

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00803

小麦 ERF 转录因子 W17 互作蛋白的筛选和解析

邱志刚 徐兆师* 郑天慧 李连城 陈明 马有志

中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基金资源和基因改良国家重大科学工程 / 农业部作物遗传改良与育种重点开放实验室, 北京 100081

摘要: 来自小麦的 ERF 转录因子 W17 基因参与胁迫应答, 过表达 W17 可显著提高转基因拟南芥的抗旱性和抗病性。本研究构建了小麦 cDNA 文库, 通过酵母双杂技术筛选 W17 的互作蛋白, 进一步解析 ERF 蛋白的作用机制。将 pGBKT7-W17 质粒、pGADT7 和小麦文库混合转入酵母细胞 AH109, 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 营养缺陷型平板上培养, 挑选直径大于 2 mm 的克隆, 在 SD/Raf/Gal/X-gal 平板上划线培养, 筛选蓝色克隆。将筛出的克隆测序、BLAST 分析, 得到 4 类与 W17 相互作用的候选蛋白, 分别是胁迫相关功能蛋白、翻译后修饰蛋白、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)大亚基/小亚基以及功能未知蛋白。互作验证表明, HSP90 和 PPR 蛋白与 W17 有相互作用关系。这些候选蛋白参与信号转导或免疫过程, 暗示 W17 在植物的逆境信号转导、下游基因转录调控, 甚至在翻译过程都有重要作用。

关键词: 酵母双杂交系统; ERF; 蛋白互作; 信号转导; 小麦

Screening and Identification of Proteins Interacting with ERF Transcription Factor W17 in Wheat

QIU Zhi-Gang, XU Zhao-Shi*, ZHENG Tian-Hui, LI Lian-Cheng, CHEN Ming, and MA You-Zhi

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China

Abstract: Ethylene responsive factors (ERFs) regulate a variety of biotic- and abiotic-stress responses. Transcription factor W17 is an ERF isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.), which participates in stress responses. To provide data for exploring the functional mechanism of ERF proteins, we constructed a wheat cDNA library and screened proteins interacting with W17 by yeast two-hybrid system. The mixture of recombinant plasmid pGBKT7-W17, pGADT7, and wheat cDNA library was introduced into yeast cell AH109. Transformed cells were incubated on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade plate for 3–5 d at 30 °C before selection of clones with diameter larger than 2 mm, and further incubated on SD/Raf/Gal/X-gal for screening blue clones. Four types of proteins that interacted with W17 were obtained, namely stress-related functional protein, post-translational modification protein, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and unknown protein. The protein-protein interaction was retested using the co-transformation yeast system of pGBKT7-W17 and candidates of interaction protein carried by pGADT7. The result showed that HSP90 and PPR proteins interacted with W17 in vivo. Most of candidate proteins involved in signal transduction and immune process, such as Tir cytoskeleton coupling protein (TCCP), 26S proteasome subunit, RNA binding protein, WD40, PPR, HSP90, and cysteine proteinase inhibitor. This result suggests that W17 possibly plays significant roles in stress signal transduction, transcription regulation of downstream genes, and translation process in stress environments.

Keywords: Yeast two-hybrid system; Ethylene responsive factor (ERF); Protein interaction; Signal transduction; Common wheat

各种植物病虫害等生物逆境以及干旱、高盐等非生物逆境严重影响作物的生长和产量。研究植物对逆境信号的感知、传递以及适应性响应的分子机制, 对于阐明植物适应逆境机制, 提高作物抗性有

本研究由国家自然科学基金项目(30700504)和国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-083B 和 2009ZX08002-008B)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 徐兆师, E-mail: xuzhaoshi@yahoo.com.cn

Received(收稿日期): 2010-10-25; Accepted(接受日期): 2011-03-08.

