



石榴低温响应因子 CBF 基因家族鉴定及其表达分析

刘龙博¹, 郑树轩², 郑洁¹

(1. 淮北师范大学 生命科学学院, 安徽淮北 253001; 2. 河南省农业广播电视学校 夏邑分校, 河南商丘 476400)

摘要 CBF(C-repeat binding factor)是 AP2 家族的一类转录激活因子,在植物响应低温胁迫和提高植物耐寒性方面具有重要作用。虽然多个石榴品种的基因组已经发布,但仍缺乏对其 CBF 基因家族的全面研究。为全面分析石榴(*Punica granatum* L.)CBF 基因家族分子生物学特性,本文对鉴定到的 PgCBFs 成员进行了生物信息和表达分析。结果表明,石榴全基因组中有 7 个 CBF 基因家族成员,蛋白序列中除包含 AP2 结构域外,还具有 CBF 特征序列 PKKPAGR_xKF_xETRHP 和 DSAWR;7 个成员集中分布在染色体 1 和 4 上,编码蛋白质氨基酸长度为 201~267 aa,分子质量为 21.69~29.81 ku;进化分析显示 PgCBFs 基因家族成员分布在 Group II~IV 亚组中,与水稻 CBF 成员组成的 Group I 存在明显区分;除 PgCBF2、PgCBF4、PgCBF5 基因结构中含有 1~2 个内含子外,其余与其他物种类似,属内含子缺失型;编码的蛋白序列均含有保守基序 Motif 1~7;蛋白二级结构主要为不规则卷曲和 α -螺旋,三级结构较为相似。PgCBFs 基因家族扩增主要来源于串联重复,并与拟南芥、苹果、桃分别存在 2 对、5 对和 4 对共线性关系;GO 注释显示 PgCBFs 多与转录调控、低温胁迫或激素诱导相关;启动子区含有多种顺势作用元件,主要为胁迫刺激、激素诱导和光响应元件;基因表达分析发现除 PgCBF6 外,其余成员在根中高度表达,在低温胁迫处理下 PgCBF 在根和韧皮部表达量显著上调,其中 PgCBF7 能够快速响应并持续应答低温诱导。结合进化树、共线性、启动子以及表达分析,推测 PgCBF7 可能与石榴幼苗低温胁迫调控相关。本研究可为深入研究石榴 CBF 基因家族生物学功能提供理论基础。

关键词 石榴(*Punica granatum* L.);CBF(C-repeat binding factor)基因家族;生物信息学;基因表达分析;低温胁迫;PgCBF7

中图分类号 S663.9

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)09-1154-14

植物生长发育过程中不可避免地遭遇多种多样的不良环境胁迫,其中低温被认为是限制植物生长和地理分布的重要生态因素,也是影响农作物与园艺植物生产的主要自然灾害。低温胁迫可引起植物形态变化,并导致代谢紊乱,作物减产,甚至死亡^[1]。研究指出植物可通过调控一系列生理生化过程以适应不利生长环境,如冷驯化(Cold acclimation,CA)被认为是温带植物提高耐寒性和安全越冬的重要策略^[2]。CBF(C-repeat binding factors)又称 DREB(dehydration-responsive element binding),是参与冷驯化的重要转录因子^[3]。它能够识别并结合至低温应答基因 COR(cold-regulated)启动子区的 CRT/DRE(G/AC-CGAC)元件参与冷驯化过程^[4]。模式植物拟南

芥 CBF1/DREB1C、CBF2/DREB1B、CBF3/DREB1A 能够迅速响应低温诱导,进而调控 173 个 COR 参与低温胁迫应答^[5]。过表达 *AtCBF1* 能够显著提高水稻、烟草、草莓、番茄和黄瓜低温胁迫抗性^[6],而 CBF1 和 CBF3 敲除后拟南芥低温胁迫抗性降低约 60%^[7]。以上研究表明 CBF 在植物低温胁迫抗性调控过程中发挥重要功能。

CBF 属于 AP2 转录因子家族的一个保守分支,除含有 AP2 结构域外,在其上下游还分布有 PKKPAGR_xKF_xETRHP 和 DSAWR 两个特征氨基酸序列。拟南芥 CBF 基因家族共 6 个成员,除 CBF1~CBF3 外,还包含有 CBF4/DREB1D、DREB1E/DDF2 和 DREB1F/DDF1^[8]。但 *AtCBF4*、*AtDREB1E* 和 *AtDREB1F* 主要参与

收稿日期:2021-08-29 修回日期:2021-10-15

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(KJ2020A0043,KJ2021B09);安徽省自然科学基金(1908085QC108)。

第一作者:刘龙博,男,助教,研究方向为果树生理与分子生物学。E-mail: Liulb@chnu.edu.cn

通信作者:郑洁,女,讲师,研究方向为果树生理与分子生物学。E-mail: Zhengji@chnu.edu.cn

ABA、干旱以及盐渍胁迫响应,而并非低温。基于全基因组数据,大量 CBF 基因家族成员已在多个植物物种中被广泛研究并证实参与植物低温胁迫响应,如:小麦(*Triticum aestivum*)^[9]、油菜(*Brassica rapa*)^[10-11]、苹果(*Malus domestica*)^[12]、茶树(*Camellia sinensis*)^[13-14]、月季(*Rosa chinensis*)^[15]等。然而有关石榴 CBF 基因家族的研究鲜有报道。

石榴(*Punica granatum* L.)起源于中亚地区,经由丝绸之路引入中国,距今已有 2 000 多年栽培历史。其果实外型美观、口感鲜甜,含大量安石榴苷等鞣花单宁类抗氧化活性物质,具备潜在保健和医用价值^[16]。石榴花期长、树姿美观,兼具有观赏价值,逐步被应用在园林绿化。石榴业已成为一种价值较高的经济树种。但石榴喜暖畏寒,在中国北方及黄淮石榴栽植片区冬春季气温较低,常有降温霜冻甚至倒春寒等灾害性天气,石榴易遭遇周期性冻害问题,特别是以‘突尼斯’软籽石榴为代表的软籽系列品种耐寒性更差,不利于优良品种推广^[17]。但目前石榴抗寒性研究主要集中在通过测定生理生化指标比较不同石榴品种低温胁迫抗性方面^[17-18]。‘大笨籽’‘泰山红’‘突尼斯’基因组密码的成功破译,高质量基因组图谱的成功构建,为进一步系统开展石榴分子生物学和遗传改良奠定了研究基础^[16,19-20]。本研究从石榴全基因组中共鉴定到 7 个 CBF 基因家族成员,基于生物信息学方法对 PgCBFs 基因家族成员氨基酸保守序列、染色体定位、理化性质、进化关系、外显子/内含子排列、蛋白质二级与三级结构、共线性关系、GO 注释、启动子顺势作用元件和表达模式等方面进行综合分析,为进一步探索石榴 CBF 家族基因功能提供参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

‘突尼斯’软籽石榴(*Punica granatum* L. ‘Tunisia’)扦插苗种植于淮北师范大学园艺实验基地温室内,温度控制在 26 °C 左右,湿度为 60%~70%,光照时间为白天 14 h,夜间 10 h,栽培基质为泥炭土、珍珠岩和蛭石(体积比为 3:1:2),低温处理前每 5 d 浇水 1 次;采用上口径和高分别为 28 cm 与 30 cm 的种植盆进行栽种,每盆栽 3 株,每 5 盆为 1 次重复。试验所采用的石榴幼苗均生长稳定且长势一致,无病虫害。

