

## 小桐子中一个新的ERF家族转录因子*JcERF3*基因的克隆及功能分析

王莎莎\*, 赵洪春\*, 邓凤飞, 龚明\*\*

云南师范大学生命科学学院, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明650500

**摘要:**从小桐子(*Jatropha curcas*)幼苗的叶片组织中分离出一个新的AP2/ERF类转录因子的编码基因, 命名为*JcERF3*。序列分析显示其完整编码区为729 bp, 编码蛋白由242个氨基酸组成。推测的蛋白质与其他物种的ERF3蛋白具有很高的序列相似性, 并含有一个保守的AP2结构域。对启动子元件的预测显示存在一个乙烯响应元件(ERE), 暗示*JcERF3*的表达可能受到乙烯的调节。核定位信号预测*JcERF3*可能定位于细胞核。过表达*JcERF3*的转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)离体叶盘在200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl溶液中的失绿程度显著低于野生型。经0°C低温胁迫24 h后, 转基因株系中游离脯氨酸和可溶性糖含量为野生型的3.79和1.67倍以上, 而电解质渗漏率仅为野生型的74%左右。12°C低温下转基因株系T1代种子的萌发速度和萌发率也远高于野生型。综上所述, *JcERF3*作为一个新的AP2/ERF转录因子, 其过表达赋予转基因烟草对低温和盐胁迫较强的耐受性, 为小桐子的抗逆遗传改良提供了重要的基因资源。

**关键词:**小桐子; 转录因子ERF; 过量表达; 低温胁迫; 盐胁迫

植物的生长和发育极大地受到环境因子的限制, 其中, 高盐、低温和干旱已成为世界范围内影响农业生产的重要环境限制因子。在长期进化过程中, 高等植物已经形成一系列保护性措施, 调节植物生理生化过程或代谢途径, 以维持植物正常生长发育(Chinnusamy等2004)。这些保护性措施很大程度上由特异性的转录因子调控, 通过对一系列防御相关基因的转录激活来实现(Singh等2002)。

AP2/ERF转录因子是植物中一个大的转录因子家族, 根据其DNA结合结构域的数量和类型差异可分为4个亚家族, 分别为AP2、CBF/DREB、ERF和RAV (Sakuma等2002)。AP2亚家族包含两个AP2/ERF域, 主要参与植物发育调节(Chuck等1998; Elliott等1996)。RAV亚家族含有一个AP2/ERF结构域和一个特异的B3结构域, 是它区别于其他转录因子亚家族的主要特征(Hu等2004)。CBF/DREB亚家族通过特异性识别DRE/CRT元件参与调控植物对非生物胁迫的响应。相比之下, ERF亚家族则主要通过识别GCC盒, 广泛参与植物对干旱、高盐、病害等非生物和生物胁迫的响应。自Paz-Ares等(1987)首先从玉米(*Zea mays*)中分离出第一个ERF转录因子后, 大量的ERF编码基因已从番茄(*Solanum lycopersicum*) (Gu等2002)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Oñate-Sánchez等2002)、烟草(*Nicotiana tabacum*) (Fischer等2004)、小麦(*Triticum aestivum*) (Egawa等2006)、棉花(*Gossypium hirsutum*) (Jin等2009)等植物中克隆出来。Cao等

(2006)的研究显示, 水稻(*Oryza sativa*)中*OsBIERF1*、*OsBIERF3*和*OsBIERF4*的表达在高盐、低温、干旱和机械损伤处理下均发生上调。番茄中*TERF1*转录本的积累也受到干旱、低温和脱落酸(abscisic acid, ABA)胁迫的显著诱导, 并参与乙烯响应和渗透调节途径(Zhang等2005)。GmERF3过表达提高了转基因烟草对高盐、干旱和青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)等病原菌的耐受性(Zhang等2009)。与此相似, 过表达*RsERF1*的拟南芥植株中, 非生物胁迫相关基因如*ABF3*、*ABF4*等的表达增强, 并赋予转基因拟南芥对NaCl胁迫较高的抗性(Ayarpadikannan等2014)。这些研究证实了ERF通过激活或抑制靶基因的表达, 提高植物对高盐、干旱、低温、病原菌等非生物和生物胁迫的耐受性。此外, ERF蛋白还可能在植物信号转导中起到关键的调控作用(Xu等2011; Thirugnanasambantham等2014)。

小桐子(*Jatropha curcas*)是属于大戟科麻疯树属的落叶灌木或小乔木, 原产于美洲, 现广泛分布于全世界热带及亚热带地区。小桐子所具备的生物产量大、适应范围广、耐贫瘠等特性使之成为水土保持、荒山绿化的先锋树种(Contran等2013), 也是开发生物农药、新药、化工原料的理想资源,

收稿 2017-06-09 修定 2017-06-18

资助 国家自然科学基金(31460182和31460059)。

\* 并列第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: gongming63@163.com)。

是公认的具有巨大开发潜力的能源植物树种(Pandey等2012; Nithiyantham等2012)。随着小桐子基因组测序的完成(Hirakawa等2012; Sato等2011)和遗传转化体系的逐步建立(Kajikawa等2012; Pan等2010),关于小桐子胁迫耐受性分子机理的研究受到越来越多的关注,一系列抗性相关基因开始得到分离和鉴定。尽管如此,关于小桐子中转录因子的相关报道至今还很少,目前只有两个ERF类转录因子的鉴定见到了相关报道(Tang等2007; Wang等2015)。而高等植物中的ERF家族通常由多个成员组成,如拟南芥和水稻中分别注释到122和139个ERF编码基因(Nakano等2006)。对小桐子中ERF家族转录因子不同成员的功能研究将有助于进一步阐明和完善小桐子抗逆的分子机制。

