

小麦转录因子基因 *TaERF7* 的克隆 及其表达分析

李紫良¹, 张建朝², 李 政¹, 冯小雨¹, 夏 玉¹, 董 剑¹, 王军卫^{1*}

(1 西北农林科技大学 农学院, 国家杨陵农业生物技术育种中心/国家小麦改良中心杨陵分中心/小麦育种教育部工程研究中心/
陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室, 陕西杨陵 712100; 2 新疆农业科学院粮食作物研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘 要: 温光敏核不育小麦 (*Triticum aestivum*) 百农不育系 (Bainong sterility, BNS) 是一种良好的小麦杂种优势利用材料, 利用其低温不育、高温可育的特性可以实现“两系法”杂交小麦育种。该研究为找到 BNS 育性转换的关键基因, 从已有 BNS 不育和可育花药的基因芯片数据中, 鉴定得到表达存在差异的 *TaERF7* 基因, 并通过设计引物克隆了 *TaERF7* 的 cDNA 和启动子序列, 采用 qRT-PCR 分析 *TaERF7* 对不同温度和光照的响应。结果显示: (1) 生物信息学分析表明, *TaERF7* 基因的 CDS 区有 660 bp, 编码 219 个氨基酸; *TaERF7* 蛋白含有 AP2 结构域和 2 个 EAR 基序, 属于第二类乙烯响应因子 (Ethylene response factor, ERF); *TaERF7* 的氨基酸序列与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) AtERF4 同源, 可能是一种转录抑制因子; *TaERF7* 启动子区含有多个光响应和低温响应的顺式作用元件。 (2) qRT-PCR 结果表明, *TaERF7* 在 BNS 的不同组织与器官中均有表达; 在长日照 (14 h) 下, *TaERF7* 在 BNS 中的表达量下调约 0.47 倍, 而在短日照 (10 h) 处理下, *TaERF7* 在 BNS 中的表达量上调约 1.14 倍; 4 °C 的低温处理使 *TaERF7* 表达量在 2 h 内上调了约 25.7 倍, 并且在 48 h 内一直保持较高的水平, 而在 37 °C 下虽然可以使 *TaERF7* 表达量在 1 h 内上调约 0.71 倍, 但 2 h 后便急剧下调, 到 12 h 时其表达量与对照相比已下调了约 0.85 倍。该研究结果初步证明, *TaERF7* 基因可能特异性结合下游基因启动子的 GCC box、DRE 和 CRT 元件, 调控下游基因的表达, 从而影响了 BNS 的育性。

关键词: 小麦; BNS 雄性不育系; 转录因子; *TaERF7*; 基因表达

中图分类号: Q785; Q789

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of Transcription Factor Gene *TaERF7* in Wheat (*Triticum aestivum*)

LI Ziliang¹, ZHANG Jianchao², LI Zheng¹, FENG Xiaoyu¹,
XIA Yu¹, DONG Jian¹, WANG Junwei^{1*}

(1 College of Agronomy, Northwest A&F University, National Yangling Agricultural Biotechnology & Breeding Center/
Yangling Branch of State Wheat Improvement Center/Wheat Breeding Engineering Research Center, Ministry of Education/Key
Laboratory of Crop Heterosis of Shaanxi Province, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of Food Crops, Xinjiang
Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: BNS is an efficient thermo-photo-sensitive genic male sterile line of wheat (*Triticum aestivum*). It is sterile in low temperature and fertile in high temperature. With these features, BNS was widely used

收稿日期: 2019-12-22; 修改稿收到日期: 2020-02-02

基金项目: 国家科技支撑计划 (2015BAD27B01); 国家自然科学基金 (31371697); 陕西省科技统筹创新工程计划 (2014KTZB02-01-02); 国家小麦产业技术体系项目 (K3070217023)

作者简介: 李紫良 (1996—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事小麦生殖发育研究。E-mail: 15721911215@163.com

* 通信作者: 王军卫, 副研究员, 主要从事小麦生殖发育和杂种优势利用研究。E-mail: wjw@nwsuaf.edu.cn

in hybrid wheat breeding. In this study, based on the gene chip data of the anthers of BNS sterile line and fertile line, we found that the transcription factor *TaERF7* was differentially expressed between the two lines, and cloned the cDNA and promoter sequences of *TaERF7*, analyzed *TaERF7* response to temperature and day length by qRT-PCR. The results showed that: (1) bioinformatics analysis revealed that the coding sequence (CDS) of *TaERF7* is 660 bp and encoding of 219 amino acids. *TaERF7* protein contains AP2 domain and two EAR motifs. It belongs to class II ethylene response factors (ERFs). The amino acid sequence of *TaERF7* is homologous to *AtERF4* in *Arabidopsis thaliana*, which is a transcriptional repressor. The promoter region contains multiple *cis*-acting elements with light and low temperature response. (2) The qRT-PCR results showed that *TaERF7* expressed in different tissues of BNS. The expression of *TaERF7* was down-regulated 0.47 fold under long daylight (14 h), while it was up-regulated 1.14 fold under short day (10 h). The low temperature treatment at 4 °C increased the expression of *TaERF7* about 25.7 fold in 2 h, and maintained a high level upto 48 h. The high temperature treatment at 37 °C increased the expression of *TaERF7* about 0.71 fold in 1 h, but it was sharply down-regulated to 0.85 fold after 2 h. According to the above results, we speculated that *TaERF7* combined to *cis*-acting element of downstream genes, regulated their expression, and caused the male sterility in BNS.

