

苹果*MdERF014*基因的克隆和功能鉴定

齐晨辉¹, 赵先炎², 姜翰², 郑朋飞¹, 刘海涛³, 李媛媛^{1,*}, 郝玉金^{1,*}

¹山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东泰安 271018

²西北农林科技大学园艺学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室/陕西苹果重点实验室, 陕西杨凌 712100

³山东熠辉检测技术有限公司, 山东泰安 271000

摘要: 本文以拟南芥中转录因子AtERF014蛋白序列为检索序列, 在苹果基因组网站进行比对分析, 获得同源性最高的基因MDP0000319736。以该基因序列设计引物, 从苹果‘皇家嘎啦’(*Malus×domestica*)克隆到该基因, 测序比对发现扩增得到的基因仅存在两处碱基差异, 将扩增的基因命名为*MdERF014*。进化树分析表明, 苹果*MdERF014*与白梨PbERF014亲缘关系最近, 并且*MdERF014*含有一个AP2保守结构域。荧光定量PCR检测发现*MdERF014*能够响应脱落酸和盐胁迫, 并且过表达*MdERF014*的苹果愈伤组织的耐盐性增强, 对ABA的敏感性降低。

关键词: *MdERF014*; 脱落酸; 盐胁迫; 功能鉴定; 苹果

APETALA 2/ethylene-responsive element binding factor (AP2/ERF)是植物中一个特别的转录因子家族(Zhuang等2011; Zhang等2008)。该转录因子家族通常含有AP2/ERF保守结构域(Okumuro等1997), 基于序列同源性和AP2保守结构域将其分为5个亚家族, 即AP2、RAV、DREB、ERF和其他一些基因家族(Sakuma等2002)。AP2/ERF在植物的生长发育和胁迫响应中发挥重要作用, 例如花器官的发育、调控叶表皮细胞、响应各种生物及非生物胁迫等(Zhang等2013; Sears等2014; Upadhyay等2013; Chen等2015; Park等2016)。

在不同物种中广泛报道了ERF家族的功能。例如: 在拟南芥中, *AtERF73/HRE1*被氨基环丙烷羧酸及低氧所诱导, 并且在氧气不足时, *AtERF73/HRE1*能够负调控乙烯响应(Yang等2011)。在拟南芥中, *ERF6*在抑制叶片生长及诱导胁迫响应基因中作为一个中心催化剂, 并且能够诱导*ERF11*的表达, 而*ERF11*能反过来中和*ERF6*的作用, *ERF6*过表达可造成植株矮化, 而且其作用能够被*ERF11*过表达所抑制, 所以*ERF6*和*ERF11*共同维持植物生长和抵御胁迫之间的平衡(Dubois等2015)。在小麦中, *ERF3*能够被盐和干旱所诱导, *ERF3*可提高胁迫相关基因的表达, 显著增强植物对盐和干旱胁迫的抗性(Rong等2014)。在大豆中, *ERF5*能够被乙烯、脱落酸(abscisic acid, ABA)、水杨酸(sali-

clic acid, SA)和大豆疫霉菌所诱导, 并且能够增强对大豆疫霉菌的抗性, 参与病原菌的抵抗过程(Dong等2015)。在野生大豆中, *ERF71*能够通过上调H⁺-ATP酶及改变植物生长素的积累, 增强植物对碱性胁迫的抗性(Yu等2017)。在四翅滨藜中, *ERF2*能够减少活性氧和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的积累, 增加抗氧化酶的活性, 在渗透胁迫时快速关闭气孔, 并且过表达*ERF2*导致种子萌发时对ABA高度敏感, 增强植物对病原菌的抗性(Sun等2018)。这些结果表明, 在植物的生长发育及抵御生物和非生物胁迫中, ERF转录因子发挥重要作用。

苹果是我国重要的经济作物之一, 苹果中ERF是如何发挥功能的已经被广泛报道。比如: *MdERF2*的表达在果树成熟中被乙烯所抑制, 从而降低*MdERF3*启动子的活性, 直接抑制*MdACS1*的表达而负调控乙烯合成(Li等2016)。*MdERF3*是乙烯的正调控因子, *MdMYC2*能结合到*MdERF3*启动子上负调控对铝的耐受性(An等2017)。在常绿苹

收稿 2018-07-30 修定 2019-08-28

资助 国家重点研发计划(2018YFD1000200)、国家自然科学基金(31772275)和山东省自然科学基金优青项目(ZR-2018JL014)。

* 共同通讯作者: 郝玉金(haoyujin@sdau.edu.cn)、李媛媛(liyy0912@163.com)。

果中过表达*ERF17*能够改变叶绿素积累,促进叶绿素降解相关基因的表达,从而改变苹果的颜色,这为苹果品质的改良提供了一个很好的理论基础(Han等2018)。在本文的研究中,我们分离得到了一个新的苹果ERF家族成员*MdERF014*,该基因含有AP2保守结构域,与白梨的*PbERF014*亲缘关系最近,在苹果的各个器官中均能表达,并且在果实中表达量最高。此外qRT-PCR检测发现*MdERF014*能够响应ABA及NaCl,过表达*MdERF014*的愈伤组织不受ABA及盐抑制。这为选育苹果抗逆优良品种提供了良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

