

丹参抗性基因 *SmORA1* 的 克隆及诱导表达分析

化文平^{1,2}, 刘文超¹, 贾林泉¹, 王喆之¹, 李翠芹^{1*}

(1 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西师范大学 生命科学学院, 西安 710062; 2 陕西学前师范学院 生物科学与技术系, 西安 710100)

摘要: 该研究采用 PCR 方法从丹参中克隆出一条乙烯应答因子结合蛋白(ERF)转录因子编码基因, 命名为 *SmORA1*, GenBank 登录号为 KT359598。经分析发现该基因全长 648 bp, 不包含内含子, 编码 206 个氨基酸残基。编码蛋白 *SmORA1* 含有典型的 AP2 结合结构域。表达分析结果表明, *SmORA1* 主要在丹参根中表达, 且该基因的表达明显受到茉莉酸甲酯(MeJA)、脱落酸(ABA)、乙烯(ET)、机械创伤和病原菌等逆境信号的诱导, 但低温和脱水情况下 *SmORA1* 表达下调。研究表明, *SmORA1* 参与丹参生物胁迫反应, 可整合 JA、ABA、ET 和病原菌等胁迫信号途径。

关键词: 丹参; 乙烯应答因子结合蛋白(ERF); 基因克隆; 表达模式; 胁迫

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Induced Expression of *SmORA1* Gene from *Salvia miltiorrhiza*

HUA Wenping^{1,2}, LIU Wenchao¹, JIA Linqun¹, WANG Zhezhi¹, LI Cuiqin^{1*}

(1 Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2 Department of Life Sciences and Technology, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710100, China)

Abstract: In this study, one gene encoding ethylene responsive factor binding protein (ERF) was cloned from *Salvia miltiorrhiza* by RT-PCR, which was named as *SmORA1* (GenBank accession number: KT359598). *SmORA1* DNA sequence consists of 648 bp without introns, and encoding 206 amino acid residues. Bioinformatics analysis showed that *SmORA1* contain typical AP2 binding domain of ERF family. The real-time quantitative PCR analysis revealed that *SmORA1* was mainly expressed in the roots, furthermore it can be induced by methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA), ethylene (ET), physical wounding and pathogens. While the expression level of *SmORA1* was down-regulated under low temperature or dehydration treatment. These results indicated that *SmORA1* was involved in plant stress responses, and integrated JA, ET, ABA and pathogen signals in *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; ethylene responsive factor binding protein(ERF); gene clone; expression pattern; stress

AP2/ERF 类转录因子是植物所特有的一大类 转录因子蛋白, 在植物中有着庞大的家族组成, 如在

收稿日期: 2015-08-10; 修改稿收到日期: 2015-09-30

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(GK201303009); 陕西省自然科学基金(2014JQ3105, 2014JQ3112); 陕西师范大学大学生创新训练项目(201510718015)

作者简介: 化文平(1980—), 男, 博士, 主要从事药用植物生物技术研究。E-mail: huawenping@126.com

* 通信作者: 李翠芹, 博士, 副教授, 主要从事药用植物次生代谢研究。E-mail: licuiqin16@snnu.edu.cn

拟南芥中有 145 个成员,在水稻中有 167 个成员^[1]。ERF 乙烯应答因子结合蛋白(ethylene responsive factor binding protein, ERF)属于 AP2/ERF 类转录因子超家族中的 ERF 家族,该超家族成员至少含有一个大约 60 个氨基酸长度的 AP2 结构域,该结构域用于识别结合 DNA 序列上保守的 GCC-box (AGCCGCC,ethylene-responsive element,ERE)^[2-3]或者 DRE 序列(TACCGACAT)^[4-5]。ERF 家族蛋白成员主要参与调控植物激素乙烯(ET)和脱落酸(ABA)等,病原菌和胁迫(低温、干旱及高盐)等的应答反应。如大豆 *GmERF057* 受盐、干旱、ET、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、ABA 和烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)等的诱导表达,在烟草中过量表达该基因可以增强植物对盐和病原菌的抗性^[6]。转基因烟草中过量表达 *GmERF3* 可以提高植物对高盐和干旱的抗性。在水稻和番茄中过表达番茄 *TERF2/LeERF2* 可提高植物耐寒能力^[7]。番茄 *JERF3* 的过表达可提高水稻抗旱性^[8]。在苜蓿中过表达大豆 *GmDREB1* 可提高苜蓿的耐盐性^[9]。

