

类番茄茄和多毛番茄CBF1基因转化烟草的表达调控分析

葛 君¹ 张 瑶² 官 超² 陈宏宇² 王傲雪² 胡春祥¹

1.东北林业大学林学院,哈尔滨 150040; 2.东北农业大学生命科学学院,哈尔滨 150030

摘要 利用农杆菌介导的叶盘法将类番茄茄(*Solanum lycopersicoides*)和多毛番茄(*Lycopersicon habrochaites*)的 CBF1 基因转入普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.),通过分析转基因烟草在低温胁迫条件下目的基因的表达水平并结合转录组数据分析差异表达的基因,揭示 CBF1 基因在烟草中发挥抗冷作用的机制与相关性。结果显示:低温胁迫下,转基因烟草的抗低温能力高于非转基因的野生型;*SlCBF1* 和 *LhCBF1* 基因在普通烟草中过量表达后,转录组测序分析表明 *SlCBF1* 基因转化的烟草植株与野生型烟草植株相比,差异表达基因为 53 个,其中 33 个表达上调,20 个表达下调; *LhCBF1* 基因转化的烟草和野生型烟草植株相比,差异表达的基因为 106 个,表达上调的有 62 个,表达下调的有 44 个。表明在烟草中过表达 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 会影响转基因烟草中受其调控的下游基因的表达水平,进而提高烟草的抗冷能力。

关键词 CBF1; 类番茄茄; 多毛番茄; 烟草; 转录组

中图分类号 Q 785 : Q 945.78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)06-0008-09

CBF(CRT/DRE binding factor)基因作为抗冷转录因子中的一员,首次见于拟南芥植株^[1]。CBF 家族成员包括 CBF1、CBF2、CBF3、CBF4,在植物抗冷、抗盐碱和抗旱等方面发挥着极为重要的作用^[2-3]。CBF 作为一种转录因子,受非生物胁迫诱导,能够特异性地与抗逆基因启动子区域 CRT/DRE 顺式作用元件相结合,进而调节下游一系列逆境应答基因的表达。CBF 转录因子主要作用是在植物受到干旱或低温等非生物胁迫时,通过调节下游基因的表达保护细胞^[4]。例如,在 COR 基因调控植物抗冷性时,CBF 转录激活因子与 COR 基因启动子区 CRT/DRE 调控元件进行特异性结合,激活启动子下游 COR 基因的表达^[5-7]。在 ABA 诱导作用下 CBF 蛋白的含量增速明显,从而诱导 COR 基因表达,提高植物抗冷能力^[8-10]。过量表达 CBF 的转基因拟南芥和非转基因拟南芥相比,转基因植株表现出更好的抗冷性,并对高盐、干旱所造成的水分胁迫也显示出更强的抗性^[1,11-12]。据报道 CBF 基因广泛存在于葡萄、小麦、油菜、番茄等多种植物中^[13-16]。

类番茄茄(*Solanum lycopersicoides*)是番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)近缘野生种,具有

耐低温的特性;多毛番茄(*Lycopersicon habrochaites*)是野生番茄种,具有很强的抗冷能力,说明它们具有优异的抗冷基因^[17-20]。它们的 CBF1 基因在拟南芥中过表达会增加其抗冷能力和耐盐能力^[21]。*SlCBF1* 和 *LhCBF1* 在其他植物中的功能还有待确定,并且由这些基因调节的下游基因也是未知的。本研究通过生物技术方法将类番茄茄和多毛番茄中的 CBF1 基因转化普通烟草,利用农杆菌介导的叶盘法将类番茄茄(*Solanum lycopersicoides*)和多毛番茄(*Lycopersicon habrochaites*)的 CBF1 基因转入普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.),通过分析转基因烟草在低温胁迫条件下目的基因的表达水平并结合转录组数据分析差异表达的基因,揭示 CBF1 基因在烟草中发挥抗冷作用的机制,旨在为植物的抗冷基因改良提供理论依据和基因材料。

1 材料与方法

1.1 材 料

基因克隆所用植物材料为类番茄茄(*S. lycopersicoides*)和多毛番茄(*L. habrochaites*),由东北农业大学生命科学学院提供。基因转化所用菌株为大

肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌株, 植物材料为普通烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 由东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室提供。

1.2 仪器与试剂

*Bam*H I 及 *Sac* I 购自 NEB 生物技术公司; T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; pLB 零背景快速克隆试剂盒购自天根生化科技公司; q-PCR 试剂盒 TransStart[®] Top Green qPCR Super Mix 购自 TransGen 生物科技有限公司; cDNA 反转录试剂盒 Rever Tra Ace[®] qPCR RT Master Mix 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; 葡萄糖、蔗糖、无水乙醇、琼脂、氨基酸等化学试剂如未加特别说明, 均为国产分析纯。

1.3 CBF1 基因的获取与载体构建

根据 GenBank 的序列号 GU129700.1 和 GU129699.1, 可知 *SlCBF1* 基因全长 876 bp, ORF 为 687 bp; *LhCBF1* 基因全长 931 bp, ORF 为 669 bp。用 DNAMAN 软件对其开放性阅读框进行分析, 设计特异性引物 *SlCBF1*-F (5'-ATGAATATCTTT-GAAACTTATTATAATT -3'), *SlCBF1*-R (5'-TTAGAT-GGAATAATTCCATAAAGTT -3'), *LhCBF1*-F (5'-ATCGGATCCATGAATATCTTCGAAACC -3') 和 *LhCBF1*-R (5'-CGCGAGCTCTTAGATAGAATAATTC -3')。引物由上海生工生物公司合成。

