

## AP2 基因家族的起源和棉花 AP2 转录因子 在抗病中的作用

秦捷<sup>1</sup>, 王武<sup>2</sup>, 左开井<sup>1\*</sup>, 唐克轩<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学植物生物技术研究中心, 上海 200030; 2. 农业部棉花遗传改良重点开放实验室  
中国农业科学院棉花研究所, 河南 安阳 455000)

**摘要:**植物中庞大的 AP2 基因家族成员因其广泛参与植物响应外界环境胁迫、生长发育相关的转录调控而备受重视。AP2 基因曾被认为是植物所特有, 但最近在蓝藻、线虫和病毒中发现了具有 AP2 结构域和位点特异核酸内切酶的蛋白。所以有人认为当今植物中的 AP2 基因起源于细菌或者病毒的基因的横向转移, AP2 结构域可能来自后来进化为叶绿体的原始蓝细菌的内共生。ERF 是 AP2 大家族中的一个亚族, 它编码的蛋白能特异结合含有 GCC 盒的病程相关基因的表达, 参与植物抗病反应。ERF 基因的表达受到疾病相关刺激以及环境胁迫的诱导, 并且在乙烯、茉莉酸和水杨酸信号传导途径中发挥一定的作用。同时, 某些 ERF 基因在转基因植物中的超表达表现了一定的广谱抗性, 因而在分子育种中具有一定的应用前景。棉花上 AP2 基因家族的基因克隆与分析最近才得以进行, 介绍了我们在棉花上相关的研究工作并讨论了它们在植物抗病反应中的作用。

**关键词:** AP2 基因; 转录调控; 起源; 抗病反应

**中图分类号:** S562.035      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2005)06-0366-05

## Origin of AP2 Gene Family and Cotton AP2 Transcription Factors' Roles in Plant Resistance

QIN Jie<sup>1</sup>, WANG Wu<sup>2</sup>, ZUO Kai-jing<sup>1\*</sup>, TANG Ke-xuan<sup>1</sup>

(1. Plant Biotechnology Centre, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; 2. Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan 455000, China)

**Abstract:** AP2 gene family firstly found in *Arabidopsis* has been isolated from cyanobacterium (*Trichodesmium erythraeum*), ciliate (*Tetrahymena thermophila*) and virus (*Bacteriophage Felix 01* and *Enterobacteria phage RB49*). A horizontal transfer of an HNH-AP2 endonuclease from bacteria or viruses into plants may led to the origin of the AP2/ERF family of transcription factors via transposition and homing processes. Bioinformatics analysis showed that over 150 AP2 genes in *Arabidopsis* could be divided into five subfamilies on the basis of number of repetition and sequence of AP2 domain: ERF (ethylene response factor) and DREB subfamily with one single AP2 domain and a conserved WLW motif; AP2 subfamily with two AP2 domains; Rav subfamily containing a B3 DNA binding domain following the AP2 domain; other subfamilies have a single AP2 domain but lack the WLW motif.

Among them, AP2/ERF subfamily could specifically bind the GCC-box presenting in many PR genes to modulate their expression and participate in disease resistance signaling pathways. ERF genes can express in biotic and abiotic stresses and it may play roles in the cross-talking of multi signal pathway. Over-expression of ERF genes showed broad-spectrum pathogen resistance in transgenic

收稿日期: 2005-05-23      作者简介: 秦捷(1975-), 男, 博士; \* 通讯作者 kizuo@sjtu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470919)和“973”项目(2004CB117300)

plants, which suggest a potential application of *ERF* genes in molecular breeding. Two *ERF* genes from sea-island cotton by SSH and cDNA screening could also be induced by ET and ABA. Over-expression of *GbERF1* can enhance transgenic tobacco resistance to *Pseudomonas syringae* pv tabaci and alter some GCC-box and non GCC-box ethylene inducible genes' expression. So, studying the AP2 gene family would help us understand the evolutionary genetics of environmental stress responses, the components and regulatory structure of individual pathways in cotton.

