

胡萝卜AP2/ERF-B1亚族两个转录因子基因的克隆及其非生物胁迫响应分析

黄蔚, 王枫, 谭国飞, 徐志胜, 李梦瑶, 熊爱生*

作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京农业大学园艺学院, 南京210095

摘要: AP2/ERF是植物中普遍存在的一类重要转录因子, 参与植物整个生命周期的生长发育和逆境信号转导。本研究以胡萝卜(*Daucus carota*) ‘黑田五寸’为试验材料, 基于其转录组和基因组数据, 检索和拼接获得胡萝卜AP2/ERF家族2个转录因子基因序列g39811和g47170。采用RT-PCR方法, 分别从‘黑田五寸’中克隆DcERF-B1-1 (g39811)和DcERF-B1-2 (g47170)转录因子基因。序列分析显示, 胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2转录因子基因分别含有630个和594个开放阅读框, 分别编码209和197个氨基酸; 均含有相对保守的AP2结合域, 具有典型的植物AP2/ERF类转录因子特征。从氨基酸组成成分、理化性质、亲水性/疏水性和三级结构上分析显示, 胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2转录因子亲水性大于疏水性, 其氨基酸序列可能属于亲水性蛋白。空间结构分析显示, 它们都具有1个 α 螺旋和3个 β 折叠。进化树分析显示, 二者均属于AP2/ERF家族转录因子中ERF亚族的B1组。实时定量荧光PCR显示, 在低温、干旱、盐胁迫的条件下, DcERF-B1-2转录因子比DcERF-B1-1转录因子对逆境的响应更大; 在高温的条件下, DcERF-B1-1转录因子比DcERF-B1-2转录因子对逆境的响应更大。

关键词: AP2/ERF; 胡萝卜; 转录因子; ERF亚族; 表达调控

Isolation and Analysis of Expression Profiles under Abiotic Stress Treatments of Two AP2/ERF-B1 Group Transcription Factor Genes from *Daucus carota*

HUANG Wei, WANG Feng, TAN Guo-Fei, XU Zhi-Sheng, LI Meng-Yao, XIONG Ai-Sheng*

College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, Nanjing, 210095, China

Abstract: AP2/ERF is an important family of transcription factors in higher plant, which encoded proteins involved in the development and signal transduction of abiotic/biotic resistance in higher plant. The g39811 and g47170 gene sequences, which encoding two AP2/ERF transcription factors, were isolated based on transcriptome and genome sequence data of carrot (*Daucus carota*). The DcERF-B1-1 (g39811) and DcERF-B1-2 (g47170) genes were cloned by RT-PCR method using cDNA as template from carrot cultivar ‘Heitianwucun’. Then, nucleic acid and deduced amino acid sequence, phylogenetic tree, and molecular modeling were predicted and analyzed. Sequence analysis indicated that the length of DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 genes were 630 bp and 594 bp, which encoded 209 and 197 amino acids, respectively. The DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 factors contained AP2-domain, which mainly found in higher plants AP2/ERF family factors. The DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 transcription factors maybe belong to hydrophilic protein. Protein three-dimensional structure prediction and analysis showed that the AP2-domain of DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 had one α -helix and three β -sheets. The DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 factors from carrot were classified into B1 subgroup of ERF subfamily transcription factor, which belongs to AP2/ERF family. Quantitative real-time PCR analysis of the expression profiles in carrot showed that the DcERF-B1-2 responded more severely than the DcERF-B1-1 by low temperature, high-salinity and salt stress treatments, and the DcERF-B1-1 responded more severely than

收稿 2014-04-14 修定 2014-06-28

资助 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0670)、国家自然科学基金项目(31272175)、江苏省杰出青年基金项目(BK20130027)、中国博士后科学基金项目(2014M551609)、江苏高校优势学科建设项目(2011PAPD)和江苏省双创计划(2011JSSC)。

* 通讯作者(E-mail: xiongaisheng@njau.edu.cn; Tel: 025-84396790)。

the *DcERF-B1-2* by high temperature treatment.

Key words: AP2/ERF; *Daucus carota*; transcription factor; ERF subfamily; expression profile

胡萝卜, 别名红萝卜、黄萝卜、丁香萝卜和药性萝卜, 原产亚洲西北, 是一种异花授粉的草本植物, 属于伞形科胡萝卜属, 富含胡萝卜素、蔗糖、葡萄糖、淀粉及矿物质(方智远和张武男2011)。胡萝卜在中国南北方都有栽培, 产量占根菜类第二位。‘黑田五寸’为胡萝卜优良品种, 从日本引进, 在我国大面积栽种, 具有叶色浓绿, 品质脆嫩, 抗病力强, 产量稳定等特点, 根据肉质根的分类, 属于长圆柱类型(章镇2004)。

AP2/ERF家族是普遍存在于植物中的一类重要转录因子, 参与植物整个生命周期的生长发育和逆境信号转导(Riechmann等2000; Sakuma等2002; Zhuang等2008; 阳文龙等2006; 张晗等2006; 庄静等2009)。并且AP2/ERF家族转录因子的成员众多, 在植物逆境调控中起着不同的作用, 其成员内部还存在相互调控的关系(Zhao等2006)。AP2/ERF家族转录因子均含有保守的AP2结合域, 通常由60个左右的氨基酸组成, 而且N-末端都有起核定位作用的碱性氨基酸序列(Okamuro等1997)。根据AP2结合域数目和结构特点, AP2/ERF家族转录因子主要分为4个亚族(ERF、DREB、AP2、RAV)(Sakuma等2002; Zhuang等2008, 2009)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Sakuma等2002)、水稻(*Oryza sativa*) (Nakano等2006)、杨树(*Populus trichocarpa*) (Zhuang等2008)中的AP2/ERF家族转录因子分别有145、164和200个, 其中ERF-B1亚族分别有15、19和16个。

胡萝卜的生长过程总是处于各种非生物和生物胁迫的环境中, 其中高温、低温、干旱和高盐等非生物逆境对胡萝卜的生长发育产生很大的影响, 严重时导致胡萝卜品质与产量的下降。植物ERF类转录因子属于AP2/ERF家族, 主要调控乙烯应答以及相关逆境响应基因的表达, 与温度、干旱以及高盐等胁迫信号传递有关, 在植物抵抗生物与非生物胁迫的过程中, 发挥重要作用(刘强等2000; Liu等1999; Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 2006)。