选择生长状态好的苹果(*Malus × domestica* Borkh.) ‘皇家嘎啦’组培苗叶片8~10片,提取总RNA后反转录得到cDNA用于基因的克隆。将生根的‘皇家嘎啦’组培苗分别用H₂O、200 mmol·L⁻¹ NaCl、100 μmol·L⁻¹ ABA分别处理0、1、3、6、12和24 h,液氮冷冻样品,全部取样完成后提取RNA,进行反转录,得到的cDNA作为非生物胁迫的模板用于定量检测。取生长于山东农业大学果树试验田实生‘皇家嘎啦’苹果树的根、茎、叶、花和果实,用于检测基因的组织表达模式。取长势较好的苹果‘王林’愈伤组织进行表型检测。

1.2 *MdERF014*基因的克隆

设计用于扩增基因的上下游引物,上游引物序列: 5' ATGGTGAAGACAGATCAGAGGA 3', 下游引物序列: 5' TCAGCAGAAGCTCCACAAGCGA 3', 以‘皇家嘎啦’cDNA为模板,利用HIFI高保真Taq酶、设计的上下游引物进行PCR扩增。PCR反应条件: 94℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 到第二步进行33次循环; 72℃延伸10 min。将扩增得到的片段进行胶回收,连接于PMD18-T克隆载体,转化大肠杆菌DH5α,氨苄抗性筛选和菌落PCR鉴定转化子后进行测序。将得到的序列与预测的序列利用DNAMAN进行比对。

1.3 *MdERF014*生物信息学分析

分析*MdERF014*蛋白序列及其他18个物种的

*ERF014*蛋白序列之间的亲缘关系,利用MEGA 5.0软件进行进化树构建。利用在线软件SMART分析*MdERF014*蛋白的保守结构域。分析苹果*MdERF014*和拟南芥*AtERF014*蛋白三级结构采用在线软件PHYRE 2。利用PlantCARE在线软件对*MdERF014*启动子区域上的顺式作用元件进行分析。

1.4 *MdERF014*表达载体的构建及苹果‘王林’愈伤组织的遗传转化

根据用于扩基因的*MdERF014*的上下游引物,将上下游引物分别加上酶切位点*Sma*I和*Eco*RI后,以*MdERF014*-PMD18-T质粒为模板进行PCR扩增,将目的条带切胶回收后,连接PMD18-T克隆载体转化大肠杆菌DH5α,氨苄抗性筛选和菌落PCR鉴定转化子后进行测序。测序正确后,用*Sma*I和*Eco*RI进行双酶切,连接到由TaKaRa Bio Inc.开发的pRI 101-AN载体上,构成*MdERF014*-OE表达载体。将*MdERF014*-OE表达载体及pRI 101-AN空载体分别转入到农杆菌GV3101后,侵染苹果‘王林’愈伤组织(Hu等2015)。

1.5 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)

采用qRT-PCR的方法,以*MdActin* (GenBank序列号CN938024)作为内参基因,检测*MdERF014*在‘皇家嘎啦’中不同组织表达水平、对非生物胁迫的响应以及转基因苹果‘王林’愈伤组织的表达量。qRT-PCR分析的上游引物序列为5' AAATGACCGTCATGTCCCCCAA 3', 下游引物序列为5' ATGAGGTTAATGGACGGCGAGG 3'。进行qRT-PCR的20 μL反应体系为: 2×UltraSYBR Mixture 10 μL、上游引物(10 μmol·L⁻¹)和下游引物(10 μmol·L⁻¹)各1.0 μL、cDNA 1.0 μL、ddH₂O 7.0 μL。每样本3次技术重复。进行qRT-PCR的反应条件: 95℃预变性10 min, 95℃变性15 s, 56℃退火15 s, 65℃延伸10 s, 40次循环,每次循环第3步进行荧光采集;最后,采用2^{-ΔΔCT}法(Livak和Schmittgen 2001)进行定量数据分析。

1.6 ABA和NaCl处理下苹果‘王林’愈伤组织的相关生理指标测定

将长势良好的转入空载体的愈伤组织及3个*MdERF014*转基因愈伤组织细胞系分别置于基本培养基以及分别添加100 μmol·L⁻¹ ABA、150

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl和 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的愈伤组织培养基上。愈伤组织培养基为MS培养基+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂。愈伤组织置于 25°C 暗室进行培养, 3周后观测表型。3个为一组检测愈伤组织的鲜重, 测3组算其平均值及误差。

称重完毕后检测MDA含量。将愈伤组织置于加有 0.5% 硫代巴比妥酸的磷酸缓冲液中, 于沸水中煮 10 min , 待试管冷却后, $4\ 000\times g$ 离心 10 min , 以 0.5% 硫代巴比妥酸为空白对照, 测定 450 、 532 和 600 nm 下的吸光值, 计算公式MDA含量= $[6.45\times(\text{OD}_{532}-\text{OD}_{600})-0.56\times\text{OD}_{450}]\times\text{提取液体积}/\text{愈伤组织鲜重}$ 。

1.7 数据分析

利用DPS 7.05数据分析软件和单因素Tukey法分析相对表达水平, 不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2 实验结果

