

水稻 *OsERF96* 应答病原菌的表达及启动子的功能分析

牟少亮¹, 申磊^{1,2}, 石星辰², 官德义^{1,2}, 何水林^{1,2}

(¹ 福建农林大学生命科学学院/作物遗传改良与综合利用教育部重点实验室, 福州 350002;

² 福建农林大学作物科学学院, 福州 350002)

摘要:前人研究发现水稻 *OsERF96* (ethylene responsive factor 96) 可应答白叶枯病原菌的侵染,但其功能及表达调控机制仍不清楚,本研究进一步分析了该基因在水稻应答稻瘟病原菌侵染及外源激素 (SA 和 MeJA) 处理下的转录情况,并分析了其启动子的诱导表达活性。结果表明:相对于对照组, *OsERF96* 在接种稻瘟病后 1~4 d 表达量显著上调,以第 1 天最高,此后逐渐下降,外源 SA 处理后 *OsERF96* 表达量持续上调;利用 *OsERF96* 启动子驱动 *GUS* 的转基因株系分析了 *OsERF96* 启动子的诱导活性,结果表明 *GUS* 在根、茎和叶均有不同程度组成型表达,稻瘟病菌接种后 4~7 d *GUS* 活性持续升高。*GUS* 活性定量表明,稻瘟病菌和 SA 处理条件下均出现了升高。综上所述, *OsERF96* 可应答白叶枯病或稻瘟病原菌的侵染,其启动子是一个对病原菌侵染产生应答的诱导性启动子。

关键词:水稻; *OsERF96*; 启动子; 稻瘟病菌

Expression of *OsERF96* Response to Pathogen and Functional Analysis of Its Promoter

MOU Shao-liang¹, SHEN Lei^{1,2}, SHI Xing-chen¹, GUAN De-yi^{1,2}, HE Shui-lin^{1,2}

(¹ College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University/Crop Genetic Improvement and

Utilization Key Laboratory of Ministry of Education, Fuzhou 350002; ² College of

Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: *OsERF96* in rice was previously found to upregulated by *Xanthomonas Campestris* attack, but its role in rice immunity and its expressional regulation remains elusive. In the present study, the transcripts of *OsERF96* were analyzed in response to inoculation of *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) as well as exogenous application of salicylic acid (SA) and Methyl Jasmonate (MeJA). The results showed that the transcripts of *OsERF96* were increased at 1-4 day post inoculation (dpi) of *M. oryzae* compared to that in mock-treated control plants, with the maximum at the 1 dpi. Additionally, the transcripts of *OsERF96* were up-regulated steadily in response to exogenous application of SA. The *GUS* expression driven by *OsERF96* promoter was consistently upregulated with inoculation of *M. oryzae* in transgenic lines. *GUS* activities were increased with treatment of *M. oryzae* or exogenous SA. The data collectively showed that *OsERF96* could respond not only to *Xanthomonas Campestris* attack, but also to *M. oryzae* inoculation and its promoter was pathogen-inductive.

Key words: rice; *OsERF96*; promoter; *Magnaporthe oryzae*

植物在生长发育过程中总是不可避免地接触到多种病害,它们在长期的适应过程中形成了复杂的防御反应机制,包括对病原菌侵染信号的感知、传导和细胞

核内基因转录表达的调节,以及由此而产生的各种抗病反应^[1-3]。越来越多的研究表明,转录因子在上游信号通路的整合和抗病相关基因的表达调控中起重要的

收稿日期:2016-03-03 修回日期:2016-05-17 网络出版日期:2016-12-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161214.1007.012.html>

基金项目:国家自然科学基金(31301254, 31372061);福建省自然科学基金(2014J01077)