着重要的意义^[1]。

植物在长期进化过程中形成了一套复杂而精细的信号传递网络,能对外界胁迫信号产生一系列应答响应,诱导抗逆相关基因的表达,保护细胞正常的生命活动。其中,转录因子(transcription factor, TF)对信号传递和基因的表达调控起非常重要的作用。植物体内存在大量的转录因子,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有5.9%的基因编码转录因子,根据DNA结构域的特点将转录因子分成若干个家族,如WRKY、AP2/EREBP、MYB和bZIP。AP2/EREBP家族是植物中分布最为广泛且研究比较深入的一类转录因子,包括AP2、RAV、DREB、ERF和AL079349 5个亚族^[2]。ERF转录因子是AP2/EREBP家族中最大的一个亚族^[3],参与GCC-box和DRE/CRT顺式元件的调控,介导植物生物和非生物两条胁迫信号传递途径,在胁迫相关基因的表达调控中起重要作用^[4]。例如,烟草的Tsi1和辣椒的CaPF1蛋白能够结合GCC-box和DRE/CRT元件,诱导PR基因(*PR1*、*PR2*、*PR3*、*osmotin*、*SAR8.2*)和RD/COR基因(*COR47*、*COR6.6*、*COR78/RD29*)的表达,从而提高植株的抗性^[5-6]。

ERF基因在提高植物抗病性和非生物胁迫抗性上发挥着重要作用^[4]。据报道,烟草Tsi1基因的超表达提高了辣椒对细菌和病毒的抗性^[7];转大麦HvRAF基因的拟南芥植株增强了对青枯病的抗病力^[8];大豆GmERF057基因提高了转基因烟草对细菌、盐和干旱的抗性^[9];JERF1和JERF3基因提高了转基因烟草的抗盐、抗旱和抗寒性^[10-11];将辣椒的CaPF1基因转到弗吉尼亚松(*Pinus virginiana* Mill.)中,提高了转基因树木对重金属、高温和病原菌等多种抗性,而且明显增加了植株生长高度^[12];转小麦TaERF1基因的拟南芥提高了对低温、干旱、高盐以及灰霉病(*Botrytis cinerea*)的抵抗力,转TaERF1基因的烟草增加了植株的抗盐性和对野火病(*Pseudomonas syringae*)的抗病性^[13]。

解析逆境胁迫信号调控网络已经成为当前植物逆境应答反应分子机制研究的热点。过去几年,对ERF基因的研究主要集中在可能介导的信号传递途径、对下游基因的转录调控和功能上,而对ERF蛋白的作用模式,包括与其他蛋白的互作机制研究甚少。转录因子的活性受许多因素的影响,如转译后修饰以及与其他蛋白之间的相互作用。例如,拟南芥细胞核提取物能增强拟南芥GBF1转录因子的

DNA结合能力^[14]。因此,研究转录因子的互作蛋白及其功能,对于研究转录因子的作用机制和抗逆相关基因的调控具有重要的意义。

小麦是我国的重要粮食作物,生物和非生物胁迫严重影响着小麦的产量和品质。我们从小麦中克隆了一个ERF基因W17,受干旱、脱落酸(ABA)和乙烯等诱导,可显著提高转基因拟南芥的抗旱性和抗病性^[13];W17蛋白具有核定位功能,可通过自身的NLS进入核内行使功能^[15]。为了进一步研究W17的作用机制,本文采用酵母双杂交技术,以W17作为“诱饵”蛋白,从小麦cDNA文库中筛选互作蛋白,为进一步解析ERF蛋白的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及cDNA文库构建

将普通小麦(*Triticum aestivum* L.)品种小白麦播种在苗床上,20~24℃生长10 d左右,从土壤中取出,用蒸馏水冲洗干净,放在滤纸上干旱处理2 h,取叶片立即放入液氮中,并保存在-80℃条件下准备提取RNA。

采用Trizol法(TianGen,北京)提取小麦叶片总RNA,第一链cDNA合成用反转录酶XL(AMV)(TaKaRa,大连)。采用SMART法(BD)合成ds cDNA,取2 μL cDNA在100 μL体系中进行LD-PCR扩增,循环数为24,延伸时间为6 min。扩增结束后取PCR产物5 μL在1.0%琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2 诱饵载体的构建及自激活检测

根据W17基因的序列及pGBKT7(Clontech,美国)的克隆位点,在基因的两端分别引入EcoR I和BamH I(Promega,美国)酶切位点。酶切、连接(T4连接酶,Promega,美国)到质粒pGBKT7。测序验证融合质粒pGBKT7-W17克隆正确。