首先提取类番茄茄 (*S. lycopersicoides*) 和多毛番茄 (*L. habrochaites*) 植株叶片的 RNA, 按试剂盒说明反转录获得 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, *SlCBF1*-F、*SlCBF1*-R、*LhCBF1*-F、*LhCBF1*-R 为引物分别进行目的基因的 PCR 扩增, 条件为: 95 °C 3 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶检测, 切胶, 纯化试剂盒 (OMEGA) 纯化回收。按 pLB 零背景快速克隆试剂盒说明连接回收片段至 pLB 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 平板抗性培养, 随机挑选出阳性菌落提取质粒进行测序, 测序结果对比 GenBank 一致后, 确定获得 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 基因。

对 pBI121 质粒进行 *Hind* III、*Eco* R I 双酶切, 获得带有 35S 启动子的 GUS 片段, 将其连入 *Hind* III、*Eco* R I 双酶切处理过的 pCambia2300 载体, 得到重组载体 35S-GUS-pCambia2300, 再将该重组载体和目的基因片段分别进行 *Bam* H I、*Sac* I 双酶切, 并连接获得 35S-gene-GUS-pCAM-

BIA2300; 接下来把 *AtRD29A* 启动子 (诱导型启动子, 含有 4 个 CRT/DRE 顺式作用元件) 和 35S-gene-GUS-pCambia2300 分别用 *Hind* III、*Bam* HI 进行双酶切, 连接完成 *AtRD29A* 启动子对 35S 启动子的替换, 获得最终的载体 RD29A-gene-GUS-pCambia2300。

1.4 重组载体获得与转化农杆菌

在 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 基因引物的 5' 端和 3' 端分别引入 *Bam* H I 和 *Sac* I 的酶切位点, 设计引物为: *SlCBF1*-vF (5'-ATCGGATCCATGAATATCTTCGAAACC -3'), *SlCBF1*-vR (5'-CGCGAGCTCTTAGATAGAATAATTC -3'), *LhCBF1*-vF (5'-ATCGGATCCATGAATATCTTTGAAACT -3') 和 *LhCBF1*-vR (5'-CGCGAGCTCTTAGATGGAATAATT -3')。分别以含有 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 基因的大肠杆菌菌液为模板, 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环。PCR 扩增出带有酶切位点的 *SlCBF1* 基因和 *LhCBF1* 基因片段。

利用 *Bam* H I 和 *Sac* I 对得到的 *LhCBF1* 基因片段、*SlCBF1* 基因片段和 H+P 载体进行双酶切处理, 并分别纯化回收产物, 然后用 T4DNA 连接酶将酶切后的 H+P 线性载体和基因片段连接分别获得 H+P-*LhCBF1* 和 H+P-*SlCBF1* 并转化大肠杆菌, 进行菌落 PCR 检测筛选阳性克隆, 送样测序, 经序列比对测序结果与 GenBank 上记录 *SlCBF1* 基因和 *LhCBF1* 基因片段的序列一致, 表明 H+P-*LhCBF1* 和 H+P-*SlCBF1* 表达载体构建成功。将阳性质粒电击转化农杆菌 EHA105 感受态中, 再经过 PCR 检测确认, 检测送至上海生工生物公司进行测序比对一致后, 将含阳性克隆的农杆菌菌液按 1:1 (体积比) 加入无菌的 50% 甘油, -80 °C 保存。

1.5 农杆菌侵染转化

将烟草种子在 MS 培养基培育, 温度为 25 °C, 光照强度为 400 μ mol/(m² · s), 光照周期为每天 16 h 光照/8 h 黑暗处理, 置于相对湿度 65%~75% 的组织培养室中培养, 当无菌苗长出 4 片真叶时选取嫩叶, 剪成 0.5 cm² 的叶盘, 放置在预培养培养基 (MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA) 上预培养 36 h。

挑取已转化的农杆菌 EHA105 单菌落, 二次活化培养至 $D_{600}=0.5$ 时; 离心后加入 50 mL 配制好

的菌液重悬液体培养基,重悬培养至 $D_{600}=0.6$ 时,用于侵染。

将预培养的烟草叶盘用已灭菌的镊子从培养皿中取出,放入准备好的侵染液中,置于控温摇床 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 100 r/min 培养 20 min ,使农杆菌通过伤口进入细胞;将已侵染的烟草叶片外植体转接至共培养基($\text{MS}+1.0\text{ mg/L }6\text{-BA}+0.2\text{ mg/L NAA}$)上, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗培养 48 h ;然后将外植体转移至分化培养基($\text{MS}+1.0\text{ mg/L }6\text{-BA}+0.2\text{ mg/L IAA}+100\text{ mg/L Kan}+500\text{ mg/L Cef}$)上,待外植体形成愈伤组织;愈伤组织分化出不定芽时,把不定芽转移至生根培养基($1/2\text{ MS}+50\text{ mg/L Kan}+500\text{ mg/L Cef}$)正常生根后便可正常继代培养。