**Key words:** AP2 gene family; transcriptional regulation; origin; disease resistance

转录因子在植物生命活动中起着重要的作用,它能汇集到细胞核内的信号,通过与下游基因启动子中顺式元件(*cis*-element)的相互作用,调控基因的表达,实现植物的生长发育和对外界刺激的应答。目前普遍认为 WRKY<sup>[1]</sup>, bZIP<sup>[2]</sup>, Myb<sup>[3]</sup> 和 AP2/ERF<sup>[4]</sup> 转录因子与植物的抗病反应相关,本文试图通过 AP2/ERF 转录因子的系统演化过程,并结合本实验室的工作对 AP2/ERF 因子在植物抗病途径中的作用进行介绍。

## 1 AP2 基因的演化

### 1.1 AP2 基因的分布

1994 年 Jofuku 等<sup>[5]</sup>首先分离到了拟南芥的 APETALA2(AP2)基因,AP2 基因所表达的蛋白质含有两个 AP2/ERF 的结构域。随后在四个能与乙烯诱导病程相关(Pathogenesis-Related, PR)的烟草蛋白中也发现了这个结构域<sup>[6]</sup>。到目前为止,在多个物种中分离和克隆到了编码 AP2/ERF 蛋白的基因,如拟南芥的 *ERF1*<sup>[7]</sup> 和 *AtERFs*<sup>[8]</sup>, 番茄的 *Ptis*<sup>[9]</sup>, 烟草的 *Tsi1*<sup>[10]</sup>。同时,在基因组数据的挖掘中也发现拟南芥、水稻和番茄基因组中具有 150 多个编码 AP2 的序列<sup>[11-12]</sup>。本实验通过筛选抗黄萎病的海岛棉(*Gossypium barbadense* L. var 7124)消减杂交文库,克隆到了两条编码 AP2/ERF 的序列,分别命名为 *GbERF1* 和 *GbERF2*<sup>[13]</sup>。这些结果表明 AP2 是一个大家族的基因。

### 1.2 AP2/ERF 的分类研究

2002 年 Sakuma<sup>[12]</sup>等根据 AP2 结构域的数量和序列结构,把拟南芥中找到的 144 个基因分为 5 个亚族: DREB、ERF、AP2、RAV 和其它类别。DREB 和 ERF 亚族(共 120 个基因)只有一个 AP2 结构域,并且有一个保守的 WLG Motif; AP2 亚族有 14 个成员,有两个 AP2 结构域; RAV 亚族有 6 个成员,在 AP2 结构域的后面有一个 B3 结构域;其他 4 个蛋白被单独分为第 V 类,它们也有一个 AP2 结构域,但是其中没有

DREB 和 ERF 典型的 WLG Motif。

## 2 AP2 基因的进化

AP2 一直被认为是植物特有的转录因子,但最近在嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)<sup>[14-15]</sup>、束毛藻(*Trichodesmium erythraeum*)和病毒(*Bacteriophage Felix 01*)与 *Enterobacteria phage RB49*<sup>[15]</sup>中也发现了编码 AP2 的基因。功能研究发现,束毛藻的 AP2 蛋白能结合富含 GC 的 DNA 序列,并且该序列和植物中 AP2 蛋白的 DNA 结合序列很类似。这个结果表明 AP2 结构域的 DNA 结合功能在长期的进化过程中是保守的。

### 2.1 AP2 基因的起源和进化

在植物以外发现 AP2 基因使得人们有兴趣并且开始试图解释这个大家族基因的起源和进化的过程。线虫编码 AP2 结构域的蛋白还有一个位点特异归巢核酸内切酶 HEG(Homing Endonuclease),并且所有植物外发现的 AP2 结构域都和 HNH 联系在一起,而 HNH 是催化中心和 DNA 结合结构域分离的 HEG<sup>[15]</sup>。

Magnani 等人认为当今植物中的 AP2 基因起源于细菌或者病毒的基因的横向转移(lateral transfer)。AP2 结构域可能来自后来进化为叶绿体的原始蓝细菌的内共生。在叶绿体从原始蓝细菌的共生进化过程发生了 AP2 基因的横向转移,这样原始的 AP2-HNH 进入了植物基因组,并通过置换和复制,在植物基因组中广泛分布。在自然选择的压力之下,可能会产生危害的内切酶活性被丢掉了。大多数的植物 AP2 基因都没有内含子。在 145 个拟南芥 AP2/ERF 基因中,只有 23 个含有内含子,这也是对从细菌或者病毒起源的基因横向转移的一个证据<sup>[15]</sup>。

除了植物和线虫,其它的真核生物包括动物基因组都没有 AP2 基因。目前一个比较可信的解释是,植物和动物的共同祖先含有 AP2 基因,但动物在进化的过程中丢失了这类基因<sup>[16]</sup>。因为已知的 AP2 蛋白质的氨基酸序列都存在着很