在本研究中,借助我们实验室前期对小桐子在低温(Wang等2013)胁迫响应与适应过程中的高通量测序分析,从小桐子叶片中克隆获得一个新的ERF编码基因,命名为*JcERF3*。过表达*JcERF3*的转基因烟草离体叶片在NaCl溶液中的失绿速率下降,在0°C低温胁迫下可溶性糖和游离脯氨酸积累水平升高,并具有较低的电解质渗漏率,表现出增强的低温和盐胁迫耐受性,为小桐子的耐逆遗传改良提供了新的基因资源。

## 材料与方法

### 1 实验材料与试剂

实验所用小桐子(*Jatropha curcas* L.)种子来自云南省楚雄州元谋县。基因扩增用高保真酶(PrimeSTAR GXL)、烟草RNA提取试剂(RNAiso Plus)、反转录试剂盒(PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、DNA凝胶回收试剂盒(TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0)、DNA加

A尾试剂盒(DNA A-tailing Kit, TaKaRa)、TA质粒提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0)、农杆菌电转化感受态细胞(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cells)均购自大连宝生物公司;TA克隆载体(pGEM-T-easy)、快速链接系统(LigaFast™ Rapid DNA Ligation System)购自普洛麦格公司;限制性内切酶购自NEB公司;基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;其他试剂均为国产分析纯。PCR引物合成和测序委托华大生物技术有限公司完成。

### 2 实验方法

#### 2.1 小桐子材料的培养

小桐子种子以1% (m/V) CuSO<sub>4</sub>进行表面消毒30 min,超纯水漂洗5~6遍,置于25°C恒温浸种18 h后播种在垫有6层湿滤纸的白磁盘中,置于26°C、75%相对湿度的人工培养箱中暗萌发7 d;将均匀萌发的种子转入人工气候箱[培养条件设置为26°C/20°C(昼/夜),光照时长16 h/8 h(昼/夜),相对湿度75%]中,使用1/2浓度Hoagland's营养液进行砂培生长2~3周,收获叶片组织于液氮中速冻,-80°C保存备用。

#### 2.2 转录因子*JcERF3*基因的克隆

小桐子叶片组织总RNA提取参照邓凤飞(2016)的方法;第一链cDNA的合成参照反转录试剂盒PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)说明书进行。基于本实验室前期对低温(Wang等2013)胁迫过程中小桐子叶片转录组测序结果,借助NCBI数据库提供的序列信息,根据*JcERF3*基因全长mRNA设计两对引物*JcERF3*-F1/R1和*JcERF3*-F2/R2(表1),以反转录的cDNA为模板进行巢式PCR,反应体系为:2 μL cDNA模板(或第一轮PCR产物)、10 μL 5×PrimeSTAR GXL Buffer、4 μL

表1 实验使用的引物信息

Table 1 Primers used in this experiment

引物名称	序列(5'→3')	备注
JcERF3-F1	AGAGAAGGTCTGTGTTGTG	第一轮PCR
JcERF3-R1	TAATAATCGTAATCGTCATC	
JcERF3-F2	ggatccATGAGGAGAGGAAGAGCC	第二轮PCR
JcERF3-R2	gagctcTCAAAGGCATAGAGCAGTrC	
35s-F-pBII21	GACGCACAATCCCACTATCC	载体pBII21鉴定引物
NOS-R	GATAATCATCGCAAGACCGG	

小写字母表示引入的酶切位点。

dNTP Mixture ( $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $1 \mu\text{L}$  JcERF-F1/R1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )或JcERF-F2/R2 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $1 \mu\text{L}$  PrimeSTAR GXL DNA聚合酶, 加双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)至 $50 \mu\text{L}$ 。PCR反应条件为:  $98^\circ\text{C}$ 变性10 s,  $55^\circ\text{C}$ 退火15 s,  $68^\circ\text{C}$ 延伸1 min, 30个循环。PCR产物经凝胶回收、加A尾后, 与pGEM-T-easy载体连接, 经热刺激转化大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers] DH5 $\alpha$ 菌株, 挑取单克隆委托华大生物技术有限公司进行测序。鉴定正确的阳性克隆命名为pGEM-T-*JcERF3*。

### 2.3 生物信息学分析

亚细胞定位分析采用Wolf Psort Prediction在线工具([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)); 启动子序列来自NCBI数据库, 转录起始位点和启动子元件预测利用在线工具BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project, [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))、Softberry (<http://www.softberry.com>)和PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)完成; 多重序列比对和进化树的构建采用软件ClustalX和MEGA 5.0 (用最大似然法, bootstrap值设为1 000); 蛋白的一级结构分析采用ProtParam (<http://web.expasy.org/>); 保守结构域分析采用NCBI CDD搜索在线工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。

