

张 伟,余方伟,李建斌,等. 结球甘蓝 CBF 家族特征分析及低温诱导基因 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 表达分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(1): 156-164.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.01.017

结球甘蓝 CBF 家族特征分析及低温诱导基因 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 表达分析

张 伟, 余方伟, 李建斌, 于 利, 王神云

(江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 转录因子 CBF 在植物对低温胁迫的响应和增强植物的抗寒性方面发挥着重要作用。为分析结球甘蓝 CBF 家族成员的氨基酸序列特征,探究其是否受低温诱导表达,本研究利用结球甘蓝 923 全基因组数据库对其进行蛋白质理化特征、系统发育关系、编码基因结构以及 2 ℃ 低温胁迫下编码基因表达水平分析。结果表明,共鉴定到 7 个 *BoCBF* 基因,系统发育分析后分成 2 个亚组(I 和 II)。BoCBF 蛋白的氨基酸长度为 203~283 aa,全部是亲水性蛋白质。在结球甘蓝 02-12 中,*BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因在叶、花、芽和角果中基本不表达,在愈伤组织、根和茎中表达量较低。转录组测序和实时荧光定量 PCR 分析发现,在耐寒结球甘蓝 923 和不耐寒结球甘蓝 D9 中,*BoCBF2b*、*BoCBF2c* 基因不受低温诱导表达,*BoCBF2a* 基因低温诱导表达最为迅速,其次是 *BoCBF1* 和 *BoCBF3* 基因。*BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因的相对表达量在低温胁迫 3~6 h 达到最大值,相对表达量达到最大值后急剧下降,在 24 h 降至最低。本研究结果为后续开展 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因调控结球甘蓝响应低温胁迫机理研究奠定了基础。

关键词: 结球甘蓝; CBF 基因家族; 低温胁迫; 基因表达

中图分类号: S635 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)01-0156-09

Characterization of CBF family in cabbage and the expression analysis of low-temperature-induced genes *BoCBF1*, *BoCBF2a*, and *BoCBF3*

ZHANG Wei, YU Fang-wei, LI Jian-bin, YU Li, WANG Shen-yun

(Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: Transcription factor CBF plays an important role in response to low temperature stress and enhancing cold resistance in plants. In order to analyze the amino acid sequence characteristics of CBF family members in cabbage and explore whether the expression of *BoCBF* genes was induced by low temperature, the whole genome database of cabbage 923 was used to identify *BoCBF* gene members and analyze the protein physicochemical properties, phylogenetic relationships,

收稿日期: 2023-02-06

基金项目: 南京市科技计划项目(202109021); 江苏省重点研发计划项目(BE2021376); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBGS (2021)067]; 国家自然科学基金项目(31902009); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-23-G42)

作者简介: 张 伟(1989-), 男, 安徽安庆人, 博士, 副研究员, 研究方向为甘蓝遗传育种与分子生物学。(E-mail) zhangwei@jaas.ac.cn

通讯作者: 王神云, (E-mail) wangshenyun@jaas.ac.cn

gene structures, and gene expression levels under 2 ℃ low temperature stress. The results showed that a total of seven *BoCBF* genes were identified and divided into two subgroups (I and II) after phylogenetic analysis. The amino acid length of BoCBF proteins ranged from 203 aa to 283 aa, all of which were hydrophilic proteins. *BoCBF1*, *BoCBF2a*, and *BoCBF3* genes were not expressed in leaves, flowers, buds and siliques of cabbage 02-12, and the expression levels were low in callus, roots and stems of

cabbage 02-12. Transcriptome sequencing and real-time fluorescence quantitative PCR analysis revealed that the expression of *BoCBF2b* and *BoCBF2c* genes was not induced by low temperature in cold-intolerant cabbage 923 and cold-intolerant cabbage D9, while *BoCBF2a* gene was most rapidly induced by low temperature, followed by *BoCBF1* and *BoCBF3* genes. The relative expression levels of *BoCBF1*, *BoCBF2a*, and *BoCBF3* genes reached the maximum at 3–6 h after low temperature stress and decreased sharply after reaching the maximum, and reached the lowest at 24 h. The results of the present study provide a basis for the subsequent study on the mechanism of *BoCBF1*, *BoCBF2a* and *BoCBF3* genes in response to low temperature stress in cabbage.

Key words: cabbage; CBF gene family; low temperature stress; gene expression

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), 是十字花科芸薹属蔬菜, 可形成叶球, 含有丰富的维生素 C 和矿物质, 营养极为丰富。甘蓝常被烹食或者生食, 是追求健康饮食人群喜爱的食物之一; 由于其具有较强的适应性和抗逆性, 全国各地均有种植, 年种植面积约 $9 \times 10^5 \text{ hm}^2$ ^[1], 是中国重要的保障供应蔬菜之一。

低温是影响作物产量和营养品质的一种非生物胁迫^[2]。结球甘蓝喜温和冷凉气候, 种子发芽适宜温度为 20~25 °C, 结球期适宜温度为 15~20 °C。结球甘蓝的适应能力较强, 但过低的温度仍然会减缓其生长速度, 降低营养品质; 特别是在 1~4 °C 低温条件下, 植株很容易通过春化作用发生“先期抽薹”^[3]; 0 °C 以下的冻害温度会导致幼苗或叶球冻伤或是直接冻死, 严重影响产量^[4-5]。结球甘蓝植株不同生长时期的耐寒性也不同, 具有 6~8 片叶的幼苗其耐寒性比较强, 能忍耐 -5~-2 °C 的低温冻害; 经过低温驯化的幼苗, 能忍耐短期 -12~-8 °C 的低温严寒; 成熟期的叶球耐寒性虽不如幼苗时期, 但早熟品种的叶球能忍耐短期 -5~-3 °C 的低温, 中、晚熟品种的叶球能忍耐短期 -8~-5 °C 的低温^[6]。