强的相似性,这暗示着所有的 AP2 都来自一个共同祖先;线虫 AP2 蛋白和植物 AP2 蛋白的 DNA 结合序列也存在相似性,这表明它们的功能在长期的进化过程中一直保守。

## 2.2 ERF 亚家族的进化

拟南芥 AP2 亚族和 Rav 亚族基因全部都有内含子,但 ERF 亚族中只有 4 个基因有内含子。这预示着在基因扩增之前就发生了内含子进化,内含子在一些早期的 AP2 基因中被丢弃了。Magnani<sup>[15]</sup> 的 NJ 系统进化树(图 1)把拟南芥 ERF 基因分为两支,有内含子的基因都在同一支内,这可能是由于内含子进化,一些 ERF 蛋白出

现了早期分化。较早期的一支中,AP2 结构域中是 Val13 和 His18 或 Val13 和 Asp18,而不是 Val13 和 Glu18 或 Ala13 和 Asp18,后者是 DREB 和 ERF 的区别。在 AP2-R1 和 AP2-R2 中有两个保守的内含子标记(intronic markers),其中一个也出现在只有一个 AP2 结构域的 AP2 基因中。据此,Magnani 等人认为 ERF 亚族是单源(monophyletic)进化。这个亚族的祖先可能在扩增和分化之前就发生了内含子进化,所以现在大多数的 AP2 基因都没有内含子。在水稻中也发现了拟南芥中的内含子标记<sup>[15]</sup>。

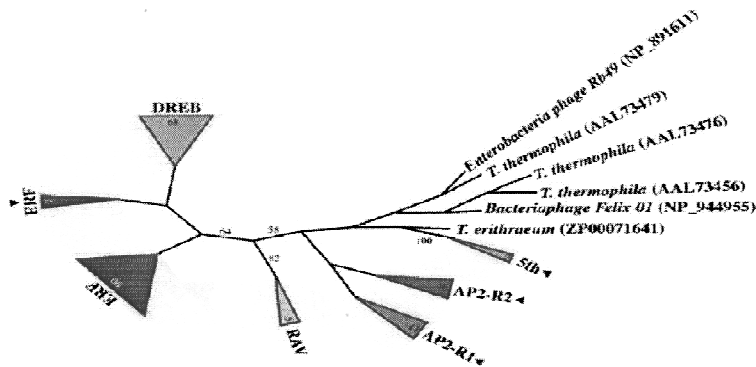


图 1 AP2 基因家族的系统树

Fig. 1 Systemic evolution tree of gene AP2 gene family

## 3 ERF 的功能研究

在单子叶和双子叶植物以及植物以外发现了 AP2 蛋白,这说明它是一个具有重要作用的转录因子。现在已经发现 AP2 家族的成员广泛参与植物生长发育和环境胁迫响应过程<sup>[4]</sup>。

### 3.1 ERF 基因的表达调控模式

ERF 基因表现出广泛的环境调节表达模式。ERF 基因对疾病相关刺激,如乙烯、茉莉酸、水杨酸和致命与弱毒性病原菌等信号都有响应,伤害和非生物因子也能诱导 ERF 基因的表达<sup>[4,10,17-18]</sup>。GbERF1 在乙烯、脱落酸、黄萎病菌、高盐、干旱和冷处理时,其表达量都增加,而水胁迫则能减少 GbERF1 的表达<sup>[13]</sup>。

ERF1 被乙烯和茉莉酸共同调控,并且被单独一个激素所诱导时,需要两种激素完整的信号传导途径,这表明 ERF1 也许是乙烯和茉莉酸途径的一个交汇点<sup>[19]</sup>。Pti 4/5/6 在拟南芥中的超表达,能在没有水杨酸的情况下诱导水杨酸相关基因的表达,这种诱导作用在水杨酸处理后能得到增强<sup>[17]</sup>。

### 3.2 ERF 对目的基因的调控

启动子区域含有 GCC 盒的基因是 ERF 调控的目的基因,这一点已经被广泛证实。但 Pti4 超表达的拟南芥的 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)分析发现,在 50 个表达量增加基因中,大多数的启动子区域都没有 GCC 盒,并且体外染色质免疫沉淀表明,Pti4 能直接或间接地结合到这些启动子上,这表明 Pti4 结合非 GCC 盒存在多种可能的方式<sup>[20]</sup>。我们对转棉花 GbERF1 的烟草分析也有类似的结果,GbERF1 也能调控非 GCC 盒基因表达,如果能发现其它的 ERF 因子也具有相同的功能,那么将会拓宽 ERF 所调控基因的范围,体现 ERF 因子更多的功能。

