

海岛棉转录因子 *EREB5* 基因的克隆及特征研究

刘 坤, 单国芳, 李付广*, 刘传亮, 张朝军, 张雪妍, 武芝侠

(中国农业科学院棉花研究所 / 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 河南 安阳 455000)

摘要: 近年来, ERF (Ethylene-responsive element binding factor) 家族转录因子已成为植物抗逆、抗病的分子机制和作物分子育种研究的热点。本研究以电子克隆、同源扩增和 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) 技术相结合的方法从海岛棉中分离出了一条新的 ERF 族转录因子基因, 命名为 *EREB5*。该基因包含一个 573 bp 长的开放阅读框, 预期编码 190 aa 长的蛋白质分子。序列分析表明该蛋白除含有一个 ERF 保守域外, 还含有一段核定位信号序列、一段富丝氨酸的激活域、多种磷酸化位点和一个土豆抑制子 I 型家族基序等。构建系统发育树分析表明该因子属于 ERF 亚家族 B3 亚组。瞬时表达实验证明该因子定位于细胞核内, 同时, 凝胶阻滞实验结果说明 *EREB5* 蛋白和 GCC 盒具有较强的结合能力。再者, 荧光定量 PCR 结果表明乙烯和黄萎病菌处理可以诱导该基因的表达。这些结果暗示 *EREB5* 蛋白很可能在黄萎病抗性机制中扮演者重要角色。

关键词: 海岛棉; ERF; 黄萎病; *EREB5*; 基因克隆

中图分类号: Q78: S562 文献标志码: A

文章编号: 1002-7807(2011)03-0205-07

Molecular Cloning and Characterization of *EREB5*, a Novel Transcription Factor Gene of ERF Family from *Gossypium barbadense* L.

LIU Kun, SHAN Guo-fang, LI Fu-guang*, LIU Chuan-liang, ZHANG Chao-jun, ZHANG Xue-yan, WU Zhi-xia

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: In recent years, ERF (Ethylene-responsive element binding factor) family transcription factors have become the research hot spot of crop molecular breeding and molecular mechanisms of resistance or tolerance of plant to bio- or abiotic stresses. In this study, one novel gene, designated as *EREB5*, was firstly isolated from *Gossypium barbadense* treated with *Verticillium dahliae* by cloning in silico, homologous amplification and RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) techniques. The bioinformatics analyses demonstrated that the full-length cDNA contained a 573 bp open reading frame which encoded a deduced protein which included 190 amino acid residues, contained an ERF conserved domain, and belonged to the B3 subgroup of ERF sub-family. It also contained one nucleus localization signal, one serine-riched domain, some sites of phosphorylation and one motif of potato inhibitor I family. Transient expression analysis showed that *EREB5* protein was localized in nucleus, meanwhile, the results of Electrophoretic mobility shift assay revealed that *EREB5* protein had the ability of binding specifically to the GCC-box. Moreover, the results of expression analysis indicated that *EREB5* was able to be induced in *Gossypium barbadense* seedlings, by inoculating with *Verticillium dahliae* or stimulation of ethylene, respectively. These results imply that *EREB5* should play an important role in resistance of *Gossypium barbadense* to *Verticillium* wilt.

Key words: *Gossypium barbadense*; ERF; *Verticillium* wilt; *EREB5*; gene cloning

植物在长期的进化过程中, 已形成一套抵制多种病原微生物入侵的防卫机制。当受到病原体侵染时, 能通过多种信号途径诱导防卫基因的表达,

激发局部或系统的防卫反应。SA (Salicylic acid) 途径主要涉及活体营养型病原菌侵染的过程, JA (Jasmonic acid) 和 ET (Ethylene) 途径主要

收稿日期: 2011-03-21 作者简介: 刘 坤 (1966-), 男, 博士研究生; * 通讯作者, lifug@cricaas.com.cn

基金项目: 国家 863 项目 (2006AA100105)

参与对坏死型病原菌的防卫反应^[4],许多转录因子作为这些信号途径的组成成分而参与防卫反应调控过程,并发挥重要作用^[5]。越来越多的报道表明许多激活型 ERF 类转录因子可以增强植物对相应病原菌的抗性^[6-11],研究发现这些能增强植物抗病性的 ERF 族转录因子多属于 B3/GIX 组^[12],如 AtERF14^[6],TiERF1^[13],Pti4-6^[14-15]等。