中药丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)的干燥根及根茎,在临床上被广泛应用于心脑血管疾病的治疗^[10-11]。对其主要药用成分合成途径相关基因的研究是人们关注的热点,但是对植物抗性相关的重要调控基因研究较少。在丹参转录组高通量测序^[12]的基础上筛选出一条与长春花 *CrORCA3* 高度相似的 ERF 编码基因序列(Contig2328)。*CrORCA3* 是长春花中长春碱合成的重要调控基因,同时也是植物抗性的重要调控基因^[13],因此在丹参中,ERF 极有可能参与植物抗性的调控。对丹参 *ERF* 基因的研究有助于阐明丹参的抗胁迫反应机制。本研究从植物丹参中克隆了一条 *ERF* 基因,分析其分子特征及其在丹参不同组织及激素和胁迫诱导下的表达,为丹参 *ERF* 功能研究及其在丹参抗胁迫中的作用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和甘蓝黑腐病假黄孢单菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)为本实验室保存。立枯丝核菌于 PDA 固体培养基活化后,转入无琼脂的马铃薯葡萄糖液体培养基中培养 3 d,菌液用双层无菌纱布过滤,并用无菌水调制成透光率为 10% 的菌悬液备用。甘蓝黑腐病黄单胞菌预处理方法见文献^[14]。

商洛紫花丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)种子于含蛭石的营养钵中,置人工气候培养箱中培养。培养条件:温度(25±2)℃,湿度 48%,光照强度 150 μmol·m⁻²·s⁻¹,光周期为光照 16 h/黑暗 8 h。生长 1 月龄丹参幼苗用于乙烯利(200 mmol/L)、ABA(100 μmol/L)、脱水(幼苗置于干燥的滤纸上)、伤害(用 6 mm 打孔器于丹参叶片每株打孔 3 个)、立枯丝核菌侵染(用菌悬液喷施丹参,每株喷施约 5 mL)、低温(4℃)等胁迫处理;MeJA 及假黄孢单菌处理参见文献^[14]。处理后不同时间取样,以未作处理的丹参幼苗为对照。种子萌发生长至花期分别取根、茎、叶和花不同器官材料。材料收集后,立即液氮速冻,并于-80℃冻存备用。

1.2 丹参 cDNA 第一链合成

以丹参叶片为材料,参照博日植物 DNA 提取试剂盒说明书提取丹参基因组 DNA。采用 OMEGA 公司 Plant RNA Kit 进行上述各种丹参材料总 RNA 的提取,获得的总 RNA 经检测合格后以其为模板,采用 PrimeScript® RT reagent Kit(Takara)试剂盒反转合成 cDNA 第一链。反转所得 cDNA 溶液稀释 10 倍,-20℃保存以用于基因克隆或定量 PCR 分析。

1.3 SmORA1 基因克隆及序列分析

依据丹参转录组序列 Contig2328,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 SmORA1F 和 SmORA1R(表 1),分别以丹参 cDNA 和总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,54℃退火 30 s,72℃延伸 3 min,扩增 30 个循环;72℃延伸 8 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,经回收后与 pMD19-T 载体(Takara)连接,转入 DH5α,随机挑选所得阳性克隆经菌落 PCR 检测后送南京金斯瑞生物有限公司进行测序验证。基因序列开放阅读框的查找、同源性分析、多序列比对等分析参照文献^[14]进行。

表 1 分析所用引物

Table 1 Primers used for PCR analysis

用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence(5'→3')
全长基因克隆 For gene cloning	SmORA1F	GCTCCCTTCAACGAGAACGAT
	SmORA1R	CGCCTGCGACGAGTTACCTT
qRT-PCR	qORA1-F	AAATGGTCGCTGATTGCTGGTA
	qORA1-R	CGTTCTCCATCCTCGCCTAAAT
	qActin-F	AGGAACCACCGATCCAGACA
	qActin-R	GGTGCCTGAGGTCCTGTT

