

6个玉米ERF基因的克隆、序列及表达分析

李世鹏 刘富洋 张 丛 邵付菊

河南农业大学生命科学学院/河南省粮食作物生理生态与遗传改良重点实验室, 郑州 450002

摘要 利用同源克隆的方法分离了6个玉米ERF (ethylene-responsive element binding factor) 基因, 分别命名为 *ZmERF4*、*ZmERF26*、*ZmERF28*、*ZmERF64*、*ZmERF89* 和 *ZmERF202*。基因结构分析显示, *ZmERF* 与拟南芥的 *AtERF* 可能存在差异。系统发育分析显示, *ZmERFs* 与 *OsERFs* 的亲缘关系更加亲近, 而与 *AtERFs* 的关系则稍远。RT-PCR 表达分析表明, 在乙烯利(ET)处理之后, 这6个 *ZmERFs* 的 mRNAs 水平在叶中都是先积累后下降的, 但其中4个基因(*ZmERF4*、*ZmERF28*、*ZmERF64* 和 *ZmERF89*) 在玉米根中都是呈现负调控的。在脱落酸(ABA)和茉莉酸(JA)处理下, 6个 *ZmERFs* 的 mRNAs 水平在叶中都发生了或多或少的变化, 但是大部分基因在根中的表达量没有明显变化, 特别是在 JA 处理之后。这些结果暗示 *ZmERFs* 可能在玉米根和叶的激素信号通路中发挥不同的作用。

关键词 玉米; ERF (ethylene-responsive element binding factor) 基因; 基因表达; 激素信号通路; 乙烯利; 脱落酸; 茉莉酸

中图分类号 S 513 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0001-08

AP2/ERF 转录因子是植物特有的一个转录因子超家族, 成员均含有由 57~66 个保守的氨基酸残基组成的 AP2/ERF DNA 结合域^[1]。基于 AP2/ERF 结构域的相似性和数目, AP2/ERF 家族被分为 3 个亚家族, 分别是 AP2、ERF 和 RAV^[2]。AP2 亚家族包含 2 个重复的 AP2/ERF 结构域; RAV 亚家族蛋白除了含有 1 个 AP2/ERF 结构域之外, 还包含 1 个在其他植物特有转录因子中保守的 B3 结构域。与 AP2 和 RAV 亚家族相比, ERF 家族蛋白主要通过识别顺式作用元件 AGCCGCC(GCC-box)来参与生物胁迫的应答, 包含单一 AP2/ERF 结构域^[3]。

最近几年, 陆续在不同种类的植物中鉴定出了 ERF 亚家族转录因子, 例如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, At)^[4]、水稻 (*Oryza sativa*, Os)^[5]、烟草 (*Nicotiana tabacum*, Nt)^[6]、西红柿 (*Lycopersicon esculentum*, Le)^[7]、大豆 (*Glycine max*, Gm)^[8] 和小麦 (*Triticum aestivum*, Ta)^[9]。这些 ERF 参与了病原体感染防御反应或者应答生物或非生物胁迫^[10]。例如: OsBIERF 蛋白在盐、低温、干旱和伤

害的胁迫下表达量上升, 可能参与了不同的信号通路来调节抗病反应和应答非生物因子胁迫^[11]。过表达 NtERF5 加强了对烟草花叶病毒的抵抗力^[6]。StERF3 负调控马铃薯对致病疫霉菌的抵抗力和盐耐受性^[12]。

另外, ERF 转录因子在响应生物和非生物胁迫的过程中参与激素信号转导也已经被广泛报道。GmERF3 被高盐、干旱、脱落酸 (ABA)、水杨酸 (SA)、茉莉酸 (JA) 和乙烯利 (ET) 所诱导^[8]。这类 AP2/ERF 结构域转录因子 ORA59 在植物防御过程中融合了茉莉酸和乙烯利信号^[13]。其他的 AP2/ERF 成员也被报道过参与新陈代谢调节和不同的发育过程^[14]。尽管在不同种植物中 ERF 已经有了很深入的研究, 但是在玉米 (*Zea Mays*, Zm) 中研究较少^[15-16]。本研究采用生物信息学的方法, 克隆了 6 个玉米 ERF 基因, 对其结构及系统发育进行了分析, 并对这 6 个 ERF 基因在激素作用下的表达模式进行了分析, 旨在为进一步研究 ERF 基因的功能奠定基础。

收稿日期: 2016-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100200); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A180005); 山东农业大学作物生物学国家重点实验室开放课题(2014KF04)

