

梅花 PmERF4 基因的克隆及其表达分析

彭 婷¹ 冯蓝萍² 王艺琴¹ 任 静¹ 包满珠² 张俊卫²

1. 贵州大学农学院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025;

2. 华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 为阐明梅花(*Prunus mume*)ERF 基因的功能, 采用 RT-PCR 技术从梅花品种‘雪梅’中克隆获得 1 个 *PmERF4* 基因。生物信息学分析表明该基因 cDNA 全长序列为 842 bp, 完整开放阅读框(ORF)为 690 bp, 编码 229 个氨基酸。氨基酸序列比对发现, *PmERF4* 蛋白包含 1 个 AP2/ERF 保守结构域。系统进化分析结果显示, 梅花 *PmERF4* 蛋白与李亚科李属植物的 ERF 蛋白高度同源。利用荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 *PmERF4* 基因在非生物胁迫和激素处理下的表达, 结果表明: *PmERF4* 基因受低温、氧化胁迫的诱导, 但响应程度不同, 它能够持续且强烈地响应低温胁迫, 对甘露醇、MeJA、SA 处理不敏感, 而高盐和 ABA 则抑制其表达; *PmERF4* 基因可能在梅花低温胁迫应答中发挥重要作用。

关键词 梅花; ERF 转录因子; 非生物胁迫; 激素; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 S 685.17 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0020-07

梅花(*Prunus mume*)是中国传统名花, 早春开花, 观赏价值高, 作为中华文化的核心象征之一, 一直都深受人们喜爱。梅花属于亚热带树种, 性喜温暖且耐寒冷, 在年平均气温 16~23 ℃ 的分布区域内自然生长最好^[1]。北方冬季的持续低温以及干冷风所引起的风害限制了梅花的生长和发育^[2], 影响“南梅北移”。长期以来, 培育既有抗寒性又有典型梅香的品种是梅花育种研究的重要任务^[3]。

近年来, 随着研究技术和手段的不断发展, 植物耐寒性研究取得了长足进展。通过对转录组和蛋白质组分析发现, 大量基因参与了植物逆境应答。在这些基因中, 转录因子因其“一因多效”的特点而受到研究者们的关注。在众多转录因子中, ERF 转录因子(ethylene responsive transcriptional factor)因其在植物响应逆境胁迫和激素信号转导过程中扮演着重要角色而成为研究的热点。ERF 转录因子是植物所特有的转录因子之一, 家族成员众多, 属于 AP2/ERF 家族的 ERF 亚家族。ERF 基因最早是从烟草(*Nicotiana tabacum*)中分离出来的^[4], 随后陆续在多种植物中被报道^[5]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中至少有 145 个成员, 根据

AP2/ERF 结构域的数量和其他保守结构域的不同可以将 AP2/ERF 家族分为 5 个亚族, 分别为 AP2、RAV、ERF、DREB 亚族和其他类别^[6]。其中, ERF 亚族包含 1 个 AP2/ERF 结构域, 能与下游基因启动子区的顺式作用元件 GCC-box 结合, 参与植物激素信号转导^[4]、非生物胁迫^[7-9]和生物胁迫分子应答反应等过程^[10-12]。

近年来开展的梅花抗寒分子机制研究取得了一定的进展, 但关于 ERF 转录因子的研究报道较少。本研究以‘雪梅’(*Prunus mume* ‘Xuemei’)嫩叶为材料, 结合其 0 ℃ 低温处理下的基因表达谱和梅花全基因组数据^[13], 利用 RT-PCR 的方法, 获得含完整编码区序列的‘雪梅’*PmERF4* 基因全长序列, 并对其进行生物信息学分析; 同时, 通过荧光定量 qRT-PCR 检测该基因在几种非生物胁迫和激素处理下的表达模式, 旨在为进一步研究 ERF 基因在梅花抗寒分子机制中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

