

doi:10.7668/hbxb.2014.06.004

# 甘薯抗逆相关基因 *IbERF3* 的克隆与表达分析

边小峰, 谢一芝, 郭小丁, 贾赵东, 马佩勇

(江苏省农业科学院 粮食作物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了提高甘薯的抗逆能力, 通过 RACE 的方法克隆到一个含有 AP2 结构域的 ERF 家族基因, 该家族基因在植物逆境调控中起重要作用。该基因 cDNA 全长 1 025 bp, 编码区为 669 bp, 编码 223 个氨基酸, 该基因在甘薯中未曾报道, 将其命名为 *IbERF3*。通过进化树分析发现, *IbERF3* 在茄目类作物中具有一定的保守性。通过定量 PCR 研究发现, *IbERF3* 在甘薯根、叶中都有表达, 且在叶片中的表达量最高, 同时研究发现, 在干旱、盐胁迫处理后 *IbERF3* 在根和叶片中表达量都显著上升。在用植物激素 ABA 处理后, *IbERF3* 的表达量逐渐上升并在 24 h 时达到最大。因此, 推测 *IbERF3* 在甘薯抗逆途径中起重要作用。

**关键词:** 甘薯; ERF; 基因克隆; 表达; 非生物逆境

**中图分类号:** Q78; S531.03      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-7091(2014)06-0016-05

## Cloning and Expression Profiles of *IbERF3*, an Abiotic Stress Related Gene in Sweet Potato

BIAN Xiao-feng, XIE Yi-zhi, GUO Xiao-ding, JIA Zhao-dong, MA Pei-yong

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

**Abstract:** In order to improve the stress resistance of sweet potato, we used RACE method to clone *IbERF3* contained an AP2 domain which belong to ERF superfamily which plays an important role in stress resistance. Blast showed that *IbERF3* was a new gene in sweet potato that had never been reported. The cDNA length of *IbERF3* was 1 025 bp, and contained an 669 bp open reading frame encoding a 223 amino acids. By homology analysis showed that *IbERF3* was conserved in Solanaceae plants. Constitutive expression showed that *IbERF3* express in root, leaf and stem, and the expression of *IbERF3* was the highest in leaf. The result reveal that the expression of *IbERF3* was induced by drought, salt both in leaf and root by qRT-PCR. After treating with ABA, The expression of *IbERF3* increased gradually and reached a maximum at 24 h. It suggests that *IbERF3* plays significant roles in responses to abiotic stress in sweet potato.

**Key words:** Sweet potato; ERF; Gene cloning; Expression; Abiotic stress

甘薯 (*Ipomoea batatas*) 不仅是重要的粮食作物, 还可预防多种疾病的发生, 具有保健延寿作用<sup>[1-2]</sup>, 而且还是生产燃料乙醇的理想原料。同其他作物相比, 甘薯比较耐贫瘠。我国旱盐碱面积广阔, 研究选育具有抗旱性、耐盐性的甘薯品种, 并在我国旱盐碱地区大规模种植, 对保障粮食安全和生物能源发展有重大意义。

植物 AP2/ERF 是一个庞大的转录因子基因家族, 因含有由 60 ~ 70 个氨基酸组成的 AP2/ERF 结

构域而得名, 存在于所有的植物中<sup>[3]</sup>。在拟南芥中共获得 145 个 AP2/ERF 家族基因<sup>[4]</sup>。AP2/ERF 转录因子参与多种生物学过程, 包括植物生长、花发育、果实发育、种子发育、损伤、病菌防御、高盐、干旱等环境胁迫响应。AP2/ERF 类转录因子参与水杨酸、茉莉酸、乙烯、脱落酸等多种信号转导途径, 而且是逆境信号交叉途径中的连接因子<sup>[3-5]</sup>。过量表达烟草 ERF 基因 *Tsi1* 和 *OPBP*<sup>[6-7]</sup>、西红柿中的 *TERF1* 和 *JERF1*<sup>[8-9]</sup> 以及辣椒中的 *CaERFLP1*<sup>[10]</sup>