2.1 *MdERF014*基因克隆和进化树分析

利用从拟南芥网(<https://www.arabidopsis.org/>)获得的AtERF014蛋白序列, 在苹果网(<https://www.rosaceae.org/>)进行Blast比对, 获得一个评分最高的序列MDP0000319736。根据该基因的序列设计上下游引物序列进行PCR扩增, 获得了一个约 700 bp 的条带(图1), 通过测序发现该片段长度为 720 bp , 与预测的开放阅读框长度一致。利用DNAMAN比对预测序列和测序序列, 发现扩增得到的基因在 612 位的核苷酸是A, 而非网站注释碱基G; 在 638 位的核苷酸是G, 而非网站注释碱基A(图2), 其余碱基与网站注释序列相符, 将扩增得到的基因序列命名为*MdERF014*。

利用*MdERF014*蛋白序列在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行Blast比对, 得到18个同源性较高的不同物种的蛋白序列, 用MEGA 5.0分析这19个物种ERF014的进化树, 发现苹果*MdERF014*和白梨PbERF014亲缘关系最近(图3)。

2.2 *MdERF014*蛋白保守结构域及三级结构分析

*MdERF014*蛋白大小为 239 氨基酸。利用SMART在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

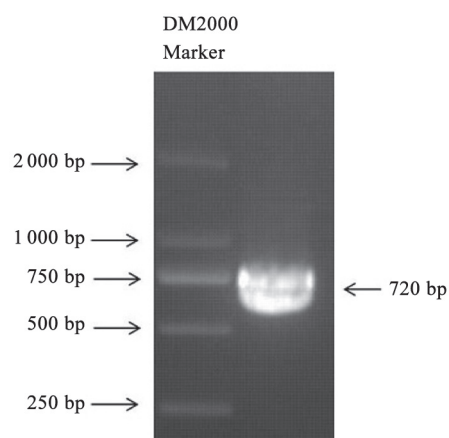


图1 *MdERF014*基因全长cDNA的PCR扩增

Fig.1 Amplification of the full length of *MdERF014* gene with PCR

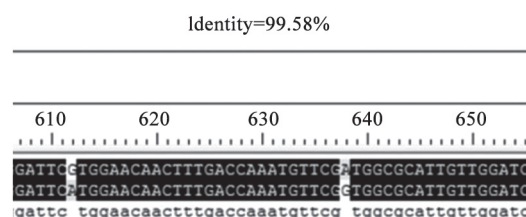


图2 *MdERF014*全长cDNA的PCR扩增结果与网站注释序列比对

Fig.2 The full-length PCR amplification results of *MdERF014* coding region compare with the predicted sequence

smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)分析*MdERF014*蛋白的保守结构域, 发现该蛋白序列上第 38 位到 101 位有一个AP2保守结构域(图4)。

拟南芥ERF014和苹果ERF014蛋白3D结构的分析采用Phyre2在线软件(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), 发现AtERF014和*MdERF014*融合后能够高度重合(图5), 这表明*MdERF014*与AtERF014可能有相似的功能。

2.3 *MdERF014*启动子顺式作用元件分析

为了预测*MdERF014*可能含有的顺式作用元件, 利用PlantCARE在线软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对*MdERF014*上游的启动子序列进行分析, 发现*MdERF014*启动子上含有与ABA响应相关的作用元件ABRE, 表明*MdERF014*可能参与了ABA信号途径(表1)。此外,

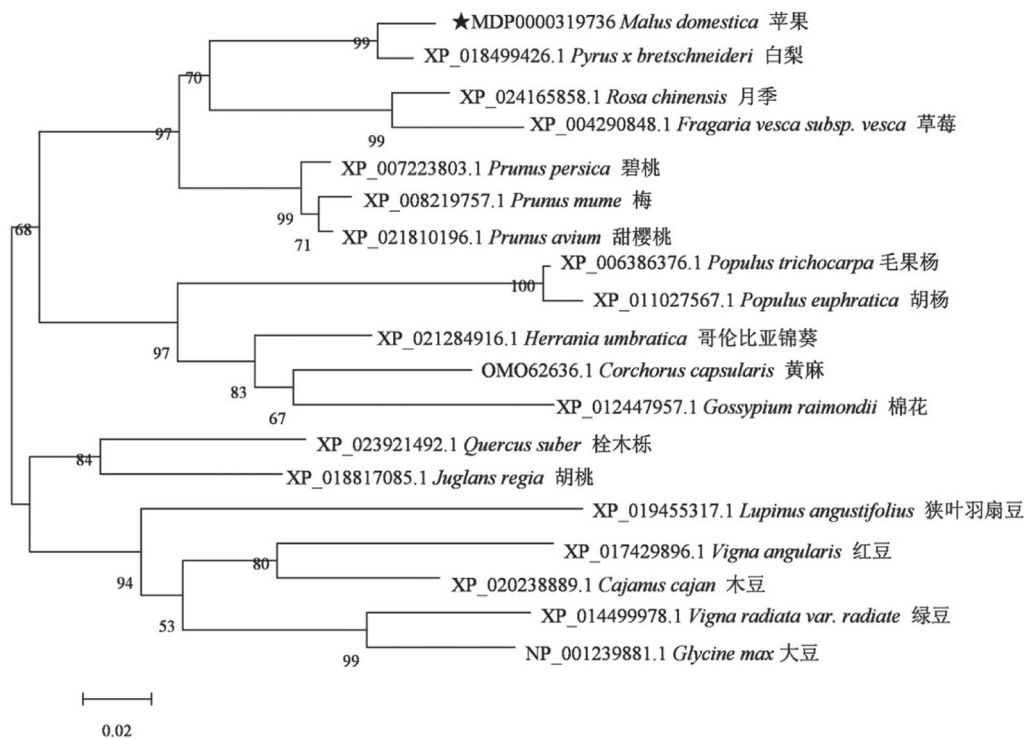


图3 苹果MdERF014与其他物种ERF014蛋白系统进化树分析
Fig.3 Phylogenetic tree between ERF014 protein of apple and other species

