

菊花抗白色锈病相关基因 *CmDREBa-2* 的克隆及表达分析

熊超明¹, 赵兴华², 贾红梅¹, 延昕¹, 毛洪玉^{1,*}

(¹ 沈阳农业大学林学院, 沈阳 110866; ² 辽宁省农业科学院花卉研究所, 沈阳 110161)

摘要: 以菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) 免疫白色锈病品种 ‘C029’ 为试验材料, 基于白色锈病原菌诱导的菊花转录组数据库, 采用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 方法克隆得到菊花 DREB (Dehydration responsive element binding protein) 基因, 命名为 *CmDREBa-2*。对其进行生物信息学分析和表达分析, 结果表明: *CmDREBa-2* 开放阅读框 (ORF) 全长 291 bp, 编码 96 个氨基酸; 预测 *CmDREBa-2* 蛋白相对分子质量为 11 159.04, pI 为 11.34, 是一个定位于细胞核、亲水的不稳定蛋白; 氨基酸序列和结构分析显示该蛋白含有 1 个由 49 个氨基酸残基组成的 AP2 保守结构域, 所以该蛋白属于 AP2/EREBP 家族; 进化树分析表明 *CmDREBa-2* 属于 DREB 家族的 A-1 组, *CmDREBa-2* 蛋白与菊花的其他两个 DREB 类蛋白 *CmDREBa* 和 *CmDREBb* 的同源性较高; 菊花 ‘C029’ 接种白色锈病原菌 6 h 后, *CmDREBa-2* 表达量达到最高, 约为未接菌对照的 34 倍; 用水杨酸 (SA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 和乙烯利 (ETH) 处理 ‘C029’ 菊花叶片, 结果表明 *CmDREBa-2* 受 3 种激素的诱导表达。

关键词: 菊花; *CmDREBa-2*; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S 682.1⁺¹

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 05-0977-11

Cloning and Expression Analysis of *CmDREBa-2*, A Resistance-related Gene to Chrysanthemum White Rust

XIONG Chaoming¹, ZHAO Xinghua², JIA Hongmei¹, YAN Xin¹, and MAO Hongyu^{1,*}

(¹ College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; ² Institute of Flowers, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China)

Abstract: Based on the information of transcriptome database derived from ‘C029’, a *Puccinia horiana* Henn. immune *Chrysanthemum morifolium* cultivar, the cDNA sequence of DREB (Dehydration responsive element binding protein) was cloned. This DREB gene was named *CmDREBa-2*. Sequence analysis showed that the open reading frame (ORF) of *CmDREBa-2* was 291 bp, encoding 96 amino acids. The molecular weight of the predicted protein was 11 159.04 and the pI value was 11.34. The protein was located in the nucleus, and it was a hydrophilic and unstable protein. The transcription factor of *CmDREBa-2* contained the AP2 DNA binding domain which was composed by 49 amino acids. The results of phylogenetic analysis showed that the *CmDREBa-2* belonged to the DREB family of A-1 and it

收稿日期: 2017 - 11 - 20; 修回日期: 2018 - 04 - 26

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (2014027004); 辽宁省教育厅科学研究计划项目 (L2015483)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: maohongyu74@163.com)

had a close relationship with *CmDREBa* and *CmDREBb* from *C. morifolium*. The expression level of *CmDREBa-2* reached a maximum at 6 h after *Puccinia horiana* Henn. infection, with 34 times as much as the control. We also found that the expression of *CmDREBa-2* was induced by SA, MeJA and ETH.

Keywords: chrysanthemum; *CmDREBa-2*; cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

菊花白色锈病 (chrysanthemum white rust, CWR) 是一种重要的世界性菊花病害。该病最早于 1895 年在日本被发现, 1901 年 Hennings 将此病原菌鉴定为 *Puccinia horiana* Henn. (Whipps, 1993)。近年来该病在印度 (Sriram et al., 2015), 美国 (Bonde et al., 2014, 2015) 以及中国的山东 (丁世民和席敦芹, 2001)、吉林 (范文忠 等, 2002)、沈阳 (田秀玲 等, 1999)、兰州 (梁伟, 2003) 均有发生, 危害中国菊花的产业化生产。

DREB 转录因子是植物特有的一类转录因子, Stockinger 等 (1997) 首次从拟南芥中分离出来。大量研究表明, DREB 在植物中过量表达, 可以显著提高对胁迫的抗性, 并具有一定的广谱效应。将拟南芥 *AtDREB1A* 转入地被菊, 其可以在常规杂交育种中稳定遗传, 并能够提高转基因地被菊耐干旱和盐渍胁迫 (洪波 等, 2006)、耐低温 (张晓娇 等, 2011) 和耐水分胁迫 (于洋 等, 2011; 杨英杰 等, 2013) 的能力。在菊花中 *DREB2A* 受高温、低温、干旱、ABA 和高盐胁迫诱导表达, 可能在提高菊花逆境胁迫耐受性方面也起着重要作用 (Liu et al., 2008)。此外, 近年来在高粱 (谢登雷 等, 2013)、白菜 (刘晓颖 等, 2013)、草莓 (张勇 等, 2014)、向日葵 (梁春波 等, 2015)、茶树 (刘志薇 等, 2015)、西藏砂生槐 (Yao et al., 2016) 和香樟 (李勇鹏 等, 2016) 等植物中也发现 DREB 基因对低温、高温、干旱、盐害都有抵御作用。

但是 DREB 基因参与植物抵御生物胁迫方面的研究鲜有报道。Chini 等 (2004) 在非依赖型 ABA 脱水反应通路中发现 *DREB2A* 与抗病激活信号通路相联系, 在板栗中非生物胁迫也明显地诱导了囊泡抗真菌蛋白的表达 (Pernas et al., 2000)。这说明植物体内生物和非生物胁迫信号转导途径中很可能存在互作, 在一定程度上也说明了 DREB 基因可能参与植物对生物胁迫的响应。菊花品种 ‘C029’ 是一个免疫白色锈病的品种, 可作为菊花抗白色锈病育种的资源材料。在课题组的前期研究中, 通过对感病 (‘C008’) 和抗病 (‘C029’) 品种进行转录组测序分析, 获得了 14 个差异表达基因 (Dong et al., 2018), 其中 *CmDREBa-2* 在接菌后表达量明显上升, 从而推测其与菊花抗白色锈病相关, 所以明确 *CmDREBa-2* 抗病反应的分子机制, 可以为菊花白色锈病抗性育种提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