Key words: wheat; BNS male sterile line; transcription factor; *TaERF7*; gene expression

杂种优势利用作为提高作物产量、改善作物品质和抗性的重要途径,已经在很多粮食作物中得到应用,如玉米(*Zea mays* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、油菜(*Brassica napus* L.)等^[1-3]。温光敏雄性不育系小麦是通过“两系法”利用小麦杂种优势的基础。相比于其他方法,“两系法”具有制种程序简便,育性易恢复等优点,成为小麦杂种优势利用的热点^[4],在小麦杂交育种中起到重要作用。

温光敏型雄性不育系小麦百农不育系(Bainong sterility, BNS)由河南科技学院茹振钢教授团队经过多年培育而成,具有穗发育时期低温不育、高温可育的特性^[5]。近年来国内学者对 BNS 的温光特性、败育时期和育性转换关键基因进行了诸多研究。BNS 的育性敏感时期被确定在雌雄蕊分化期到四分体形成期,育性转换温度约为 8~12 °C,10 月 17 日之前播种高度不育,11 月 18 日后播种育性恢复^[6];BNS 的败育时期被确定在了二核期^[7];而对于育性转换关键基因的研究目前尚不明确。前人主要研究了 BNS 不育系和可育系在花药四分体到三核时期的基因表达变化^[8-10],而对 BNS 在育性敏感时期差异基因的研究极少报道。

转录因子作为调控基因表达的重要蛋白质分子,对基因的时空表达和表达强弱起到重要作用。温度变化可以诱导很多转录因子基因产生差异表达,从而引起植物表型的变化^[11-13]。在小麦中,许多乙烯响应转录因子(ethylene response factor, ERF)已经被证明参与到小麦生物胁迫与非生物胁迫的响应过程^[14-17]。其中,*TaERF1* 被干旱、盐和低温胁迫以及外源 ABA、乙烯和水杨酸诱导,通过

与 GCC-box 和 CRT/DRE 元件特异性结合调控下游靶基因的表达,*TaERF1* 的过表达可以提高转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对病原菌和非生物胁迫的抗性^[14]; *TaERF3* 也可以与 GCC-box 特异结合,并通过水杨酸信号通路参与对病原菌的防御机制^[15]; *TaERF4* 和 *TaERF5* 主要参与小麦的盐胁迫响应过程,其中 *TaERF4* 是一个转录抑制因子^[16-17]。

根据 ERF 转录因子含有不同的结构域可以将其分为四类^[18]。其中,第二类 ERF 转录因子在序列 N 端含有一个 AP2 结构域, C 端含有保守的两亲抑制基序(EAR 基序),在拟南芥和烟草(*Nicotiana tabacum*)中被鉴定为转录抑制因子^[19-20]。随后的研究表明,EAR 基序以两种形式存在于 ERF 转录因子中,分别是 DLNxxP 和 LxLxL^[21]。研究发现,带有 EAR 基序的 GmERF4 的表达可以提高烟草对盐和干旱胁迫的抗性^[22]。然而,大多数带有 EAR 基序的 ERFs 表达后会引起植物对非生物胁迫的抗性降低,而将 EAR 基序突变或删除后,突变后的 ERFs 的表达往往会使植物对非生物胁迫的抗性增强^[23-24]。例如,在番茄中过表达 *SlERF3* 严重抑制植株的生长,而 EAR 基序突变后的 *SlERF3*ΔRD 的表达则会使转基因番茄(*Solanum lycopersicon* L.)增强对盐胁迫的抗性,产生更多的花、果实和种子^[23]。过表达 *OsERF3* 对转基因水稻的乙烯释放和耐旱性起到抑制作用,而 EAR 基序突变的 *OsERF3* 的表达可以提高水稻的耐盐性和乙烯释放量^[24]。

在 BNS 的育性转换过程中,低温起到了决定性

的作用^[25]。相对于晚播 BNS 在穗发育时期的较高温度,早播的 BNS 在穗发育时遭受到的也是一种低温胁迫。环境的变化会使植物的基因转录发生改变,很多转录因子将会在此过程中参与转录调控^[26-27]。在 BNS 的雄性不育发生过程中,应该也有许多转录因子起到作用。然而,针对 BNS 雄性不育,至今仍没有开展转录因子的相关研究。

本课题组通过基因表达谱芯片技术,对 BNS 小麦不育系和可育系的花药差异表达基因进行分析,鉴定到一个乙烯响应转录因子基因^[28]。经过保守结构域分析,发现该基因与小麦 ERF 类转录因子基因 *TaERF* 同源,暂且命名为 *TaERF7*^[14-17,29]。本研究通过 PCR 克隆得到了 *TaERF7*,通过生物信息学分析,预测 *TaERF7* 启动子区的顺式作用元件,以及利用 qRT-PCR 分析 *TaERF7* 表达模式,为后续探明 BNS 的雄性不育奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验所用温光敏核不育小麦 BNS 为本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 DNA、总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