1.6 低温胁迫

将转 *SlCBF1* 基因烟草、转 *LhCBF1* 基因烟草和野生型烟草同时放入人工气候箱,设定温度为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度为 $400\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光照周期为每天 16 h 光照/ 8 h 黑暗,相对湿度 $65\%\sim75\%$,分别在培养 $0、1、2、12、24、48、72\text{ h}$ 时进行叶片取样,每个样品 3 次重复。之后进行 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恢复处理,分别在 $24、48、72\text{ h}$ 时进行叶片取样。

1.7 荧光实时定量 PCR 分析

1) 将 RNA 反转录成 cDNA。提取样品的 RNA,将 RNA 在 PCR 仪 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min ,立即放到冰上冷却;在冰上加入 $2\text{ }\mu\text{L }5\times\text{RT Master Mix}$ 、 $1\text{ }\mu\text{L RNA}$ 、 $7\text{ }\mu\text{L Nuclease-free water}$,轻轻搅拌混

匀。逆转录反应条件: $37\text{ }^{\circ}\text{C }15\text{ min}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C }5\text{ min}$, $98\text{ }^{\circ}\text{C }5\text{ min}$ 。产物于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2) 根据 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 序列设计引物,以普通烟草肌动蛋白 $\beta\text{-actin}$ 为内参,通过 real-time PCR,检测 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 基因的相对表达量。荧光实时定量 PCR 扩增引物如下:*Sl*-qPCR-F ($5'\text{-CTGATTCTGCTTGAGGTTGC-3'}$)、*Sl*-qPCR-R ($5'\text{-TTGCAAGTAATCCAGGCATG-3'}$)、*Lh*-qPCR-F ($5'\text{-ATTCTCTGATTTCAGCTTGG-3'}$)、*Lh*-qPCR-R ($5'\text{-GCTTCCTCATCCACGAAGTCAT-3'}$)、 $\beta\text{-actin-F}$ ($5'\text{-TCCATGCTCAATGGGATACT-3'}$)、 $\beta\text{-actin-R}$ ($5'\text{-TTCAACCCCTTGCTGTGTGAT-3'}$)。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 12 s , $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s , $80\text{ }^{\circ}\text{C }1\text{ s}$, 40 个循环; $55\sim99\text{ }^{\circ}\text{C}$ 每 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 1 s 。

1.8 转录组测序

将 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫 72 h 分别转化 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 基因的烟草植株作为处理,以相同条件下的野生型烟草植株为对照,通过苏州金唯智生物科技有限公司 Illumina HiSeq[®] 2500 System 测序平台系统进行转录组测序并进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 载体获得