低温信号途径是依赖于 CBF (C-repeat binding factor) 转录因子的 ICE1-CBF-COR 信号转导途径。在低温胁迫下, ICE1 转录因子可直接与 3 个低温响应基因 (*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*) 基因启动子区域结合^[7], 被激活的 CBF 转录因子与冷诱导基因 (*COR*) 启动子区域 CRT/DRE 元件结合, 诱导 *COR* 基因的转录, 使其迅速响应低温胁迫, 从而提高植株的耐冷性^[8]。*AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因在拟南芥 4 号染色体上串联排列, 不依赖 ABA 信号转导, 受低温胁迫诱导表达, 在响应低温胁迫的基因调控中发挥重要作用^[9-10]。而 *AtCBF4* 与 *AtCBF1*、*AtCBF2*、*AtCBF3* 成员的基因功能不同, 依赖 ABA 信号转导, 不受低温胁迫诱导表达, 但在抗旱过程中发挥一定

的作用^[11]。有研究结果表明过量表达 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因能大幅提高拟南芥植株的抗冻性, 其下游大量的 *COR* 基因被诱导表达^[9-10]。与野生型拟南芥相比, *cbf1/cbf2/cbf3* 3 突变体在冷驯化后表现出强烈的冻敏感表型, 且 *AtCBF* 基因的突变影响了拟南芥全转录组中 10%~20% 的 *COR* 基因表达^[12-13]。此外, 在油菜、番茄、大麦、玉米及水稻等作物中也发现 *CBF* 基因具有冷诱导表达特征^[14-18]。单子叶植物和双子叶植物的 *CBF* 基因均与低温胁迫响应密切相关, 说明植物中 *CBF* 基因在低温信号途径中发挥的作用相对保守。

本研究为了探索与拟南芥同为十字花科的结球甘蓝作物中 *CBF* 基因是否也存在冷诱导特性, 对结球甘蓝全基因组中 *CBF* 家族成员进行鉴定, 并分析其编码的蛋白特征、基因结构、系统发育、不同器官/组织表达量以及 2 °C 低温胁迫下的基因表达模式等, 挑选出候选低温诱导基因, 为进一步开展 *BoCBF* 基因响应低温胁迫的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 结球甘蓝 CBF 家族成员鉴定

拟南芥 *AtCBF* 蛋白氨基酸序列 (*AtCBF1*-AT4G25490、*AtCBF2*-AT4G25470、*AtCBF3*-AT4G25480、*AtCBF4*-AT5G51990) 从 NCBI 数据库获取。结球甘蓝和大白菜全基因组序列分别参考结球甘蓝 923^[19] 和大白菜 Chiifu-401-42 V3.0^[20] 基因组。将 *AtCBF* 蛋白氨基酸序列用 BLASTP 分别搜索结球甘蓝和大白菜全基因组序列, 获取候选结球甘蓝 *BoCBF* 和大白菜 *BrCBF* 蛋白氨基酸序列。利用 Pfam 35.0 和 SMART 数据库分析候选 *BoCBF* 和 *BrCBF* 蛋白的保守结构域, 剔除不含 AP2 (PF00847) 结构域的候选蛋白质, 确定 *BoCBF* 和 *BrCBF* 家族成员。

1.2 *BoCBF* 蛋白理化特征及系统发育分析

采用 ProtParam 工具分析 *BoCBF* 蛋白的理化特

征,包括氨基酸序列长度、相对分子质量、理论等电点、不稳定指数、脂肪族氨基酸指数和总平均亲水性等特征。采用 MEGA v7.0.26 软件对 BoCBF、BrCBF 和 AtCBF 蛋白氨基酸序列进行聚类分析,选择最大似然法(Bootstrap 值设定为1 000)绘制系统发育树。

1.3 BoCBF 基因结构、物理位置及亚细胞定位预测分析

在结球甘蓝 923 全基因组数据库中分别获取 BoCBF 基因的 gDNA 和 CDS 序列,利用在线工具 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 绘制外显子-内含子结构图。根据 BoCBF 基因的物理位置,使用 MapChart v2.3 软件绘制 BoCBF 基因染色体位置图。采用在线软件 BaCelLo 和 Plant-mPLoc^[21-22] 对 BoCBF 蛋白的亚细胞定位进行预测。

1.4 CBF 基因进化约束值分析和基因组加倍事件发生时间估计

通过 DnaSP v6 软件^[23] 计算结球甘蓝和拟南芥 CBF 基因之间的进化约束值(非同义替换率 K_a /同义替换率 K_s)。非同义替换率计算公式为非同义替换的 SNP 数/非同义替换位点数,同义替换率计算公式为同义替换的 SNP 数/同义替换位点数。利用同义替换率来估算结球甘蓝和拟南芥之间全基因组加倍事件发生的时间。估算公式为加倍事件发生时间(T)= $K_s/2\lambda$ [拟南芥每年每个同义替换位点发生替换的速率(λ)为 1.5×10^{-8}]^[24]。