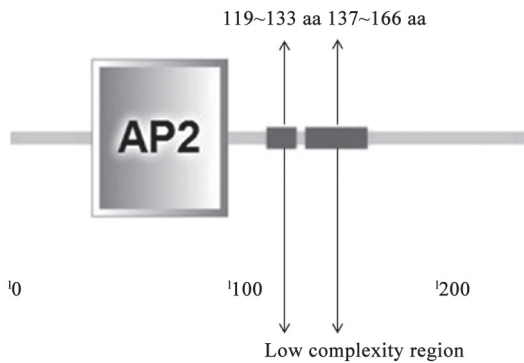


图4 MdERF014蛋白的保守结构域预测
Fig.4 Prediction of the conserved domains of MdERF014 protein

该启动子上还含有与植物生长调节物质相关的响应元件, 茉莉酸(jasmonic acid, JA)响应元件CGT-CAmotif、赤霉素响应元件P-box、水杨酸响应元件TCA-element, 这表明MdERF014可能参与植物生长调节物质的调节。同时, MdERF014启动子上还有与光响应相关元件ACE及与干旱诱导相关的

MYB绑定位点MBS, 这表明MdERF014可能参与光响应途径及植物的抗旱途径(表1)。

2.4 MdERF014组织表达模式及非生物胁迫的响应

利用qRT-PCR检测MdERF014在苹果‘皇家嘎啦’中的组织表达模式发现, MdERF014在根、茎、叶、花和果实中均有表达, 并且在果实中表达量最高, 根中表达量最低(图6), 表明MdERF014可能在果实发育中发挥作用。

为了研究MdERF014的功能, 我们利用qRT-PCR检测了MdERF014对非生物胁迫的响应, 发现MdERF014能够响应ABA及盐胁迫, 并且随着处理时间的延长, 基因表达量明显下降, 与对照差异显著(图7)。

2.5 MdERF014转基因苹果‘王林’愈伤组织不受ABA抑制

为了深入研究MdERF014的功能, 我们检测了3个苹果‘王林’转基因细胞系愈伤组织中MdERF014的表达量, 发现MdERF014在转基因愈伤组织MdERF014-OE-1、MdERF014-OE-2和MdE-

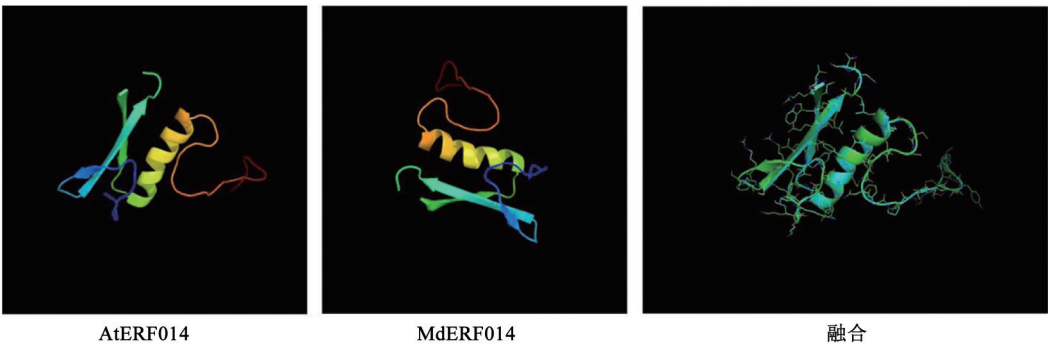


图5 AtERF014和MdERF014蛋白三级结构
Fig.5 Protein 3-dimitional structure of AtERF014 and MdERF014

表1 *MdERF014* 基因上游调控序列顺式作用元件分析

Table 1 Analysis of *cis*-acting regulatory elements in the upstream regulatory sequences of *MdERF014*

顺式元件名称	信号序列	功能	起始位点/bp	终止位点/bp
ABRE	CGTACGTGCA	与脱落酸响应相关的作用元件	-82	-91
ACE	AAAACGTTTA	参与光响应的作用元件	-593	-602
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸响应元件	-692	-697
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件	-389	-396
TCA-element	CAGAAAAGGA	参与水杨酸的作用元件	-396	-405
MBS	CAACTG	与干旱诱导相关的MYB结合位点	-794	-800

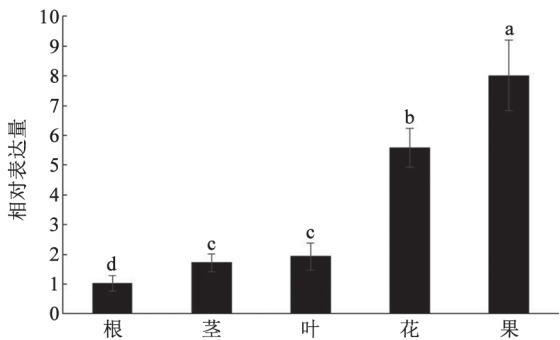


图6 *MdERF014*在苹果不同组织中的表达水平
Fig.6 Expression of *MdERF014* gene in different tissues of apple
不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下图同此。