将pGBKT7-W17、空pGBKT7以及阴性对照分别与pGADT7共同转入酵母菌株AH109中,SD/-Trp/-Leu(Sigma,德国)和SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(Sigma,德国)平板筛选培养,验证pGBKT7-W17是否具有自激活活性。

1.3 酵母感受态的制备、诱饵质粒及文库质粒的转化

采用酵母双杂交系统(Clontech,美国),按说明书(MATCHMAK2 ER pLexA Two-Hybrid User Manual和Yeast Protocols Handbook)方法制备AH109感受态细胞,将pGBKT7-W17质粒、pGADT7和小

麦文库混合转入酵母细胞 AH109。

1.4 酵母双杂交筛选阳性克隆

诱饵载体 BD 质粒 pGBKT7 带有 Trp 筛选标记, AD 质粒 pGADT7 带有 Leu 筛选标记。将 pGBKT7-W17、pGADT7 和文库质粒混合转化 AH109, 涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 营养缺陷型平板, 30℃ 培养 3~5 d, 用牙签挑取直径大于 2 mm 的阳性克隆, 然后在 SD/Raf/Gal/X-gal (Sigma, 德国) 平板上画线培养, 筛选蓝色克隆。

1.5 候选克隆 PCR 检测、测序及分析

将筛选出的阳性酵母菌落进行 PCR 检测。PCR 条件为 94 预变性 3 min; 94 30 s, 68 3 min, 30 个循环; 68 3 min。PCR 引物序列分别为 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAAC-3' 和 5'-GTGAAGCTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTAC-3'。用插入片段大于 500 bp 的克隆提取质粒(TianGen, 北京), 转化到大肠杆菌 DH5 α (TransGen, 北京), 送 SunBiotech 公司(北京)测序, 通过检索 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和利用 DNAMAN 软件(Lynnon Biosoft, 美国)进行多重序列比较和同源性分析。

1.6 酵母双杂交互作验证

按前述方法制备酵母 AH109 感受态细胞。采用共转化方法将 pGBKT7-W17 以及连有可能互作基因的 pGBKT7-W17pGADT7 质粒转化入酵母细胞中。将转化后的酵母划线于 SD/-Trp/-Leu 平板上。若酵母菌株在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长则证明诱饵载体和可能的互作质粒载体均已转入酵母菌株 AH109 中。挑取 SD/-Trp/-Leu 平板上生长的单克隆菌株于 1 mL YPDA 液体培养基中。在 30℃ 下振荡培养 2 d 后, 吸取 1 μ L 酵母菌液点到 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 平板上。将平板置于 30℃ 培养 3~4 d 后长出蓝色菌落组合为互作阳性结果。

2 结果与分析

2.1 cDNA 文库的构建

所提取的小麦总 RNA 经紫外分光光度计分析, $A_{260}/A_{280}=1.85$ 。1% 琼脂糖凝胶电泳可见 28S 和 18S 的清晰 RNA 条带, 而且 28S RNA 是 18S RNA 的 2 倍左右(图 1), 表明获得的总 RNA 纯度及浓度较高, 可以满足后续实验的需要。

用 3 μ L 总 RNA 为模板合成 cDNA, 取 2 μ L cDNA 进行 LD-PCR 扩增 ds cDNA。合成的 ds cDNA

质量较好, 主要集中在 250~2 000 bp 之间(图 2), 可以用于 cDNA 文库的构建。

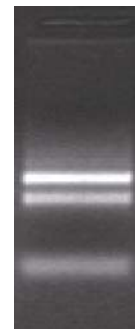


图 1 小麦总 RNA 电泳

Fig. 1 Gel electrophoretic result of total RNA from wheat

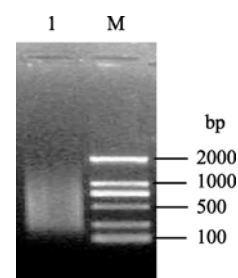


图 2 小麦双链 cDNA 凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoretic result of double-stranded cDNA from wheat

1: ds cDNA; M: DL2000 marker.