本研究以胡萝卜‘黑田五寸’为材料, 基于本课

题组胡萝卜转录组和基因组数据, 经过拼接、克隆得到胡萝卜AP2/ERF-B1组2个转录因子*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*基因。对其进行序列、进化树、三级结构等较为详尽的分析。采用荧光定量PCR方法, 对胡萝卜中*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*基因在高温、低温、干旱及高盐四种主要非生物胁迫的响应表达进行研究, 以期为进一步开展胡萝卜ERF类转录因子的逆境调控研究奠定基础, 并且对研究胡萝卜中ERF类转录因子对非生物逆境响应的机制和调控途径, 及胡萝卜逆境生理的基础和应用研究均具有重要的意义。

材料与方法

1 植物材料、菌株与质粒

植物材料为本实验室(南京农业大学伞形科蔬菜作物遗传与种质创新实验室)保存的胡萝卜(*Daucus carota* L.)品种‘黑田五寸’, 种植于南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室人工气候室, 种植条件为白天25 °C, 夜晚18 °C, 湿度75%。剪取2月龄胡萝卜植株生长健康的叶片用于总RNA的提取以及cDNA的合成, 将2月龄的植株进行逆境处理0、1、2、4、8和24 h(包括38 °C高温、4 °C低温、20% PEG6000干旱和0.2 mol·L⁻¹ NaCl盐处理)。

大肠杆菌菌株DH5α由本实验室保存; pMD-18-T质粒载体、*Ex Taq*聚合酶、DL2000分子量标准、Prime Script RT Reagent Kit、SYBR Premix *Ex Taq* Kit购自大连TaKaRa公司, DNA回收试剂盒购于杭州维特洁公司、RNA Simple Total RNA Kit购于北京天根生化科技有限公司。

2 方法

2.1 RNA的提取及cDNA的合成

RNA的提取按照RNA Simple Total RNA Kit试剂盒说明书进行; 用Prime Script RT Reagent Kit将提取的总RNA反转录成cDNA。

2.2 胡萝卜AP2/ERF-B1亚族转录因子的克隆

根据本实验室测定的胡萝卜‘黑田五寸’转录组和基因组数据, 检索并拼接出胡萝卜转录因子

*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*的基因序列, 分别设计两对引物如下, G39811-F: 5'-ATGGGGCGAGG-TAGGGCGAGC-3', G39811-R: 5'-TCAAAGCCTA-AGAGCAGTGCA-3'和G47170-F: 5'-ATGCGACG-CAACAACAGATCC-3', G47170-R: 5'-TCAGA-GACACAGAGCAGTAGC-3'。以‘黑田五寸’的cDNA为模板进行扩增, PCR反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 54 °C退火30 s, 72 °C延伸60 s, 共35个循环; 72 °C延伸10 min。PCR产物经1.2%的琼脂糖凝胶电泳回收后, 连接到pMD18-T载体上并转化至大肠杆菌DH5 α , 提取质粒经PCR鉴定后委托南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

2.3 序列分析

同源性计算利用NCBI网站GenBank数据库的BLAST程序; 对序列进行多重比对采用DNAMAN软件, 然后构建同源进化树, 并用MEGA5对进化树进行测试和编辑, 生成报告图形(Tamura等2011); 氨基酸成分、蛋白相对分子质量、等电点分析用ExPASy网站相关软件完成(Gasteiger等2003), 蛋白质疏水/亲水性分析采用DNAMAN软件; 蛋白质空间结构模型通过Swiss-Model建立(Schwede等2003)。

2.4 实时定量PCR反应

采用iQTM5 Software和iQTM5 Real-time PCR System完成荧光定量PCR。用胡萝卜*actin*基因作为参考基因, 与目标基因一起扩增。根据‘黑田五寸’中扩增*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*基因序列分别设计表达检测引物*DcERF-B1-1F*: 5'-CCTCG-GTCTCCTCCTATTTTCGC-3', *DcERF-B1-1R*: 5'-AT-CACCACCATCGTCATCATCG-3'和*DcERF-B1-2F*: 5'-TCGTGTCTGGCTCGGTACGTTTG-3', *DcERF-B1-2R*: 5'-CGTGCTGCTCAGGCTACTACTC-GTC-3'。使用SYBR Premix Ex *Taq*试剂盒, 按照操作说明进行实时定量PCR。相对定量使用参照基因的 $\Delta\Delta C_t$ 法, C_t 表达差异等于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta C_t = C_{t\text{目标基因}} - C_{t\text{actin}}$ (Pfaffl 2001)。

实验结果

1 ‘黑田五寸’中*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子基因的克隆

分别用引物G39811-F和G39811-R、G47170-F和G47170-R, 以‘黑田五寸’的cDNA为模板, 利用RT-PCR技术扩增, 均得到600 bp左右的预期片段(图1), 其大小与预期的片段大小一致。克隆后序列测序与分析表明, 来源于‘黑田五寸’的转录因子基因*DcERF-B1-1*含有一个630 bp的开放阅读框, 编码209个氨基酸; *DcERF-B1-2*基因含有一个594 bp的开放阅读框, 编码197个氨基酸(图2)。

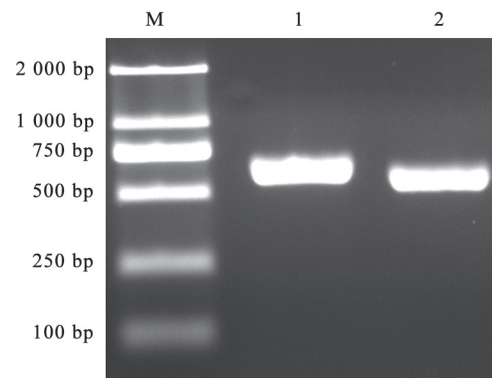


图1 RT-PCR克隆胡萝卜*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*基因
Fig.1 *DcERF-B1-1* and *DcERF-B1-2* genes from carrot amplified by RT-PCR