### 2.4 转基因烟草株系的获得

pGEM-T-*JcERF3*克隆质粒经BamH I和Sac I双酶切, 亚克隆入二元植物表达载体pBI121, 构建重组表达载体pBI121-*JcERF3*, 以CaMV 35S启动子驱动外源*JcERF3*基因的表达。重组质粒经电转化转入农杆菌LBA 4404感受态细胞(TaKaRa), 转化根据说明书进行操作。以农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘Xanthi’ (邓凤飞2016), 并经卡那霉素筛选转基因株系。取转基因烟草幼苗的叶片组织进行基因组DNA和总RNA提取, 分别以基因组PCR和逆转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)检测阳性株系。收取转基因株系的T1代种子用于抗性分析实验。

### 2.5 转基因烟草种子发芽率的测定

转基因烟草和野生型烟草种子经表面消毒后播种于MS固体培养基(邓凤飞2016), 置于 $26^\circ\text{C}$ 下暗培养3 d后平均分为两组: 一组在正常培养条件的培养箱中萌发, 培养条件为 $26^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$  (昼/夜),

16 h光照/8 h黑暗的光周期(强度是 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 相对湿度为75%; 另一组转入低温( $12^\circ\text{C}$ )培养箱中萌发, 光周期、光强和相对湿度设置同上。每天记录统计烟草种子的发芽率, 直至所有种子萌发完全。实验设置3组生物学重复, 每组至少50粒种子。

### 2.6 离体叶片在高盐胁迫下的失绿实验分析

转基因烟草和野生型烟草植株取第三位的叶片进行打孔, 获得的叶盘圆片置于0和 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl溶液中, 在 $26^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$  (昼/夜)、16 h光照/8 h黑暗光周期( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )、相对湿度为75%的条件下培养3~6 d, 观察叶片的失绿情况。实验进行3个生物学重复。

### 2.7 转基因烟草的低温耐受性分析

转基因烟草和野生型烟草幼苗长到30 d左右时, 挑选长势均一的烟草植株进行低温( $0^\circ\text{C}$ )胁迫处理24 h, 收集对照(0 h)和胁迫后植株的叶片组织用于生理生化指标的测定。叶片电解质渗漏率、游离脯氨酸含量、可溶性糖含量的测定参照李忠光和龚明(2014)的方法。

## 实验结果

### 1 小桐子*JcERF3*基因的克隆及序列分析

在实验室前期对小桐子在低温胁迫过程中叶片组织的全转录组测序基础上(Wang等2013), 通过巢式PCR扩增, 获得转录因子*JcERF3*基因的完整编码区(coding sequence, CDS)序列, 长度为729 bp, 编码一个由242个氨基酸构成的蛋白质。生物信息学分析表明, *JcERF3*蛋白的分子质量为26.57 kDa, 等电点(pI)为9.38, 在其N端的37~99 aa间存在一个保守的AP2结构域(图1)。Wolf Psort预测显示*JcERF3*蛋白具有核定位信号, 是在细胞核内表达的转录因子。借助NCBI数据库比对, 获得*JcERF3*基因起始密码子上游-1.5 kb的启动子区域, 利用Softberry和BDGP对转录起始位点进行预测, PlantCARE启动子元件预测分析发现在转录起始位点上游630 bp处存在一个乙烯响应元件(ethylene-responsive element, ERE), 此外, 还存在两个热激响应元件(heat-shock element, HSE)、TATA框(TATA-box)、防御和胁迫响应元件(TC-rich repeats)以及昼夜节律调节元件(Circadian)等(图2), 表明*JcERF3*的转录可能受多种信号调控。

```

1   10   20   30   40   50   60
1  ATGAGGAGAGGAAGAGCGCGCTGACATCCGCTGCGGCTACAGATGCTAAACAAGCCGTG
1  M R R G R A A V T S A A A T D A K Q A V

70   80   90   100  110  120
61  GAAACCAACGGATCTGCACCACAAAAATCCTAAACGGAAGAGAACCAGATATAGAGGA
21  E T N G S A P Q K I L N G R E P R Y R G

130  140  150  160  170  180
121 GTTCGTAAAAGACCATGGGGCAGATTTGCTGCGGAGATTAGAGATCCATGGAAGAAGACG
41  V R K R P W G R F A A E I R D P W K K T

190  200  210  220  230  240
181 AGAGTTTGGCTGGTACTTTGATTCTGCAGAAGACGCTGCACGTCTTACGACAAGGCG
61  R V W L G T F D S A E D A A R A Y D K A

250  260  270  280  290  300
241 GCTCGTACGCTTCGTGGACCGAAAGCTAAAACCAATTTCTATCTACTTCTAATTTA
81  A R T L R G P K A K T N F P I S T S N L

310  320  330  340  350  360
301 TCTCCTTTCACCTATCAAAACCCGCCGACCCGTTTCATGGATACCGGATTTATTCATCA
101 S P F T Y Q N P P D P F M D H R I Y S S

370  380  390  400  410  420
361 AATGCATTTCAAGAGCATCATGTAATCCTCAAAGACCTACGCTAGCAGTTGAGTAGT
121 N A F Q E H H V N P Q R P T S S S L S S

430  440  450  460  470  480
421 ACCGTCGAGTCCTTCAGCGGTCCCGGCCACCAACGACGGTGCTACCACCAATATCAACA
141 T V E S F S G P R P P T T V L P P I S T

490  500  510  520  530  540
481 ACAAATCAGGTGTTTTATTAGCGACGGTAACGAGAGGTCACAAGAGACCATCCTCGG
161 T K S G V L L A T V T R G H K R H H P R

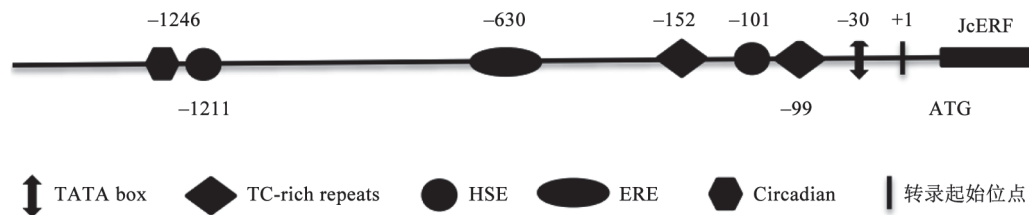
550  560  570  580  590  600
541 ACCCGCCGGTGGTGCCGGAAGATTGTCACAGCGATTGTGATTTCATCTTTCAGTAGTT
181 T P P V V P E D C H S D C D S S S S V V

610  620  630  640  650  660
601 GACGATGGAGATATTGCATCATCGTCTTCTCTATACAGGAAGCCGTTACCGTTGATCTG
201 D D G D I A S S S S L Y R K P L P F D L

670  680  690  700  710  720
661 AATTTTCCACCGTTGGATCAGGTTGACTTTGCTGGTGATGATCTTCAATGCACCTGCTCTA
221 N F P P L D Q V D F A G D D L Q C T A L

721 TGCCTTTGA
241 C L *