收稿日期: 2014-08-08

基金项目: 江苏省青年基金项目 (BK20130716); 江苏省农业科技自主创新基金项目 (CX(12)5018); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-11-C-03); 国家自然科学基金 (31301379)

作者简介: 边小峰 (1983-), 男, 江苏无锡人, 助理研究员, 博士, 主要从事甘薯遗传与育种研究。

通讯作者: 谢一芝 (1962-), 男, 江苏无锡人, 研究员, 主要从事甘薯遗传育种及栽培生理研究。

和 *CaPFI*<sup>[11]</sup> 都能提高转基因植株的耐逆性,包括耐盐、旱以及低温等。因此,研究 ERF 家族基因能为甘薯的耐逆育种提供基因资源。

*IbERF1* 和 *IbERF2* 是从甘薯愈伤中克隆得到的 2 个 AP2/ERF 家族基因,*IbERF1* 在甘薯生长的悬浮细胞中表达量很高,*IbERF2* 在须根 (Fibrous roots) 和粗色素根 (Thick pigmented roots) 中的表达量较高。在干旱、盐胁迫后 *IbERF1* 和 *IbERF2* 在根和叶片中的表达量都上调。*IbERF1* 和 *IbERF2* 还参与不同的化学应激反应和生物胁迫防御,在  $H_2O_2$ 、甲基紫精、镉、铜的胁迫以及病原菌感染后叶片中的表达量上升。将 *IbERF1* 和 *IbERF2* 在烟草叶片中进行瞬时表达,发现 *IbERF1* 和 *IbERF2* 能激活烟草体内一系列参与非生物胁迫的保护基因,如 *PR5* (Osmotin)、*ERD10* (Early responsive to dehydration-10)、铜锌超氧化物歧化酶 (CuZnSOD) 基因和过氧化氢酶 (CAT) 基因等。*IbERF1* 和 *IbERF2* 可能通过调控 *PR5*、*ERD10*、*CuZnSOD*、*CAT* 等基因表达参与逆境胁迫防御<sup>[12]</sup>。

本研究主要通过 RACE 的方法获得 1 个含有 AP2 保守结构域的 ERF 基因,并将其命名为 *IbERF3*,该基因受干旱、盐以及 ABA 诱导表达,因此,推测该基因对甘薯抗逆调控途径起重要作用,也为甘薯的抗逆分子育种提供基因资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料和 RNA 提取及反转

本研究采用江苏省农科院选育品种宁紫薯 1 号作为研究对象。RNA 提取采用 OMEGA 公司 RNA Plant Kit。采用 Bio Teke supermo III RT Kit 将 RNA 反转成 cDNA。

### 1.2 *IbERF3* 克隆

根据 NCBI 公布的 EST 序列设计 5'RACE 和 3'RACE 引物,采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 获得 5'和 3'序列,并采用软件 DNAMAN 进行序列拼接,获得全长序列。RACE 引物序列为 3' race-outer CAATACCTCCTCGGCGAC TTT, 3' race-inner CGATACAGAGGAGTTCGGAGGA; 5' race-outer TCGGGAGTGGAGCGAACAAT, 5' race-inner CAAAGTCGCCGAGGAGGTATT。全长 *IbERF3* 全长扩增引物 CATATCCACTTCCTGCTAGTCTGC; TGCTACACTGATCTCGGTCAA。采用 TOYOBO 公司的 KOD FX 酶对基因全长进行扩增,并连接全式金平端测序载体 Peasy blunt,送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

### 1.3 逆境处理方法

剪取宁紫 1 号 25 cm 的苗,并保留 3 张完全展开叶,放入 1/2 Hogland 营养液中 25 °C 培养 15 d,分别用 0.1 mol/L ABA、20% PEG6000 和 150 mmol/L NaCl 处理 3, 6, 12, 24, 48 h, 取 3 个重复,液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱。

### 1.4 *IbERF3* 生物信息学分析

获取 *IbERF3* cDNA 全长后,在 NCBI 上分别预测 ORF 和保守结构域 (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/, www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), 将 *IbERF3* 编码区氨基酸序列与 NCBI 数据库比对,获得其蛋白结构域和同源序列,并用软件 MEGA 5.1 进行进化树分析。