试验于 2016—2017 年在沈阳农业大学林学院进行, 菊花免疫白色锈病品种 ‘C029’, 由沈阳农业大学林学院花卉基地提供。选取生长健壮的 ‘C029’ 组培苗, 用手指涂抹法将白色锈病病原菌 (*Puccinia horiana* Henn.) 接种到组培苗的第 2~5 枚叶片, 未接菌的组培苗作为对照, 分别于接菌后 0、1、6、10、18、24、36、48、72 和 96 h 时采集叶片, 置于液氮中冷冻, -80°C 冰箱保存备用。分别用 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA, $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 和 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ETH 喷洒生长健壮的 ‘C029’ 的组培苗叶片表面, 喷洒清水的组培苗作为对照, 每个处理重复 3 次, 然后于 0、1、6、12、24 和 48 h 采集第 2~5 枚叶片, 马上置于液氮中冷冻, -80°C 冰箱保存备用。

1.2 *CmDREBa-2* 全长的获得及检测

总 RNA 的提取按照 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒说明书进行, cDNA 的合成按照 Prime Scrip™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行。

根据转录组测序结果, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 条特异性 5'RACE 引物和两条特异性 3'RACE 引物 (表 1), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成。PCR 反应体系和扩增方法参照 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit User Manual。PCR 产物进行电泳并对目的条带进行切胶回收纯化, 纯化产物与 pMD18T 进行连接, 转化后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司直接测序。

用 DNAMAN 软件与中间片段拼接得到 cDNA 全长。利用拼接得到的 cDNA 全长序列设计该基因的特异片段扩增引物 (表 1), PCR 扩增得到特异序列, 产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 目的片段回收纯化后连接 pMD18T 载体, 转化大肠杆菌, 至少筛选 3 个阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.3 生物信息学分析

序列同源性分析采用 GenBank 的 BLAST 程序, 开放阅读框框查找采用 NCBI ORF Finder, 氨基酸、序列比对、进化树分析采用 DNAMAN 2.6 和 MEGA 5.0 软件; 采用 ProtParam 数据库 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 分析氨基酸序列的多个物理和化学参数 (分子量、等电点、亲水性等)。采用 SOPMA 程序 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa>) 对蛋白进行二级结构预测; 使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测蛋白质三级结构; 利用 PSORT (<http://wolfsort.org/>) 进行亚细胞定位的预测。

1.4 基因表达分析

采用 qPCR 技术分析 *CmDREBa-2* 在白色锈病病原菌诱导下和外源生长调节剂处理下不同时间点的表达情况, 以 *Actin* 基因为内参, 反应引物见表 1, 按照 SYBR®Premix Ex Taq™ II 使用说明在 StepOnePlus 进行 qPCR 反应。每个样品设有 3 次重复。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 变性到延伸循环 40 次; END (熔解曲线): 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。采用 2^{-ΔΔCT} 法分析结果。

表 1 *CmDREBa-2* 的克隆和定量 PCR 所用引物
Table 1 Primers used for cloning and RT-PCR of *CmDREBa-2*

用途 Primer function	引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence
管家基因扩增 Housekeeping gene amplification	Actin-F	CCACTTAATCCAAAAGCCAA
	Actin-R	ACCATCACCAGAATCCAACA
<i>CmDREBa-2</i> RT-PCR	q- <i>CmDREBa-2</i> -F	AAACTTCCTACTCCTTACACCTC
	q- <i>CmDREBa-2</i> -R	GTACATACCTCTTTACAACCACA
转录组序列验证 The transcriptome sequence primers	B055-F	ATGTTGGCTTCACAAACC
	B055-R	CGAGGACTGCGGGATAGG
5' RACE 特异性引物 Gene specific primers for 5' RACE	GSP1	CAGCGGTGTCATGTGT
	GSP2	ACTTCCTACTCCTTACACC
	GSP3	TGGGTGTCGTGTCTCCTTG
3' RACE 特异性引物 Gene specific primers for 3' RACE	C038-1	ACACATGACACCGCTGACATGGCA
	C038-2	ATGAGAGGTCGATCCGCGTGTTTA
特异扩增引物 Specific amplification primer	<i>CmDREBa-2</i> -F	ATGCATATCGAATCACAATACCTT
	<i>CmDREBa-2</i> -R	CTAAAAACACCTCAACGACATGTC

2 结果与分析

2.1 *CmDREBa-2* 的克隆

以菊花 ‘C029’ 接菌处理 6 h 的 cDNA 为模板, 利用转录组序列验证引物进行 RT-PCR 得到 240 bp 的条带 (图 1, a), 测序后在 NCBI 数据库进行 BLAST, 发现其与已知菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) 材料的 *DREB* 基因具有较高同源性。以此片段为基础设计特异性引物 (表 1), 获得 535 bp 的 3'端序列 (图 1, b) 和 284 bp 的 5'端序列 (图 1, c)。用 DNAMAN 软件与中间片段拼接得 cDNA 全长, 全长为 834 bp, 并设计特异引物 (表 1) 扩增, 获得 533 bp 的特异序列 (图 1, d)。特异片段测序结果与拼接序列进行比对, 两者吻合度达到 98.74%, 两者编码的氨基酸序列比对也几乎一致, 差异氨基酸位于 AP2 结构域下游。cDNA 序列在 NCBI 网站进行 BLAST, 结果显示全长序列与菊花另外两个 *DREB* 序列 (EF490996.1, EF487535.1) 有较高的同源性, 因此将该基因命名为 *CmDREBa-2*。