```

图1 小桐子*JcERF3*基因的核苷酸序列及其推导的蛋白序列Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *JcERF3* from *J. curcas*图2 *JcERF3*基因启动子区域顺式作用元件预测Fig.2 Prediction of *cis*-acting elements in *JcERF* promoter

2 JcERF3蛋白的多重序列比对及进化树分析

运用Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对JcERF3和来源于其他植物的ERF蛋白进行多重序列比对, 结果显示JcERF3与同为大戟科的近缘物种蓖麻(*Ricinus communis*)的ERF3蛋白(EEF31169.1)具有最高的序列一致性(75%), 此外, 与木本的毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP\_002298817.1)、可可

(*Theobroma cacao*, XP\_007020716.1)中ERF3蛋白一致性分别达到71%和66%, 但是与已报道的两个小桐子AP2/ERF蛋白序列一致性仅不到25%, 充分表明JcERF3是小桐子中一个新的ERF家族成员。用最大似然法构建了ERF蛋白的系统进化树, JcERF3与蓖麻的ERF3蛋白显示出最近的进化关系(图3)。

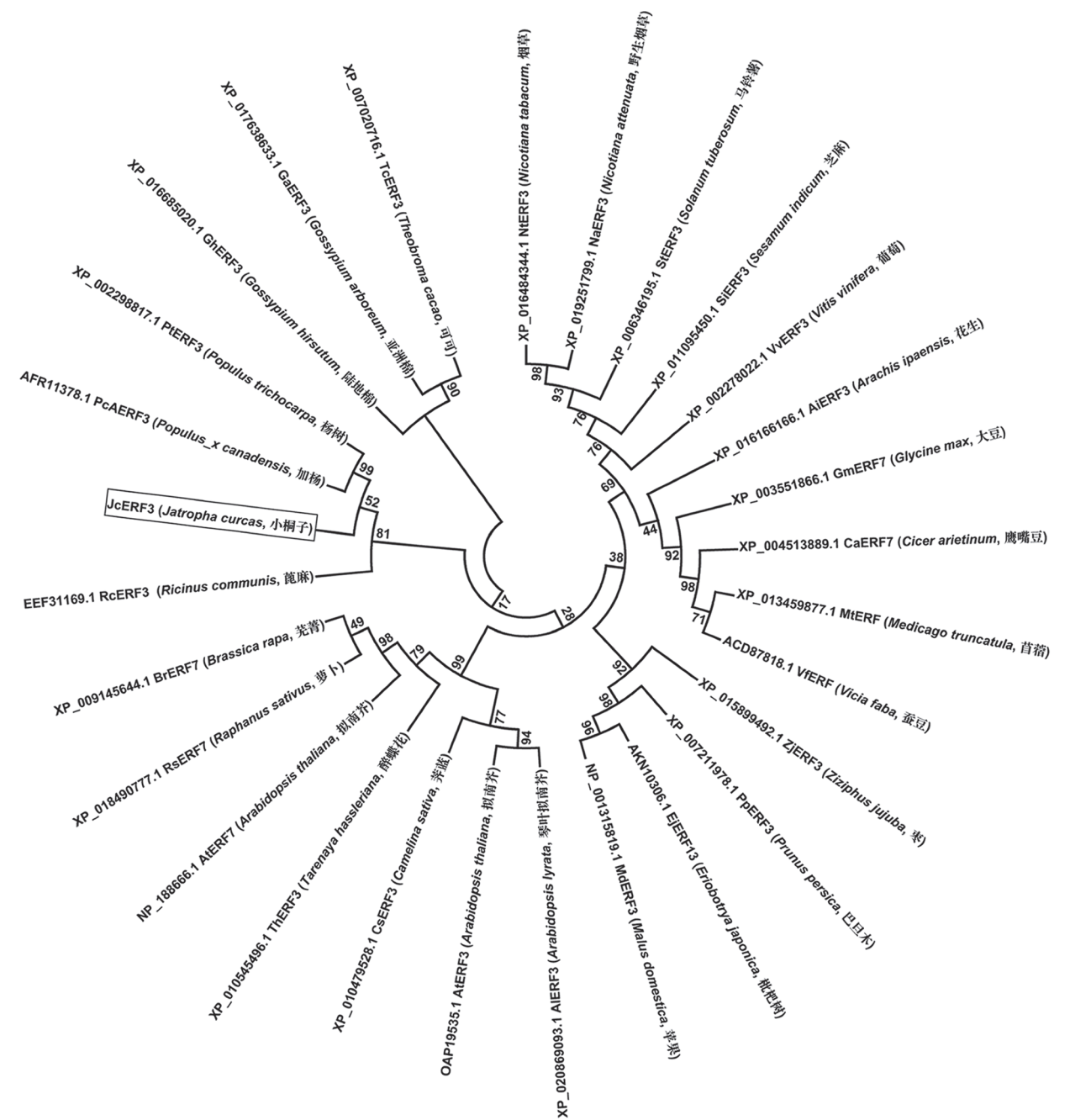


图3 小桐子JcERF3与其他植物ERF蛋白的系统进化分析  
 Fig.3 Phylogenetic analysis of JcERF3 with other ERF transcription factors from various plant species  
 框中为JcERF转录因子; 线上数字表示置信度。