M: 标准分子量; 1: cDNA中扩增的*DcERF-B1-1*产物; 2: cDNA中扩增的*DcERF-B1-2*产物。

2 *DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子同源性比较、氨基酸组成成分及理化性质分析

使用Blastp程序, 分别对胡萝卜‘黑田五寸’的2个ERF-B1亚族转录因子氨基酸序列进行同源性检索, 它们与其他植物ERF类转录因子相似度较高。其中, *DcERF-B1-1*氨基酸序列与马铃薯ERF3 (XP006352525.1)的一致性达到60%; *DcERF-B1-2*氨基酸序列与鹰嘴豆ER3 (XP004491090.1)和马铃薯ERF3的一致性分别达到56%和54%。

对其组成成分与理化性质进行分析结果显示(表1), 进行比对的ERF类转录因子氨基酸数目在190~240之间, 碱性氨基酸多于酸性氨基酸, 脂肪族氨基酸多于芳香族氨基酸。虽然同属于ERF家族, 但理论等电点(theretical pI)存在较大的差异, *DcERF-B1-1*氨基酸序列和*DcERF-B1-2*氨基酸序列理论等电点为8.51和6.73。ERF类转录因子氨基酸序列在不同物种间包含的酸性氨基酸、碱性氨基酸、芳香族氨基酸、脂肪族氨基酸等方面存在

ATGGGGCGAGGTAGGGCGAGCAAACCGGGCGGCAGCGGGCGG	ATGCGACGCAACAACAGATCCAAGCCGGCGACGGAGACGCCGATC
M G R G R A S K P A A A A A A	M R R N N R S K P A T E T P I
GCGCAGGGCGGAGAGATAGCGGGATCGGGATCTCAAGAGATAAG	GCCGCGGTGCCCGGTAACGAGCCGAGATATCGCGCGTTCCG
A Q G G E I A G S G S Q E I R	A A A A A G N E P R Y R G V R
TACCGTGGGGTTCGGAAGAGGCCATGGGGGAGATTCGCGGCTGAA	CGGCGTCCGTGGGGCCGATTGCTGCCGAGATTCGCGATCCGTGG
Y R G V R K R P W G R F A A E	R R P W G R F A A E I R D P W
ATTCGAGACCCATGGAAGAAAAGTAGGGTTGGCTTGGTACTTTT	AAGAAAACGCTGTCTGGCTCGGTACGTTTACTCGGCTGAGGAC
I R D P W K K T R V W L G T F	K K T R V W L G T F D S A E D
GATTCTGCTGAAGATGCTGCAAGAGCGTATGATGCTGCTGCCGTG	GCGGCTCGGCCTACGACGCCGCCGAGATCTCTCCGTGGACCG
D S A E D A A R A Y D A A A V	A A R A Y D A A A R S L R G P
AATTTTCGGGGCCCAAAGCTAAGACCAATTCCTTTTGATCCC	AAGGCGAAAACAAATTTCCGATTTTTCGAAAATCAAGCCGGC
N F R G P K A K T N F P F D P	K A K T N F P I F S E N Q A G
AGGTTTTCAACCCTAATTTATCCCTTTTGTCCCTGATAATCAC	GGCGATCGGAATAATCTCGGCCAGCCGATTTATGTGTACCGCCG
R F F N P N L S P F V P D N H	G D R N N L G Q P I Y V Y R P
TTGATTGTGCTGCTCACCGTCCGGCTTCTAGTGGTATGATAGC	ACGAGTAGTAGCCTGAGCAGCAGGTGGAGTCTGCTGTGGTCCG
L I V A A H R P A S S G M S S	T S S S L S S T V E S S C G P
ACCGTTGAGTCTTTAGTGGCCCTAATCGCCCTGCTCAGATTGCT	ACAGCGGGGCTTCGAGCACAGCCGGGAGGGTGAAGAACGTG
T V E S F S G P N R P A Q I A	T A A A S S T A P A R V K N V
GCTTCTTTCCTTCGAGGAGGTTTCTCGGTCTCTCTATTTTCG	TTCAAGCCGAGAATTCAGTGGAGGATTTCCACAGCGATTGCGAT
A S L P S R R F P R S P P I S	F K P R I Q V E D F H S D C D
CCTGATGATTACCACAGTGTGTTGATCTCCGGTTCTGCTGTT	TCGCTCTTCCGTGGTGGATGACTGCGACACGACGCTGTTTCC
P D D Y H S D C D S S G S V V	S S S S V V D D C D T T S F H
GATAATCGTCAAGGAGTTGCTCATGCTGATGTCGGTTCTCTCTG	AAGCCGTTCTTTTGATCTCAATTTACCTCCCGGTTGGATGAT
D N R Q G V A H A D V G S S S	K P F S F D L N L P P P L D D
GTCTGTAAGCCACTGGGGTTTGTCTTAACCTCCCCCTCCCGAT	GATATGGATATCGAAAATCCCGATGATTACAAGCTACTGCTCTG
V C K P L G F D L N F P P P D	D M D I E N P D D L Q A T A L
GATGACAGTGGTGGTATCTTGATTGCACTGCTCTTAGGCTTTGA	TGTCTCTGA
D D D G G D L D C T A L R L *	C L *

*DcERF-B1-1**DcERF-B1-2*图2 胡萝卜*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列Fig.2 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *DcERF-B1-1* and *DcERF-B1-2* from carrot

*表示终止密码子。

一定的差异,但亲缘关系越近的物种差异相对较小。

对*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子氨基酸序列进行疏水性/亲水性分析。结果表明,*DcERF-B1-1*转录因子的亲水性区域中,第194位到第203位亲水性最强,疏水性区域中第10位到第16位疏水性最强(图3)。*DcERF-B1-2*转录因子的亲水性区域中第20位到第33位亲水性最强,疏水性区域中第192位到第197位疏水性最强(图4)。通过

结果可知,2个转录因子亲水区域多于疏水区域,其氨基酸序列可能属于亲水性蛋白。

3 胡萝卜*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子氨基酸序列比对和进化树分析

利用Blast Conserved Domains Search,分析胡萝卜*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*的保守域,表明这2个转录因子均在30~85位氨基酸间含有一个典型的AP2结构域(图5-A)。将*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子的AP2结构域氨基酸序列与

