



青花菜 C3H 型锌指蛋白基因 *BoCCCH2* 的克隆与表达

蒋明^{1*}, 刘青娥², 章燕如¹, 祝琦¹, 龚秀¹, 俞可可¹, 周秀倩¹

(1. 台州学院生命科学院生态学省重点学科, 浙江 椒江 318000; 2. 丽水学院生态学院, 浙江 丽水 323000)

摘要 以青花菜为材料,在克隆 C3H 型锌指蛋白基因 *BoCCCH2* 的基础上,研究该基因在不同器官及霜霉菌和灰葡萄孢菌侵染叶片中的表达模式。测序结果表明,*BoCCCH2* 没有内含子,编码区全长为 1 740 bp,编码 579 个氨基酸,推导的蛋白质具 2 个 ANK 结构域和 2 种 CCCH 锌指结构,锌指结构的类型分别为 C-X₈-C-X₅-C-X₃-H 和 C-X₅-C-X₄-C-X₃-H。反转录聚合酶链反应表明:*BoCCCH2* 在根、叶、花茎、嫩角果、花蕾和花中均有表达,其中在根中的表达量最高;经霜霉菌和灰葡萄孢菌侵染后,该基因表达量均有不同程度的增加,其中在霜霉菌侵染下,表达量在 24 h 后开始增加,72 h 时下降,而在灰葡萄孢菌侵染下,6 h 时的表达量最大,12 h 时开始缓慢下降。聚类结果表明,*BoCCCH2* 与其他十字花科植物的同源序列聚为一类,支持率达 100%,而与豆科、大戟科和蔷薇科等植物的序列处于不同分支。对 *BoCCCH2* 基因的克隆和表达分析为该基因功能研究奠定了基础。

关键词 青花菜; C3H 型锌指; 霜霉菌; 灰葡萄孢菌; 克隆; 表达

中图分类号 Q 78 文献标志码 A

Cloning and expression of a C3H-type zinc finger protein gene *BoCCCH2* from *Brassica oleracea* var. *italica*. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2016,42(2):143-149

JIANG Ming^{1*}, LIU Qing'e², ZHANG Yanru¹, ZHU Qi¹, GONG Xiu¹, YU Keke¹, ZHOU Xiuqian¹
(1. Ecology Key Discipline of Zhejiang Province, College of Life Sciences, Taizhou University, Jiaojiang 318000, Zhejiang, China; 2. College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, Zhejiang, China)

Summary *Brassica oleracea* var. *italica* is an important vegetable crop worldwide, and in China, Taizhou City of Zhejiang Province is one of the major broccoli production areas. Downy mildew and grey mold rot are two common fungal diseases caused by *Hyaloperonospora parasitica* and *Botrytis cinerea*, respectively. In recent years, broccoli production in Taizhou was frequently affected by these two fungal diseases, resulting in yield and quality loss. Broccoli germplasm resources resistance to disease is scarce; therefore, molecular breeding is regarded as an effective solution to solve the problem. This is critically important to isolate genes associated with disease resistance, which will act as potential target genes for broccoli breeding.

Zinc finger proteins are kinds of important transcription factors in eukaryotic organisms, which involve in

基金项目:浙江省本科院校中青年学科带头人学术攀登项目(pd2013420);浙江省自然科学基金(LY13C150003);浙江省重点学科(浙江省台州学院生态学)开放课题(EKD2013-03);浙江省公益技术应用研究计划项目(2016C32091).

*通信作者(Corresponding author):蒋明(<http://orcid.org/0000-0001-9556-2249>),E-mail jiangming1973@139.com

收稿日期(Received):2015-04-16 接受日期(Accepted):2015-06-17 网络出版日期(Published online):2016-03-19

URL:<http://www.cnki.net/kcms/detail/33.1247.S.20160319.2344.002.html>

various biological activities, such as replication, transcription, translation, repair, metabolism and signaling. According to the number and order of cysteine and histidine residues, zinc finger proteins were classified into several different types, such as C2H2, C2C2, C2C2C2, C2HC and C3H. For example, C3H-type ones contain one to six typical motifs with three cysteine residues and one histidine residue. However, their functions are little known, and no gene has been reported in broccoli.

In this study, a C3H-type zinc finger protein gene *BoCCCH2* was isolated from broccoli, and later the expression patterns in different organs as well as leaves infected by *H. parasitica* and *B. cinerea* were studied.

