

# 棉花抗枯萎病相关转录因子基因 *GhERFB101* 的克隆与表达分析

韩泽刚<sup>1</sup>, 赵曾强<sup>1</sup>, 何兰兰<sup>1</sup>, 柴蒙亮<sup>2</sup>, 李会会<sup>1</sup>, 张 薇<sup>1</sup>

(1. 石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832000)

**摘要:**为了探究 ERF 转录因子家族与棉花枯萎病抗性之间的关系,也为海岛抗枯萎病品种的选育工作提供新的基因资源,从 Solexa 高通量测序技术建立的棉花基因表达谱中筛选探针序列,通过电子克隆结合 RT-PCR 技术从高抗枯萎病的棉花品种中棉所 12 中克隆到一个新的 ERF-B1 亚组转录因子基因,命名为 *GhERFB101* (GenBank: KF850521)。序列分析表明,该基因开放阅读框 738 bp,编码 245 个氨基酸,含有一个保守的 AP2/ERF 结构域,在进化上与拟南芥 *AtERF11* 的亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析显示,枯萎病菌诱导后,*GhERFB101* 基因在抗病品种根中的表达量呈现下降趋势;而在感病品种中,该基因呈上调表达,随着病菌处理后时间延长,其表达量呈现先增加后降低的变化趋势,在病菌处理后 12 h 表达量达到最大,在 48 h 下降到最低。乙烯和茉莉酸诱导后,该基因表达量均呈现明显的先增加后降低的变化趋势,在乙烯处理后 2 h 基因的表达量达到最大;茉莉酸则在处理后 1 h 基因的表达量达到最大;而水杨酸诱导后基因的变化幅度不大;推测该基因可能通过茉莉酸、乙烯信号传导途径参与对枯萎病菌的防御反应。

**关键词:**棉花;ERF-B1 转录因子;枯萎病菌;基因克隆;表达分析

中图分类号:Q78;S562.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0066-07

doi:10.7668/hbxb.2015.01.011

## Cloning and Expression Analysis of Transcription Factor Gene *GhERFB101* Related to Resistant *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Cotton

HAN Ze-gang<sup>1</sup>, ZHAO Zeng-qiang<sup>1</sup>, HE Lan-lan<sup>1</sup>, CHAI Meng-liang<sup>2</sup>, LI Hui-hui<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>

(1. Agricultural College of Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** In order to explore the relationship between ERF transcription factor family and cotton resistance to *Fusarium wilt*, and provide new gene resources for breeding work of sea island cotton resistance to *Fusarium wilt*. Before this study, we constructed a digital expression profiling of cotton root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*) in different time, then we found a query sequence in it, through the method of silico cloning and RT-PCR, we cloned a new ERF-B1 subgroup transcription factor gene, named *GhERFB101* (GenBank: KF850521) from the roots of Zhongmiansuo 12 which was a high resistant cultivar to the infection of *Fov*. Sequence analysis indicated that the ORF of *GhERFB101* was 738 bp encoding 245 amino acids and a conserved AP2/ERF domain, and closed to *Arabidopsis AtERF11* in the phylogenetic relationship. Real-time RT-PCR analysis indicated that the relative expression of *GhERFB101* decreased in resistant cultivar after the treatment of *Fov*. while in the susceptible cultivar the gene expression was up regulation. With the treatment time going on, the expression level increased first and decreased then. It reached the highest after 12 h and the lowest after 48 h. After the treatment of ethylene and jasmonic acid, the expression also showed the same trend like before, the expression level reached the maximum at 2 h after the treatment of ethylene, and it reached the maximum at 1 h after the treatment of jasmonic acid. While the changes of salicylic acid treatment was not significant; we speculated that *GhERFB101* may involve

收稿日期:2014-09-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31260358);农业部转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08005-005)

作者简介:韩泽刚(1989-),男,山西临汾人,在读硕士,主要从事棉花分子育种研究。

通讯作者:张 薇(1969-),女,新疆石河子人,教授,博士,主要从事棉花分子育种研究。

in jasmonic acid and ethylene signal pathway to defense *Fov*.

**Key words:** Cotton; ERF-B1 transcription factors; *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; Gene clone; Expression analysis

海岛棉是世界上最重要的栽培棉种,因其纤维细长、洁白光泽、内在品质好,是纺制高档和特种棉纺织品的重要原料。海岛棉枯萎病是影响海岛棉产量和品质的重要病害,长期以来,由于海岛棉缺乏高抗枯萎病的基因资源,致使海岛棉抗枯萎病品种的选育工作进展缓慢。从枯萎病抗性基因丰富的陆地棉品种中充分挖掘抗病相关基因,为利用转基因技术培育海岛棉抗枯萎病新品种奠定了基础。近年来,通过基因工程技术已经得到一些与抗病相关的基因,并获得了一些抗病种质资源。但植物对病原菌的抗性是多个基因共同作用的结果,仅靠改变单一抗病基因常常难以获得预期效果,而转移调控多个抗病相关基因表达的转录因子为这一问题的解决提供了思路。