棉花黄萎病是由土传病原真菌大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 侵染所致,已成为棉花最为严重的病害之一。但是黄萎病抗性的分子机制还不清楚。为了加强棉花黄萎病抗性分子机制的研究,推动棉花抗黄萎病基因工程育种工作的进展,黄萎病抗性相关基因的克隆及鉴定已成为首先必须做好的工作之一。

本研究利用电子克隆、同源扩增和 RACE 技术相结合的方法从海岛棉 cDNA 中克隆了一条新的 ERF 族 B3 组基因,在对其编码蛋白质的氨基酸序列分析的基础上,对亚细胞定位、和 GCC-box 序列特异性结合的能力、乙烯和黄萎病诱导表达特征进行了实验研究。最后对其可能功能进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料培育、RNA 提取及反转录

温室培养海岛棉 7124 种子,28℃ 下萌发,长至 1 片真叶完全平展时,分别参照 Zhang 等^[16]和朱荷琴等^[17]的方法对棉花幼苗进行乙烯和黄萎病菌孢子液处理。按 0 h,1 h,3 h,6 h,12 h,24 h,48 h 全株取样。采用 CTAB/ 酚法^[18]提取棉花组织总 RNA,并用 PrimeScript[®] RT reagent Kit (TaKaRa 公司)反转录生成 cDNA, -20℃ 储存待用。

1.2 EREB5 基因全长的获得

首先,进行电子克隆。以 ERF 族 B3 亚组转录因子 AtERF13 基因的 DNA 序列为提问序列,在 TIGR 网站,选择陆地棉 EST (Expression sequence tag) 数据库用 Blastn 比对搜索,选择得分最高、长度为 746 bp 单一 EST 序列 DT467806 组成的 Unigene 族。其次,进行同源扩增。以 DT467806 cDNA 序列为模板设计合成引物(南京金斯瑞基因生物科技有限公司):5' 端引物 primer1,5'CCGCTGTCGACCACTTTTCTT3';3'

端引物 primer2,5'TTAATCAGATCCAACCCGCCATTAAT3'。预期扩增片段大小为 741 bp。以黄萎病菌孢子液处理 48 h 的海岛棉 7124 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,克隆测序。第三,进行 RACE 扩增。设计合成巢式引物:5-Gsp1,5'CACCGCCGCTTCTCTTCTAAT3';5-Gsp2,5'CTGAGGAGGGCCAACGTTCAATGG3';3-Gsp1,5'GATAGGCTCAAGTAACGTAGAACC3';3-Gsp2,5'TGCCTGCCGCTACTCATTTCA T3',用 5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 (TaKaRa 公司),按照 protocol 操作,进行 5'/3'-RACE 扩增,克隆测序。最后,比对拼接获得基因全长 cDNA 序列。

1.3 序列分析

将序列提交到 NCBI,利用 ORF finder 在线分析预期蛋白编码框及氨基酸序列;用 Motifscan 分析预期蛋白序列中存在的各种功能基序或信号序列;用 PSORT 分析亚细胞定位可能性;用 Mega4.1 软件进行比对并选择 NJ 法构建系统发育树,分析所属类型。

1.4 亚细胞定位

首先,构建 EREB5-GFP 融合蛋白瞬时表达载体:pCAMBIA2300-GFP-EREB5(图 1);其次,用基因枪 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) 轰击转化洋葱表皮细胞;再次,将轰击过的洋葱表皮置于 MS 培养基上培养 16~24 h;最后,用激光共聚焦荧光显微镜观察和拍照 (Leica Microsystem, Heidelberg, Germany)。

1.5 凝胶阻滞实验

首先,用扩增引物:(正向)5'CGCGAATTCATGTTGACCGATCAGTCTG3';(反向)5'GCGGCCGCCCATTAATAGAGATCAAAT3',PCR 扩增包含编码 AP2/ERF 保守域的 EREB5 基因片段。将扩增片段插入 pGEX-4T-1 载体的 EcoRI/NofI 位点,构建含有 GST 标签序列的原核表达载体:pGEX-4T-1-EREB5;其次,用 pGEX-4T-1-EREB5 载体转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞,并用含有 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside, 0.8 mmol·L⁻¹) 的 LB 培养基,25℃ 下振荡培养 4 h,诱导表达 EREB5-GST 融合蛋白。再次,用 Glutathione Sepharose 4B Microspin column

(Amersham, Arlington Heights, IL, USA) 纯化融合蛋白。最后,按 Choi 等^[10]描述的方法进行 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)。