BNS 叶片 DNA 提取参考 Murray 和 Thompson^[30]的方法进行。总 RNA 的提取使用 TRNzol-A+(天根,北京),cDNA 的合成使用 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(全式金,北京)。使用 NanoDrop One 超微量分光光度计(Thermo,美国)测定得到 cDNA 的浓度和纯度,并使用 Nuclease-free Water 将 cDNA 稀释到 100 ng/ μ L。

1.2.2 *TaERF7* 和 *TaERF7* 启动子的克隆 分别以上述 1.2 得到的 DNA 和 cDNA 为模板,以 Oligo7 设计的 *TaERF7*-F/R 为引物(表 1),使用 KOD-Plus-Neo (TOYOBO,日本)扩增 *TaERF7*。PCR

扩增体系为:10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L,2 mmol/L dNTPs 5 μ L,25 mmol/L $MgSO_4$ 3 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L,KOD-Plus-Neo 1 μ L,cDNA/DNA 1 μ L,ddH₂O 32 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}C$ 2 min;98 $^{\circ}C$ 10 s,68 $^{\circ}C$ 30 s,35 个循环;68 $^{\circ}C$ 5 min。将 *TaERF7* 起始密码子上游 2 000 bp 的启动子片段作为本研究中 *TaERF7* 的启动子,命名为 *TaERF7*-P。*TaERF7*-P 的克隆用 DNA 为模板,引物为 *TaERF7*-P-F/R(表 1),PCR 使用酶和扩增体系与 *TaERF7* 的克隆相同,PCR 反应程序为:94 $^{\circ}C$ 2 min;98 $^{\circ}C$ 10 s,68 $^{\circ}C$ 1 min 32 s,35 个循环;68 $^{\circ}C$ 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后,用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(生工,上海)进行回收,连接到 pEASY-Blunt Zero Cloning Vector(全式金,北京),转化大肠杆菌 DH5 α 后,挑选阳性克隆送奥科生物科技有限公司(杨陵)测序。

1.2.3 *TaERF7* 蛋白的生物信息学分析 结合 Ensembl Plant 网站(<http://plants.ensembl.org/index.html>)的小麦参考基因组序列和 *TaERF7* 的测序结果,确定 *TaERF7* 的 ORF 序列和蛋白质序列。通过 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 Blast 分析,获得的 *TaERF7* 蛋白的同源序列,运用 MEGA X 对 *TaERF7* 蛋白进行系统进化分析,使用 Clustal X 和 Jalview 对 *TaERF7* 蛋白和其同源序列进行多序列比对。利用 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析 *TaERF7* 蛋白序列的结构域,使用 ProtParam 在线网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白的理化性质,使用 SignalP 5.0 在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行氨基酸信号肽预测,使用 TMHMM 2.0 在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白质的跨膜螺旋,利用 Cell-PLoc 2.0 在线网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)预测 *TaERF7* 蛋白的亚细胞定位。通过 PlantCARE 网

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

名称 Name	引物序列 Primer sequence(5'→3')		用途 Application
	正向 Forward	反向 Reverse	
TaERF7	CTCCGCTCCCCATGGCTC	GGATGTTTCTCATGCTACCTGCC	<i>TaERF7</i> 克隆 Cloning of <i>TaERF7</i>
TaERF7-P	GCTACGATAGGGAATGACGGA	GGATGTTTCTCATGCTACCTGCC	启动子克隆 Cloning the promoter of <i>TaERF7</i>
Q-TaERF7	GATCAGCGGCATGAACAAG	CGGCAGGTTCAGGTCAAA	qRT-PCR
TaActin	ACCTTCAGTTGCCAGCAAT	CAGAGTCGAGCACAAATACCAGTTG	qRT-PCR

站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和文献信息,对 *TaERF7* 启动子中的顺式作用元件进行预测。