大量的研究表明,转录因子在植物与病原菌的互作中发挥着重要的调控作用。目前,已知与抗病反应有关的转录因子家族主要有以下类型: bZIP 型、ERF 型转录因子、锌指蛋白中的 WRKY 家族、MYB 家族、homeodomain 蛋白、HSF 蛋白等<sup>[1]</sup>,其中乙烯响应因子(Ethylene-responsive element-binding factor, ERF)是植物中最大的转录因子家族之一。已有的研究表明:ERFs 转录因子通过与 GCC-box 等顺式作用元件互作激活或抑制下游多个病程相关蛋白基因的表达,在植物抗病信号转导途径中发挥着重要的调控作用<sup>[2]</sup>。Sakuma 等<sup>[3]</sup>根据 DNA 结合域的数目和类型不同,把 ERF 家族又分为 2 个亚家族,即主要响应非生物胁迫的 A 组(编码 DREB/CBF-like 蛋白)和响应生物胁迫的 B 组(编码 ERF-like 蛋白),每组又各分为 6 个亚组,即 A-1 ~ A-6 亚组和 B-1 ~ B-6 共 12 个亚组。

近期研究表明,ERF-B1 亚组转录因子不仅参与植物的生长发育,更与植物的非生物胁迫和抗病反应密切相关。Zhang 等<sup>[4-5]</sup>研究发现,从番茄中克隆的 *LeERF2* 基因以及烟草中的 *TeERF2* 基因均能够参与乙烯的生物合成调控,并且与植物的抗低温响应有关。而 Yang 等<sup>[6]</sup>研究发现,拟南芥 *AtERF4* 基因不仅能够响应脱落酸、乙烯和茉莉酸胁迫,更能够抑制几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖苷酶的活性,并在枯萎病菌处理后的不同时间该基因的表达量发生了明显的变化,说明其与植物的抗病反应有关。刘坤<sup>[7]</sup>则以拟南芥 B1 亚组的基因序列为提问序列通

过电子克隆从海岛棉中获得了 *GbB1001* ~ *GbB1009* 共 9 个基因,实时荧光定量 PCR 技术证明其均能够响应黄萎病菌的诱导。

目前,棉花中预测的 ERF 亚族转录因子共有 148 个<sup>[8]</sup>,但是已报道的仅有 *GhEREB2/3*<sup>[9]</sup>、*GhERF1-6*<sup>[10-13]</sup>、*GhDREB1L* 以及 *GhDBP2/3*<sup>[14-16]</sup> 等少数几个,对棉花 ERF 亚族转录因子的了解还不够深入,ERFs 在棉花与枯萎菌互作中的分子调控机制的研究仍比较薄弱。石河子大学长绒棉育种课题组在前期研究中,利用 Solexa 高通量测序技术建立了枯萎病菌诱导棉花幼苗根部不同时间的基因表达谱,获得 66 个差异表达 AP2/ERF 转录因子基因。本研究在此基础上,从中筛选并克隆了一个 ERF-B1 亚组转录因子基因,利用实时荧光定量 PCR 技术分析其在枯萎病菌和激素胁迫下的表达情况,为海岛棉抗枯萎病品种的选育工作提供新的基因资源和理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料种植及处理

1.1.1 材料的种植 高抗枯萎病的陆地棉品种中棉所 12 和高感枯萎病的陆地棉品种新陆早 7 号由石河子大学棉花所提供。挑选经浓硫酸脱绒籽粒饱满的种子,0.1% 氯化汞浸泡 15 min 进行种子消毒,无菌水冲洗 4 ~ 5 遍。将种子种植于无菌蛭石,待棉苗长至 3 cm 左右将其移入盛有霍格兰营养液的塑料盒中(棉苗用带有孔洞的泡沫板漂浮),于 25 ℃、光照 16 h、黑暗 8 h 的培养箱中继续培育,每周换 1 次培养液<sup>[17]</sup>。

1.1.2 枯萎病菌处理 待棉苗的第一片真叶完全展开时,选取生长一致的 2 个品种棉苗分别进行枯萎病菌处理:将生长于 PDA 培养基的枯萎病菌菌落(菌种为枯萎病 7 号生理小种强致病力菌株 F430,由石河子大学植保系张莉老师提供)接种到已灭菌的查氏培养液中,28 ℃ 振荡培养 4 d,配制成浓度为  $7 \times 10^6$  个/mL 的孢子悬浮液。将长至两叶一心的棉花幼苗浸泡到孢子悬浮液中 45 min 后转入霍格兰营养液中<sup>[17]</sup>,并分别采集中棉所 12 和新陆早 7 号 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 h 的棉花根部组织,液氮速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱。