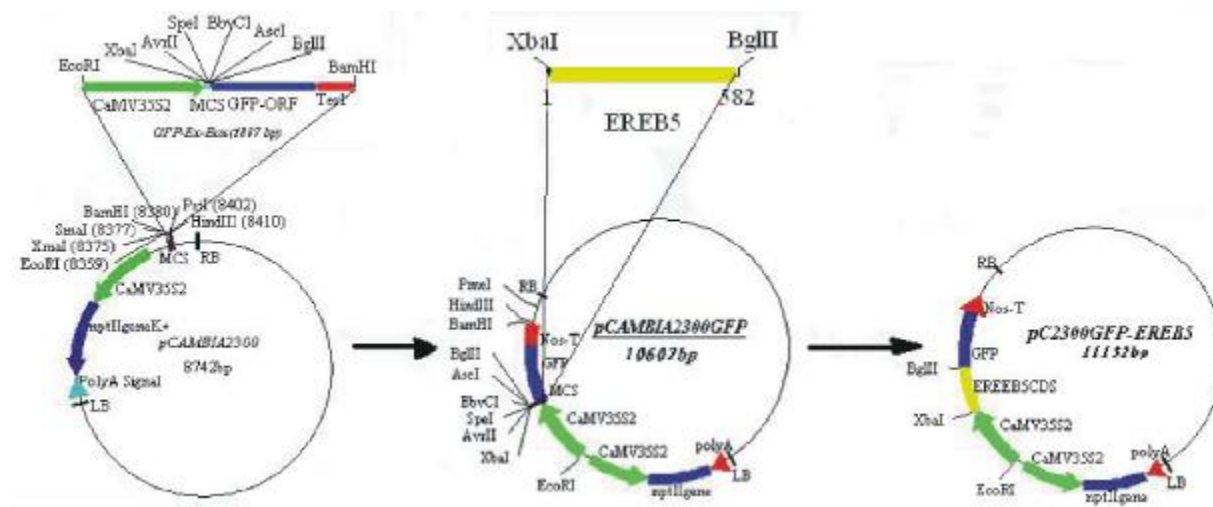


图 1 亚细胞定位瞬时表达载体构建流程图

Fig. 1 Flow chart of construction of transient expression vector for subcellular localizing

1.6 表达分析

设计合成荧光定量 PCR 引物, 5 倍系列稀释模板溶液, 制作标准曲线, 检测引物扩增效率; 选择扩增效率在 95%~105% 之间, 无非特异性扩增的引物对: 5QRTsp2, 5'TCCAGCCTTCTCCGAAATCC3'; 5QRT-ap2, 5'ACCGCCGCTTCCTTCTCT3'; actinIIF-P1, 5'AGAGATTCCGTTGTCCAG AAGT3'; actinIIRP1, 5'GTTGAACCACCACTGA GCAC3'; 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) (Takara 公司) 试剂盒, 取 2 μ L 逆转录产物 (约 50~100 ng cDNA), 建立 20 μ L 反应体系; 每个样品 3 个重复, 0 h 为校准样品, *ActinII* 为内参基因; 使用 ABI7500 (Applied biosystems) 型荧光定量 PCR 仪器, 数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析, 数据为 3 次独立实验结果的平均值及标准误, 用 Microsoft Excel 2003 处理数据并制图。

2 结果与分析

2.1 ERF 族转录因子 *EREB5* 基因的克隆

将电子克隆、同源扩增和 RACE 延伸获得的目的片段克隆测序后, 拼接成 1276 bp 长的 cDNA 序列。用 NCBI 中 ORF finder 工具在线分析, 发现含有一个 573 bp 长的开放阅读框, 预期编码 190 aa 长的蛋白分子 (图 2)。再利用 Blastn 和 Blastp 工具, 在 nucleotide collection(nr/nt)和 Non-

redundant protein sequences(nr)数据库中比对搜索, 没有搜寻到完全匹配的结果(hits), 其结构和功能均未被注释, 确定这是一条新基因。序列分析表明蛋白质序列中含有一个 ERF 保守域, 属于 ERF 家族, 将该基因命名为 *EREB5*。

2.2 *EREB5* 蛋白功能位点分析和同源比对

提交 *EREB5* 氨基酸序列, 用 Motifscan 工具 (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 在线分析, 结果发现序列除含有一个 AP2/ERF 保守域(90~148)(如图 2, 加粗处)外, 还含有一个富含丝氨酸的区域(172~185)(图 2, 下划线处)和 96~111 处的一个富含碱性氨基酸序列, 前者可能是激活作用序列, 后者是一段核定位信号。另外, 序列中含有酰胺化位点 1 个(85~88); cAMP-cGMP 依赖型蛋白激酶磷酸化位点 1 个(164~167); 酪氨酸激酶 II 磷酸化位点 5 个(36~39, 75~78, 123~126, 154~157, 178-181); 肉豆蔻酰化位点 1 个(51~56); 蛋白激酶 C 磷酸化位点 1 个(85~87); 1 个土豆 I 型抑制子家族基序(144~154)。