通过酶切处理和连接,重新构建获得最终的载体 RD29A-gene-GUS-pCAMBIA2300,如图 1 所示。

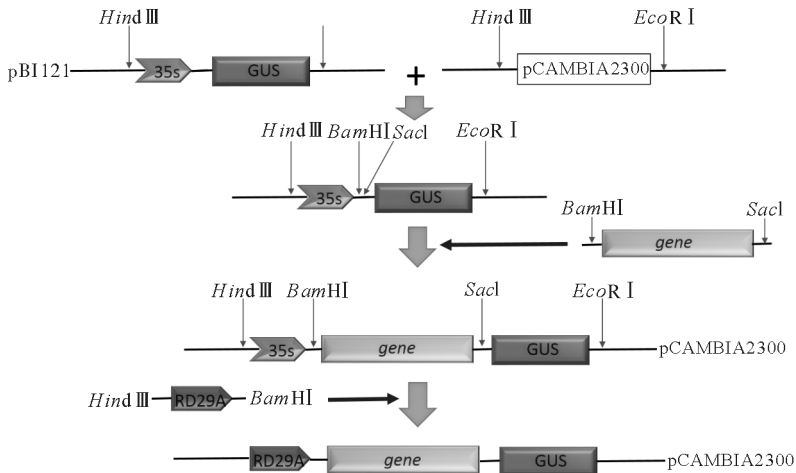


图 1 载体 RD29A-gene-GUS-pCAMBIA2300

Fig.1 RD29A-gene-GUS-pCAMBIA2300 vector

2.2 转基因烟草 PCR 检测

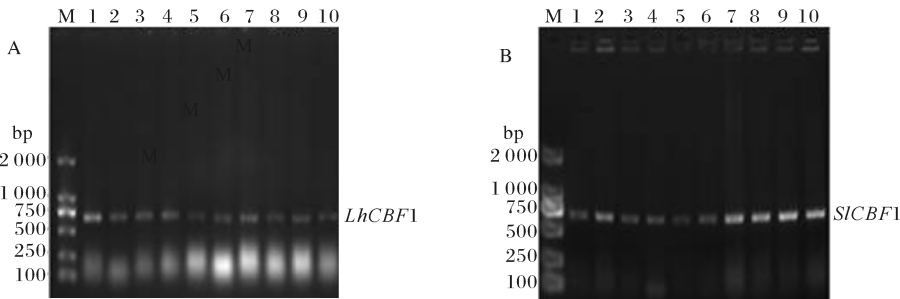
分别选取培养基上正常生长的 10 个转化子,对

转 *LhCBF1*、*SlCBF1* 基因烟草提取 DNA,进行 PCR 检测。

通过 PCR 对转基因植株进行阳性筛选。经过先后 2 批次筛选,将其中的阳性结果进行最终鉴定(图 2)。

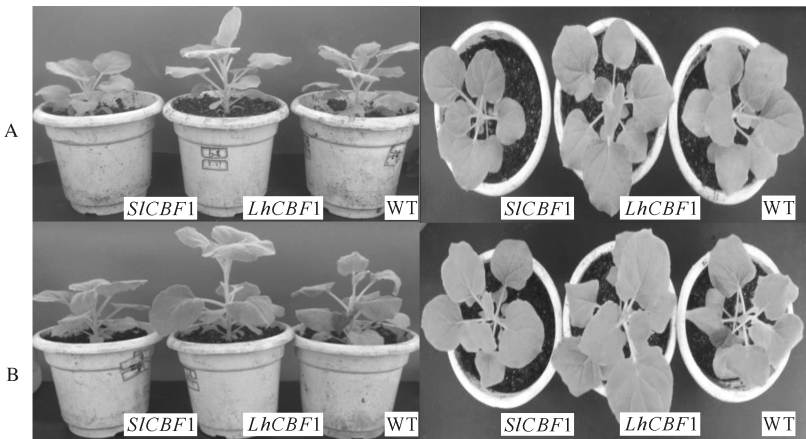
2.3 低温胁迫处理

在 4℃低温胁迫 72 h,发现野生型烟草叶片开始下垂,而转 *SICBF1* 基因烟草和转 *LhCBF1* 基因烟草阳性植株未出现损伤和叶片下垂的直观表型(图 3)。



A:转 *LhCBF1* 烟草; B:转 *SICBF1* 烟草。A:*LhCBF1* transgenic tobacco; B:*SICBF1* transgenic tobacco.

图 2 转基因烟草植株 DNA 的 PCR 检测
Fig.2 PCR of transgenic tobacco plants DNA



A: 4℃低温胁迫前; B:4℃低温胁迫 72 h 后。A:Before 4℃ stress; B:4℃ stress after 72 h.

图 3 4℃低温胁迫处理植株表型
Fig.3 4℃ low temperature stress

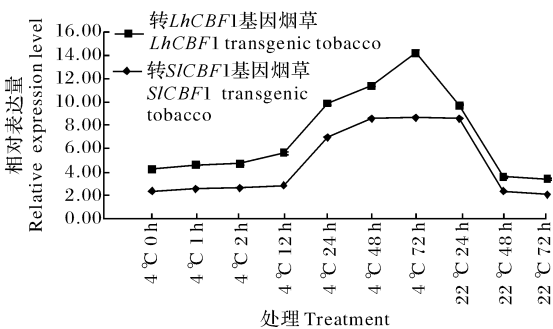


图 4 转 *SICBF1*、*LhCBF1* 基因烟草在低温胁迫和恢复室温下的表达量分析

Fig.4 Expression analysis of *SICBF1*,*LhCBF1* transgenic tobacco at 4℃ and recovery at 22℃

2.4 转基因烟草中 *SICBF1*、*LhCBF1* 基因的表达量分析

以普通烟草肌动蛋白 β -actin 为内参,通过 real-time PCR,检测 *SICBF1* 和 *LhCBF1* 基因的相对表达量。在低温胁迫下,*SICBF1* 基因表达量为内参的 2~8 倍;*LhCBF1* 基因表达量为内参的 2~6 倍,如图 4 所示。

2.5 RNA 质量检测

各样品测序原始数据经过数据过滤,进行 RNA 质量统计,发现读段长度均大于 100 bp,各样品测序数据 Q20 质量分别为 98.05%、99.22%、99.35%,质量较好,如表 1 所示,可用于后续分析。

2.6 基因差异表达分析

对 DESeq 检测的结果按照差异显著性标准(差异基因表达变化 2 倍以上且 $FDR \leq 0.05$)进行筛选,统计基因显著性差异表达情况。对 *SICBF1* 基因过表达烟草植株、*LhCBF1* 基因过表达烟草植株分别以野生型烟草植株的基因表达为参照,分析基因

表 1 测序数据质量统计
Table 1 Sequencing filter statistics

样品 Sample	长度/bp Length	读取数 Reads	基数 Bases	质量/% Q20	质量/% Q30	GC 比/% GC content percent
转 <i>LhCBF1</i> 基因烟草 <i>LhCBF1</i> transgenic tobacco	118.02	45 834 366	5 409 457 179	98.05	94.70	41.86
转 <i>SICBF1</i> 基因烟草 <i>SICBF1</i> transgenic tobacco	122.78	30 436 336	3 736 842 502	99.22	97.72	42.51
野生型 WT	123.00	39 656 020	4 877 523 730	99.35	98.08	42.44

差异表达情况。在 4℃低温胁迫 72 h 条件下,对转 *SICBF1* 基因烟草植株和野生型烟草植株的基因表达水平进行比较,得到差异表达基因 53 个,上调 33 个,下调 20 个;对转 *LhCBF1* 基因烟草植株和野生型烟草植株基因表达水平进行分析(图 5),筛选到 106 个差异表达的基因,其中上调 62 个,下调 44 个;