1.2.4 *TaERF7* 的表达模式分析 将 BNS 幼苗在培养室(温度 18 ℃,光照/黑暗 16 h/8 h,相对湿度 50%)培养至花药发育为减数分裂期,分别取花药、雌蕊、内外稃、根、茎和叶样品各 0.1 g 提取总 RNA 并进行反转录。将 BNS 幼苗在培养室(温度 18 ℃,光照/黑暗 12 h/12 h,相对湿度 50%)培养 3 周后,进行温度处理和不同光照处理。温度处理为:将 BNS 幼苗在低温(4 ℃)处理 48 h 后,恢复培养温度至 18 ℃,在 0、1、2、4、8、12、24、36、48、60、72 和 84 h,对叶片分别取样;将 BNS 幼苗在高温(37 ℃)处理 12 h 后,恢复培养温度至 18 ℃,在 0、1、2、4、8、12、24 和 36 h,对叶片分别取样。光照处理为:将 BNS 幼苗分为 3 组,分别在不同光照长度下(光照/黑暗分别为 10 h/14 h、12 h/12 h、14 h/10 h)培养 10 d 后,剪取 3 组 BNS 的叶片。对温度处理和光照处理取样的叶片提取总 RNA 并进行反转录。*TaERF7* 和小麦内参基因 *TaActin*(GenBank No. AB181991.1)用于 qRT-PCR 的引物如表 1,使用 Tip Green qPCR SuperMix(全式金,北京)进行 qRT-PCR。反应体系为:cDNA (100 ng/ μ L) 2 μ L,上下游引物(10 μ mol/L) 各 0.4 μ L,2 $\times$ Tip Green qPCR SuperMix 10 μ L,Passive Reference Dye(50 $\times$) 0.4 μ L,Nuclease-free Water 6.8 μ L。qRT-PCR 在 QuantStudio 3(Thermo,美国)中进行,反应程序为:94 ℃ 30 s;94 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,共 40 个循环。每个反应设置 3 次重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析基因的相对表达量^[31]。

1.3 数据分析

基因表达数据的统计作图用 Excel 进行。

2 结果与分析

2.1 *TaERF7* 基因及其启动子的克隆和序列分析

根据表达谱芯片的结果,我们设计了 *TaERF7*-F/R 引物,从 BNS 的 cDNA 和 DNA 中分别进行扩增,得到 2 条大小相同的条带(图 1,A)。连接载体测序发现 2 个序列完全一致,说明在 cDNA 和 DNA 中 *TaERF7* 的序列相同。比对发现 *TaERF7* 定位在小麦 2BL 染色体,仅有 1 个外显子,CDS 区有 660 bp,编码 219 个氨基酸。设计 *TaERF7*-P-F/R 引物,从 BNS 的 DNA 中扩增得到 1 条包含 *TaERF7* 启动子的 3 042 bp 的序列(图 1,B)。

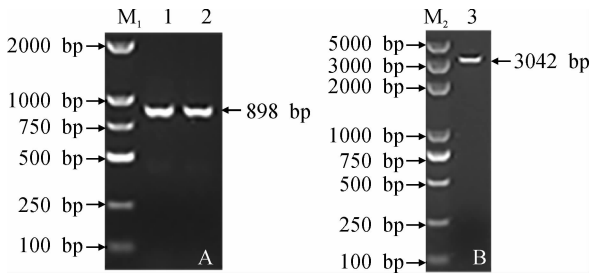
通过 PlantCARE 网站和文献信息分析,我们发现 *TaERF7* 启动子序列上存在很多顺式作用元件,功能各异。其中,GT rich、GC rich、C/DRE 和 IC-Er2 来自文献^[32-34],其他元件均来自 PlantCARE 网站分析。在这些元件中,一般顺式作用元件有 14 个,响应植物激素的元件有 16 个,MYB 转录因子结合位点 3 个,光响应元件 15 个,低温响应元件 23 个,脱水响应元件 21 个(表 2)。

2.2 *TaERF7* 蛋白的生物信息学分析

在线网站 ProtParam 分析表明,*TaERF7* 蛋白的相对分子量是 22.262 kD,理论等电点为 8.79,带有正电荷的氨基酸残基(Arg + Lys)20 个,带有负电荷的氨基酸残基(Asp + Glu)18 个;*TaERF7* 蛋白不稳定系数 66.21,归类为不稳定蛋白质,脂溶性指数为 76.94。*TaERF7* 蛋白无跨膜螺旋和信号肽,定位在细胞核内。

SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析显示 *TaERF7* 蛋白含有一个保守的 AP2 结构域,属于 AP2/ERF 家族成员,由于其 AP2 结构域中第 14 位和第 19 位分别是丙氨酸(A)和天冬氨酸(D)(图 2),所以将该蛋白归类为 ERF 亚族^[35]。将 *TaERF7* 与大麦(*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)和水稻(*Oryza sativa*)等植物中同源基因进行了氨基酸序列比对,发现 *TaERF7* 蛋白 N 端和 C 端分别含有 AP2 结构域和 EAR 基序,可以将其归类为第二类 ERF 转录因子(图 2)。

将 *TaERF7* 蛋白序列在 NCBI 网站比对后,我们得到了来自不同物种的 12 条同源序列。其中,*TaERF7* 蛋白与二穗短柄草中 ERF4 (GenBank



M₁. DL2000;1. 以 cDNA 为模板克隆的 *TaERF7*;
2. 以 DNA 为模板克隆的 *TaERF7*;M₂. DL5000;
3. *TaERF7* 启动子的克隆

图 1 *TaERF7* 及其启动子的克隆

M₁. DL2000; 1. *TaERF7* cloned with cDNA as template;
2. *TaERF7* cloned with DNA as template; M₂. DL5000;
3. Cloning of *TaERF7* promoter

Fig. 1 Cloning of *TaERF7* and its promoter

表 2 *TaERF7* 启动子区预测的顺式作用元件
Table 2 Predicted *cis*-acting elements in promoter of *TaERF7*