梅花品种‘雪梅’枝条来自华中农业大学梅园。

收稿日期: 2019-02-26

基金项目: 贵州省科技支撑计划([2018]2302); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目([2017]112)

彭 婷, 博士, 讲师。研究方向: 园林植物遗传育种与生物技术。E-mail: 568539157@qq.com

通信作者: 张俊卫, 博士, 副教授。研究方向: 园林植物遗传育种与生物技术。E-mail: zjw@mail.hzau.edu.cn

于2017年3月上旬采集健康无病虫害且长势整齐一致的休眠枝,将其剪成12~15 cm长的茎段,保留茎段上的4~5个腋芽,并将其放进装有清水的培养瓶中,水深以不超过茎段长度的1/3为准。放于培养室中脱驯化,设置培养室光周期为16 h/8 h(昼/夜),温度为25 °C,湿度为75%,每3 d更换1次培养瓶中的清水。当‘雪梅’休眠枝上的腋芽萌发且叶片展开至2~3 cm时开始进行各种处理。各处理光周期和湿度与对照相同。2 °C低温处理:于0、1、3、6、12、24、48 h后分别采样;氧化胁迫处理(H_2O_2):培养瓶中的水换为3% H_2O_2 的1/4 MS液体培养基,于0、3、6、12、24、36、48 h后分别采样;盐(NaCl)处理:培养瓶中的水换为200 mmol/L NaCl的1/4 MS液体培养基,于0、3、6、12、24、48 h后分别采样;甘露醇(mannitol)处理:培养瓶中的水换为300 mmol/L 甘露醇的1/4 MS液体培养基,于0、3、6、12、24、48 h后分别采样;激素处理:培养瓶中的水分别换为100 μmol/L ABA或100 μmol/L MeJA或500 μmol/L SA的水溶液,于0、3、6、12、24 h后分别采样,每个时间点随机采集至少3个茎段上的叶芽,样品采后立即用液氮速冻保存。

存于-80 °C冰箱中。每个处理时间点设置3个生物学重复。

1.2 梅花 PmERF4 基因的克隆

梅花叶片总RNA提取采用艾德莱公司EASY spin植物RNA快速提取试剂盒,用TaKaRa公司的反转录试剂盒PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time,货号RR047A)将提取的总RNA反转录成cDNA,-20 °C保存备用。根据梅花基因组上公布的PmERF4基因序列,设计全长特异引物,以‘雪梅’低温处理12 h后反转录成的cDNA为模板,克隆PmERF4基因序列全长,使用Taq DNA聚合酶进行PCR扩增。扩增条件为94 °C预变性4 min;(94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s),37个循环;72 °C总延伸10 min。目的基因经电泳检测,切胶回收后连接至中间克隆载体pMD18-T(TaKaRa,货号6011),热激法转化大肠杆菌DH5 α ,挑取阳性克隆送往武汉擎科伟业生物科技有限公司测序。全长序列扩增、菌落PCR检测和测序所用引物见表1。

表1 研究所用的PCR引物

Table 1 PCR primers and their sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
PmERF4-ZF	CTAAGTCTCACATCAATCTCCCC	PmERF4 基因扩增
PmERF4-ZR	GCTTCTTGCTTTCTCGCTCTC	Amplification of PmERF4
PmEF1 α -qF	CGGATTCAATGTTAAGAATGTTGC	内参基因 Reference gene
PmEF1 α -qR	AGAACTGGAGCATATCCGTTACC	
PmERF4-qF	CAGAGCAGCACCGTGGAGTC	qRT-PCR
PmERF4-qR	AACCGCTCGCTCGAACCT	
M13	TGTAAAACGACGGCCAGT	测序 Sequencing

1.3 序列比对与系统进化分析

将测序得到的序列在NCBI数据库进行序列比对,用ExPASy提供的ProtParam网站预测蛋白质的分子质量、氨基酸组成和理化性质,利用SWISS-MODEL软件预测蛋白质的三级结构,与其他物种同源蛋白质的氨基酸多序列比对使用Clustalx 1.83和Genedoc软件,再用MEGA 5.0软件进行系统进化树分析。

