入理解药用活性成分合成途径的分子调控机制至关重要。虽然一些参与活性成分生物合成的AP2/ERF已被分离验证,但除了长春花转录因子ORCA3外几乎没有核心调控因子,为了分离核心调控因子,有必要对合成途径上关键酶的启动子顺式作用元件进行分析,能够与关键酶基因启动子上的顺式作用元件结合的转录因子可能在调控次生代谢途径中具有重要作用。

2.2 转录因子AP2/ERF调节药用植物生长发育

调控药用植物生长发育的转录因子AP2/ERF多属于AP2亚家族,转录因子AP2/ERF调控药用植物生长发育主要体现在影响花、果实的发育过程。Luo等人^[59]从睡莲中分离到一个AP2亚家族成员*NsAP2*,*NsAP2*在新生的花器官原基中表达量最高。当花器官发育完全时,*NsAP2*主要在萼片和花瓣中表达。在拟南芥中过表达*NsAP2*基因,拟南芥的花瓣数增加,植株变高。莲中克隆到一个*NnAP2*基因,对5个莲花品种组织部位表达分析,发现*NnAP2*在花中表达量最高;同时发现,*NnAP2*基因在非单瓣花瓣中表达量比单瓣花瓣高,预测*NnAP2*可能参与花发育过程^[58]。AP2亚家族成员*Pp30*基因与黏果酸浆花和果实大小的自然变异密切相关,在发育不同时期,*Pp30*的表达与花器官和果实的大小呈正相关,其可能是控制花和果实大小的关键调控因子^[60]。

转录因子AP2/ERF还参与了药用植物的其他发育过程,例如百脉根*LjERF1*能够正向调控根结瘤的早期过程,过表达*LjERF1*能够显著增加结瘤的数量,RNA干扰*LjERF1*则会导致结瘤的抑制^[79]。此外,转录因子AP2/ERF能够调控药用植物的胚胎发育过程,

Morcillo等人^[61]在油棕中分离到一个AP2亚家族成员*EgAP2-1*,*EgAP2-1*在合子胚中表达量最高,转化拟南芥发现,细胞再生能力增强,并且使叶子的形态发生改变,说明*EgAP2-1*参与油棕合子胚和体细胞胚发育过程。

转录因子AP2/ERF调控药用植物生长发育研究还不多,并且大多关注药用植物的观赏和食用价值。药用植物的药用部位包括营养器官和繁殖器官,这些器官的生长发育影响着药材品质的形成,加强转录因子调控药用植物生长发育研究将为药用植物的栽培育种提供理论指导。

2.3 转录因子AP2/ERF参与药用植物生物和非生物胁迫响应

干旱、高盐、极端温度、病原微生物入侵等非生物与生物胁迫对药用植物的产量和活性成分含量有重要影响。为了在各种胁迫条件下生存,药用植物进化出复杂的系统来响应多种胁迫信号。对麦冬、柴胡、鹰嘴豆等药用植物转录因子AP2/ERF研究发现,一些DREB、ERF家族成员参与响应胁迫过程。

李聪^[77]从麦冬中分离到一个*OjERF*基因,*OjERF*基因在麦冬中的表达受到干旱、高盐、低温、ABA和乙烯等不同程度的诱导;在烟草中过表达*OjERF*基因,转基因烟草的抗逆相关基因表达增强,叶绿素、脯氨酸含量增加,SOD和CAT酶活性提高,说明过表达*OjERF*基因提高了抗旱和耐盐能力。Chen等人^[88]通过微阵列技术检测MeJA诱导下高氏柴胡的差异表达基因,发现2个ERF亚家族基因分别上调了41和133倍,在柴胡悬浮细胞中超表达*BkERF1*和*BkERF2.2*,发现防御基因表达上调,同时,转基因植株对灰霉菌的抗性增强^[76]。民族药鹰嘴豆中的*CAP2*基因在受到干旱、盐分和外源ABA处理的植株中表达量增加,在烟草中过表达*CAP2*基因提高了烟草对盐分和干旱胁迫的耐受能力^[57]。烟草中的转录因子*Tsi1*能够结合GCC box和DRE/CRT元件,转化烟草后发现,过表达*Tsi1*能够诱导病程相关蛋白基因的表达,从而提高植物的抗病性,同时又能提高植物的耐盐能力^[26]。烟草中其他的转录因子如*NtERF5*,*NtCEF1*等也被证明具有抗烟草花叶病毒、番茄细菌性叶斑病的作用^[74,75]。