1.1.3 激素处理 待棉苗的第一片真叶完全展开

时,选取生长一致的中棉所 12 棉苗分别进行乙烯(ET)、水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)处理;将棉苗分别浸于含有 1 mmol/L ET、50  $\mu$ mol/L SA 和 1 mmol/L JA 的霍格兰营养液中。处理 0,0.5,1,2,4,8,12,24 h 后取植株的根部组织样品,液氮速冻后保存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱。

## 1.2 试验方法

1.2.1 棉花 RNA 提取及 cDNA 的合成 用改良的 CTAB 法<sup>[18]</sup>提取棉花根部组织的总 RNA。cDNA 的合成按照 TaKaRa 公司生产的 First strand cDNA synthesis kits 说明书上的步骤进行操作。

1.2.2 基因全长 cDNA 的克隆 以表达谱中筛选得到的 ERF-B1 亚组基因片段作为探针,利用 NCBI 网站中的棉花 EST 数据库,选用 tBlastn 方式进行比对分析,选择下载与之一致性高的 ESTs 序列,使用在线拼接软件 CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)进行 ESTs 序列拼接;并以拼接好的序列为新探针,继续在棉花 EST 数据库中进行同源搜索,直到拼接的序列不再延伸为止。利用 NCBI 网站上的 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析该基因的开放阅读框(ORF)并利用 Primer premier 5.0 软件设计引物扩增 ORF(引物序列为 F1:5'-ATGGCGCCGAGGGAGAAAACGG-3';R1:5'-GGATCCGGCGACTTCCGGAGC-3')。以枯萎病菌处理后的棉花根系 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得预期大小的目的片段,回收目的片段与 pMD19-T 载体连接,转化至 Top10 大肠杆菌感受态,菌液 PCR 与酶切验证后,筛选出阳性菌株,送往北京华大基因公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 利用 ExPaSy ProtParam

(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白理化性质分析;利用 ExPaSy ProtScale (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)进行蛋白亲/疏水性分析;利用 GOR4 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html))进行蛋白二级结构分析;利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)进行 AP2/ERF 结构域三级结构的同源建模分析;利用 Motif Scan ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan))进行蛋白保守域的分析;利用软件 DNAMAN 进行序列比对分析;利用 MEGA 5.0 软件进行进化树分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 使用 Primer premier 5.0 软件设计实时荧光定量 PCR 引物(F2:5'-TTACTTCGACGCTTTGGT-3';R2:5'-CATAATCAGGCGACTTCC-3'),以棉花的 *GhUBQ7* (DQ116441)基因作为内参基因(引物为 FU:5'-GAAGACCTACACCAAGCCCAAG-3';RU:5'-CGGACTCTACTCAATCCCCACC-3')。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成,所用染料为 TaKaRa 公司的 SYBR,实时荧光定量 PCR 的反应体系及程序参见 TOYOBO 公司的 SYBR<sup>®</sup>Green Realtime PCR Master Mix(QPK-212)说明书,试验设计 3 个重复,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GhERFB101* 全长 cDNA 的克隆

课题组利用 Solexa 高通量测序技术建立枯萎病菌诱导棉花幼苗根部不同时间的基因表达谱,从中发现 66 个差异表达 AP2/ERF 基因( $P < 0.005$ ,  $FDR \leq 0.001$  以及  $|\log_2 \text{ratio}| \geq 1$ )。表 1 列举出部分 ERF-B1 亚组的基因在表达谱中的表达情况。

表 1 部分 ERF-B1 亚组基因在表达谱中的表达分析

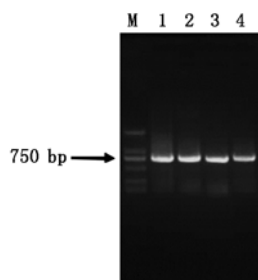
Tab.1 The expression of partial ERF-B1 genes in DGE

编号 Code	基因信息号 Gene identifier	与对照(0 h)相比基因在不同时间的表达量 The expression of genes at different time compare with CK(0 h)					
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
1	Gorai.010G155900.1	1.247	0.819	0.597	0.299	0.135	0.160
2	Gorai.005G200200.1	0.965	0.383	0.330	0.372	0.259	0.252
3	Gorai.013G169500.1	0.317	0.058	0.281	0.001	0.564	0.253
4	Gorai.009G375700.1	1.344	0.453	0.191	0.080	0.090	0.215
5	Gorai.002G067600.1	1.235	0.373	0.165	0.174	0.075	0.108

经过比较分析,选取基因信息号为 Gorai.010G155900.1 的基因片段为探针,利用 CAP3 在线拼接软件对从棉花 EST 数据库中检索到的一致性较高的 ESTs 序列进行拼接得到基因序列,并依据此序列的 ORF 设计引物,利用 RT-PCR 方法从枯萎病

菌处理后的棉花根部 cDNA 中扩增获得序列长度约为 730 bp 的目的片段(图 1),将回收该片段与 pMD19-T 连接、转化后测序。测序结果表明,该片段全长 738 bp,其核苷酸序列与电子拼接序列一致,含有该转录因子保守的 AP2/ERF 结构域,将其命名