Results indicated that *BoCCCH2* contained no intron, and the full length of coding sequence was 1 740 bp encoding 579 amino acids. The deduced protein sequence contained two ANK domains and two CCCH zinc finger structures, respectively, and the CCCH zinc finger types were C—X₈—C—X₅—C—X₃—H and C—X₅—C—X₄—C—X₃—H. Reverse transcription-polymerase chain reaction results showed that the *BoCCCH2* was expressed in roots, leaves, stalks, young siliques, flower buds and flowers, with highest level in roots. Expression levels increased when challenged by both *H. parasitica* and *B. cinerea*. When infected by *H. parasitica*, expression levels increased after 24 h, and decreased after 72 h, while infected by *B. cinerea*, the highest level was detected after 6 h, and slowed down in 12 h. Homologous sequences were downloaded from NCBI (National Center for Biotechnology Information) website, including *Citrus sinensis*, *Gossypium raimondii*, *Populus trichocarpa*, *Ricinus communis*, *Prunus persica*, *P. mume*, *Malus domestica*, *Fragaria vesca*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine soja*, *B. rapa*, *Camelina sativa*, *Capsella rubella*, *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema salsugineum*. Phylogenetic analysis results revealed that *BoCCCH2* was grouped with homogeneous sequences from other Cruciferae plants with bootstrap confidence of 100%, and sequences from Leguminosae, Euphorbiaceae and Rosaceae were found on different clades.

In conclusion, these results indicate that the *BoCCCH2* might play an important role in defense responses challenged by either *H. parasitica* or *B. cinerea*. Cloning and expression analysis of *BoCCCH2* provide evidence for further studies on gene function.

Key words *Brassica oleracea* var. *italica*; C3H-type zinc finger; *Hyaloperonospora parasitica*; *Botrytis cinerea*; cloning; expression

青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)为十字花科(Cruciferae)甘蓝类蔬菜,是甘蓝(*B. oleracea*)的一个变种,迄今已有 2 500 多年的栽培历史^[1]。青花菜以花蕾群和花茎为食用部位,可生食也可蒸煮,色泽碧绿,营养丰富,风味独特,深受人们的喜爱。浙江是我国青花菜主产省,在台州、宁波和温州等沿海地区均有大面积栽植,是当地菜农的重要收入来源。霜霉病和灰霉病是青花菜在生长过程中常见的 2 种病害,分别由寄生霜霉菌(*Hyaloperonospora parasitica*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)引起,这 2 种病害在苗期和成株期均可发生,危害叶片和花球^[2]。我国的青花菜种质资源十分匮乏,常规育种受到很大的限制,已成为青花菜良种培育的重要制约因素^[3]。分子育种是种质创新的重要手段之一,具有成本低、目的性强和效率高等优点,近年来在青花菜育种中已有一些报道^[4-6]。合适的靶标基因是基因工程育种的基础,转录因子通过结合特定的启动子,控制一系列下游基

因的活动;导入一个抗病转录因子基因就相当于转入多个抗病相关基因,从而提高综合抗病能力^[7]。

锌指蛋白是真核生物中一类重要的转录因子,参与细胞的诸多生命活动,包括复制、转录、翻译、修复、物质代谢、信号转导和 RNA 编辑等^[8-9]。锌指结构由一段小分子肽链组成,可与 Zn²⁺ 结合形成指形结构,该结构能与核酸、蛋白质及一些小分子结合,从而发挥特定的功能^[10]。根据锌指结构中半胱氨酸(C)和组氨酸(H)的数量及排列位置,可分为 C2H2、CCCC、C2HC、C2C2、C2C2C2C2 和 C3H 等类型^[11-12]。C3H 型锌指蛋白通常含 1~6 个锌指结构,每个锌指结构由 3 个半胱氨酸和 1 个组氨酸组成,它们在种子萌发、抗病免疫反应、盐胁迫响应、叶片衰老和干旱胁迫反应等方面起着重要作用^[13-16]。目前,有关青花菜 C3H 型锌指蛋白基因方面的研究尚未见报道;因此,本研究在克隆 *BoCCCH2* 的基础上,利用反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

方法研究该锌指基因在不同器官及在霜霉菌和灰葡萄孢菌侵染下叶片中的表达模式,旨在为开展该基因的功能鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青花菜 Bo0112 在室内栽植,其生育期为 75 d,花球坚实,花蕾深绿色,侧枝少,具有较强的霜霉病和灰霉病抗性。于花期采集根、叶、花茎、花蕾、开放的花和嫩角果,用于 DNA 和 RNA 提取。霜霉菌病叶采自浙江省临海市上盘镇青花菜基地,用无菌 ddH₂O 小心冲洗叶片上的白色霉层,将孢子溶液稀释后备用,待青花菜长至 2 叶 1 心时用喷雾法接种^[17]。灰葡萄孢菌也采自上盘镇青花菜基地,利用分离法获得菌株,在无菌室中把菌株接种到马铃薯葡萄糖琼脂(potato-dextrose agar, PDA)培养基上,25 °C 培养 6 d,在菌落边缘用打孔器打出直径为 5 mm 的琼脂块,反贴于叶片正面,对照为不接菌的 PDA 培养基。分别采集接种霜霉菌和灰葡萄孢菌 0、6、12、24、36 和 72 h 时的叶片,置于 -80 °C 备用。