#### 4 *JcERF3*转基因烟草种子在低温下的萌发实验

为了验证*JcERF3*的功能,我们构建了过表达植物载体pBI121-*JcERF3*。经农杆菌介导的叶盘转化法获得过表达*JcERF3*的转基因烟草株系,经基因组PCR和RT-PCR验证,筛选得到的3个阳性转基因烟草株系,分别命名为*JcERF3-A*、*JcERF3-8*和*JcERF3-13*,并收获T1代种子进行进一步的抗性分析。将转基因株系和野生型烟草种子播种于MS培养基上,置于正常温度和低温12°C下进行萌发,对萌发率进行统计。结果表明,在正常培养条件下,转基因和野生型烟草的发芽速度和发芽率没有明显差异(图4-A);而在低温12°C下,转基因株系种子的萌发情况要明显优于野生型(图4-B),到第14天时野生型烟草种子的萌发率仅为32%,转基因烟草种子的萌发率达到76% (图4-B和C)。

#### 5 *JcERF3*转基因烟草的耐盐性分析

为初步检测*JcERF3*在植物耐盐性方面的作用,我们对转基因株系和野生型烟草离体叶片进行失绿实验分析。将均匀打孔的叶盘置于200 mmol·L<sup>-1</sup>的NaCl溶液中,以不添加NaCl的蒸馏水处理为对照,

观察叶盘的失绿情况。结果显示(图5),处理3 d后,对照组的转基因烟草叶盘和野生型烟草叶盘未表现出明显的失绿现象,此时在200 mmol·L<sup>-1</sup>的NaCl溶液中,野生型烟草约70%的叶盘开始明显黄化,而转基因烟草叶盘的黄化率不超过16.7%。到处理6 d时,野生型烟草叶盘几乎全部黄化,而转基因烟草叶片的黄化率仍维持在40%~50%,初步证实*JcERF3*的过表达赋予转基因烟草一定的高盐胁迫耐受性。

#### 6 *JcERF3*转基因烟草的低温耐受性分析

为进一步验证*JcERF3*过表达株系的低温耐受性变化,将转基因和野生型烟草幼苗置于0°C低温胁迫下处理24 h,并对叶片的电解质渗漏率、游离脯氨酸和可溶性糖含量进行测定。电解质渗漏率被看作是逆境胁迫下反映细胞膜完整程度的直接指标。如图6所示,低温胁迫24 h后,野生型烟草的电解质渗漏率迅速升高至约39.96%,而三个转基因株系的电解质渗漏率分别为野生型的76.03%、78.64%和66.06%,显示出*JcERF3*的过表达缓解了低温胁迫对细胞膜的损伤程度。可溶性糖和游离