RF014-OE-3中的表达量显著高于转入空载体的愈伤组织(图8)。

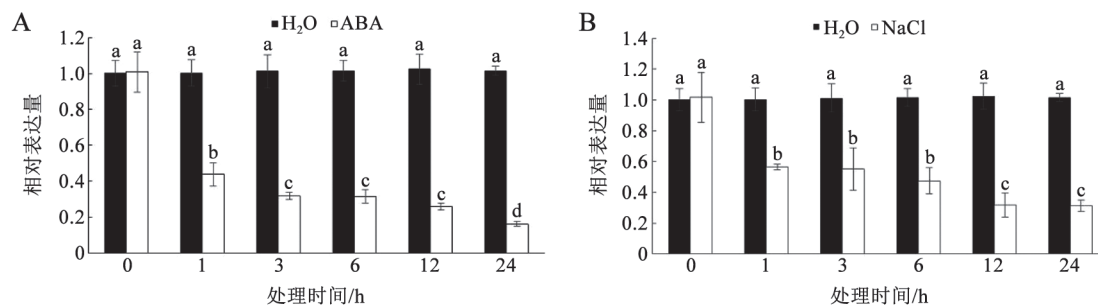
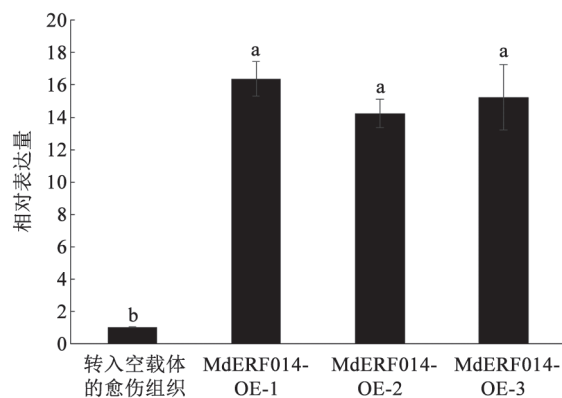
由于*MdERF014*能够响应ABA (图7), 所以我们检测了*MdERF014*转基因愈伤组织3个细胞系在ABA处理下的表型。结果发现, 在对照培养基上, 转入空载体的愈伤组织长势与3个转基因愈伤组

织细胞系(MdERF014-OE-1、MdERF014-OE-2和MdERF014-OE-3)相似, 而在100和150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理下, 转基因愈伤组织细胞系长势明显好于转入空载体的愈伤组织(图9)。

植物器官在逆境下遭受伤害, 往往发生膜脂过氧化作用, 丙二醛是膜脂过氧化的最终分解产物, 从膜上产生的位置释放出来后, 与蛋白质、核酸起反应修饰, 丙二醛的积累可能对膜和细胞造成一定的伤害。图10显示, ABA处理下, 与转入空载体的愈伤组织相比, 转基因愈伤组织细胞系MdERF014-OE-1、MdERF014-OE-2和MdERF014-OE-3的鲜重显著增加, MDA含量显著降低, 这表明*MdERF014*过量表达苹果愈伤组织的生长不受ABA抑制。

2.6 *MdERF014*过表达苹果‘王林’愈伤组织不受NaCl抑制

由于*MdERF014*能够响应NaCl (图7), 所以我们检测了盐胁迫对*MdERF014*的影响。结果(图12)发现, 在对照培养基上, 转入空载体的愈伤组织长势

图7 在ABA和盐处理下苹果组培苗中*MdERF014*的表达水平Fig.7 Expression level of *MdERF014* gene in apple seedling under ABA and salt treatments图8 *MdERF014*在苹果‘王林’转基因愈伤组织的表达Fig.8 Expression level of *MdERF014* in transgenic calli of apple ‘Orin’

与3个转基因愈伤组织细胞系(MdERF014-OE-1、MdERF014-OE-2和MdERF014-OE-3)相似;而在50和100 mmol·L⁻¹ NaCl下,转基因愈伤组织细胞系长势好于转入空载体的愈伤组织(图11),其鲜重显著增加,MDA含量显著降低。这表明*MdERF014*基因在盐胁迫过程中起到正调控的作用。

3 讨论

ERF转录因子参与了植物响应生物和非生物胁迫刺激,在植物的生长发育过程中发挥重要作用。在海岛棉中,一个新的AP2/ERF转录因子基因*GbERFb*能显著被乙烯、JA、SA、刀伤、H₂O₂和黄萎病菌所诱导,过表达*GbERFb*能够提高植物对黄萎病的抵抗能力,有效提高农作物的抗病性(Liu等2017)。在杨树中,*PsnERF75*提高植物对盐的耐受性,过表达*PsnERF75*拟南芥长势明显好于对照,

并且能够提高种子的萌发率,清除活性氧、减轻植物损伤(Wang等2018)。在大豆中,大豆疫霉病、乙烯和JA均能诱导*GmERF113*的表达,过表达*GmERF113*大豆能够增强对疫霉病的抵抗能力,并且正调控病原菌相关基因的表达(Zhao等2017)。在花椰菜中,*BoERF1*被NaCl和菌核病所诱导,过表达*BoERF1*能够提高种子萌发率,并且降低盐胁迫下的叶绿素损失,在盐胁迫及抗菌核病起了一个正调控作用(Jiang等2018)。在菊花中,*Cm-ERF053*能正调控芽分支及侧根的发育,还能提高植物的抗旱性,这为菊花的生产、观赏和抗旱性提供了一个潜在的价值(Nie等2018)。