低温处理时将石榴幼苗与种植盆共同放置于低温冷藏柜中,处理温度为-4 °C,分别在处理后 0、1、3、6、12、24 h 收集幼嫩不定根和 1 a 生枝条韧皮部。每个样品收集时间点均设置 3 次重复,样品收集后置于液氮处理并储存于-80 °C 低温冰箱,待用。

1.2 石榴 CBF 基因家族成员鉴定

石榴基因组数据下载自 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Punica+granatum>)^[20],拟南芥和水稻基因组数据分别来源于 TAIR(<http://www.arabidopsis.org>)和 RGAP(<http://rice.uga.edu/>)。使用 7 个拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和 10 个水稻(*Oryza sativa*)CBF 蛋白序列通过本地 Blast 初步鉴定石榴 CBF 候选基因($E < 1.00E^{-10}$)。在 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)中下载 AP2 结构域(PF00847)种子文件,通过 HMMER 3.1 软件鉴定含有 AP2 结构域的候选基因家族成员($E < 1.00E^{-10}$)。提取 Blast 与 HMMER 相同候选基因蛋白序列,利用 SMART(<http://smart.emblheidelberg.de>)数据库和 ClustalW2(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)分析候选 PgCBFs 蛋白质保守结构域与 CBF 基因家族特征序列,确定石榴 CBF 基因家族成员。

根据基因组注释文件,通过 TBtools 软件对 PgCBF 基因家族成员进行染色体定位绘图^[21],并根据染色体定位信息对 PgCBF 成员命名。PgCBF 基因家族成员 mRNA 和 CDS 数据均来自于基因组注释信息。通过 ExPasy 在线网站(<http://www.expasy.org/tools/>)分析各成员的蛋白质长度、分子量和理论等电点。利用在线工具 BUSCA(<http://busca.biocomp.unibo.it/>)对 7 个 PgCBF 成员亚细胞定位进行预测。

1.3 系统进化树构建

除石榴 7 个 PgCBF 基因家族成员外,收集拟南芥(*A. thaliana*)、水稻(*O. sativa*)、大豆(*Glycine max*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、桃(*Prunus persica*)、苹果(*M. domestica*)以及茶树(*C. sinensis*)等 7 个物种的 49 个 CBF 基因家族氨基酸序列,通过 MEGA X 软件构建进化树。设定条件为:最优替代模型使用 JTT + G,构建方法使用最大似然法(Maximum Likelihood method, ML),Bootstrap 设置为 1 000 重复。

1.4 石榴 PgCBF 基因结构、保守基序和蛋白质二级及三级结构分析

根据 7 个物种的 GFF3 文件,提取 50 个 CBF 基因家族成员的基因序列、外显子、内含子以及上下游非翻译区长度与排布信息。通过 Motif Elicitation(<http://meme-suite.org/tools/meme>)分析 CBF 基因家族成员的保守基序类型,设置鉴定到 MEME 数量为 10 个。利用 TBtools 工具对 CBF 基因家族系统进化树、基因结构和保守基序进行可视化^[21]。分别利用 NPS@: SOPMA(<https://www.predictprotein.org/signin>)和 Ex-PaSy Swiss-Model(<http://swissmodel.expasy.org>)预测 PgCBF 基因家族成员蛋白质二级和三级结构。

1.5 CBF 基因家族成员共线性分析

苹果(*M. domestica*)和桃(*P. persica*)基因组数据下载自 GDR(<https://www.rosaceae.org/>)。使用 MCScanX 软件对 4 个物种的基因组序列进行比对,获得它们的 CBF 基因家族共线性关系,使用 TBtools 绘制基因共线性结果^[21]。

1.6 PgCBF 基因家族成员 GO 注释分析

将石榴蛋白序列数据比对到 Swiss-Prot 数据库,利用 TBtools 进行蛋白序列 GO 注释分析^[21]。

1.7 石榴 PgCBFs 基因家族启动子区顺式作用元件分析

使用 TBtools 提取 PgCBF 基因家族各成员

起始密码子(ATP)上游 2 000 bp 的碱基序列作为启动子区域,利用 plantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行顺式作用元件分析。通过 TBtools 构建热图呈现顺势作用元件分析结果^[21]。

1.8 石榴 PgCBFs 基因家族转录表达分析

分别选取石榴根、叶片、花、内种皮、外种皮和果皮转录组数据,分析石榴 PgCBF 基因家族在不同组织中的表达模式。石榴转录组数据下载自 NCBI SRA 数据库(No. SRP100581)^[19]。下载获取转录组后,使用 TBtools 转录组数据分析系列功能,通过 FastQC 进行质控,利用 Trimmomatic 去除接头,使用 Kallisto 对基因表达分析,通过 TBtools 绘制基因表达热图^[21]。

1.9 RNA 提取与石榴 PgCBFs 表达分析

使用 RNA 提取试剂盒(TIANGEN, China)提取石榴根和枝条韧皮部总 RNA,去除基因组 DNA 后,合成 cDNA,并使用 DEPC 水稀释 10 倍用做 qRT-PCR 模板。QRT-PCR 使用 20 μ L 反应体系,包含 1 μ L cDNA 模板、0.5 μ L 上和下游引物、10 μ L SYBR 预混液(chamQ SYBR qPCR Master Mix, Vazyme, China)以及 8 μ L DEPC 水。使用 ABI 7300 进行 qRT-PCR 反应,设定程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 35 s,40 个循环。基因表达量使用 *PgActin* 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达量^[22]。本研究使用的引物信息见表 1。

表 1 石榴 PgCBF 基因 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers used for qPCR assay of PgCBF genes in pomegranate

基因 Gene	基因 ID Gene ID	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence	长度/bp Size
<i>PgActin</i>	GU376750	GATTCTGGTGATGGTGTGAG	GACAATTTCCCGTTCAGCAG	168
<i>PgCBF1</i>	XM_031545436.1	CGAGCCTGCCGAAACAC	TCCGCCTGCCTCAACTT	116
<i>PgCBF2</i>	XM_031545446.1	TGTTCCGACGCCGCACT	GCACGCCTTACCGATACCA	129
<i>PgCBF3</i>	XM_031545424.1	GGCCTGCCGAAACACTT	TCCGCCTGCCTCAACTT	114
<i>PgCBF4</i>	XM_031539966.1	GAGCCAGATGCGGGATT	GCGAGTGGTGTTCAAGGAG	115
<i>PgCBF5</i>	XM_031519246.1	CGGATGCCTTGTCTCCTTGA	TCCACATTTCCCGACTCCTG	120
<i>PgCBF6</i>	XM_031534851.1	TGCTTCTCGCTTCGTGGG	GGCGTGCCTCAACTTTGC	125
<i>PgCBF7</i>	XM_031534105.1	GGCTCGCTTCTTTGGGTT	CTCTTATGGATCGCCGTAT	109