2.2 诱饵载体的构建及自激活检测

将 W17 基因全长克隆到诱饵载体 pGBKT7 中, 得到重组质粒 pGBKT7-W17。经酶切(图 3)并测序鉴定, W17 基因已成功插入质粒 pGBKT7 中。为检测重组质粒是否具有自激活活性, 将 pGBKT7-W17、空 pGBKT7 以及阴性对照分别与 pGADT7 共同转入酵母菌株 AH109 中, SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板筛选培养 2~3 d (图 4), 除阴性对照外, 在 SD/-Trp/-Leu 平板上都能长出菌落, 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上都没有长出菌落, 说明 pGBKT7-W17 没有自激活活性, 可以在营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板筛选培养上用酵母双杂交系统筛选小麦 cDNA 文库。

2.3 W17 互作蛋白的筛选

将“诱饵”质粒 pGBK-W17、文库质粒 pGADT7 混合转化 AH109, 涂布于营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板, 30℃ 培养 3~5 d, 选择直径大于 2 mm 的菌落, 共得到 160 个候选克隆(图 5-A)。牙签挑取候选克隆, 在 SD/Raf/Gal/X-gal 平板上画

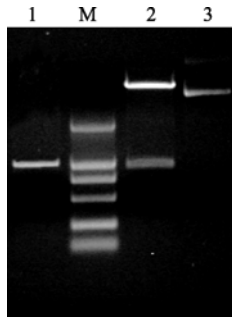


图 3 质粒 pGBKT7-W17 双酶切及 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pGBKT7-W17 by *EcoR* I/*Bam* H I double digestion and PCR analysis

M: DL2000 marker; 1: PCR 扩增结果; 2: *EcoR* I/*Bam* H I 双酶切鉴定; 3: 重组质粒 pGBKT7-W17。

M: DL2000; 1: PCR amplification result; 2: identification by *EcoR* I/*Bam* H I; 3: recombined plasmid pGBKT7-W17.

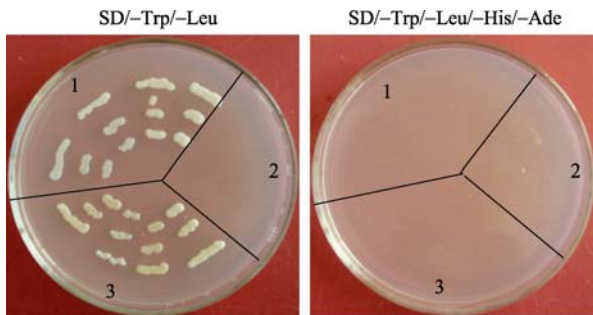


图 4 pGBKT7-W17 的自激活验证

Fig. 4 Validation of pGBKT7-W17 for auto-activation

1: pGADT7+pGBKT7-W17; 2: H₂O+pGADT7; 3: pGADT7+pGBKT7.

线培养, 大约 1/5 的阳性克隆显蓝色(图 5-B)。

2.4 候选基因的克隆及序列分析

将显蓝的克隆进行 PCR 检测, 检测结果显示插入片段多数大小不一, 但是大多数集中在 500~2 000 bp (图 6), 说明 cDNA 文库的质量较好。克隆 10 和克隆 11 有 2 条 PCR 扩增带, 可能有 2 个质粒被转到酵母细胞, 需要进一步鉴定。

将扩增带大于 500 bp 的酵母质粒转化大肠杆菌 DH5 α 进行测序, 测序结果提交到 GenBank 进行

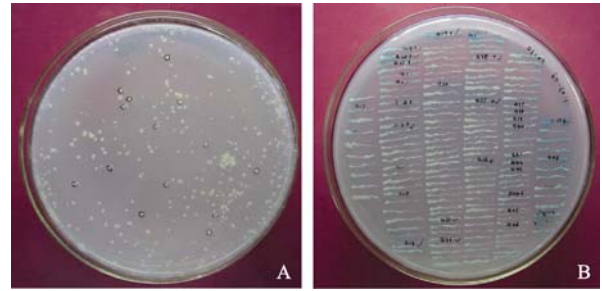


图 5 W17 互作蛋白筛选

Fig. 5 Screening proteins interacting with W17

A: 筛库得到的克隆; B: 在 SD/Raf/Gal/X-gal 上划线筛选筛选阳性克隆。

A: clones identified by screening cDNA library; B: the positive clones were tested on SD/Raf/Gal/X-gal plates.