在本文的研究中,我们鉴定了一个含有AP2保守结构域的转录因子MdERF014。为了研究*MdERF014*的功能,我们检测了*MdERF014*在‘皇家嘎啦’不同组织的表达模式,发现*MdERF014*在根、茎、叶、花、果中均有表达,并且在果中表达量最高(图6)。先前有研究报道,*MdERF1*主要在果实中表达,能够调控果实的成熟(Wang等2007),而*MdERF014*在果实中表达量最高,说明*MdERF014*可能在果实发育中发挥作用,与果实的品质相关。拟南芥的*AtERF014*主要研究了在植物免疫方面的作用,例如*AtERF014*正调控对番茄丁香假单胞菌的抗性,负调控对葡萄孢菌的抗性(Birkenbihl等2017; Zhang等2016)。但是尚未有研究报道ABA和NaCl对*AtERF014*影响,在本文的研究中,我们发现在苹果‘王林’愈伤组织中过表达*MdERF014*能够增强对ABA和NaCl的抗性。该结果可能是由于*MdERF014*的表达受到上游某些转录因子的转录抑制,且这

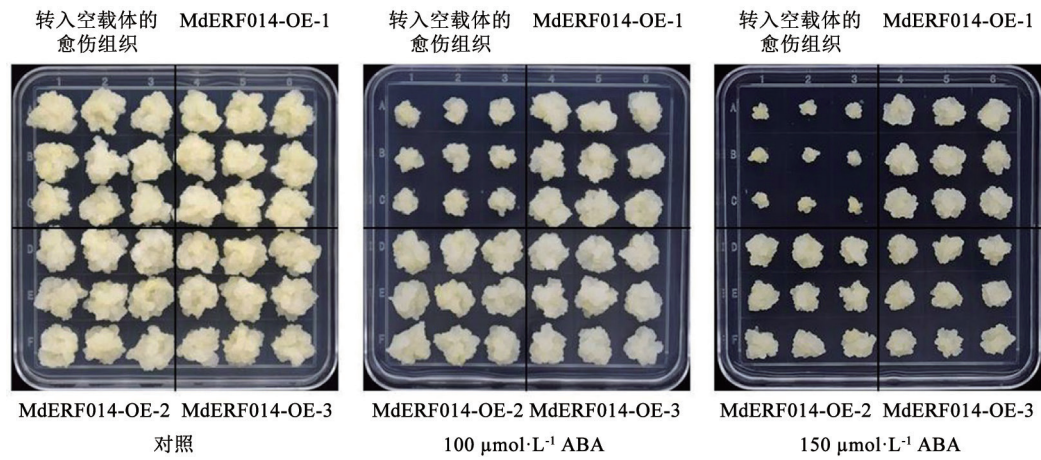


图9 ABA处理下苹果‘王林’转基因愈伤组织的生长状态

Fig.9 Growth status of transgenic calli of apple ‘Orin’ under ABA treatment

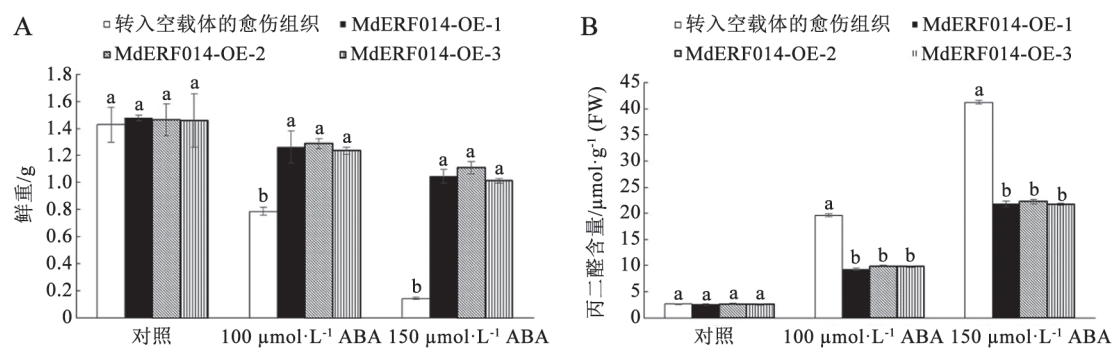


图10 ABA处理下苹果‘王林’转基因愈伤组织的鲜重和丙二醛含量变化

Fig.10 Changes of fresh weight and MDA content in apple ‘Orin’ transgenic calli under ABA treatment