表1 胡萝卜和其他不同植物来源的ERF氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 The comparison of composition and physical and chemical characterization of amino acid sequences of ERF transcription factors from carrot and some plant species

来源植物	氨基酸名称	氨基酸序列 登陆号	氨基酸数	分子量/ kDa	理论等 电点	碱性氨基 酸比例/%	酸性氨基 酸比例/%	脂肪族氨 基酸比例/%	芳香族氨 基酸比例/%
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	DcERF-B1-1	KJ915914	209	22.34	8.51	14	11	12	9
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	DcERF-B1-2	KJ915915	197	21.62	6.73	14	13	13	8
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AtERF3	XP002894264.1	224	25.05	9.20	16	12	13	8
鹰嘴豆 (<i>Cicer arietinum</i>)	CaERF7	XP004513889.1	223	23.90	5.94	13	13	14	9
大豆 (<i>Glycine max</i>)	GmERF7	XP003551866.1	212	23.20	5.96	15	15	14	9
蚕豆 (<i>Vicia faba</i>)	VfERF	ACD87818.1	221	23.95	6.74	14	13	13	9
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	StERF3	XP006352525.1	223	24.54	8.55	14	12	14	8
番茄 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	SIERF	NP001239044.1	240	26.36	7.73	16	12	13	8
黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	CsERF7	XP004167752.1	214	23.62	8.98	15	12	14	8
柿树 (<i>Diospyros kaki</i>)	DkERF7	AFH56414.1	219	24.08	7.26	16	13	12	8
葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>)	VvERF3	XP002278022.1	224	24.19	9.68	16	11	13	7
海岛棉 (<i>Gossypium barbadense</i>)	GbERF	AHA82411.1	207	23.00	9.16	17	12	12	8
蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	RcERF	XP002531192.1	228	25.00	8.84	15	11	12	8
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	NtERF#229	BAL68173.1	221	24.30	8.63	15	12	13	7

拟南芥中的ERF1~15、CBF1~4保守域氨基酸序列进行同源序列比对分析,结果显示上述转录因子都具有WLG单元,具有典型的AP2结构域序列特征(图5-B)。

为了进一步分析本实验克隆的‘黑田五寸’DcERF-B1-1和DcERF-B1-2与AP2/ERF家族相关转录因子的进化关系,选取拟南芥中AP2/ERF家族转录因子进行同源进化比对。构建的同源进化树表明,DcERF-B1-1和DcERF-B1-2在进化关系上属于AP2/ERF家族转录因子中的ERF亚族。进一步分析显示,胡萝卜中的DcERF-B1-1和DcERF-B1-2均属于ERF亚族中的B1组,同拟南芥ERF-B1组成员AT1G50640.1和AT3G20310.1进化关系最近(图6)。

4 胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2转录因子三

级结构预测与分析

DcERF-B1-1和DcERF-B1-2在AP2结构域中有7个位点不同,即第1、8、47、48、49、60和61位点。比对发现,胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2转录因子AP2结构域序列都与AtERF1有较高的同源性。以拟南芥AtERF1 (PDB ID:1gc-cA)为模型,构建胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2的三维结构模型(Allen等1998; Arnold等2006)。建模的结果表明,DcERF-B1-1、DcERF-B1-2和AtERF1具有十分相似的三维结构,都有1个 α 螺旋和3个 β 折叠(图7)。

5 胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2基因在不同逆境处理下的表达情况

本研究采用四种条件:高温(38 °C)、低温

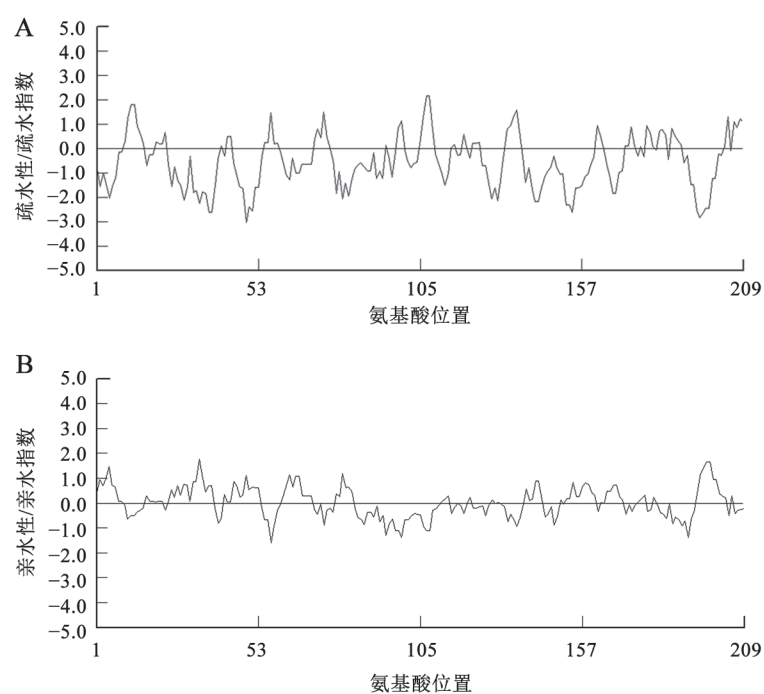


图3 胡萝卜DcERF-B1-1氨基酸序列的疏水性(A)和亲水性(B)分析

Fig.3 Predicted hydrophobicity (A) and hydrophilicity (B) of deduced amino acid sequence of DcERF-B1-1 from carrot