除了正向调控靶基因的转录,AP2/ERF也具有反向调控的作用。刘文进等人^[78]从桉柳中获得一个具

负调控作用的*ThERF1*基因,转化拟南芥进行抗逆能力分析,在干旱、盐分、ABA胁迫处理下,转基因植株的长势很弱,SOD,POD活性及叶绿素含量均低于野生型拟南芥,证明*ThERF1*基因的过表达增加了植株对胁迫的敏感性。

3 转录因子AP2/ERF的作用机制

转录因子AP2/ERF的作用不仅体现在激活或抑制防御基因等一系列下游靶基因的表达,其自身转录后调控也影响着转录因子AP2/ERF的活性,进而对植物的各种生物学过程产生影响。所以,理解AP2/ERF调控靶基因的机制和自身的调控机制对转录因子AP2/ERF的功能研究非常重要。

对靶基因的调控作用方面,按照转录因子的调控区活性不同可将转录因子AP2/ERF分为激活子或抑制子。抑制子进一步可分为主动抑制子和被动抑制子^[89]。主动抑制子拥有的抑制结构域能够直接结合转录起始复合物抑制转录的起始;被动抑制子不包含抑制结构域,它们抑制转录的方式是通过与激活子争夺靶基因的结合位点或直接与激活子结合,使靶基因无法转录。转录激活子AP2/ERF的转录激活域往往富含酸性氨基酸^[90],与之相反的AP2/ERF正向抑制子通常含有EAR或BRD基序^[91,92],通过与基础转录复合物的互作来抑制靶基因的转录^[4]。

转录因子自身的调控机制包括转录后调控和翻译后调控。转录后调控过程决定了转录因子AP2/ERF是否有活性。初级转录产物的可变剪切可以克服真核生物基因组有限的编码能力,由单基因编码产生多个蛋白,增加了蛋白组的多样性。在不同环境下,转录因子转录后由于可变剪切可以产生不同的转录本,进而影响植物的生长发育、胁迫应答等过程^[93]。已证明一些DREB亚家族成员如水稻*OSDREB2B*^[94]由于可变剪切产生2种类型转录本,一种在DNA结构域前有一个终止密码子,导致蛋白翻译后没有活性,另一个转录本编码具有活性的完整蛋白(图2(a))。一般在没有胁迫情况下非活性转录本主要表达,在有胁迫刺激时,有活性的转录本响应胁迫信号而大量积累^[4]。

翻译后水平的调控也会影响转录因子AP2/ERF的丰度和活性,一些AP2/ERF具有磷酸化位点,磷酸化修饰对转录因子AP2/ERF的细胞核转运、蛋白稳定性、活性有重要作用。AP2/ERF蛋白的稳定性还受26S

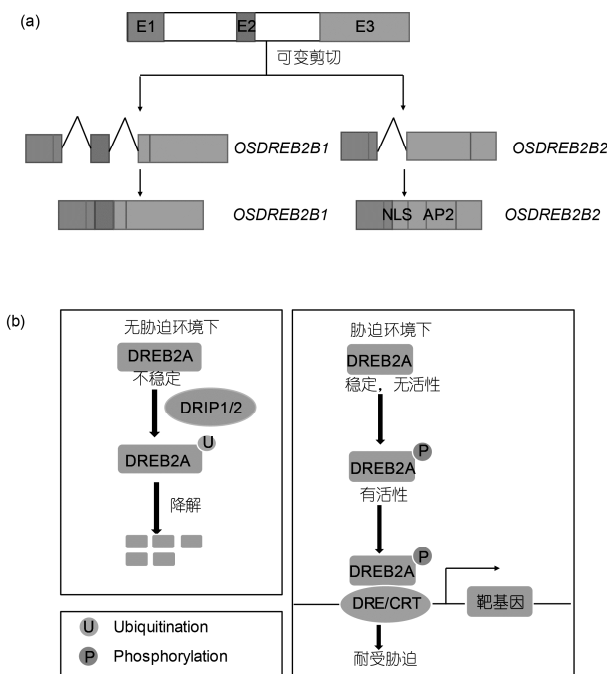


图2 转录因子AP2/ERF基因家族自身调控机制^[94,95] (a) 水稻转录因子*OSDREB2B*可变剪切过程; (b) 翻译后修饰对拟南芥转录因子DREB2A稳定性和活性影响

Figure 2 Regulatory mechanisms of AP2/ERF transcription factors^[94,95]. (a) The alternative splicing patterns of a transcription factor gene *OSDREB2B* from *Oryza sativa*; (b) post-translational mechanism affecting DREB2A protein stability and activity.