第一作者研究方向为植物的抗病分子机制研究。E-mail: moushaoliang@163.com

通信作者:何水林,研究方向为作物抗逆及遗传育种。E-mail: shllhe201304@aliyun.com

调节作用^[4],对这些转录因子的表达和功能鉴定及其分子机制的剖析是植物生物学研究的重要领域。

ERF(ethylene responsive factor)是植物特有的一类转录因子,它通常包含有一段高度保守的 ERF 区域可以与 DNA 结合。ERF 转录因子一般通过与其靶基因启动子上的特定 GCC 盒、DRE 盒及类似元件结合而调控靶基因的表达^[5-7],在植物的生长发育、新陈代谢以及逆境胁迫中具有重要调节作用^[8-12]。大量研究表明 ERF 转录因子参与了植物对细菌、真菌等生物防御反应过程的调控。例如,大豆 *GmERF5* 基因的转录在疫霉菌、乙烯、水杨酸的处理后转录水平表现为上调表达,*GmERF5* 过量表达之后提高了大豆对疫霉菌的抗性^[13]。烟草 ERF 转录因子 *OPBP1* 在水稻中过量表达可显著提高水稻对稻瘟病菌和稻纹枯病菌的抗性^[14]。柴胡 *BkERF1*、*BkERF2.1* 和 *BkERF2.2* 在转基因拟南芥植株中的过量表达可通过诱导部分抗病基因的表达,提高拟南芥对灰霉病菌的抵抗能力^[15]。马铃薯 *StERF3* 基因在抗病信号途径中是一个负调控因子,过量表达后增加了对晚疫病的敏感性^[16]。综上所述,ERF 类转录因子在植物应答病原菌侵染中可作为正或负调节因子起调控作用。

水稻基因组中共发现了 139 个 ERF 家族成员,可分成 15 个亚族^[17]。K. R. Kottapalli 等^[18]利用 DNA 芯片分析了籼稻品种 IET8585 在细菌(白叶枯病菌)侵染条件下的转录水平,发现 ERF 家族成员 *OsERF96*(Os10g0562900)在白叶枯病侵染早期(6 h)和后期(120 h)均表现为上调表达,但有关该基因在水稻抗病中的作用及其表达调控还鲜有报道。本研究以水稻品种日本晴为材料,利用荧光定量 PCR 技术分析了 *OsERF96* 在真菌(稻瘟病菌)侵染条件下的转录情况,并分析了该基因启动子在稻瘟病菌侵染条件下的诱导活性。

1 材料与方法

1.1 水稻处理方法

水稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. japonica cv. Nipponbare)先在培养皿中进行催芽,然后选择长势良好的种子转移至盛有土壤的塑料花盆中。待水稻幼苗长至 4~5 叶期时,采用喷雾接种法接种稻瘟病菌 *guy11* 分生孢子(浓度为 10^5 /mL),对照组喷洒水作为处理。外源激素处理是将水杨酸(SA)(100 μ mol/L)和茉莉酸甲酯(MeJA)(100 μ mol/L)溶解在 10% 乙醇中进行叶面喷洒保湿,对照组只喷洒 10% 乙醇。

1.2 荧光定量 PCR(qPCR)

采用 Trizol 法提取水稻叶片 RNA,并反转录成 cDNA 作为模版。上下游引物序列分别为 F:5'-CCATCCTCAACTTCCCCAACG-3'和 R:5'-ACCTCAC-CCTCTTGCCTCTTCC-3',反应体系为 SYBRPremix Ex TaqTM 12.5 μ L,上游和下游引物各 0.5 μ L,模板 2.5 μ L,用 ddH₂O 补至 25 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,共计 40 个循环。以水稻肌动蛋白 Actin(X15865)为内参基因,在 Bio-rad 荧光定量 PCR 仪上运行,每个样品重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量^[19]。

1.3 *OsERF96* 启动子的克隆

OsERF96 启动子克隆是以 GenBank 上公布的水稻品种日本晴序列为参考,设计特异性引物(5'-TCAATAGGAACAGACGAACGA-3'和 5'-AGCGATT-TAAAGGGGAGA-3'),以 CTAB 法提取的 DNA 为模板,Takara 公司生产的 ExTaq 高保真酶进行 PCR 反应(扩增参数为:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 110 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min),琼脂糖凝胶回收 PCR 产物后连接至 PMD-18T 载体中,同时送到三博远志生物有限公司测序验证。

1.4 *OsERF96* 启动子的 GUS 融合表达载体构建及农杆菌介导的水稻遗传转化

利用 gateway 技术,分别以 pDONR207 和 pMDC163 为中间和目的载体,构建了 *OsERF96* 启动子与 *GUS* 融合的表达载体(*pOsERF96::GUS*)。PCR 验证后,转化至农杆菌 EHA105 菌株中备用。利用农杆菌介导的方法进行遗传转化,以日本晴成熟胚为材料,在含有 2,4-D 的 NB 培养基上进行愈伤组织的诱导。农杆菌介导的转化参照 S. Toki 等^[20]的方法。获得的转基因植株提取 DNA 后,利用潮霉素基因特异引物(HypF:5'-ACACAGCCATCGGTCCAGAC-3';HypR:5'-ATCTTAGCCAGACGAGCGGG-3')进行 PCR 验证。