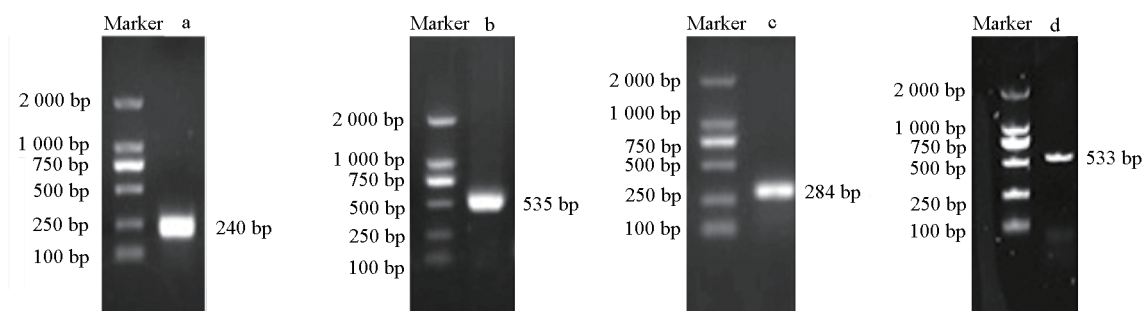


图 1 基因克隆电泳图

a: 转录组片段; b: 3'RACE 产物; c: 5'RACE 产物; d: 特异扩增。

Fig. 1 Electrophoresis results of *CmDREBa-2* cloning

a: Transcriptome fragment; b: 3' fragment; c: 5' fragment; d: Specific amplification.

2.2 *CmDREBa-2* 的生物信息学分析

2.2.1 序列特征分析

CmDREBa-2 cDNA 全长 834 bp。NCBI ORF Finder 分析序列表明该序列包含 179 bp 5' UTR (非编码区) 和 363 bp 3' UTR, 3'端还有一段全长为 29 bp 的 polyA 加尾信号。ORF Finder 分析表明, *CmDREBa-2* 的开放阅读框有 291 bp, 编码 96 个氨基酸 (图 2)。利用 ProtParam 预测 *CmDREBa-2* 所编码的蛋白质相对分子质量为 11 159.04, 理论等电点 pI 为 11.34, 氨基酸序列中 Arg 的使用率最高, 占 14.6%, 蛋白分子式为 $C_{491}H_{806}N_{160}O_{130}S_4$ 。该蛋白总的负电荷残基数为 7 个, 总的正电荷残基数为 23 个, 不稳定系数为 53.65, 为不稳定蛋白, 该蛋白的亲水性区域大于疏水性区域, 平均疏水性为 -0.742, 即为亲水性蛋白; 亚细胞定位预测表明该蛋白定位于细胞核上。