从 NCBI 数据库下载 *BoCCCH2* 的同源序列,分别来自橙(*Citrus sinensis*, 登录号 KDO66907.1)、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*, KJB08973.1)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, EEE84607.2)、蓖麻(*Ricinus communis*, EEF36773.1)、桃(*Prunus persica*, EMJ09531.1)、梅(*Prunus mume*, XP_008220916.1)、苹果(*Malus domestica*, XP_008384793.1)、野草莓(*Fragaria vesca*, XP_004294290.1)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*, ESW14199.1)、野生大豆(*Glycine soja*, KHN40076.1)、不结球白菜(*Brassica rapa*, XP_009120380.1)、亚麻芥(*Camelina sativa*, XP_Q10483463.1)、芥菜(*Capsella rubella*, EOA13094.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AED97077.1)和山萹苣菜(*Eutrema salsugineum*, ESQ42513.1)。

1.2 DNA、RNA 提取和 cDNA 合成

基因组 DNA 的提取采用十二烷基磺酸钠法;RNA 提取采用 TRIzol 法;cDNA 合成试剂盒购自 TaKaRa 公司,第 1 链和第 2 链的合成根据说明书进行。

1.3 基因克隆

采用的上、下游引物分别为 BoC3HUP: 5'-

ATGGGAGATGACGAGCTGT-3' 和 BoC3HDN: 5'-TCAAGCAACGGTTTGTCT-3'。反应总体积为 25 μL,含 1×PCR 缓冲液,0.8 U *Taq* DNA 聚合酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),0.3 μmol/L dNTPs(上海生工生物工程股份有限公司),各 0.2 μmol/L 上、下游引物,40 ng 叶片基因组 DNA 或 cDNA 模板,最后加无菌 ddH₂O 至 25 μL。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,53.3 °C 退火 55 s,72 °C 延伸 115 s,31 个循环;72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,割取含目的条带的胶块,利用 DNA 凝胶回收试剂盒(碧云天生物技术研究所)回收,实验操作根据说明书进行。取 2 μL PCR 回收产物克隆到 pGEM-T Easy 载体(Promega 公司,美国),于 4 °C 冰箱中连接过夜,用热激法将连接产物转入 DH5α 大肠杆菌感受态细胞(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)中,各取 3 个阳性克隆用于测序。

1.4 基因表达分析

根据测序结果设计 RT-PCR 引物。上、下游引物分别为 BoC3HRTUP: 5'-TATGATCGCTGCCTTGTTT-3' 和 BoC3HRTDN: 5'-AGTTCATTGCTGCGTTCTAT-3',以各器官及经霜霉菌和灰葡萄孢菌处理的叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系及所采用的试剂同 1.3 节。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,56.5 °C 退火 55 s,72 °C 延伸 80 s,33 个循环;72 °C 延伸 10 min。以肌动蛋白基因为内标,上、下游引物分别为 5'-TCTCGATGGAAGAGCTGGTT-3' 和 5'-GATCC TTACCGAGGGAGGTT-3'。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55.6 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,32 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 结束后,产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳、拍照和记录。

1.5 生物信息学分析

BoCCCH2 的编码蛋白用 Primer premier 5.0 软件翻译;*BoCCCH2* 及其同源序列比对采用 ClustalX 1.81 软件;系统进化树的构建采用 Mega 3.1 软件,建树方法为邻接法,自举检验次数为 1 000。