蛋白酶体途径的调控,泛素化会使ERF蛋白受到抑制或被降解。例如,在正常生长条件下,拟南芥转录因子DREB2A被具有泛素连接酶功能的DRIP1/2蛋白识别,进而被降解。在干旱、盐分等逆境下,DREB2A受到磷酸化作用而具有稳定活性,进而激活下游胁迫响应基因(图2(b))^[95]。转录因子AP2/ERF与其他蛋白质的相互作用也会影响AP2/ERF的定位、稳定性、丰度和转录活性^[31,96]。

4 转录因子AP2/ERF的研究方法

传统研究方法先通过实验分离响应某种生物学过程的转录因子(图3),分离方法包括酵母单杂交法^[9,14,16]、T-DNA标签激活^[67]、图位克隆^[10,54]和以已知转录因子保守区为模板做RACE全长克隆^[62]等。然后通过对植株进行胁迫处理,用实时荧光定量PCR技术检测转录因子的表达量,分析其可能参与的胁迫响应或生长发育过程。功能验证包括利用DNase I足迹法^[39,43]、EMSA法^[13-15]、酵母单杂交法^[15,64,71]、染色质免疫沉淀技术(ChIP)^[10]验证启动子与顺式作

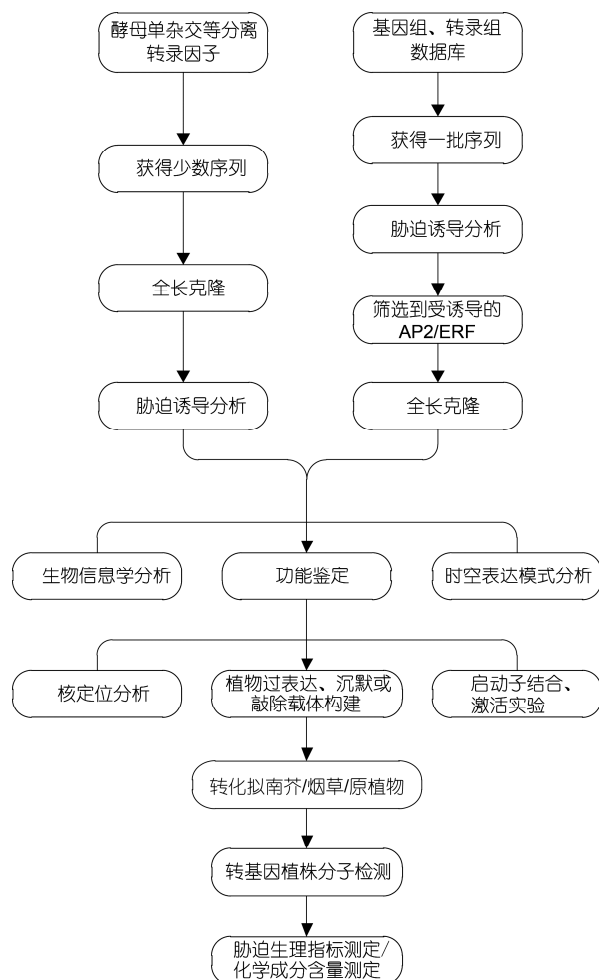


图3 转录因子 AP2/ERF 的研究技术路线

Figure 3 Investigation workflow of AP2/ERF transcription factors

用元件的结合；瞬时表达法^[15,32,57]验证转录因子能否激活报告基因的表达；最后通过转基因验证转录因子对植株的表型和化学成分含量的影响。传统研究方法难点在于转录因子的分离，其实验步骤繁琐，耗时长，成功率低，获得的转录因子少。同时，由于发现的转录因子不多，也就难于对转录因子的结构、功能和进化关系进行整体分析。

生物信息学、基因组学、转录组学等组学技术和分子生物学技术的快速发展，为转录因子的分离、筛选、功能验证提供了众多新方法，加速了转录调控机制的研究进程(图3)。以组学数据为基础的转录因子研究，省去了实验方法分离转录因子的步骤，可以从大量组学数据中搜索到转录因子的信息，在基因组水平上分析整个家族的结构、分类和进化关系^[97~99]。很多数据库收录了转录因子的结构、作用位点等详细