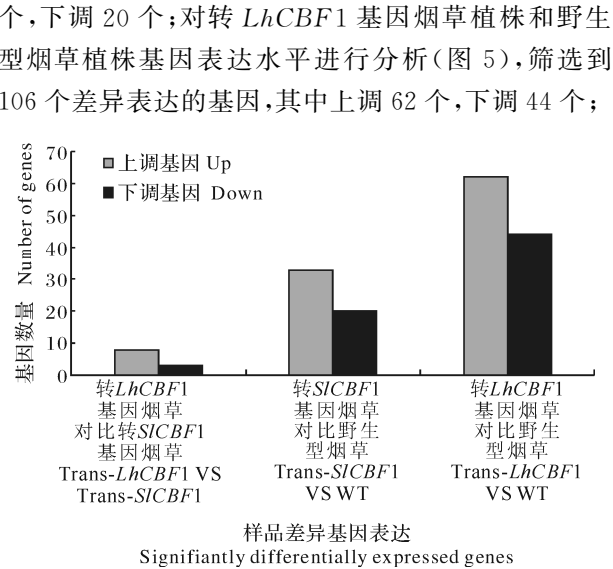


图 5 样品差异比较基因表达的上下调情况
Fig.5 Significantly differentially expressed genes

转 *LhCBF1* 基因烟草植株和转 *SICBF1* 基因烟草植株基因表达水平进行分析,得到差异表达基因 11 个,其中上调 8 个,下调 3 个。

2.7 差异基因功能分析

普通烟草转录组测序为无参考基因组测序,需要对该物种所有转录本序列进行测序,再通过研究不同处理的基因表达情况与差异进行分析。

1)Nr 注释分析。发现差异显著的主要是生长素结合蛋白和热激蛋白等。

2)GO 注释分析。发现普通烟草物种的 GO 分析属于细胞组分的有 11 个分类,分子功能的有 12 个分类,属于生物学过程的组分最多,共有 23 个。

3)普通烟草物种的 COG 注释。有 24 个功能类别,其中多的几类为一般功能预测、碳水化合物运输和代谢类、细胞周期控制,细胞分裂,染色体分配、翻译,核糖体结构和生物发生、翻译后修饰、重组与修复、氨基酸转运和代谢、转录类等功能的基因,如图 6 所示。

4)KEGG 代谢通路分析。发现最多的是与代

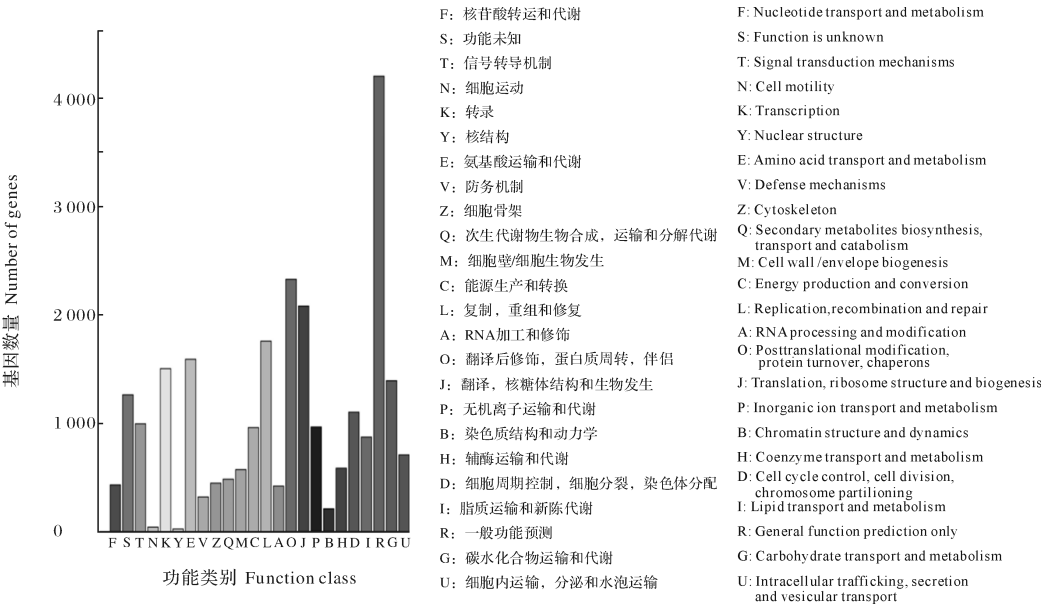


图 6 COG 注释结果
Fig.6 Cluster of orthologous groups of proteins

谢途径相关的通路,肌动蛋白细胞骨架调节、RNA 转运等途径较多。

5)转基因烟草与非转基因烟草基因差异表达聚类分析。结果表明,差异表达基因数量较多并且差异显著(图 7)(所有样品的基因差异表达聚类图中

$FDR \leq 0.05$, $\text{fold change} \geq 2$, 颜色越深,表达量越高,左边每一个不同颜色色块代表表达量相似的一类基因聚簇。以 $\log_2\text{FPKM}$ 值进行聚类,红色表示高表达基因,绿色表示低表达基因。颜色从绿到红,表示基因表达量越高。)

