

# 苹果脱水反应元件结合蛋白 A4 亚家族成员 *MdTINY* 的功能分析

张海园, 王寻, 王晴, 由春香\*

山东农业大学 园艺科学与工程学院 山东省苹果技术创新中心 山东果蔬优质高效生产协同创新中心 小麦育种全国重点实验室, 山东 泰安 271018

张海园, 王寻, 王晴, 由春香. 苹果脱水反应元件结合蛋白 A4 亚家族成员 *MdTINY* 的功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4183-4197.

ZHANG Haiyuan, WANG Xun, WANG Qing, YOU Chunxiang. Functions of *MdTINY*, a member of the apple dehydration responsive element binding-A4[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4183-4197.

**摘要:** 脱水反应元件结合蛋白(dehydration responsive element binding, DREB)转录因子在植物生长和发育过程中发挥重要作用, 并且广泛参与各种非生物胁迫响应。DREB 共含有 6 个亚族, TINY 属于 DREB-A4 亚家族, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtTINY* 在植物生长与抵御逆境中起到了重要的调节作用。为了探究苹果(*Malus domestica*) DREB-A4 亚家族的进化特征及 *MdTINY* 基因的生物学功能, 本研究利用 GDDH13、TAIR 等数据库和 Expasy、WoLF PSORT 等在线软件, 研究了苹果中 DREB-A4 亚族的生物学信息, 并预测了蛋白质三级结构。苹果 DREB-A4 亚族含有 22 个基因, 均含有 1 个保守的 AP2 结构域, 亚细胞定位预测结果显示 DREB-A4 亚族蛋白主要定位于细胞核中。通过农杆菌转化法获得 *MdTINY* 的转基因愈伤组织, 结合实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)与花青苷含量检测, 探究了 *MdTINY* 的主要生物学功能。*MdTINY* 与 *AtTINY* 的亲缘关系更近, 蛋白相似度最高, *MdTINY* 的编码区全长为 759 bp, 编码 252 个氨基酸, 启动子元件和表达模式分析表明, *MdTINY* 基因能够响应光照和多种胁迫处理。亚细胞定位检测结果显示, *MdTINY* 蛋白定位于细胞核中, 转录自主激活活性验证实验显示, *MdTINY* 具有自主激活活性。过表达 *MdTINY* 抑制了愈伤组织的正常生长, 促进了愈伤组织的花青苷积累。以上结果表明, *MdTINY* 负调控苹果植株生长, 能够促进果实着色。本研究为苹果优质色泽品种培育提供了候选基因。

**关键词:** 苹果; *MdTINY*; 花青苷; 植物生长; 亚细胞定位

资助项目: 国家自然科学基金(32172538)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172538).

\*Corresponding author. E-mail: youchunxiang@sdau.edu.cn

Received: 2024-02-19; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-07

# Functions of *MdTINY*, a member of the apple dehydration responsive element binding-A4

ZHANG Haiyuan, WANG Xun, WANG Qing, YOU Chunxiang\*

National Key Laboratory of Wheat Improvement, Shandong Collaborative Innovation Center of Fruit & Vegetable Quality and Efficient Production, Apple Technology Innovation Center of Shandong Province, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

**Abstract:** The dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors play an important role in plant growth and development and are extensively involved in plant responses to abiotic stress. The DREB family contains six subfamilies, and TINY belongs to the DREB-A4 subfamily. The *Arabidopsis thaliana* TINY gene, *AtTINY*, plays a role in regulating plant growth and responses to stress. In order to investigate the evolutionary characterization of the DREB-A4 subfamily and the biological function of the *MdTINY* gene in apple (*Malus domestica*), in this study, we used the databases GDDH13 and TAIR and online tools (Expasy and WoLF PSORT) to study the biological information of the DREB-A4 subfamily in apple. In addition, the tertiary structures of the proteins were predicted. The apple DREB-A4 subfamily contained 22 genes, all of which had a conserved AP2 domain, and subcellular localization predictions showed that DREB-A4 subfamily proteins were mainly located in the nucleus. The transgenic calli of *MdTINY* were obtained by the *Agrobacterium*-mediated transformation method, and the main biological functions of *MdTINY* were explored by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) combined with anthocyanin content determination. *MdTINY* shared the highest amino acid sequence similarity with *AtTINY*. The coding region of *MdTINY* had a full length of 759 bp, encoding 252 amino acid residues. Analysis of the promoter elements and expression patterns indicated that *MdTINY* was responsive to light and multiple stress conditions. *MdTINY* was localized in the nucleus and had transcriptional autoactivation activity. The overexpression of *MdTINY* in calli inhibited normal growth and promoted anthocyanoside accumulation. These results indicated that *MdTINY* negatively regulated apple plant growth and promoted fruit coloring, providing a candidate gene for the breeding of apple varieties with high quality of fruit color.

**Keywords:** apple; *MdTINY*; anthocyanin; vegetative growth; subcellular localization

AP2/乙烯响应因子(APETALA2/ethylene-responsive factor, ERF)是植物中最大的转录因子家族之一,这一家族的成员能够编码1个或多个约60个氨基酸长度的保守AP2结构域。拟南芥中AP2/ERF转录因子家族被分为DREB、AP2、ERF、RAV (related to ABI3/VP1)和Soloist这5个亚家族<sup>[1]</sup>。DREB家族基因广

泛地参与植物各种非生物胁迫和次生代谢进程, DREB家族蛋白质的第14、19位氨基酸分别为缬氨酸和谷氨酸, DREB家族基因可进一步被细分为A1-A6这6个亚家族<sup>[2]</sup>。据报道,苹果MdDREB家族中存在6个亚族,共68个成员,实时荧光定量PCR显示,部分苹果MdDREB家族基因,可能在苹果应对干旱、盐、

脱落酸(abscisic acid, ABA)等非生物胁迫方面发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。DREB 家族基因可以特异性地结合 DRE/CRT 基序,从而参与激素、生物和非生物胁迫、生长和生殖发育调控等进程<sup>[4]</sup>。不同植物中的 DREB 家族成员在干旱、寒冷和高盐胁迫中的应答作用也被广泛研究<sup>[5]</sup>。*DREB1* 的表达受到 ICE1 和 HOS1 等上游转录因子的调节,该基因能够增强拟南芥植株抵御冷胁迫的能力<sup>[6]</sup>。DREB1 和 DREB2 参与调控 ABA 非依赖途径,而部分 DREB 家族蛋白在 ABA 依赖途径中发挥作用,说明二者之间存在串扰<sup>[7]</sup>。小麦(*Triticum aestivum*) *TaDREB3* 能够调控 *RD29A*、*LEA7*、*HSP70* 等应激基因的表达水平,增强了转基因植株对干旱和盐胁迫的耐受性<sup>[8]</sup>。DREB-A4 亚族在拟南芥中有 17 个家族成员<sup>[9]</sup>,该家族的生物学功能在拟南芥中已经被很好地表征。

*AtERF040* 属于拟南芥 DREB-A4 亚家族成员,过表达 *AtERF040* 导致拟南芥的下胚轴和根部变短,抑制了拟南芥的正常生长,因此该基因被命名为 *AtTINY*<sup>[10]</sup>。过表达 *AtTINY* 植株生长发育迟缓,对油菜素甾醇(brassinosteroid, BR)生物合成抑制剂的敏感性增加; *tiny1/tiny2/tiny3* 三重突变体受 BR 介导的植株生长效应敏感性显著降低, BR 信号转导相关基因的转录情况受到显著影响,表明 *AtTINY* 负调控 BR 信号从而抑制了拟南芥的正常生长。*AtTINY* 能够调节 *IAA19*、*RD29A* 和 *CESA5* 等干旱响应基因的表达,增强了转基因植株的抗旱性<sup>[11]</sup>。玫瑰(*Rosa chinensis*) *RcTINY2* 基因的表达水平受到 ABA、干旱和盐处理的显著影响。*RcTINY2* 蛋白定位于细胞核中,并在酵母细胞中表现出转录激活活性。过表达 *RcTINY2* 的拟南芥植株,在种子萌发和幼苗生长期均表现出对 ABA、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)和