为 *GhERFB101*, GenBank 登录号为 KF850521。进化树分析表明,该基因属于 ERF-B1 亚组成员(图 2)。

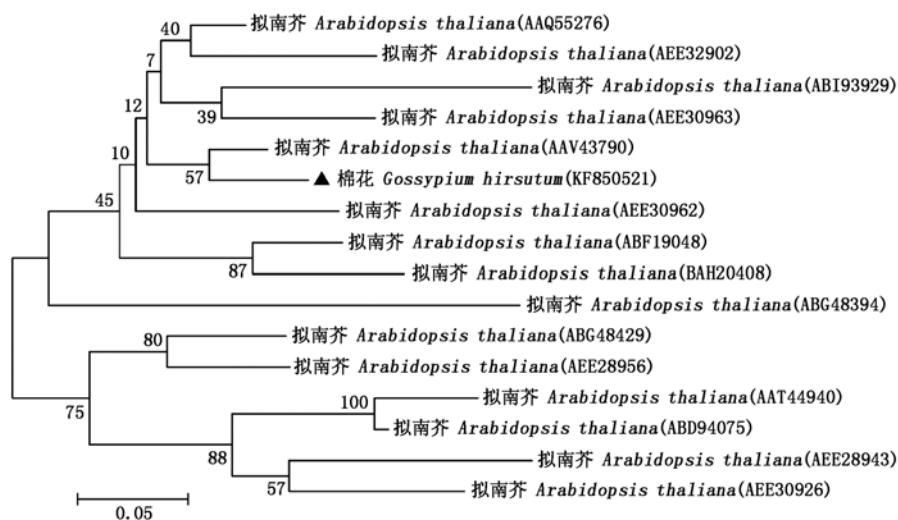


M. DL2000 Marker; 1~4. cDNA 为模板的 PCR 扩增产物。

M. DL2000 Marker; 1~4. PCR amplification products of *GhERFB101* from genome cDNA.

图 1 *GhERFB101* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *GhERFB101* gene



三角符号代表 *GhERFB101*; 其余为拟南芥 ERF-B1 亚组转录因子;

括号中的内容为基因登录号; 图中分支上的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比。图 4 同。

Triangle respectively stands *GhERFB101* and the others stand ERF-B1 subgroup transcription factors from *Arabidopsis thaliana*; GenBank accession numbers are in the brackets; The numbers on the branches represent the reliability percent of Bootstrap values based on 1 000 replications. The same as Fig. 4.

图 2 *GhERFB101* 与拟南芥 ERF-B1 亚组转录因子的进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of *GhERFB101* together with ERF-B1 subgroup transcription factors from *Arabidopsis thaliana*

### 2.3 *GhERFB101* 基因系统进化分析

目前,已从拟南芥、棉花及其他植物中克隆了一些相关的 ERF-B1 亚组转录因子基因,如:拟南芥中的 *AtERF4* (NP188139)、*AtERF9* (NP199234) 与 *AtERF11* (NP174159) 基因;海岛棉中的 *GbERFa* (AHA82411)、*GbEREB2* (EU082108)、*GbERF1* (AAT77192) 基因;烟草中的 *NtERF111* (BAL68166)、*NtERF193* (BAL68168) 基因;番茄中的 *LeERF1* (AY077626)、*LeERF2* (AY275554);甘蔗中的 *SodERF3* (AM493723) 以及大豆中的 *GmERF4* (NP001238595) 等。运用 DNAMAN 软件将 *GhERFB101* 基因推定的氨基酸序列与上述基因的氨基酸序列进行同源比对,并利用 MEGA 5.0 软件分

### 2.2 生物信息学分析

对 *GhERFB101* 基因编码的蛋白进行生物信息学分析,结果表明,该基因编码的蛋白由 245 个氨基酸组成,分子量为 26.74 kDa,理论等电点为 8.88,为亲水蛋白。结构域分析表明,该转录因子保守的 AP2/ERF 结构域位于第 22~79 氨基酸。蛋白二级结构分析表明,无规则卷曲所占的比例较高,为 61.22%,是该蛋白二级结构的主要组成元件,而  $\alpha$  螺旋和延伸链所占比例分别为 20.82% 和 17.96%。蛋白 AP2/ERF 结构域的三级结构分析表明,该转录因子 AP2/ERF 结构域与 *AtERF1*<sup>[19]</sup> 非常相似,由此推测 *GhERFB101* 基因编码的转录因子可能具有与 *AtERF1* 相同的结合特性,即可以与下游基因启动子中的 GCC-box 结合,从而实现对下游基因的表达调控。

析系统进化树。结果表明,*GhERFB101* 基因推定的氨基酸序列与上述基因的一致区主要集中在 AP2/ERF 结构域(图 3);*GhERFB101* 基因在进化上与拟南芥 *AtERF11* 的亲缘关系最近(图 4)。