李世鹏, 硕士研究生, 研究方向: 植物抗逆分子生物学. E-mail: 513485031@qq.com

通信作者: 邵付菊, 博士, 副教授, 研究方向: 植物抗逆分子生物学. E-mail: taifj2008@163.com

1 材料与方法

1.1 玉米 ERF cDNA 序列的获得

为了获得玉米 *ERF* 基因,利用已报道的拟南芥 *ERF* 序列在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行 BLAST 并且在 PlantGDB(<http://www.plantgdb.org>)进行搜索,获得了 6 个玉米 *ERF* 基因的序列信息。

1.2 系统发育分析和序列对比

利用 DNAMAN 软件包,分析这 6 个 ERF 的氨基酸序列及其相对应的蛋白质。同时利用 PlantGDB 数据库(<http://www.plantgdb.org>)上的 BLASTN 功能搜索了每个 *ERF* 基因在玉米基因组上的位置,外显子-内含子结构是通过对比全长 cDNA 序列和它们的全长基因序列得到的。利用 MEGA6 软件构建 6 个 *ZmERF* 基因和其他来自水稻和拟南芥的 *ERF* 基因的进化树。

1.3 植物材料及处理

以玉米(*Zea mays* L.)品种郑单 958 为材料,表面消毒后用无菌蒸馏水培养,黑暗中平铺在滤纸上萌发 24 h。挑选已发芽的种子放在培养箱中继续用无菌蒸馏水培养,温度为 25 ℃,光周期为光 16 h/暗 8 h,湿度为 75%。当第 2 片叶子完全展开时,将样品分为 3 组,分别用 ABA、JA、ET 处理。在进行 ABA 和 JA 处理时,将植株分别浸泡在含有

100 μmmol/L ABA 和 100 μmmol/L JA 的水溶液中。ET 处理是用 50 mL 质量浓度为 60 mg/L 的 ET 水溶液喷洒幼苗并置于密闭容器中。在 ABA 处理时,取样的时间点为 0、2、6、12、24 h;JA 处理的取样时间点为 0、3、6、12、24、48 h;ET 处理的取样时间点为 0、2、10、24、48 h。所有材料获取后立即用液氮冷冻并保存于-80 ℃冰箱中。

1.4 RNA 提取及反转录

用 TRIZOL 法从不同处理的玉米幼苗的叶和根中提取 RNA,并用 RNA 纯化试剂盒纯化和 DNaseI(Promega, USA)消化,去除掉其中的残留化学物质和 DNA 以排除各种污染。总 RNA 用 UV-分光光度计(Eppendorf Biophotometer)检测,确保其浓度和 D_{260}/D_{280} 符合标准,便于后续的试验操作。以 2 μL 总 RNA 为模版,用 AMV 逆转录酶(Promega)按照说明书进行反转录得到 cDNA。

1.5 半定量 RT-PCR 分析表达模式

用上述的 cDNA 和基因特异性引物(表 1)进行 RT-PCR。以玉米的 *Actin2* 基因作为 RT-PCR 的内参,进行本底校准。PCR 体系为 2 μL 10×PCR Buffer、1.5 μL dNTP mix(2.5 mmol/L)、上下游引物各 1 μL(10 μmol/L)、0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL, TaKaRa, Japan)、1 μL cDNA 和 14 μL ddH₂O。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,每个反应至少重复 3 次。

表 1 6 个 *ZmERF* 基因的信息及基因特异性引物

Table 1 The six *ZmERF* genes in maize genome and gene-specific primers used for RT-PCR

基因 Gene	登录号 Accession No.	染色体 Chr	染色体上的位置 Position	内含子 Exons	cDNA/ bp	氨基酸/aa Amino acid	引物 Primers (5'-3')
<i>ZmERF4</i>	NM_001153501	8	120487062-120488125	1	1 080	233	F:TTCCCTTTTCGGCAGCATC R:AGTAATCCGGTCCATAACAACG
<i>ZmERF16</i>	XM_008661870	9	125166524-125167980	2	1 261	404	F:GACAGTAGTAGTAAGGTCGTTCGTG R:GCATCATTTGAAGGCAATCC
<i>ZmERFP28</i>	BT055988	5	212350136-212352738	3	1 497	448	F:GACTTGGGCTGGGAGAATGAT R:AATAGGGAACAGGTCGATAACC
<i>ZmERF64</i>	NM_001152759	9	11535444-11537990	3	1 574	363	F:TCTTCAGACCAAGGCAGCAACT R:GCAGGCTCTTACCCTTTGTGTC
<i>ZmERF89</i>	NM_001157201	7	120384803-120387759	3	1 756	418	F:CTCCCGATAACGCCGTGCTG R:TCTCGCCCTCGTCTCGTCTCC
<i>ZmERF202</i>	NM_001155962	2	184210038-184211923	2	1 701	423	F:TTGACCTGAGACGAACATACC R:ACCATCGACGCACCAACAT