1.5 不同器官/组织及低温胁迫下 BoCBF 基因表达量分析

选取耐寒结球甘蓝 923 和不耐寒结球甘蓝 D9 为

试验材料,将其种子播种在 32 孔穴盘中,放进人工气候室中正常管理,环境条件设置:白天温度为 25 ℃,光照时间 14 h,夜晚温度为 18 ℃。待结球甘蓝长至五叶一心,转移至春化室进行 2 ℃低温胁迫,处理不同时间(0 h、3 h、6 h、12 h、24 h)后进行取样,将叶片放入锡箔纸并立即于液氮中冷冻,在-80 ℃冰箱中保存备用。选择低温胁迫处理 0 h、6 h、24 h 的叶片样品送广州基奥迪生物科技有限公司进行转录组测序。此外,从 NCBI 的 GEO 数据库下载了结球甘蓝 02-12 正常生长条件下 7 个不同器官/组织(芽、愈伤组织、花、叶、根、角果和茎)的转录组数据(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE42891>, GSE42891 数据集)用于 BoCBF 基因不同器官/组织的表达量分析。以结球甘蓝 923 基因组作为转录组分析的参考基因组,以 FPKM 值来表示结球甘蓝 BoCBF 基因在不同器官/组织及低温胁迫下的表达量,利用 Excel 软件计算平均值和标准差,绘制柱形图。

1.6 BoCBF1、BoCBF2a 和 BoCBF3 基因相对表达水平分析

将上述保存的低温处理 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 的叶片样品分别提取植物总 RNA,并合成第一链 cDNA。参照结球甘蓝 923 基因组^[19] 序列,利用 Beacon Designer 7.7 软件分别设计 BoCBF1、BoCBF2a、BoCBF3 基因和内参基因 BoActin2 的特异引物序列(表 1)。利用 SYBR Green 染料法在罗氏荧光定量 PCR 仪器上进行 PCR 反应,试验采取 3 次技术重复,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法计算基因的相对表达水平和标准差^[25]。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for real-time fluorescence quantitative PCR

基因名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
BoCBF1	GATTGGCTCGGTACTTTCCT	TCAGCCATACTAGCCAACAAGG
BoCBF2a	CGAGGAGTTCGCCTTAGAAAA	TCGTGTCATTAACCTCAGCCTG
BoCBF3	TACGGATGAAGTGAAGCAA	GCCATATCAGCCAACAAG
BoActin2	CCAGAGGTCTTGTCCAGCCATC	GTTCCACCACTGAGCACAATGTTAC

2 结果与分析

2.1 结球甘蓝 CBF 家族成员鉴定、理化特征及系统发育分析

通过对结球甘蓝和大白菜全基因组数据库

BLASTP 搜索以及 AP2 保守结构域的在线验证,分别鉴定到 7 个 BoCBF 蛋白和 6 个 BrCBF 蛋白(表 2)。BoCBF 蛋白的氨基酸序列长度为 203~283 aa,相对分子质量为 $2.25\times 10^4\sim 3.11\times 10^4$ 。BoCBF1、BoCBF2a、BoCBF2c、BoCBF3、BoCBF4a、BoCBF4b 理

论等电点为4.58~6.14,为弱酸性蛋白质;*BoCBF2b* 理论等电点为7.63,为弱碱性蛋白质。蛋白质的不稳定指数为45.78~68.32,均超过临界值40。此外, *BoCBF* 蛋白的脂肪族氨基酸指数为56.78~73.20, 总平均亲水性指数为-0.598~-0.314,均为亲水性蛋白质。

表 2 结球甘蓝 CBF 家族成员理化特征

Table 2 Physical and chemical characteristics of CBF family members in cabbage

CBF 家族	结球甘蓝 CBF 基因				结球甘蓝 CBF 蛋白				
	基因编号	所在染色体	开放阅读框长度(bp)	氨基酸长度(aa)	相对分子质量	理论等电点	不稳定指数	脂肪族氨基酸指数	总平均亲水性指数
BoCBF1	<i>BolO_8g16590.1</i>	染色体 8	753	250	2.79×10 ⁴	4.85	47.99	60.20	-0.504
BoCBF2a	<i>BolO_7g56370.1</i>	染色体 7	612	203	2.25×10 ⁴	5.89	49.73	73.20	-0.314
BoCBF2b	<i>BolO_3g19100.1</i>	染色体 3	852	283	3.11×10 ⁴	7.63	49.36	66.64	-0.412
BoCBF2c	<i>BolO_3g19080.1</i>	染色体 3	615	204	2.26×10 ⁴	5.79	47.79	65.69	-0.390
BoCBF3	<i>BolO_8g16610.1</i>	染色体 8	834	277	3.05×10 ⁴	4.58	45.78	60.69	-0.480
BoCBF4a	<i>BolO_9g40700.1</i>	染色体 9	663	220	2.45×10 ⁴	6.14	61.60	60.41	-0.515
BoCBF4b	<i>BolO_9g40730.1</i>	染色体 9	711	236	2.53×10 ⁴	5.32	68.32	56.78	-0.598