### 2.4 实时荧光定量 PCR 分析

运用实时荧光定量 PCR 技术,分析抗病与感病品种在枯萎病菌处理后 *GhERFB101* 基因的表达特性(图 5-A)。结果表明:枯萎病菌诱导后,*GhERFB101* 基因的表达量在抗病品种中呈下降趋势,48 h 后基因的表达量降至最低,相对表达量仅为 0.02。而在感病品种中,该基因的表达量在各个时间点均明显高于抗病品种;与处理前相比该基因呈上调表达,且随着病菌处理后时间延长,其表达量呈

现先增加后降低的变化趋势,在病菌处理后 12 h 表达量达到最大,是处理前表达量的 5.87 倍,而后逐渐下降至 48 h,相对表达量为 3.10。

棉花 <i>Gossypium hirsutum</i> (KF850521)	.....NAERE.....KTAIVKGNNGCT.....KEVHRRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	89
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (AHA82411)	.....KRRGRG.....FAAAAAAIFDS.....EEFYRGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	80
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (ABU53677)	.....NAEQKNA.....SKTLKANGIS.....STSSQEVHRRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	91
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (AAT77192)	MSNVYLWYHYDIFKFFLCIIIEGNSSEKSMQFDSQAEKCAKRRKKNQYGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	120
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP188139)	.....MAKMGKDF.....ATINQTHNN.....KEIRYGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	91
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP199234)	.....NAEQKANG.....RSIAVSEGGKNTMTIMTKREVHRRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	97
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP174159)	.....NAETV.....KTAIVKTNES.....NGVYRGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	86
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (BAL68166)	.....NAEQGGGAIIV.....FVTAIVGRVMS.....KEVYRGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	100
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (BAL68168)	.....NAEQGGGAVAV.....TAIVGRVMS.....KEVYRGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	98
大豆 <i>Glycine max</i> (NP001238595)	.....NAERCH.....KTSNAKANGNMSG.....VKEVHRRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	87
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> (AY077626)	.....NAEQGGGAIIV.....FVTAIVGRVMS.....KEVYRGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	66
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> (AY275554)	.....NAEQGGGAIIV.....FVTAIVGRVMS.....KEVYRGRGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	88
甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i> (AM493723)	.....NAERSS.....TSPTGSSSSNR.....AAATEGPRBGRBGRWSYAEIRBGRKSRWLGSTDTBARRAYDAAREFGAATNNHLPGEI.....LNNGS	81
consensus	ig r r w g eir p r w l g t f e a a y d a g a n p	

棉花 <i>Gossypium hirsutum</i> (KF850521)	NCNNNGTNCNNNNHNSFRRSIVESSSE.....PFTIVKCS.....FLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	201
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (AHA82411)	.....PNTIAFFPIHHHR.....RLVPMG.....NFQCLEMNFQRTSSMSSTVSESSEGGFRAQLPQKS.....TDFAAVSTRYRFFTFPLAF....	157
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (ABU53677)	YRG.....QNCQSPSCSIVESSG.....SPTVERG.....VNTLSGAVGRFFACQQLALGGVANGISGVTRSRVLFEEALGGAGVGVGVYVFRDFPVGVQMGFASV....	190
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (AAT77192)	NSQ.....KFLRZNLKFPVLMNLQN.....YVLSQPEQVEFTMGVEERPLVNGFAYVDFPVTISDAGSNQSDNALVYNSDQSGNSINCSDYWGEGQARTFEISSILEASVVG	228
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP188139)	FTG.....FARSPSCSILDCASFF.....TIUVFSA.....TAGNVP.....FQLELSLGGGGGGSCY.....QTPMSRF.....VYFDLMGIGNVGRGQFPFVTSAFRSFVHVAT....	180
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP199234)	NDG.....GENSVNRTVTIAR.....EMTRQR.....FFACHRRKRVGVGVSAGFF.....EDPSRAASLRAELS.....BVCPVDFPVDNIELSIGIBET....	178
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP174159)	LT.....CSLSCSIVESSFF.....RVAAACS.....FLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	125
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (BAL68166)	GVKINKNIND.....NNRSPSCSIVESSRDLSPFVWDS.....FLDLSLG.....VHFFPNQRLTSFISGGFFGC.....GTGATF.....AVNHHMYLEALRAGVINLEKHQKRTVDFLGG....	209
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (BAL68168)	GVKINKNIND.....NNRSPSCSIVESSRDLSPFVWDS.....FLDLSLG.....VHFFPNQRLTSFISGGFFGC.....GTGATF.....AVNHHMYLEALRAGVINLEKHQKRTVDFLGGNGH	211
大豆 <i>Glycine max</i> (NP001238595)	.....VKNSEFSCSIVESSRD.....RVAAACS.....FLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	174
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> (AY07626)	.....FNNFPTSSKILST.....ITAKLHRCYMASLQMTISFQSGKLARNATNVQSVINSYKMKQMLVFKFSLTHHDEEAKVNVGVGVIRKVEDQVLEG	165
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> (AY275554)	KEAVKNEIN.....FNPCTIVESS.....FVWDSFLDLSLG.....SGIGGNHHTVVFSSGG.....GTGATF.....AVNHHMYLEALRAGVINLEKHQKRTVDFLGGNGH	175
甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i> (AM493723)	.....MVEFVGSVAVLESS.....SSSSWSLLFESVIAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	158
consensus		