NaCl 的敏感性增加,根系生长和侧根数减少<sup>[12]</sup>。玉米(*Zea mays*) *ZmDREB4.1* 定位于细胞核中,可以直接结合 DRE 基序。异源转化 *ZmDREB4.1* 烟草植株,降低了烟草细胞的伸长,抑制了下胚轴、叶柄和茎的延伸;同时限制了烟草细胞的分裂再生,导致烟草叶片窄小<sup>[13]</sup>。番茄(*Solanum lycopersicum*) *SIDREBA4* 的表达水平在高盐、干旱、寒冷等处理下显著升高。过表达 *SIDREBA4* 的番茄诱导了茉莉酸、水杨酸(salicylic acid, SA)和乙烯等激素相关生物合成基因的表达,增强了番茄植株对高温的耐受性<sup>[14]</sup>。

花青苷广泛地分布在植物的花、果、叶、茎和种子中,它的含量会影响果实的色泽,是评价果实外观品质的一项重要指标,由细胞质合成,之后被运输到液泡中进行贮存<sup>[15]</sup>。花青苷具有抗氧化、清除活性氧等功能,可以提高植物对多种胁迫的抵抗作用,同时也是衡量植物抗性的一个重要生理指标<sup>[16]</sup>。

本研究通过搜索和比对苹果基因组,确定了苹果 DREB-A4 亚族的 22 个基因,它们均含有保守的 AP2 保守结构域,亚细胞定位预测显示,该亚族蛋白主要定位于细胞核中,同时对它们进行了三级结构预测。为了进一步解析苹果 DREB-A4 亚家族的生物学功能,选取与拟南芥 *AtTINY* (DREB-A4 亚家族)蛋白结构相似的 *MdTINY* 探究其生物学功能。过表达 *MdTINY* 抑制了苹果愈伤组织的正常生长,促进了愈伤组织花青苷的积累。本研究为探究优质外观表型苹果育种提供了新的思路和基因资源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 *MdDREB-A4* 成员鉴定

从拟南芥 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>)中获取拟南芥 DREB-A4 家族成员信息。利用拟南芥 DREB-A4 亚族基因搜

索比对苹果双单倍体 GDDH13 基因组数据库 (<https://iris.angers.inra.fr/gddh13/>) 获得苹果 DREB-A4 亚族基因和蛋白质序列<sup>[17]</sup>。

## 1.2 MdDREB-A4 的生物信息学分析

采用在线软件 ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 MdDREB-A4 亚族的蛋白质分子量、等电点等进行预测分析; 利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对苹果进行三级结构分析<sup>[18]</sup>; NOVO PRO (<https://www.novopro.cn/tools/secondary-structure-prediction.html>) 进行蛋白质二级结构比对; MEME-SUITE (<https://meme-suite.org/meme/>) 进行亚族蛋白质基序分析; 使用 Plant CARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子顺式作用元件分析; 使用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 进行蛋白质亚细胞定位预测; 使用 PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>) 进行信号序列类型和分布分析<sup>[19]</sup>。

## 1.3 载体构建

选取合适的酶切位点, 以苹果组培苗 GL3 的 cDNA 为模板, PCR 扩增所需要的目的序列, 并回收目的片段; 使用同源重组技术构建 35S::MdTINY-pRI101、35S::MdTINY-RDK9、pGADT7-MdTINY 和 pGBKT7-MdTINY 重组载体, 转入大肠杆菌中过夜培养, 筛选阳性菌落, 提取质粒, 转化到 GV3101 农杆菌中<sup>[20]</sup>。

## 1.4 试验材料和生长条件

愈伤组织: 苹果‘王林’(Orin)愈伤组织, 在 Murashige 和 Skoog 培养基 (Murashige and Skoog medium, MS) 愈伤组织继代培养基上进行暗培养, 温度为 22–25 °C, 每隔 15 d 左右进行继代。选取长势基本一致、生长 12 d 左右的愈伤组织, 在 MS 愈伤组织继代培养基中进行生长状态观察。将生长状态良好的苹果愈伤组织转移到  $OD_{600}$  在 0.5 左右的菌液中, 黑暗环境

振荡培养 15 min, 在无任何抗性的培养基中培养 2 d, 然后转移至含有卡那霉素 (kanamycin) 的培养基中筛选, 进行苹果愈伤组织的遗传转化实验<sup>[21]</sup>。

苹果幼苗: 25 d 龄的‘平邑甜茶’幼苗, 用 NaCl (150 mmol/L), PEG 6000 (10%) 和 ABA (100  $\mu$ mol/L) 分别处理。处理 0、1、3、6、12、24、48 h 后, 在不同的时间点对幼苗进行取样<sup>[22]</sup>。

## 1.5 实时荧光定量 PCR 分析

使用 RNA 植物提取试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司), 提取苹果幼苗和愈伤组织中的 RNA; 使用逆转录试剂盒 (莫纳生物公司) 将提取的 RNA 逆转录为 cDNA; 在 iCycler iQ5 (Bio-RAD) 仪器上进行实时荧光定量 PCR 检测, PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。反应体系 20  $\mu$ L。使用苹果 18S 为内参基因, 并通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法分析基因的相对表达水平<sup>[23]</sup>。用于定量 PCR 反应的引物见表 1。

## 1.6 花青苷总量检测

称取 1 g 苹果愈伤组织鲜样, 充分研磨, 加入 5 mL 提取液 [95% 乙醇: 1.5 mol/L HCl = 85:15 (体积比)], 置于黑暗处 12 h, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 使用分光光度计测定  $A_{530}$ 、 $A_{620}$  和  $A_{650}$  的吸光度值, 计算总花青苷含量<sup>[24]</sup>。

## 1.7 亚细胞定位和自激活检测

亚细胞定位: 将 35S::MdTINY-RDK9 重组载体转化到 GV3101 农杆菌中, 进行农杆菌活化, 调整  $OD_{600}$  至 1.2 左右, 注射到健康生长的烟草叶片中, 培养 2 d, 用激光共聚焦显微镜, 观察 GFP 在烟草细胞中的分布情况<sup>[25]</sup>。

转录自激活验证: 将 pGADT7 (5  $\mu$ L) + pGBKT7 (5  $\mu$ L), pGADT7-MdTINY (5  $\mu$ L) + pGBKT7 (5  $\mu$ L), pGADT7 (5  $\mu$ L) + pGBKT7-MdTINY (5  $\mu$ L) 这 3 组混合载体分别转化进入 Y2H 酵母感受态 (50  $\mu$ L)

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sense primer (5'→3')
<i>Md18S</i> (qRT)-F	GGGTTTCGATTCCGGAGAGG
<i>Md18S</i> (qRT)-R	CCGTGTCAGGATTGGGTAAT
<i>MdTINY</i> -F	ATGAGCGCTGATCAACCCCAAA
<i>MdTINY</i> -R	ATTATTATAGTCCCATAACAAACCC TCA
<i>MdTINY</i> (qRT)-F	TTTGGTGGGTAAGTCGGTTTCTTGG
<i>MdTINY</i> (qRT)-R	CCTCCTTCCTCGCCTTCCTCAC
<i>MdDFR</i> (qRT)-F	GTTGAGGGAGATAGGGTTTGAG
<i>MdDFR</i> (qRT)-R	GGTAAATGTAAAACAATAGAGAGG
<i>MdANR</i> (qRT)-F	TCAACAAAAGATACCCCCAG
<i>MdANR</i> (qRT)-R	GATAGCTAGCTCGATACATGC
<i>MdF3H</i> (qRT)-F	GCCGATCACCTACCCGAG
<i>MdF3H</i> (qRT)-R	GTACAAGAAGTGGGAAGGC

中,调整菌液初始浓度  $OD_{600}$  至 0.9 左右,设置  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  这 4 个浓度梯度。Y2H 酵母在 SD/-Leu-Trp 和 SD/-Ade-His-Leu-Trp 培养基上生长 2 d 左右,观察生长状态<sup>[25]</sup>。

### 1.8 数据统计分析

使用数据处理系统(data processing systems, DPS)软件分析所有数据的显著差异,不同的小写字母代表显著的差异( $P < 0.05$ )。每个实验设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 DREB-A4 亚家族鉴定及生物信息学分析

在 TAIR 数据库中,共含有 *AtTINY* (*AT5G25810*)等 17 个拟南芥 DREB-A4 亚家族成员,但 *At1G63040* 基因在 TAIR 中被注释为假基因,基因序列全长目前仍不明确,在本研究中不讨论其蛋白质具体信息。为了探究苹果 DREB-A4 亚家族成员信息,使用金冠苹果 GDDH13 的基因组为参考基因组,通过同源序列比对,在苹果基因组中共筛选到 22 个 DREB-A4 亚