2 结果与分析

2.1 *ZmERFs* 结构分析

在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上用 *AtERF* 的 AP2 结构域序列进行 BLAST,找

到了玉米 *ERF* 家族的 6 个基因全长序列。基于 *ERF* 序列的同源性,将它们分别命名为 *ZmERF4*、*ZmERF16*、*ZmERF28*、*ZmERF64*、*ZmERF89* 和 *ZmERF202*。对比这几个基因的全长 cDNA 序列与全长基因序列,发现它们在内含子数目上存在一

定的差异(表 1)。这 6 个 *ERF* 基因分别含有 0~2 个内含子。其中 *ZmERF28*、*ZmERF64* 和 *ZmERF89* 有相似的基因结构,都含有 1 个长的和 1 个短的内含子(图 1)。*ZmERF16* 和 *ZmERF202* 含有 2 个内含子;*ZmERF4* 没有内含子。这 6 个基因分别被定位在染色体 2、5、7、8、9 上:*ZmERF89* 定位在染色体 7, *ZmERF28* 定位在染色体 5, *ZmERF64* 和 *ZmERF16* 定位在染色体 9, *ZmERF4* 定位在染色体 8, *ZmERF202* 定位在染色体 2(表 1)。

2.2 系统发育分析和多序列比对

尽管这 6 个 *ERF* 的氨基酸数目(233~448 aa)存在很大差异,但是它们都含有 1 个在 *ERF* 亚家族中高度保守的 AP2/*ERF* 结构域。用这 6 个 *ERF* 的结构域序列进行多重序列比对(图 2),发现所有的 AP2/*ERF* 结构域序列都含有 1 个 α -螺旋和 3 个

β -折叠区域^[17],并且高度保守。序列比对结果显示,氨基酸残基 Arg-3、Pro-20、Arg-39、Arg-49、Gly-50、Lys- 52、Ala-53、Lys-54、Asn-56 和 Phe-57 在 6 个蛋白质中完全保守(图 2)。进一步分析表明, *ZmERF16* 与其他蛋白同源性最低,其次是 *ZmERF4*。

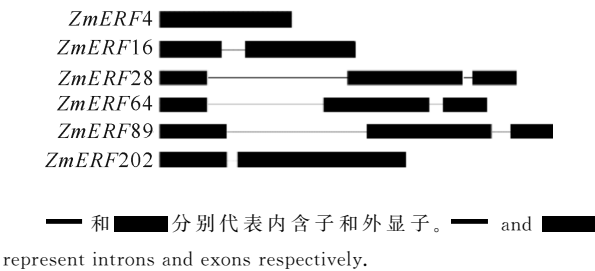
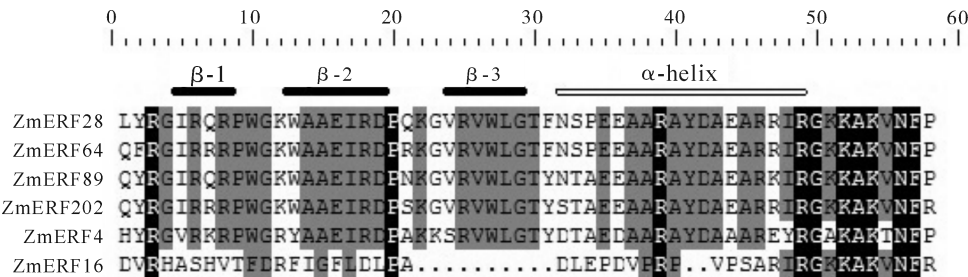


图 1 *ZmERFs* 的基因结构
Fig.1 The structures of the *ZmERFs*



黑色和灰色底纹区域表示各基因对应氨基酸残基同源率大于 80%。Black and gray shading indicate identical and conserved amino acid residues present in more than 80% of the aligned sequences, respectively.