2 结果与分析

2.1 石榴 CBF 基因家族成员鉴定与染色体定位分析

利用 17 个拟南芥和水稻 CBF 蛋白序列通过 Blast 以及 HMM 方法,去除冗余序列后,在石榴

基因组中鉴定到 7 个 CBF 候选基因家族成员。通过多序列比对(图 1),7 个 PgCBF 成员与拟南芥和水稻 CBF 基因家族成员类似,除 AP2 结构域外,也包含有 2 个保守氨基酸序列(PKK/RP-AGR $\times$ KFxETRHP 和 DSAWR),分别位于 AP2 结构域上下游,表明鉴定到 7 个 PgCBFs 为石榴

CBF 基因家族成员。

根据 PgCBF 基因家族成员的染色体位置信息将它们命名为 *PgCBF1* ~ *PgCBF7* (图 2-A)。7 个成员分布在 2 条染色体上, *PgCBF1* ~

PgCBF5 集中分布在 1 号染色体下部, 聚集在一起形成基因簇 (图 2-B), *PgCBF6* 和 *PgCBF7* 分别位于 4 号染色体的上部和下部。

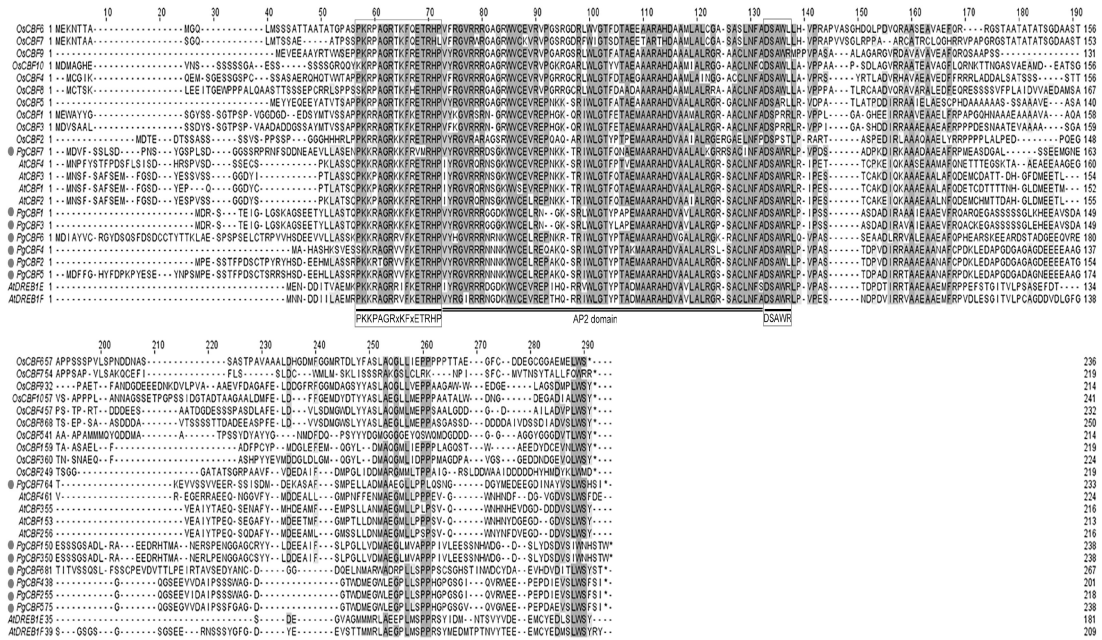
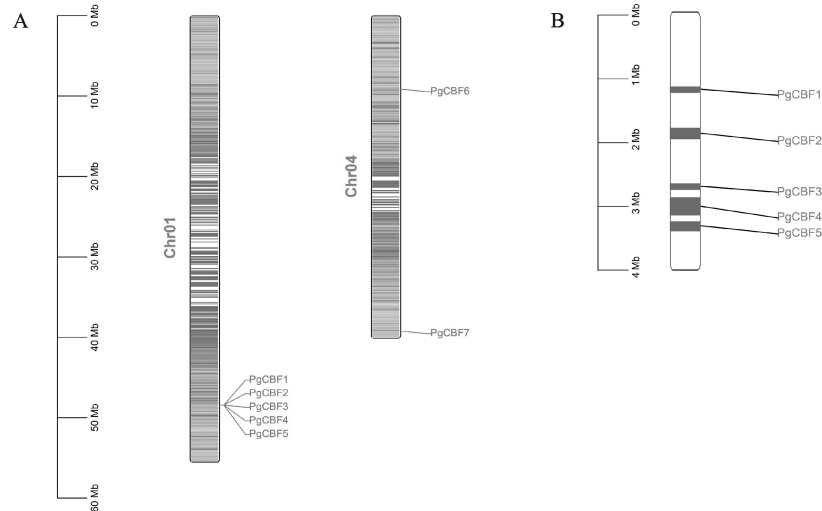


图 1 拟南芥、水稻、石榴 CBF 家族基因蛋白质多序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of CBF protein from *A. thaliana*, *O. sativa* and *P. granatum*



A. *PgCBF1* ~ *PgCBF7* 染色体分布; B. *PgCBF1* ~ *PgCBF5* 在染色体 1 上的分布示意图

A. Distribution of *PgCBF1* — *PgCBF7* in chromosome; B. Schematic representation of *PgCBF1* — *PgCBF5* located in Chr01

图 2 石榴 7 个 CBF 基因染色体分布

Fig. 2 Distribution of seven CBF genes in pomegranate chromosome

2.2 石榴 CBF 基因家族成员序列理化性质分析

如表 2 所示, 除 *PgCBF1* 和 *PgCBF3* 外, 其余 5 个 PgCBF mRNA 片段大小各不相同, 长度约为 1 119 ~ 2 763 bp. *PgCBF1*、*PgCBF3* 和 *PgCBF5* 编码区 (714 bp) 和蛋白质 (238 aa) 长度

一致, 蛋白质分子质量 (MW) 大小相近, *PgCBF7* 与它们相似。7 个成员理论等电点 (pI) 为 4.89 ~ 5.60; 亚细胞定位预测与转录因子蛋白功能定位一致, 均处于细胞核内。

表 2 PgCBF 基因家族成员理化性质分析

Table 2 Analysis of physical and chemical properties of family members of PgCBF gene family

基因 Gene	基因 ID Gene ID	mRNA 长度/bp mRNA length	CDS 长度/bp CDS length	蛋白长度/aa Protein length	蛋白分子质量/ku Molecular mass	理论等 电点 pI	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>PgCBF1</i>	XM_031545436.1	995	714	238	25.89	5.60	Nucleus
<i>PgCBF2</i>	XM_031545446.1	1 698	654	218	23.79	4.89	Nucleus
<i>PgCBF3</i>	XM_031545424.1	995	714	238	25.71	5.23	Nucleus
<i>PgCBF4</i>	XM_031539966.1	2 763	603	201	21.69	5.30	Nucleus
<i>PgCBF5</i>	XM_031519246.1	1 497	714	238	25.85	4.92	Nucleus
<i>PgCBF6</i>	XM_031534851.1	1 119	801	267	29.81	5.58	Nucleus
<i>PgCBF7</i>	XM_031534105.1	1 140	699	233	25.47	5.09	Nucleus

2.3 CBF 基因家族进化树构建

使用石榴等 8 个物种的 56 个 CBF 基因家族氨基酸序列构建进化树。将 CBF 基因家族分为 4 个亚组,分别包含 9、8、19 和 20 个成员(图 3)。水稻除 *OsCBF2* 外,其他 9 个成员全部位于 Group I,表明 Group I 中的 CBF 成员在单子叶植物中可能有独特的作用^[23]。与其他研究结果