信息，如TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html#transfac>) 和 PlnTFDB (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>)等。一些数据库和分析软件能够分析预测转录因子的保守结构域和亚细胞定位情况，如 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/interProScan/>)，WoLF PSORT (<http://wolfsort.org/>)等。还有一些提供了顺式作用元件和蛋白互作的数据库成为研究转录因子自身调控的有力工具^[100]。组学方法的优势是最大程度获得了转录因子基因资源，但是从上百个转录因子中筛选到有功能的转录因子并非易事。通常的方法是通过比较转录组学方法找到差异表达基因^[88,101]，表达差异大的基因可能成为研究候选对象。

除了生物信息学方法外，新的分子生物学技术如RNAi技术、人工miRNA引发的基因沉默技术和嵌合抑制沉默技术，为突变体表型分析提供了技术支撑。此外，ChIP-chip技术和ChIP-Seq技术是在全基因组水平上高通量分析DNA结合位点的方法，这两种方法在揭示基因表达调控的若干机制及构建基因表达调控网络图谱中发挥重要作用^[100]。

组学和生物信息学已经成为分离筛选转录因子和预测转录因子功能的主要方法，但是经典实验方法在转录因子研究方法中仍占有重要位置，在研究中应根据具体情况对实验方法做恰当选择，以期快速获得最佳实验结果。

5 展望

转录因子AP2/ERF不仅在阐明其生物学功能的分子调控机制方面具有重要的理论价值，同时，在药用植物育种改良和活性成分的生物合成方面具有良好应用前景。

药用植物的药材产量和品质受到各种生物与非生物胁迫的影响，药用植物在进化过程中，自身建立了一系列复杂的分子机制使其能够在恶劣环境中生存，在适应复杂环境过程中产生了起重要作用的调控蛋白。在所有调控蛋白中，转录因子在激活防御基因的表达方面起核心作用。转录因子通过与胁迫响应基因启动子上顺式作用元件的结合，激活一个级联或整个网络的基因，这种特征使其成为基因工程的强大工具，对药用植物的育种改良有重要价值^[55]。很多植物如拟南芥、水稻、烟草中的抗逆转录因子AP2/ERF已被分离鉴定，但是获得能够响应多种胁迫

迫且具有很强耐受力的AP2/ERF转基因植株的研究还在实验阶段,植株矮化和非正常表型是植物育种研究的两个重要局限,可能由于转基因植株生长阶段、基因来源、基因启动子来源等原因造成的,利用不同来源启动子和基因融合可以解决转基因植株的非正常生长问题.实验证实一部分AP2/ERF转基因植株比野生型植株生长状态好,证明转录因子AP2/ERF在药用植物遗传育种方面具有应用价值^[4].

基因组学、转录组学、生物信息学的快速发展加快了转录因子的研究进程,从全基因组水平分析转录因子基因家族的蛋白结构特征,并与近缘物种比较进化关系,有助于预测未知转录因子AP2/ERF的功能,同时结合组织部位、发育阶段、胁迫诱导条件

下转录组差异基因的表达模式分析,从大量家族成员中筛选到可能与特定功能相关的转录因子.陈士林等人^[101,102]已完成药用植物丹参全基因组测序,AP2/ERF家族共有170个成员,对MEJA诱导的丹参叶片进行转录组测序分析,有6个转录因子AP2/ERF表达上调,这些转录因子可能参与丹参活性成分的生物合成.中药合成生物学是通过在底盘细胞中设计和装配天然药物生物合成相关元件,实现有效成分高效的异源合成^[102].其中转录因子是生物合成途径重要调控元件,AP2/ERF的深入研究将有助于丰富生物元件库,在药用植物活性成分生物合成中,关键性转录因子AP2/ERF将可能通过激活特定代谢流向,提高代谢通量,最终提高目标产物的产率.