图 2 6 个 *ZmERFs* 的 AP2/*ERF* 结构域序列比对分析

Fig.2 Sequences alignment analysis of the AP2/*ERF* domain of the 6 *ZmERFs*

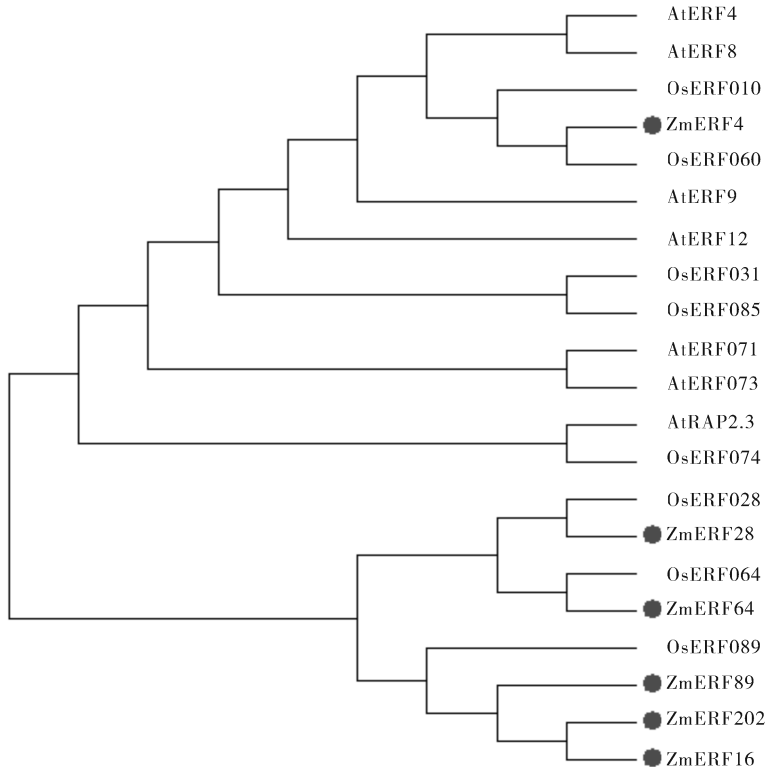
为了阐明这 6 个玉米 *ERF* 和水稻、拟南芥的 *ERF* 基因之间的系统发育关系,建立了含有 11 个 *AtERFs*、14 个 *OsERFs* 和 6 个 *ZmERFs* 蛋白序列的进化树(图 3),该进化树含有 2 个 Group,分别命名为 Group I 和 II。在 Group I 中又分为 2 个亚群(subgroup-1 和 subgroup-2),其中 *ZmERF4* 与 *OsERF060* 和 *OsERF010* 更加亲近。在 Group II 中,另外 5 个蛋白和 *OsERF064*、*OsERF028* 和 *OsERF089* 有密切的系统发育关系。不论在 Group I 还是 Group II 中, *ZmERFs* 都与同为单子叶植物的水稻 *ERFs* 有着更加密切的系统发育关系。这暗示着 *ERF* 的出现早于单双子叶植物的分化。

此外,还发现了一些 AP2/*ERF* 结构域之外的保守域。进化树成员的序列分析显示,在 N-端有 1 个高度保守的基序(MCGGAI),存在于除了 subgroup-1 和 *ZmERF16* 之外的所有成员中(图 4A)。

subgroup-1 中有 1 个保守结构域 DLNxxPP,但在 subgroup-2 中没有发现(图 4B);还有 1 个保守序列 SN/DSF/YG 以及 1 个公认的磷酸化位点 TP/SDI/YT/AS 存在于 Group II 中(图 4C)。

2.3 *ZmERFs* 在 3 种激素处理下的表达模式

半定量 PCR 结果(图 5)表明,在 ET、ABA 和 JA 的处理下,6 个 *ERFs* 在根和叶中的 mRNA 水平都不同程度地被调控,特别是 ET。在 ET 处理下(图 5A),在叶中,所有的 6 个 *ZmERFs* 都在 2 h 迅速表达,并且在 10 h 达到最大值,随后在 24~48 h 慢慢下降。但是,有 2 个基因(*ZmERF28*、*ZmERF64*)在 24 h 表达下降,但在 48 h 又明显上升。在根中,除了 *ZmERF16* 和 *ZmERF202*,其他 *ZmERFs* 的表达都下调,特别是 *ZmERF64*、*ZmERF89*。 *ZmERF16* 和 *ZmERF202* 在根和叶中的表达模式都是先增加后下降。



Zm (*Zea Mays*), At (*Arabidopsis thaliana*), Os (*Oryza sativa*); 拟南芥、水稻 ERF 基因登录号依次为: AtERF4: AEE75632.1; AtERF8: AEE32902.1; AtERF9: AED95075.1; AtERF12: AEE30962.1; AtERF071: AEC10854.1; AtERF073: AEE35312.1; AtRAP2.3: AEE75863.1; OsERF010: NP_001044519.1; OsERF060: NP_001055942.1; OsERF031: NP_001049176.1; OsERF085: NP_001062782.1; OsERF074: NP_001060280.1; OsERF028: NP_001048319.1; OsERF064: NP_001057044.1; OsERF089: NP_001063252.1; 玉米 ERF 的登录号见表 1。Gene accession numbers of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* are as follows: AEE75632.1; AtERF8: AEE32902.1; AtERF9: AED95075.1; AtERF12: AEE30962.1; AtERF071: AEC10854.1; AtERF073: AEE35312.1; AtRAP2.3: AEE75863.1; OsERF010: NP_001044519.1; OsERF060: NP_001055942.1; OsERF031: NP_001049176.1; OsERF085: NP_001062782.1; OsERF074: NP_001060280.1; OsERF028: NP_001048319.1; OsERF064: NP_001057044.1; OsERF089: NP_001063252.1; The accession No. of maize ERF is shown in Table 1.