使用 NCBI CDD (Conserved Domain Database) 数据库分析 *CmDREBa-2* 全长序列中可能的蛋白功能结构域, 该蛋白有 1 个典型的 AP2 保守结构域 (图 2), 分布在第 22 ~ 70 位氨基酸之间, 并且 AP2 结构域的第 14 位为缬氨酸 (V), 但第 19 位不是通常的谷氨酸 (E) 而是组氨酸 (H), 与 *CmDREBa* (ABO93604.1) 相同 (图 2, 图 3), 这也符合 *DREB* 转录因子的典型特征。由此推测, *CmDREBa-2* 属于 *DREB* 转录因子基因。

```

CTGGGACTCACACAATACACATCTACATGTATAAATATC
AAGCACTACTTGCAAGTTACATATAAATTGTTCAAACCTCAACCAATAAATTCACAAGCTGCACAT
GCATATCGAATCACAATACCTTCTTTGAGGCAAATTTGTTGTTGTATATACCTCTTTACAACCGAAGT
GATGTTGGCTTCACAAAACCCCTAAGAAAAGAGCAGGAAGAAAAAGTTCAAGGAGACACGA
  M L A S Q N P K K R A G R K K F K E T R
CACCCAATATATCGAGGTGTAAGAAGTAGGAAGTTTAGTAAATGGGTATGTGAAGTTACA
  H P I Y R G V R S R K F S K W V C E V T
CATGAAACCGCTGACATGCGAGCTAGGGTGCATGATGTAGCTGTTTAGCAATCAGAGGT
  H E T A D M A A R V H D V A V L A I R G
CGATCCGCGTGTAAATTTTGCTGACTCCGTATGCGCTGCCCCATCCCGAGTCCTCG
  R S A C L N F A D S V W R L P I P Q S S
ACATACAAAAGGCAGCTTCCGAAGCGGCCAAGGCTTTTAGACCGATCGTAG
  T Y K R Q L P K R P R L L D R S *
AGATTGCGAAAATCGTGTATGACGTGGACGAGGATGAGATATTGGGAAACAGGTGTTATTGCGAGCA
TGGCAAGGGAACATAATGCTACCGTCACTACATGCGGTAGGGCATGGAATACTTTTGATGACGTGGAAT
TATTGTATGACATGTCGTTGAGGTGTTTTAGTTTACACAGGAGAGTATATTGAGAAGGAATAAGACC
ATCATCTCATGTTCAAGTTTCTCATATTATAAAACCCACGAAGAGATTCTCTAATTATTCTTATACAT
TGTATATTAGGCTAATTCAATACTTATCTATGTTATAAATATAAATTATCCCCCGTAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 菊花 *CmDREBa-2* 基因的 cDNA 全长序列及其推导的氨基酸序列

划直线处为 *CmDREBa-2* 氨基酸的特征序列, 虚线处为 AP2/EREB-DNA 结合结构域,
曲线处为 polyA 尾, 方框表示起始密码子和终止密码子。

Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequences of *CmDREBa-2* oxidase gene from *Chrysanthemum*

The amino acids underlined are *CmDREBa-2* character sequences, the amino acids with imaginary line are
AP2/EREB-DNA binding domain, the amino acids with wavy line are polyA,
the translation start and stop codons are framed.

2.2.2 编码蛋白的序列同源性比较

利用蛋白比对, 在 NCBI 数据库中找到了 6 个菊科植物: 4 个菊花 (ABO93604.1、ABS11982.1、ACU00263.1、ABD90468.1)、1 个向日葵 (XP_021984743.1) 和 1 个紫茎泽兰 (ADE62311.1) 同源蛋白。利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对, 结果表明, *CmDREBa-2* 与这 6 个菊科植物都具有 AP₂ 保守结构域, 同源性分别为 38.54%、38.92%、33.50%、32.51%、40.99% 和 30.14%, 其同源性不高的主要原因是 *CmDREBa-2* 基因编码的氨基酸太少 (图 3)。比对结果显示, *CmDREBa-2* 蛋白中的 AP₂ 结构域中缺少以 “RVWL” 为主体构成的 β 3 保守区域 (图 3), 使得 *CmDREBa-2* 蛋白中的 AP₂ 结构域较短, 可能因此它能够参与生物胁迫应答, 但其具体功能需要进一步试验揭示。

2.2.3 蛋白质的二级结构与三级结构分析

利用 SMOQA 数据库 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa>) 对 *CmDREBa-2* 蛋白进行二级结构预测, 结果表明, 该蛋白由 26.04% 的 α -螺旋, 15.62% 的 β -折叠, 5.21% 的 β -转角和 53.13% 的随机卷曲组成。由此可知随机卷曲结构是 *CmDREBa-2* 蛋白的主要组成部分, 而 α -螺旋和 β -折叠则分散在蛋白序列中 (图 4, a)。

由 SWISS-MODEL 模拟出的 *CmDREBa-2* 的三级结构 (图 4, b), 其结构较为简单, 只含有 1 个 α -螺旋和 3 个 β -折叠, 4 个组分间以 β -转角 (loop) 相连接。

紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i>	AaDREB1A	MATLIQFNTPYTSLSADNIPTTESSTSDYSTGTSTFSDEE	40
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1	MATFIQFNAGNIPTESCST.....SDED	23
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1A	MATFIQFNAGNIPTESCST.....SDED	23
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa	MDIESHYQHQEKLSTVQPSLEPE	23
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa-2		0
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	HaDREB1D-like		0
	CmDREBb	MDIESHYLHQEKLSTVQPSLEPE	23
紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i>	AaDREB1A	VLASCNPKKRAGRKKEETRHFVYRGVRRDSCKWVCEV	80
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1	VLASCNPKKRAGRKKEETRHFVYRGVRRDSCKWVCEV	63
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1A	VLASCNPKKRAGRKKEETRHFVYRGVRRDSCKWVCEV	63
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa	VLASCNPKKRAGRKKEETRHFVYRGVRRDSCKWVCEV	63