参考文献

- 1 Drews G N, Bowman J L, Meyerowitz E M. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell*, 1991, 65: 991–1002
- 2 Kunst L, Klenz J E, Martinez-Zapater J, et al. *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 1989, 1: 1195–1208
- 3 Shannon S, Meeks-Wagner D R. Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1993, 5: 639–655
- 4 Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P. *APETALA2*/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol*, 2013, 199: 639–649
- 5 Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, et al. DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: Structure, function, and evolution. *Trends Plant Sci*, 2013, 18: 267–276
- 6 Houston K, McKim S M, Comadran J, et al. Variation in the interaction between alleles of *HvAPETALA2* and microRNA172 determines the density of grains on the barley inflorescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 16675–16680
- 7 Woo H R, Kim J H, Kim J, et al. The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2010, 61: 3947–3957
- 8 Jofuku K D, den Boer B G, van Montagu M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 1994, 6: 1211–1225
- 9 Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 1995, 7: 173–182
- 10 Aya K, Hobo T, Sato-Izawa K, et al. A novel AP2-type transcription factor, SMALL ORGAN SIZE1, controls organ size downstream of an auxin signaling pathway. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 897–912
- 11 Chuck G, Meeley R B, Hake S. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene indeterminate *spikelet1*. *Genes Dev*, 1998, 12: 1145–1154
- 12 Zhuang J, Anyia A, Vidmar J, et al. Discovery and expression assessment of the AP2-like genes in *Hordeum vulgare*. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33: 1639–1649
- 13 Zhou J, Tang X, Martin G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J*, 1997, 16: 3207–3218
- 14 Menke F L, Champion A, Kijne J W, et al. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J*, 1999, 18: 4455–4463
- 15 Yu Z X, Li J X, Yang C Q, et al. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Mol Plant*, 2012, 5: 353–365

- 16 Dai Y, Qin Q, Dai D, et al. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding methyl jasmonate-responsive transcription factor TcAP2 from *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 1801–1809
- 17 Ansari M T, Saify Z S, Sultana N, et al. Malaria and artemisinin derivatives: An updated review. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13: 1879–1902
- 18 Moudi M, Go R, Yien C Y, et al. Vinca Alkaloids. *Int J Prev Med*, 2013, 4: 1231–1235
- 19 Xu S, Liu P. Tanshinone II-A: New perspectives for old remedies. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23: 149–153
- 20 Liu Q, Zhang G Y, Chen S Y. The structure and regulation of plant transcription factors (in Chinese). *Chin Sci Bull (Chinese Ver)*, 2000, 45: 1465–1474 [刘强, 张贵友, 陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用. *科学通报*, 2000, 45: 1465–1474]
- 21 Yan X, Zhang L, Chen B, et al. Functional identification and characterization of the *Brassica napus* transcription factor gene *BnAP2*, the ortholog of *Arabidopsis thaliana* *APETALA2*. *PLoS One*, 2012, 7: e33890
- 22 Zhang P, Yang P, Zhang Z, et al. Isolation and characterization of a buffalograss (*Buchloe dactyloides*) dehydration responsive element binding transcription factor, *BdDREB2*. *Gene*, 2014, 536: 123–128
- 23 Zhang X X, Tang Y J, Ma Q B, et al. *OsDREB2A*, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean. *PLoS One*, 2013, 8: e83011
- 24 Tang M, Liu X, Deng H, et al. Over-expression of *JcDREB*, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor gene in woody biodiesel plant *Jatropha curcas*, enhances salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2011, 181: 623–631
- 25 Park J M, Park C J, Lee S B, et al. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*, 2001, 13: 1035–1046
- 26 McGrath K C, Dombrecht B, Manners J M, et al. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol*, 2005, 139: 949–959
- 27 Zhang H, Zhang D, Chen J, et al. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 825–834
- 28 Lai Y, Dang F, Lin J, et al. Overexpression of a Chinese cabbage BrERF11 transcription factor enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 62: 70–78
- 29 Dong J, Wang X, Wang K, et al. Isolation and characterization of a gene encoding an ethylene responsive factor protein from *Ceratoides arborescens*. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 1349–1357
- 30 Zhang H, Liu W, Wan L, et al. Functional analyses of ethylene response factor JERF3 with the aim of improving tolerance to drought and osmotic stress in transgenic rice. *Transgenic Res*, 2010, 19: 809–818
- 31 Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 470–478
- 32 Li C W, Su R C, Cheng C P, et al. Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway. *Plant Physiol*, 2011, 156: 213–227
- 33 Zhao L, Hao D, Chen L, et al. Roles for a soybean RAV-like orthologue in shoot regeneration and photoperiodicity inferred from transgenic plants. *J Exp Bot*, 2012, 63: 3257–3270
- 34 Matias-Hernandez L, Aguilar-Jaramillo A E, Marin-Gonzalez E, et al. RAV genes: Regulation of floral induction and beyond. *Ann Bot*, 2014, doi: 10.1093/aob/mcu069
- 35 Giri M K, Swain S, Gautam J K, et al. The *Arabidopsis thaliana* *At4g13040* gene, a unique member of the AP2/EREBP family, is a positive regulator for salicylic acid accumulation and basal defense against bacterial pathogens. *J Plant Physiol*, 2014, 171: 860–867
- 36 Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2006, 140: 411–432
- 37 Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290: 998–1009
- 38 Allen M D, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, et al. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J*, 1998, 17: 5484–5496
- 39 Buttner M, Singh K B. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5961–5966
- 40 Okamuro J K, Caster B, Villarreal R, et al. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7076–7081
- 41 Shigyo M, Ito M. Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes. *Dev Genes Evol*, 2004, 214: 105–114
- 42 Kim S, Soltis P S, Wall K, et al. Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2*-like gene family. *Mol Biol Evol*, 2006, 23: 107–120