### 1.5 定量分析

提取各处理后的 RNA,采用 TOYOBO 公司的荧光定量试剂盒。反应在 7500 Real-time 定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 上进行,按照相对定量的方法检测基因的表达量,反应程序按照 Applied Biosystems 提供的操作手册进行,甘薯 *Tubulin* 基因作为反应中的内参,*Tubulin* 引物序列:F:5'-CAACTACC AGCCACCAACTGT-3', R:5'-CAAGATCCTCAGGAGC TTCAC-3'; *IbERF3* 定量引物:F:5'-ATCTGGTAACG GCGGAAGG-3', R:5'-GAACGCAGCACAATCGTAG GC-3'。

## 2 结果与分析

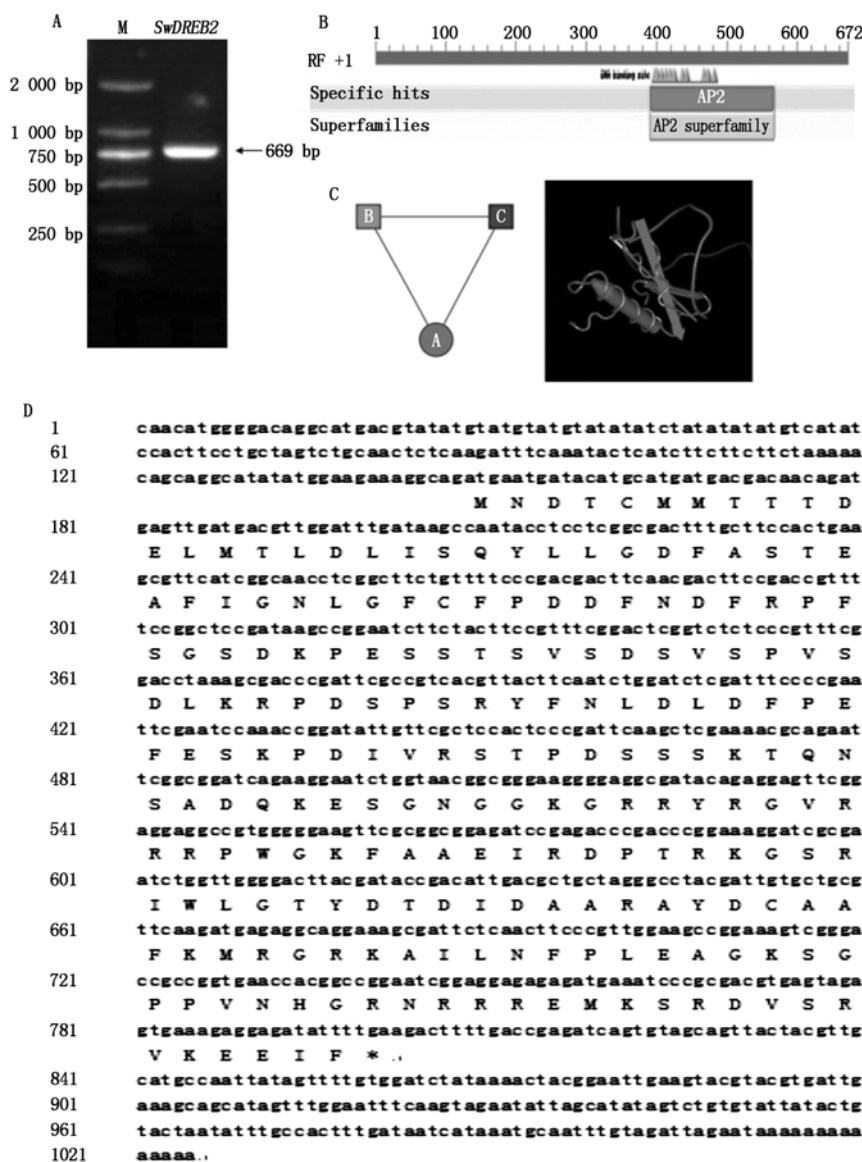
### 2.1 *IbERF3* 基因序列克隆

根据 AP2 保守结构域的序列,从 NCBI 甘薯 EST 库中获得 1 段含有 AP2 结构域的 EST 序列,根据其序列信息设计 3'和 5'RACE 引物,最终获得 cDNA 全长为 1 025 bp,编码区长度为 669 bp,编码 223 个氨基酸,预测其蛋白分子量为 25.13 kDa,等电点为 8.02,并将其命名为 *IbERF3*,通过 NCBI 保守结构域预测发现,该基因在编码区 400 ~ 450 bp 间含有保守的 AP2 结构域,并且蛋白结构预测表明该基因编码的蛋白含有 2 个乙烯结合元件 (图 1)。