BLAST 分析。结果表明, 克隆到的基因主要分为胁迫相关功能基因、翻译后修饰蛋白、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)大亚基/小亚基以及功能未知蛋白 4 类。部分测序结果及其可能的功能见表 1。

2.5 蛋白的互作验证

将诱饵和候选蛋白的质粒转化酵母细胞, 在营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu 平板上划线培养, 挑取单菌落摇菌, 吸取 1 μ L 点至 SD/-Trp/-Leu 平板上。酵母在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长证明互作组合蛋白均转化入酵母细胞中。再吸取 1 μ L 菌液点在营养缺陷型 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 平板上培养, 结果显示 HSP90 和 PPR 的菌落能正常生长且菌落显蓝色(图 7)。这一结果初步证实 HSP90 和 PPR 蛋白与 W17 发生了相互作用。

3 讨论

酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system)快速、直接分析已知蛋白之间的相互作用及分离新的与已知蛋白作用的配体及其编码基因。酵母双杂交系统虽然仍有一定的局限性, 如要求蛋白间的相互作用定位于细胞核内; 同时该系统不适用某些需经过翻

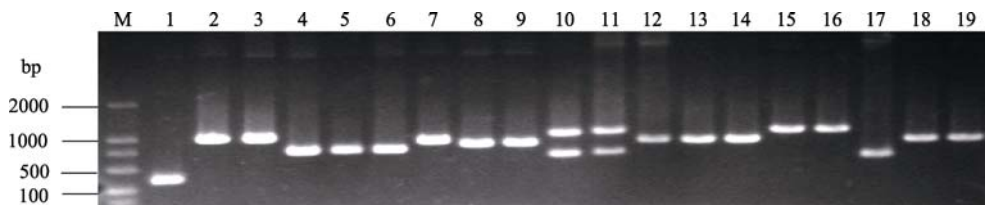


图 6 酵母克隆的 PCR 检测

Fig. 6 PCR identification of yeast clones

M: DL2000 marker; 1~19: 酵母克隆。M: DL2000 marker; 1~19: yeast clones.

表 1 部分测序结果及 Blast 分析推测的功能
Table 1 Part of sequencing results and predicted functions by Blast analysis

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession No.	功能 Function
胁迫相关功能基因 Stress-related function gene		
NADPH	NM_001069918	参与逆境条件下活性氧的产生。
26S proteasome subunit	NM_100359	与 DNA 修复、转录调节、细胞程序性凋亡等细胞生理过程有关。在高等植物中, 参与植物胁迫、雄性不育、衰老过程。
Cysteine proteinase inhibitor	AY062608	抑制半胱氨酸肽链内切酶的水解作用, 有很好的生物防御作用, 可抑制治病真菌, 如赤霉病、稻瘟病菌等的生长。抑制鞘翅目昆虫消化蛋白质的能力, 起到抗虫作用。
PPR	NM_120563	大多数定位在细胞器叶绿体或线粒体上, 对细胞器基因的表达具有重要的调节作用, 参与植物雄性不育、胁迫等响应。
翻译后修饰蛋白 Post-translational modification protein		
WD40	NM_124800	通过介导蛋白质间的相互作用发挥其功能, 参与调节包括信号转导、mRNA 剪接、组蛋白修饰、细胞骨架组装和细胞周期调控等重要过程。
TCCP	NZ_ABKY02000004	在紧密素转位受体(Tir)与信号分子和细胞骨架之间充当桥梁的作用。
RNA binding protein	NM_104627	RNA 的特异结构或序列结合, 进而调节 RNA 的剪辑、运输、稳定性和翻译, 转录后水平基因表达调控的主要承担者, 抑制 miRNAs 作用。
HSP90	NM_124642	在参与信号转导的蛋白和参与细胞周期调控的蛋白的折叠、激活甚至运输过程中起重要作用。
1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 1,5-ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase		
Rubisco large/small subunit	AY836183	参与植物的光呼吸代谢途径, 大亚基起固定 CO ₂ 的催化作用, 小亚基则起着影响酶的催化效率以及 CO ₂ /O ₂ 的注意性结构区域的作用。二者还与植物对氮的吸收、利用和循环有关。
未知蛋白 Unknown protein		