采用 MEGA v7.0.26 软件对结球甘蓝、大白菜和拟南芥 17 个 CBF 蛋白氨基酸序列构建系统发育树(图 1)。CBF 蛋白被分成 2 个亚组,亚组I包含 12 个 CBF 蛋白,亚组II包含 5 个 CBF 蛋白。其中亚组I包括 5 个结球甘蓝 CBF 蛋白 (*BoCBF1*、*BoCBF2a*、*BoCBF2b*、

BoCBF2c 和 *BoCBF3*),4 个大白菜 CBF 蛋白和 3 个拟南芥 CBF 蛋白。亚组II包括 2 个结球甘蓝 CBF 蛋白 (*BoCBF4a* 和 *BoCBF4b*),2 个大白菜 CBF 蛋白和 1 个拟南芥 CBF 蛋白。相比拟南芥 CBF 家族成员,结球甘蓝和大白菜 CBF 家族成员之间的亲缘关系更近。

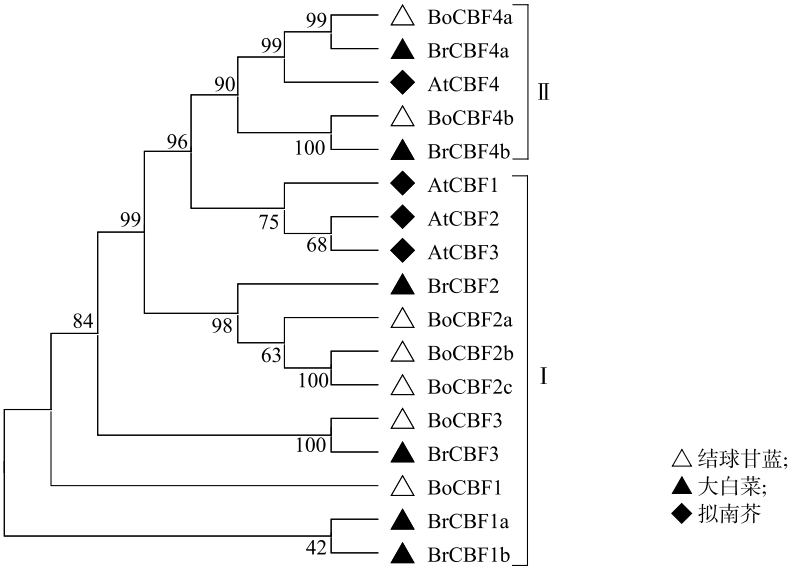


图 1 结球甘蓝、大白菜和拟南芥 CBF 蛋白系统发育分析
Fig.1 Phylogenetic analysis of CBF proteins in cabbage, Chinese cabbage and *Arabidopsis thaliana*

2.2 *BoCBF* 基因结构、物理位置及其编码蛋白质的亚细胞定位预测分析

BoCBF2b 基因包含 3 个外显子和 2 个内含子, *BoCBF2c* 基因包含 2 个外显子和 1 个内含子,

BoCBF1、*BoCBF2a*、*BoCBF3*、*BoCBF4a* 和 *BoCBF4b* 均只有 1 个外显子,没有内含子(图 2)。此外,本研究还分析了 7 个 *BoCBF* 基因在结球甘蓝染色体上的物理位置分布,其中 *BoCBF2b* 和 *BoCBF2c* 串联分

布在 3 号染色体上,*BoCBF2a* 位于 7 号染色体上,*BoCBF1* 和 *BoCBF3* 串联分布在 8 号染色体上,*BoCBF4a* 和 *BoCBF4b* 串联分布在 9 号染色体上(图 3)。

为了预测 *BoCBF* 蛋白亚细胞定位信息,分别利

用 BaCellLo 和 Plant-mPLOC 工具在线进行预测(表 3)。结果表明,结球甘蓝 *BoCBF1*、*BoCBF2a*、*BoCBF2b*、*BoCBF2c*、*BoCBF3* 和 *BoCBF4a* 蛋白均被预测定位于细胞核中,*BoCBF4b* 被预测可能定位在细胞质或细胞核中。