1.4 PmERF4 基因的表达分析

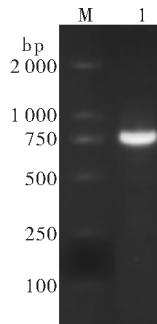
荧光定量qRT-PCR采用美国Applied biosystems公司生产的ABI 7500 Real-Time PCR System荧光定量PCR仪,PCR反应程序为:95 °C预变性30 s;95 °C变性30 s,60 °C退火30 s,共40个循环;95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s;反应体系为10 μL,以梅花PmEF1 α 为内参基因,根据扩增的PmERF4序列设计定量引物,引物序列见表1。基因相对表达量的计算采用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ [14],利用Microsoft excel进行数据处理,SAS9.2软件对数据进行方差分析,Duncan's检验法进行多重比较($P<0.01$),SigmaPlot软件作图。

荧光定量qRT-PCR采用美国Applied biosys-

2 结果与分析

2.1 PmERF4 基因的克隆与氨基酸序列比对

以‘雪梅’嫩叶 cDNA 为模板,根据梅花基因组数据库上的序列设计特异引物,进行 RT-PCR 扩增,获得 1 条长度为 842 bp 的条带(图 1),测序结果表明该基因开放阅读框为 690 bp,编码 229 个氨基酸。

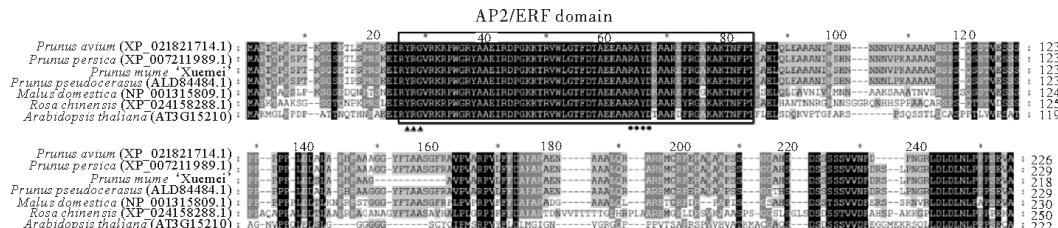


M:DNA 分子质量标准; 1: *PmERF4* 基因 cDNA PCR 产物。
M:DNA marker DL2000; 1: The amplification cDNA product of *PmERF4* gene.

图 1 ‘雪梅’*PmERF4* 基因的克隆

Fig.1 Cloning of *PmERF4* gene from *Prunus mume* ‘Xuemei’

利用 ProtParam 网站对蛋白质的理化性质和氨基酸组成进行预测分析,结果显示:*PmERF4* 蛋白的理论分子质量为 24.35 ku,等电点 pI 为 9.62。氨基酸组成分析发现以丙氨酸(17%)和丝氨酸(11.4%)的含量最高。该蛋白不稳定系数值为 60.67,脂肪系数 58.21,预测其属于不稳定蛋白。由 23 个带负电荷残基(Asp+Glu)、29 个带正电荷残基(Arg+Lys)组成,总平均亲水性为 -0.577,说明该蛋白是一个亲水蛋白。SWISS-MODEL 预测 *PmERF4* 蛋白的三级结构,发现含有 1 个 α 螺旋结构、3 个 β 折叠结构。利用 Clustalx 1.83 和 Genedoc 软件将该氨基酸序列与甜樱桃(*P. avium*,GenBank:XP_021821714.1)、桃(*P. persica*,GenBank:XP_007211989.1)、中国樱桃(*P. pseudocerasus*,GenBank:ALD84484.1)、苹果(*Malus domestica*,GenBank:NP_001315809.1)、月月红(*Rosa chinensis*,GenBank:XP_024158288.1)和拟南芥(*A.thaliana*,GenBank:AT3G15210)的 ERF 蛋白进行序列比对,结果表明 *PmERF4* 与其他植物的 ERF 蛋白有很高的相似性(图 2),均包含 1 个 AP2/ERF 保守结构域,且 AP2/ERF 结构域非常保守的 YRG 和 RAYD 氨基酸序列也在 *PmERF4* 蛋白中保守存在,