用 Mega4.1 软件中的 ClustalW 对 *EREB5* 和模式植物拟南芥 ERF 家族所有成员的 ERF 保守域一起比对分析, 利用 NJ 法构建系统发育树(图 3)。由系统发育树可见 *EREB5* 位于 B3/GIX 亚组内。B3/GIX 亚组可以进一步再分为 a、b、c 三个小

```

1      GCGCGCCGCTGTGACCACTTTTCTTAAACAAATTACTAGCTTGCTTGGTTCATTCCCCTAGGTTACTTACGGTTG
76     AATACAAAACATGTTGACCGATCAGTCTGAGAGTAATTCAGTAATATCTGAGGATCTTGCCTTCTTGGACTCCTT
1      M L T D Q S E S N S V I S E D L A F L D S F
151    TAGCCAGCATATTCTGGCTGATGATTCTGAGGCTTCTTTCACCTTGTAGACGACGTCGCTCCTTCGACCGGCA
23     S Q H I L A D D S E A S F T L L D D V V S F D R Q
226    GCCCTTATATGGCGGGGCTACTTCCAGCCTTCTCCGAAAATCCATTGAACGTTGGCCCTCCCTCAGCCTGTGGAAGT
48     P L Y G G A T S S L L R N P L N V G P P Q P V E V
301    GAAGGCAAGTCAATTAGAAGAGGAAGCGCGGTGGGTAGTGGGAAAAGGGTGAATTACAGGGGAGTGAGAAGGAG
73     K A S Q L E E E A A V G S G K R V N Y R G V R R R
376    ACCGTGGGAAAAGTATGCGGGGAGATAAGGGATCCTAAGAAGAATGGGTTGAGGAATTGGCTAGGGACTTACCA
98     P W G K Y A A E I R D P K K N G L R N W L G T Y Q
451    AACGCCGAAGATGCTGCTTTGGCTTATGATAAAGCCGCTTTCAGATTTCGTGGCTCAAAAAGCTAAAGCTCAATTT
123    T P E D A A L A Y D K A A F K I R G S K A L N F
526    CCCTCACTTGATAGGCTCAAGTAAACGTAGAACCCTTAGAGTGGGTCCAAGGCGTCGCTCACCCCTCTTAAATC
148    P H L I G S S N V E P V R V G P R R R S P P L K S
601    GTCTTCTTCGCTTTTTCCATAGTGGATAGCAGCAGCTCCACTATGCCGAAGCCATAATAAATGAAAAGTCAAAT
173    S S S S F S I V D S S S S S T M P K P
676    AGTTAATGGTTGGTGCCTGCGCTACTCATTTCATTTGATCTCTATTAATGGCGTGTGGATCTGATTAATTAG
751    CTTTACCTTTCAACGCTTGAATCTGATTAAGCGATCCATCGAGTTTTAGGTCGAAGAAAAGAAATTCTAAAAT
826    AAGGAATAATAGCACAAGTGGCCTTTGTATTTTAGATTTAGTACTAATATGGTACCTATACTGTCAAATGTGAAC
901    ATTCGTTCCGTTTATTAATGTGATAAAGGTTCAAATTTGGAAGCTGATGTTCAAGATTGGTTAAAGTGCTAGAACT
976    GGGGATCTGGAATTGGAGTTGAAGCTACTGGGTTTTGAGGGAAGCAAGCACCTGTAATAAATTTGTTCTGTCTCT
1051   CATGGTCTGCCATGGATTCTGTTTTATGTCAGAGAAAATGTTGTCAGCTCTACTAGAACTTAACCCCTTTTT
1126   AGGAAAAAATCTAGGGTGGTGTGATATTGATATATATATATGTAAGTTTCAGGGTTCTGTGTCTCTCTCTCG
1201   TGCTGAATGTATGAATATATCAGTTGATAAAGTAAAATAAATTATAAATATGTATATTGGCAATAAAAAAAAAA
1276   A