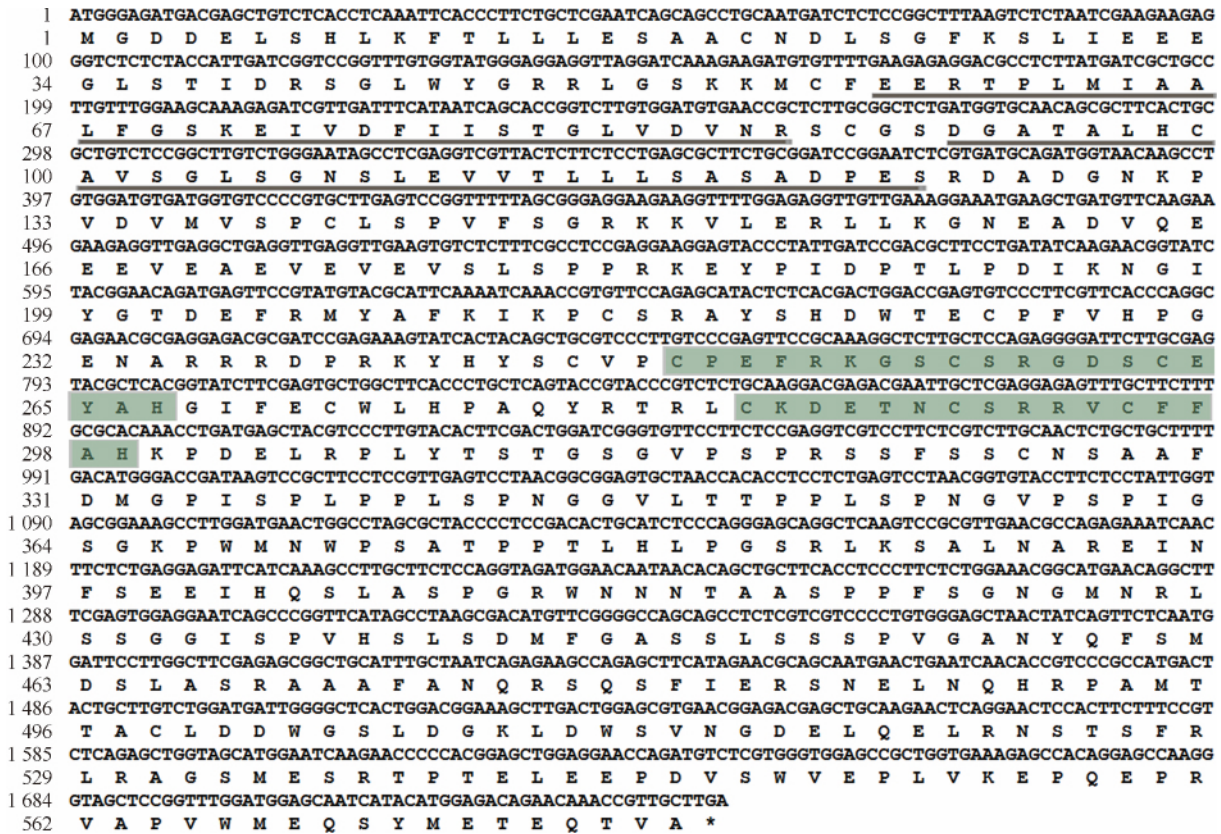
2 结果与分析

2.1 *BoCCCH2* 的克隆与序列分析

分别以叶片基因 DNA 和 cDNA 为模板,用 BoC3HUP/BoC3HDN 引物进行 PCR 扩增,经割胶、回收、连接、转化和测序,获得相应的基因序列。

测序结果(图 1)表明:*BoCCCH2* 的基因组 DNA 和 cDNA 长度均为 1 740 bp,该基因没有内含子,分别以 ATG 和 TGA 作为起始及终止密码子;*BoCCCH2* 编码 579 个氨基酸,推导的蛋白质具 2

个 ANK 结构域,分别位于 57~87 和 92~124 处,另有 2 个不同类型的 CCCH 锌指结构,分别为 C—X₈—C—X₅—C—X₃—H 和 C—X₅—C—X₄—C—X₃—H,位于 249~267 和 284~299 处。



下划线处为 ANK 结构域;阴影部分为 2 个 CCCH 结构域。

Underlined sequences indicate the ANK domains; sequences highlighted in shades demonstrate two CCCH domains.

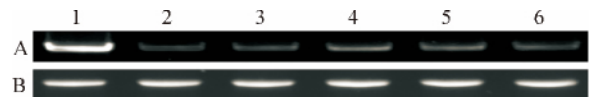
图 1 青花菜 *BoCCCH2* 编码区及推导的氨基酸序列

Fig.1 Complete coding sequence and deduced amino acid sequence of *BoCCCH2* from *Brassica oleracea* var. *italica*

2.2 *BoCCCH2* 的表达分析

为研究 *BoCCCH2* 在不同器官及经霜霉菌和灰葡萄孢菌侵染叶片中的表达模式,以肌动蛋白基因为内标,用 *BoC3HRTUP/BoC3HRTDN* 引物对进行 RT-PCR 分析。结果(图 2)表明:*BoCCCH2* 在根、叶、花茎、嫩角果、花蕾和花中均有表达;在根中的表达量最大,条带最亮,在叶片、花茎和花中的表达量较小,条带亮度较弱。