顺式元件名称 <i>Cis</i> -element name	核心序列 Core sequence	数量 Number	功能 Function
CAAT-box	CAAAT/CAACCAACTCC	14	启动子和增强子区的一般顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
ABRE	ACGTG/CACGTG /CAAATGCCGCGTGGC	9	ABA 响应元件 <i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
TGA-element	AACGAC	1	生长素响应元件 Auxin-responsive element
CGTCA-motif	CGTCA	3	茉莉酸甲酯响应元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGACG-motif	TGACG	3	茉莉酸甲酯响应元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
CCAAT-box	CAACGG	2	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
MBS	CAACTG	1	参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility
Box 4	ATTAAT	1	部分光响应保守元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
G-box	CACGTT/CACGAC /TACGTG/TAACACGTAG /GCCACGTGGA	9	光响应元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
GATA-motif	AAGGATAAGG	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element
Sp1	GGGCGG	4	光响应元件 Light responsive element
GT rich	AACCAAA	1	低温和脱水响应元件 Cold and dehydration responsive element
GC rich	CCCC	19	低温和脱水响应元件 Cold and dehydration responsive element
C/DRE	ACCGACC	1	低温和脱水响应元件 Cold and dehydration responsive element
ICEr2	ACTCCG	2	低温响应元件 Cold responsive element

No. XP_003580517. 1) 氨基酸序列相似度达到 81.98%。使用 MEGA X 进化分析后(图 3),发现小麦 *TaERF7* 与大麦和二穗短柄草 2 个近缘物种中的同源序列处于同一分枝,进化关系较近。

2.3 不同温度光照处理下 *TaERF7* 基因的表达分析

为确定 *TaERF7* 在 BNS 不同组织和器官的表达特性,利用 qRT-PCR 对 *TaERF7* 在花药、雌蕊、内外稃、根、茎和叶的转录水平进行分析,发现 *TaERF7* 在不同组织和器官都有表达(图 4,A)。

研究发现,*TaERF7* 启动子上存在很多低温响应元件和光响应元件。因此采用 qRT-PCR 验证 *TaERF7* 在 BNS 叶片中表达量响应温度和光照的变化,结果表明短光照和低温可以使 *TaERF7* 表达量明显提高,而高温会使表达量降低(图 4,B~D)。相比于 12 h/d 光照时间下 *TaERF7* 的表达量,14 h/d 的光照使表达量下调约 0.47 倍,10 h/d 的光照则会使其表达量增加约 1.14 倍(图 4,B)。

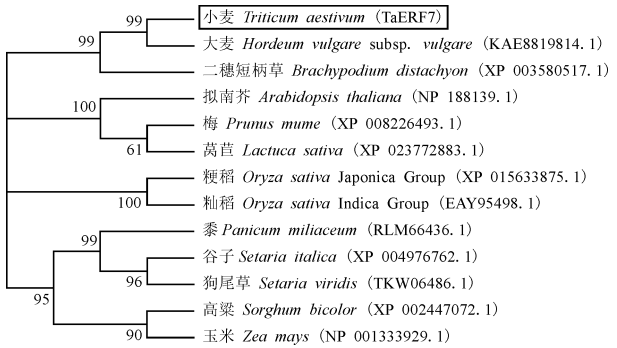
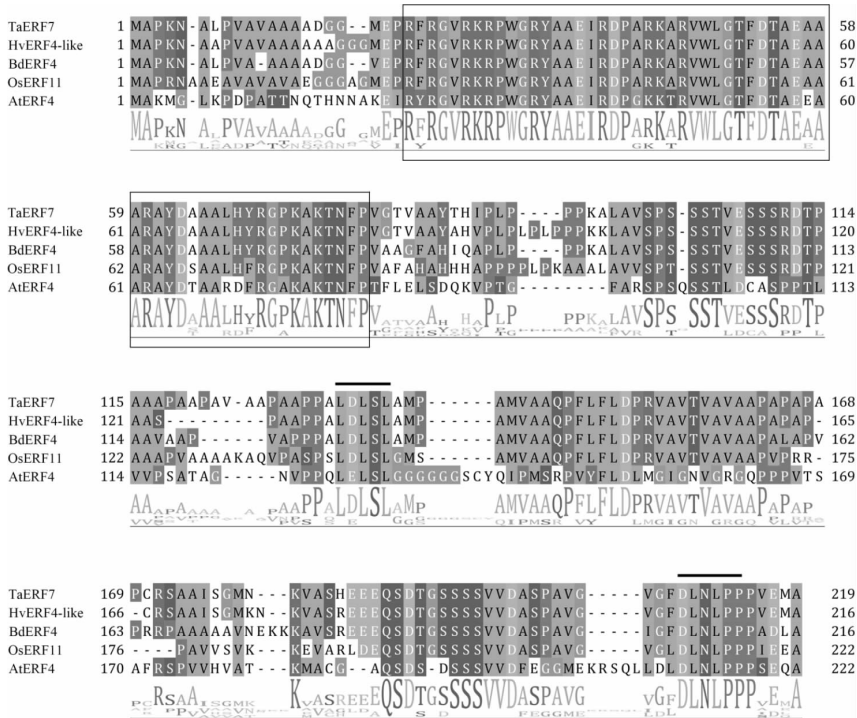