一致,拟南芥 6 个成员分布于 Group III 和 IV 中^[23], *PgCBF2*、*PgCBF4* ~ *PgCBF6* 与 *AtDREB1F* 和 *AtDREB1E* 具有较近的亲缘关系, *PgCBF7* 与 *AtCBF1* ~ *AtCBF4*、*MdCBF1*、*PpCBF6*、*SlCBF1*、*CsCBF3* 等均归属于 Group III。*PgCBF1* 和 *PgCBF3* 具有较近亲缘关系,均归属于 Group II。

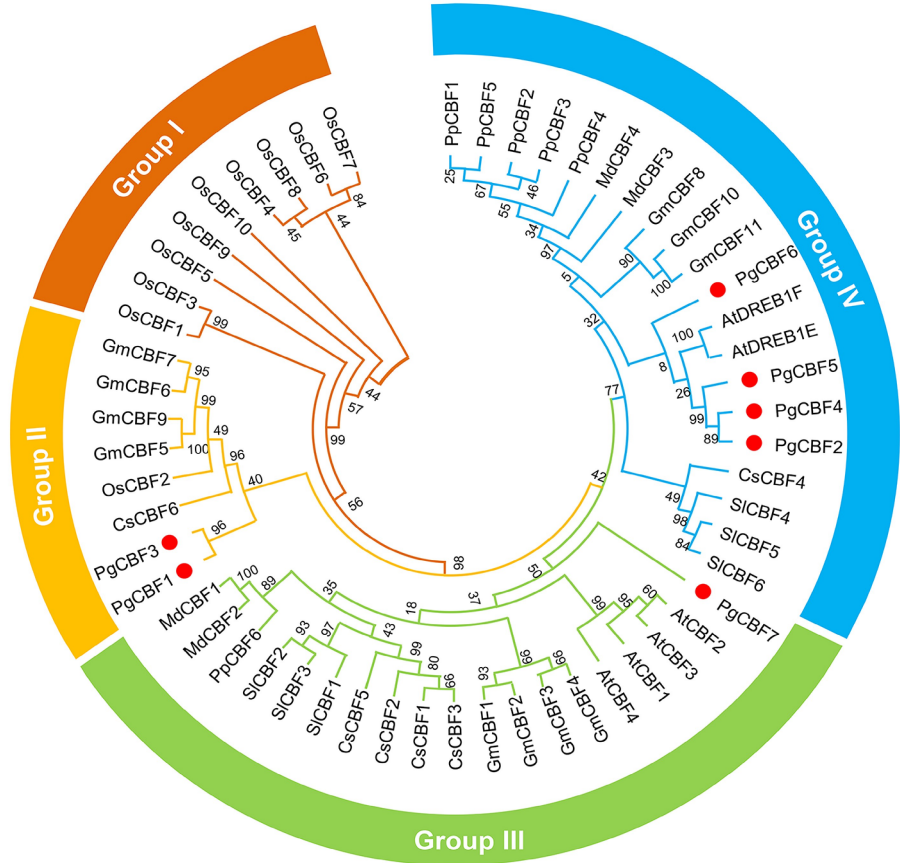


图 3 石榴与拟南芥、水稻、大豆、番茄、桃、苹果及茶树 CBF 基因家族进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of CBF gene family from pomegranate(Pg),Arabidopsis (At) , rice (Os),soybean(Gm) ,tomato(Sl) ,peach(Pp) ,apple(Md) and tea(Cs)

2.4 CBF 家族基因结构、保守基序及结构域分析

为进一步分析 CBF 基因家族进化关系,综合分析包括 PgCBF 在内的 50 个 CBF 基因结构和保守基序(图 4)。通过基因组 GFF 注释文件对 CBF 基因家族 CDS 分布以及外显子和内含子统计分析,结果显示大部分 CBF 成员基因结构相似仅有 1 个外显子,不包含内含子,为内含子缺失型(图 4-A)。仅有少部分成员含有 1~2 个内含子,如: *AtDERB1E*、*PgCBF2*、*PgCBF4* 和 *PgCBF5*。

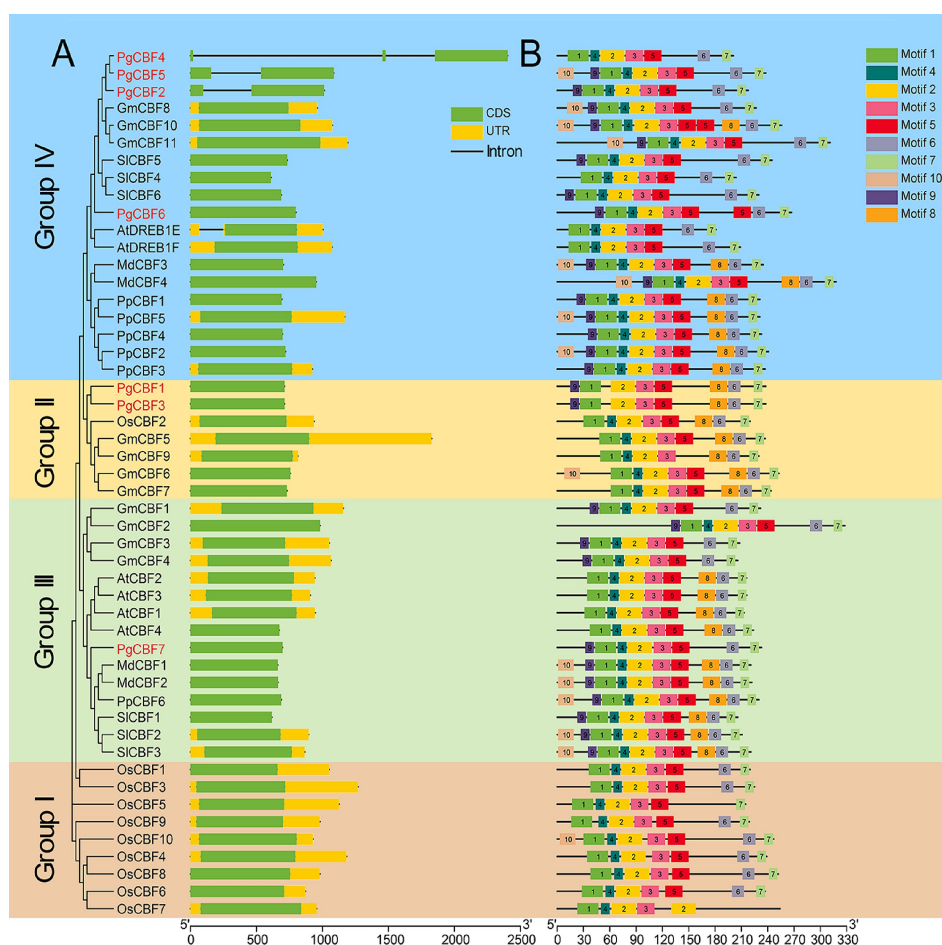
通过 MEME 在线工具预测 CBF 基因家族成员的 10 个保守基序(图 4-B),各保守基序的氨基酸长度为 11~25 aa(表 3)。除了少部分成员外,大多数 CBF 蛋白含有 motif 1~7,且在不同 CBF 亚组中排列较为一致(图 4-B),表明这些 motif 在 CBF 家族成员高度保守。除与其他物种 CBF 成