家族成员,这些成员均含有保守的 AP2 结构域。苹果 DREB-A4 亚家族成员蛋白质相对分子质量介于 19 413.55 (MD08G1213600)–44 015.92 (MD07G1099500) Da,编码区长度介于 534–1 203 bp,其中 MD07G1099500 的编码区最长为 1 203 bp,编码 400 个氨基酸。苹果 DREB-A4 亚家族蛋白质理论等电点介于 4.82–7.56,MD07G1099500 为中性,其他家族成员均偏酸性。转录因子进入细胞核对于其发挥生物学功能具有重要意义,本研究所识别的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)均属于经典核定位信号(cNLS),包括 2 类:单分型 NLS (分 2 种序列模式:pat4 和 pat7)和双分型 NLS (bipartite 模式),预测结果显示,MD01G1196300、MD07G1263200、MD12G1019000、MD14G1017000 既没有 pat4 定位也没有 pat7 定位,以上核定位预测信息可以支持 MdDREB-A4 为转录因子。蛋白分子量、理论等电点、核定位信号等 MdDREB-A4 亚家族蛋白质详细信息见表 2。对苹果 DREB-A4 亚家族蛋白质进行三级结构建模(图 1),结果发现,DREB-A4 亚家族蛋白中普遍具有高占比的无规卷曲。

### 2.2 苹果 DREB-A4 亚家族成员 TINY 的序列比对与启动子分析

将拟南芥 *AtDREB-A4* 亚家族中除 *At1G63040* 外的 16 个家族蛋白与 *MdTINY* (MD08G1114100) 蛋白进行蛋白质基序分析,结果显示,*MdTINY* 与 *AtTINY* (*AT5G25810*)蛋白具有多个保守基序,其中 AP2 保守结构域覆盖 *MdTINY* 全长蛋白的第 65–122 位氨基酸(图 2)。蛋白质二级结构比对结果显示,*MdTINY* 与 *AtTINY* 蛋白质的二级结构具有较高相似性。*MdTINY* 的蛋白质二级结构中无规卷曲占比最高,为 59.94%,编码区全长 759 bp,编码 252 个氨基酸(图 3)。为了进一步探究苹果 *MdTINY* 的生物学功能,

表 2 苹果 MdDREB-A4 成员信息

Table 2 Information of MdDREB-A4 in apple

Sequence number	Molecular weight (Da)	Number of amino acids	Theoretical pI	Subcellular localization	NLS: pat4 and pat7	NLS: bipartite
MD01G1083000	20 591.89	186	6.07	nucl: 12, mito: 2	4: 37-RKRR 4: 51-PRKK 7: 51-PRKKSRI	37-RKRRWGKWWSEIREPRK3 8-KRRWGKWWSEIREPRKK 39-RRWGKWWSEIREPRKKS
MD01G1196300	25 057.82	235	4.94	nucl: 11, mito: 1, plas: 1, golg: 1	—	—
MD02G1060200	29 869.77	275	4.90	nucl: 14	4: 82-PRKK 7: 49-PDQKRAR 7: 82-PRKKSRI	—
MD02G1217800	39 382.54	359	6.15	nucl: 13, chlo: 1	4: 79-KRKK 4: 201-KKKR 4: 264- KRKK	—
MD02G1217900	30 247.09	278	5.79	nucl: 13, cyto: 1	4: 80- KKKR 4: 116-PRKK 7: 116-PRKKSRI	66-KKGQRPNEKEQGNKKK
MD04G1060400	28 796.56	260	5.41	nucl: 14	4: 112-PRKK 7: 112-PRKKSRI	—
MD04G1067700	29 004.90	264	5.68	nucl: 14	7: 109-PRKTKRI	—
MD06G1053600	28 062.89	253	5.25	nucl: 14	4: 110-PKKK 7: 110-PKKSRI	—
MD07G1099400	31 984.32	292	5.38	nucl: 13, cyto: 1	4: 92-KKKR 4: 128-PRKK 7: 128-PRKKSRI	78-KKGQEPNEKEQGNKKK
MD07G1099500	44 015.92	400	7.56	nucl: 13, cyto: 1	4: 33-KKKK 4: 34-KKKR 4: 218-KKKK 4: 219-KKKK 4: 220-KKKR	58-RRRTKWWSEISDKGKKF 59-RRTKWWSEISDKGKKFR 250-RKNGKKGWVISQKGGKLL
MD07G1151700	21 019.20	188	5.79	nucl: 14	4: 36-RKRR 4: 50-PRKK 7: 50-PRKKSRI	36-RKRRWGKWWSEIREPRK 37-KRRWGKWWSEIREPRKK 38-RRWGKWWSEIREPRKKS
MD07G1263200	24 445.11	228	4.82	nucl: 9, plas: 3, cyto: 1, mito: 1	—	—
MD08G1114100	27 755.65	252	5.12	nucl: 13.5, cyto_nucl: 7.5	4: 84-PRKK 7: 84-PRKKSRI	—
MD08G1213600	19 413.55	178	4.85	nucl: 14	4: 22-RKRR	—
MD09G1206700	26 222.00	241	6.20	nucl: 12.5, cyto_nucl: 7.5, cyto: 1.5	4: 52- KRKR 4: 87-PRKK 7: 87-PRKKSRI	40-KKPSREQQVVLKRKRDR 73- RKRNWGKWWSEIREPRK 74-KRNWGKWWSEIREPRKK
MD12G1019000	22 561.87	210	5.03	chlo: 11, nucl: 3	—	40-RRRSSGKWWSEIREPKK
MD14G1017000	21 723.10	199	5.28	chlo: 10, nucl: 3, mito: 1	—	29-RRRSSGKWWSEIREPKK
MD15G1093800	26 829.79	245	5.11	nucl: 14	4: 84-PRKK 7: 84-PRKKSRI	—

(待续)

(续表 2)

Sequence number	Molecular weight (Da)	Number of amino acids	Theoretical pI	Subcellular localization	NLS: pat4 and pat7	NLS: bipartite
MD15G1193700	30 211.34	281	5.42	nucl: 14	4: 88-PRKK 7: 52-PDQKRAK 7: 88-PRKKNRI	—
MD15G1396500	22 231.94	201	5.28	nucl: 14	4: 19-RKRK 7: 33-PGKKTRI	—
MD15G1396900	19 685.86	180	5.40	nucl: 14	4: 22-RKRK	—
MD17G1187300	26 449.32	243	5.61	nucl: 12, cyto: 1, mito: 1	4: 53-KRKR 4: 54-RKRH 4: 88-PRKK 7: 88-PRKKSRI	40-KKPSSEQQQVILKRKR

Numbers represent WoLF PSORT II predicted scores, nucl: Nucleus; cyto: Cytoplasm; chlo: Chloroplast; mito: Mitochondrion. The number before the underscore represents the starting position of the signal sequence, NLS: Nuclear localization signal.