棉花 <i>Gossypium hirsutum</i> (KF850521)	.....HEIFNAGVQSDSDSSSVVLDNHHEIKR.....FLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	245
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (AHA82411)	.....EDCHSDCCSSSVVLDGVIASSRR.....RMFFDLNFFLDLDDLHCTALCL.....	207
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (ABU53677)	.....VRSEFDSAI.....HCKARRFG.....FLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	222
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> (AAT77192)	EEFLECANPSKRLKPSNNVMPAEDNSAKTSLCELLANHYVQMPFFIEGNWCATIDAFINGCATQDGNFMCLNWFDFPTMAEGV	318
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP188139)	.....XMACGAQSDSDSSSVVLDFFGGMEKRSQ.....FLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	222
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP199234)	.....VKEVF.....RRE.....FLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	200
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP174159)	.....MMVFDERSESSSVVMDVVRVYGRV.....VLDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	166
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (BAL68166)	.....SSGGSGSGTQSESSSVIFPMRTVVFETR.....TGDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	255
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (BAL68168)	GGSGSGSGTQSESSSVIFPMRTVVFETR.....TGDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	259
大豆 <i>Glycine max</i> (NP001238595)	.....AASEFHTTSDSDSSSVLDNHHEGVGSGRSITLNLHHEPHEIA.....	222
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> (AY07626)	.....IPQFVKPLEDCHIEQMLELLEVG.....SEFCSVVRSHQIC.....	204
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> (AY275554)	.....GDSSTVIFPMRTVVFETR.....AGDLNLGHAATVGVGSPAVRLPFFQISSVTGFFANGVAVAAQVVFYFDALVFGVMGQCCQQRLEFHREY....	210
甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i> (AM493723)	.....KSEEEQSGSLSSSSGVDFAPVGLDNLNLHHEPHEIA.....	201
consensus		

黑色实线表示 AP2/ERF 结构域;括号中的内容为基因登录号。

The black solid line indicates AP2/ERF domain; GenBank accession numbers are in the brackets.

图 3 *GhERFBI01* 基因与其他 ERF-B1 亚组转录因子基因推定氨基酸序列的同源比对

Fig. 3 Alignment of deduced amino acid sequences of *GhERFBI01* gene and the other disease resistance-related ERF-B1 subgroup transcription factor genes

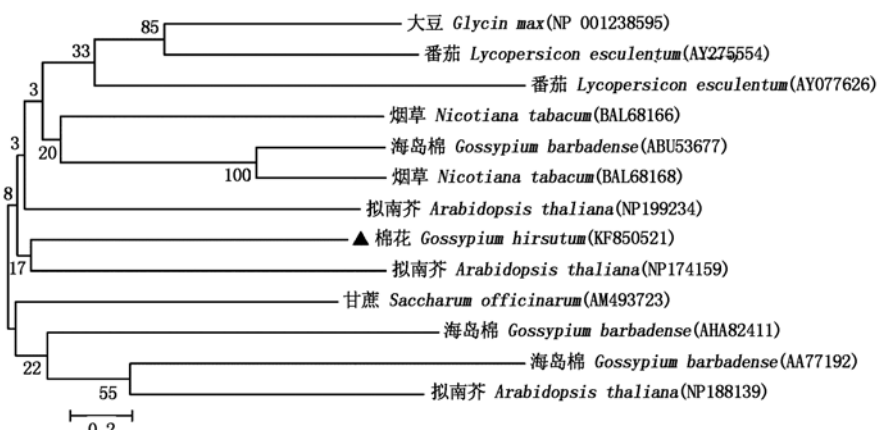


图 4 *GhERFBI01* 与其他 ERF-B1 亚组转录因子系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *GhERFBI01* with the other disease

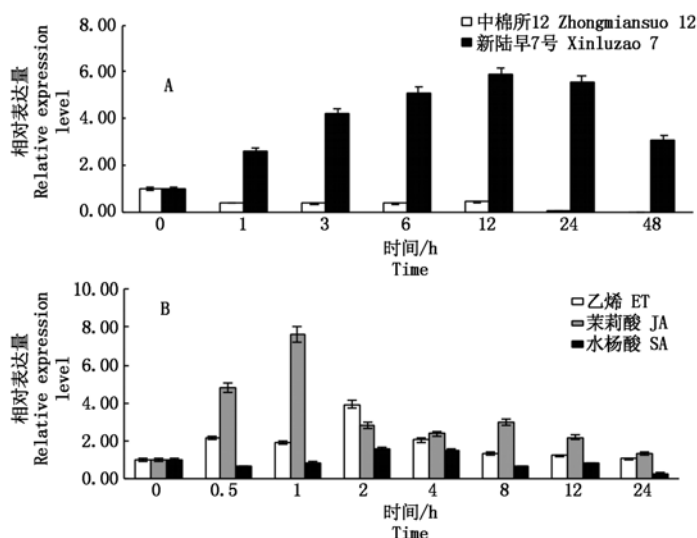
resistance-related ERF-B1 subgroup transcription factors