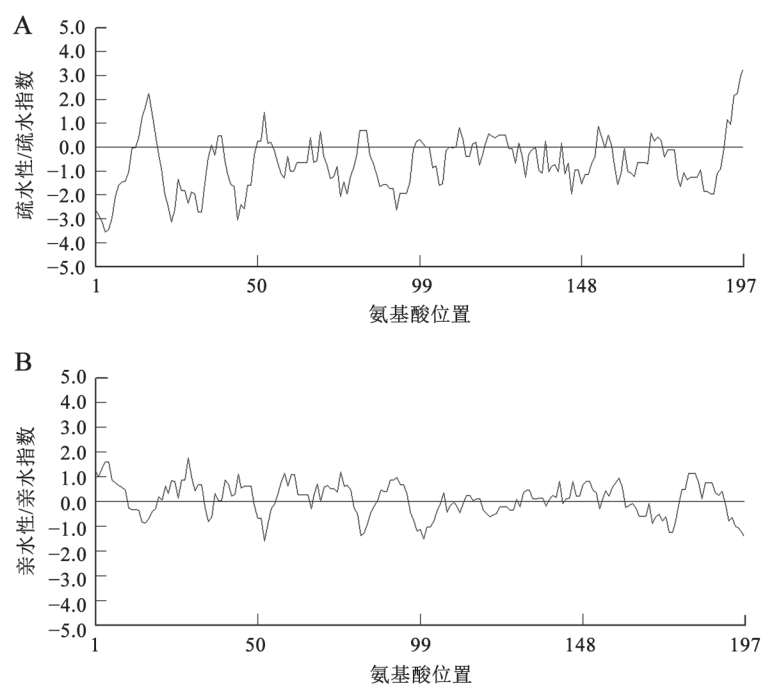


图4 胡萝卜 DcERF-B1-2氨基酸序列的疏水性(A)和亲水性(B)

Fig.4 Predicted hydrophobicity (A) and hydrophilicity (B) of deduced amino acid sequence of DcERF-B1-2 from carrot

(4 °C)、干旱(20% PEG)、高盐(0.2 mol L⁻¹ NaCl)、
分别处理‘黑田五寸’0、1、2、4、8和24 h。采用

荧光定量PCR检测胡萝卜中*DcERF-B1-1*和
*DcERF-B1-2*基因在上述4种不同逆境条件下的表

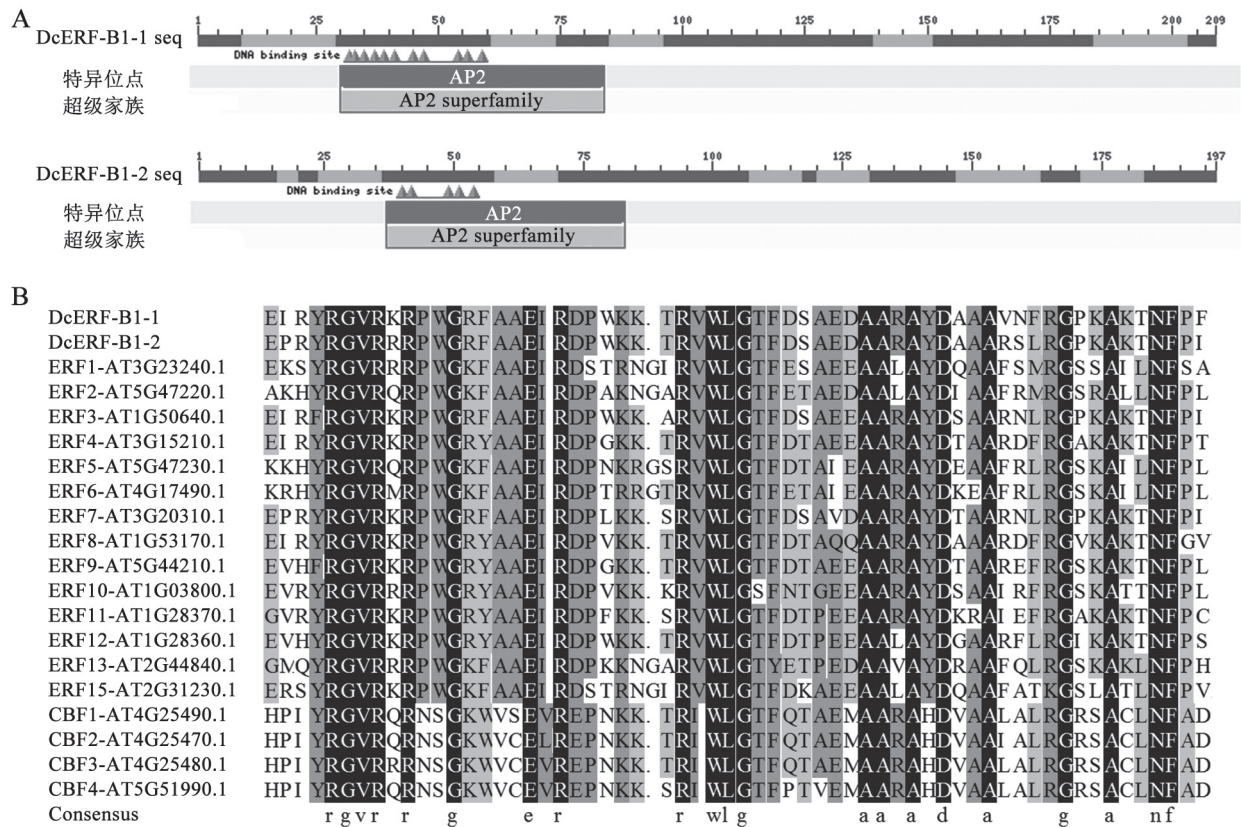


图5 胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2氨基酸保守域(A)和一致性(B)比较

Fig. 5 The conserved domain (A) and identity (B) of DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 from carrot

达水平, 研究胡萝卜中*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子对不同逆境的响应情况(图8)。结果表明: 不同逆境处理下, 胡萝卜中转录因子基因*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*响应呈现较大的差异。当受到高温胁迫时, *DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*均被显著的诱导, 其中*DcERF-B1-1*比*DcERF-B1-2*对高温的响应更大(图8-A)。低温处理后, *DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*均呈现先下降后上升的趋势, 其*DcERF-B1-2*比*DcERF-B1-1*对低温的响应更明显, 处理2 h后, *DcERF-B1-2*表达量为对照的7倍, 而*DcERF-B1-1*表达量为对照的1.3倍(图8-B)。干旱胁迫下, *DcERF-B1-2*和*DcERF-B1-1*表达呈现明显的不同, *DcERF-B1-1*表达量一直低于对照, 处理8 h时, 表达量仅为对照的5%; 而*DcERF-B1-2*表达呈现先下降再上升的趋势, 处理8 h时, 其表达量为对照的2.2倍(图8-C)。高盐胁迫下, *DcERF-B1-1*表达量低于或接近于对照表达水平; 而*DcERF-B1-2*表达在盐处理1 h时被显著诱导, 表达量达到对照