图 3 *TaERF7* 的系统进化分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *TaERF7*

4 ℃的低温处理使 *TaERF7* 表达量在 2 h 内上调了约 25.7 倍,并且在 48 h 内一直保持较高的水平,温度升高到 18 ℃之后表达量也恢复到未处理时(图 4,C)。37 ℃的高温虽然可以使 *TaERF7* 表达量在 1 h 内上调约 0.71 倍,但 2 h 后便急剧下调,到 12 h 时其表达量与未处理时相比已下调了约 0.85 倍。即使温度恢复到 18 ℃后,*TaERF7* 的表达量也很难再恢复到未处理水平(图 4,D)。



HvERF4-like, 大麦(KAE8819814.1);BdERF4, 二穗短柄草(XP_003580517.1);OsERF11, 水稻(XP_003580517.1);
AtERF4, 拟南芥(NP_188139.1);方框, AP2 结构域;黑色线条, EAR 基序

图 2 *TaERF7* 和同源序列的氨基酸比对

HvERF4-like, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*(KAE8819814.1);BdERF4, *Brachypodium distachyon*(XP_003580517.1);
OsERF11, *Oryza sativa*(XP_003580517.1);AtERF4, *Arabidopsis thaliana*(NP_188139.1);Boxes, AP2 domain;Black lines, EAR motifs

Fig. 2 The amino acid alignment of *TaERF7* with the homologous sequences

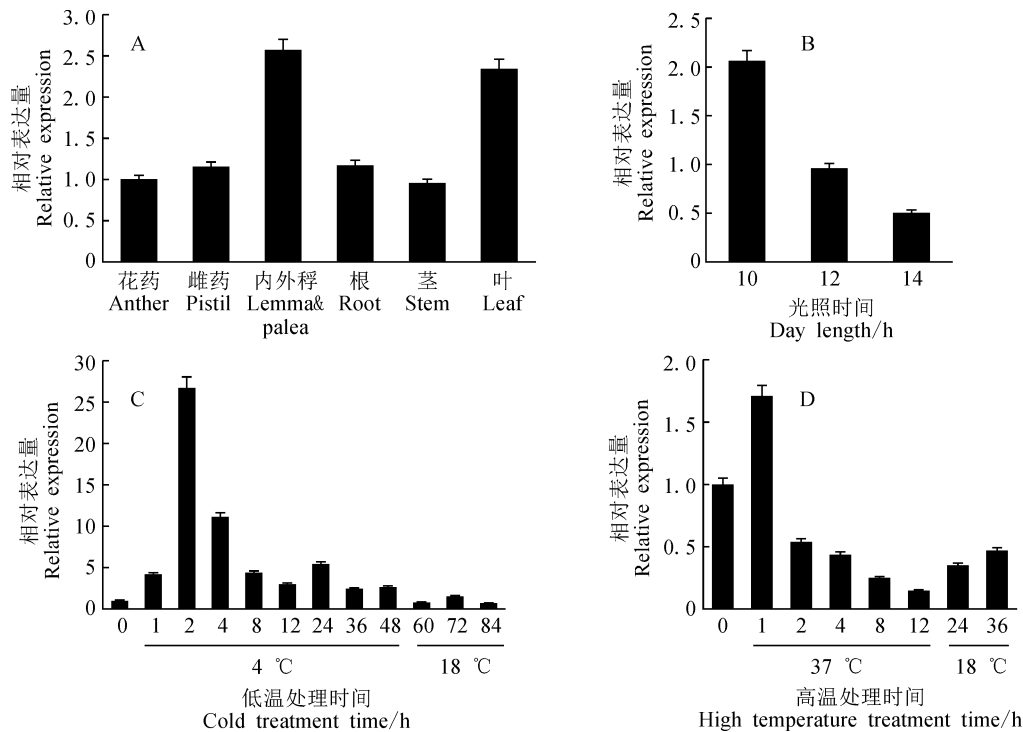


图 4 *TaERF7* 的组织表达特性(A)及不同光照时间(B)和温度(C,D)处理的表达分析
Fig. 4 Tissue expression pattern (A) of *TaERF7* and expression of *TaERF7* under different daylength treatments (B) and temperature treatments (C and D)

3 讨论

在 ERF 转录因子中,第二类 ERFs 不同于其他转录激活因子,由于其特有的 EAR 基序,通常作为转录抑制因子抑制下游基因的表达^[36]。近些年的研究发现第二类 ERFs 在很多植物中作为转录抑制因子,参与植物对非生物胁迫的响应,以及果实成熟和细胞 PCD 过程的转录调控^[37-39]。然而,目前尚无研究报道转录抑制因子参与小麦的温光敏雄性不育。事实上,很多转录抑制因子都能够响应低温的诱导^[40-41],同时 BNS 雄性不育主要是由于低温引起,所以低温是转录抑制因子上调表达和 BNS 温光敏雄性不育的共同条件。