1.5 GUS 蛋白组织化学染色和酶活测定

GUS 染色液配制以及 GUS 酶活性的测定均按照实验室前期的方法^[21]。酶活力单位以每 min 水解 PNPG 生成 1 nmol/L 对硝基苯酚的酶量为 1 个单位。

2 结果与分析

2.1 *OsERF96* 蛋白的序列分析

OsERF96(Os10g0562900)基因共编码 273 个氨基酸,利用 SMART 工具(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 *OsERF96* 蛋白的氨基酸序列进行分析,

发现其含有一个典型的 AP2 结构域(89 ~ 153 氨基酸残基)。利用 DNAMAN 软件进行序列比对,结果发现水稻 *OsERF96* 蛋白与大麦 (BAJ92494.1)、高粱

(KXG38903.1)和谷子(XP_004983639)的同源性分别为 53.02%、51.03% 和 45.21%,同源性较高的区域主要位于 AP2 结构域部分,而其他区域同源性相对较低(图 1)。

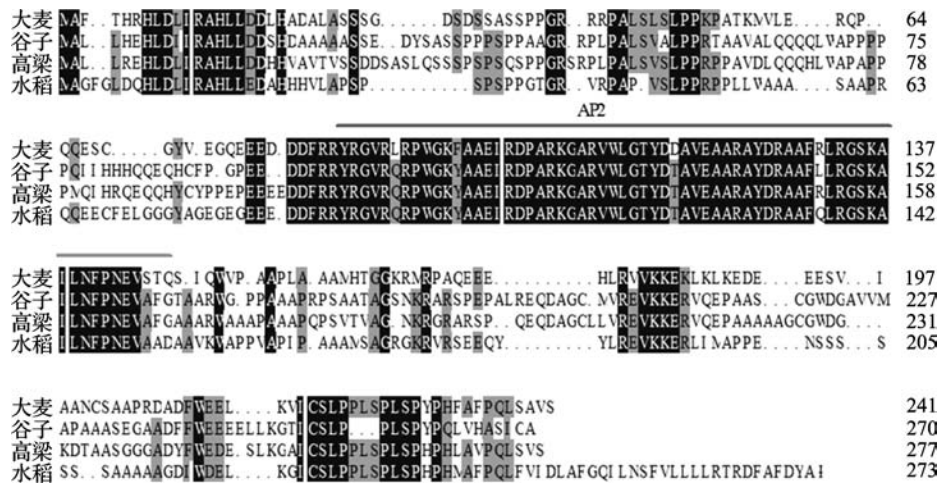


图 1 水稻 *OsERF96* 蛋白的同源比对分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment of the amino acid sequence of *OsERF96* and its homolog proteins

2.2 *OsERF96* 在稻瘟病菌、外源水杨酸或茉莉酸甲酯处理条件下的转录情况分析

在日本晴幼苗生长到 4 ~ 5 叶期时进行接种稻瘟病菌处理,然后分别在接种后的 1 ~ 4 d,剪取水稻叶片进行 RNA 提取,反转录后进行 qPCR 分析。结果表明 *OsERF96* 基因在稻瘟病菌侵染条件下,相对于对照转录水平出现了显著升高。最高峰出现在接种稻瘟病菌 1 d 后,为对照组的 24.9 倍,2 ~ 4 d 的转录水平逐渐下降,分别为对照组的 14.5 倍、7.0 倍和 4.5 倍(图 2A)。

植物激素(SA 和 JA)在植物抗病反应中起着重要作用,能够提高抗病信号途径下游抗病相关基因的表达^[17]。SA 和 JA 途径的标记基因 *PR1a* 和 *PR1b* 在外源 SA 或 MeJA 处理时均表现为上调表达(图 2B 和 C)。*OsERF96* 在外源水杨酸(SA)处理 1 ~ 24 h 时,转录水平相对于对照组也显著升高,最高峰出现在 12 h,为对照组的 13.5 倍(图 2D)。而在外源茉莉酸甲酯(MeJA)处理时,只在 1 h 时出现了升高,而在 3 h、6 h 和 12 h,表现为下调表达(图 2E)。