### 2.2 *IbERF3* 的进化树分析

利用 NCBI Blast 方法在 GenBank 进行同源查找,获得了与 *IbERF3* 核苷酸序列具有相似性的植物种属同源基因。在多重比较分析的基础上,建立了与其各同源植物种属基因的系统进化树 (图 2)。研究发现,*IbERF3* 与矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中的 *ERF9* 同源性最高,并且与 *IbERF3* 同源性较高的都为茄目作物,番茄 (*Solanum lycopersicum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*),表明该基因在茄目作物中具

有一定的保守性。



A. *IbERF3* 电泳图; B. AP2 保守结构域预测; C. *IbERF3* 蛋白结构预测, B 框和 C 框以及三维图中箭头所指为乙烯结合元件; D. *IbERF3* 全长序列以及编码区序列。  
A. Electrophoretogram of *IbERF3*; B. Prediction of AP2 conserved domain; C. Protein structure of *IbERF3*, B, C box and arrows was ethylene binding element; D. Full length and coding region of *IbERF3*.

图 1 *IbERF3* 序列及结构域分析

Fig. 1 Sequence of *IbERF3* and conserved domain analysis

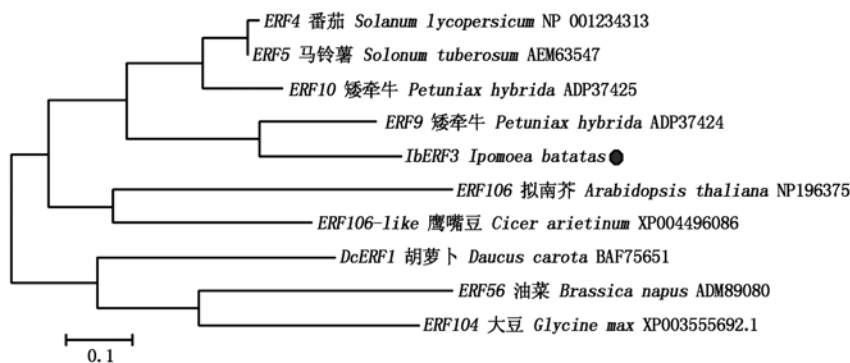


图 2 *IbERF3* 与其同源基因的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *IbERF3* and its homologous gene in plant species

### 2.3 *IbERF3* 组成性表达分析

将苗长为 25 cm 的甘薯水培 15 d, 分别取其根、茎以及第 4 张展开叶提取 RNA 分析 *IbERF3* 的组成性表达, 研究发现该基因在叶片中表达量最高(图 3)。

### 2.4 *IbERF3* 受干旱和盐胁迫诱导表达

将苗长为 25 cm 的甘薯水培 15 d 后, 分别用 20% 的 PEG6000 和 150 mmol/L 的 NaCl 分别进行模拟干旱处理和盐处理。分别在处理 3, 6, 12, 24, 48 h 检测叶片和根中的 *IbERF3* 的表达量。定量结果显示, 在干旱胁迫后 3 h, *IbERF3* 的表达量在根和叶片中都是先下降而后在 6 h 时迅速增加, 在根中