的2.1倍, 然后表达量下降, 低于对照(图8-D)。

讨 论

高等植物中, 转录因子在非生物和生物逆境胁迫应答过程中, 扮演着非常重要的角色。转录因子先与其调控的下游基因启动子区的顺式作用元件结合, 然后通过直接调控靶基因的表达或其他途径, 形成基因表达的调控网络(Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 2006; 莫纪波等2011)。AP2/ERF转录因子家族是高等植物一类庞大的转录因子家族, 其家族特征是含有一个高度保守的AP2结构域(Ohme-Takagi和Shinshi 1995; Allen等1998)。其中AP2亚族含2个AP2结构域, ERF和DREB亚族仅含1个AP2结构域, 而RAV家族除一个AP2结构域外还含1个B3结构域(Sakuma等2002; Nakano等2006)。AP2/ERF转录因子家族在植物发育过程中发挥了巨大作用(庄静等2008; 张计育等2012; 莫纪波等2011)。ERF转录因子是AP2/ERF转录因子家

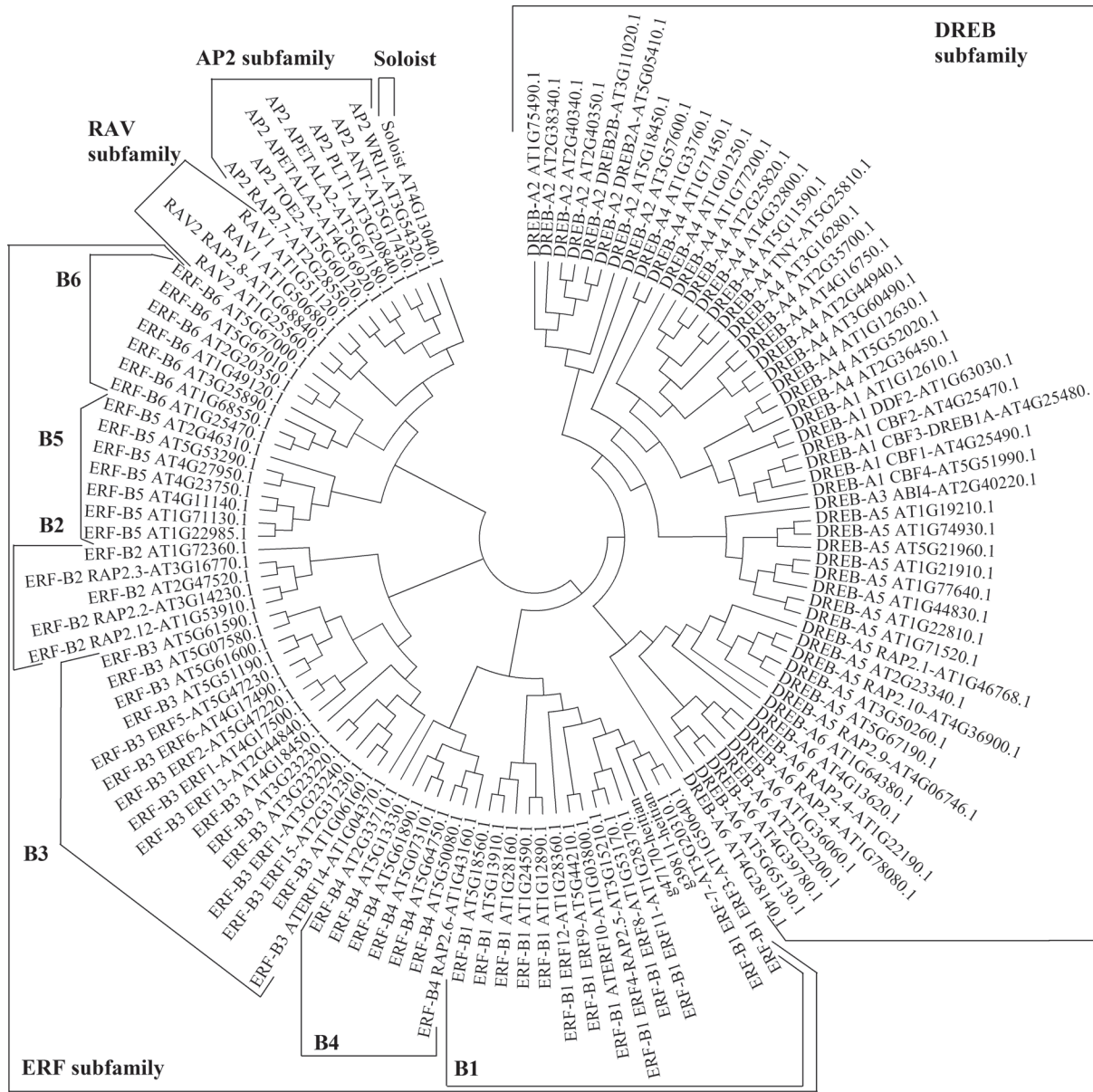


图6 胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2转录因子的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 transcription factors from carrot