图 3 包含 6 个 ZmERFs 和部分拟南芥和水稻的 ERF 的系统进化树

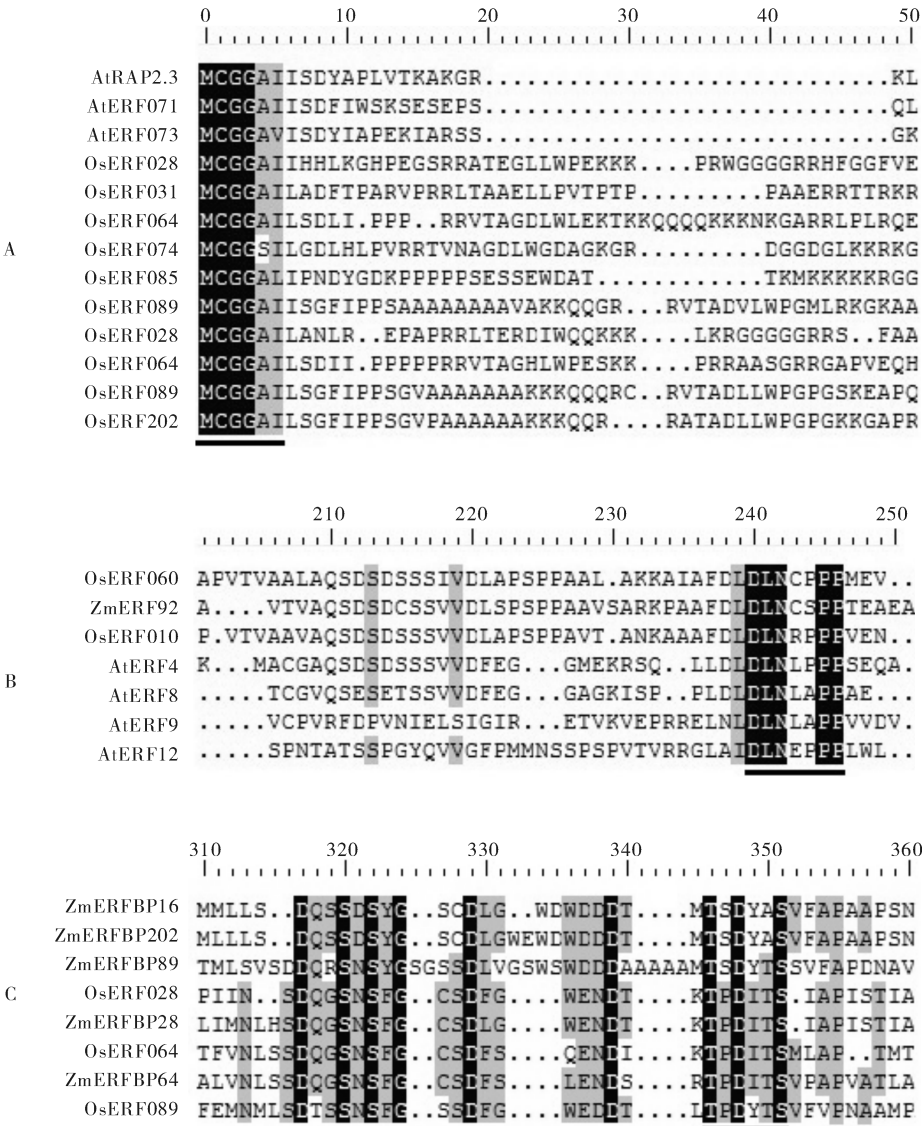
Fig.3 Phylogenetic tree analysis of the six ZmERFs and part of ERFs from *Arabidopsis* and rice

在 ABA 处理下(图 5B),在叶中, *ZmERF28*、*ZmERF89* 在 2~6 h 表达量增加并在 6 h 达到最高,随后在 12~24 h 下降。 *ZmERF64*、*ZmERF202* 在 2 h 内表达量就达到最高,并且在随后的时间内均保持恒定。 *ZmERF4* 的 mRNA 在 2 h 积累但是在随后的 6~24 h 都没有检测到。在这 6 个基因中,只有 *ZmERF16* 的 mRNA 有微量的变化。在根中, *ZmERF18*、*ZmERF64* 和 *ZmERF89* 的表达都缓慢下降,其他 3 个基因(*ZmERF4*、*ZmERF16* 和 *ZmERF202*)的表达仅在 2 h 微量升高。