```

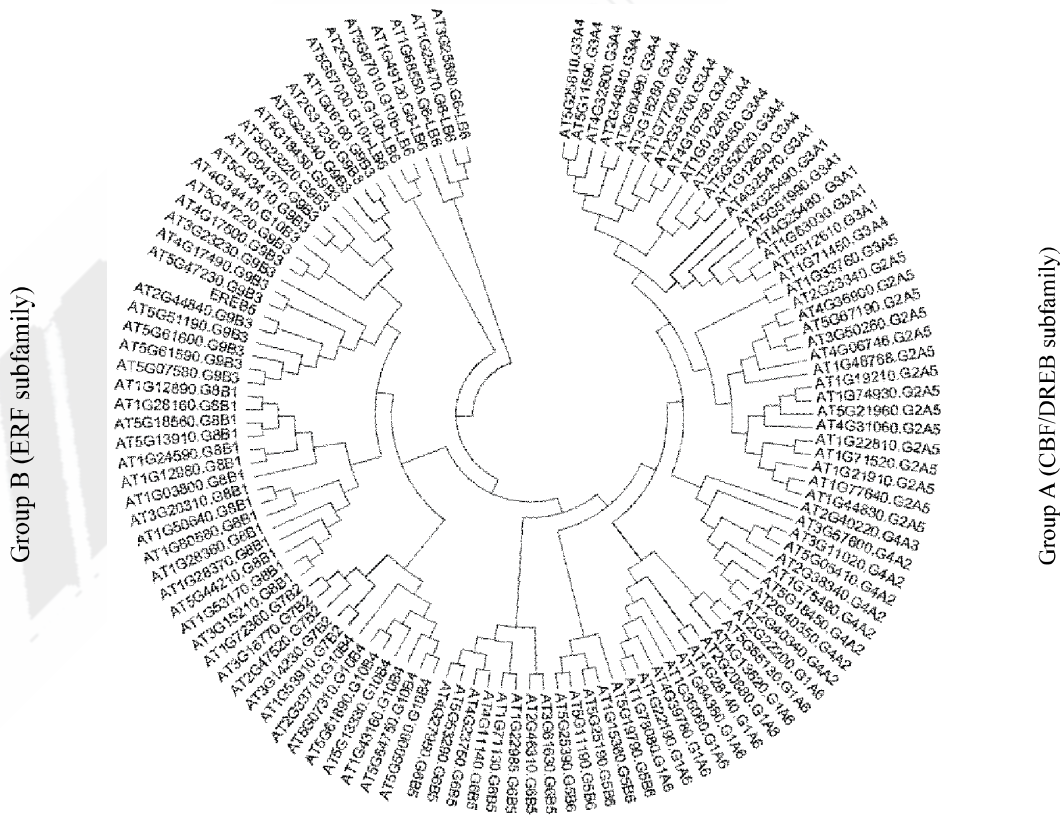
注:加粗处为ERF保守域;下划线处为富含丝氨酸位点。

Notes: Bold letters indicate conservative ERF domain; Serine-riched domain is underlined.

图2 EREB5基因的核苷酸及其编码的氨基酸序列

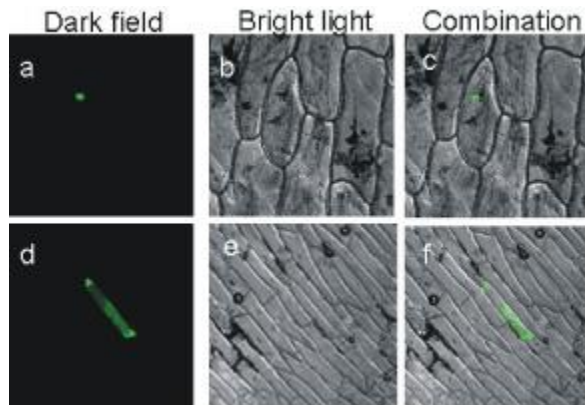
Fig. 2 The nucleotide sequence of EREB5 gene and its deduced aa sequence

组^[12]。而EREB5和拟南芥的At2g44840 (AtERF 13)、At4g17500 (AtERF1)、At5g47220 (AtERF2) 同属于a小组,其中和AtERF13同源性最高。



2.3 *EREB5* 蛋白核定位分析

序列分析结果表明 *EREB5* 氨基酸序列中含有一段核定位信号序列, 用在线工具 PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 进一步分析, 结果表明该因子定位于核的确定性值高达 0.96。为了进一步证实核定位特性和分析结果的正确性, 进行了瞬时表达实验, 结果 (图 4) 可见, 对照 pCAMBIA2300-GFP 转化的洋葱表皮细胞中 (d, e, f) 绿色荧光蛋白分布于全细胞, 包括细胞质、细胞核和细胞膜等, 但是, 在 pCAMBIA2300-GFP-*EREB5* 载体转化洋葱表皮细胞中, 融合蛋白只在核内积累 (a, b, c), 这一结果表明 *EREB5* 定位于核内。