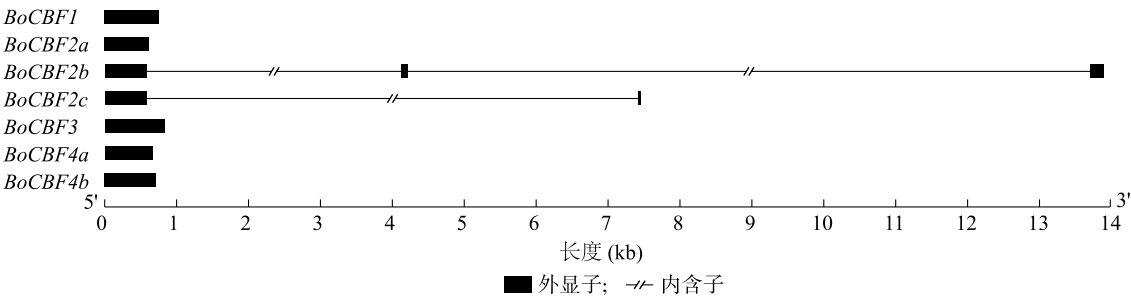


图 2 *BoCBF* 基因外显子-内含子结构图
Fig.2 The exon-intron structure of *BoCBF* genes

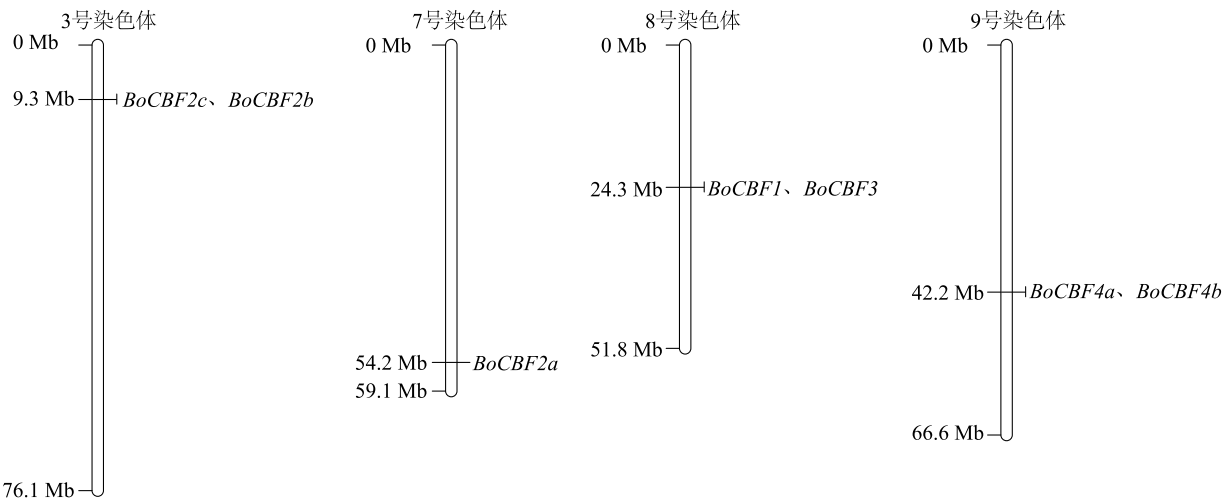


图 3 *BoCBF* 基因在染色体上的物理位置分布
Fig.3 Physical distribution of *BoCBF* genes on the chromosomes

表 3 *BoCBF* 蛋白亚细胞定位预测

Table 3 Subcellular localization prediction of *BoCBF* proteins

蛋白质	BaCellLo 亚细胞定位预测	Plant-mPLOC 亚细胞定位预测
BoCBF1	细胞核	细胞核
BoCBF2a	细胞核	细胞核
BoCBF2b	细胞核	细胞核
BoCBF2c	细胞核	细胞核
BoCBF3	细胞核	细胞核
BoCBF4a	细胞核	细胞核
BoCBF4b	细胞质	细胞质、细胞核

2.3 *CBF* 基因进化约束值分析和基因组加倍事件发生时间估计

除 *AtCBF4* 与 *BoCBF4b* 同源基因对外,其余 6 个 *CBF* 直系同源基因对的进化约束值(K_a/K_s)均远小于 1 (0.156~0.294),表明进化中 *CBF* 基因以纯化选择作用为主(表 4)。在结球甘蓝和拟南芥的直系同源基因对中,同义替换率为 0.490~0.815。以拟南芥每年每个同义替换位点发生替换的速率(λ)为参考,利用结球甘蓝和拟南芥的直系同源基因对的同义替换率(K_s)估算,结球甘蓝和拟南芥之间全基因组加倍事件发生的时间大致发生在 $1.63\times 10^7\sim$

2.72×10⁷ 年前。由表 4 可知,相比同源基因 *AtCBF2*、*BoCBF2a*、*BoCBF2b*、*BoCBF2c* 基因可能发生了全基因组三倍化事件(WGT),且它们的发生时

间为1.63×10⁷~1.97×10⁷年前,这与芸薹族物种与拟南芥进行分化后经历了一次额外的全基因组三倍化事件的时间(1.30×10⁷~1.70×10⁷年前)相符合^[26]。

表 4 结球甘蓝和拟南芥 CBF 基因进化约束值及基因组加倍事件发生时间预测

Table 4 Prediction of evolutionary constraint values and the time of whole genome duplication events between orthologous CBF gene pairs of cabbage and *Arabidopsis thaliana*

直系同源基因对		同义替换率	非同义替换率	进化约束值	加倍事件发生时间(年)
<i>AtCBF1</i>	<i>BoCBF1</i>	0.685	0.107	0.156	2.28×10 ⁷
<i>AtCBF2</i>	<i>BoCBF2a</i>	0.592	0.140	0.237	1.97×10 ⁷
	<i>BoCBF2b</i>	0.566	0.162	0.286	1.89×10 ⁷
	<i>BoCBF2c</i>	0.490	0.144	0.294	1.63×10 ⁷
<i>AtCBF3</i>	<i>BoCBF3</i>	0.815	0.148	0.182	2.72×10 ⁷
<i>AtCBF4</i>	<i>BoCBF4a</i>	0.632	0.105	0.166	2.11×10 ⁷
	<i>BoCBF4b</i>	—	0.613	—	—

2.4 结球甘蓝不同器官/组织及低温胁迫下 *BoCBF* 基因表达量分析

本研究分析了 5 个 *BoCBF* 基因在结球甘蓝 7 个不同器官/组织中的表达量(图 4)。其中 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因在甘蓝多个器

官/组织中基本不表达(*FPKM*<1),仅在愈伤组织、根和茎中有较低的表达量。*BoCBF4a* 基因仅在愈伤组织、根和茎中有中等表达量,*BoCBF4b* 基因在茎中表达量中等,在根中表达量较高。