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa-2	VLASCNPKKRAGRKKEETRHFVYRGVRRDSCKWVCEV	39
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	HaDREB1D-like	VLASCNPKKRAGRKKEETRHFVYRGVRRDSCKWVCEV	39
	CmDREBb	VLASCNPKKRAGRKKEETRHFVYRGVRRDSCKWVCEV	63
AP2 DNA binding domain			
紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i>	AaDREB1A	REPNNKIRVWLGTYPTATMAARAHDAVLAIRGRSCCLNF	120
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1	REPNNKIRVWLGTYPTATMAARAHDAVLAIRGRSCCLNF	103
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1A	REPNNKIRVWLGTYPTATMAARAHDAVLAIRGRSCCLNF	103
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa	RHPITQSRVWLGTHDTATMAARAHDAVLAIRGRSCCLNF	103
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa-2	THE.....TATMAARAHDAVLAIRGRSCCLNF	67
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	HaDREB1D-like	REPNNKIRVWLGTYPTATMAARAHDAVLAIRGRSCCLNF	79
	CmDREBb	RHPITQSRVWLGTHDTATMAARAHDAVLAIRGRSCCLNF	103
紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i>	AaDREB1A	ADSLWRLEIPSSNVKDIQKAAVKAEEAFRPTETDVAVIE	160
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1	ADSLWRLEIPSSNVKDIQKAAVKAEEAFRPNDDVALAE	143
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREB1A	ADSLWRLEIPSSNVKDIQKAAVKAEEAFRPNDDVALAE	143
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa	ADSLWRLEIPSSNVKDIQKAAVKAEEAFRPNDDVALAE	143
菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	CmDREBa-2	ADSLWRLEIPSSNVKDIQKAAVKAEEAFRPNDDVALAE	96
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	HaDREB1D-like	ADSLWRLEIPSSNVKDIQKAAVKAEEAFRPNDDVALAE	119
	CmDREBb	ADSLWRLEIPSSNVKDIQKAAVKAEEAFRPNDDVALAE	143

图 3 CmDREBa-2 氨基酸序列与近缘物种 DREB 类蛋白的多重比对
Fig. 3 Protein multi-alignment of CmDREBa-2 with C4Hs from other plants

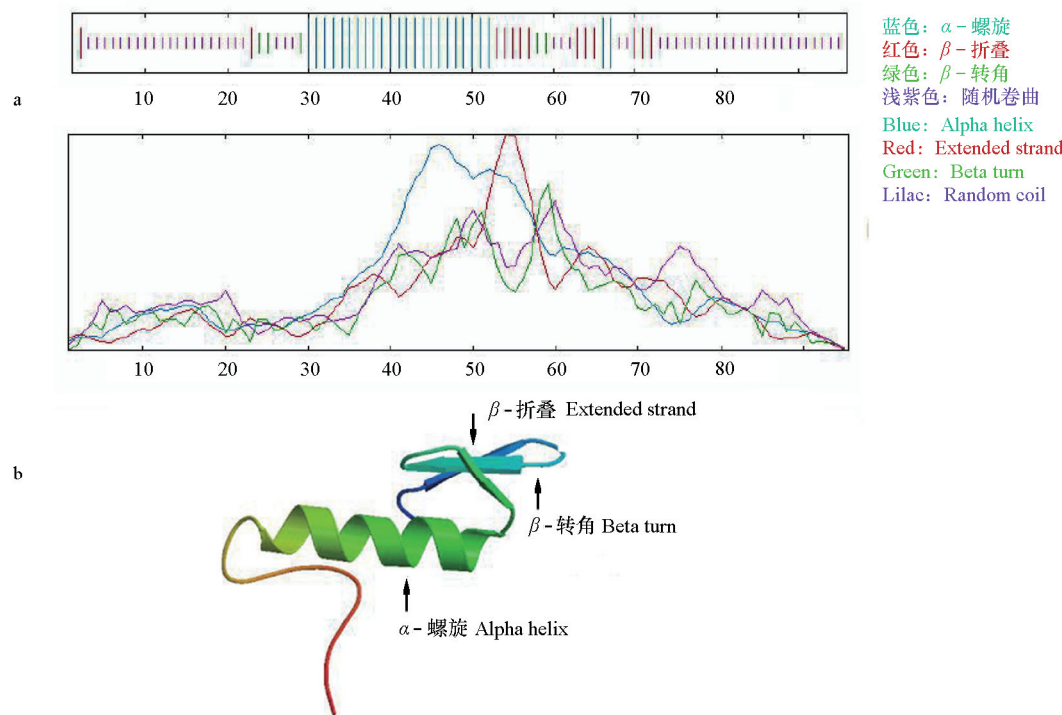


图 4 CmDREBa-2 蛋白的二级结构 (a) 与三级结构预测 (b)
Fig. 4 The secondary structure (a) and three-dimension structures (b) of the deduced CmDREBa-2 polypeptide

2.3 *CmDREBa-2* 蛋白分子的系统进化树

为了分析试验中得到的 *CmDREBa-2* 与 DREB 转录因子的关系, 将 *CmDREBa-2* 蛋白与部分菊科植物和拟南芥 DREB 家族蛋白进行同源性比较, 利用 MEGA5.05 软件, 采用邻近法构建系统进化树。结果 (图 5) 表明: *CmDREBa-2* 属于 DREB 家族的 A-1 组, 并且拟南芥和菊科植物 DREB 没有位于同一小分支, 这也说明了 DREB 蛋白在不同植物中具有较高的保守性, *CmDREBa-2* 与菊花另外两个 DREB 关系最近, 尤其是 *CmDREBa*, 这也是 *CmDREBa-2* 命名的缘由。

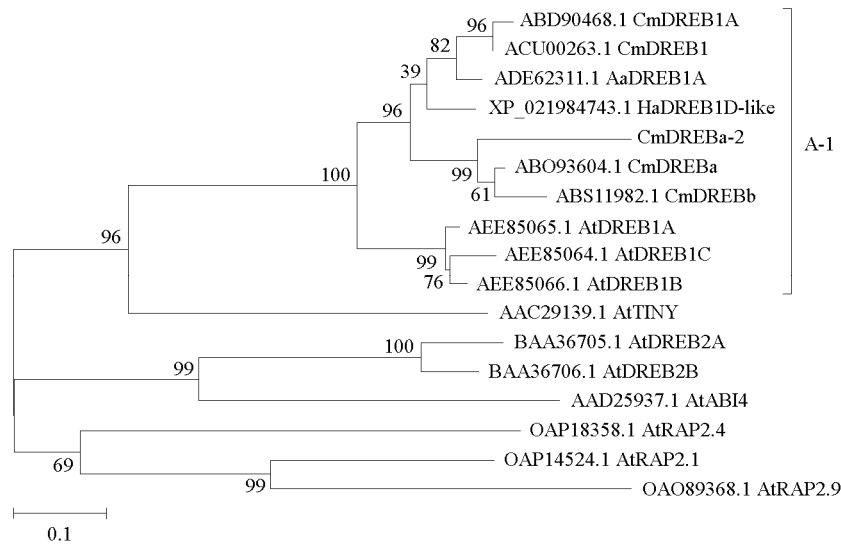


图 5 *CmDREBa-2* 和其他 DREB 蛋白的系统进化树

Cm: 菊花; Aa: 紫茎泽兰; Ha: 向日葵; At: 拟南芥。

Fig. 5 Phylogenetic tree of *CmDREBa-2* and DREB from other plants

Cm: *Chrysanthemum morifolium*; Aa: *Ageratina adenophora*; Ha: *Helianthus annuus*; At: *Arabidopsis thaliana*.

2.4 *CmDREBa-2* 的表达分析

2.4.1 在白色锈病病原菌诱导下表达特异性分析

菊花品种 ‘C029’ 在接种白色锈病病原菌后, *CmDREBa-2* 表达明显受白色锈病病原菌诱导。由图 6 可知, 在接菌处理后的 6、10、18、24 和 72 h, *CmDREBa-2* 的表达量显著高于未接菌的对照, 分别为未接菌对照的 34 倍、4 倍、7 倍、2.8 倍和 2.7 倍。

2.4.2 在 SA、MeJA 和 ETH 诱导下表达特异性分析

对菊花品种 ‘C029’ 进行茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理后, *CmDREBa-2* 表达量出现明显变化, 分别于 6、24 和 48 h 显著高于清水对照, 大约为清水对照的 2 倍、3 倍和 2.8 倍。外源乙烯利 (ETH) 处理后, *CmDREBa-2* 表达量呈现一直上升的趋势, 均显著高于清水对照, 并在 48 h 达到峰值, 为清水对照的 4 倍。外源水杨酸 (SA) 处理后, *CmDREBa-2* 表达量和 MeJA 处理后表达趋势一致, 但变化幅度更大, 在 6 和 24 h 显著高于清水对照, 均为清水对照的 3 倍 (图 7)。

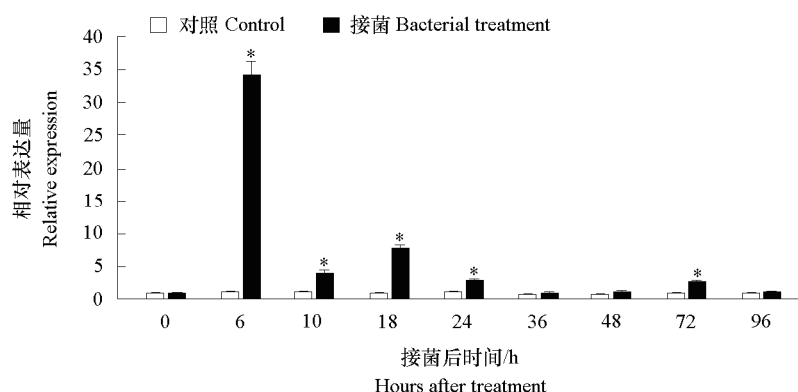


图6 菊花‘C029’叶片接种白锈病原菌后 *CmDREBa-2* 的表达情况

* 表示不同处理在同一时间点表达差异显著 (Tukey's test, $P < 0.05$)。

Fig. 6 Expression levels of *CmDREBa-2* gene under *Puccinia horiana* treatments in ‘C029’ chrysanthemum

* means significant difference in the same time between the two treatments (Tukey's test, $P < 0.05$).

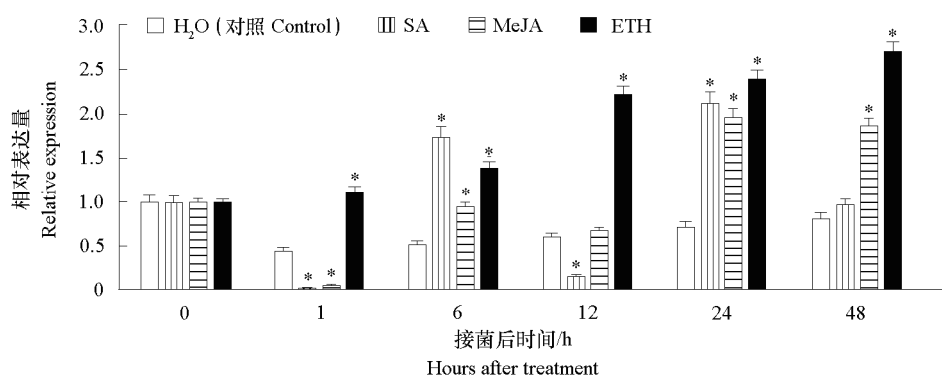


图7 菊花‘C029’叶片在 MeJA、SA 和 ETH 处理后 *CmDREBa-2* 的表达情况

* 表示不同激素处理在同一时间点与对照表达差异显著 (Tukey's test, $P < 0.05$)