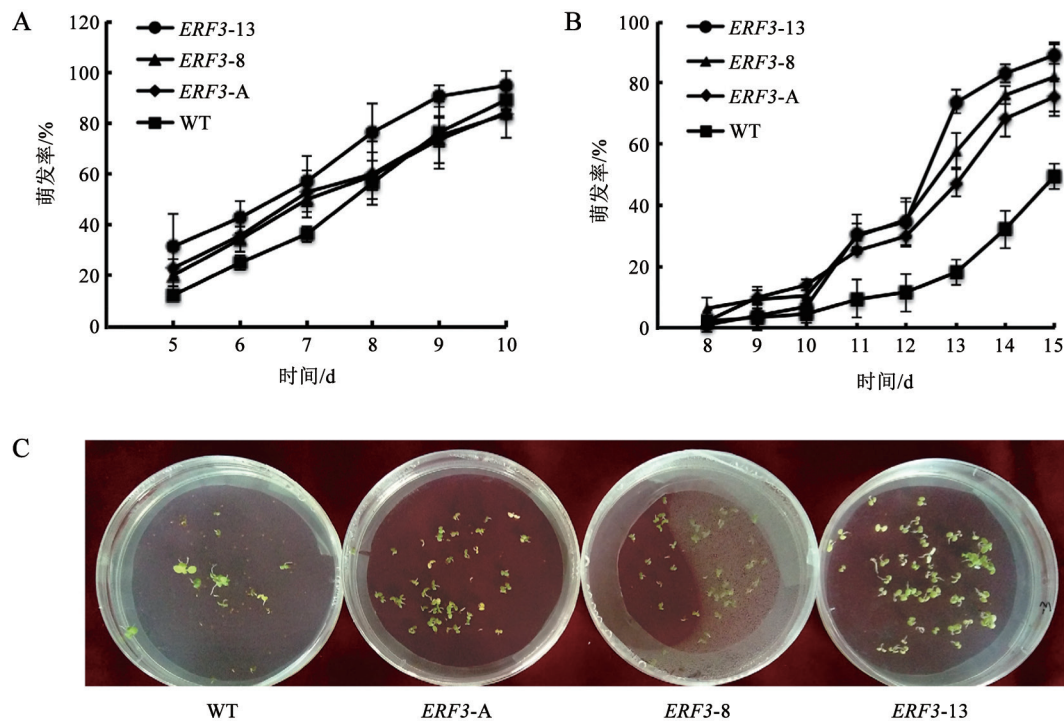


图4 转基因和野生型烟草的萌发实验

Fig. 4 Germination assays of transgenic and wild type tobacco seeds

A: 正常温度下的萌发率; B: 低温(12°C)胁迫下的萌发率; C: 低温(12°C)胁迫14 d后的萌发情况。WT: 野生型; 图5和6同。

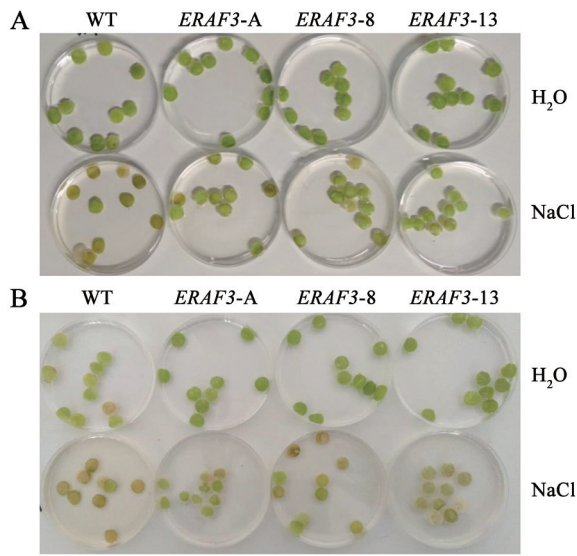


图5 离体叶盘在200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl溶液中的失绿分析  
Fig.5 Chlorophyll lost assays of leaf disk exposed to 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl solution

图片摄于处理的第3和第6天,以蒸馏水处理为对照。

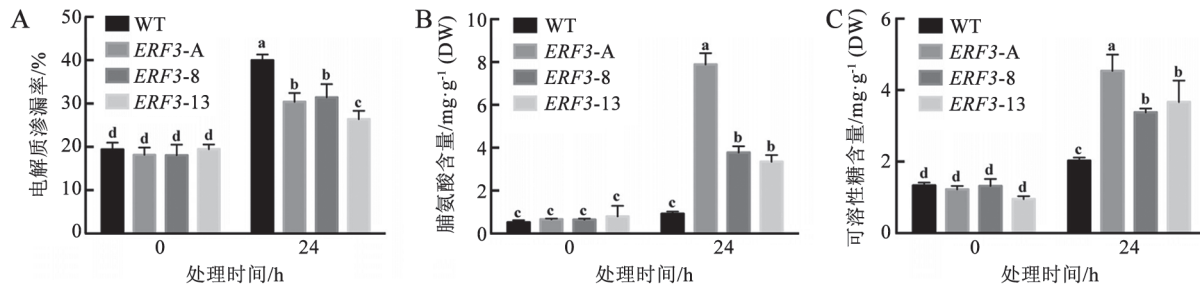


图6 低温胁迫下烟草叶片电解质渗漏率(A)、游离脯氨酸(B)及可溶性糖(C)含量的变化  
Fig.6 Effect of low temperature stress on electrolyte leakage (A), and contents of free proline (B) and soluble sugars (C) in tobacco leaves

拟南芥和水稻中分别注释了122和139个ERF编码基因。小桐子作为近年来备受关注的能源植物树种,有关其ERF家族成员的相关报道目前还很少。充分发掘并对不同ERF成员的功能进行分析,将极大地有助于阐明小桐子耐逆性形成的分子机制网络。本研究借助实验室前期对小桐子叶片的全转录组测序结果(Wang等2013),克隆获得一个新的ERF类转录因子,其编码蛋白含有一个高度保守的AP2结构域。然而蛋白序列比对分析显示该基因的编码蛋白与目前已报道的两个小桐子AP2/ERF类转录因子的序列一致性仅为不足25%,与其他植物(如蓖麻、毛果杨等)的ERF3类转录因子的一致

脯氨酸是高等植物体内重要的渗透调节物质,其积累水平可在一定程度上反映植物对胁迫的耐受能力。测定结果发现,低温胁迫24 h后,野生型烟草叶片中游离脯氨酸含量没有显著变化,而三个转基因株系中的脯氨酸含量均发生大幅度增加,分别达到野生型的8.66、4.14和3.67倍。与此相似,尽管低温胁迫24 h促进了野生型烟草叶片中可溶性糖的积累(与0 h对照相比增加了51.69%),但仍仅为同时期转基因烟草的44.57%、59.83%和55.12%,证实了*JcERF3*的过表达提高了烟草在低温胁迫下的渗透调节物质积累能力。