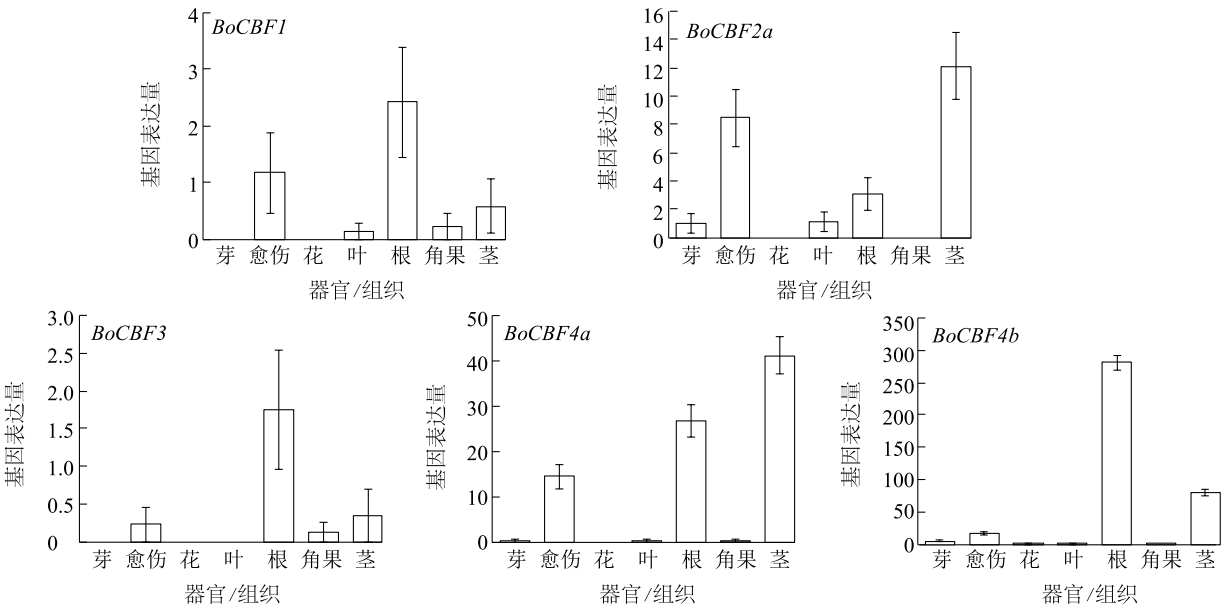


图 4 转录组测序分析结球甘蓝 02-12 不同器官/组织中 *BoCBF* 基因表达量

Fig.4 The expression of *BoCBF* genes in different organs/tissues of cabbage 02-12 analyzed by transcriptomic sequencing

本研究还分析了 5 个 *BoCBF* 基因在低温胁迫下的表达模式(图 5),耐寒结球甘蓝 923 和不耐寒结球甘蓝 D9 中 *BoCBF2b* 和 *BoCBF2c* 基因的表达

量均为 0。在未进行低温处理时(0 h),*BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因在耐寒结球甘蓝 923 和不耐寒结球甘蓝 D9 中的表达量几乎为 0,*BoCBF4a* 和

BoCBF4b 基因表达量较低。低温胁迫处理 0~6 h, *BoCBF1* 和 *BoCBF2a* 基因迅速响应, 表达量上升, 其中不耐寒结球甘蓝 D9 中 *BoCBF2a* 基因表达量急剧升高; 低温胁迫 6 h 后至 24 h, 耐寒结球甘蓝 923 和不耐寒结球甘蓝 D9 中 *BoCBF1* 和 *BoCBF2a* 基因的表达量急剧下降。此外, 低温胁迫 0~24 h, 耐寒结球甘蓝 923 中 *BoCBF4a* 和 *BoCBF4b* 基因表达量基本没有变化, 说明 *BoCBF4a* 和 *BoCBF4b* 基因不受低温诱导表达。不耐寒结球甘蓝 D9 中 *BoCBF4a* 和 *BoCBF4b* 基因表达量在低温胁迫 0~6 h 下降, 在低温胁迫 6 h 后至 24 h 表达量急剧上升。

根据前期拟南芥响应低温信号途径的研究结果^[27], 可知拟南芥中响应低温胁迫的 *AtCBF* 基因家

族成员主要为 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3*, 且基因快速响应的时间为低温胁迫 0~3 h。结合图 5 的分析结果, 本研究选取 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因, 通过实时荧光定量 PCR 分析两个不同耐寒性结球甘蓝品种在低温胁迫 0 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 后这 3 个基因的相对表达量。如图 6 所示, 不耐寒结球甘蓝 D9 中 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因的相对表达量在低温胁迫 3 h 达到最大值; 耐寒结球甘蓝 923 中 *BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因的相对表达量在低温胁迫 3 h 达到最大值, *BoCBF1* 基因相对表达量在低温胁迫 6 h 达到最大。*BoCBF1*、*BoCBF2* 和 *BoCBF3* 基因的相对表达量达到峰值后急剧下降, 在 24 h 降至最低。