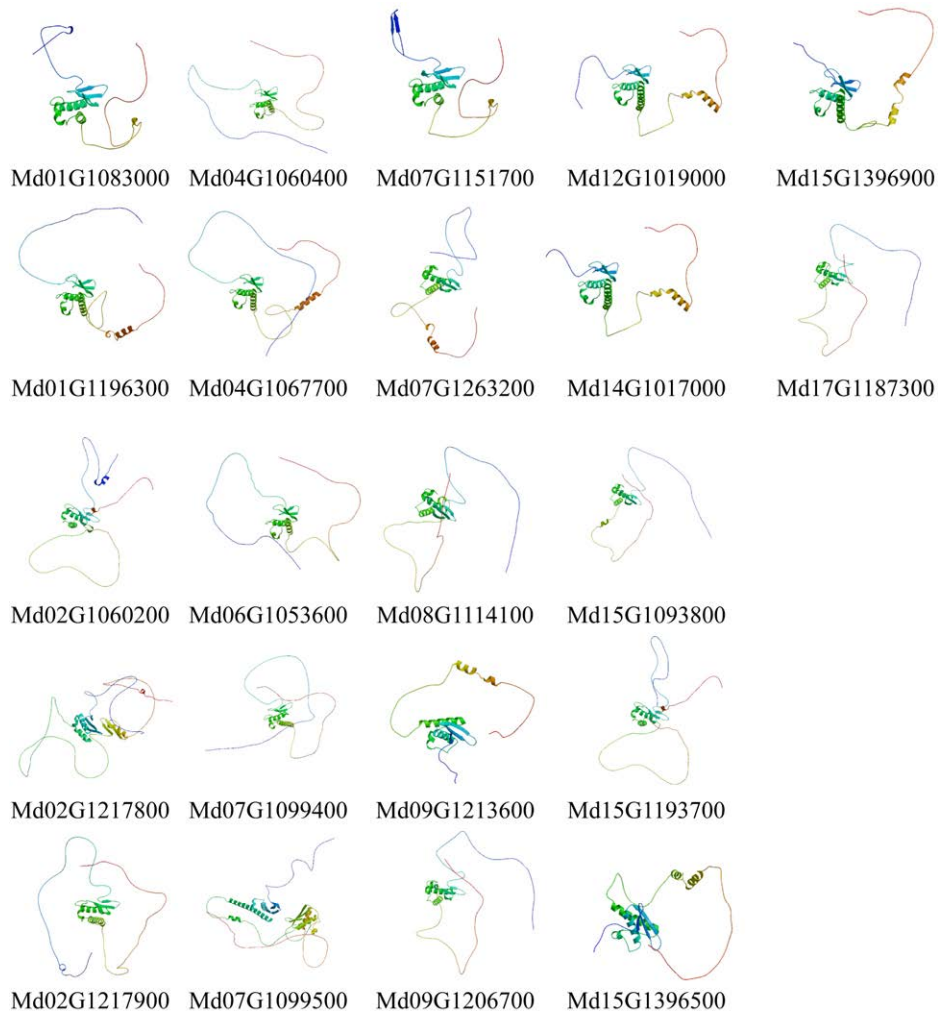


图 1 MdDREB-A4 蛋白质三级结构模式图

Figure 1 Tertiary structure diagrams of MdDREB-A4 proteins.

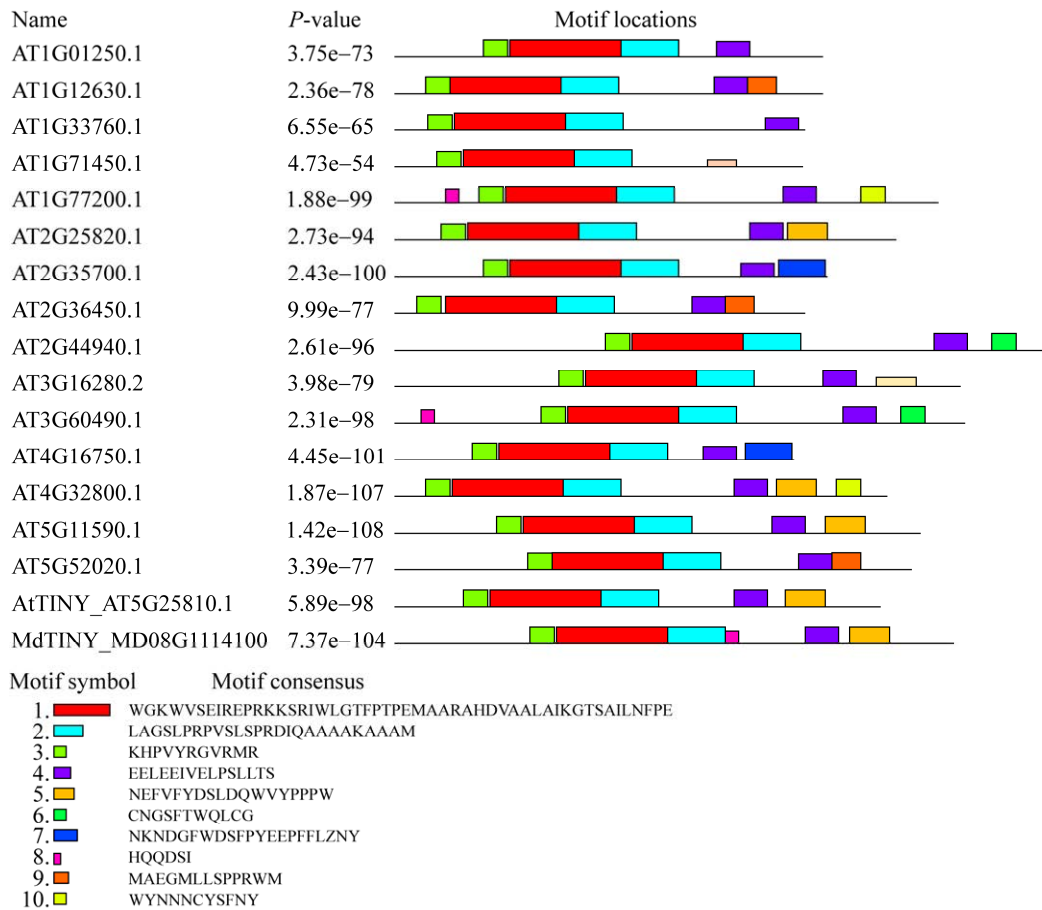


图2 MdTINY与AtDREB-A4蛋白保守基序分析

Figure 2 Conserved motif analysis of MdTINY and AtDREB-A4 proteins.

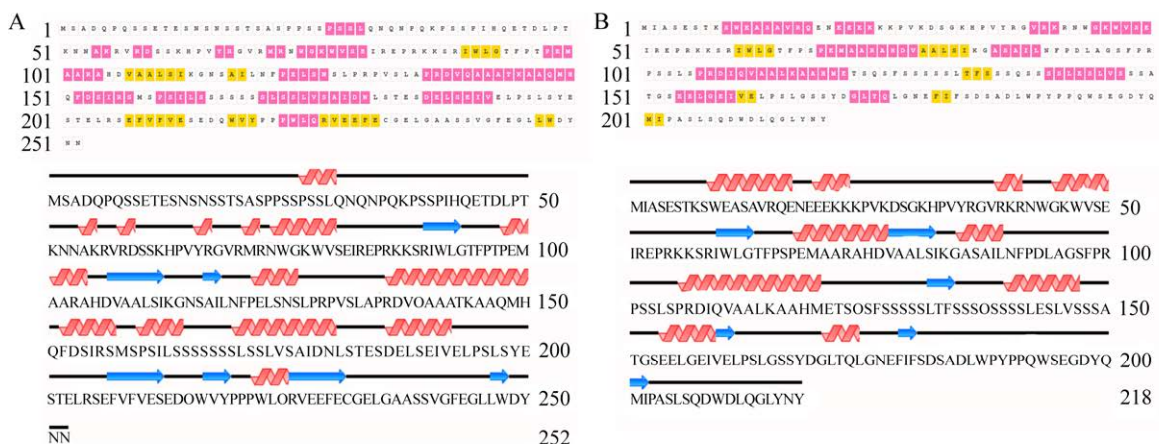


图3 MdTINY与AtTINY二级结构比对 A: MdTINY二级结构序列. B: AtTINY二级结构序列. 粉色代表 helix, 白色代表 coil, 黄色代表 strand

Figure 3 Comparison of MdTINY and AtTINY secondary structures. A: MdTINY secondary structure sequence. B: AtTINY secondary structure sequence. Pink for helix, white for coil, yellow for strand.