## 讨 论

AP2/ERF转录因子是植物中最大的转录因子家族之一,其中,ERF亚家族具有典型的AP2结构域,被认为广泛参与了植物对生物和非生物胁迫因子的响应。研究显示,ERF亚家族成员众多,如

性达到70%左右,表明*JcERF3*是一个新的AP2/ERF家族成员。

研究显示,ERF转录因子的表达受到多种生物和非生物胁迫因子的诱导,Wang等(2015)和Tang等(2007)也证实了小桐子*JcERF*和*JcERF2*基因的表达受到干旱、NaCl、外源ABA、乙烯、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)以及机械损伤的诱导。本研究借助NCBI和小桐子基因组数据库(*Jatropha* Genome Database, <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)获得了*JcERF3*起始密码子上游-1.5 kb处的启动子区域,并对转录起始位点和顺式作用元件进行了预测,发现除了存在一个ERE外,还存在两个HSE、

防御和胁迫响应元件(TC-rich repeats)、生物节律调节元件(Circadian)等,暗示JcERF3的转录还可能受到高温、生物节律等因素的调节。植物激素信号转导途径广泛参与了植物对环境因子的发育调节,尤其是ABA,其与低温信号发生交谈(crosstalk)的分子机理目前还没有完全阐明。因此,不同ERF转录因子成员对胁迫的响应模式差异,可能以不同方式调控了外界因素与内源性信号网络之间的互作,其具体的分子机制还有待更加深入的研究。此外,以往的研究也提出,ERF类转录因子是一把“双刃剑”,尽管大多数ERF均作为转录激活因子调控下游抗性基因的表达,但也有少数ERF蛋白是转录抑制因子,如A-5 DREBs和B-1 ERFs (Dong等2012)。因此,本研究中获得的JcERF3的转录激活效应及其识别基序与互作蛋白的特点,仍需要进一步借助如酵母双杂交、酵母单杂交或双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)等技术深入发掘。

有关过表达验证ERF转录因子功能的相关报道已有很多(Thirugnanasambantham等2014),ERF可通过识别并结合下游基因启动子中的GCC基序,激活下游基因如PR、COR基因(如*rd29A*、*cor6.6*、*GST*)等(Yi等2004)。Wang等人的研究也发现,过表达JcERF2的转基因烟草中,*NtOsmotin*、*NtPR1a*、*NtSAR8.2a*等下游基因的表达水平显著提高,伴随着叶片中游离脯氨酸、可溶性糖含量的升高,最终表现出对干旱和高盐胁迫的耐受性增强(Wang等2015)。与此相似,本研究通过对过表达JcERF3的转基因烟草进行叶盘失绿分析和低温耐受性分析也发现,JcERF3的导入提高了烟草对高盐胁迫的耐受性,增强了烟草在低温胁迫下的渗透调节能力,缓解了低温对细胞膜的损伤。然而,JcERF3如何引起这些抗性效应的具体机理和事件还需要进一步分析和阐明,如通过构建突变体库或RNAi技术获得功能缺失的株系,对突变株系或过表达株系进行全转录组分析,将有助于丰富JcERF3基因的作用网络信息。

### 参考文献

- Ayarpadikannan S, Chung E, Kim K, So HA, Schraufnagle KR, Lee JH (2014). *RsERF1* derived from wild radish (*Raphanus sativus*) confers salt stress tolerance in *Arabidopsis*. *Acta Physiol Plant*, 36 (4): 993–1008
- Cao Y, Song F, Goodman RM, Zheng Z (2006). Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress. *J Plant Physiol*, 163 (11): 1167–1178
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*, 55 (395): 225–236
- Chuck G, Meeley RB, Hake S (1998). The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene *indeterminate spikelet1*. *Genes Dev*, 12 (8): 1145–1154
- Contran N, Chessa L, Lubino M, Bellavite D, Roggero PP, Enne G (2013). State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: from sowing to biodiesel and by-products. *Ind Crop Prod*, 42: 202–215
- Deng F (2016). Regulation of abscisic acid on metabolism of proline and betaine and molecular cloning and functional analysis of stress-related genes in *Jatropha curcas* (Master's thesis). Kunming: Yunnan Normal University (in Chinese with English abstract) [邓凤飞(2016). ABA对逆境胁迫下小桐子脯氨酸和甜菜碱代谢的影响及抗逆相关基因的克隆与功能分析(硕士论文). 昆明: 云南师范大学]
- Dong W, Ai X, Xu F, Quan T, Liu S, Xia G (2012). Isolation and characterization of a bread wheat salinity responsive ERF transcription factor. *Gene*, 511: 38–45
- Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S (2006). Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a *DREB2* homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes. Genet Syst*, 81 (2): 77–91
- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQJ, Gerentes D, Perez P, Smyth DR (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*, 8 (2): 155–168
- Fischer U, Dröge-Laser W (2004). Overexpression of *NtERF5*, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Mol Plant Microbe Interact*, 17 (10): 1162–1171
- Gu YQ, Wildermuth MC, Chakravarthy S, Loh YT, Yang C, He X, Han Y, Martin GB (2002). Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14 (4): 817–831
- Hirakawa H, Tsuchimoto S, Sakai H, Nakayama S, Fujishiro T, Kishida Y, Kohara M, Watanabe A, Yamada M, Aizu T, et al (2012). Upgraded genomic information of *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol*, 29 (2): 123–130
- Hu YX, Wang YX, Liu XF, Li JY (2004). *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Res*, 14 (1): 8–15
- Jin L, Huang B, Li H, Liu J (2009). Expression profiles and transactivation analysis of a novel ethylene-responsive transcription factor gene *GhERF5* from cotton. *Prog Nat Sci*, 19 (5): 563–572
- Kajikawa M, Morikawa K, Inoue M, Widyastuti U, Suharsono S, Yokota A, Akashi K (2012). Establishment of bispyribac selection