茉莉酸处理下(图 5C),在叶中, *ZmERF28*、*ZmERF64*、*ZmERF89* 和 *ZmERF202* 的表达在处

理后 2 h 上调,直到 48 h 一直维持较高水平,但在根中几乎没有变化; *ZmERF16* 的表达量在根和叶中均在 3 h 和 24 h 各出现 1 个峰值; *ZmERF4* 在叶中的表达量基本无变化,但是在根中于 12 h 出现 1 个较小的峰值。

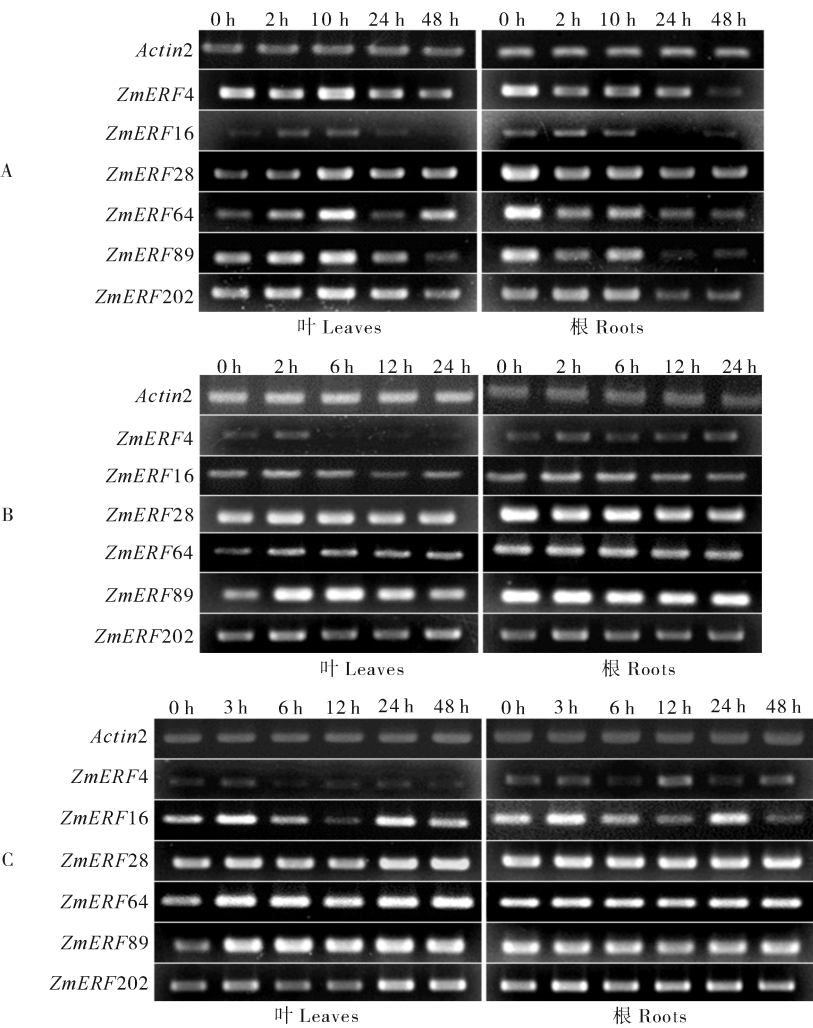
进一步的比较分析发现, *ZmERF28* 的表达模式在 ABA 和 ET 的处理中极为相似,但是与 JA 处理下的不同。 *ZmERF16*、*ZmERF64* 和 *ZmERF89* 也有这个现象。对于 *ZmERF202*,它在 ABA 和 JA 处理下的表达模式比较相似,但是与 ET 处理下不一样。而 *ZmERF4* 在 3 种激素处理下的表达模式都不一样。



A.氨基酸残基序列的 N-端保守域 MCGGAI;B.subgroup-1 蛋白的 C-端保守域;C.位于 Group II ERF 蛋白上的假定的蛋白激酶磷酸化位点。下划线部分为保守序列,黑色和灰色底纹区域表示各基因对应氨基酸残基相同率大于 80%。A.An sequences alignment of the N-terminal amino acids of the phylogenetic tree members,all of which contain the MCGGAI motif; B.An sequences alignment of the C-terminal regions of subgroup-1 proteins; C.Putative protein kinase phosphorylation sites conserved in the Group II ERF proteins. The conserved motifs are underlined.Black and gray shading indicate identical and conserved amino acid residues present in more than 80% of the aligned sequences,respectively.