Fig. 7 Expression levels of *CmDREBa-2* gene under MeJA, SA and ETH treatments in ‘C029’ chrysanthemum

* means significant difference in the same time between hormone and water treatments (Tukey's test, $P < 0.05$).

3 讨论

DREB 转录因子属于 AP2/EREBP 家族, 该家族转录因子在植物体内的分布十分广泛, 是调控植物发育和胁迫耐性的重要因子, 根据基因序列的相似性和 AP2 结构域的个数以及结构特点可以分为 5 个亚族 AP2、DREB、ERF、RAV 和单独成员 Soloist (Sakuma et al., 2002; Feng et al., 2005)。其中 DREB 亚族和 ERF 亚族都只含有一个 AP2 结构域 (Sakuma et al., 2002), 两个亚族之间的关系很近, 有些学者将两者归为一起, 并且将它们分为 12 个亚组 (Licausi et al., 2013), 这说明这两个亚族的基因存在功能相似的可能性。目前对于 DREB 转录因子的研究主要集中在其对干旱 (Dubouzet et al., 2003; Chen et al., 2016), 低温 (Chen et al., 2003, 2016), 高盐 (Herath, 2016) 等非生物胁迫的响应, 其他 4 个亚族基因的功能则集中在调控植物发育 (AP2、RAV)、胁迫响应 (ERF、RAV) 和生物胁迫响应 (Soloist) 方面 (季爱加 等, 2015)。Lai 等 (2013) 从白菜中分离得到一个 ERF 亚家族转录因子基因 *BrERF11*, 研究发现 *BrERF11* 受外源水杨酸、茉莉酸甲酯、乙烯和过氧化氢的诱导, 转化烟草后发现植株对青枯雷尔氏菌的抗病性增强。Chini 等 (2004) 在非依赖型 ABA

脱水反应通路中发现 *DREB2A* 与抗病激活信号通路相联系, 这些都说明 DREB 转录因子有很大的可能参与植物对生物胁迫的抵御反应。菊花白色锈病是菊花生产中的严重病害, 一旦发病有可能对当地的菊花产业造成毁灭性的打击。本研究选取菊花免疫白色锈病品种 ‘C029’ 为试材, 对 DREB 转录因子在菊花抵御白色锈病中的作用进行了研究。

本研究在前期研究的基础上通过 RACE 技术得到一个新的 DREB 基因并命名为 *CmDREBa-2*, 序列分析表明该基因具有典型 DREB 基因的 AP2 结构域, 是植物 DREB 家族的一员。系统进化树分析表明 *CmDREBa-2* 转录因子属于 DREB 转录因子的 A-1 组与菊花 DREBa 和 DREBb 具有极高的相似性, 尤其与 *CmDREBa* 在 AP2 结构域的第 19 位均为组氨酸, 这与菊花其他 DREB 的谷氨酸不同 (Sakuma et al., 2002), 这些都表明该蛋白是菊花体内的 DREB 转录因子。

利用实时荧光定量 RT-PCR, 对 *CmDREBa-2* 在菊花 ‘C029’ 叶片受白色锈病胁迫诱导下的表达情况进行了分析, 结果表明该基因受白色锈病的诱导, 表达趋势呈现先急剧升高, 后下降再升高最终趋于平稳, 分别在接菌处理后的 6、10、18、24 和 72 h 表达量显著高于未接菌的对照 ($P < 0.05$)。这说明 *CmDREBa-2* 参与了 ‘C029’ 对白色锈病抵御反应, 这也说明 DREB 类转录因子有参与植物抵御生物胁迫反应的功能。这与 PA2/EREBP 家族中的独立成员和 ERF 亚族的功能相吻合。

SA、JA 和乙烯是植物体内重要的抗病信号分子, 它们在抵御生物类胁迫中具有重要作用 (Lu et al., 2015)。Nakano 等 (2006) 的研究表明 *DEARI* 基因被 JA 和乙烯联合调控。Chini 等 (2004) 研究发现 *DREB2A* 的表达依赖水杨酸。这些研究说明一些 DREB 转录因子基因受 SA、JA 和 ETH 的诱导。本试验结果与之一致。

本试验虽然证明 *CmDREBa-2* 参与了菊花 ‘C029’ 对白色锈病抵御反应, 并且受 SA、MeJA 和 ETH 诱导, 但是该基因是通过何种途径来实现这种参与生物胁迫的功能, 尚不清楚, 该基因受白色锈病诱导后激活了下游哪些抗性基因来抵抗白色锈病的也不清楚, 这些都是实现菊花抗性育种亟待解决的问题。

References

- Bonde M R, Murphy C A, Bauchan G R, Luster D G, Palmer C L, Nester S E. 2015. Evidence for systemic infection by *Puccinia horiana*, causal agent of chrysanthemum white rust, in chrysanthemum. *Phytopathology*, 105 (1): 91 - 98.
- Bonde M R, Palmer C L, Luster D G, Nester S E, Revell J M, Berger D K. 2014. Viability of *Puccinia horiana* teliospores under various environmental conditions. *Plant Health Progress*, 15 (1): 25 - 28.
- Chen J Q, Dong Y, Wang Y J, Liu Q, Zhang J S, Chen S Y. 2003. An AP2/EREBP-type transcription-factor gene from rice is cold-inducible and encodes a nuclear-localized protein. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (6): 972 - 979.
- Chen Y X, Huang L K, Yan H D, Zhang X Q, Xu B, Ma X. 2016. Cloning and characterization of an ABA-independent DREB transcription factor gene, *HcDREB2*, in *Hemarthria compressa*. *Hereditas*, 153 (1): 3.
- Chini A, Grant J J, Seki M, Shinozaki K, Loake G J. 2004. Drought tolerance established by enhanced expression of the *CC-NBS-LRR* gene, *ADRI*, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 38 (5): 810 - 822.
- Ding Shi-min, Xi Dun-qin. 2001. Occurrence regularity and chemical control of chrysanthemum white rust. *Plant Protection*, 27 (2): 20 - 22. (in Chinese)
- 丁世民, 席敦芹. 2001. 菊花白锈病发生规律与药剂防治. *植物保护*, 27 (2): 20 - 22.
- Dong L, Huang Z Q, Liu D, Zhu P F, Lü S J, Li N, Mao H Y. 2018. Transcriptome analysis of chrysanthemum in responses to white rust. *Scientia Horticulturae*, 233: 421 - 430.
- Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet E G. 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 33 (4): 751 - 763.