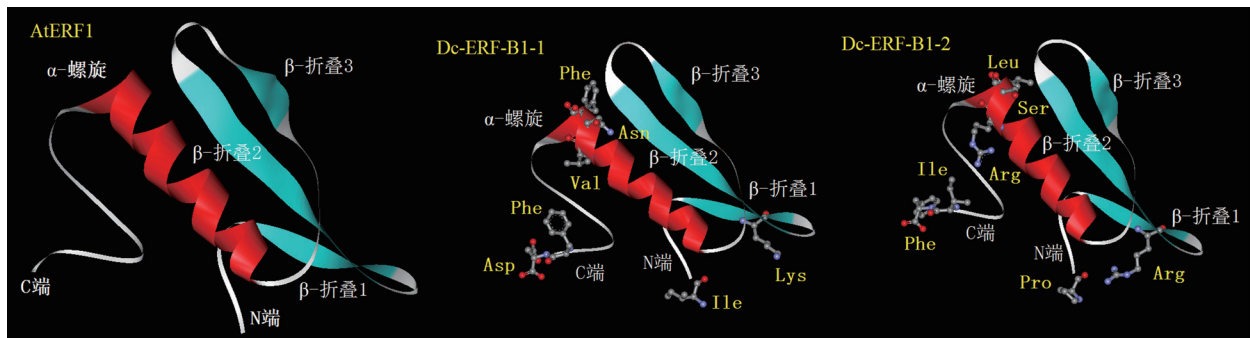


图7 胡萝卜DcERF-B1-1和DcERF-B1-2转录因子蛋白的三维结构预测

Fig.7 The three-dimension structures of DcERF-B1-1 and DcERF-B1-2 transcription factors from carrot

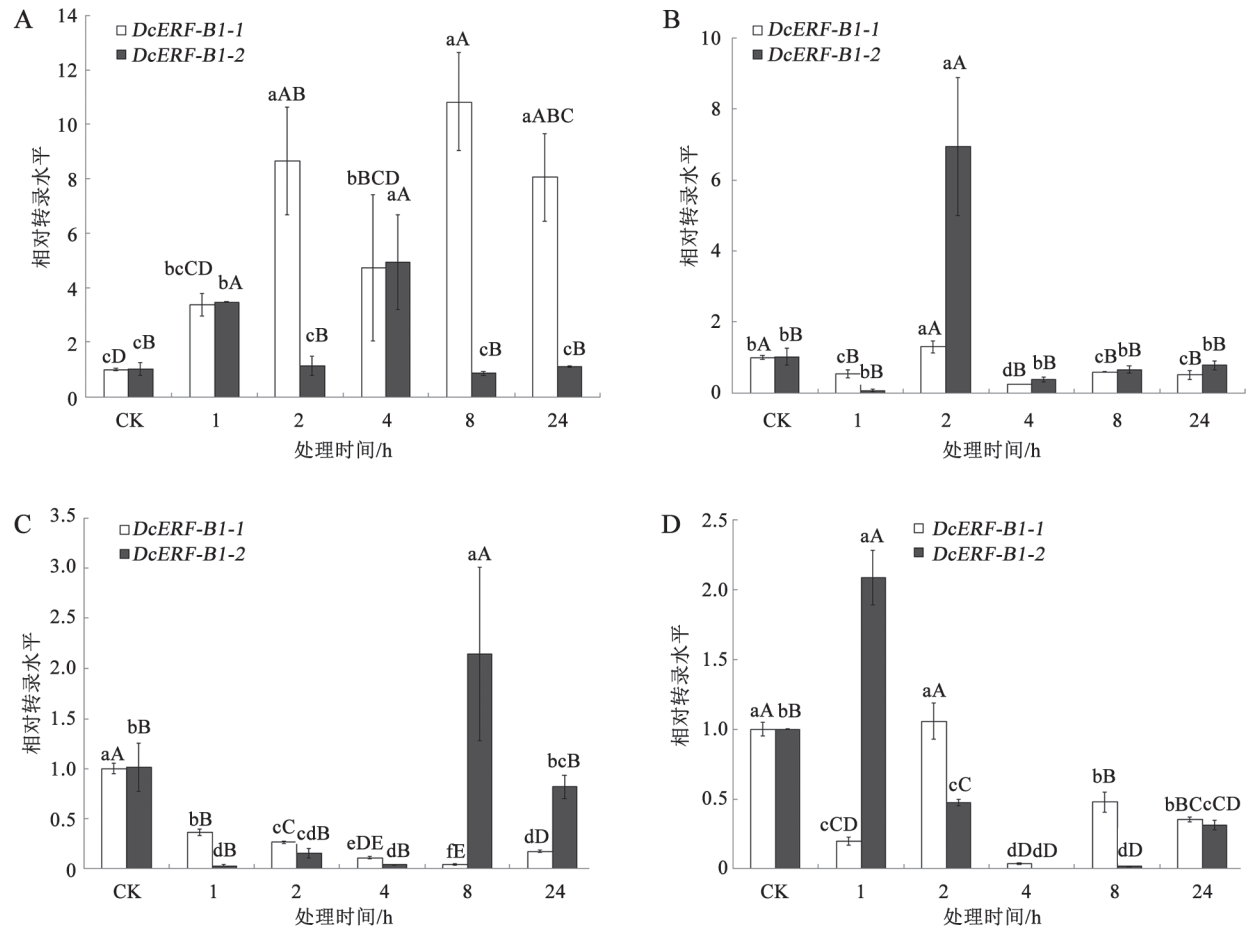


图8 胡萝卜*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*基因在不同逆境条件下的表达水平

Fig.8 Expression analysis of *DcERF-B1-1* and *DcERF-B1-2* genes from carrot under different abiotic stress treatments

A: 高温; B: 低温; C: 干旱; D: 盐。图中柱上不同大小写字母分别表示在0.01和0.05水平上差异显著性。

族的一个亚家族,广泛参与植物生长发育及各种逆境环境下的调控。ERF亚族的转录因子对逆境胁迫有响应,过量表达能够提高植株的非生物胁迫抗性(Hao等1998; Xiong等2013; Zhuang等2013, 2014)。

本研究以胡萝卜‘黑田五寸’为实验对象,克隆得到胡萝卜*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子基因序列。通过序列比对和进化树分析发现,‘黑田五寸’中的*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子均含有一个AP2结合域,并且同属于AP2/ERF家族转录因子中ERF亚族的B1组(Sakuma等2002; Zhuang等2008)。分别对其氨基酸的组成成分、理化性质、亲水性/疏水性进行了分析。两个转录因子理论等电点(theoretical pI)存在较大的差异,均属于亲水性蛋白。在三级结构方面,胡萝

卜*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子AP2结构域序列都与AtERF1有较高的同源性,三维结构上均具有1个 α 螺旋和3个 β 折叠(Allen等1998),胡萝卜*DcERF-B1*转录因子AP2结构域的空间结构特征对结合相关顺式元件调控下游基因表达起了关键作用(Allen等1998; Sakuma等2002)。