图 4 ERF 蛋白的 AP2/ERF 结构域之外的保守序列分析

Fig.4 The motifs outside of the AP2/ERF domain conserved in the ERF proteins



A. 乙烯利处理；B. 脱落酸处理；C. 茉莉酸处理。A: Ethylene treatment (ET)；B: Absciscic acid treatment (ABA)；C: Jasmonic acid treatment (JA).

图 5 半定量 RT-PCR 分析 6 个 *ZmERF* 基因在 3 种激素处理下的表达模式

Fig.5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of the six *ZmERF* genes in leaves and roots of maize under three hormones

3 讨 论

据报道,大多数拟南芥 *ERF* 家族基因都没有内含子^[18],在 122 个 *AtERF* 成员中只有 20 个在其开放阅读框内含有单一内含子^[19]。在本研究中,6 个玉米 *ERF* 中有 3 个基因含有 2 个内含子,且只有 1 个基因没有内含子,这一结果暗示着玉米 *ERF* 基因家族与拟南芥的 *ERF* 家族基因结构可能存在差异。然而,AP2 结构域氨基酸残基序列的分析结果显示 Arg-3、Pro-20、Arg-39、Arg-49 在检测的蛋白中是完全保守的,而且该保守现象与拟南芥中之前的报道是一致的^[18]。这些结果暗示了玉米 *ERF* 基因结构相较于其蛋白结构具有较明显的变化,其蛋白结构更为保守。

在转录因子的 DNA 结合区域之外,还有一些保守区域可能与蛋白的转录活性、蛋白间相互作用以及定位等有关^[20]。在我们的研究中,发现 4 个蛋白(*ZmERF28*、*ZmERF64*、*ZmERF89*、*ZmERF202*)都含有一个高度保守的 N-端序列(MCGGAI),这也是拟南芥 *ERF* 亚家族的 Group VII 成员的典型特征^[19],在西红柿 *ERF* 家族中也有此特征^[7]。最近有研究报道这个独特的结构域在拟南芥中参与了氧敏感机制^[21]。另一个在 Group I 的 subgroup-1 中保守的结构域(DLNxxPP),是一个 C-端抑制结构域,也存在于 TFIIIA 型 C₂H₂ 锌指蛋白^[22]。此结构域存在于这类蛋白上,也暗示着它有转录调节的功能^[19]。还有一个保守区域(TP/SDI/YT/AS)存在于 Group II 上,已经被证实是一个普遍存在的磷酸

化位点,也存在于拟南芥的一些 *ERF* 成员中^[19]。此外还发现,尽管 *ZmERF16* 在 AP2 结构域与其他蛋白的同源性更差,但 *ZmERF4* 与其他 *ZmERFs* 的亲缘关系还要远于 *ZmERF16*。这个结果暗示了在 AP2/*ERF* 结构域之外还存在着一些影响 *ERF* 亚家族进化关系的关键序列。

ABA、JA、SA 和 ET 介导的小分子内源激素信号通路在串联生物和非生物胁迫信号中扮演着重要角色^[1]。ABA 广泛参与非生物胁迫,例如干旱和渗透胁迫;SA、JA 和 ET 则在生物胁迫中扮演重要角色。另外还发现,JA 和 ET 也经常参与到防御寄生病原体和植食性昆虫的机制中^[23-24]。在本研究中,*ERF* 基因作为乙烯响应转录因子,在根和叶中也明显受 ET 调控。外源施加的 ABA 或 JA 导致这些 *ERF* 基因的 mRNA 在叶中出现不同程度的积累,然而在根中表达则没有明显的变化,特别是 JA 处理。在乙烯、ABA 及 JA 三种激素处理中,外源乙烯对于 *ERF* 基因表达的调控最为明显,而后两者对 *ERF* 基因的调控则不甚明显,尤其是在根中。基于前人的研究^[25-26] 和本研究结果,推测 *ZmERFs* 可能作为一个胁迫响应中激素信号通道的关键调节蛋白,在玉米的根和叶中扮演着不同的角色。