- Fan Wen-zhong, Wei Guo-xian, Sun Yan-mei. 2002. Chrysanthemum white rust occurred seriously in Jilin. *Plant Protection*, 28 (2): 20. (in Chinese)
- 范文忠, 魏国先, 孙艳梅. 2002. 菊花白锈病在吉林市严重发生. *植物保护*, 28 (2): 20.
- Feng Jian-xun, Liu Di, Pan Yi, Gong Wei, Ma Li-geng, Luo Jing-chu, Deng Xing-wang, Zhu Yu-xian. 2005. An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* AP2/EREBP transcription factor gene family. *Plant Molecular Biology*, 59: 853 – 868.
- Herath V. 2016. Small family, big impact: *in silico* analysis of DREB2 transcription factor family in rice. *Computational Biology & Chemistry*, 65: 128 – 139.
- Hong Bo, Tong Zheng, Ma Nan, Li Jian-ke, Gao Jun-ping. 2006. The heterologous expression of *AtDREB1A* gene in *Chrysanthemum morifolium* enhanced the tolerance of plants to drought and salinity stress. *Chinese Science C series (Life Sciences)*, 36 (3): 223 – 231. (in Chinese)
- 洪波, 仝征, 马男, 李建科, 高俊平. 2006. *AtDREB1A* 基因在菊花中的异源表达提高了植株对干旱和盐渍胁迫的耐性. *中国科学 C 辑 (生命科学)*, 36 (3): 223 – 231.
- Ji Ai-jia, Luo Hong-mei, Xu Zhi-chao, Zhang Xin, Song Jing-yuan, Chen Shi-lin. 2015. Research and perspectives on AP2/ERF transcription factors in medicinal plants. *Chinese Science Bulletin*, (14): 1272 – 1284. (in Chinese)
- 季爱加, 罗红梅, 徐志超, 张鑫, 宋经元, 陈士林. 2015. 药用植物转录因子 AP2/ERF 研究与展望. *科学通报*, (14): 1272 – 1284.
- Lai Y, Dang F, Lin J, Yu L, Shi Y, Xiao Y, Huang M, Lin J, Chen C, Qi A, Liu Z, Guan D, Mou S, Qiu A, He S. 2013. Overexpression of a Chinese cabbage *BrERF11* transcription factor enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco. *Plant Physiology Biochemistry*, 62 (1): 70 – 78.
- Li Yong-peng, Zhang Jia-jia, Zhang Li-wei, Tan Ji, Chen Meng-ya, Du Li. 2016. Isolation of two DREB1 transcription factor genes and their responses to different stresses in *Toona sinensis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (4): 743 – 751. (in Chinese)
- 李勇鹏, 张佳佳, 张力维, 谭计, 陈梦雅, 杜丽. 2016. 香樟两个 DREB1 转录因子基因的分离及其对不同胁迫的响应分析. *园艺学报*, 43 (4): 743 – 751.
- Liang Chun-bo, Huang Xu-tang, Li Cen, Zhou Fei, Wang Wen-jun, Ma Jun, Chen Hui-rong, Guo Yong-li. 2015. Cloning and expressing analysis of a DREB transcription factor in ‘Sunflower’. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*, 56 (7): 31 – 34. (in Chinese)
- 梁春波, 黄绪堂, 李岑, 周菲, 王文军, 马军, 陈惠荣, 郭永利. 2015. 向日葵逆境应答转录因子 DREB 的克隆与表达分析. *宁夏农林科技*, 56 (7): 31 – 34.
- Liang Wei. 2003. Investigation results of rust resistance of introduced chrysanthemum varieties in Lanzhou area and measures to prevent rust. *Gansu Agricultural Science and Technology*, (9): 41 – 43. (in Chinese)
- 梁伟. 2003. 兰州地区引进菊花品种的抗锈性调查结果及防锈病措施. *甘肃农业科技*, (9): 41 – 43.
- Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P. 2013. APETALA2/ethylene responsive factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199 (3): 639 – 649.
- Liu L Q, Zhu K, Yang Y F, Wu J, Chen F D, Yu D Y. 2008. Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a *DREB2*-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*). *Journal of Plant Research*, 121 (2): 215 – 226.
- Liu Xiao-ying, Chen Li-yuan, Zhang Jing-qiu, Li Jia-wei, Gao Yue, Wang Zhen-ying. 2013. Isolation and functional analysis of a new DREB transcription factor (*BpDREB1*) from *Brassica pekinensis*. *Acta Agronomica Sinica*, 39 (2): 230 – 237. (in Chinese)
- 刘晓颖, 陈丽媛, 张竞秋, 李嘉玮, 高越, 王振英. 2013. 白菜脱水应答转录因子 *BpDREB1* 基因的克隆及功能研究. *作物学报*, 39 (2): 230 – 237.
- Liu Zhi-wei, Xiong Yang-yang, Li Tong, Yan Ya-jun, Han Hong-run, Wu Zhi-jun, Zhuang Jing. 2015. The cloning of transcription factor gene *CsDREB-44* and the response to temperature stress in *Camellia sinensis*. *Journal of Tea Science*, 35 (1): 24 – 34. (in Chinese)