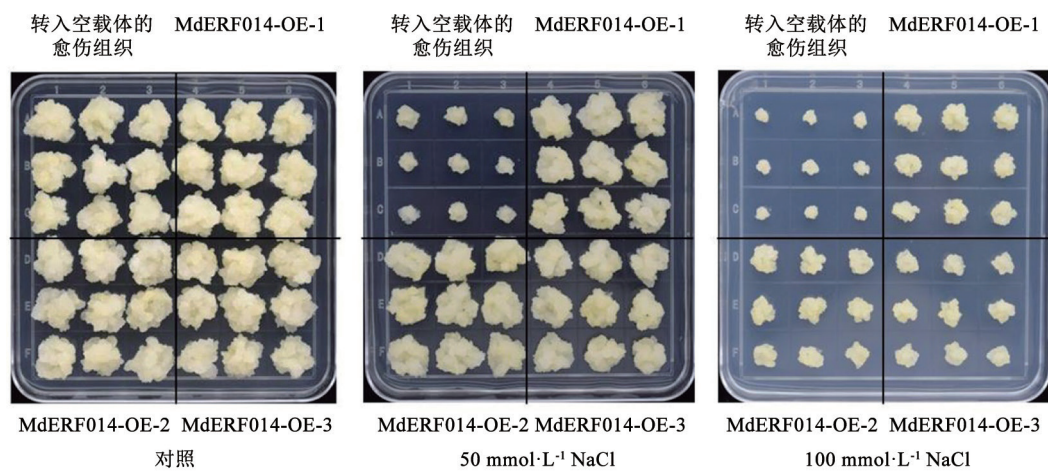


图11 NaCl处理下苹果‘王林’转基因愈伤组织的生长状态

Fig.11 Growth status of transgenic calli of apple ‘Orin’ under NaCl treatment

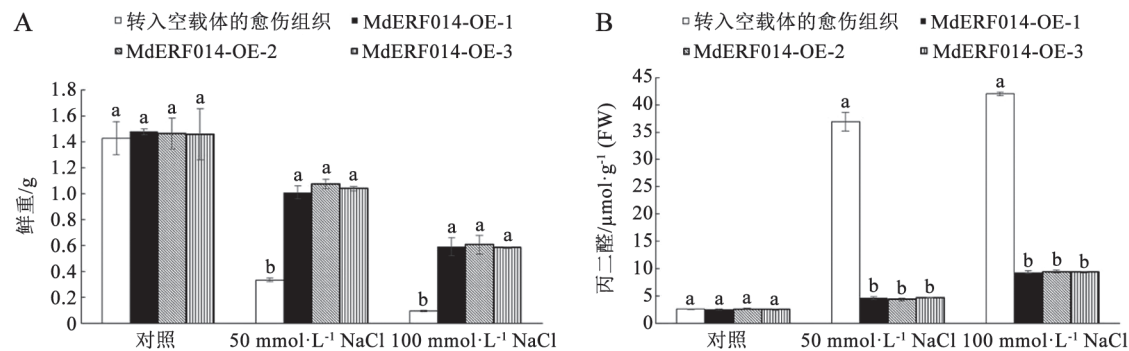


图12 NaCl处理下苹果‘王林’转基因愈伤组织的鲜重和丙二醛含量变化

Fig.12 Changes of fresh weight and MDA content in apple ‘Orin’ transgenic calli under NaCl treatment

些转录因子的表达和蛋白的积累受ABA和NaCl处理上调, 导致ABA和NaCl处理降低了*MdERF014*的表达。而该基因本身是提高抗性的, 因此在应用35S强启动子构建的过量表达载体获得的转基因材料对于ABA和NaCl的抗性是提高的。

盐胁迫是影响苹果产量和品质的一个重要因素之一, 在苹果中MdNAC047能够结合到*MdERF3*的启动子上, 使*MdERF3*表达上调, 通过调控乙烯响应而增强抗盐性(An等2018)。*MdERF014*与*MdERF3*功能相似, 能够增强苹果愈伤组织的抗盐性, 这为提高苹果品质、产量、育种和砧木的选育提供了一个良好的理论基础。

参考文献(References)

- An JP, Wang XN, Yao JF, et al (2017). Apple *MdMYC2* reduces aluminum stress tolerance by directly regulating *MdERF3* gene. *Plant Soil*, 418 (1-2): 255–266
- An JP, Yao JF, Xu RR, et al (2018). An apple NAC transcription factor enhances salt stress tolerance by modulating the ethylene response. *Physiol Plantarum*, 164 (3): 279–289
- Birkenbihl RP, Liu S, Somssich IE (2017). Transcriptional events defining plant immune responses. *Curr Opin Plant Biol*, 38: 1–9
- Chen WH, Li PF, Chen MK, et al (2015). Forever young flower negatively regulates ethylene response DNA-binding factors (EDFs), by activating an ethylene-responsive factor (ERF), to control *Arabidopsis* floral organ senescence and abscission. *Plant Physiol*, 168 (4): 1666–1683
- Dong LD, Cheng YX, Wu JJ, et al (2015). Overexpression of *GmERF5*, a new member of the soybean EAR motif-containing ERF transcription factor, enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *J Exp Bot*, 66 (9): 2635–2647
- Dubois M, Van den Broeck L, Claeys H, et al (2015). The ethylene response factors *ERF6* and *ERF11* antagonistically regulate mannitol-induced growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 169 (1): 166–179
- Han ZY, Hu YN, Lü YD, et al (2018). Natural variation underlies differences in *ethylene response factor 17* activity in fruit peel degreening. *Plant Physiol*, 176 (3): 2292–2304
- Hu DG, Sun MH, Sun CH, et al (2015). Conserved vacuolar H⁺-ATPase subunit B1 improves salt stress tolerance in apple calli and tomato plants. *Sci Hortic-Amsterdam*, 197: 107–116
- Jiang M, Ye ZH, Zhang HJ, et al (2018). Broccoli plants over-expressing an ERF transcription factor gene *Bo-ERF1* facilitates both salt stress and *Sclerotinia* stem rot resistance. *J Plant Growth Regul*, 38: 1–13
- Li T, Jiang ZY, Zhang LC, et al (2016). Apple (*Malus domestica*) *MdERF2* negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing *MdACS1* transcription. *Plant J*, 88 (5): 735–748
- Liu JG, Wang YQ, Zhao GY, et al (2017). A novel *Gossypium barbadense* ERF transcription factor, *GbERFb*, regulation host response and resistance to *Verticillium dahliae* in tobacco. *Physiol Mol Biol Plants*, 23 (1): 125–134
- Nie J, Wen C, Xi L, et al (2018). The AP2/ERF transcription factor *CmERF053* of chrysanthemum positively regulates shoot branching, lateral root, and drought tolerance. *Plant Cell Rep*, 37: 1–12
- Okamoto JK, Caster B, Villarroel R, et al (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (13): 7076–7081
- Park CS, Go YS, Suh MC (2016). Cuticular wax biosynthesis is positively regulated by *WRINKLED4*, an AP2/ERF-