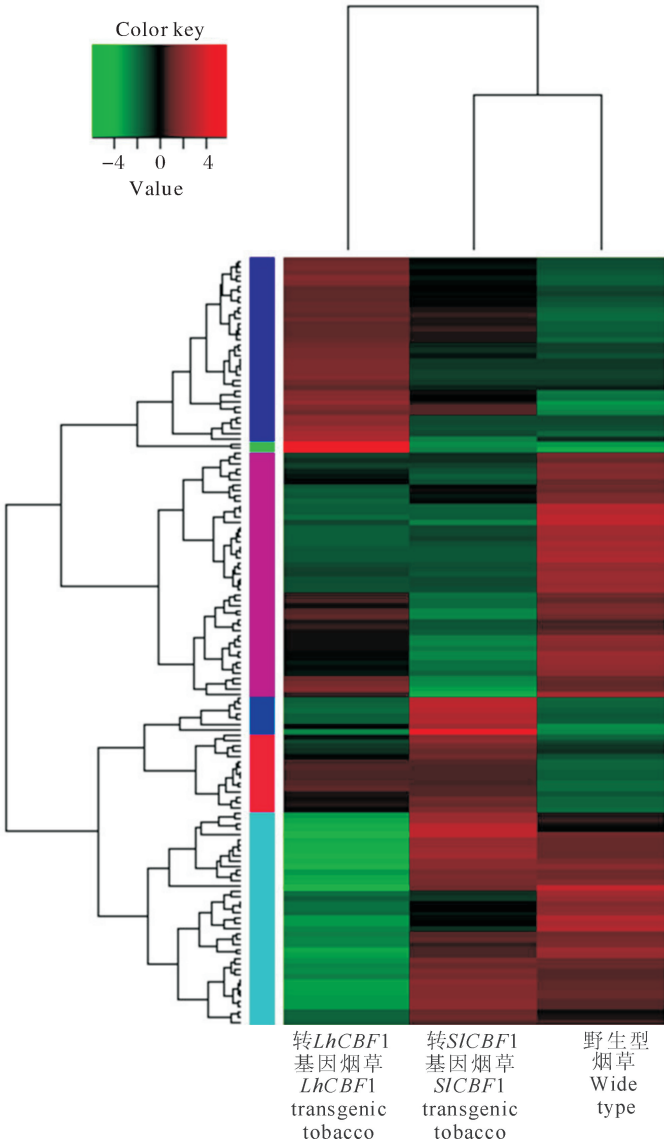


图 7 聚类分析结果

Fig.7 Hierarchical clustering

6)对差异表达显著的基因进行 GO 功能显著性富集分析。①WT 与 *SiCBF1* 细胞层次 GO-C 层次分析。发现转 *SiCBF1* 烟草差异表达基因 *c75037_g1_i1* 编码漆酶蛋白 SKU5,参与细胞壁形成过程;*c72119_g1_i5* 编码光系统 II 核心天线蛋白 CP47 参与光系统 II 过程;*c77204_g1_i7* 编码烟酸磷酸核糖转移酶 I,参与细胞质中选择性脱羧过程;

*c66488_g1_i1*编码肌球蛋白Ⅷ,参与细胞核内部物质运输过程;*c132906_g1_i1* 编码细胞周期蛋白,参与细胞核形成过程。分子功能层次 GO-F 层次分析发现,*c79782_g1_i2* 编码 RNA 解旋酶 DHX36,参与 ATP 结合过程;*c73122_g2_i4* 编码蛋白因子 CRS2,参与 RNA 结合过程;*c75522_g1_i4* 编码转录因子 DIVARICATA,参与 DNA 结合过程;

c79762_g1_i8 编码 AGO 蛋白质 1A,参与核酸结合过程。生物过程层次 GO-P 层次分析发现,*c77033_g3_i1* 编码泛素蛋白连接酶 COP1,参与含花青素化合物代谢过程;*c61621_g1_i2* 编码 α -氨基己二酸半醛合成酶,参与氨基酸分解代谢过程;*c78639_g1_i1* 编码非特异性蛋白质 LOC543757,参与蛋白质折叠;*c78489_g2_i1* 编码 ABC 转运蛋白 7,参与 ATP 分解代谢过程;*c77122_g1_i10* 编码核酸结合蛋白,参与 RNA 多聚腺苷酸化;*c64215_g2_i3*编码 (6-4)光产物光解酶,参与 DNA 修复;*c78625_g1_i4* 编码 ABC 转运蛋白 B9,参与跨膜运输;*c79544_g1_i1* 为 *At1g03370* 基因编码含 GRAM 结构域的蛋白,参与钙离子介导的信号传导;*c79743_g2_i7* 编码 ABC 转运蛋白 B4,参与向地性过程;*c69281_g1_i1* 编码 phyloplanins 蛋白,可以抑制孢子萌发、防止病原菌入侵;*c65404_g1_i1* 编码果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶 α ,参与对葡萄糖刺激的反应。