注: a, b, c: pCAMBIA2300-GFP-*EREB5* 载体转化的洋葱表皮细胞; d, e, f: pCAMBIA2300-GFP 载体转化的洋葱表皮细胞; a, d: 荧光图像; b, e: 可见光图像; c, f: 重叠图像。

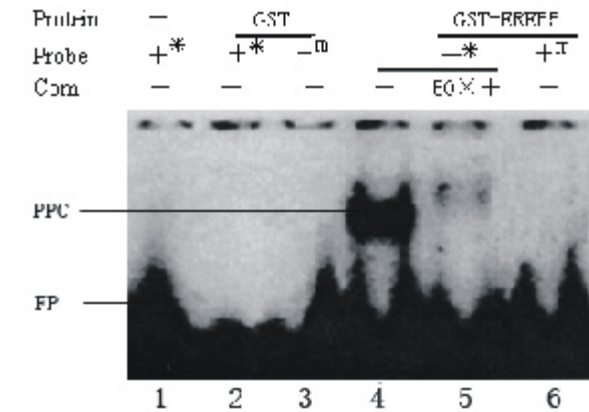
Notes: a, b, c: Onion epidermal cells transformed with pCAMBIA2300-GFP-*EREB5*; d, e, f: Onion epidermal cells transformed with pCAMBIA2300-GFP; a, d: Fluorescence images; b, e: Bright-field images; c, f: Corresponding overlaid images.

图 4 在洋葱表皮细胞中 *EREB5* 蛋白的亚细胞定位
Fig. 4 Subcellular localization of *EREB5* in onion epidermal cells

2.4 *EREB5* 蛋白与 GCC 盒元件亲和性分析

EMSA 实验结果 (图 5): 泳道 4 中正常探针和融合蛋白结合成复合物, 移动较慢; 泳道 5 中加入无标记正常探针作为竞争物时, 标记正常探针和融合蛋白结合形成的复合物明显减少; 泳道 6 中没有滞后物发现, 说明标记突变探针和融合蛋白不能结合形成复合物; 对照 (泳道 1, 2, 3) 也未见滞后复合物存在, 表明 GST 既不能和正常探

针结合, 也不能和突变探针结合; 这些结果表明 *EREB5* 蛋白具有和正常 GCC-box 序列特异结合的能力。



注: A: 2×GCC- 和 2×mGCC- 盒核苷酸序列 (m: 突变的), 下划线为核心序列; 在 B 中, +*: 标记正常探针; +^m: 标记突变探针; +: 无标记正常探针; GST: GST 蛋白; GST-*EREB5*: GST 和 *EREB5* 融合蛋白; -: 没有加入相应的成分; 1~6: 不同的泳道; Com: 竞争物; PPC: 探针和蛋白复合物; FP: 自由探针。

Notes: A: The nucleotide sequences of 2×GCC- and 2×mGCC-box (m: mutated), and the underlined are the core sequences of GCC- and mGCC-box; In part B, +*: Labeled-normal-probes; +^m: Labeled-mutated-probes; +: Unlabeled-normal-probes; GST: GST protein; GST-*EREB5*: The fusion protein of GST with *EREB5*; -: The corresponding components were not added; 1~6: Different lanes; Com: Competition; PPC: Protein-probe complexes; FP: Free probes.

图 5 *EREB5* 蛋白和 GCC-box 的特异结合活性

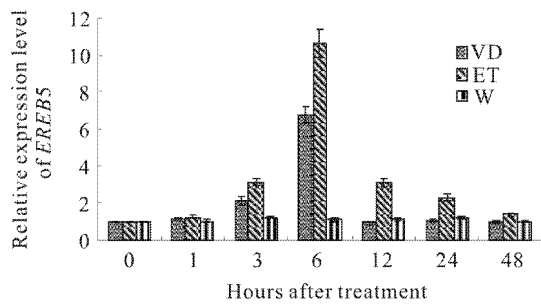
Fig. 5 The sequence-specific binding activity of the *EREB5* protein with GCC-box

2.5 *EREB5* 基因的诱导表达水平分析

用乙烯和黄萎病菌孢子液分别处理后按一定的时间间隔取样, 提取总 RNA 进行荧光定量 PCR 分析, 结果表明, 在乙烯诱导 3 h 后该基因的表达量开始明显增加, 6 h 后达到高峰。在黄萎病菌胁迫 3 h 后该基因表达量略有增加, 6 h 达到高峰, 之后表达量又明显降低至接种前。但该基因在接水对照的所有时间点表达量均未发生明显变化 (图 6)。

3 结论和讨论

利用生物信息学工具对 *EREB5* 蛋白氨基酸序列分析表明含有一个 AP2/ERF 保守域和 1 段核



注: VD:大丽轮枝菌; ET:乙烯; W:水。

Notes: VD: *Verticillium dahliae*; ET: ethylene; W: Water.