方框标记的为 AP2 结构域,三角形标记的为 YRG 氨基酸序列,圆点标记的为 RAYD 氨基酸序列。The AP2 domain is marked in frame. The triangle and dot indicates YRG, RAYD amino acid sequences, respectively.

图 2 梅花与其他植物的 ERF 氨基酸序列比对

Fig.2 The alignment of amino acid sequences of ERF from *P. mume* and other plants

说明克隆的基因是 ERF 基因,并将其命名为 *PmERF4* 基因。

2.2 PmERF4 进化树分析

利用 MEGA5.0 软件,采用邻接法(neighbour-joining method)构建了包含 8 个 ERF 蛋白家族的系统进化树。结果显示:梅花 *PmERF4* 蛋白与甜樱桃(*P. avium*)和桃(*P. persica*)的 ERF 蛋白在进化树的同一分支上,亲缘关系最近;与李亚科的中国樱桃(*P. pseudocerasus*)和野樱(*P. yedoensis* var. *nudiflora*)的同源性也很高;与其他蔷薇科植物如

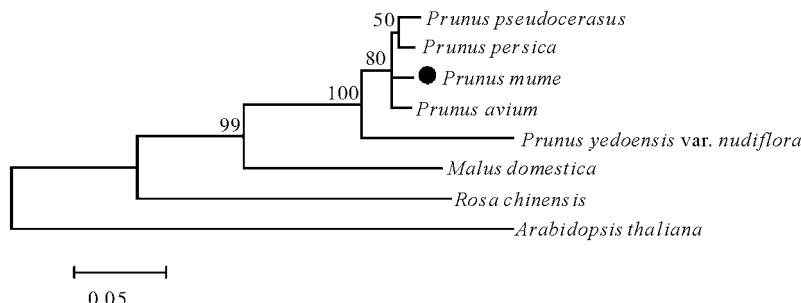
苹果(*Malus domestica*)和月月红(*Rosa chinensis*)同源性要低于李亚科植物,与拟南芥(*A. thaliana*)的 AtERF4 蛋白亲缘关系较远。

2.3 PmERF4 基因在非生物胁迫和激素处理下的表达分析

1)‘雪梅’*PmERF4* 基因在低温、高盐、H₂O₂、甘露醇处理下的表达模式(图 4)。分别对‘雪梅’茎段进行 2 ℃ 低温处理及培养瓶中加入 3% H₂O₂、200 mmol/L NaCl 和 300 mmol/L 甘露醇,结果显示:*PmERF4* 基因在低温处理 1 h 后表达量迅速上

升,在低温处理后的 6 h 内达到高峰,表达量约为处理前的 30 倍,6 h 后表达量逐渐下降,说明 *PmERF4* 基因对低温胁迫的响应很敏感且持续时间长(图 4A)。NaCl 处理 3 h 后 *PmERF4* 基因的表达量显著下降,之后的表达量也一直低于对照,48 h 时检测不到该基因的表达,说明盐胁迫下调该基因的表达(图 4B)。H₂O₂ 处理后, *PmERF4*