RT-PCR 结果表明:对照叶片中 *BoCCCH2* 的表达量没有明显变化(图 3E);在霜霉菌侵染下,6 h 和 12 h 时与 0 h 没有区别,24 h 后表达量增加,但增幅较小(图 3A);叶片经灰葡萄孢菌侵染后,6~36 h 的表达量增加,其中 6 h 时的表达量最大,之后逐渐减少,72 h 时的表达量与 0 h 相仿(图 3C)。



A:*BoCCCH2* 基因表达;B:肌动蛋白基因对照。1:根;2:叶;3:花茎;4:嫩角果;5:花蕾;6:花。

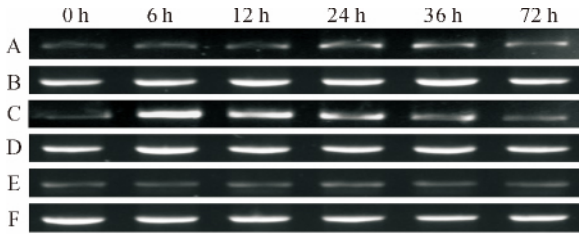
A, Expression of *BoCCCH2* gene; B, Actin gene (CK). 1: Roots; 2: Leaves; 3: Stalks; 4: Young siliques; 5: Flower buds; 6: Flowers.

图 2 *BoCCCH2* 基因在不同器官中的表达

Fig.2 Expression patterns of *BoCCCH2* in different organs

2.3 系统发育分析

利用 ClustalX 1.81 软件对 *BoCCCH2* 及其同源序列比对结果表明:桃(EMJ09531.1)和梅(XP_008220916.1)的相似性最大,达 97%;其次为不结



(A,C):分别为霜霉菌和灰葡萄孢菌侵染下 *BoCCCH2* 的表达;E:对照叶片中 *BoCCCH2* 的表达;(B,D,F):肌动蛋白基因对照。

A and C: Expression of *BoCCCH2* gene challenged by *H. parasitica* and *B. cinerea*, respectively; E: Expression of *BoCCCH2* gene in control leaves; B, D and F: Actin gene (CK).

图 3 霜霉菌和灰葡萄孢菌侵染下 *BoCCCH2* 在叶片中的表达

Fig.3 Expression patterns of *BoCCCH2* in leaves challenged by *Hyaloperonospora parasitica* and *Botrytis cinerea*

球白菜(XP_009120380.1)和 *BoCCCH2*,相似性达 94%;而菜豆(ESW14199.1)和不结球白菜、菜豆和 *BoCCCH2* 及野生大豆(KHN40076.1)和不结球白菜的序列相似性最低,仅为 43%;*BoCCCH2* 与不结球白菜的相似性最高,与亚麻荠(XP_010483463.1)、荠菜(EOA13094.1)、拟南芥(AED97077.1)及山箭菜(ESQ42513.1)等十字花科植物的相似性分别为 77%、78%、78%和 79%,而与其他植物的相似性较低,为 43%~47%。

从图 4 可以看出:*BoCCCH2* 及 15 条同源序列均有 2 个 CCCH 锌指结构,它们是蛋白序列中最为

保守的区域;第 1 个 CCCH 锌指结构在 +296、+298、+299 和 +302 位存在差异,第 2 个锌指结构较第 1 个保守,有 3 处出现差异,分别位于 +328、+329 和 +331;*BoCCCH2*、不结球白菜和山箭菜的 2 个锌指结构序列完全一致,类似现象也出现在拟南芥、荠菜和亚麻荠、菜豆和大豆、苹果和草莓及桃和梅的组合中;另外,雷蒙德氏棉与十字花科植物第 2 个锌指结构序列完全一致。

利用 Mega 3.1 软件构建系统发育树。结果(图 5)表明:16 条蛋白序列可分为 4 类,*BoCCCH2* 先与不结球白菜聚为一组,再与山箭菜、拟南芥、亚麻荠和荠菜等十字花科植物组成 IV 类,支持率达 100%;豆科的菜豆和野生大豆聚为一类(III),支持率为 100%;蔷薇科的野草莓、苹果、梅和桃聚为一类(II),支持率也是 100%;橙、雷蒙德氏棉、毛果杨和蓖麻处于同一分支,归为 I 类,但支持率低,仅 51%。