参 考 文 献

- [1] 张计育,王庆菊,郭忠仁.植物 AP2/*ERF* 类转录因子研究进展[J].遗传,2012,34(7):835-847.
- [2] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. Science, 2000, 290: 2105-2110.
- [3] 刘武,戴良英.植物抗逆相关 *ERF* 转录因子研究综述[J].中国农学通报,2007,23(4):78-81.
- [4] ONATE-SA'NCHEZ L, SINGH K B. Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection[J]. Plant physiology, 2002, 128: 1313-1322.
- [5] LIU D, CHEN X, LIU J, et al. The rice *ERF* transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance[J]. Journal of experimental botany, 2012, 63: 3899-3912.
- [6] FISCHER U, DROGE LASER W. Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2004, 17: 1162-1171.
- [7] TOURNIER B, SANCHEZ-BALLESTA M T, JONES B, et al. New members of the tomato *ERF* family show specific expression pattern and diverse DNA binding capacity to the GCC box element[J]. FEBS letters, 2003, 550: 149-154.
- [8] ZHANG G, CHEN M, LI L, et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/*ERF* type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco[J]. Journal of experimental botany, 2009, 60: 3781-3796.
- [9] ZHU X L, QI L, LIU X, et al. The wheat ethylene response factor transcription factor pathogen-induced *ERF1* mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses[J]. Plant physiology, 2014, 164: 1499-1514.
- [10] 黄泽军,黄荣峰,黄大昉. *ERF* 转录因子及其在植物防卫反应中的作用[J]. 植物病理学报, 2004, 34(3): 193-198.
- [11] CAO Y, SONG F, GOODMAN R M, et al. Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress[J]. Journal of plant physiology, 2006, 163: 1167-1178.
- [12] TIAN Z D, HE Q, WANG H X, et al. The potato *ERF* transcription factor StERF3 negatively regulates resistance to *Phytophthora infestans* and salt tolerance in potato[J]. Plant cell physiology, 2015, 56: 992-1005.
- [13] 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 physiology, 2008, 47: 1347-1357.
- [14] FUKAO T, XU K, RONALD P C, et al. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice[J]. The plant cell, 2006, 18: 2021-2034.
- [15] QIN F, YOH SAKUMA, JIE L I, 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 cell physiology, 2004, 45: 1042-1052.
- [16] ALLEN M D, YAMASAKI K, OHME-TAKAGI M, et al. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA[J]. EMBO J, 1998, 17: 5484-5496.
- [17] 葛宝宇,林轶,侯和胜. *ERF* 类转录因子的结构与功能[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(20): 32-35.
- [18] TOSHITSUGU N, KAORU S, TATSUHIITO F, et al. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. Plant physiology, 2006, 140: 411-432.
- [19] LIU L, WHITE M J, MACRAE T H. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation[J]. Eur J Biochem, 1999, 262: 247-257.
- [20] LICAUSI F, KOSMACZ M, WEITS D A, et al. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization[J]. Nature, 2011, 479: 419-422.
- [21] OHTA M, MATSUI K, HIRATSU K, et al. Repression do-

- mains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression[J]. *Plant cell*, 2001, 13: 1959-1968.
- [22] MAUCH-MANI B, MAUCH F. The role of abscisic acid in plant pathogen interactions[J]. *Current opinion in plant biology*, 2005, 8: 409-414.
- [23] DE VOS M, VAN OOSTEN V R, VAN POECKE R M, et al. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack[J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2005, 18: 923-937.
- [24] GLAZEBROOK J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens[J]. *Annual review of phytopathology*, 2005, 43: 205-227.
- [25] LIANG H, LU Y, LIU H, et al. A novel activator-type ERF of *thinopyrum intermedium*, TiERF1, positively regulates defence responses[J]. *Journal of experimental botany*, 2008, 59: 3111-3120.
- [26] 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: 262-270.

Cloning and analyzing the sequences and expression of six maize *ERF* genes

LI Shipeng LIU Fuyang ZHANG Cong TAI Fujun

*State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Collaborative
Innovation Center of Henan Grain Crops/*

College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract Six maize *ERF* genes were isolated and designated as *ZmERF4*, *ZmERF26*, *ZmERF28*, *ZmERF64*, *ZmERF89* and *ZmERF202*, respectively. Results of analyzing gene structure showed that the structures of the maize *ZmERF* genes isolated were different from those of *Arabidopsis AtERF*. Results of phylogenetic analysis showed that *ZmERFs* had a closer relation to *OsERFs* and a little far relation to *AtERFs*. Results of expression analysis showed that mRNAs of all six *ZmERFs* were accumulated firstly and then declined in leaves, whereas the expressions of 4 genes including *ZmERF4*, *ZmERF28*, *ZmERF64* and *ZmERF89* were down-regulated in roots under ET treatment. mRNAs of 6 *ERFs* were regulated more or less in leaves, whereas expressions of most *ZmERFs* in roots were not changed significantly under ABA or JA treatment, especially for JA treatment. It is indicated that the *ZmERFs* might play different roles in hormone signaling pathway of maize leaves and roots.

Keywords *Zea mays*; *ERF* genes; gene expression; hormone signaling pathway; ET; ABA; JA

(责任编辑:张志钰)