使用 Plant CARE 分析 *MdTINY* 启动子中的顺式作用元件, 结果表明, *MdTINY* 包含多个响应元件, 如: 光响应元件 G-Box (CACGTT)、Box 4 (ATTAAT)、G-box (TACGTG), ABA 响应元件 ABRE (ACGTG)、ABRE4 (CACGTA), 响应厌氧诱导的顺式作用元件 ARE (AAACCA), 响应干旱的元件 MBS (CAACTG), 参与低温反应的顺式元件 LTR (CCGAAA) 等, 详细的启动子顺式作用元件信息见表 3。推测 *MdTINY* 可能参与到低温、干旱、光等信号通路中。

### 2.3 苹果 *MdTINY* 表达模式分析

为了探究 *MdTINY* 在非生物应激源中的表达模式, 检测 *MdTINY* 基因在 NaCl (150 mmol/L)、PEG 6000 (10%) 和 ABA (100  $\mu$ mol/L) 处理下的表达模式。150 mmol/L NaCl 处理下, *MdTINY* 在 48 h 表达显著升高(图 4A)。在 100  $\mu$ mol/L ABA 处理条件下, *MdTINY* 在 24 h 表达显著升高(图 4B)。在模拟干旱处理下, 随着时间的推移, *MdTINY* 的表达在 6、12 h 显著高于初始表达水平(图 4C)。这些结果表明, *MdTINY* 在不同应激反应过程中可能发挥着重要的调节作用, 且可能是通过调控植物的生长与抵御逆境的关系来实现的。

## 2.4 *MdTINY* 的亚细胞定位和自主激活活性检测

### 2.4.1 *MdTINY* 的亚细胞定位

前期的亚细胞定位预测提示 *MdTINY* 可能定位于细胞核中。为了探究其真实的定位情况, 在花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV)启动子 CaMV 35S 的驱动下, *MdTINY*-GFP 融合基因在烟草叶片中瞬时表达。结果显示, *MdTINY* 仅在细胞核中被检测到, 说明 *MdTINY* 定位于细胞核中(图 5)。

### 2.4.2 *MdTINY* 的自主激活活性检测

将 pGADT7+pGBKT7、pGADT7-*MdTINY*+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-*MdTINY* 的混合质粒转化进入 Y2H 酵母感受态中培养 2 d, 3 组混合质粒均在 SD/-Leu-Trp 培养基上生长, 表明这些转化是成功的。具有 pGADT7+pGBKT7-*MdTINY* 的 Y2H 酵母转化体在 SD/-Ade-His-Leu-Trp 培养基上生长, 其他 2 组酵母未生长, 表明 *MdTINY* 具有转录自主激活活性(图 6)。

## 2.5 *MdTINY* 过表达抑制苹果愈伤组织生长

为了进一步研究苹果 *MdTINY* 的生物学功能, 将 *MdTINY* 过表达载体(35S::*MdTINY*-pRI101) 转化到苹果愈伤组织中, 获得了 2 个较高表达

表 3 *MdTINY* 启动子区域的顺式作用元件分析

Table 3 *Cis*-elements analysis of *MdTINY* promoter regions

<i>Cis</i> -element name	<i>Cis</i> -element sequence (5'→3')	Function	Location
ABRE	ACGTG	<i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	+252
AuxRR-core	GGTCCAT	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in auxin responsiveness	-816
ABRE4	CACGTA	<i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	+888
G-Box	CACGTT	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	-251
ARE	AAACCA	<i>Cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction	+279
MBS	CAACTG	MYB binding site involved in drought-inducibility	+1 693
LTR	CCGAAA	<i>Cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness	+2 235
Box 4	ATTAAT	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	-1 447
G-box	TACGTG	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	-888

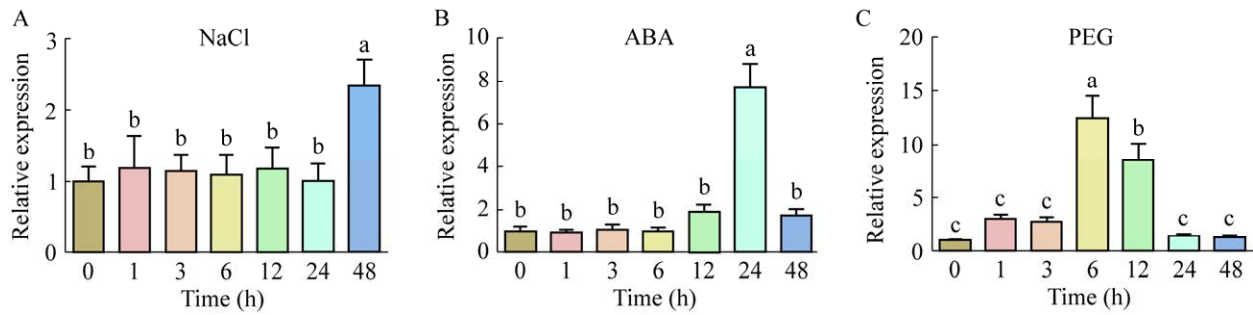


图4 *MdTINY*在不同胁迫处理条件下的表达谱 A: *MdTINY*在150 mmol/L NaCl中的相对表达量. B: *MdTINY*在100  $\mu$ mol/L ABA中的相对表达量. C: *MdTINY*在10% PEG 6000中的相对表达量. 误差条表示3个独立生物学重复的平均值 $\pm$ 标准差( $n=3$ ). 不同小写字母表示差异达到显著水平( $P < 0.05$ )

Figure 4 The expression pattern of *MdTINY* under different stress treatments. A: The relative expression of *MdTINY* in 150 mmol/L NaCl. B: The relative expression of *MdTINY* in 100  $\mu$ mol/L ABA. C: The relative expression of *MdTINY* in 10% PEG 6000. Error bars represent the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ) taken from three independent biological replicates. Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

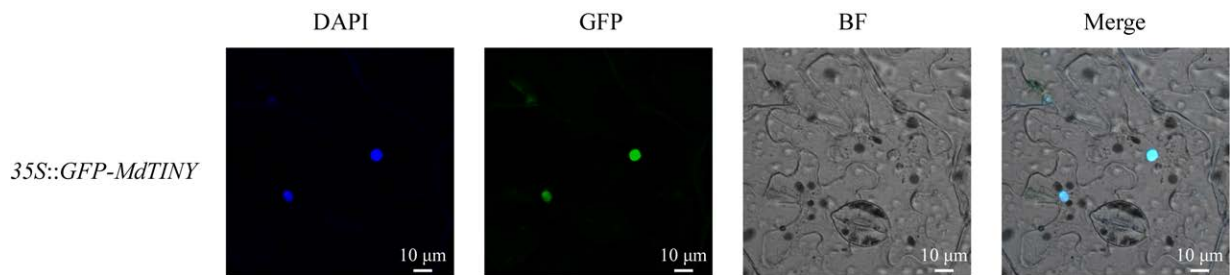


图5 *MdTINY*蛋白的亚细胞定位

Figure 5 Subcellular localization of *MdTINY*. Scale bar=10  $\mu$ m.

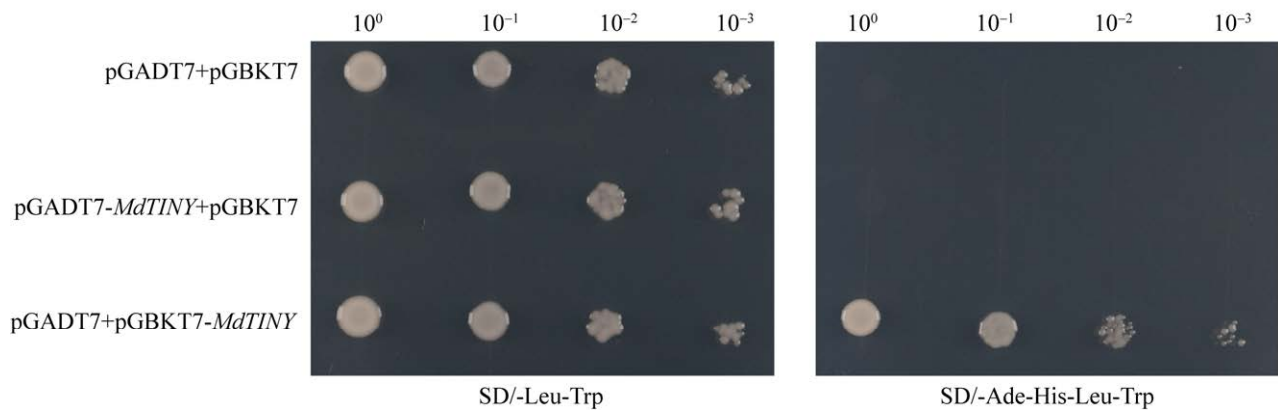


图6 *MdTINY*的自激活活性测定

Figure 6 Determination of *MdTINY* self-activation activity.