1.4 *SmORA1* 表达分析

以 SYBR green II (Takara) 为荧光染料,采用 Bio-Rad 检测 *SmORA1* 在丹参不同器官以及胁迫处理下的表达。以丹参持家基因 β actin (GenBank 登录号 DQ243702) 作内参,所用引物见表 1。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环。每个样品 3 次技术重复及 2 次生物重复。采用 *Ct* 相对定量法^[15] 对数据进行分析,单因素方差分析用 SPSS 16.0 中 ANOVA,用 Tukey test 分析各样品间基因表达的差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 丹参 *SmORA1* 基因克隆

在本实验室丹参转录组数据库基础上,从cDNA

和 DNA 水平均克隆得到 1 条大小约为 700 bp 左右的基因片段(图 1)。经测序验证,克隆序列与原 EST 序列(Contig2328)完全一致,序列长 648 bp,包含 621 bp 开放读码框,不包含内含子序列。将该序列命名为 *SmORA1*,GenBank 登录号为 KT359598。

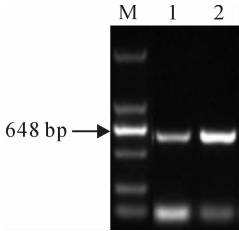


图 1 丹参 *SmORA1* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification products of *SmORA1* from *S. miltiorrhiza*
M. DL2000; 1. cDNA; 2. DNA