员基本一致的 motif 组合与排列顺序外,7 个 PgCBF 成员中有 6 个成员含有 motif 9(图 4-B)。

2.5 石榴 CBF 家族基因蛋白质二级和三级结构预测

对 7 个石榴 CBF 基因家族成员蛋白二级结构预测发现该家族包含 α -螺旋、延伸链、 β -转角和不规则卷曲(表 4)。在 7 个编码蛋白中主要是 α -螺旋(22.56%~34.50%)和不规则卷曲(44.50%~59.02%),延伸链(9.05%~15.79%)和 β -转角(0.42%~5.50%)较少。

7 个石榴 CBF 基因家族成员蛋白三级结构与模型 5wx9.1.A 较为相似(42.65%~46.58%)(图 5),且 7 个 PgCBFs 蛋白的三级结构较为相似,均由 1 个 α -螺旋和 2 个 β -折叠构成。



A. 基因结构; B. 保守基序分布; 刻度尺分别表示基因长度(bp)和蛋白序列长度(aa)

A. Gene structure; B. Distribution of conserved motif elements. Scale markers represent gene length(bp) and protein sequence length(aa), respectively

图 4 CBF 基因家族基因结构和保守基序分析

Fig. 4 Analysis of gene structure and conserved motif elements of CBF gene family

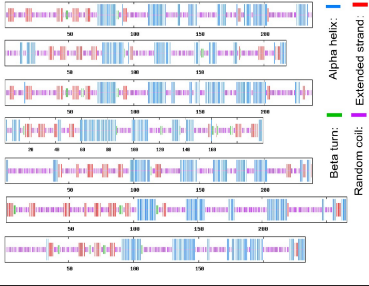
表 3 石榴和其他 6 个物种 CBF 蛋白保守基序分析

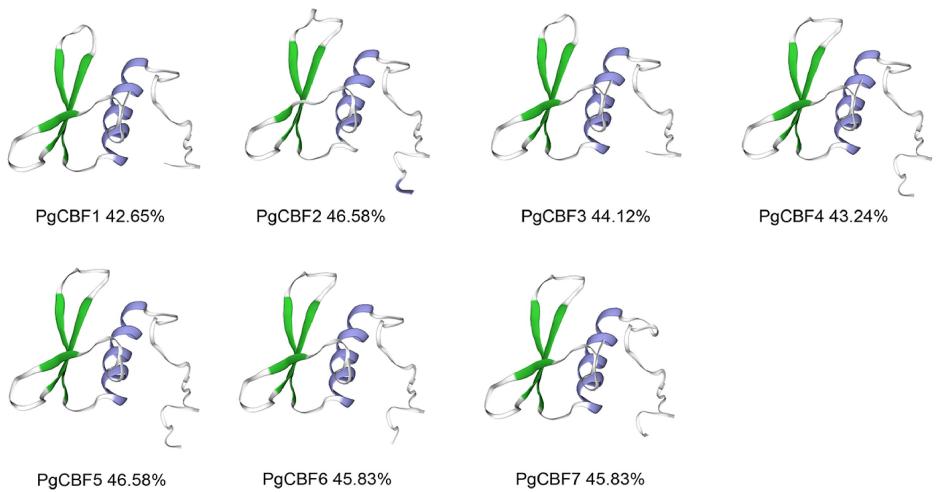
Table 3 Analysis of conserved motif of CBF protein in pomegranate with other six species

基序 Motif	长度/aa Length	氨基酸保守序列 Amino acid conserved sequence
Motif 1	25	PKKRAGRKKFKETRHPVYRGVRRRN
Motif 2	29	KKSRIWLGTYPTAEMAARAHDAALALRG
Motif 3	21	RSACLNFAWSAWRLPVPASTB
Motif 4	11	GKWVCEVREPN
Motif 5	21	AKDIRRAAAEAAEAFRPEESS
Motif 6	15	LLASMAEGLLLSPPP
Motif 7	11	EDDADVSLWSY
Motif 8	21	EAEQSGSLFYMDDEAMFDMPG
Motif 9	11	SDEEVJLASSR
Motif 10	19	MBIFSSYYSDSQEESESSS

表 4 石榴 CBF 基因家族蛋白二级结构分析

Table 4 Secondary structure of protein sequence of CBF gene family in pomegranate

蛋白 Protein	α-螺旋/% α-helices	延伸链/% Extended strands	β-转角/% β-turns	不规则卷曲/% Random coils	二级结构元件分布 Distribution of secondary structure elements
PgCBF1	30.80	12.66	1.69	54.85	
PgCBF2	26.73	14.29	1.84	57.14	
PgCBF3	33.76	12.24	2.53	51.48	
PgCBF4	34.50	15.50	5.50	44.50	
PgCBF5	29.93	13.08	0.42	56.54	
PgCBF6	22.56	15.79	2.63	59.02	
PgCBF7	30.17	9.05	3.45	57.33	



绿色代表 β-折叠,蓝色代表 α-螺旋
Green represents β-sheet and the blue represents α-helix

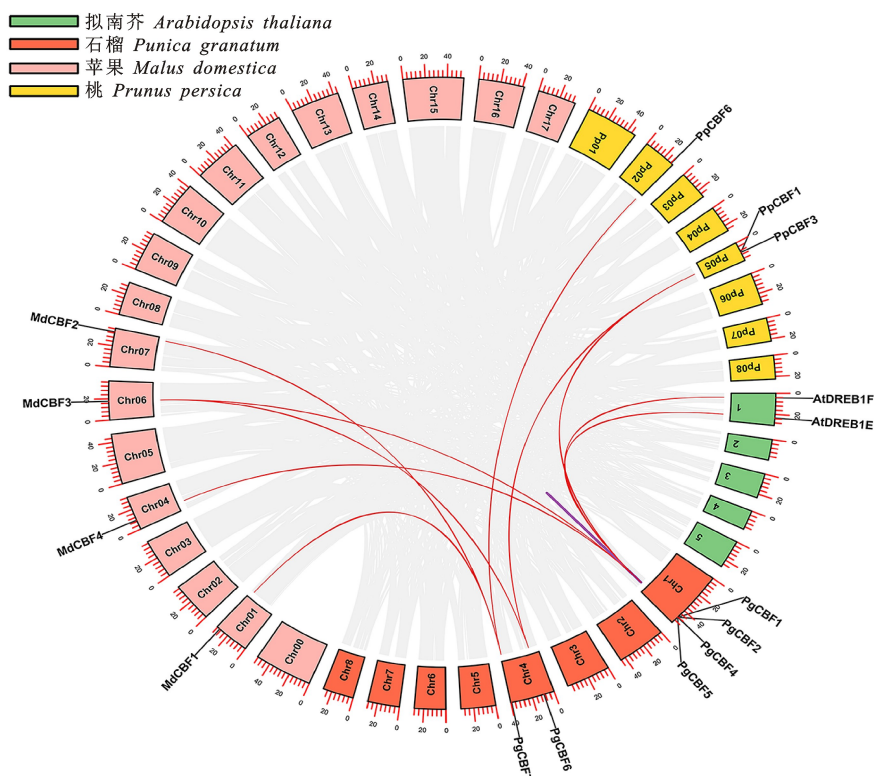
图 5 7 个石榴 CBF 基因家族蛋白三级结构预测

Fig. 5 Tertiary structure of seven CBF proteins in pomegranate

2.6 石榴 PgCBF 基因共线性分析

如图 6 所示,在石榴 PgCBF 家族间存在 1 个串联复制基因对 (PgCBF4 / PgCBF5)。并鉴定到石榴共与拟南芥、苹果和桃的 10 个 CBF 基因家族成员存在共线性关系。其中, PgCBF1 分别