量的过表达愈伤组织(图 7A)。将正常生长的野生型(wild type, WT)和 *MdTINY-OX* 愈伤组织, 在同一培养基上黑暗培养 10 d 左右。结果显示, WT 比 *MdTINY-OX* 生长快(图 7B), 同时 *MdTINY-OX* 的鲜重显著低于野生型(图 7C), 说明 *MdTINY* 过表达抑制苹果愈伤组织生长。

## 2.6 *MdTINY* 过表达促进苹果愈伤组织花青苷积累

*MdTINY* 启动子中富含多个光响应元件, 推测其可能参与调控花青苷的合成路径。为了探究其在影响苹果花青苷合成中的作用, 将在黑暗处生长 15 d 的 WT 和 *MdTINY-OX* 愈伤组织, 置于强光照培养箱, 观察愈伤组织的着色情况。在相同光照情况下, *MdTINY-OX* 比 WT 显著促进了花青苷的积累(图 8A), 接着检测了总花青苷含量, 也证明了相同的结果(图 8B)。进一步检测

花青苷合成相关基因的表达水平, 发现 *MdTINY-OX* 转基因愈伤组织中的 *MdANR*、*MdDFR* 和 *MdF3H* 表达水平均显著高于 WT (图 8C–8E)。

## 3 讨论与结论

DREB 亚家族属于 AP2/ERF 转录因子家族, 含有 1 个保守的 AP2 结构域, 广泛地参与植物的生长发育、生物和非生物胁迫进程。DREB 亚家族被细分为 6 个亚族, 它们在调控植株多种代谢途径中发挥重要作用。DREB-A2 亚家族在植物的抗旱、耐盐等方面发挥重要作用, 该亚家族转录水平受到 E3 连接酶和激素信号等调控<sup>[7,26]</sup>。DREB 亚家族可以与干旱、低温响应元件 DRE/CRT 或具有 DRE 元件核心序列(A/GCGAC)结合, 诱导相关逆境胁迫响应基因的表达, 介导非生物信号转导途径<sup>[27-28]</sup>。

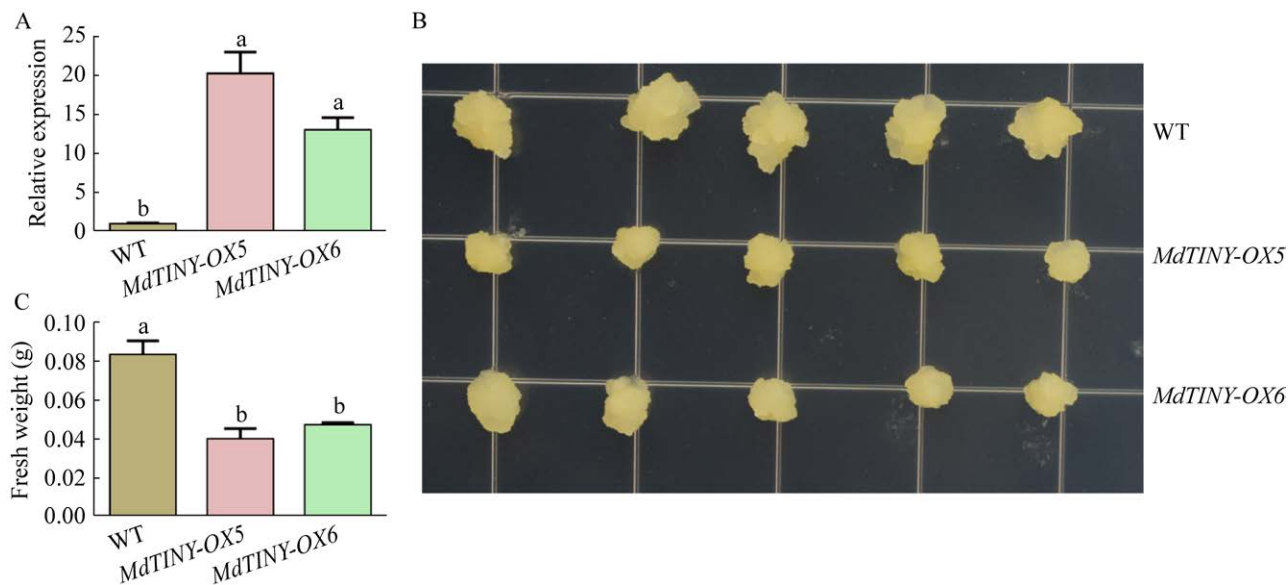
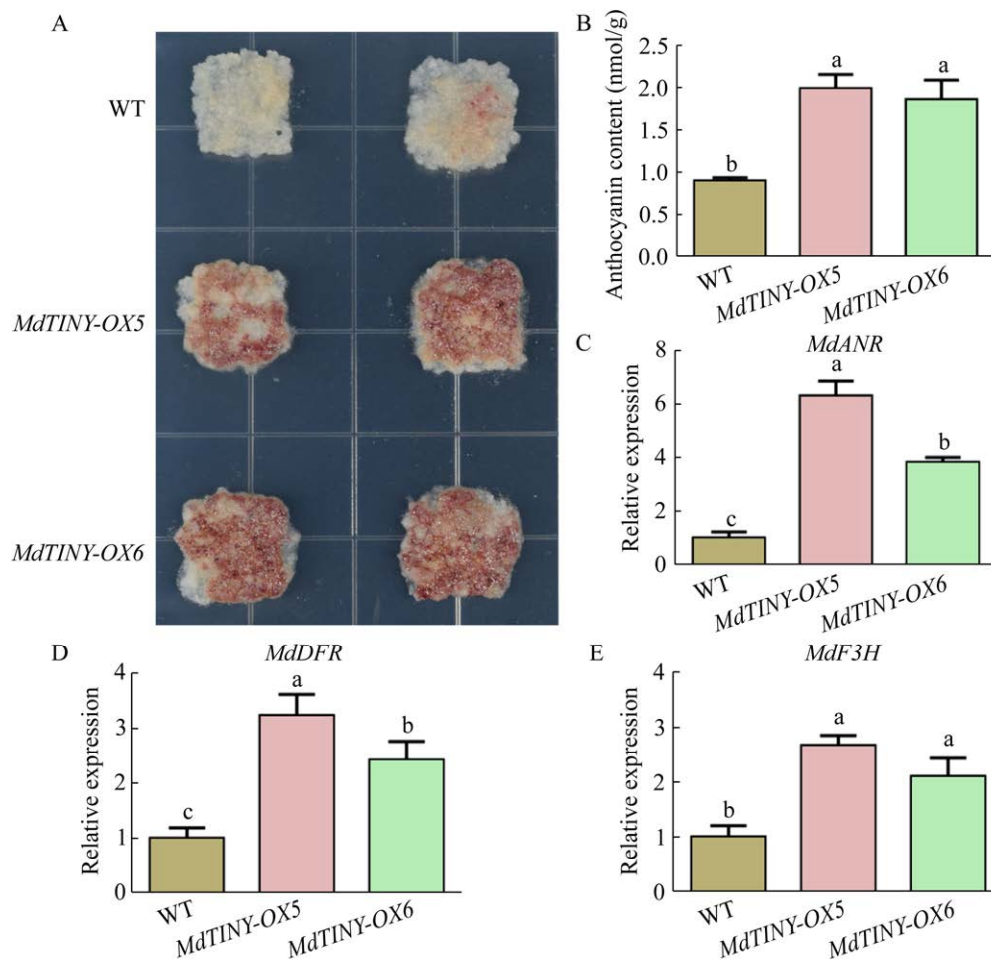


图 7 *MdTINY* 过表达抑制愈伤组织生长 A: 转基因愈伤组织 *MdTINY* 的定量表达检测。B: WT 和 *MdTINY-OX* 的愈伤组织生长情况。C: WT 和 *MdTINY-OX* 的愈伤组织鲜重。不同小写字母表示差异达到显著水平( $P < 0.05$ )

Figure 7 *MdTINY* overexpression inhibits calli growth. A: Relative expression levels of *MdTINY* in transgenic calli. B: Calli growth phenotype of WT and *MdTINY-OX*. C: Fresh weight of calli of WT and *MdTINY-OX*. Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



**图 8** *MdTINY* 过表达促进愈伤组织花青苷积累 A: WT 和 *MdTINY-OX* 愈伤组织的花青苷表型. B: 花青苷含量. C: *MdANR* 的相对表达水平. D: *MdDFR* 的相对表达水平. E: *MdF3H* 的相对表达水平. 不同小写字母表示差异达到显著水平( $P < 0.05$ )

**Figure 8** Overexpression of *MdTINY* promotes anthocyanin accumulation in apple calli. A: Phenotype of anthocyanin accumulation in WT and *MdTINY-OX* of apple. B: Anthocyanin content. C: Relative expression levels of *MdANR*. D: Relative expression levels of *MdDFR*, E: Relative expression levels of *MdF3H*. Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