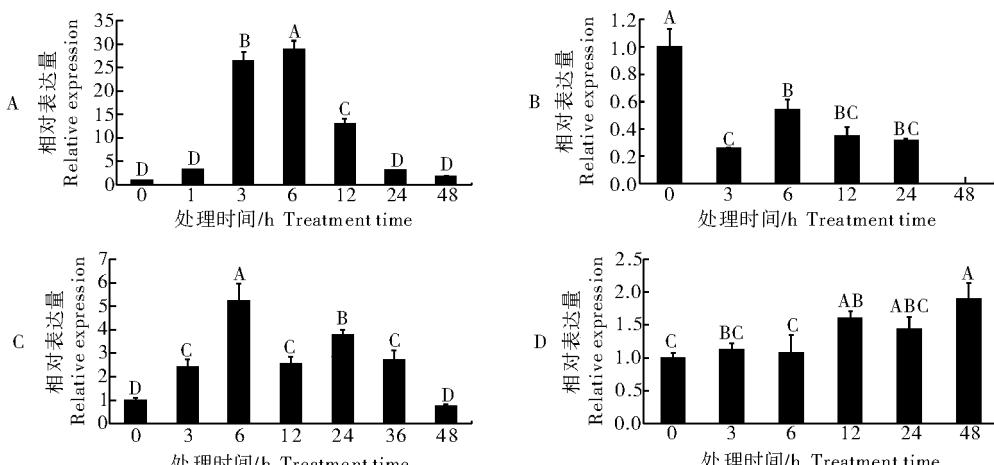
基因的表达量也是先降后升,6 h 时达到高峰,约为处理前的 5 倍,之后的表达量整体呈现下降的趋势,说明 *PmERF4* 基因对氧化胁迫的响应不如低温胁迫强烈(图 4C)。*PmERF4* 基因在甘露醇处理前期表达量与对照相比差异不大,处理 24 h 之内只是略高于对照,只在处理 48 h 时为处理前的 2 倍左右,说明该基因对渗透胁迫的响应不敏感(图 4D)。



圆点标记的为 *PmERF4* 蛋白。*Prunus mume* 'Xuemei' is marked after the dot.

图 3 *PmERF4* 与其他物种 ERF 氨基酸序列系统进化树分析

Fig.3 The phylogenetic tree of ERF4 from *Prunus mume* 'Xuemei' and other plants based on amino acid sequences



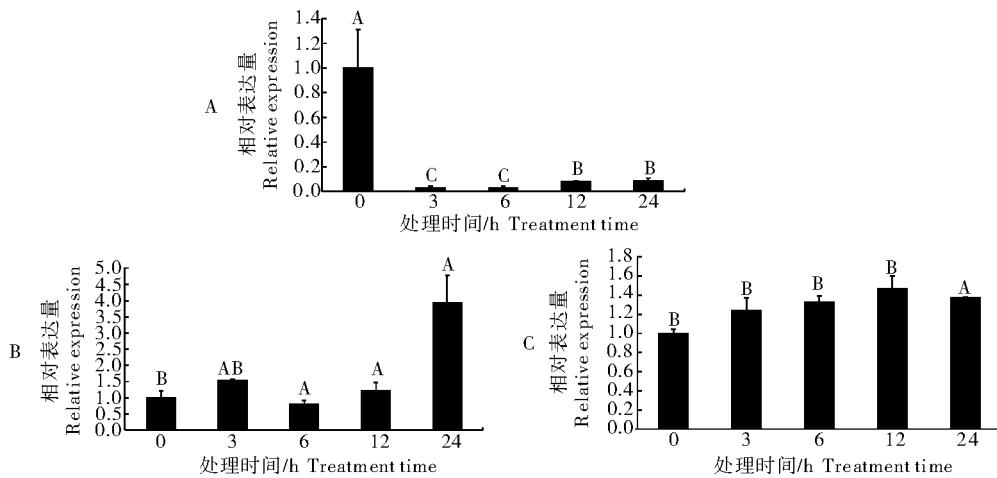
A. 低温处理; B. 盐处理; C. H₂O₂ 处理; D. 甘露醇处理。柱间字母表示差异显著性($P < 0.01$),以 *PmEF1α* 为内参基因进行标准化定量,把对照(0 h)的表达量设为 1,数据为 3 次重复实验的平均值±标准误。下同。A. Cold treatment; B. Salt treatment; C. H₂O₂ treatment; D. Mannitol treatment. Letters between columns indicate significant differences at 0.01 level. *PmEF1α* is used as an internal control for the normalization(mean ± SE). The gene expression at 0 h is defined as 1 and expression patterns of other time points are accordingly calculated. The error bars indicate standard deviations for three independent replicates. The same as follows.