与 AtDREB1F、MdCBF4、MdCBF3 和PpCBF1 具有共线性关系; PgCBF2 与 AtDREB1E 具有共线性关系; PgCBF4 与 PpCBF3 具有共线性关系; PgCBF6 与 MdCBF3 以及PpCBF1 具有共线性关系; PgCBF 7 与 MdCBF 1、MdCBF 2 和



紫色曲线表示石榴 CBF 基因间的共线性关系,红色曲线表示石榴和其他物种 CBF 基因间的共线性关系

Purple curve represents synteny relationship among pomegranate CBF genes, red curves represent synteny relationship between pomegranate and CBF genes of other three species

图 6 石榴、拟南芥、苹果和桃的 CBF 基因家族共线性分析

Fig. 6 Synteny analysis of CBF genes family of *P. granatum*, *A. thaliana*, *M. domestica* and *P. persica*

PpCBF6 具有共线性关系。

2.7 石榴 PgCBF 基因 GO 注释

利用 GO 注释分析发现 7 个 PgCBF 可被划分在分子功能、细胞组分、生物过程 3 个大类的 26 个亚类中(图 7)。分子功能主要涉及顺势作用元件结合与转录调控(10 个亚类),细胞组分主要参与细胞核内组分形成(1 个亚类),生物过程中涉及冷驯化(GO: 0009631)、响应低温、高温与环境胁迫刺激(GO: 0050826、GO: 0009408、GO: 0006950、GO: 0050896)、参与赤霉素、ABA 等激素合成与信号转导过程(GO: 0009686、GO: 0046885、GO: 0009738、GO: 0071215、GO: 0010817、GO: 0009737、GO: 0009737、GO: 0032870)。GO 注释表明 7 个 PgCBF 参与转录调控与胁迫及植物激素刺激应答,尤其是温度胁迫。

2.8 石榴 PgCBF 家族基因顺式作用元件分析

位于上游启动子区的顺势作用元件是植物内

部信号和胁迫刺激响应的重要调控区域。对 7 个石榴 CBF 基因家族起始密码子上游 2 kb 碱基序列进行分析。鉴定到一系列与胁迫相关(低温、干旱、缺氧)、激素相关(ABA、MeJA、GA、SA、生长素)以及光诱导相关顺势作用元件(图 8)。在胁迫诱导的启动子元件中,除 *PgCBF6* 外,6 个成员含有 16 个缺氧诱导元件 ARE;有 5 成员含有 6 个低温应答元件 LTR;4 个成员含有 7 个干旱诱导元件 MBS。在激素响应元件中,在 7 个成员中鉴定到 36 个 ABA 响应元件 ABRE,40 个 MeJA 应答元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif,2 个 GA 应答元件 P-box,7 个生长素应答元件 AuxRR-core、TGA-element、TGA-box,5 个 SA 应答元件 TCA-element。在 PgCBF 启动子区还存在大量光诱导元件,其中 G-box 元件最多,共在 7 个成员共鉴定到 40 个。结果表明 PgCBF 参与响应石榴胁迫应答、激素和光诱导。

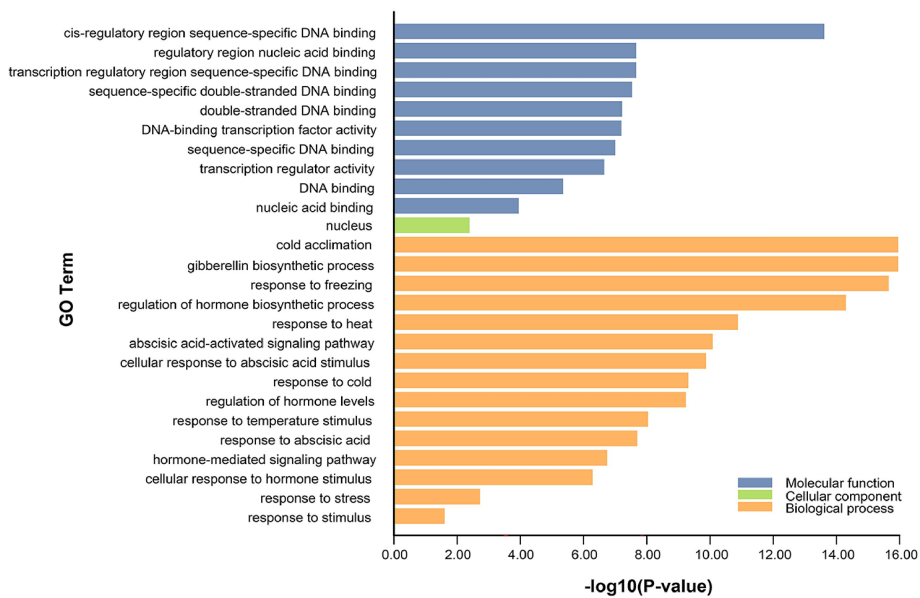


图 7 石榴 PgCBF 基因家族成员 GO 注释分析

Fig. 7 Information from gene ontology(GO) annotation of PgCBFs

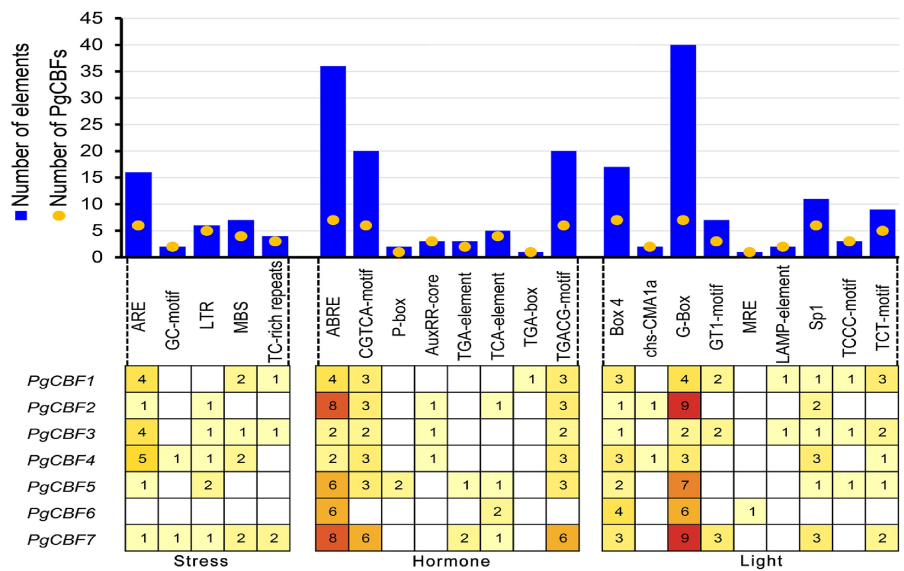


图 8 石榴 CBF 基因家族启动子顺式作用元件分析

Fig. 8 Analysis of putative cis-regulatory elements in promoter regions of CBF genes family in pomegranate