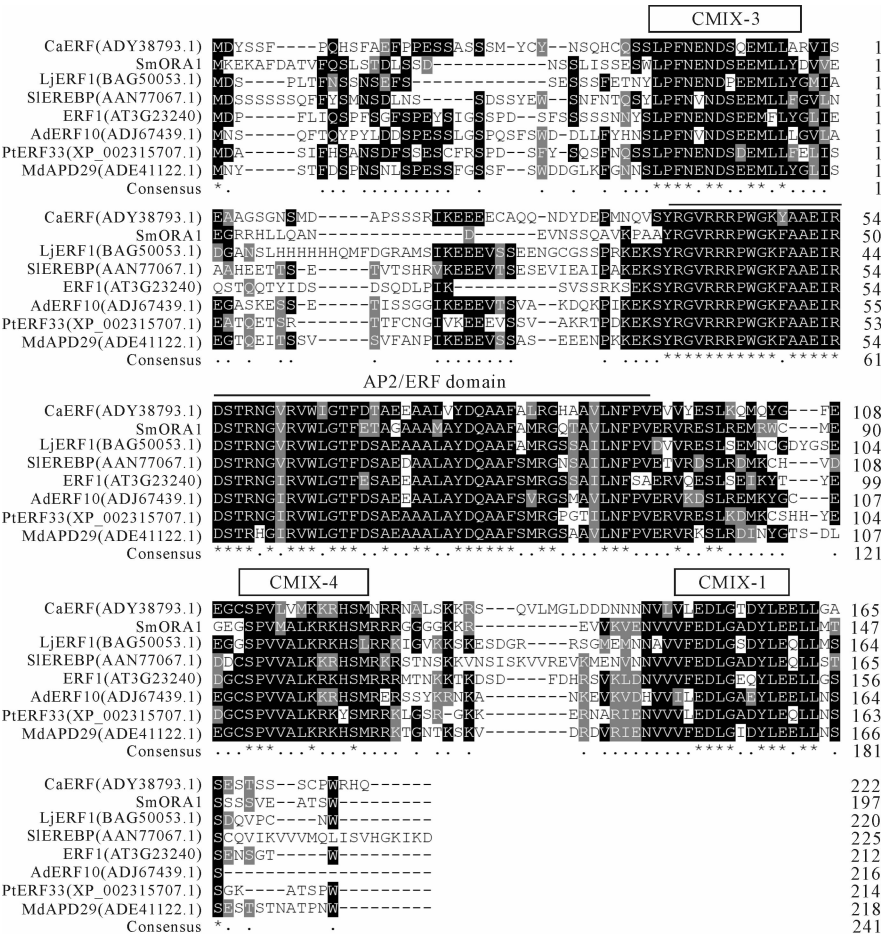


图 2 *SmORA1* 与其他植物 ERF 氨基酸序列比对

CaERF. 咖啡树; SmORA1. 丹参; LjERF1. 百脉根; SIEREBP. 番茄; ERF1. 拟南芥; AdERF10. 猕猴桃; PtERF33. 毛果杨; MdAPD29. 苹果; 线和框分别表示 AP2/ERF 结构域和保守元件

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of *SmORA1* and ERFs from other plant species

CaERF. *Coffea arabica*; SmORA1. *Salvia miltiorrhiza*; LjERF1. *Lotus japonicus*; SIEREBP. *Solanum lycopersicum*; ERF1. *Arabidopsis thaliana*; AdERF10. *Actinidia deliciosa*; PtERF33. *Populus trichocarpa*; MdAPD29. *Malus × domestica*;
The line and boxes indicate AP2/ERF domain and conserved motifs, respectively

2.2 丹参 SmORA1 生物信息学分析

序列比对分析结果(图 2)显示,丹参 *SmORA1* 推导氨基酸序列(*SmORA1*)与拟南芥 *ERF1* (AT3G23240)、苹果(*Malus × domestica*, ADE41122. 1)、百脉根(*Lotus japonicus*, BAG50053. 1)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP_002315707)、番茄(*Solanum lycopersicum*, AAN77067. 1)和咖啡树(*Coffea arabica*, ADY38793. 1)等序列的一致性达 60%、55%、57%、55%、54%和 51%。*SmORA1* 在 75~130 位氨基酸间具有典型的 AP2 保守功能域,还含有 CMIX-1、CMIX-3 和 CMIX-4 等 3 个保守元件(图 2)。*SmORA1* 与拟南芥 *ERF1* (AT3G23240) 具有很高的-一致性,保守元件与 AP2/ERF 结构域的分布也基本一致^[16]。

经 ProtParam 程序预测,*SmORA1* 蛋白分子量为 15.00 kD,等电点为 5.89。利用 SignalP4.1 Server 和 PSORT 程序对丹参乙烯响应因子进行亚定位分析,均显示 *SmORA1* 无信号肽,可能与小麦 W17(ERF 类转录因子)一样通过自身富含赖氨酸和精氨酸的核定位信号区(NLS)进入核内行使功能,参与了 GCC-box 调控的生物胁迫信号传导途径^[17]。

2.3 丹参 SmORA1 表达分析

2.3.1 *SmORA1* 在丹参不同器官中的表达 以丹参 β -actin 基因为内参,采用实时荧光定量 PCR 技

术考察 2 年龄丹参苗中 *SmORA1* 基因在丹参不同器官中的表达情况。结果显示(图 3),*SmORA1* 在丹参的根、茎、叶和花中的表达存在很大差异,主要在根中表达,叶中表达量最低。

2.3.2 *SmORA1* 在不同胁迫条件下的表达 为探讨 *SmORA1* 在丹参胁迫反应中的作用,分别用 100 μ mol/L ABA、5 mmol/L MeJA、200 mmol/L 乙烯利、4 $^{\circ}$ C 低温、伤害、脱水、立枯丝核菌和假黄孢单菌处理丹参实生苗,采用实时荧光定量 PCR 检测 *SmORA1* 基因的表达。

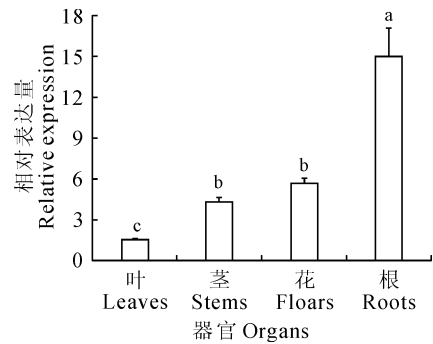


图 3 *SmORA1* 基因在丹参不同器官中的表达
不同的小写字母表示不同器官间存在显著差异($P < 0.05$)