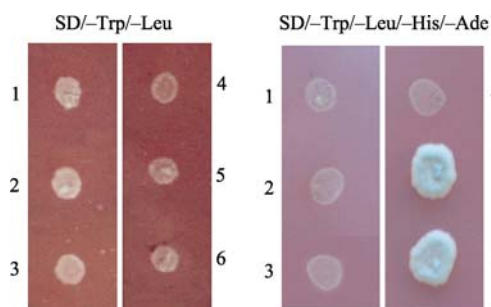


图 7 候选蛋白与 W17 的互作验证
Fig. 7 Validation of interaction between candidate proteins and W17

1: BD+AD; 2: BD-17+AD; 3: BD+AD+PPR; 4: BD+AD-90;
5: BD-17+AD-PPR; 6: BD-17+AD-90.

译后加工才能相互作用的蛋白, 但仍然是从 cDNA 文库中寻找新的互作蛋白的一种快捷有效的方法。本研究构建了小麦 cDNA 文库, 用酵母双杂交技术筛选到 4 类与 ERF 转录因子 W17 相互作用的候选蛋白, 为深入研究 W17 的抗逆机制奠定了基础。

早期研究表明, ERF 基因家族介入了乙烯信号调控途径^[16-17], 但近几年的研究发现乙烯、茉莉酸、水杨酸和 ABA 等几种重要的信号分子传递途径都参与了对 ERF 基因家族的转录调控^[18-24]。因此, ERF 转录因子家族可能在乙烯、茉莉酸、水杨酸和 ABA

信号传递途径中处于核心位置, 参与对不同信号的传递和对下游基因的转录调控。目前, 对 ERF 基因家族在不同信号传递中的作用以及信号传递涉及到的蛋白尚不清楚。

许多 ERF 蛋白功能的发挥需要转录后修饰或参与蛋白间的互作, 包括转录因子、腈水解酶和泛素连接酶等^[17,25-26]。因此, 筛选 W17 互作蛋白、构筑互作图谱、分析互作机制对揭示 W17 基因在不同信号传递中的作用及其转录表达调控具有重要意义。本研究获得的 W17 互作蛋白的大部分都与植物的抗逆、基因表达调控有关。

HSP90 是一类大量存在且高度保守的分子伴侣, 在细胞的生长进程中起着至关重要的作用^[27-28]。叶绿体特异性的 HSP90-5 突变导致拟南芥对红光应答、硝酸盐抗性的改变和 *cr88* 突变体中组成型的叶绿体发育的延迟^[29]; 敲除 *HSP90* 基因能导致植物形态学的改变^[30]。最近发现, HSP90 介导了对植物的抗逆响应。胞质 HSP90 与 R 蛋白之间互作而具有抗病性^[31-32]; 在拟南芥和烟草中, 多个证据表明 HSP90、SGT1 及 RAR1 之间存在相互作用, 这种互作对 R 蛋白的活性起重要作用^[33-35]。在逆境条件下, 分子伴侣 HSP90 产物急剧增加, 帮助靶蛋白正确折