2.9 石榴 PgCBF 家族基因表达分析

通过石榴转录组数据^[19],在石榴根、叶片、花和果实不同组织中对 7 个 PgCBF 成员的表达模式进行分析(图 9)。结果显示,除 *PgCBF6* 外,其余 6 个基因在根中显著表达,其中 *PgCBF5* 的表达量最高。*PgCBF2* 和 *PgCBF5* 在花和果皮中表达显著高于其余成员。*PgCBF6* 仅在果皮中有显著表达。与其他成员相比, *PgCBF7* 在果实内种皮和外种皮中表达上调。但所有 PgCBFs 在叶片

中只有痕量表达或不表达。结果表明 PgCBF 成员在不同组织中发挥功能存在差异。

在低温处理后的石榴根和枝条韧皮部中 PgCBF 基因家族成员表达量均显著上调,但存在差异(图 10)。在根中, *PgCBF1*、*PgCBF2*、*PgCBF4* 和 *PgCBF5* 在低温处理后 0~6 h 表达量逐步升高并达到最大值,其中 *PgCBF2*、*PgCBF4* 和 *PgCBF5* 在 6 h 表达量均为 0 h 的 10 倍以上,而 *PgCBF1* 仅为 0 h 的 2.2 倍。在枝条

3 讨论

低温是制约植物生长发育的一个主要非生物胁迫因子。植物遭受冷胁迫时,约有 12% 的转录组基因参与 CBF 转录因子转录表达调控过程,以增强植物耐寒能力^[24]。随着植物全基因组测序、组装和注释研究的进一步发展,通过比较基因组方法在不同的植物物种中识别和鉴定到越来越多的 CBF 基因家族。通过分析发现 CBF 是一个小的基因家族,如在拟南芥(*A. thaliana*)、水稻(*O. sativa*)、油菜(*B. rapa*)、大豆(*G. max*)、苹果(*M. domestica*)、桃(*P. persica*)、梨(*Pyrus bretschneideri*)、葡萄(*Vitis vinifera*)^[23]、鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)^[25]和茶树(*C. sinensis*)^[14]中分别鉴定到 6、10、9、11、4、6、11、4、14 和 6 个 CBF 成员。同样的,本研究共在石榴全基因组中仅鉴定到 7 个 CBF 基因家族成员(表 2),包含 1 个串联复制基因对(*PgCBF4* / *PgCBF5*)(图 6),但在染色体间未鉴定到片段重复(图 6),这可能是 CBF 家族成员较少的一个原因。鉴定到的 7 个 PgCBF 蛋白序列中均含有由 59 个氨基酸残基组成的高度保守 AP2 结构域和 2 个特征序列(图 1),其中位于 N 端的特征序列内的 PKK/RP-AGR_xKF 属于细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS)序列,表明 PgCBF 定位在细胞核内(表 2),与棉花 GhDREB1^[26]、茄子 SmCBF^[27]、茶树 CsCBF^[14]亚细胞定位分析结果一致。

构建系统进化树有利于分析基因家族成员蛋白质结构与功能。与其他双子叶植物 CBF 成员分布一致(图 3)^[23],PgCBF 成员分布在 Group II ~ IV。在石榴中,*PgCBF2*、*PgCBF4*、*PgCBF5*、*PgCBF6* 与 *AtDREB1F*、*AtDREB1E* 共同归属于 Group IV,且均含有 ABRE 顺势作用元件(图 8),推测它们可能参与 ABA 信号转导或胁迫应答过程(图 7)。在 Group III 中多数成员能够显著响应低温胁迫,如:苹果 *MdCBF1* 转基因至拟南芥能够显著诱导 *AtCOR15a*、*AtRD29A* 和 *AtRD29B* 表达,低温胁迫抗性明显增强^[12]; *PpCBF6* 在桃遭遇低温胁迫时表达量显著升高,能够结合至 *PpVIN2* 启动子区抑制其表达,降低液泡转化酶(vacuolar invertase, VIN)活性,提高蔗糖含量,从而缓解低温对果实的伤害^[28];在低温胁迫条件下,番茄 *slcbf1* 突变体更易遭受低温

胁迫伤害,电导率和丙二醛含量明显升高^[29];茶树 *CsCBF3* 在拟南芥中过表达后,能够显著诱导 *AtCOR15a* 和 *AtRD29A* 表达上调,明显改善了转基因植株在 -4 °C 和 -8 °C 的生长状态^[14]。在石榴中, *PgCBF7* 与 *MdCBF1*、*MdCBF2*、*PpCBF6* 均归属 Group III,并与它们存在共线性关系(图 6),GO 注释(图 7)、LTR 顺序作用元件(图 8)以及基因表达分析(图 10)等结果表明 *PgCBF7* 能够直接并快速响应低温胁迫,其可能在低温胁迫中发挥重要功能,但具体分子机制还需进一步研究说明。

PgCBF 基因家族成员与已鉴定到的大部分 CBF 基因家族成员平均蛋白质长度、分子质量均值类似^[14-15]。同时,不同基因亚组在基因结构和 motif 组成与排列上并没有明显的区分(图 4),PgCBF 蛋白二级和三级结构类似(表 4,图 5),表明 CBF 基因家族在进化过程中相对保守^[13]。

一些转录因子已被证实能够结合至 CBF 启动子区参与其表达调控,如 ICE1/2、CAMTA1-3、PIF4/7、EIN3、MYB15 等^[15]。在石榴 PgCBF 启动子区鉴定到大量胁迫应答、激素响应与光诱导元件(图 8)。虽然 *PgCBF1* 和 *PgCBF6* 启动子区并未鉴定到 LTR 元件,但在低温处理诱导后显著诱导表达量上升(图 10),表明在石榴中可能存在不依赖 LTR 元件调控 CBF 表达途径。如研究指出,*PIF4/7* 与 *CBF1* 和 *CBF2* 基因启动子中的 G-box 结合后能够在长日照条件下抑制 *CBF1* 和 *CBF2* 表达,而在短日照条件这种抑制可被解除,从而导致 CBF 表达上调,增加耐寒性^[30]。此外,CBF 还参与植物激素信号转导。如外源 MeJA 处理能够显著诱导苹果愈伤组织中 *MdCBF1*、*MdCBF2*、*MdCBF3* 表达,增强愈伤组织低温抗性^[31]。在敲除番茄 *slcbf1* 后,吡啶乙酸的含量明显增加,但 MeJA、ABA 和玉米素核苷的含量减少^[29]。需要注意的是,虽然在 7 个启动子中共鉴定到 36 个 ABRE 元件(图 8),但研究发现 ABA 可直接结合至 *COR* 基因启动子区的 ABRE 元件,而提高植物耐寒性并不依赖 CBF 途径^[32];然而,目前仍然缺少 ABA 与 CBF 基因表达调控相关报道,但可能存在某些机制,它可以通过与其启动子结合来调节 CBF 表达^[33]。仍需要进一步研究以阐明 ABA 和 CBF 基因之间的复杂调节关系。

本研究共在石榴基因组中鉴定到 7 个 CBF

基因家族成员,它们的蛋白质序列与结构相对保守;通过 GO 注释与顺式作用元件分析,发现 PgCBF 基因家族与石榴激素和胁迫响应紧密相关,尤其在低温条件下各基因表达均明显上调,特别是 *PgCBF7* 能够快速响应低温诱导并持续高表达,表明 *PgCBF7* 可能在石榴幼苗低温胁迫应答中发挥重要调控功能。