②WT 与 *LhCBF1* 细胞组分层 GO-C 层次分析。发现转 *LhCBF1* 烟草差异表达基因 *c70445_g1_i7* 编码植脂酰-CoA 合成酶 I ;*c77253_g1_i3* 编码膜蛋白 *At1g16860*,参与质膜信号转导过程;*c67381_g1_i4*编码天冬氨酸蛋白酶 I ,参与细胞壁形成过程;*c73440_g3_i4* 编码 CRAL-TRIO 结构域蛋白 C23B6.04c,参与细胞内部物质运输过程;*C61599_g1_i1* 编码光系统 II 5 ku 蛋白,参与光合作用;*C79617_g1_i4*、*c68804_g2_i2* 编码核糖核酸酶 T2;*c71556_g4_i4* 编码热休克蛋白 Le-HSP17.6 II ;*c67757_g3_i6* 编码驱动蛋白 125 ku 蛋白,参与细胞质形成过程;*c67250_g1_i1* 编码脯氨酸丰富蛋白,参与叶绿体类囊体膜形成过程;*c74911_g1_i13* 编码受体样蛋白激酶 At5g61350,参与细胞核形成过程。分子功能层次 GO-F 分析发现,*c73251_g1_i4* 编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 *At1g56140*;*c77587_g1_i4* 编码富含半胱氨酸的类受体激酶 III ,参与非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性过程。生物过程层次 GO-P 层次分析(图 8)发现,*c79544_g1_i1* 编码 ABR 蛋白 *At1g03370*,参与钙离子介导信号传导过程;*c72280_g1_i2* 编码热应激转录因子 B-3,*c77244_g1_i11* 为 MADS 盒基因,参与调控 DNA 转录过程;*c59305_g1_i2* 编码热应激转录因子 A-6b,参与调控细胞蛋白代谢过程;*c76436_g1_i7* 编码赖氨酸

特异性脱甲基酶 8,参与调控昼夜节律过程。

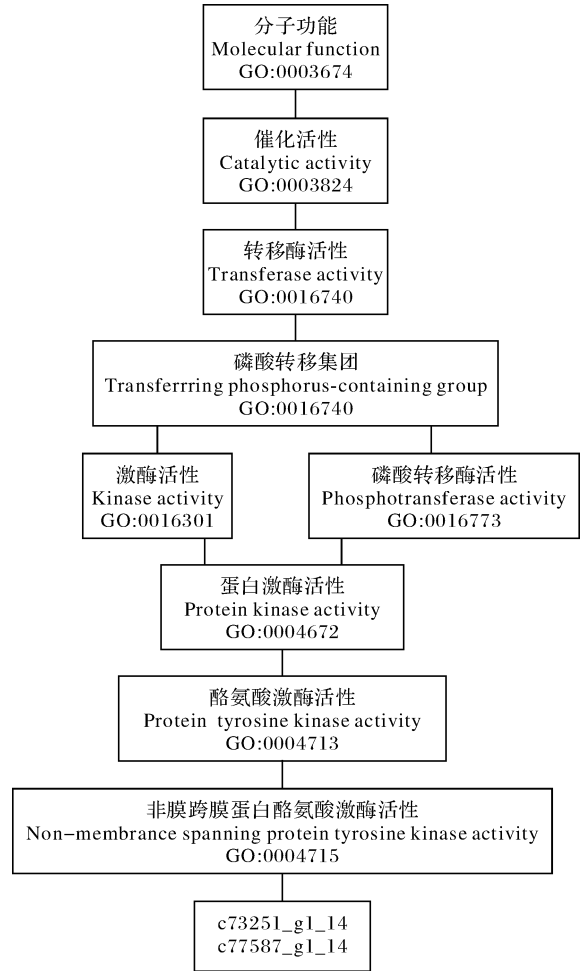


图 8 WT VS *LhCBF1* GO-F 层次分类图
Fig.8 GO-F hierarchical classification map
of WT VS *LhCBF1*

3 讨 论

本研究利用农杆菌介导的叶盘法将类番茄茄和多毛番茄的 *CBF1* 基因转入烟草,对转基因烟草进行低温处理,对 *CBF1* 抗冷基因的调控功能和调控机制及调控途径进行探讨。与野生型烟草进行比较,在 4℃低温胁迫下,*SlCBF1* 和 *LhCBF1* 在转基因烟草中过量表达,转基因植株表现出更强的抗低温能力。该结果与 Zhang 等^[20]通过转 *SsCBF1* 基因提高拟南芥的抗冷能力的结果一致。本研究发现转基因植株抗冷能力的提高可能与其下游所调控的抗冷相关靶基因的表达量有关,*CBF1* 基因正调控下游抗冷相关基因表达和相关蛋白含量发生变化。转录组测序研究证实 *SlCBF1* 和 *LhCBF1* 的表达可以影响下游基因的表达,从而提高植物抗冷相关

的重要化合物的含量,减少冷胁迫对细胞的损伤,增强了对冷胁迫的耐受能力。通过转录组数据分析发现转基因烟草中 *SlCBF1* 调节某些相关合成代谢与分解代谢过程,如酶合成与酶活性的调节,防细胞冻伤的重要化合物的含量调节,小分子与 DNA、RNA 等相关生物大分子的结合能力及相关应激反应等,这些具体的生理生化过程使转 *SlCBF1* 基因烟草植株具有较强的抗低温能力。*LhCBF1* 调节的众多下游基因中,有的具有蛋白酪氨酸激酶活性,与第二信使的产生相关,参与细胞的信号转导过程,参与光合作用和生物过程的调控。调控的下游基因产物定位于线粒体,是细胞能量转化系统的成员。