叠、或清除损伤的靶蛋白,从而帮助细胞恢复正常状态并提高生存能力^[36]。因此,我们推测 HSP90 可能参与了小麦 ERF 转录因子介导的信号传递网络。

PPR 基因家族在线粒体和叶绿体基因表达调控中具有重要作用。玉米 PPR 蛋白 CRP1 定位在叶绿体的基质上,参与叶绿体基因 *petD* 和 *petA* 转录本的翻译以及对 *petD* 初始转录本进行加工^[37]。拟南芥 PPR 蛋白 HCF152 是叶绿体 RNA 加工和剪接因子,参与 *psbB-psbT-psbH-petB-petD* 转录本的正确加工过程^[38-39]。此外,PPR 蛋白在线粒体 RNA 的加工过程中也具有重要的作用。酵母 PPR 蛋白 PET309 定位在线粒体上,对保持含有内含子线粒体基因 *COX1* 初始转录物的稳定性和成熟 mRNA 翻译起重要作用^[40]。PPR 基因不仅对细胞器基因进行调节,而且对细胞器外一些基因的表达也起作用。例如,果蝇 PPR 蛋白 BSF 对果蝇早期胚胎发育模式的形成起作用,它特异地结合在 *bicoid* mRNA 3'端非翻译区,提高 mRNA 的稳定性^[41]。

本研究通过酵母双杂交系统筛选出来的蛋白多参与信号转导或免疫过程。W17 与 HSP90、RNA binding protein、PPR 等蛋白相互作用,表明 W17 在植物的逆境信号转导、下游基因的转录调控,甚至翻译过程中的作用都至关重要。研究这些蛋白的功能反过来可以验证 W17 的生物学作用,更好地阐明小麦 ERF 转录因子可能参与的信号传递网络、与其他蛋白的作用机制及其转录表达调控。

4 结论

构建了小麦 cDNA 文库,用酵母双杂技术筛选到 W17 互作蛋白,许多候选蛋白参与信号转导或免疫过程,暗示 ERF 转录因子可能与植物的逆境信号转导、下游基因的转录调控具有相关性。

References

- [1] Zhu J K. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 66-71
- [2] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290: 998-1009
- [3] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2006, 140: 411-432
- [4] Xu Z S, Chen M, Li L C, Ma Y Z. Functions of the ERF transcription factor family in plants. *Botany*, 2008, 86: 969-977
- [5] Park J M, Park C J, Lee S B, Ham B K, Shin R, Paek K H. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*, 2001, 13: 1035-1046
- [6] Yi S Y, Kim J H, Joung Y H, Lee S, Kim W T, Yu S H, Choi D. The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2862-2874
- [7] Shin R, Park J M, An J M, Paek K H. Ectopic expression of *Tsi1* in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15: 983-989
- [8] Jung J, Won S Y, Suh S C, Kim H, Wing R, Jeong Y, Hwang I, Kim M. The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Planta*, 2007, 225: 575-588
- [9] Zhang G, Chen M, Chen X, Xu Z, Guan S, Li L C, Li A, Guo J, Mao L, Ma Y. Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the *ERF* gene family in soybean (*Glycine max* L.). *J Exp Bot*, 2008, 59: 4095-4107
- [10] Wu L, Chen X, Ren H, Zhang Z, Zhang H, Wang J, Wang X C, Huang R. ERF protein JERF1 that transcriptionally modulates the expression of abscisic acid biosynthesis-related gene enhances the tolerance under salinity and cold in tobacco. *Planta*, 2007, 226: 815-825
- [11] Wu L, Zhang Z, Zhang H, Wang X C, Huang R. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol*, 2008, 148: 1953-1963
- [12] Tang W, Charles T M, Newton R J. Overexpression of the pepper transcription factor CaPF1 in transgenic Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth. *Plant Mol Biol*, 2005, 59: 603-617
- [13] Xu Z S, Xia L Q, Chen M, Zhang R Y, Li L C, Zhao Y X, Lu Y, Ni Z Y, Liu L, Qiu Z G, Ma Y Z. Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (*TaERF1*) that increases multiple stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 719-732
- [14] Klimczak L J, Collinge M A, Farini D, Giuliano G, Walker J C, Cashmore A R. Reconstitution of *Arabidopsis* casein kinase II