2.3 *OsERF96* 基因启动子的克隆和序列分析

以水稻品种日本晴 DNA 为模板,在 *OsERF96* 上游设计特异性引物,经过 PCR 扩增获得了一条约 2 kb 大小的条带,测序结果表明实际大小为 1957 bp,与 GenBank 公布的基因组序列同源性为 99.9%,进一步利用网络软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线分析其顺式作用元件分布情况,结果表明 *OsERF96* 启动子区域除了基本

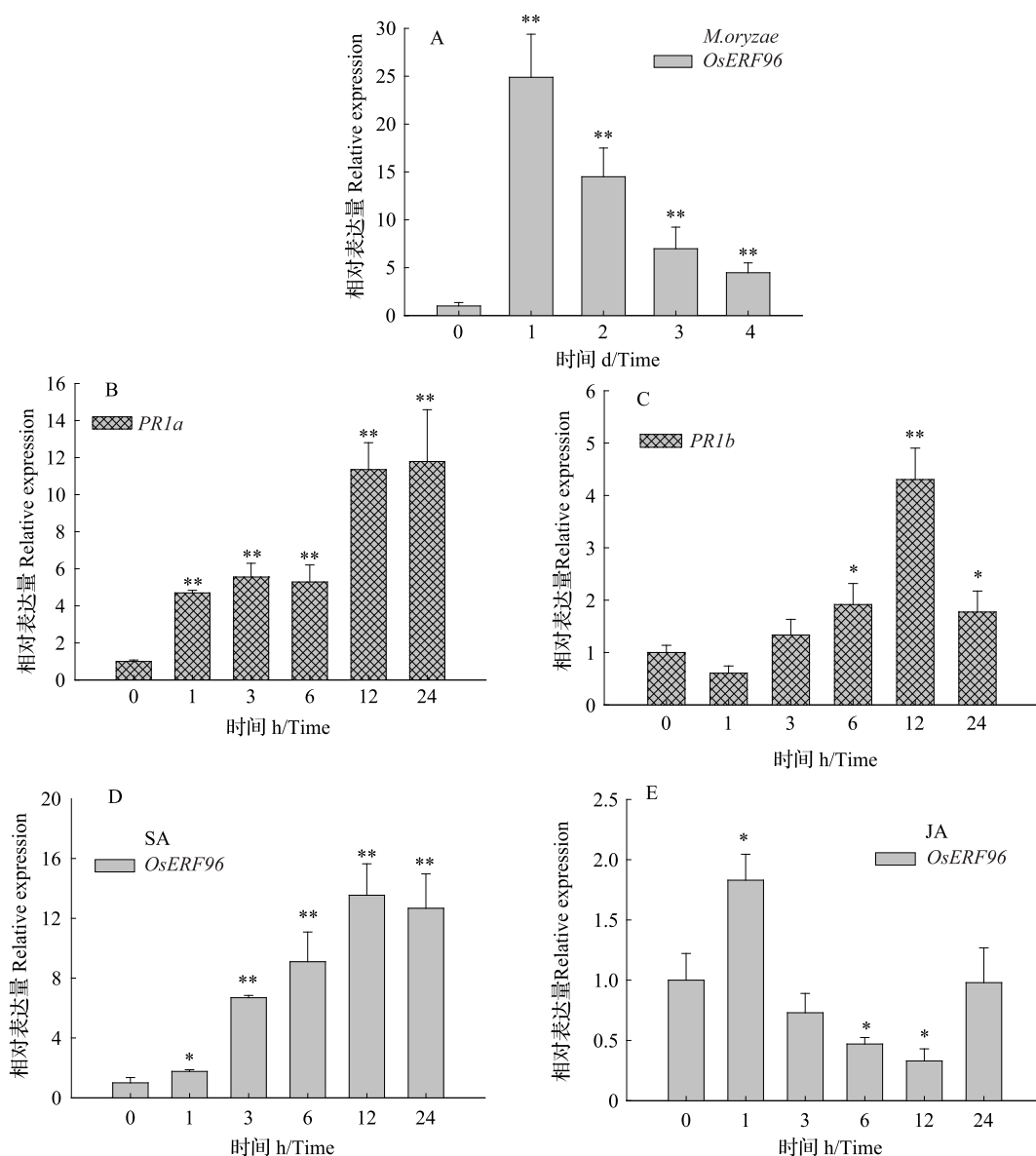
的元件(TATA 盒和 CAAT 盒)外,还分布着 CGTCA-motif、TCA-element、W-box 等植物应答逆境的通用顺式作用元件(图 3)。