植物的抗逆表型是由多基因控制的数量性状,而不是由具体某一个基因所能够独立控制的,植株对逆境胁迫会产生多个应答通路,各通路之间会交叉形成一个复杂的网络结构,总体上呈现数量遗传的特点,并且具有较高的遗传力。Xiong 等^[21]于1999年发现 *CBF* 调控的植物抗冷途径并不是一个单一的过程,它与干旱、高盐诱导的途径形成交叉网络,互相协调。因此,*SlCBF1* 基因和 *LhCBF1* 基因这种协同调控的交叉网络还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1035-1040.
- [2] LIU Q, ZHANG J Y, CHEN S Y. Structure and regulatory function of plant transcription factors[J]. *Chinese science bulletin*, 2001, 46(4): 271-278.
- [3] PARK J M, PARK C J, LEE S B, et al. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco[J]. *Plant cell*, 2001, 13(5): 1035-1046.
- [4] CHIANG D A, KEH H C, HUANG H H, et al. Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*[J]. *Plant physiology*, 2002, 130(2): 639-648.
- [5] 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]. *Plant J*, 2004, 39: 905-919.
- [6] THOMASHOW M F, GILMOUR S J, STOCKINGER E J, et al. Role of *Arabidopsis* *CBF* transcriptional activators in cold acclimation[J]. *The journal of plant physiology*, 2001, 112: 171-175.
- [7] THOMASHOW M F. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! [J]. *Plant physiology*, 2001, 125: 89-93.
- [8] XIONG L, SCHUMAKER K S, ZHU J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress[J]. *Plant cell*, 2002, 14: 165-183.
- [9] MILBORROW B V. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plant: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis[J]. *Plant cell*, 2001, 13: 1205-1219.
- [10] ZHU Y, CAI X L, WANG Z Y, et al. An interaction between a MYC protein and an EREBP protein is involved in transcriptional regulation of the *rICE Wx* gene[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 47803-47811.
- [11] MEDINA J, BARGUES M, TEROL J, et al. The *Arabidopsis* *CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration[J]. *Plant physiology*, 1999, 119(2): 463-470.
- [12] JAGLO K R, KLEFF S, AMUNDSEN K L E, et al. Components of the *Arabidopsis* G-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species [J]. *Plant physiology*, 2001, 127: 910-917.
- [13] BENEDICT C, SKINNER J S, MENG R, et al. The *CBF1*-dependent low temperature signaling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp.[J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 1259-1272.
- [14] OENE D, JAN H V, PIET J, et al. Low-temperature-related growth and photosynthetic performance of alloplasmic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with chloroplasts from *L. hirsutum* Humb. & Bonpl[J]. *Euphytica*, 2002, 124(3): 407-421.
- [15] PINO M T, SKINNER J S, PARK E J, et al. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic *AtCBF* expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield[J]. *Plant biotechnology journal*, 2007, (5): 591-604.
- [16] 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: 1086-1094.
- [17] 朱文哲, 李景富, 王傲雪. 低温胁迫对多毛番茄幼苗生理生化特性的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2011(4): 57-62.
- [18] 陈秀玲, 王傲雪, 张珍珠, 等. 番茄 NAC 转录因子家族的鉴定及生物信息学分析[J]. *植物生理学报*, 2014(4): 461-470.
- [19] 林涛, 王傲雪, MAZZUCATO A, 等. 基因组分析揭示番茄育种的历史[J]. *遗传*, 2014(12): 1275-1276.

[20] ZHANG L L, LI Z J, LI J F, et al. Ectopic overexpression of Ss-CBF1, A CRT/DRE-binding factor from the nightshade plant *Solanum lycopersicoides*, confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE, 2013(1): e61810.

[21] XIONG L, ISHITANI M, ZHU J K. Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 1999, 119: 205-211.

Ectopic expression, regulation and function of *CBF1* genes from *Solanum lycopersicoides* and *Lycopersicon habrochaites* in tobacco

GE Jun¹ ZHANG Yao² GONG Chao² CHEN Hongyu² WANG Aoxue² HU Chunxiang¹

1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China ;
2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract The *CBF1* gene from *Solanum lycopersicoides* and *Lycopersicon habrochaites* was transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by agrobacterium-mediated leaf disc method. The transcriptional differences of transgenic tobacco under low temperature stress were studied. The results showed that under low temperature stress, the low temperature tolerance of transgenic tobacco was higher than that of the wild type when the transgenic tobacco was under low temperature stress. Both *SlCBF1* and *LhCBF1* genes were overexpressed in ordinary tobacco. There were 53 differentially expressed genes, 33 up-regulated genes and 20 down-regulated genes in transgenic tobacco plants expressing *SlCBF1* and wild-type tobacco. There were 106 differentially expressed genes, 62 genes up-regulated and 44 down-regulated genes in transgenic tobacco plants expressing *LhCBF1* gene and wild-type tobacco. It is indicated that *SlCBF1* and *LhCBF1* may play an important role in transgenic tobacco to obtain anti-low temperature.

Keywords *CBF1*; *Solanum lycopersicoides*; *Lycopersicon habrochaites*; tobacco; transcriptome

(责任编辑: 张志钰)