3 讨论

锌指蛋白广泛存在于真核生物中,在转录调控中起着重要作用。有关 C2H2 型锌指蛋白的研究最多,而对 C3H 型的报道相对较少^[8,18],与青花菜锌指蛋白相关的研究很少。GAO 等^[19]在研究种子和幼苗硫代葡萄糖苷代谢时,利用 RNA-Seq 鉴定出 1 633 个转录因子基因,其中 C3H 与 C2H2 锌指蛋白基因的数量分别为 69 和 65。C3H 型锌指结构由 3 个半胱氨酸和 1 个组氨酸构成,参与植物生长发育、物质代谢和逆境响应^[13,20-21]。根据半胱氨酸和组

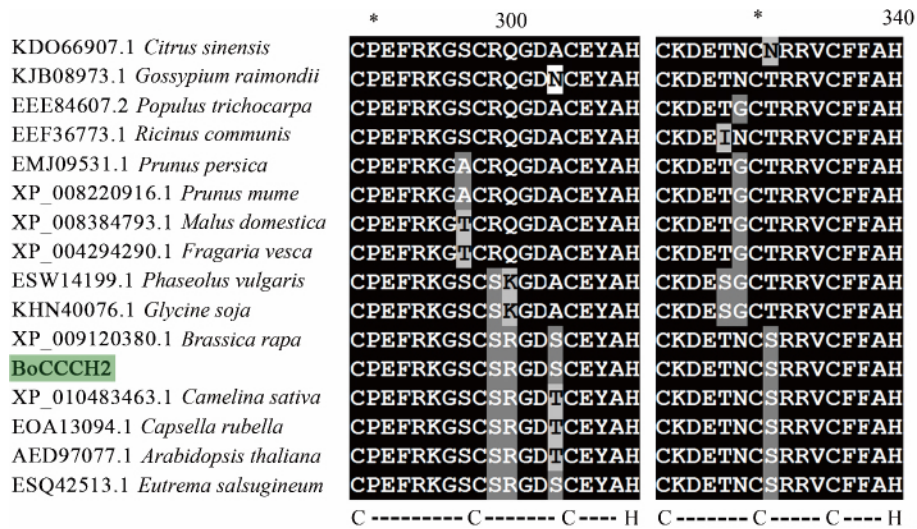


图 4 *BoCCCH2* 及其同源序列锌指模体的比较

Fig.4 Comparisons of zinc finger motifs among *BoCCCH2* and its homologous sequences

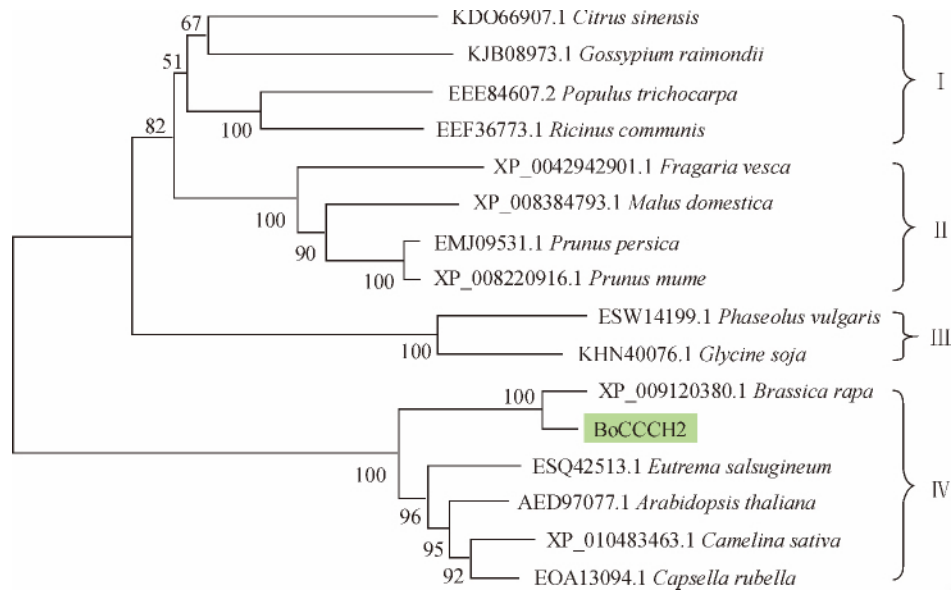


图 5 用邻接法构建的 BoCCCH2 及其同源序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of BoCCCH2 and its homologous sequences constructed using neighbor-joining method