为了检测 *GhERFBI01* 基因对激素的响应情况,分别用乙烯(ET)、茉莉酸(JA)以及水杨酸(SA)处理抗病品种中棉所 12 的棉苗,实时荧光定量 PCR

分析表明(图 5-B),ET 和 JA 诱导后,该基因的表达量均呈先增加后降低的变化趋势,ET 在处理 2 h 后基因的表达量达到最大,是处理前的 3.94 倍;JA 则

在处理后 1 h 基因的表达量达到最大,是处理前的 7.62 倍,随着时间的推移,ET 和 JA 诱导后的基因表达量均逐渐降低,且在 24 h 降至最低,相对表达

量分别为 1.06 和 1.37,略高于处理前。该基因在 SA 处理后表达量变化幅度不大,推测该基因主要响应 ET 和 JA 的诱导。



A. 枯萎病菌处理后 *GhERFB101* 基因的实时荧光定量 PCR 结果; B. 激素处理后 *GhERFB101* 基因实时荧光定量 PCR 结果; ET 代表乙烯处理、JA 代表茉莉酸处理、SA 代表水杨酸处理。

A. Real-time RT-PCR result of *GhERFB101* gene after the treatment of Fov.; B. Real-time RT-PCR result of *GhERFB101* gene after the treatment of hormones; ET stands for ethylene treatment, JA stands for asmonic acid and SA stands for salicylic acid treatment.

图 5 不同胁迫处理下 *GhERFB101* 基因的实时荧光定量 PCR 分析

Fig. 5 Real-time RT-PCR analysis of *GhERFB101* gene when treated with different stress treatments

### 3 讨论

近年来, Solexa 高通量测序技术的迅猛发展给生物基因组学的研究带来了深刻的影响, 为从作物的整体水平研究基因的表达变化, 阐明作物对病原菌的抗性机制提供了有力的技术支持。本研究在此基础上, 结合电子克隆和 RT-PCR 技术获得一个新的 *GhERFB101* 基因。保守域和进化树分析证明, 该基因属于棉花的 ERF-B1 亚组, 为棉花 ERF 家族中的新成员。

已有研究表明, ERF-B1 亚组转录因子基因在抗病和抗多种逆境胁迫过程中起着重要作用, 如 *LeERF2*<sup>[4-5]</sup>、*AtERF4*<sup>[6]</sup>、*GmERF4*<sup>[20]</sup>、*SodERF3*<sup>[21]</sup> 等, 并且 ERF-B1 亚组转录因子中含有 EAR 基序, 属于转录抑制子, 是不可缺少的负向调控因子。该类因子通过与下游防卫基因启动子中 GCC-box 特异性的结合, 不仅可以抑制该类基因的基础转录活性, 而且还可以拮抗抵消激活型转录因子如 *AtERF5* 等对该类基因的激活作用从而调控植物对病原菌的抗性<sup>[3,5,22]</sup>。

Mcgrath 等<sup>[23]</sup> 使用实时荧光定量 PCR 技术鉴定出拟南芥中 10 个 ERF 族转录因子基因可以显著响应 JA 和病原菌的诱导, 其中 ERF-B1 亚组转录因子基因 *AtERF4* 可以下调 JA 防卫反应基因的表达水平, 导致植株对枯萎病菌抗性的减弱。刘坤<sup>[7]</sup> 从

海岛棉品种海 7124 中克隆了 2 个 ERF-B1 亚组基因 *GbEREB3* 和 *GbEREB4*, 构建过表达载体转化烟草, 通过对转基因阳性植株进行实时荧光定量 PCR 分析, 结果表明, 病程相关蛋白基因 *PR1a* 和 *PR2* 的表达量均显著减少, 推测这 2 个基因的过量表达可能会降低植株对病原菌的抗性。本研究克隆得到一个 ERF-B1 亚组转录因子基因 *GhERFB101*, 序列分析发现, 其 C 末端含有一个 EAR 抑制基序 (PLLNDLNQ-PAP), 属于转录抑制子。表达分析显示, 该基因能够响应枯萎病菌诱导, 与对照相比, 在抗病品种根中的表达量呈现下降趋势, 而在感病品种中, 该基因呈上调表达, 且随着病菌处理后时间的延长, 其表达量呈现先增加后降低的变化趋势。*GhERFB101* 基因在抗病和感病品种中表达模式的不同是否与两品种对枯萎病抗性不同有关, 还有待进一步的研究。