2.4 *OsERF96* 基因启动子的组织特异性和诱导活性分析

将收获的 T₂转基因种子经潮霉素抗性筛选后,培养 7 ~ 8 d 选取能正常萌发的种子转移至盛有土壤的塑料花盆中进行种植。在水稻处于分蘖期时,分别取 *OsERF96* 启动子转基因水稻植株的根、茎和叶进行 GUS 染色,结果表明,在转基因水稻的根、茎和叶不同的器官均能检测到 GUS 活性,说明 *OsERF96* 启动子没有明显的器官特异性(图 4A)。

在水稻生长到 4 ~ 5 叶期时接种稻瘟病菌,在接种 4 d、5 d、6 d、7 d 后分别剪取水稻叶片进行 GUS 染色。结果表明,与对照相比,该启动子在遭受稻瘟病菌病原菌胁迫时能够产生持续应答,在接种 4 d、5 d、6 d、7 d 后均能明显检测到 GUS 的诱导活性,而且随着病害的加重 GUS 活性也逐渐升高(图 4B)。说明 *OsERF96* 启动子是一个对稻瘟病菌侵染产生应答的诱导型启动子。

选择 4 ~ 5 叶期的转基因水稻叶片进行 GUS 酶活性分析,结果表明在稻瘟病菌侵染 7 d 后,GUS 酶活性为对照组的 2.13 倍(P < 0.05)。外源 SA 和 MeJA 喷洒叶片 24 h 后检测 GUS 活性,SA 处理条件下差异显著,是对照组的 1.62 倍,而 MeJA 处理条件下差异并不显著(图 5)。

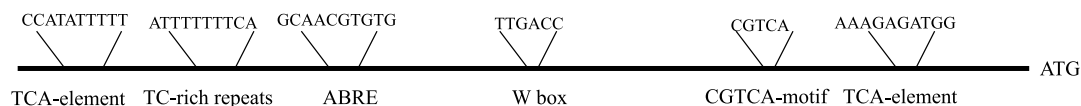


** 和 * 分别表示差异极显著 ($P < 0.01$) 和差异显著 ($P < 0.05$)

** and * indicate significant difference at $P < 0.01$ and $P < 0.05$

图 2 荧光定量 PCR 分析 *OsERF96* 在稻瘟病菌、外源水杨酸及茉莉酸甲酯处理条件下的转录水平

Fig. 2 PCR analysis of relative *OsERF96* transcript levels in rice treated with *M. oryzae*, exogenous SA and MeJA



TCA-element; SA 应答元件; TC-rich repeats; 逆境胁迫应答元件;

ABRE; ABA 应答元件; Wbox; 真菌和 SA 应答元件; CGTCA-motif; MeJA 应答元件

TCA-element; *cis*-acting element involved in SA responsiveness, TC-rich repeats; *cis*-acting element involved in defense and

stress responsiveness, ABRE; *cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness, Wbox; Fungal elicitor and

SA responsive element, CGTCA-motif; *cis*-acting element involved in the MeJA-responsiveness