- type transcription factor, in *Arabidopsis* stems. *Plant J*, 88 (2): 257–270
- Rong W, Qi L, Wang AY, et al (2014). The ERF transcription factor *TaERF3* promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. *Plant Biotechnol J*, 12 (4): 468–479
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al (2002). 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*, 290 (3): 998–1009
- Sears MT, Zhang H, Rushton PJ, et al (2014). *NtERF32*: a non-NIC2 locus AP2/ERF transcription factor required in jasmonate-inducible nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Mol Biol*, 84 (1-2): 49–66
- Sun XH, Yu G, Li JT, et al (2018). *AcERF2*, an ethylene-responsive factor of *Atriplex canescens*, positively modulates osmotic and disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 274: 32–43
- Upadhyay RK, Soni DK, Singh R, et al (2013). *SlERF36*, an EAR-motif-containing ERF gene from tomato, alters stomatal density and modulates photosynthesis and growth. *J Exp Bot*, 64 (11): 3237–3247
- Wang AD, Tan DM, Takahashi A, et al (2007). *MdERFs*, two ethylene-response factors involved in apple fruit ripening. *J Exp Bot*, 58 (13): 3743–3748
- Wang SJ, Zhou BR, Yao WJ, et al (2018). *PsnERF75* Transcription factor from *Populus simonii* × *P. nigra* confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J Plant Biol*, 61 (2): 61–71
- Yang CY, Hsu FC, Li JP, et al (2011). The AP2/ERF transcription factor *AtERF73/HRE1* modulates ethylene responses during hypoxia in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 156 (1): 202–212
- Yu Y, Duan XB, Ding XD, et al (2017). A novel AP2/ERF family transcription factor from *Glycine soja*, *GsERF71*, is a DNA binding protein that positively regulates alkaline stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 94 (4-5): 509–530
- Zhang GY, Chen M, Chen XP, et al (2008). Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.). *J Exp Bot*, 59 (15): 4095–4107
- Zhang HJ, Hong YB, Huang L, et al (2016). *Arabidopsis AtERF014* acts as a dual regulator that differentially modulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Botrytis cinerea*. *Sci Rep-UK*, 6: 30251
- Zhang HW, Zhang JF, Quan RD, et al (2013). EAR motif mutation of rice *OsERF3* alters the regulation of ethylene biosynthesis and drought tolerance. *Planta*, 237 (6): 1443–1451
- Zhao Y, Chang X, Qi D, et al (2017). A novel soybean ERF transcription factor, *GmERF113*, increases resistance to *Phytophthora sojae* infection in soybean. *Front Plant Sci*, 8: 299
- Zhuang J, Chen JM, Yao QH, et al (2011). Discovery and expression profile analysis of AP2/ERF family genes from *Triticum aestivum*. *Mol Biol Rep*, 38 (2): 745–753

Gene cloning and functional identification of *MdERF014* gene in apple

QI Chen-Hui¹, ZHAO Xian-Yan², JIANG Han², ZHENG Peng-Fei¹, LIU Hai-Tao³, LI Yuan-Yuan^{1,*}, HAO Yu-Jin^{1,*}

¹State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Collaborative Innovation Center of Fruit & Vegetable Quality and Efficient Production, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

²State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas/Shaanxi Key Laboratory of Apple, College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

³Shandong Yihui Detection Technology Co. Ltd., Taian, Shandong 271000, China

Abstract: The *Arabidopsis* ERF014 protein sequence was used as a query to search the apple genome. We obtained a gene with the highest score MDP0000319736. The primer was designed from the gene sequence, and the gene was cloned from *Malus × domestica*. Sequencing alignment revealed that the amplified gene had only two base differences, and the gene was named *MdERF014*. Phylogenetic analysis showed that the apple *MdERF014* had the closest relationship with the white pear *PbERF014*. The *MdERF014* contained an AP2 conserved domain. Real-time quantitative PCR revealed that *MdERF014* was able to respond to abscisic acid and sodium chloride stress. Overexpression of *MdERF014* in apple callus enhanced the salt tolerance, and reduced the ABA sensitivity.

Key words: *MdERF014*; abscisic acid; salt stress; functional identification; apple

Received 2018-07-30 Accepted 2019-08-28

This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFD1000200), the National Natural Science Foundation of China (31772275) and the Natural Science Fund for Excellent Young Scholars of Shandong Province (ZR2018JL014).

*Co-corresponding authors: Hao YJ (haoyujin@sdaa.edu.cn), Li YY (liyy0912@163.com).