本研究基于 BNS 不育系和可育系花药的基因芯片结果^[28],对差异表达基因 *TaERF7* 及其启动子进行了克隆和分析。分析 *TaERF7* 蛋白序列,我们发现该蛋白作为第二类 ERF,是一个转录抑制因子。顺式作用元件分析发现在 *TaERF7* 的启动子上有大量的低温和光照响应元件。进化分析显示 *TaERF7* 蛋白与大麦 ERF4-like、二穗短柄草 ERF4、拟南芥 *AtERF4* 高度同源。其中,*AtERF4*

转录因子可以通过与下游基因启动子的 GCC box (GCCGCC) 结合,在基因瞬时表达实验中,抑制下游基因的表达^[20]。在小麦中的研究表明 ERF 不仅可以结合 GCC box,也可以特异性结合 DRE (ACCGAC) 和 CRT (GCCGAC) 元件^[42]。由本研究可以看出,*TaERF7* 在 BNS 不同的组织或器官中均有表达,所以 *TaERF7* 很可能参与 BNS 的多个性状的调控。

根据前人研究,BNS 的育性敏感时期被确定在雌雄蕊分化期到四分体形成期,育性转换温度约为 8~12 ℃。随着播期的推迟,BNS 的穗发育时期温度由低温到高温,日照长度由长日照向短日照过渡,育性也由不育恢复到可育^[6]。因此,本实验利用 qRT-PCR 验证 *TaERF7* 在 BNS 叶片中表达量响应温度和光照的变化。结果表明 *TaERF7* 在 BNS 的叶片中受到低温和短光照诱导后上调表达,而高温和长日照会使其下调表达。以上结果初步证明 *TaERF7* 可能特异性结合下游基因启动子的 GCC box、DRE 和 CRT 元件,调控下游基因的表达,从而影响了 BNS 的育性。该结果为进一步研究 *TaERF7* 在小麦中的生物学功能和在 BNS 雄性不育中的作用奠定了理论基础。

参考文献:

[1] 张艳辉. 玉米杂种优势群与杂种优势模式应用的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2016.

[2] 袁隆平. 超级杂交稻研究进展[J]. 农学报,2018,8(1): 71-73.

YUAN L P. Progress in breeding of super hybrid rice[J]. *Journal of Agriculture*, 2018,8(1): 71-73.

[3] 赵永国. 人工合成甘蓝型油菜杂种优势与利用研究[D]. 北京:中国农业科学院,2009.

[4] 王书平. 小麦生理型雄性不育分子机理研究及其败育分子模型的建拓[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2016.

[5] 张自阳,胡铁柱,冯素伟,等. 温敏核雄性不育小麦 BNS 的育性转换规律初探[J]. 河南农业科学,2010,(7): 5-9.

ZHANG Z Y, HU T Z, FENG S W, et al. A preliminary study on fertility alteration of thermo-sensitive genic male sterile wheat line BNS[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2010,7: 5-9.

[6] 王茂婷,高庆荣,孙正娟,等. BNS 小麦穗分化进程与其雄性不育性的表现[J]. 分子植物育种,2011,9(3): 294-301.

WANG M T, GAO Q R, SUN Z J, et al. Spike differentiation process and the male sterility of BNS in wheat[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011,9(3): 294-301.

[7] 李东霄,邓小莉,李 淦,等. 温敏核不育小麦可育花药和败育花药发育观察[J]. 中国细胞生物学学报,2012,34(9): 37-42.

LI D X, DENG X L, LI G, et al. Observation in fertile and sterile anthers of a thermo-sensitive genic male-sterile wheat (*Triticum astivum* L.)[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2012,34(9): 37-42.

[8] 苏 晴,茹振钢,秦志英,等. 小热激蛋白基因(*hsp23.5*)在小麦 BNS 雄性不育系和转换系中的差异表达[J]. 农业生物技术学报,2013,21(1): 29-37.

SU Q, RU Z G, QIN Z Y, et al. Differential expression of small heat shock protein gene(*hsp23.5*) between wheat (*Triticum aestivum*) BNS male sterile line and its conversion line [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2013,21(1): 29-37.

[9] 王 震,范晓静,等. ATP 合成相关基因在小麦 BNS 不育系育性转换中的差异表达[J]. 作物学报,2014,40(8): 1 501-1 505.

WANG Z, FAN X J, et al. Differential expression of ATP synthesis related gene in fertility conversion of wheat BNS male sterile line[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014,40(8): 1 501-1 505.

[10] 张芳凝,李桂冬,范晓静,等. 两个育性相关基因在 BNS 和 YS 小麦温敏雄性不育系中的表达差异分析[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(2): 368-372.

ZHANG F N, LI G D, FAN X J, et al. Differential expression analysis of two male fertility-related genes in wheat thermo-sensitive male sterile line BNS and YS (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015,16(2): 368-372.

[11] DUBOUZET J G, SAKUMA Y, ITO Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression[J]. *The Plant Journal*, 2003,33(4): 751-763.