氨酸之间的氨基酸残基数, C3H 型锌指结构共有序列的最初定义是 $C-X_{6-14}-C-X_{4-5}-C-X_3-H$ ^[22], 在对拟南芥和水稻的 C3H 进行全基因组鉴定时发现了一些新类型, 重新定义为 $C-X_{4-15}-C-X_{4-6}-C-X_3-H$ ^[23]。锌指蛋白通常含 1~6 个锌指结构, 但也有例外, 如玉米的 ZmC3H3 含 7 个 C3H, 类型为 $C-X_{17}-C-X_6-C-X_3-H$, 除此之外, 还有 $C-X_8-C-X_5-C-X_3-H$ 、 $C-X_7-C-X_5-C-X_3-H$ 、 $C-X_7-C-X_4-C-X_3-H$ 、 $C-X_5-C-X_4-C-X_3-H$ 、 $C-X_7-C-X_6-C-X_3-H$ 和 $C-X_8-C-X_4-C-X_3-H$ ^[24]。在本研究中 BoCCCH2 具 2 个锌指结构, 分别为 $C-X_8-C-X_5-C-X_3-H$ 和 $C-X_5-C-X_4-C-X_3-H$, 它们均为常见类型, 拟南芥 C3H14 和 C3H15 各具 2 个锌指结构, 都是 $C-X_8-C-X_5-C-X_3-H$ 类型^[23]; 在毛果杨的 211 个 C3H 锌指结构中, $C-X_8-C-X_5-C-X_3-H$ 有 96 个, $C-X_7-C-X_5-C-X_3-H$ 有 76 个^[25], 而在拟南芥的 148 个 C3H 锌指结构中, $C-X_8-C-X_5-C-X_3-H$ 和 $C-X_7-C-X_5-C-X_3-H$ 类型的 C3H 分别为 78 和 43 个。

锚蛋白重复序列 (ankyrin repeats, ANK) 结构域在蛋白质-蛋白质互作中起着重要作用, 它们参与转录起始、细胞周期调控、细胞骨架、离子运输和信号转导^[26]。玉米 C3H 锌指蛋白 ZmC3H4、ZmC3H10、ZmC3H43 和 ZmC3H63 均带有 2 个 ANK 结构域^[24]; 在毛果杨的 91 个 C3H 锌指蛋白中, PtC3H32、

PtC3H33、PtC3H34、PtC3H35、PtC3H36、PtC3H37、PtC3H38、PtC3H39、PtC3H81、PtC3H82、PtC3H90 和 PtC3H91 等 12 个蛋白具 ANK^[25]; 而在拟南芥中, 有 5 个 C3H 型锌指蛋白具 ANK, 它们是 AtC3H30、AtC3H56、AtC3H66、AtC3H47 和 AtC3H29^[23], 其中 AtC3H29 又名 ZFAR1, 它发生突变后, 对灰葡萄孢菌的敏感性增加^[27]。在本研究中, 推导的 BoCCCH2 具 2 个 ANK 结构域, 分别位于 57~87 和 92~124 处, 其功能尚需进一步研究。

C3H 型锌指蛋白基因参与植物生长发育, 如毛果杨的 34 个 CCCH 在根中大量表达, 24 个在新叶中高表达, 43 个在雌花序或雄花序中表达^[25]; 与毛果杨不同, 拟南芥中的大部分 CCCH 在根、叶、花序和种子中均有表达^[23]; 拟南芥的 C3H14 和 C3H15 在花茎、花和角果中表达量最高, 它们与细胞次生壁加厚相关^[23]。在本研究中, BoCCCH2 在根中的表达量最高, 而在花茎、叶、嫩角果、花蕾和花中的表达量相对较低。C3H 型锌指蛋白参与逆境胁迫响应, 陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) GhTZF1 的表达受聚乙二醇、盐、茉莉酸甲酯和过氧化氢的诱导, 该基因的过量表达可增加拟南芥的耐旱性和延缓因干旱引起的衰老^[16]。本研究青花菜 BoCCCH2 的表达受霜霉菌和灰葡萄孢菌的诱导, 但表达量和表达模式存在一定差异, 暗示该基因与 2 种病菌的抗病反应相关。

对青花菜 BoCCCH2 基因的克隆与表达分析, 为该基因在抗病反应中的功能鉴定奠定了基础。下

一步我们将开展载体构建和转基因研究,以明确 *BoCCCH2* 在霜霉病和灰霉病抗性反应中的功能。

参考文献 (References):