图6 乙烯或黄萎病菌处理时 *EREBS* 基因的相对表达水平分析

Fig. 6 Relative expression level analysis of *EREBS* in response to VD or ET

定位信号。通过实验确认 *EREBS* 定位于细胞核内, 并且能够与顺式元件 GCC 盒结合。表明 *EREBS* 具有 ERF 族转录因子典型特征, 进一步比对分析说明, 它是海岛棉 ERF 家族转录因子的一个新成员。

ERF 是一个植物界特有的转录因子大家族, 包括许多成员。根据目前报道, 拟南芥有 122 个^[2], 大豆有 120 个^[20], 水稻有 139 个^[21], 陆地棉有 148 个^[21]。根据 ERF 保守域的不同, 把拟南芥中该基因家族成员分为 ERF 和 CBF/DREB 两个亚家族, 即 B 组(Group B)和 A 组(Group A), 两组又各分为 6 个亚组(Subgroup), 即 B1、B2、B3、B4、B5、B6 和 A1、A2、A3、A4、A5、A6^[22], 或者直接分为 12 组(Group), 即: G I、G II、G III、G IV、G V、G VI、G VII、G VIII、G IX、G X、G XI、G XII^[12]。进一步的研究表明: 不同植物种类中 ERF 族转录因子的分类基本上是一致的^[12,22-23]。被充分研究过的一些具有增强植物抗病能力的激活型 ERF 族转录因子, 如 AtERF14、Pti4 和 TiERF1 等属于 G IX/B3 组。研究表明 *EREBS* 和 G IX 或 B3 亚组成员亲缘关系较近, 同源性较高, 属于同一小组, 即 B3a。

一些病程相关蛋白(Pathogenesis-related protein, PR) 如几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖苷酶等基因的启动子中含有 GCC-box 序列, ERF 族转录因子能通过和该顺式元件的结合高调 PR 基因的表达水平, 从而提高抗病能力^[23]。含有富丝氨酸激活域的 *EREBS* 因子能够与 GCC 盒结合, 说明应该能够激活该类 PR 基因的表达, 提高植株抗病

能力。

植物受到病原菌侵染后, 蛋白酶抑制剂在植物体内富集, 通过抑制病原菌的蛋白水解酶活性, 增强对病原菌的抗性作用。据报道, 番茄和土豆的丝氨酸蛋白酶抑制剂 I、II 都具有上述特征^[24-25]。王雪等^[26]通过蛋白质组学分析发现, 黄萎病处理可以诱导丝氨酸蛋白酶抑制剂同源蛋白的表达, 丝氨酸蛋白酶抑制剂属于土豆抑制剂 I 家族。说明蛋白酶抑制剂可能与棉花抗黄萎病机制有关。分析表明 *EREBS* 蛋白序列中含有一个土豆 I 型抑制子家族基序, 可能具有蛋白酶抑制剂类似的活性, 据此推断可能与黄萎病的防卫反应相关。本研究实验结果也表明, 黄萎病菌处理下 *EREBS* 基因表达水平升高。由此推断 *EREBS* 可能是棉花黄萎病抗病反应体系中的一个重要组分。

此外, 盐胁迫也可以提高 *EREBS* 基因的表达水平(数据未发表)。据报道 CE1 元件是介导防卫反应和非生物胁迫反应的重要因子^[27], 而 AtERF13 能够和 CE1 元件结合, 提高对 ABA 敏感性, 从而表现出介导抗病和抗逆过程的重要功能。而 *EREBS* 和 AtERF13 同源性最高, *EREBS* 很可能也具有相似的功能, 这一推断还有待于进一步的实验验证。

参考文献:

- [1] THOMMA B P, Eggermont K, Penninckx I A, et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(25): 15107-15111.
- [2] GLAZEBROOK J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens[J]. Annu Rev Phytopathol, 2005, 43: 205-227.
- [3] LOUISE F T, Jonathan P A, Karam B S. Plant defense responses: What have we learnt from *Arabidopsis*?[J]. Functional Plant Biology, 2005, 32(1): 1-19.
- [4] LORENZO O, Solano R. Molecular players regulating the Jasmonate signalling network[J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8(5): 532-540.
- [5] SINGH K B, Foley R C, Oñate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. Curr Opin Plant Biol, 2002, 5(5): 430-436.