- 43 Nole-Wilson S, Krizek B A. DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 4076–4082
- 44 Krizek B A. AINTEGUMENTA utilizes a mode of DNA recognition distinct from that used by proteins containing a single AP2 domain. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 1859–1868
- 45 Xue G P, Loveridge C W. *HvDRF1* is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant J*, 2004, 37: 326–339
- 46 Niu X, Helentjaris T, Bate N J. Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *Plant Cell*, 2002, 14: 2565–2575
- 47 Luo G Y, Ye L F, Chen X B. Research progress of *Arabidopsis* B3 transcription factor gene superfamily (in Chinese). *Chem Life*, 2013, 33: 287–293 [罗光宇, 叶玲飞, 陈信波. 拟南芥B3转录因子基因超家族. 生命的化学, 2013, 3: 287–293]
- 48 Magnani E, Sjolander K, Hake S. From endonucleases to transcription factors: Evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell*, 2004, 16: 2265–2277
- 49 Wuitschick J D, Lindstrom P R, Meyer A E, et al. Homing endonucleases encoded by germ line-limited genes in *Tetrahymena thermophila* have APETALA2 DNA binding domains. *Eukaryot Cell*, 2004, 3: 685–694
- 50 Balaji S, Babu M M, Iyer L M, et al. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 3994–4006
- 51 Moure C M, Gimble F S, Quijcho F A. Crystal structure of the intein homing endonuclease PI-SceI bound to its recognition sequence. *Nat Struct Biol*, 2002, 9: 764–770
- 52 Shen B W, Landthaler M, Shub D A, et al. DNA binding and cleavage by the HNH homing endonuclease I-HmuI. *J Mol Biol*, 2004, 342: 43–56
- 53 Flick K E, Jurica M S, Monnat R J Jr. et al. DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-PpoI. *Nature*, 1998, 394: 96–101
- 54 Zhou Y, Lu D, Li C, et al. Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor SHATTERING ABORTION 1. *Plant Cell*, 2012, 24: 1034–1048
- 55 Akhtar M, Jaiswal A, Taj G, et al. DREB1/CBF transcription factors: Their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *J Genet*, 2012, 91: 385–395
- 56 Sohn K H, Lee S C, Jung H W, et al. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 2006, 61: 897–915
- 57 Shukla R K, Raha S, Tripathi V, et al. Expression of CAP2, an APETALA2-family transcription factor from chickpea, enhances growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 2006, 142: 113–123
- 58 Liu Z, Gu C, Chen F, et al. Identification and expression of an APETALA2-like gene from *Nelumbo nucifera*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168: 383–391
- 59 Luo H, Chen S, Jiang J, et al. The AP2-like gene *NsAP2* from water lily is involved in floral organogenesis and plant height. *J Plant Physiol*, 2012, 169: 992–998
- 60 Wang L, Li Z, He C. Transcriptome-wide mining of the differentially expressed transcripts for natural variation of floral organ size in *Physalis philadelphica*. *J Exp Bot*, 2012, 63: 6457–6465
- 61 Morcillo F, Gallard A, Pillot M, et al. *EgAP2-I*, an *AINTEGUMENTA*-like (*AIL*) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. *Planta*, 2007, 226: 1353–1362
- 62 Dai Y L. Molecular cloning and characterization of AP2-type transcription factors involved in isoprenoid biosynthetic pathway of *Taxus cuspidata* (in Chinese). Doctor Dissertation. Shanghai: Fudan University, 2008 [戴怡龄. 红豆杉中与异戊二烯代谢途径相关的AP2类转录调控因子的克隆与功能研究. 博士学位论文. 上海: 复旦大学, 2008]
- 63 Li C, Guo M Y, Han L B. Overexpression of *OjDREB* gene increases tolerance to salt in transgenic tobacco (in Chinese). *Acta Tab Sin*, 2012, 18: 72–76 [李聪, 郭梦阳, 韩烈保. 转*OjDREB*基因提高烟草耐盐能力的研究. 中国烟草学报, 2012, 4: 72–76]
- 64 Sun J, Peng X, Fan W, et al. Functional analysis of *BpDREB2* gene involved in salt and drought response from a woody plant *Broussonetia papyrifera*. *Gene*, 2014, 535: 140–149
- 65 Navarro M, Marque G, Ayac C, et al. Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *J Exp Bot*, 2009, 60: 2713–2724
- 66 Cong L, Chai T Y, Zhang Y X. Characterization of the novel gene *BjDREB1B* encoding a DRE-binding transcription factor from *Brassica juncea* L. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371: 702–706
- 67 van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 2000, 289: 295–297