[12] QIN F, SAKUMA Y, Li J, et al. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in

- cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, **45**(8): 1 042-1 052.
- [13] ITO Y, KATSURA K, MARUYAMA K, *et al.* Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, **47**(1): 141-153.
- [14] 徐兆师. 小麦抗逆相关 DREB/ERF 转录因子基因的克隆与鉴定[D]. 北京:中国农业科学院, 2005.
- [15] ZHANG Z Y, YAO W L, DONG N, *et al.* A novel ERF transcription activator in wheat and its induction kinetics after pathogen and hormone treatments[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**(11): 2 993-3 003.
- [16] 徐 飞. 小麦盐胁迫响应基因 *TaERF4* 的克隆及功能分析[D]. 济南:山东大学, 2012.
- [17] 张 蕾. 小麦盐胁迫应答相关基因 *TaERF5* 的功能研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2013.
- [18] FU C C, HAN Y C, QI X Y, *et al.* Papaya CPERF9 acts as a transcriptional repressor of cell-wall-modifying genes *Cp-PME1/2* and *CpPG5* involved in fruit ripening[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, **35**(11): 2 341-2 352.
- [19] OHTA M, OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions[J]. *The Plant Journal*, 2000, **22**(1): 29-38.
- [20] FUJIMOTO S Y, OHTA M, USUI A, *et al.* Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression [J]. *The Plant Cell*, 2000, **12**(3): 393-404.
- [21] KAGALE S, LINKS M G, *et al.* Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis[J]. *Plant Physiology*, 2010, **152**(3): 1 109-1 134.
- [22] ZHANG G Y, CHEN M, CHEN X P, *et al.* Isolation and characterization of a novel EAR-motif-containing gene *GmERF4* from soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, **37**(2): 809-818.
- [23] PAN I C, LI C W, *et al.* Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of *SlERF3* enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato[J]. *Planta*, 2010, **232**(5): 1 075-1 086.
- [24] ZHANG H W, ZHANG J F, QUAN R D, *et al.* EAR motif mutation of rice OsERF3 alters the regulation of ethylene biosynthesis and drought tolerance[J]. *Planta*, 2013, **237**(6): 1 443-1 451.
- [25] 李罗江, 茹振刚, 高庆荣, 等. BNS 小麦的雄性不育性及其温光特性[J]. 中国农业科学, 2009, **42**(9): 3 019-3 027.
- LI L J, RU Z G, GAO Q R, *et al.* Male sterility and thermophotosensitivity characteristics of BNS in wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, **42**(9): 3 019-3 027.
- [26] MIZOI J, OHORI T, *et al.* GmDREB2A;2, a canonical dehydration-responsive element-binding protein2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression [J]. *Plant Physiology*, 2013, **161**(1): 346-361.
- [27] SHARMA R, SINGH G, BHATTACHARYA S, *et al.* Comparative transcriptome meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* under drought and cold stress [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(9): e0203266.
- [28] 白羿雄. 温敏核不育小麦 BNS 不育系和可育系花药的细胞学研究及基因的表达谱分析[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2015.
- [29] HAGHIR S, ALEMZADEH A. Cloning and molecular characterization of *TaERF6*, a gene encoding a bread wheat ethylene response factor[J]. *Molecular Biology Research Communications*, 2018, **7**(4): 153-163.
- [30] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, **8**(19): 4 321-4 325.
- [31] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [32] DOLFERUS R, JACOBS M, *et al.* Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene[J]. *Plant Physiology*, 1994, **105**(4): 1 075-1 087.
- [33] KIM H J, KIM Y K, PARK J Y, *et al.* Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2002, **29**(6): 693-704.
- [34] ZARKA D G, VOGEL J T, COOK D, *et al.* Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature[J]. *Plant Physiology*, 2003, **133**(2): 910-918.
- [35] 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[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **290**(3): 998-1 009.
- [36] OHTA M, MATSUI K, *et al.* Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression[J]. *The Plant Cell*, 2001, **13**(8): 1 959-1 968.
- [37] SONG C P, AGARWAL M, *et al.* Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses[J]. *The Plant Cell*, 2005, **17**(8): 2 384-2 396.
- [38] YIN X R, ALLAN A C, CHEN K S, *et al.* Kiwifruit *EIL* and *ERF* genes involved in regulating fruit ripening[J]. *Plant Physiology*, 2010, **153**(3): 1 280-1 292.
- [39] CAO F Y, DEFALCO T A, *et al.* Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR 8 (ERF8) has dual functions in ABA signaling and immunity[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, **18**(1): 211.
- [40] AMALRAJ A, LUANG S, KUMAR M Y, *et al.* Change of function of the wheat stress-responsive transcriptional repressor *TaRAP2. 1L* by repressor motif modification [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, **14**(2): 820-832.
- [41] DONG C J, LIU J Y. The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2. 1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, **10**: 47.
- [42] XU Z S, XIA L Q, CHEN M, *et al.* Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (*TaERF1*) that increases multiple stress tolerance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, **65**(6): 719-732.