- [6] OÑATE-SÁNCHEZ L, Jonathan P A, Jodi Y, et al. AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(1): 400-409.
- [7] PARK J M, Park C J, Lee S B, et al. Overexpression of the tobacco *Tsil* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(5): 1035-1046.
- [8] BERROCAL-LOBO M, Molina A, Solano R. Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi[J]. *The Plant Journal*, 2002, 29(1): 23-32.
- [9] GU Yong-qiang, Wildermuth M C, Chakravarthy S, et al. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14: 817-831.
- [10] ZHANG Hong-bo, Zhang Da-bing, Chen Jia, et al. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55: 825-834.
- [11] CAO Yi-fei, Wu Ye-fei, Zheng Zhong, et al. Over-expression of the rice EREBP-like gene *OsBIERF3* enhances disease resistance and salt tolerance in transgenic tobacco[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2006, 67(3-5): 202-211.
- [12] NAKANO T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140: 411-432.
- [13] CHEN Liang, Zhang Zeng-yan, Liang Hong-xia, et al. Overexpression of *TiERF1* enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(15): 4195-4204.
- [14] THARA V K, Tang Xiao-yan, Gu Yong-qiang, et al. *Pseudomonas syringae* pv tomato induces the expression of tomato EREBP-like genes *pt4* and *pt5* independent of ethylene, salicylate and jasmonate[J]. *Plant J*, 1999, 20(4): 475-83.
- [15] WU Ke-qiang, Tian Li-ning, Hollingworth Jamie, et al. Functional analysis of tomato Pti4 in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 128: 30-37.
- [16] ZHANG Gai-yun, Chen Ming, Chen Xue-ping, et al. Isolation and characterization of a novel EAR-motif-containing gene *GmERF4* from soybean (*Glycine max* L.)[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 2: 809-818.
- [17] 朱荷琴, 宋晓轩, 孙君灵. 棉花黄萎病菌安阳菌系致病类型变异研究[J]. *棉花学报*, 1999, 11(6): 312-317.
- ZHU He-qin, Song Xiao-xuan, Sun Jun-ling. Study on Pathogenic type in Anyang strains of *Verticillium dahliae* Kleb [J]. *Acta Gossypii Sinica*, 1999, 11(6): 312-317.
- [18] 蒋建雄, 张天真. 利用 CTAB/ 酸酚法提取棉花组织总 RNA [J]. *棉花学报*, 2003, 15(3): 166-167.
- JIANG Jian-xiong, Zhang Tian-zhen. Extraction of total RNA in cotton tissues with CTAB/acidic phenolic method[J]. *Cotton Science*, 2003, 15(3): 166-167.
- [19] CHOI M S, Kim M C, Yoo J H, et al. Isolation of a Calmodulin binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 40820-40831.
- [20] ZHANG Gai-yun, Chen Ming, Chen Xue-ping, et al. Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(15): 4095-4107.
- [21] ANTONY C, Eugenie H, Benoit P, et al. Molecular diversity and gene expression of cotton ERF Transcription factors reveal that group IX members are responsive to jasmonate, ethylene and *Xanthomonas* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(4): 471-485.
- [22] SAKUMA Y, Liu Qiang, 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 and Biophysical Research Communications*, 2002, 290: 998-1009.
- [23] ZHOU Jian-min, Tang Xiao-yan, 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]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(11): 3207-3218.
- [24] GRAHAM J S, Pearce G, Merryweather J, et al. Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves I. The cDNA-deduced primary structure of preinhibitor I and its post-translation processing[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260: 6555-6560.
- [25] SÁNCHEZ-SERRANO J, Schmidt R, Schell J, et al. Nucleotide sequence of a proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato and its mode of expression[J]. *Molecular General Genetics*, 1986, 203: 15-20.
- [26] 王雪, 马骏, 张桂寅, 等. 黄萎病菌胁迫条件下棉花叶片的蛋白质组分析[J]. *棉花学报*, 2007, 19(4): 273-278.
- WANG Xue, Ma Jun, Zhang Gui-yin, et al. Proteomic analysis of cotton leaf under *Verticillium dahliae* stress [J]. *Cotton Science*, 2007, 19(4): 273-278.
- [27] LEE S J, PARK J H, LEE M H, et al. Isolation and functional characterization of CE1 binding proteins[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 277-289. ●