- recombinant subunits and phosphorylation of factor GBF1 from transcription. *Plant Cell*, 1995, 7: 105–115
- [15] Zhao Y-X(赵云祥), Liu P(刘沛), Xu Z-S(徐兆师), Chen M(陈明), Li L-C(李连城), Chen Y-F(陈耀锋), Xiong X-J(熊祥进), Ma Y-Z(马有志). Analysis of specific binding and subcellular localization of wheat ERF transcription factor W17. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 7(6): 647–655 (in Chinese with English abstract)
- [16] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 1995, 7: 173–182
- [17] Büttner M, Singh K B. Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5961–5966
- [18] Gu Y Q, Yang C, Thara V K, Zhou J, Martin G B. *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell*, 2000, 12: 771–785
- [19] Oñate-Sánchez L, Singh K B. Identification of arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol*, 2002, 128: 1313–1322
- [20] Berrocal-Lobo M, Molina A. Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 763–770
- [21] Lee J H, Kim D M, Lee J H, Kim J, Bang J W, Kim W T, Pai H S. Functional characterization of NtCEF1, an AP2/EREBP-type transcriptional activator highly expressed in tobacco callus. *Planta*, 2005, 222: 211–224
- [22] Hu Y, Zhao L, Chong K, Wang T. Overexpression of *OsERF1*, a novel rice ERF gene, up-regulates ethylene-responsive genes expression besides affects growth and development in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 1717–1725
- [23] Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse C M, Memelink J. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1347–1357
- [24] Zhang H, Yang Y, Zhang Z, Chen J, Wang X C, Huang R. Expression of the ethylene response factor gene *TSRF1* enhances abscisic acid responses during seedling development in tobacco. *Planta*, 2008, 228: 777–787
- [25] Xu P, Narasimhan M L, Samson T, Coca M A, Huh G H, Zhou J, Martin G B, Hasegawa P M, Bressan R A. A nitrilase-like protein interacts with GCC Box DNA-binding proteins involved in ethylene and defense responses. *Plant Physiol*, 1998, 118: 867–874
- [26] Koyama T, Okada T, Kitajima S, Ohme-Takagi M, Shinshi H, Sato F. Isolation of tobacco ubiquitin-conjugating enzyme cDNA in a yeast two-hybrid system with tobacco ERF3 as bait and its characterization of specific interaction. *J Exp Bot*, 2003, 385: 1175–1181
- [27] Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59: 1640–1648
- [28] Jackson S E, Queitsch C, Toft D. Hsp90: from structure to phenotype. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 1152–1155
- [29] Cao D, Froehlich J E, Zhang H, Cheng C L. The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant *cr88* encodes a chloroplast-targeted HSP90. *Plant J*, 2003, 33: 107–118
- [30] Bhattarai K K, Li Q, Liu Y, Dinesh-Kumar S P, Kaloshioan I. The Mi-1-mediated pest resistance requires *Hsp90* and *Sgt1*. *Plant Physiol*, 2007, 144: 312–323
- [31] Botër M, Amigues B, Peart J, Breuer C, Kadota Y, Cacas C, Moore G, Kleanthous C, Ochsenbein F, Shirasu K, Guerois R. Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell*, 2007, 19: 3791–3804
- [32] Shirasu K. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60: 139–164
- [33] Hubert D A, Tornero P, Belkhadir Y, Krishna P, Takahashi A, Shirasu K, Dangl J L. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *EMBO J*, 2003, 22: 5679–5689
- [34] Takahashi A, Casais C, Ichimura K, Shirasu K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11777–11782
- [35] Liu Y, Burch-Smith T, Schiff M, Feng S, Dinesh-Kumar S P. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J Biol Chem*, 2004, 279: 2101–2108
- [36] Sangster T A, Queitsch C. The HSP90 chaperone complex an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 86–92
- [37] Fisk D G, Walker M B, Barken A. Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J* 1999, 18:

- 2621–2630
- [38] Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N, Schuster G. HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell*, 2003, 15: 1480–1495
- [39] Nakamura T, Meierhoff K, Westhoff P, Schuster G. RNA-binding properties of HCF152, an *Arabidopsis* PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 4070–4081
- [40] Mantey G M, McEwen J E. The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1995, 14: 4031–4043
- [41] Mencebo R, Zhou X, Shillinglaw W, Henzel W, Macdonald P M. BSF binds specifically to the *bicoid* mRNA 3' untranslated region and contributes to stabilization of *bicoid* mRNA. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 3462–3471