此外, 大量的研究认为, 植物激素水杨酸 (SA)、茉莉酸 (JA) 和乙烯 (ET) 是植物抗病信号转导途径中的重要调控因子<sup>[24]</sup>。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *GhERFB101* 在 ET、JA 及 SA 诱导后的表达模式, 结果发现在 ET 和 JA 的诱导后, 该基因表达量呈现明显的变化趋势, 而 SA 诱导后基因的变化幅度不大, 推测该基因可能通过茉莉酸、乙烯信号途径参与对枯萎病菌的防御反应。

ERF 亚族作为植物特有的一类转录因子, 数目庞大且功能各异, 能够对病原微生物的入侵、干旱、

高盐、低温等胁迫产生应答,提高植株的耐受性,在植株的生长、发育过程中起到重要作用<sup>[25]</sup>,是改良植物遗传特性的良好基因资源。本研究从高抗枯萎病的棉花品种中克隆了 *GhERFB101* 基因,并对其表达特性进行了初步分析,进一步的功能发掘还有待更深入的研究来证明。

### 参考文献:

- [1] 罗红丽,陈银华. 植物抗病反应相关转录因子的研究进展[J]. 热带生物学报,2011,2(1):83-88.
- [2] 刘建光,王永强,张寒霜,等. ERF 转录因子在植物逆境胁迫的研究进展[J]. 华北农学报,2013,28(z1):214-218.
- [3] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-binding specificity of the AP2/ERF domain of *Arabidopsis* DREBs transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 290(3):998-1009.
- [4] Zhang Z J, Zhang H W, Quan R D, et al. Transcriptional regulation of the ethylene response factor *LeERF2* in the expression of ethylene biosynthesis genes controls ethylene production in tomato and tobacco[J]. Plant Physiology, 2009, 150(1):365-377.
- [5] Zhang Z J, Huang R F. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor *TERF2/LeERF2* is modulated by ethylene biosynthesis[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 73(3):241-249.
- [6] Yang Z, Tian L, Latoszek-Green M, et al. *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(4):585-596.
- [7] 刘 坤. 海岛棉 ERF 族 B3 和 B1 亚组转录因子基因的克隆与特征研究[D]. 北京:中国农业科学院,2011.
- [8] Champion A, Hebrard E, Parra B, et al. Molecular diversity and gene expression of cotton ERF transcription factors reveal that group IXa members are responsive to jasmonate, ethylene and xanthomonas[J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(4):471-485.
- [9] Duan H Y, Li F G, Wu X D, et al. Cloning and characterization of two EREBP transcription factors from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Biochemistry-Moscow, 2006, 71(3):285-293.
- [10] Jin L G, Liu J Y. Molecular cloning, expression profile and promoter analysis of a novel ethylene responsive transcription factor gene *GhERF4* from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(1):46-53.
- [11] Jin L G, Huang B, Li H, et al. Expression profiles and transactivation analysis of a novel ethylene-responsive transcription factor gene *GhERF5* from cotton[J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(5):563-572.
- [12] Jin L G, Li H, Liu J Y. Molecular characterization of three ethylene responsive element binding factor genes from cotton [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(5):485-495.
- [13] Qiao Z X, Huang B, Liu J Y. Molecular cloning and functional analysis of an *ERF* gene from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2008, 1779(2):122-127.
- [14] Huang B, Jin L G, Liu J Y. Identification and characterization of the novel gene *GhDBP2* encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Plant Physiology, 2008, 165(2):214-223.
- [15] Huang B, Jin L G, Liu J Y. Molecular cloning and functional characterization of a DREB1/CBF-like gene (*GhDREB1L*) from cotton [J]. Science in China: Life Sciences, 2007, 50(1):7-14.
- [16] Huang B, Liu J Y. Cloning and functional analysis of the novel gene *GhDBP3* encoding a DRE-binding transcription factor from *Gossypium hirsutum* [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2006, 1759(6):263-269.
- [17] 彭 珊, 吕学莲, 高峰, 等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究[J]. 棉花学报, 2008, 20(3):174-178.
- [18] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA [J]. 棉花学报, 2007, 19(1):69-70.
- [19] Allen M D, Yamasaki K, Ojme-Takagi M, et al. A novel mode of DNA recognition by  $\alpha$ -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA [J]. The EMBO Journal, 1998, 17(18):5484-5496.
- [20] Zhang G, Chen M, Chen X, et al. Isolation and characterization of a novel EAR motif containing gene *GmERF4* from soybean (*Glycine max* L.) [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(2):809-818.
- [21] Trujillo L E, Sotolongo M, Menéndez C, et al. *SodERF3*, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants [J]. Plant & Cell Physiology, 2008, 49(4):512-525.
- [22] Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, et al. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression [J]. Plant Cell, 2001, 13:1959-1968.
- [23] 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 [J]. Plant Physiology, 2005, 139(2):949-959.
- [24] Pieterse C J, Leon-Reyes A, Van Der Ent S, et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity [J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(5):308-316.
- [25] Gutterson N, Reuber T L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(4):465-471.