的积累量达到最大, 而后表达量再减弱; 干旱胁迫 48 h 叶片表达量再次升高达峰值。盐处理后, 根和叶片中的表达量都是在 24 h 达到最高(图 4)。

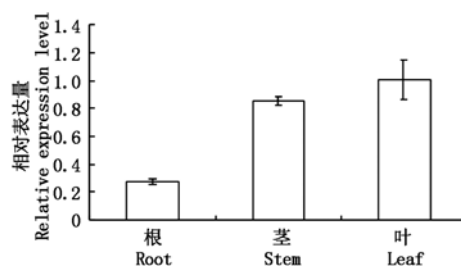
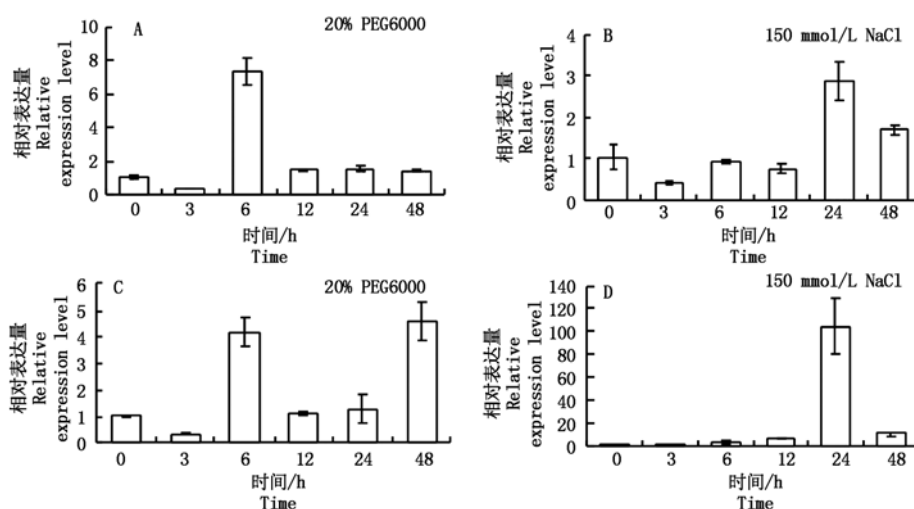


图 3 *IbERF3* 在根、茎、叶中的表达

Fig. 3 The transcript level of *IbERF3* in root, stem and leaf of sweet potato



A, C. 在干旱胁迫下根和叶片的表达量; B, D. 在盐胁迫下根和叶片的表达量。

A, C. The expression level in root and leaf under drought stress; B, D. The expression level in root and leaf under salt stress.

图 4 *IbERF3* 在干旱和盐胁迫下的表达模式

Fig. 4 The expression mode of *IbERF3* under drought and salt stress

### 2.5 *IbERF3* 受植物激素 ABA 诱导表达

ABA 途径是一条重要的调控植物抗逆的途径。将苗长为 25 cm 的甘薯水培 15 d 后, 用 0.1 mmol/L 的植物激素 ABA 处理。分别在处理 3, 6, 12, 24,

48 h 检测根和叶片中的 *IbERF3* 的表达量, 处理 3 h 后表达量略有降低, 而后逐渐上升, 24 h 后表达量达到最高(图 5)。

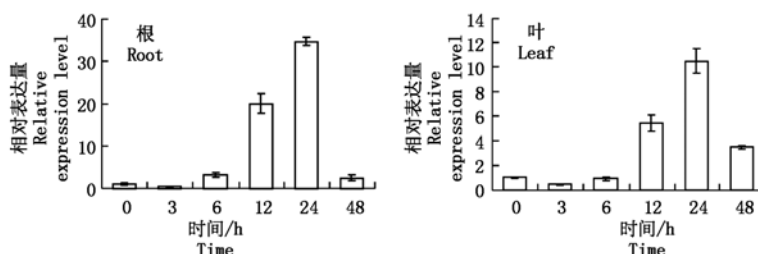


图 5 *IbERF3* 在激素 ABA 处理后在根和叶中的表达模式

Fig. 5 The expression mode of *IbERF3* in root and leaf induced by ABA

## 3 结论与讨论

本研究中克隆到一个含有 AP2 保守结构域的 ERF 家族基因 *IbERF3*, 通过同源比对发现 *IbERF3*

在茄目作物中具有一定的保守性。并且 *IbERF3* 和模式作物拟南芥 *AtERF106* 较为相似, *AtERF106* 属于 ERF 家族基因中的 B3 亚家族基因, B3 亚家族基因主要参与乙烯信号的传导, 在抗病和逆境胁迫中