图 3 *OsERF96* 基因启动子的顺式作用元件

Fig. 3 *cis*-elements in the promoter of *OsERF96* gene

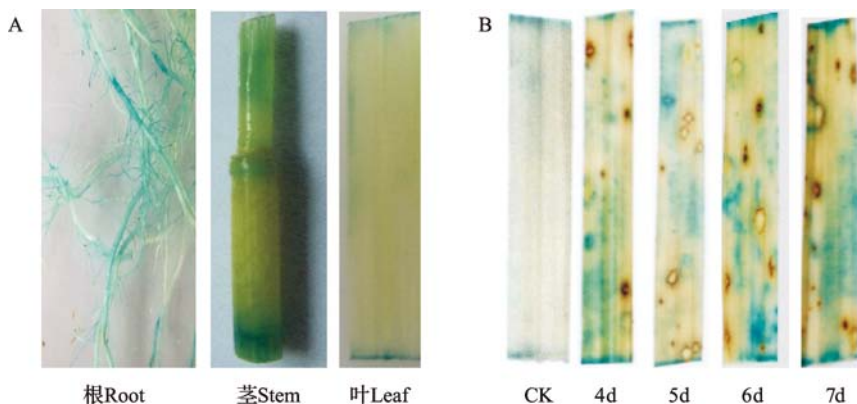
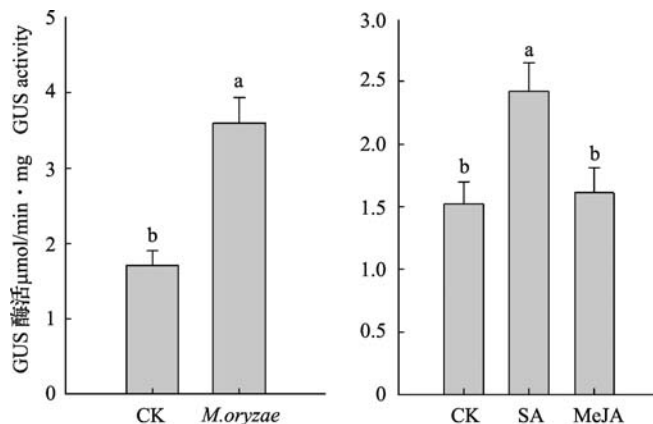


图4 *OsERF96* 启动子转基因水稻不同器官以及在稻瘟病菌接种后的 GUS 染色分析

Fig. 4 GUS histochemical analysis for *OsERF96* promoter in different organs of transgenic rice and with the inoculation of *M. oryzae*



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

Different small letters indicate the significant difference at 0.05 level

图5 *OsERF96* 启动子在稻瘟病菌、外源水杨酸及茉莉酸甲酯处理条件下的 GUS 酶活性测定

Fig. 5 GUS activity response to treatment with *M. oryzae*, exogenous SA and MeJA

3 讨论

OsERF96 基因是 ERF 家族中第 IX 亚族的一个成员^[17],该亚组中许多成员参与了植物的抗病反应。例如,烟草 *NtERF5* 过量表达提高了对烟草花叶病毒的抗性^[22],番茄 *Pti4* 和 *Pti5* 能够激活抗病相关基因的表达,*Pti4* 在拟南芥中过量表达可提高对白粉病和细菌性叶斑病的抗性^[23]。拟南芥 *ERF1* 基因过量表达之后提高了拟南芥对腐生性真菌的抗性^[24]。

白叶枯病和稻瘟病是水稻生产过程中的重要病害,可导致水稻的严重减产和米质的下降^[1,25]。对水稻自身免疫机制的探索与阐释是培育优良抗病品种的重要基础。*OsERF96* 在细菌(白叶枯病)接种条件下出现了上调表达^[18],本研究进一步分析了该基因在真菌(稻瘟病菌)侵染条件下的转录情况,结

果发现在侵染 1 d 后,*OsERF96* 转录水平迅速升高,而且在 2~4 d 后相对于对照组均表现为上调表达,说明 *OsERF96* 在水稻遭受稻瘟病侵染的过程中能够产生应答。对 *OsERF96* 启动子在稻瘟病菌侵染条件下的诱导活性分析表明,它能够对稻瘟病菌产生持续的应答,是一个稻瘟病菌诱导型启动子。这些结果表明,*OsERF96* 在白叶枯病和稻瘟病菌的侵染过程中均能产生应答,其启动子是一个病原菌诱导型启动子。

SA 和 JA 是植物免疫系统中重要的信号分子^[26-27],因此本研究分析了在 SA 和 MeJA 处理条件下的表达特征。在 SA 处理时,*OsERF96* 表现为持续的上调表达,而在 MeJA 处理 1 h 时表现为上调,而在 6 h 和 12 h 时表现为下调表达。对 *OsERF96* 启动子的 GUS 活性分析表明 *OsERF96* 启动子在 SA 处理条件下活性增加,MeJA 处理条件下差异不显