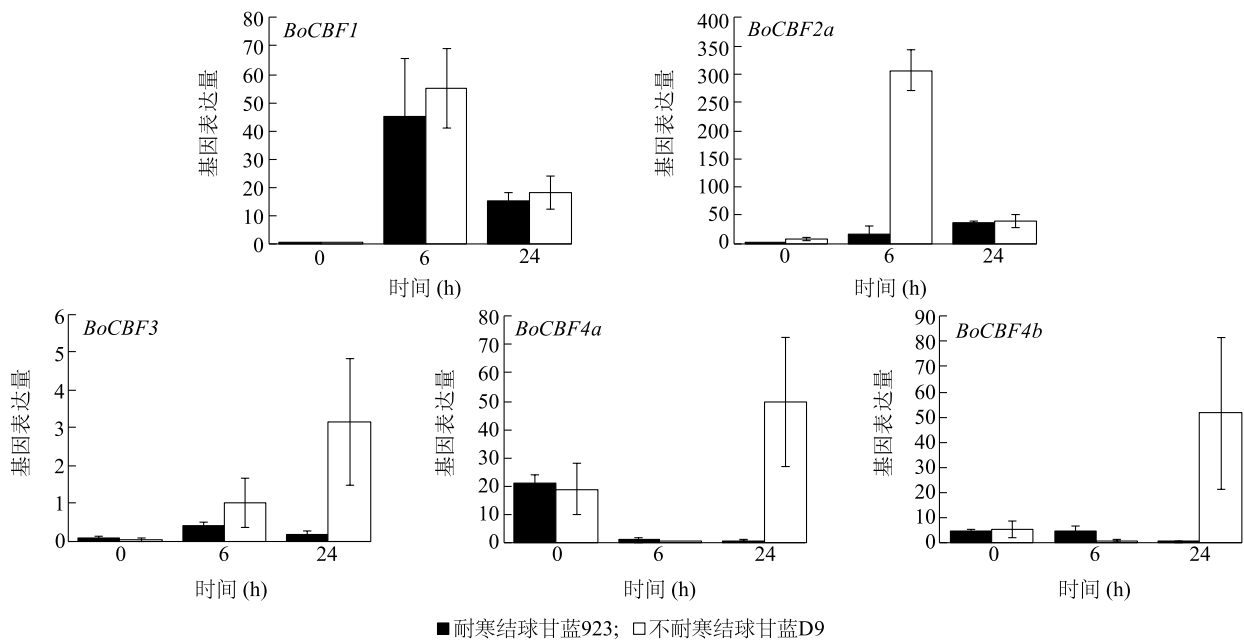


图 5 转录组测序分析 *BoCBF* 基因在 2 °C 低温胁迫下的表达量

Fig.5 Expression of *BoCBF* genes under 2 °C low temperature stress analyzed by transcriptomic sequencing

3 讨论

低温对结球甘蓝栽培有较大影响, 产量及品质均受到严重影响。依赖于 CBF (C-repeat binding factor) 转录因子的 ICE1-CBF-COR 信号转导途径是植物响应低温胁迫信号的重要途径之一^[7-8]。此外, 拟南芥、大麦、玉米、水稻、小麦、葡萄和番茄等作物 CBF 基因的功能已经被广泛研究^[10, 16-18, 28-30]。本研究探究了与拟南芥同属十字花科的结球甘蓝 *BoCBF* 基因的低温诱导特性, 对进一步解析 *BoCBF*

基因响应低温胁迫具有重要的意义。

AtCBF1、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因串联排列在拟南芥 4 号染色体上。在结球甘蓝中, 仅 *BoCBF1* 和 *BoCBF3* 串联排列在 8 号染色体上, *BoCBF2a* 位于 7 号染色体, *BoCBF2b* 和 *BoCBF2c* 串联分布在 3 号染色体上。推测结球甘蓝中与拟南芥 *AtCBF2* 同源的 *BoCBF2* 基因发生了基因复制或丢失现象, 导致加倍后的 *BoCBF2a*、*BoCBF2b*、*BoCBF2c* 基因与 *BoCBF1* 和 *BoCBF3* 不在同一条染色体上。此外, 研究发现除 *BoCBF2b* 和 *BoCBF2c* 含有内含子序列外, 其他

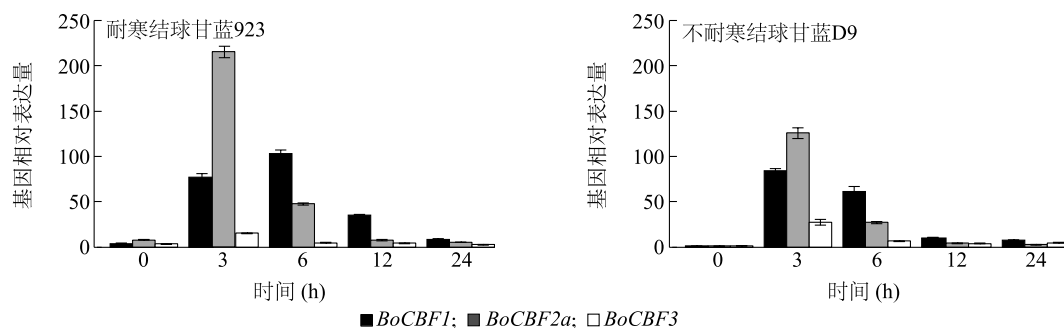


图 6 实时荧光定量 PCR 分析 2 °C 低温胁迫下 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因相对表达水平

Fig.6 The relative expression levels of *BoCBF1*, *BoCBF2a*, and *BoCBF3* under 2 °C low temperature stress analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR

BoCBF 基因与拟南芥 *AtCBF* 基因结构一致,均无内含子结构,表明 *CBF* 基因在植物进化过程中具有较高的保守性。与 *BoCBF2a* 基因结构相比,发生全基因组三倍化事件后形成的 *BoCBF2b* 和 *BoCBF2c* 基因结构在进化过程中发生了变异,出现了较长的内含子序列,导致其基因功能也随之发生了变化。

拟南芥中 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因不依赖 ABA 信号转导,受低温胁迫诱导表达,是低温诱导的关键基因^[7-8]。本研究发现结球甘蓝 923 和 D9 中 *BoCBF1*、*BoCBF2a*、*BoCBF3*、*BoCBF4a* 和 *BoCBF4b* 基因受低温胁迫诱导表达,而结球甘蓝 923 和 D9 中 *BoCBF2b*、*BoCBF2c* 被发现不受低温胁迫诱导表达。其中,结球甘蓝 D9 中 *BoCBF4a* 和 *BoCBF4b* 基因在低温处理 6 h 后至 24 h 时表达量上升,可能是由于受到节律调节或者光调控的影响。结合转录组测序和实时荧光定量 PCR 分析发现,耐寒结球甘蓝 923 和不耐寒结球甘蓝 D9 中 *BoCBF2a* 基因响应低温胁迫诱导最为迅速,其次是 *BoCBF1* 和 *BoCBF3*。本研究还发现在耐寒结球甘蓝 923 和不耐寒结球甘蓝 D9 中 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因受低温胁迫诱导后基因相对表达量变化趋势均为先上升后下降,仅表达水平出现高低的差异。综上所述,本研究结果为后续开展 *BoCBF1*、*BoCBF2a* 和 *BoCBF3* 基因调控结球甘蓝响应低温胁迫机理研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 杨丽梅,方智远,庄 木,等. “十二五”我国甘蓝遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2016(11):1-6.
- [2] CHINNUSAMY V, ZHU J, ZHU J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends in Plant Science,2007,12(10):444-451.
- [3] 徐 磊,林碧英,林义章. 春化作用与甘蓝类蔬菜的生育障碍(综述)[J]. 亚热带植物科学,2002,31(4):73-76.
- [4] 张 伟,余方伟,李建斌,等. 甘蓝蔗糖合成酶基因家族鉴定及响应低温胁迫表达模式分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(2):24-32.
- [5] 山 溪,秦文斌,张振超,等. 低温对结球甘蓝幼叶氮代谢活性及光合色素的影响[J]. 南方农业学报,2019,50(12):2728-2733.
- [6] 蔡 青,李成琼,司 军. 结球甘蓝耐寒性研究进展[J]. 长江蔬菜,2009(2):1-3.
- [7] TANG K, ZHAO L, REN Y, et al. The transcription factor ICE1 functions in cold stress response by binding to the promoters of *CBF* and *COR* genes[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020,62(3):258-263.
- [8] DING Y, SHI Y, YANG S. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants[J]. New Phytologist,2019,222(4):1690-1704.
- [9] GILMOUR S J, ZARKA D G, STOCKINGER E J, et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression[J]. The Plant Journal,1998,16(4):433-442.
- [10] 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 expression, respectively, in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell,1998,10(8):1391-1406.
- [11] HAAKE V, COOK D, RIECHMANN J L, et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology,2002,130(2):639-648.
- [12] JIA Y, DING Y, SHI Y, et al. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of *CBFs* in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*[J]. New Phytologist,2016,212(2):345-353.
- [13] ZHAO C, ZHANG Z, XIE S, et al. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Ara-*

- bidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2744-2759.
- [14] JAGLO K R, KLEFF S, AMUNDSEN K L, et al. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 910-917.
- [15] HSIEH T H, LEE J T, YANG P T, et al. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/ dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(3): 1086-1094.
- [16] CHOI D W, RODRIGUEZ E M, CLOSE T J. Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern, and map location [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1781-1787.
- [17] QIN F, SAKUMA Y, LI J, et al. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(8): 1042-1052.
- [18] 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(4): 751-763.
- [19] GUO N, WANG S, GAO L, et al. Genome sequencing sheds light on the contribution of structural variants to *Brassica oleracea* diversification [J]. *BMC Biology*, 2021, 19(1): 93.
- [20] CHEN H, WANG T, HE X, et al. BRAD V3.0: an upgraded Brassicaceae database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50: 1432-1441.
- [21] PIERLEONI A, MARTELLI P L, FARISELLI P, et al. BaCellLo: a balanced subcellular localization predictor [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(14): e408-e416.
- [22] CHOU K C, SHEN H B. Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11335.
- [23] ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(12): 3299-3302.
- [24] KOCH M A, HAUBOLD B, MITCHELLOLDS T, et al. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae) [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2000, 17(10): 1483-1498.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] CHENG F, MANDAKOVA T, WU J, et al. Deciphering the diploid ancestral genome of the mesohexaploid *Brassica rapa* [J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(5): 1541-1554.
- [27] SHI Y, DING Y, YANG S. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(1): 7-15.
- [28] MORRAN S, EINI O, PYVOVARENKO T, et al. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(2): 230-249.
- [29] ZHANG X, FOWLER S G, CHENG H, et al. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(6): 905-919.
- [30] XIAO H, SIDDIQUA M, BRAYBROOK S, et al. Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(7): 1410-1421.

(责任编辑:成纾寒)