尽管目前有很多报道证明 ERF 能调控目的基因的表达,Pti4 和 ERF1 在拟南芥中的超表达只能激活一部分启动子中含 GCC 盒的基因<sup>[19,21]</sup>。但对 ERF 这样的大家族基因来说,目的基因可能存在重叠或分工,即若干个 ERF 基因调节一个或某个 ERF 专一调控某些目标基因,但目前对这方面还不清楚。

ERF 基因在超表达的情况下,能增强植株的抗病能力,如 AtERF1 基因的超表达,增强了拟

南芥对灰霉 (*Botrytis cinerea*), 核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*), *Erysiphe orontii* 的抗性(美国专利: 6664446)。烟草 *Tsi1* 基因的超表达, 增强了拟南芥对辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*), 野油菜假单胞菌 (*Xanthomonas campestris*), 辣椒温和斑驳病毒 (PMMV), 黄瓜花叶病毒 (CMV) 的抗性<sup>[10,22]</sup>。超表达棉花 *GbERF1* 的转基因烟草具有对假单胞菌的抗性。

### 3.3 ERF 结构域与功能的联系

AP2 基因家族在经历了基因扩增之后, 在数量上得到了极大的扩展, 然而 AP2 蛋白保守结构域和其他部分的进化速率有明显的差异。从 Myb 和 bHLH 家族的分析表明, 不同的序列保守性, 是结构对功能的约束的反映, 同一个基因在不同的物种中, 越是重要的功能, 结构就越保守<sup>[23]</sup>。在 AP2 中, 结构的保守性局限在一个 60 个氨基酸残基组成的即 AP2 结构域。我们发现,

不同的 ERF 蛋白在这个区域上存在着很高的相似性, 但在整个蛋白序列的水平上的相似性却非常低, *GbERF1* 和 *AtERF1* 在 AP2 结构域和整个序列上的相似性分别为 72% 和 13.2%<sup>[19]</sup>。这体现了这个结构域在 AP2 蛋白功能中的重要性。

我们对功能和调控方式有报道的 ERF 基因的系统树(图 2)分析发现, 这些基因可以明显的分为两类, 这是它们蛋白结构上的不同, 而非功能上的不同。如同样是来自番茄的 *Pti1* 与 Tomato *ERF1* 都能结合 GCC 以外的 DNA 盒, 在转基因植株中的超表达能增强植株抗性<sup>[20,24]</sup>。来自拟南芥的基因都位于一类, 而番茄中的 *Pti4/5/6* 则被分开了。来自水稻的两条 *ERF* 基因分别位于两类中, 这表明单子叶植物和双子叶植物中的 ERF 基因并没有明显的进化上的差异。因为在单子叶和双子叶植物分化之前, AP2/ERF 基因的分化就已经出现了<sup>[11]</sup>。

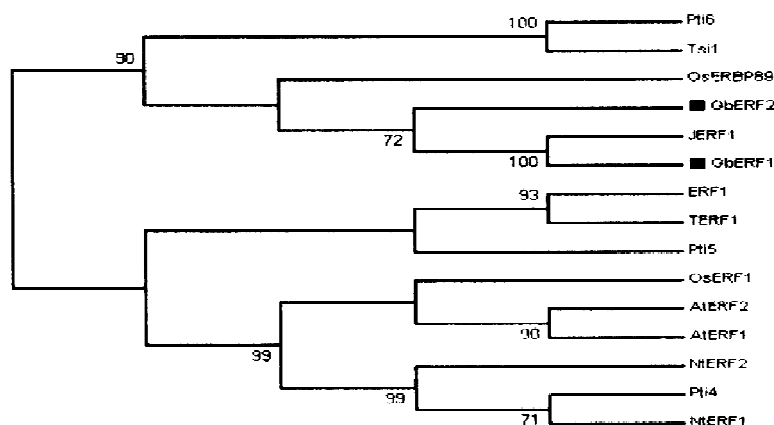


图 2 ERF 亚族部分基因的系统进化树

Fig. 2 Systemic evolution tree of partial genes in ERF subnationality

## 4 展望

由于基因组数据的关系, 目前大多数关于 AP2 的分析都是在拟南芥中进行的。随着其它植物基因组测序的完成, 在更多的植物中开展 AP2 转录因子系统分析, 将会有助于了解 AP2 的全貌和植物的进化过程。发育调控因子的多样化驱动着形态学上的进化, 我们认为适应、环境响应等过程是通过胁迫响应因子结构的多样化或调控