Fig. 3 Expression of *SmORA1* gene in different organs in *S. miltiorrhiza*
Different lower-case letters show significant difference among different organs ($P < 0.05$)

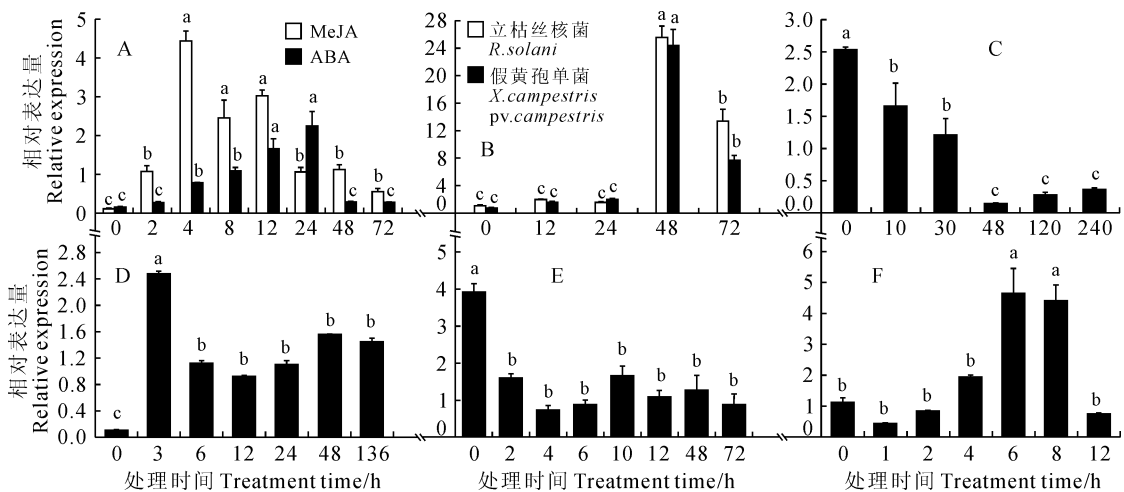


图 4 不同处理下 *SmORA1* 基因的表达模式分析

A. MeJA 和 ABA; B. 立枯丝核菌和假黄孢单菌; C. 脱水; D. 乙烯; E. 低温; F. 机械伤害;
不同小写字母表示同一胁迫处理不同时间点间存在显著差异($P < 0.05$)

Fig. 4 Expression profiles of *SmORA1* gene under different treatments

A. MeJA and ABA; B. *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; C. Dehydration;
D. Ethylene; E. Lower temperature; F. Physical wounding; Different normal letters show significant difference between samples collected at different time under the same treatment ($P < 0.05$)

结果表明,*SmORA1* 在 MeJA 处理 4 h 后,表达量显著性上调,8 h 后表达量降低(图 4,A);ABA 处理后,*SmORA1* 基因表达量在处理 4 h 出现显著性提高,在处理 24 h 达到最大(图 4,A);在立枯丝核菌(图 4,B)和假黄孢单菌(图 4,B)感染处理后,*SmORA1* 的表达量都在处理后 48 h 出现显著上调;乙烯利处理 3 h 后,*SmORA1* 呈现最高响应,随后在 6 h 表达量有所降低,但仍显著高于正常水平(图 4,D);低温(图 4,E)和脱水(图 4,C)2 种非生物胁迫处理下,基因表达量出现下调现象,且在相应的检测期内均低于对照水平;机械伤害 6~8 h 后,*SmORA1* 基因表达出现显著上升,此后回复正常水平(图 4,F)。