图 4 *PmERF4* 在不同非生物胁迫下的表达水平

Fig.4 The expression levels of *PmERF4* under different abiotic stress

2) ‘雪梅’*PmERF4* 基因在ABA、MeJA 和 SA 处理下的表达模式(图 5)。‘雪梅’茎段培养瓶中分别加入 100 μmol/L ABA、100 μmol/L MeJA 或 500 μmol/L SA,结果显示:在ABA 处理 3 h 后 *PmERF4* 表达量显著下降,且处理 24 h 内都显著低于对照,说明 ABA 处理负调控该基因的表达

(图 5A)。*PmERF4* 基因在 MeJA 处理下的表达模式与甘露醇相似,在处理前期表达量与处理前相比差异不大,高峰值出现在处理 24 h 时,约为处理前的 4 倍(图 5B)。SA 处理后,*PmERF4* 在处理 6 h 后与对照相比,表达量虽有差异,但高峰值仅为对照的 1.46 倍,说明该基因对 SA 处理不敏感(图 5C)。



A.ABA 处理; B.MeJA 处理; C.SA 处理。A.ABA treatment; B.MeJA treatment; C.SA treatment.

图 5 *PmERF4* 在不同激素处理下的表达水平

Fig.5 The expression levels of *PmERF4* under different hormone treatment

3 讨 论

植物在生长发育过程中会受到各种逆境胁迫的影响。其中,低温是影响植物生长发育、限制植物地理分布的关键环境因子之一。为抵御低温导致的伤害,植物在漫长的进化过程中逐渐形成了一系列精细而高效的转录调控机制以适应和抵抗低温。研究证明,ERF 转录因子在植物生长发育、逆境调控和激素信号转导过程中发挥重要作用。该转录因子广泛存在于不同的植物中,目前在拟南芥^[15]、水稻^[4]、大豆^[16]、葡萄^[17]、番茄^[9]、甜橙^[18]、橡胶树^[19]、苜蓿^[20]、萝卜^[21]、巴西蕉^[22]和花生^[23]等物种中已有报道,并在一些物种中进行了功能验证,但在园林花卉梅花中并未见报道。

参考梅花基因组序列信息,通过 RT-PCR 扩增,本研究从‘雪梅’中克隆得到 1 个 *PmERF4* 基因;氨基酸序列比对显示 *PmERF4* 蛋白含有典型的 ERF 保守结构域;进化树分析结果显示 *PmERF4* 蛋白与中国樱桃等李属植物的 ERF4 同源性最高,与蔷薇科其他植物的同源性次之,与拟南芥的 AtERF4 蛋白同源性最低。有意思的是,AP2 结构域只有 2 个氨基酸位点存在差异,结构上的保守性暗示了这些氨基酸在功能上可能存在相似性。蔷薇科 ERF 蛋白与拟南芥的 ERF 蛋白沿着两大分支方向进化,而蔷薇科的李属、蔷薇属和苹果属 ERF 蛋白分别聚类在 3 个小分支上,这与植物系统分类学的进化规律一致,说明蔷薇科内 ERF 基因序列的