来实现的。一系列参与胁迫响应信号途径的调控因子和它们的 DNA 盒是这种进化过程的物质基础。AP2 就是一个很好的例子。AP2 家族中的 ERF 转录因子在植物抗病防御过程中的作用引起了人们的广泛关注, 随着 ERF 的研究的不断深入以及更多的 ERF 基因分离, 将有助于在更精细的条件下分析 ERF 对在整体上的调控作用, 为今后的实际应用 ERF 基因打下良好的基础。

致谢: 棉花“973”项目首席专家喻树迅在百忙之中对本文审阅并提出宝贵意见, 特此致谢!

### 参考文献:

- [1] EULGEM T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends Plant Science, 2000, 5: 199-206.
- [2] JAKOBY M, Weisshaar B, Droge-Laser W, et al.

- bZIP transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends Plant Science, 2002, 7: 106-111.
- [3] DANIEL X, Lacomme C, Morel J B, et al. A novel *myb* oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death[J]. Plant Journal, 1999, 20: 57-66.
- [4] Riechmann J L, Meyerowitz E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors[J]. Biological Chemistry, 1998, 379: 633-646.
- [5] JOFUKU K D, den Boer B G, Van M M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. Plant Cell, 1994, 6: 1211-1225.
- [6] OHME-TAKAGI M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. Plant Cell, 1995, 7: 173-182.
- [7] SOLANO R, Stepanova A, Chao Q, et al. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1[J]. Genes Development, 1998, 12: 3703-3714.
- [8] 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]. Plant Cell, 2000, 12: 393-404.
- [9] ZHOU J, Tang X, Martin G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes[J]. EMBO Journal, 1997, 16: 3207-3218.
- [10] PARK J M, Park C J, Lee S B, et al. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco [J]. Plant Cell, 2001, 13: 1035-1046.
- [11] GUTTERSON N, Reuber T L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors[J]. Current Opinion Plant Biology, 2004, 7: 465-471.
- [12] 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 Biophysical Research Communications, 2002, 290: 998-1009.
- [13] QIN J, Zhao J Y, Zuo K J, et al. Isolation and characterization of an ERF-like gene from *Gossypium barbadense*[J]. Plant Science, 2004, 167: 1383-1389.
- [14] WUITSCHICK J D, Lindstrom P R, Meyer A E, et al. Homing endonucleases encoded by germ line-limited genes in *Tetrahymena thermophila* have APF-TFLA2 DNA binding domains[J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3: 685-694.
- [15] MAGNANI E, Sjolander K, Hake S. From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants [J]. Plant Cell, 2004, 16: 2265-2277.
- [16] WESSLER S R. Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain [J]. Trends Plant Science, 2005, 10: 54-56.
- [17] 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: 817-831.
- [18] GU Y Q, Yang C, Thara V K, et al. *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase[J]. Plant Cell, 2000, 12: 771-786.
- [19] LORENZO O, Piqueras R, Sanchez-Serrano J J, et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense[J]. Plant Cell, 2003, 15: 165-178.
- [20] CHAKRAVARTHY S, Tuori R P, D'Ascenzo M D, et al. The tomato transcription factor *Pti4* regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements [J]. Plant Cell, 2003, 15: 3033-3050.
- [21] WU K, Tian L, Hollingworth J, et al. Functional analysis of tomato *Pti4* in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2002, 128: 30-37.
- [22] SHIN R, Park J M, An J M, et al. Ecotopic expression of *Tsi1* in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens[J]. Molecular Plant Microbe Interaction, 2002, 15: 983-989.
- [23] ATCHLEY W R, Fitch W M, Bronner-Fraser M. Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors[J]. Proceedings National Academy Sciences, USA, 1994, 91: 11522-11526.
- [24] HUANG Z, Zhang Z, Zhang X, et al. Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes[J]. FEBS Letters, 2004, 573: 110-116. ●