著。在 *OsERF96* 启动子区发现了与应答 SA 相关的 2 个 TCA 盒和 1 个 W 盒元件。这些结果说明 *OsERF96* 对稻瘟病菌的应答与可能 SA 途径相关。

参考文献

- [1] Mou S L, Shi L P, Lin W, et al. Over-expression of rice CBS domain containing protein, OsCBSX3, confers rice resistance to *Magnaporthe oryzae* inoculation[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(7): 15903-15917
- [2] Boyd L A, Ridout C, O'Sullivan D M, et al. Plant-pathogen interactions; disease resistance in modern agriculture [J]. Trends Genet, 2013, 29(4): 233-240
- [3] 赵开军, 李岩强, 王春连, 等. 植物天然免疫性研究进展及其对作物抗病育种的可能影响[J]. 作物学报, 2011, 37(6): 935-942
- [4] Zhao Y, Ma Q, Jin X, et al. A novel maize homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) I gene, *Zmhdz10*, positively regulates drought and salt tolerance in both rice and *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55(6): 1142-1156
- [5] Wu L, Zhang Z, Zhang H, et al. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing[J]. Plant Physiol, 2008, 148(4): 1953-1963
- [6] Zhang H, Huang Z, Xie B, et al. The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco[J]. Planta, 2004, 220(2): 262-270
- [7] Zhang Z, Zhang H, Quan R, 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 Physiol, 2009, 150(1): 365-377
- [8] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(3): 287-291
- [9] Chung M Y, Vrebalov J, Alba R, et al. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, *SlAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening[J]. Plant J, 2010, 64(6): 936-947
- [10] Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J. The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice[J]. Plant Cell, 2011, 23(1): 412-427
- [11] Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, et al. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water[J]. Nature, 2009, 460(7258): 1026-1030
- [12] Xu K, Xu X, Fukao T, et al. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice[J]. Nature, 2006, 442(7103): 705-708
- [13] Dong L, Cheng Y, Wu J, et al. Overexpression of GmERF5, a new member of the soybean EAR motif-containing ERF transcription factor, enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean[J]. J Exp Bot, 2015, 66(9): 2635-2647
- [14] Chen X, Guo Z. Tobacco OPBP1 enhances salt tolerance and disease resistance of transgenic rice[J]. Int J Mol Sci, 2008, 9(12): 2601-2613
- [15] Liu W Y, Chiou S J, Ko C Y, et al. Functional characterization of three ethylene response factor genes from *Bupleurum kanoi* indicates that BkERFs mediate resistance to *Botrytis cinerea* [J]. J Plant Physiol, 2011, 168(4): 375-381
- [16] Tian Z, He Q, Wang H, et al. The potato ERF transcription factor StERF3 negatively regulates resistance to *Phytophthora infestans* and salt tolerance in potato[J]. Plant Cell Physiol, 2015, 56(5): 992-1005
- [17] 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
- [18] Kottapalli K R, Rakwal R, Satoh K, et al. Transcriptional profiling of indica rice cultivar IET8585 (*Ajaya*) infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae pv oryzae* [J]. Plant Physiol Biochem, 2007, 45(10-11): 834-850
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [20] Toki S, Hara N, Ono K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice[J]. Plant J, 2006, 47(6): 969-976
- [21] 牟少亮, 蔡金森, 严雁, 等. 水稻 *Pi-ta* 启动子的克隆及其功能分析[J]. 核农学报, 2013, 27(12): 1803-1808
- [22] Fischer U, Droge-Laser W. Overexpression of *NiERF5*, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus [J]. Mol Plant Microbe In, 2004, 17(10): 1162-1171
- [23] Gu Y Q, Wildermuth M C, Chakravarthy S, et al. Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2002, 14(4): 817-831
- [24] Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi[J]. Plant J, 2002, 29(1): 23-32
- [25] 牟少亮, 官德义, 林琳, 等. 水稻 *Xa1* 基因启动子的克隆及功能分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 865-869
- [26] Pieterse C M, Leon-Reyes A, Van der Ent S, et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity[J]. Nat Chem Biol, 2009, 5(5): 308-316
- [27] Verhage A, van Wees S C, Pieterse C M. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say [J]. Plant Physiol, 2010, 154(2): 536-540