复制事件可能要晚于物种间的进化。

PmERF4 基因在低温、高盐、氧化和渗透等非生物胁迫下的表达分析结果表明,*PmERF4* 基因对低温和氧化胁迫都有响应,但响应程度不一样。*PmERF4* 基因能够持续而强烈地响应低温胁迫,也能响应氧化胁迫,但不如低温胁迫强烈。这一结果与‘雪梅’低温表达谱数据分析结果基本一致。此外,*PmERF4* 对渗透胁迫的响应相对不敏感,而且高盐会抑制其表达。研究表明,一些 ERF 转录因子能够整合不同的植物激素信号途径^[24]。在本研究中,*PmERF4* 基因对 MeJA 和 SA 处理相对不敏感,而 ABA 处理会显著抑制该基因表达,我们推测 *PmERF4* 基因可能是通过非 ABA 依赖型途径参与梅花低温胁迫应答,这一推论需要进一步的验证。这些结果说明 *PmERF4* 基因对不同非生物胁迫和激素处理的响应程度不一样,可能是因为梅花基因组上有 55 个 ERF 基因^[25],这些 ERF 基因功能的分化导致某个或某类 ERF 基因有偏向性地响应某种或某几种胁迫或激素处理,而基因组上的其他 ERF 基因对其他胁迫响应更敏感。与笔者前期对梅花 *PmCBFs* 基因在各种非生物胁迫下的表达研究结果^[2]类似,*PmCBFb* 基因更响应低温胁迫,对甘露醇处理不敏感,而 *PmCBFc* 基因则更响应氧化胁迫。ERF 基因对不同非生物胁迫的响应程度不一样的研究结果也同样出现在番茄、花生和甜橙等植物中。如番茄的一类 ERFs 特异地响应低温和高温胁迫,而另一类 ERFs 基因则更容易被高盐、水

涝胁迫诱导^[9]。花生 AhERF3 基因在叶片组织中,低温和高盐胁迫的表达情况与 PmERF4 基因一致,但对渗透胁迫的响应有所差异^[23]。甜橙 ERF 基因可以被低温、干旱、高盐和激素如 ABA、MeJA 和乙烯诱导,但主要受低温和乙烯诱导^[18]。

在本研究中,我们克隆了 1 个‘雪梅’PmERF4 基因,初步确定了该基因受低温和氧化胁迫诱导,尤其是对低温响应非常强烈。我们推测‘雪梅’PmERF4 基因参与了梅花响应低温和氧化胁迫的过程,可能在梅花抗寒过程中起重要作用。但对其功能的验证及其抗寒分子机制的揭示,仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 陈俊愉.中国梅花品种图志[M].北京:中国林业出版社,2010,1-8.
- [2] PENG T, GUO C, YANG J, et al. Overexpression of a Mei (*Prunus mume*) CBF gene confers tolerance to freezing and oxidative stress in *Arabidopsis*[J]. Plant cell tissue and organ culture, 2016, 126(3):373-385.
- [3] 张杰,张启翔,杨炜茹.梅花 CBF 转录因子的克隆及表达[J].西北植物学报,2012,32(8):1505-1510.
- [4] OHME-TAKAGI M, SHINSHI H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element[J]. The plant cell, 1995, 7:173-182.
- [5] 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(2):411-432.
- [6] AKUMA 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 and biophysical research communications, 2002, 290(3):998-1009.
- [7] YAMAMOTO S, SUZUKI K, SHINSHI H. Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells[J]. The plant journal, 1999, 20(5):571-579.
- [8] 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]. The plant cell, 2000, 12:771-785.
- [9] KLAY I, GOUIA S, LIU M, et al. Ethylene response factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants[J]. Plant science: an international journal of experimental plant biology, 2018, 274:137-145.
- [10] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeatDRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1997, 94:1035-1040.
- [11] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP_AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene[J]. The plant cell, 1998, 10:1391-1406.
- [12] DUBOUZET J G, SAKUMA Y, ITO Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression [J]. The plant journal, 2003, 33:751-763.
- [13] ZHANG Q, CHEN W, SUN L, et al. The genome of *Prunus mume*[J]. Nature communications, 2012, 3:1318.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [15] JOFUKU K D, BOER B G W, VAN-MONTAGU M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*[J]. The plant cell, 1994, 6: 1211-1225.
- [16] ZHAI Y, SHAO S, SHA W, et al. Overexpression of soybean *GmERF9* enhances the tolerance to drought and cold in the transgenic tobacco[J]. Plant cell tissue and organ culture, 2016, 128(3):607-618.
- [17] SUN X, ZHAO T, GAN S, et al. Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ethylene response factor 057[J]. Scientific reports, 2016, 6: 24066.
- [18] MA Y, ZHANG L, ZHANG J, et al. Expressing a *Citrus* ortholog of *Arabidopsis ERF1* enhanced cold-tolerance in tobacco[J]. Scientia horticulturae, 2014, 174:65-76.
- [19] LESTARI R, RIO M, MARTIN F, et al. Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor *HbERF-IXc5* enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation[J]. Plant biotechnology journal, 2018, 16(1): 322-336.
- [20] ZHUO C, LIANG L, ZHAO Y, et al. A cold responsive ethylene responsive factor from *Medicago falcata* confers cold tolerance by up-regulation of polyamine turnover, antioxidant protection, and proline accumulation[J]. Plant cell and environment, 2018, 41(9):2021-2032.
- [21] LI M Y, XU Z S, HUANG Y, et al. Genome-wide analysis of AP2_ERF transcription factors in carrot (*Daucus carota* L.) reveals evolution and expression profiles under abiotic stress [J]. Molecular genetics genomics, 2015, 290:2049-2061.
- [22] 侯晓婉,胡伟,徐碧玉,等.香蕉 2 个 ERF 转录因子的克隆及功能研究[J].果树学报,2017,34(7):806-816.