都起重要作用<sup>[5]</sup>。如 *AtERF1*、*NtERF5* 在抗病性上起重要作用<sup>[13-14]</sup>, *TERF1*、*OPBP1* 在提高植物的耐盐性途径中起重要作用<sup>[7-8]</sup>。本研究中克隆到的 *IbERF3* 对盐、旱都响应表达,和 B3 亚家族基因的特点相似,并且 *IbERF3* 对 ABA 也响应表达,推测该基因是 ABA 抗逆途径中的一个重要的转录因子<sup>[15]</sup>。而该基因是否也在抗病过程中起作用还需要进一步的研究。

本研究中,分别采用盐、旱以及植物激素 ABA 处理甘薯幼苗,研究发现 *IbERF3* 在不同的处理下根和茎都体现了上调表达的趋势。在旱胁迫下根和叶表达量达到峰值的时间是不同的,但在 6 h 都体现了明显的上调表达。在盐和 ABA 的处理下,无论在根和叶中达到峰值的时间都是处理后 24 h,因此,推测 *IbERF3* 参与了依赖 ABA 的抗逆途径。在受盐、旱以及植物激素 ABA 处理后,*IbERF3* 的表达量都在处理 3 h 后下降,表明植株当刚受到逆境胁迫处理时,并没有接受响应信号,表达未被激活,而是在一段时间以后才被激活,表达量迅速上升,因此,推测 *IbERF3* 受上游的某个信号基因调控。

本研究克隆的 *IbERF3* 是甘薯中新发现的一个 AP2/ERF 家族基因,未有前人报道。在先前的研究中,已在甘薯中报道 2 个 ERF 基因, *IbERF1* 和 *IbERF2*,这 2 个基因都受干旱和盐胁迫诱导<sup>[12]</sup>,其表达模式与本研究中 *IbERF3* 基因相似。*IbERF1* 和 *IbERF2* 还受重金属离子诱导和病原菌诱导表达, *IbERF3* 是否也受金属离子诱导和病原菌诱导表达有待进一步的研究,并且其抗逆境胁迫的功能需通过转基因进行功能的验证。

#### 参考文献:

- [1] Kays S J, Kays S E. Sweetpotato chemistry in relation to health [C]. Sweetpotato Production Systems toward the 21st Century Kyushu National Agri Expt Sta, Miyakonojo, Miyazaki, Japan, 1998; 231 - 272.
- [2] 谢一芝,郭小丁,贾赵东,等. 紫心甘薯育种现状及展望[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 709 - 713.
- [3] 张计育,王庆菊,郭忠仁. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展 [J]. 遗传, 2012, 34: 835 - 847.
- [4] Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(2): 86 - 96.
- [5] 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.
- [6] 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 [J]. The Plant Cell, 2001, 13(5): 1035 - 1046.
- [7] 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 [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55(4): 607 - 618.
- [8] Huang Z J, Zhang Z J, Zhang X L, et al. Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes [J]. FEBS Letters, 2004, 573(1/3): 110 - 116.
- [9] Zhang H, Huang Z, Xie B, et al. The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco [J]. Planta, 2004, 220(2): 262 - 270.
- [10] Lee J H, Hong J P, Oh S K, et al. The ethylene-responsive factor like protein 1 (CaERFLP1) of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) interacts *in vitro* with both GCC and DRE/CRT sequences with different binding affinities: possible biological roles of CaERFLP1 in response to pathogen infection and high salinity conditions in transgenic tobacco plants [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55: 61 - 81.
- [11] Yi S Y, Kim J H, Joung Y H, et al. The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2004, 136(1): 2862 - 2874.
- [12] Kim Y H, Jeong J C, Park S, et al. Molecular characterization of two ethylene response factor genes in sweetpotato that respond to stress and activate the expression of defense genes in tobacco leaves [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(11): 1112 - 1120.
- [13] Solano R, Stepanova A, Chao Q, et al. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 [J]. Genes & Development, 1998, 12(23): 3703 - 3714.
- [14] Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2002, 29(1): 23 - 32.
- [15] 朱旗,徐吉臣. 植物抗旱分子机制研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010(26): 14198 - 14202.