大多数的 A1 (DREB1)型和 A2 (DREB2)型都参与了非生物胁迫响应。A3 亚家族成员 ABI4 参与了 ABA 和糖信号转导途径。A5 和 A6 亚家族分别介导干旱和光照反应<sup>[29]</sup>。苹果 *MdDREB2A* 参与了对干旱、盐和 ABA 胁迫的反应。在胁迫处理下，转基因材料中的相对电导率、超氧阴离子水平和丙二醛含量均显著降低<sup>[30]</sup>。*MdDREB2A* 可以直接结合 *MdARF6* 的启动子，从而影响干旱与生长

素介导的苹果根系发育<sup>[19]</sup>。苹果的 A2、A4、A6 亚家族成员，*MdERF12*、*MdERF30*、*MdERF20* 基因的相对表达水平在盐处理下显著升高<sup>[31]</sup>。拟南芥 DREB-A4 亚家族，含有 17 个蛋白，其中 *AtTINY* 转基因表现为生长矮小与提升抗旱性的表型。本研究从金冠苹果数据库中共查找到 22 个 DREB-A4 亚家族成员，它们均含有 1 个保守的 AP2 基序，蛋白质相对分子质量介于 19 413.55

(MD08G1213600)-44 015.92 (MD07G1099500) Da。苹果 DREB-A4 亚族蛋白质理论等电点介于 4.82-7.56, MD07G1099500 为中性, 其他家族成员均偏酸性。亚细胞定位预测结果显示, 其亚家族蛋白质主要定位于细胞核中。

DREB-A4 亚家族基因的功能也被广泛地研究。棉花 *GhTINY2* 异源转化拟南芥, 转基因植株下胚轴伸长受到抑制, 生长发育迟缓。过表达 *GhTINY2* 的棉花和拟南芥植株对黄萎病的耐受性增强, *GhTINY2* 通过直接激活 *WRKY51* 的表达来促进 SA 积累和 SA 信号传导<sup>[32]</sup>。在日本结缕草(*Zoysia japonica*)叶片组织中, *ZjDREB4.1* 为组成型表达, *ZjDREB4.1* 的表达水平受低温诱导, 在干旱和高盐胁迫下表达先下调后恢复至正常水平<sup>[33]</sup>。番茄 *SIDREBA4* 可以通过在生理水平上改变渗透液和应激激素的含量以及抗氧化酶的活性来改变植物对热胁迫的抗性<sup>[14]</sup>。蚕豆(*Phaseolus vulgaris* L.) *PvERF35* 过表达的植物具有高浓度的脯氨酸、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbateperoxidase, APX)和过氧化物酶(peroxidase, POX), 增强了对盐胁迫的耐受性, 蛋白质互作预测结果提示, *PvERF35* 蛋白可能与 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC)存在紧密联系<sup>[34]</sup>。经过序列比对, 苹果 *MdTINY* 基因与拟南芥 *AtTINY* 高度同源, *MdTINY* 与 *AtTINY* 蛋白具有多个保守基序, AP2 保守结构域覆盖 *MdTINY* 蛋白的第 65-122 位氨基酸。*MdTINY* 的启动子中含有能够响应 ABA、低温、厌氧、光等多种非生物胁迫的顺式作用元件。实时荧光定量 PCR 显示, *MdTINY* 能够响应盐、干旱和 ABA 处理。苹果愈伤组织中过表达 *MdTINY* 抑制了苹果愈伤组织的正常生长, *MdTINY-OX* 愈伤组织鲜重也较轻, 推测可能是 *MdTINY* 通过调节苹果植株生长与胁迫响应的关系, 来增强苹果植株抵御各类胁迫的能力。转录

因子主要定位于细胞核, 通过调控下游基因转录水平发挥功能<sup>[25]</sup>。亚细胞定位结果显示, *MdTINY* 定位于细胞核中, 且具有转录自主激活活性。

果实的色泽是影响果实商品性的一个重要因素。光照是影响花青苷合成的主要因素之一, 在苹果生产中, 套袋处理影响了果实的着色, 后期果实临近成熟, 摘袋后花青苷的合成被显著诱导, 苹果的着色情况成为评价苹果品质的一项重要指标, 花青苷的合成也受到多种功能基因的调控<sup>[35]</sup>。在 *MdTINY* 的启动子序列中含有多个光响应元件, 提示其可能受到光照因素的诱导。*MdTINY* 过表达促进转基因愈伤组织的花青苷积累, 增加了花青苷的含量; 荧光定量 PCR 结果显示, 其可能是通过调节 *MdANR*、*MdDFR* 和 *MdF3H* 的表达来促进愈伤组织花青苷的积累。

综上所述, 本研究对苹果 *MdDREB-A4* 进行了全基因组鉴定和生物信息学分析, 探究了 *MdTINY* 基因的生物学功能, 过表达 *MdTINY* 抑制愈伤组织生长, 促进愈伤组织花青苷积累, 这为后期探究抗逆性强与优质色泽苹果的育种提供了基因源, 但其调控花青苷积累的内在机制仍需进一步探究。

## 致谢

感谢北京农业职业学院的宋晓华老师对本文语言的修改。

## REFERENCES

- [1] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET JG, 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[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(3): 998-1009.
- [2] 悦曼芳, 张春, 吴忠义. 植物转录因子 AP2/ERF 家族蛋白结构和功能的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(12): 11-26.

- YUE MF, ZHANG C, WU ZY. Research progress in the structural and functional analysis of plant transcription factor AP2/ERF protein family[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(12): 11-26 (in Chinese).
- [3] ZHAO T, LIANG D, WANG P, LIU JY, MA FW. Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(5): 423-436.
- [4] STOCKINGER EJ, GILMOUR SJ, THOMASHOW MF. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(3): 1035-1040.
- [5] 韩芳英, 胡昕, 王楠楠, 谢裕红, 王晓艳, 朱强. DREBs 响应植物非生物逆境胁迫研究进展[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(11): 86-98.  
HAN FY, HU X, WANG NN, XIE YH, WANG XY, ZHU Q. Research progress in response of DREBs to abiotic stress in plant[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(11): 86-98 (in Chinese).
- [6] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, LEE BH, HONG XH, AGARWAL M, ZHU JK. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(8): 1043-1054.
- [7] SARKAR T, THANKAPPAN R, MISHRA GP, NAWADE BD. Advances in the development and use of DREB for improved abiotic stress tolerance in transgenic crop plants[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2019, 25(6): 1323-1334.
- [8] NIU X, LUO TL, ZHAO HY, SU YL, JI WQ, LI HF. Identification of wheat *DREB* genes and functional characterization of *TaDREB3* in response to abiotic stresses[J]. *Gene*, 2020, 740: 144514.
- [9] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, SHINSHI H. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [10] WILSON K, LONG D, SWINBURNE J, COUPLAND G. A dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of *TINY*, an *Arabidopsis* gene related to *APETALA2*[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(4): 659-671.
- [11] XIE ZL, NOLAN T, JIANG H, TANG BY, ZHANG MC, LI ZH, YIN YH. The AP2/ERF transcription factor *TINY* modulates brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(8): 1788-1806.
- [12] GENG LF, SU L, WANG Y, GENG ZW, LIN S, ZHANG YC, YU S, FU LF, LIU QH, CHENG CX, JIANG XQ. Role of *RcTINY2* in the regulation of drought and salt stress response in *Arabidopsis* and rose[J]. *Horticulturae*, 2022, 8(8): 747.
- [13] LI SX, ZHAO Q, ZHU DY, YU JJ. A DREB-like transcription factor from maize (*Zea mays*), *ZmDREB4.1*, plays a negative role in plant growth and development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 395.
- [14] MAO LZ, DENG MH, JIANG SR, ZHU HS, YANG ZG, YUE YL, ZHAO K. Characterization of the DREBA4-type transcription factor (*SIDREBA4*), which contributes to heat tolerance in tomatoes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 554520.
- [15] HONDA C, MORIYA S. Anthocyanin biosynthesis in apple fruit[J]. *The Horticulture Journal*, 2018, 87(3): 305-314.
- [16] AN JP, LI HH, SONG LQ, SU L, LIU X, YOU CX, WANG XF, HAO YJ. The molecular cloning and functional characterization of *MdMYC2*, a bHLH transcription factor in apple[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 108: 24-31.
- [17] 王寻, 冯资权, 由春香, 韩月彭, 王小非, 郝玉金. 苹果 NF-YA 转录因子家族的生物信息学和表达分析[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(1): 69-84.  
WANG X, FENG ZQ, YOU CX, HAN YP, WANG XF, HAO YJ. Bioinformatics and expression analysis of NF-YA transcription factor family in apple[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(1): 69-84 (in Chinese).
- [18] 王寻, 韩月彭, 由春香, 王小非, 郝玉金. 苹果阳离子氨基酸转运蛋白(CAT)的鉴定、比较与表达分析[J]. *植物生理学报*, 2020, 56(12): 2631-2646.  
WANG X, HAN YP, YOU CX, WANG XF, HAO YJ. Identification, comparison and expression analysis of cationic amino acid transporter (CAT) in apple[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(12): 2631-2646 (in Chinese).
- [19] ZHANG TT, KANG H, FU LL, SUN WJ, GAO WS, YOU CX, WANG XF, HAO YJ. Nin-like protein 7 promotes nitrate-mediated lateral root development by activating transcription of tryptophan aminotransferase related 2[J]. *Plant Science*, 2021, 303: 110771.
- [20] YANG K, LI CY, AN JP, WANG DR, WANG X, WANG CK, YOU CX. The C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc finger transcription factor *MdZAT10* negatively regulates drought tolerance in apple[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 167: 390-399.
- [21] LIU HF, ZHANG TT, LIU YQ, KANG H, RUI L, WANG DR, YOU CX, XUE XM, WANG XF. Genome-wide analysis of the 6B-INTERACTING PROTEIN1 gene family with functional characterization of *MdSIP1-2* in *Malus domestica*[J]. *Plant Physiology*