3 讨论

丹参是中国大宗中药材之一,需求量大。但种植过程中,各种病虫害十分普遍,可造成 15%~45% 的损失,是影响丹参质量和产量的重要因素之一^[14]。研究丹参抗性基因功能将为丹参抗性育种奠定基础。AP2/ERF 类转录因子以含有识别 DNA 的 AP2 结合结构域为特征,是植物特有的一类转录因子。Sakuma 等^[18] 按照含有 AP2 结构域数目将 AP2/ERF 类转录因子超家族分为 AP2、ERF 和 RAV 等 3 个家族,其中 ERF 家族仅含有 1 个 AP2 特征结构域。Nakano 等^[19] 依据结构特征进一步将拟南芥的 122 条 ERF 序列分为 12 个不同的组。其中,IX 组成员(如 ERF1、AtERF1 和 ORA59 等)在植物抗生物和非生物胁迫中发挥着重要作用,尤其在抗病病原菌方面^[20-22]。如干涉 ORA59 的拟南芥株系对灰霉病的抗性减弱,过表达 ORA59 可增强植株对灰霉病的抗性^[21]。过表达拟南芥 ERF1 不仅可增强拟南芥植株抗盐和抗旱性能,同时也可以增强植物对灰霉病(*Botrytis cinerea*)和短小芽孢杆菌(*Plectosphaerella cucumerina*)等病原菌的抗性^[20]。本研究克隆得到的 *SmORA1* 编码蛋白具有一个典型的 AP2 保守功能域,与拟南芥中的 ERF1 一致性最高,且其它保守元件分布也完全相同^[17]。按照 Nakano 等^[17] 对拟南芥中 ERF 转录因子的分类方法,*SmORA1* 与拟南芥 ERF1 同属于第 IX 组成

员(B3)。说明本研究克隆得到的 *SmORA1* 属于 ERF 基因家族成员,可能与拟南芥 ERF1 一样在丹参胁迫反应中发挥着重要作用。

研究表明,ERF 家族 IX 组成员的编码基因的表达受茉莉酸(JA)、乙烯(ET)和水杨酸等抗性相关激素的诱导^[17],通过整合不同胁迫信号途径调控下游抗性基因^[23]。如 ERF1 的表达受高盐、干旱、高温、JA 和 ET 等因素的诱导,但受 ABA 的抑制^[20];拟南芥 ORA59 和水稻 *OsERF1* 的表达都受到 JA 和 ET 的诱导^[21,24]。该研究同样表明,*SmORA1* 的表达不仅受到 ET、MeJA 的诱导,还可以响应物理伤害和病原菌侵染。同属于 ERF 家族 IX 组的成员的 *OsERF1* 和 ERF1 对 ABA 的响应也不尽相同。ERF1 的表达受 ABA 的抑制^[22],而 *OsERF1* 的表达则受 ABA 的诱导。本研究表明,*SmORA1* 的表达同样受到 ABA 的诱导。进一步说明 ERF 家族 IX 组的不同成员在整合不同的信号途径上有所差别,其不同植物胁迫信号途径中发挥的作用也可能有所差别。

ERF 蛋白还普遍参与植物抗旱、抗冷等胁迫反应。如烟草中过量表达 *GmERF3* 可以提高烟草对高盐和干旱的抗性;在水稻、番茄、烟草和苜蓿中过量表达 ERF 基因均可以提高植物的抗旱性^[7-9]。番茄 *JERF3* 受低温诱导,在烟草中过表达 *JERF3* 可增强烟草抗旱、抗盐和抗冻能力^[25]。拟南芥 ERF1、ORA59 和 AtERF1 的过表达都可增强植物的抗旱能力。但本研究的结果表明,在脱水或低温情况下,*SmORA1* 基因的表达量出现了显著性下调。可能是由于拟南芥 ERF1 的表达受到高温的诱导^[20],在低温条件下该类基因表达受到抑制。干旱胁迫下 *SmORA1* 基因的表达量出现了显著性下调,可能是因为 *SmORA1* 的启动子区域无相应的调控元件,*SmORA1* 不参与植物的抗旱反应。

综上所述,*SmORA1* 属于 ERF 家族第 IX 组成员成员,其编码基因受到 ET、MeJA、ABA、物理伤害和病原菌侵染等外界环境条件的诱导,在低温或脱水处理中表达受抑制。说明 *SmORA1* 可能普遍参与植物的抗性反应,但其具体调控的靶基因是否与其同源基因(ERF1 等)雷同尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] MIZOI J, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1819(2): 86-96.