- 68 Lu X, Zhang L, Zhang F, et al. AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea*. *New Phytol*, 2013, 198: 1191–1202
- 69 Zhang W, Zou A, Miao J, et al. *LeERF-I*, a novel AP2/ERF family gene within the B3 subcluster, is down-regulated by light signals in *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Biol (Stuttg)*, 2011, 13: 343–348
- 70 Shoji T, Kajikawa M, Hashimoto T. Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell*, 2010, 22: 3390–3409
- 71 Sears M T, Zhang H, Rushton P J, et al. NtERF32: A non-NIC2 locus AP2/ERF transcription factor required in jasmonate-inducible nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Mol Biol*, 2014, 84: 49–66
- 72 De Boer K, Tilleman S, Pauwels L, et al. APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant J*, 2011, 66: 1053–1065
- 73 Guo Z J, Chen X J, Wu X L, et al. Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 607–618
- 74 Fischer U, Droge-Laser W. Overexpression of *NtERF5*, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to *tobacco mosaic virus*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 1162–1171
- 75 Lee J H, Kim D M, Lee J H, et al. Functional characterization of NtCEF1, an AP2/EREBP-type transcriptional activator highly expressed in tobacco callus. *Planta*, 2005, 222: 211–224
- 76 Liu W Y, Chiou S J, Ko C Y, et al. Functional characterization of three ethylene response factor genes from *Bupleurum kaoi* indicates that BkERFs mediate resistance to *Botrytis cinerea*. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 375–381
- 77 Li C. Identification and characterization of transcription factor *OjERF* gene from *Ophiopogon japonicus* (in Chinese). Doctor Dissertation. Beijing: Beijing Forestry University, 2013 [李聪. 麦冬OjERF基因的克隆与功能研究. 博士学位论文. 北京: 北京林业大学, 2013]
- 78 Liu W J. Regulation mechanism of an ethylene response factor gene, *ThERF1*, from *Tamarix hispida* in response to high-salt stress (in Chinese). Doctor Dissertation. Harbin: Northeast Forestry University, 2013 [刘文进. 柽柳乙烯响应因子ThERF1基因应答高盐胁迫的调控机理. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013]
- 79 Asamizu E, Shimoda Y, Kouchi H, et al. A positive regulatory role for *LjERF1* in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, 2008, 147: 2030–2040
- 80 Tang M, Sun J, Liu Y, et al. Isolation and functional characterization of the *JcERF* gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 419–428
- 81 Zhou C, Zhao S J, Hu Z B. Periwinkle secondary molecular mechanism of transcriptional regulation of metabolic (in Chinese). *Plant Physiol J*, 2010, 3: 284–290 [周晨, 赵淑娟, 胡之璧. 长春花次生代谢转录调控的分子机制. 植物生理学通讯, 2010, 3: 284–290]
- 82 Peebles C A, Hughes E H, Shanks J V, et al. Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time. *Metab Eng*, 2009, 11: 76–86
- 83 Pan Q, Wang Q, Yuan F, et al. Overexpression of *ORCA3* and *G10H* in *Catharanthus roseus* plants regulated alkaloid biosynthesis and metabolism revealed by NMR-metabolomics. *PLoS One*, 2012, 7: e43038
- 84 Wang C T, Liu H, Gao X S, et al. Overexpression of *G10H* and *ORCA3* in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 887–894
- 85 van der Fits L, Memelink J. The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J*, 2001, 25: 43–53
- 86 Suttipanta N, Pattanaik S, Gunjan S, et al. Promoter analysis of the *Catharanthus roseus* geraniol 10-hydroxylase gene involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1769: 139–148
- 87 De Sutter V, Vanderhaeghen R, Tilleman S, et al. Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells. *Plant J*, 2005, 44: 1065–1076
- 88 Chen L R, Chen Y J, Lee C Y, et al. MeJA-induced transcriptional changes in adventitious roots of *Bupleurum kaoi*. *Plant Sci*, 2007, 173: 12–24
- 89 Zhang J F, Quan R D, Huang R F. Studies on structure and function of repressors with EAR motif (in Chinese). *J Agric Sci Technol*, 2011, 13: 53–57 [张健飞, 权瑞党, 黄荣峰. EAR转录抑制子结构及功能的研究. 中国农业科技导报, 2011, 4: 53–57]
- 90 Tiwari S B, Belachew A, Ma S F, et al. The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *Plant J*, 2012, 70: 855–865
- 91 Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, et al. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*, 2001, 13: 1959–1968
- 92 Ikeda M, Ohme-Takagi M. A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 970–975