- 刘志薇, 熊洋洋, 李彤, 严雅君, 韩洪润, 吴致君, 庄静. 2015. 茶树转录因子基因 *CsDREB-44* 的克隆与温度胁迫响应的分析. *茶叶科学*, 35 (1): 24 – 34.

- Lu J, Robert C A, Riemann M, Cosme M, Mène-Saffrané L, Massana J, Stout M J, Lou Y, Gershenzon J, Erb M. 2015. Induced jasmonate signaling leads to contrasting effects on root damage and herbivore performance. *Plant Physiology*, 167 (3): 1100 - 1116.
- Nakano T, Suzuki K, Ohtsuki N, Tsujimoto Y, Fujimura T, Shinshi H. 2006. Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 119 (4): 407 - 413.
- Pernas M, Sánchez-Monge R, Salcedo G. 2000. Biotic and abiotic stresses can induce cystatin expression in chestnut. *Febs Letters*, 467 (2 - 3): 206 - 210.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290: 998 - 1009.
- Sriram S, Chandran N K, Kumar R, Reddy M K. 2015. First report of *Puccinia horiana* causing white rust of chrysanthemum in India. *New Disease Reports*, 32: 8.
- Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. 1997. *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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (3): 1035 - 1040.
- Tian Xiu-ling, Xia Bing-qiang, Luo feng-xia, Deng li-qin. 1999. A preliminary study on the pathogen and infection pathway of white rust in *Chrysanthemum*. *Journal of Shenyang Aricultural University*, 30 (3): 379 - 380. (in Chinese)
- 田秀玲, 夏炳强, 罗凤霞, 邓丽琴. 1999. 菊花白色锈病的病原菌和侵染途径的初步研究. *沈阳农业大学学报*, 30 (3): 379 - 380.
- Whipps J M. 1993. A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potential for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Annals of Applied Biology*, 122 (1): 173 - 187.
- Xie Deng-lei, Cui Jiang-hui, Chang Jin-hua. 2013. Cloning and expression analysis of *SbDREB2* gene from *Sorghum bicolor*. *Acta Agronomica Sinica*, 39 (8): 1352 - 1359. (in Chinese)
- 谢登雷, 崔江慧, 常金华. 2013. 高粱中 *SbDREB2* 基因的克隆与表达分析. *作物学报*, 39 (8): 1352 - 1359.
- Yang Ying-jie, Li Chun-shui, Zhang Xiao-jiao, Wei Qian, Gao Jun-ping, Hong Bo. 2013. Drought stress tolerance of the hybrid offspring produced by *AtDREB1A* transgenic chrysanthemum. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 21 (2): 148 - 157. (in Chinese)
- 杨英杰, 李春水, 张晓娇, 魏 倩, 高俊平, 洪 波. 2013. 转 *AtDREB1A* 基因菊花杂交后代优株水分胁迫耐性分析. *农业生物技术学报*, 21 (2): 148 - 157.
- Yao W J, Fu Y R, Zhang Y F, Li H. 2016. Cloning of four *DREB* genes from Tibetan *Sophora moorcroftiana* and analysis of their expression during abiotic stress. *Journal of Forestry Research*, 27 (3): 675 - 683.
- Yu Yang, Wu Ping, Li Chun-shui, Hong Bo. 2011. Drought tolerance and water saving ability in *DREB1A* transgenic plants of ground cover chrysanthemum 'Fall Color'. *Journal of Northeast Forestry University*, 39 (8): 33 - 39. (in Chinese)
- 于 洋, 吴 萍, 李春水, 洪 波. 2011. 转 *DREB1A* 基因地被菊耐旱节水性. *东北林业大学学报*, 39 (8): 33 - 39.
- Zhang Xiao-jiao, Shi Chun-feng, Li Chun-shui, Gao Jun-ping, Hong Bo. 2011. Cold stress tolerance of the filial generations produced by *AtDREB1A* transgenic ground cover chrysanthemum and a conventional variety. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (9): 1717 - 1726. (in Chinese)
- 张晓娇, 史春风, 李春水, 高俊平, 洪 波. 2011. 转 *AtDREB1A* 基因地被菊杂交后代优株耐寒性分析. *园艺学报*, 38 (9): 1717 - 1726.
- Zhang Yong, Tang hao-ru, Luo Ya, Wang Xiao-rong, Chen Qing, Liu Ze-jing. 2014. Cloning and expression analysis of strawberry *FaCBF1* gene. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (2): 240 - 248. (in Chinese)
- 张 勇, 汤浩茹, 罗 娅, 王小蓉, 陈 清, 刘泽静. 2014. 草莓 *FaCBF1* 基因的克隆及表达分析. *园艺学报*, 41 (2): 240 - 248.