- [2] HAO D, OHME-TAKAGI M, SARAI A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor(ERF domain) in plant[J]. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**(41): 26 857—26 861.
- [3] OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element[J]. *Plant Cell*, 1995, **7**(2): 173—182.
- [4] JIANG C, IU B, SINGH J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus* [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1996, **30**(3): 679—684.
- [5] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. *PNAS*, 1997, **94**(3): 1 035—1 040.
- [6] ZHANG G, CHEN M, CHEN X, *et al.* Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the *ERF* gene family in soybean(*Glycine max* L.) [J]. *J. Exp. Bot.*, 2008, **59**(15): 4 095—4 107.
- [7] ZHANG Z, HUANG R. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor TERF2/LeERF2 is modulated by ethylene biosynthesis[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2010, **73**(3): 241—249.
- [8] ZHANG H, LIU W, WAN L, *et al.* Functional analyses of ethylene response factor JERF3 with the aim of improving tolerance to drought and osmotic stress in transgenic rice[J]. *Transgenic Res.*, 2010, **19**(5): 809—818.
- [9] JIN T, CHANG Q, LI W, *et al.* Stress-inducible expression of *GmDREB1* conferred salt tolerance in transgenic alfalfa[J]. *Plant Cell Tiss. Org.*, 2010, **100**(2): 219—227.
- [10] LIN T H, HSIEH C L. Pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) on cerebral infarction[J]. *Chin. Med.*, 2010, **5**: 22.
- [11] LI Y G, SONG L, LIU M, *et al.* Advancement in analysis of *Salviae miltiorrhizae* Radix et Rhizoma(Danshen)[J]. *J. Chromatogr A.*, 2009, **1 216**(11): 1 941—1 953.
- [12] HUA W P, ZHANG Y, SONG J, *et al.* *De novo* transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients[J]. *Genomics*, 2011, **98**(4): 272—279.
- [13] VAN DER FITS L, MEMELINK J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. *Science*, 2000, **289**(5 477): 295—297.
- [14] KONG W W(孔维维), HUA W P(化文平), WANG ZH ZH(王喆之). Clone and expression under stress of *SmPI1* and *SmPI2* from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2015, **35**(2): 227—232(in Chinese).
- [15] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biol.*, 2002, **3**(7): RESEARCH0034.
- [16] BERROCAL-LOBO M, MOLINA A. Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum* [J]. *Mol. Plant Micr. Int.*, 2004, **17**(7): 763—770.
- [17] ZHAO Y X, XU ZS, CHEN M, *et al.* Analysis of specific binding and subcellular localization of wheat [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2008, **41**(6): 1 575—1 582.
- [18] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET JG, *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, **290**(3): 998—1 009.
- [19] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, *et al.* Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiol.*, 2006, **140**(2): 411—432.
- [20] CHENG M C, LIAO P M, KUO W W, *et al.* The *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals[J]. *Plant Physiol.*, 2013, **162**(3): 1 566—1 582.
- [21] PRÉ M, ATALLAH M, CHAMPION A, *et al.* The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense[J]. *Plant Physiol.*, 2008, **147**(3): 1 347—1 357.
- [22] LORENZO O, PIQUERAS R, SÁNCHEZ-SERRANO J J, *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense[J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(1): 165—178.
- [23] THIRUGNANASAMBANTHAM K, DURAIRAJ S, SARAVANAN S, *et al.* Role of ethylene response transcription factor(ERF) and its regulation in response to stress encountered by plants[J]. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2015, **33**(3): 347—357.
- [24] HU Y, ZHAO L, CHONG K, *et al.* Overexpression of *OsERF1*, a novel rice *ERF* gene, up-regulates ethylene-responsive genes expression besides affects growth and development in *Arabidopsis* [J]. *J. Plant Physiol.*, 2008, **165**(16): 1 717—1 725.
- [25] WANG H, HUANG Z, CHEN Q, *et al.* Ectopic overexpression of tomato *JERF3* in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2004, **55**(2): 183—192.