本文从胡萝卜中克隆的*DcERF-B1-1*和*DcERF-B1-2*转录因子基因在高温、低温、干旱、盐胁迫4种非生物逆境胁迫诱导下均能响应,说明这2个转录因子在胡萝卜中与上述4种逆境调控有关。另外,结果分析显示在低温、干旱、盐胁迫的条件下,*DcERF-B1-2*转录因子比*DcERF-B1-1*转录因子对逆境的响应更大;在高温的条件下,*DcERF-B1-1*转录因子比*DcERF-B1-2*转录因子对逆境的响应更大。植物中,AP2/ERF家族转录因子

是一个大的家族, 研究已经证实, 该转录因子家族在植物中具有多种功能(Mizoi等2012)。植物中不同的AP2/ERF转录因子功能不同, 对非生物逆境胁迫的响应有正有负。研究证实多个AP2/ERF家族转录因子成员与逆境相关, 过量表达这些转录因子可以提高转基因植物的抗逆性能(Mizoi等2012)。但是研究也证实, 部分AP2/ERF家族转录因子成员对于植物逆境调控起负作用, 水稻的*OsAP23*和*OsERF922*基因过量表达降低转基因植物对逆境的抗性(Liu等2012; Zhuang等2013)。研究还证实, AP2/ERF家族中的转录因子中同一亚族的转录因子对非生物逆境胁迫还存在相互调控的关系(Zhao等2006; Novillo等2007)。本文从胡萝卜中克隆的ERF亚族中B1组的2个转录因子, 氨基酸序列相似度较高, 但是两者对非生物逆境胁迫的响应不同, 说明胡萝卜中相似的2个转录因子之间也存在逆境的相互调控, 胡萝卜非生物逆境调控中AP2/ERF家族转录因子涉及的逆境调控是一个调控网络。

参考文献

- 方智远, 张武男(2011). 中国蔬菜作物图鉴. 南京: 江苏科学技术出版社, 6~7
- 刘强, 张贵友, 陈受宜(2000). 植物转录因子的结构与调控作用. 科学通报, 45 (14): 1465~1474
- 莫纪波, 李大勇, 张慧娟, 宋凤鸣(2011). ERF 转录因子在植物对生物和非生物胁迫反应中的作用. 植物生理学报, 47 (12): 1145~1154
- 阳文龙, 刘敬梅, 刘强, 公衍道, 赵南明(2006). 高羊茅DREB类转录因子基因的分离及鉴定分析. 核农学报, 20 (3): 187~192
- 张晗, 信月芝, 郭惠明, 程红梅(2006). CBF转录因子及其在植物抗冷反应中的作用. 核农学报, 20 (5): 406~409
- 张计育, 王庆菊, 郭忠仁(2012). 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展. 遗传, 34 (7): 835~847
- 章镇(2004). 园艺学各论. 北京: 中国农业出版社, 352
- 庄静, 彭日荷, 高峰, 付晓燕, 朱波, 金晓芬, Zhang J, 熊爱生, 姚泉洪(2009). ‘沪油 15’中两个AP2/ERF-B1亚族转录因子的克隆与分析. 核农学报, 23 (3): 435~441
- 庄静, 周熙荣, 孙超才, 管帮超, 彭日荷, 乔玉山, 章镇, 熊爱生, 姚泉洪(2008). 油菜‘沪油15’中AP2/ERF-B3亚族转录因子的克隆和生物信息学分析. 分子细胞生物学报, 41 (3): 192~206
- Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M (1998). A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. EMBO J, 17 (18): 5484~5496
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics, 22 (2): 195~201
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Apple RD, Bairoch A (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res, 31 (13): 3784~3788
- Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. J Biol Chem, 273 (41): 26857~26861
- Liu D, Chen X, Liu J, Ye J, Guo Z (2012). The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. J Exp Bot, 63 (10): 3899~3912
- Liu L, White MJ, MacRae TH (1999). Transcription factors and their genes in higher plants. Eur J Biochem, 262 (2): 247~257
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochim Biophys Acta, 1819: 86~96
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. Plant Physiol, 140 (2): 411~432
- Novillo F, Medina J, Salinas J (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. Proc Natl Acad Sci USA, 104 (52): 21002~21007
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell, 7 (2): 173~182
- Okamoto JK, Caster B, Villarroel R, Montagu MV, Jofuku KD (1997). The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 94 (13): 7076~7081
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, 29 (9): e45
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang CZ, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR et al (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science, 290 (5499): 2105~2110
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002). 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, 290 (3): 998~1009
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res, 31 (13): 3381~3385
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 28 (10): 2731~2739
- Xiong AS, Jiang HH, Zhuang J, Peng RH, Jin XF, Zhu B, Wang F, Zhang J, Yao QH (2013). Expression and function of a modified AP2/ERF transcription factor from *Brassica napus* enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Mol Biotechnol, 53 (2): 198~206
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration

- and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 781~803
- Zhao TJ, Sun S, Liu Y, Liu JM, Liu Q, Yan YB, Zhou HM (2006). Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*. *J Biol Chem*, 281 (16): 10752~10759
- Zhuang J, Cai B, Peng RH, Zhu B, Jin XF, Xue Y, Gao F, Fu XY, Tian YS, Zhao W et al (2008). Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 371 (3): 468~474
- Zhuang J, Jiang HH, Wang F, Peng RH, Yao QH, Xiong AS (2013). A rice OsAP23, functioning as an AP2/ERF transcription factor, reduces salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol Rep*, 31 (6): 1336~1345
- Zhuang J, Peng RH, Cheng ZM, Zhang J, Cai B, Zhang Z, Gao F, Zhu B, Fu XY, Jin XF et al (2009). Genome-wide analysis of the putative AP2/ERF family genes in *Vitis vinifera*. *Sci Hortic*, 123 (1): 73~81
- Zhuang J, Zhang J, Hou XL, Wang F, Xiong AS (2014). Transcriptomic, proteomic, metabolomic and functional genomic approaches for the study of abiotic stress in vegetable crops. *Crit Rev Plant Sci*, 33 (2-3): 225~237