- and Biochemistry, 2023, 195: 89-100.
- [22] ZHANG TT, LIU YQ, LI XW, LIU HF, WANG YX, ZHANG FJ, WANG XF, YOU CX, LU XY. The drought-responsive factor MdDREB2A affects root development by directly regulating the transcription of *MdARF6*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2023, 213: 105437.
- [23] 王寻, 陈西霞, 李宏亮, 张富军, 赵先炎, 韩月彭, 王小非, 郝玉金. 苹果 NLP (Nin-Like Protein) 转录因子基因家族全基因组鉴定及表达模式分析[J]. 中国农业科学, 2019, 52(23): 4333-4349.  
WANG X, CHEN XX, LI HL, ZHANG FJ, ZHAO XY, HAN YP, WANG XF, HAO YJ. Genome-wide identification and expression pattern analysis of NLP (nin-like protein) transcription factor gene family in apple[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(23): 4333-4349 (in Chinese).
- [24] WANG DR, YANG K, WANG X, LIN XL, RUI L, LIU HF, LIU DD, YOU CX. Overexpression of *MdZAT5*, an C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc finger protein, regulates anthocyanin accumulation and salt stress response in apple calli and *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1897.
- [25] 赵娜红, 曹瑞兰, 苏文娟, 谢荟清, 曾进, 刘娟. 油茶两个响应干旱 NAC 转录因子的克隆、亚细胞定位及自激活检测[J/OL]. 广西植物, [2024-02-03]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=hFA5SNLy t3g19BPakMzpXEMks-B00T8-r4n5cDgYnfmkc-I33-zChKaLNDgUuHo\\_Nd8RAIp5oKtNvV5UCHk1IeyEIKudfOWsnYJwhGMbqCorj9ftextCIE8XWW-Yk3aIQmqGBdSJqZCrnmY78JiIZgyLn3\\_e2tgqJJZ3DjMe3QLCrz4uzdeIIIEsZmklfXc&uniplatform=NZKPT&language=CHS](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=hFA5SNLy t3g19BPakMzpXEMks-B00T8-r4n5cDgYnfmkc-I33-zChKaLNDgUuHo_Nd8RAIp5oKtNvV5UCHk1IeyEIKudfOWsnYJwhGMbqCorj9ftextCIE8XWW-Yk3aIQmqGBdSJqZCrnmY78JiIZgyLn3_e2tgqJJZ3DjMe3QLCrz4uzdeIIIEsZmklfXc&uniplatform=NZKPT&language=CHS).  
ZHAO NH, CAO RL, SU WJ, XIE HQ, ZENG J, LIU J. Cloning, subcellular localization, and self-activation detection of two NAC transcription factors in response to drought for *Camellia oleifera*[J/OL]. GUIHAIA, [2024-02-03]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=hFA5SNLy t3g19BPakMzpXEMks-B00T8-r4n5cDgYnfmkc-I33-zChKaLNDgUuHo\\_Nd8RAIp5oKtNvV5UCHk1IeyEIKudfOWsnYJwhGMbqCorj9ftextCIE8XWW-Yk3aIQmqGBdSJqZCrnmY78JiIZgyLn3\\_e2tgqJJZ3DjMe3QLCrz4uzdeIIIEsZmklfXc&uniplatform=NZKPT&language=CHS](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=hFA5SNLy t3g19BPakMzpXEMks-B00T8-r4n5cDgYnfmkc-I33-zChKaLNDgUuHo_Nd8RAIp5oKtNvV5UCHk1IeyEIKudfOWsnYJwhGMbqCorj9ftextCIE8XWW-Yk3aIQmqGBdSJqZCrnmY78JiIZgyLn3_e2tgqJJZ3DjMe3QLCrz4uzdeIIIEsZmklfXc&uniplatform=NZKPT&language=CHS) (in Chinese).
- [26] MATSUKURA S, MIZOI J, YOSHIDA T, TODAKA D, ITO Y, MARUYAMA K, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2010, 283(2): 185-196.
- [27] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. The Plant Cell, 1994, 6(2): 251-264.
- [28] THOMASHOW MF. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 571-599.
- [29] KERCHEV PI, PELLNY TK, VIVANCOS PD, KIDDLE G, HEDDEN P, DRISCOLL S, VANACKER H, VERRIER P, HANCOCK RD, FOYER CH. The transcription factor ABI4 is required for the ascorbic acid-dependent regulation of growth and regulation of jasmonate-dependent defense signaling pathways in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2011, 23(9): 3319-3334.
- [30] LIAN XY, ZHAO XY, ZHAO Q, WANG GL, LI YY, HAO YJ. *MdDREB2A* in apple is involved in the regulation of multiple abiotic stress responses[J]. Horticultural Plant Journal, 2021, 7(3): 197-208.
- [31] 李慧峰, 董庆龙, 赵强, 冉昆. 14 个苹果 AP2/ERF 转录因子基因的克隆与表达分析[J]. 核农学报, 2020, 34(5): 921-931.  
LI HF, DONG QL, ZHAO Q, RAN K. Cloning and expression analysis of fourteen AP2/ERF transcription factors in apple[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(5): 921-931 (in Chinese).
- [32] XIAO SH, HU Q, ZHANG XJ, SI H, LIU SM, CHEN L, CHEN K, BERNE S, YUAN DJ, LINDSEY K, ZHANG XL, ZHU LF. Orchestration of plant development and defense by indirect crosstalk of salicylic acid and brassinosteroid signaling *via* transcription factor *GhTINY2*[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(13): 4721-4743.
- [33] 李京, 吴奇, 张琳婕, 李旭婷, 周敏琪, 韦善君. 结缕草转录因子基因 *ZjDREB4.1* 克隆和逆境表达模式[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 80-88.  
LI J, WU Q, ZHANG LJ, LI XT, ZHOU MQ, WEI SJ. Cloning and expression profiles of a transcription factor gene *ZjDREB4.1* in *Zoysia japonica* under adversity[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(2): 80-88 (in Chinese).
- [34] KAVAS M, GÖKDEMİR G, SEÇGIN Z, BAKHSH A. Ectopic expression of common bean ERF transcription factor *PvERF35* promotes salt stress tolerance in tobacco[J]. Plant Biology, 2020, 22(6): 1102-1112.
- [35] AN JP, LI R, QU FJ, YOU CX, WANG XF, HAO YJ. An apple NAC transcription factor negatively regulates cold tolerance *via* CBF-dependent pathway[J]. Journal of Plant Physiology, 2018, 221: 74-80.

(本文责编 郝丽芳)