- [23] CHEN N, YANG Q, SU M, et al. Cloning of six ERF family transcription factor genes from peanut and analysis of their expression during abiotic stress[J]. *Plant molecular biology reporter*, 2012, 30(14): 1415-1425.
- [24] SINGH K B, FOLEY R C, OÑATE-SÁNCHEZ L. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. *Current opinion in plant biology*, 2002, 5(5): 430-436.
- [25] DU D, HAO R, CHENG T, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Prunus mume*[J]. *Plant molecular biology reporter*, 2012, 31(3): 741-750.

Cloning and expression of *PmERF4* gene in *Prunus mume*

PENG Ting¹ FENG Lanping² WANG Yiqin¹ REN Jing¹ BAO Manzhu² ZHANG Junwei²

1. *Key Laboratory of Germplasm Innovation on Protection and Conservation of Mountain Plant Resources, Ministry of Education/College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China*;

2. *Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract ERF (ethylene response factor) transcription factor plays a critical role in response to environmental stress and hormonal signal transduction in plants. To elucidate the function of *ERF* gene in *Prunus mume*, the *PmERF4* gene was cloned from a *Prunus mume* ‘Xuemei’ by RT-PCR. The full-length cDNA sequence of *PmERF4* was 842 bp with an open reading frame (ORF) of 690 bp, encoding 229 amino acids. The deduced amino acid sequence alignment of *PmERF4* contained a conserved AP2/ERF domain. The result of phylogenetic analysis showed the *PmERF4* was highly homologous to other proteins in *Prunus* genus. qRT-PCR was conducted to examine the expression patterns of *PmERF4* under abiotic stress and hormone treatment. The results showed that *PmERF4* was induced by cold and H₂O₂ stress. The induction levels of the gene were different between cold and H₂O₂ stress. A continuous and strong response of *PmERF4* was triggered by cold. *PmERF4* was insensitive to mannitol, MeJA and SA treatment and its expression was inhibited by NaCl and ABA. It is indicated that *PmERF4* from *Prunus mume* may be involved in response to cold and H₂O₂ stress.

Keywords *Prunus mume*; ethylene responsive transcriptional factor; abiotic stress; hormone; gene cloning; gene expression

(责任编辑:张志钰)