- [1] BUCK P A. Origin and taxonomy of broccoli. *Economic Botany*, 1956,10(3):250-253.
- [2] 任典东,汪恩国,王永才.台州西兰花主要病虫害发生为害规律研究. *蔬菜*,2013(2):65-67.
REN D D, WANG E G, WANG Y C. Occurrence of broccoli key diseases and insect pests in Taizhou. *Vegetables*, 2013 (2):65-67. (in Chinese)
- [3] 兰梅,黄丽,许彬,等.青花菜单倍体育种研究进展. *云南农业大学学报(自然科学版)*,2012,27(4):579-584.
LAN M, HUANG L, XU B, *et al.* Advances in haploid breeding of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2012,27(4):579-584. (in Chinese with English abstract)
- [4] MORA-AVILES M A, EARLE E D. Expression of pathogenesis-related genes in transgenic broccoli and canola plants expressing the *Trichoderma harzianum*-endochitinase gene. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 2004,10(2):141-146.
- [5] CAO J, TANG J D, STRIZHOV N, *et al.* Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* Cry1C protein control diamondback moth larvae resistant to Cry1A or Cry1C. *Molecular Breeding*, 1999,5(2):131-141.
- [6] ZHAO J Z, COLLINS H L, TANG J D, *et al.* Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000,66(9):3784-3789.
- [7] 金慧,栾雨时.转录因子在植物抗病基因工程中的研究进展. *中国生物工程杂志*,2010,30(10):94-99.
JIN H, LUAN Y S. Progress on transcription factor in gene engineering of diseases resistances in plants. *China Biotechnology*, 2010, 30 (10): 94-99. (in Chinese with English abstract)
- [8] KRISHNA S S, MAJUMDAR I, GRISHIN N V. Structural classification of zinc fingers: Survey and summary. *Nucleic Acids Research*, 2003,31(2):532-550.
- [9] SUN T, SHI X, FRISO G, *et al.* A zinc finger motif-containing protein is essential for chloroplast RNA editing. *PLoS Genetics*, 2015,11(3):e1005028.
- [10] KLUG A, SCHWABE J W. Protein motifs 5. Zinc fingers. *The FASEB Journal*, 1995,9(8):597-604.
- [11] IUCHI S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001,58(4):625-635.
- [12] LI W T, HE M, WANG J, *et al.* Zinc finger protein (ZFP) in plants. *Plant Omics Journal*, 2013,6(6):474-480.
- [13] BOGAMUWA S P, JANG J C. Tandem CCCH zinc finger proteins in plant growth, development and stress response. *Plant and Cell Physiology*, 2014,55(8):1367-1375.
- [14] KONG Z, LI M, YANG W, *et al.* A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiology*, 2006,141 (4):1376-1388.
- [15] LEE S J, JUNG H J, KANG H, *et al.* *Arabidopsis* zinc finger proteins AtC3H49/AtTZF3 and AtC3H20/AtTZF2 are involved in ABA and JA responses. *Plant and Cell Physiology*, 2012,53(4):673-686.
- [16] ZHOU T, YANG X Y, WANG L C, *et al.* GhTZF1 regulates drought stress responses and delays leaf senescence by inhibiting reactive oxygen species accumulation in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2014,85 (1/2):163-177.
- [17] JIANG M, MIAO L X, HE C M. Overexpression of an oil radish superoxide dismutase gene in broccoli confers resistance to downy mildew. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012,30(4):966-972.
- [18] SHI Z H, ZHANG C, XU X F, *et al.* Overexpression of *AtTTP* affects *ARF17* expression and leads to male sterility in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2015,10(3):e0117317.
- [19] GAO J, YU X, MA F, *et al.* RNA-seq analysis of transcriptome and glucosinolate metabolism in seeds and sprouts of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *PLoS One*, 2014,9(2):e88804.
- [20] TAKATSUJI H. Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1998,54(6):582-596.
- [21] LIN P C, POMERANZ M C, JIKUMARU Y, *et al.* The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein *AtTZF1* affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses. *The Plant Journal*, 2011,65(2):253-268.
- [22] BERG J M, SHI Y. The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc. *Science*, 1996, 271: 1081-1085.
- [23] WANG D, GUO Y H, WU C A, *et al.* Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics*, 2008,9:44.
- [24] PENG X J, ZHAO Y, CAO J G, *et al.* CCCH-type zinc finger family in maize: Genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought treatments. *PLoS One*, 2012,7(7):e40120.
- [25] CHAI G, HU R, ZHANG D, *et al.* Comprehensive analysis of CCCH zinc finger family in poplar (*Populus trichocarpa*). *BMC Genomics*, 2012,13(1):253.
- [26] CHAKRABARTY B, PAREKH N. Identifying tandem ankyrin repeats in protein structures. *BMC Bioinformatics*, 2014,15(1):6599.
- [27] ABUQAMAR S, CHEN X, DHAWAN R, *et al.* Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *The Plant Journal*, 2006,48(1):28-44.