- 93 Seo P J, Park M J, Park C M. Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: Mechanisms and functions. *Planta*, 2013, 237: 1415–1424
- 94 Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics*, 2010, 283: 185–196
- 95 Lyzenga W J, Stone S L. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *J Exp Bot*, 2012, 63: 599–616
- 96 Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819: 86–96
- 97 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 Exp Bot*, 2008, 59: 4095–4107
- 98 Xu W, Li F, Ling L, et al. Genome-wide survey and expression profiles of the AP2/ERF family in castor bean (*Ricinus communis* L.). *BMC Genomics*, 2013, 14: 785
- 99 Song X, Li Y, Hou X. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*). *BMC Genomics*, 2013, 14: 573
- 100 Wang C Q, Kong W W, Li J. Current research method of transcription factors in plants (in Chinese). *Lett Biotechnol*, 2013, 24: 118–123 [王传琦, 孔稳稳, 李晶. 植物转录因子最新研究方法. *生物技术通讯*, 2013, 1: 118–123]
- 101 Luo H, Zhu Y, Song J, et al. Transcriptional data mining of *Salvia miltiorrhiza* in response to methyl jasmonate to examine the mechanism of bioactive compound biosynthesis and regulation. *Physiol Plant*, 2014, 152: 241–255
- 102 Chen S L, Zhu X X, Li C F, et al. Genomics and synthetic biology of traditional Chinese medicine (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2012, 47: 1070–1078 [陈士林, 朱孝轩, 李春芳, 等. 中药基因组学与合成生物学. *药学报*, 2012, 8: 1070–1078]

Research and perspectives on AP2/ERF transcription factors in medicinal plants

Ji AiJia¹, LUO HongMei¹, XU ZhiChao¹, ZHANG Xin¹, SONG JingYuan^{1,2} & CHEN ShiLin^{1,3}

¹Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

²Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing 408435, China;

³Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

As a major source of Chinese medicines and traditional drugs worldwide, medicinal plants are facing challenges such as resource scarcity and low bioactive compound content. Regulating gene expression by transcription factors (TFs) is an effective method to coordinate the development of medicinal plants and the biosynthesis of active compounds. Therefore, many researches have been focused on TFs. As one of the largest transcription factor families, AP2/ERF TFs contain at least one AP2 DNA binding domain. This gene family is divided into five subfamilies, namely AP2 (APETALA2), ERF (ethylene-responsive factor), DREB (dehydration-responsive element binding proteins), RAV (related to ABI3/VP1) and Soloist. This review emphasizes that AP2/ERF TFs regulate the biosynthesis of active compounds, development and stress responses of medicinal plants. The regulatory mechanism and research methods for AP2/ERF TFs are also elaborated. Genomics, transcriptomics, and bioinformatics are proposed to be powerful tools for isolation, screening and prediction of AP2/ERF TFs. This review may serve as a guide for future studies on unknown AP2/ERF TFs. In the future, knowledge of the functions and regulatory mechanisms of AP2/ERF TFs may contribute to the enhancement of bioactive compound production by metabolic engineering and the breeding of fine varieties of medicinal plants. Such work would help to address the growing global demand for natural medicines.

transcription factors (TFs), AP2/ERF, medicinal plants, bioactive compounds, growth and development

doi: 10.1360/N972014-00697