- protocols for *Agrobacterium tumefaciens*- and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol*, 29 (2): 145–153
- Li Z, Gong M (2013). *Comprehensive and Design Experiment Textbook in Plant Physiology*. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press (in Chinese) [李忠光, 龚明(2013). 植物生理学综合性和设计性实验教程. 武汉: 华中科技大学出版社]
- 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
- Nithiyantham S, Siddhuraju P, Francis G (2012). Potential of *Jatropha curcas* as a biofuel, animal feed and health products. *J Am Oil Chem Soc*, 89 (6): 961–972
- Oñate-Sánchez L, Singh KB (2002). Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol*, 128 (4): 1313–1322
- Pan JL, Fu QT, Xu ZF (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection. *Afr J Biotechnol*, 9 (39): 6477–6481
- Pandey VC, Singh K, Singh JS, Kumar A, Singh B, Singh RP (2012). *Jatropha curcas*: a potential biofuel plant for sustainable environmental development. *Renew Sust Energ Rev*, 16 (5): 2870–2883
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H (1987). The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO Journal*, 6 (12): 3553–3558
- 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
- Sato S, Hirakawa H, Isobe S, Fukai E, Watanabe A, Kawashima K, Minami C, Muraki A, Nakazaki N, et al (2011). Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. *DNA Res*, 18: 65–76
- Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 430–436
- Tang M, Sun J, Liu Y, Chen F, Shen S (2007). 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*, 63 (3): 419–428
- Thirugnanasambantham K, Durairaj S, Saravanan S, Karikalan K, Muralidaran S, Islam VIH (2014). Role of ethylene response transcription factor (ERF) and its regulation in response to stress encountered by plants. *Plant Mol Biol Rep*, 33 (3): 1–11
- Wang H, Zou Z, Wang S, Gong M (2013). Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L. *PLoS ONE*, 8 (12): e82817
- Wang X, Han H, Yan J, Chen F, Wei W (2015). A New AP2/ERF transcription factor from the oil plant *Jatropha curcas* confers salt and drought tolerance to transgenic tobacco. *Appl Biochem Biotech*, 176 (2): 582–597
- Xu ZS, Chen M, Li LC, Ma YZ (2011). Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *J Integr Plant Biol*, 53 (7): 570–585
- Yi SY, Kim JH, Joung YH, Lee S, Kim WT, Yu SH, Choi D (2004). The pepper transcription factor *CaPFI* confers pathogen and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 136: 2862–2874
- Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y (2009). Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J Exp Bot*, 60 (13): 3781–3796
- Zhang X, Zhang Z, Chen J, Chen Q, Wang XC, Huang R (2005). Expressing *TERF1* in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. *Planta*, 222 (3): 494–501

## Isolation and functional characterization of a new ERF transcription factor *JcERF3* from *Jatropha curcas*

WANG Sha-Sha\*, ZHAO Hong-Chun\*, DENG Feng-Fei, GONG Ming\*\*

School of Life Sciences, Yunnan Normal University; Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education; Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650500, China

**Abstract:** A novel candidate for ERF-like transcription factor was isolated from the leaf tissue of *Jatropha curcas*, and designated as *JcERF3*. The complete coding region (CDS) of *JcERF3* was 729 bp, encoding a polypeptide of 242 amino acid residues. The predicted *JcERF3* protein shares high identities with ERF3-like proteins from other plant species, and contains a conserved DNA-binding domain (AP2/ERF domain) with 58 amino acids. An ethylene-responsive element (ERE) was predicted as a *cis*-element in the promoter region, indicating the potential regulation of ethylene on expression of *JcERF3*. Prediction of nuclear localization sequence (NLS) implies that *JcERF3* protein probably localizes in nucleus. Overexpression of *JcERF3* conferred salinity tolerance in transgenic tobacco, as was evident by leaf disk assays. When inoculated in the solution of 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, leaf disks of transgenic plants maintained a relatively higher content of chlorophyll, as compared to the wild type (WT). Beyond that, when exposed to chilling stress (0°C) for 24 h, the transgenic plants showed increased proline (at least 3.79-fold) and soluble sugar (at least 1.67-fold) contents and reduced electrolyte leakage (approx. 74%), as compared to WT. Germination assays of T1 seeds under chilling stress also indicates the transgenic tobacco seeds showed earlier and higher percent of germination, as compared to WT. Taken together, as a novel AP2/ERF transcription factor, overexpression of *JcERF3* conferred transgenic tobacco plants an enhanced tolerance to chilling and high salinity stresses. It can be used as a potential candidate gene for genetic improvement of stress tolerance in *J. curcas*.

**Key words:** *Jatropha curcas*; transcription factor ERF; overexpression; chilling stress; salinity stress

---

Received 2017-06-09 Accepted 2017-06-18

This work was supported by the National Science Foundation of China (Grant Nos. 31460182 and 31460059).

\*Co-first authors.

\*\*Corresponding author (E-mail: gongming63@163.com).