参考文献 Reference:

- [1] TAJI T, OHSUMI C, IUCHI S, *et al.* Important roles of drought and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2002, 29(4): 417-426.
- [2] THOMASHOW M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 571-599.
- [3] PARK S, SHI A, MOU B. Genome-wide identification and expression analysis of the CBF/DREB1 gene family in lettuce[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5733.
- [4] 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]. *Plant Journal*, 1998, 16(4): 433-442.
- [5] PARK S, LEE C M, DOHERTY C J, *et al.* Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network [J]. *Plant Journal*, 2015, 82(2): 193-207.
- [6] 丁杨林, 施怡婷, 杨淑华. 植物响应低温胁迫的分子机制研究[J]. *生命科学*, 2015, 27(3): 398-405.
- [6] DING Y L, SHI Y T, YANG SH H. Molecular mechanisms of plant responses to cold stress [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(3): 398-405.
- [7] NOVILLO F, MEDINA J, SALINAS J. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(52): 21002-21007.
- [8] AKHTAR M, JAISWAL A, TAJ G, *et al.* DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants [J]. *Journal of Genetics*, 2012, 91(3): 385-395.
- [9] MOHSENI S, CHE H, DJILLALI Z, *et al.* Wheat CBF gene family: identification of polymorphisms in the CBF coding sequence [J]. *Genome*, 2012, 55(12): 865-881.
- [10] LEE S C, LIM M H, YU J G, *et al.* Genome-wide characterization of the CBF/DREB1 gene family in *Brassica rapa* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 61: 142-152.
- [11] 解盼, 刘蔚, 康郁, 等. 甘蓝型油菜 CBF 基因家族的鉴定和表达分析 [J]. *作物学报*, 2021, 47(12): 2394-2406.
- [11] XIE P, LIU W, KANG Y, *et al.* Identification and relative expression analysis of CBF gene family in *Brassica napus* L [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(12): 2394-2406.
- [12] XUE Y, WANG Y Y, PENG R H. Transcription factor *MdCBF1* gene increases freezing stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biologia Plantarum*, 2014, 58: 499-506.
- [13] WANG P, CHEN X, GUO Y, *et al.* Identification of CBF transcription factors in tea plants and a survey of potential CBF target genes under low temperature [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5137.
- [14] HU Z, BAN Q, HAO J, *et al.* Genome-wide characterization of the C-repeat binding factor (CBF) gene family involved in the response to abiotic stresses in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 921.
- [15] LI J, ZHENG G, LI S, *et al.* Characterization of *Rosa chinensis* CBF genes and the function of RcCBF6 in cold tolerance [J]. *Journal of Plant Biology*, 2020, 63: 267-278.
- [16] YUAN Z, FANG Y, ZHANG T, *et al.* The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(7): 1363-1374.
- [17] 刘贝贝, 陈利娜, 牛娟, 等. 6 个石榴品种抗寒性评价及方法筛选 [J]. *果树学报*, 2018, 35(1): 66-73.
- [17] LIU B B, CHEN L N, NIU J, *et al.* Selection of methods for evaluation on cold tolerance of six pomegranate varieties [J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(1): 66-73.
- [18] 焦其庆, 冯立娟, 尹燕雷, 等. 石榴冻害及抗寒评价研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2019, 55(4): 425-432.
- [18] JIAO Q Q, FENG L J, YIN Y L, *et al.* Research progress on evaluation of freezing injury and cold resistance of pomegranate [J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55(4): 425-432.
- [19] QIN G H, XU C, MING R, *et al.* The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome and the genomics of punicalagin biosynthesis [J]. *Plant Journal*, 2017, 91(6): 1108-1128.
- [20] LUO X, LI H, WU Z, *et al.* The pomegranate (*Punica granatum* L.) draft genome dissects genetic divergence between soft- and hard-seeded cultivars [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(4): 955-968.
- [21] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: an Integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTEN 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.
- [23] LI W, CHEN Y, YE M, *et al.* Evolutionary history of the

- C-repeat binding factor/dehydration-responsive element-binding 1(CBF/DREB1) protein family in 43 plant species and characterization of CBF/DREB1 proteins in *Solanum tuberosum*[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2020, 20(1): 142.
- [24] SUN J, PENG X, FAN W, *et al.* Functional analysis of *Bp-DREB2* gene involved in salt and drought response from a woody plant *Broussonetia papyrifera*[J]. *Gene*, 2014, 535(2): 140-149.
- [25] GUAN Y, LIU S, WU W, *et al.* Genome-wide identification and cold stress-induced expression analysis of the CBF gene family in *Liriodendron chinense*[J]. *Journal of Forestry Research*, 2021, 32: 2531-2543.
- [26] SHAN D P, HUANG J G, YANG Y T, *et al.* Cotton GhDREB1 increases plant tolerance to low temperature and is negatively regulated by gibberellic acid[J]. *The New Phytologist*, 2007, 176(1): 70-81.
- [27] ZHOU L, LI J, HE Y, *et al.* Functional characterization of *SmCBF* genes involved in abiotic stress response in eggplant(*Solanum melongena*) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 233(15): 14-21.
- [28] CAO K F, WEI, Y Y, CHEN Y, *et al.* *PpCBF6* is a low-temperature-sensitive transcription factor that binds the *PpVIN2* promoter in peach fruit and regulates sucrose metabolism and chilling injury[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 181: 111681.
- [29] LI R, ZHANG L, WANG L, *et al.* Reduction of tomato-plant chilling tolerance by CRISPR-Cas9-mediated SICBF1 mutagenesis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(34): 9042-9051.
- [30] LEE C M, THOMASHOW M F. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor(CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(37): 15054-15059.
- [31] WANG Y, XU H, LIU W. Methyl jasmonate enhances apple' cold tolerance through the JAZ-MYC2 pathway[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2019, 136: 75-84.
- [32] SHI Y, DING Y, YANG S. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation [J]. *Plant Cell Physiology*, 2015, 56(1): 7-15.
- [33] JUNG W J, SEO Y W. Identification of novel C-repeat binding factor(CBF) genes in rye(*Secale cereale* L.) and expression studies[J]. *Gene*, 2019, 684: 82-94.

Identification and Expression Analysis of CBF(C-repeat Binding Factor) Gene Family in Pomegranate(*Punica granatum* L.)

LIU Longbo¹, ZHENG Shuxuan² and ZHENG Jie¹

(1. School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei Anhui 253001, China;

2. Xiayi Branch of Henan Agricultural Radio and Television School, Shangqiu Henan 476400, China)

Abstract As a class of AP2 family transcription factors, C-repeat binding factor(CBF) gene family plays an important role in resisting low-temperature stress and improving cold tolerance of plants. The genome of pomegranate is released, but a comprehensive study on its CBF genes family is still lacking. In order to characterize the CBF gene family of pomegranate(*Punica granatum* L.), PgCBF family genes were comprehensively analyzed by using bioinformatics methods and qRT-PCR. In this study, the total of seven pomegranate CBF genes were from pomegranate genome. Sequences alignment revealed that all the CBF proteins contained AP2 DNA-binding domain, signature sequences PKKPAGR_xKF_xETRHP and DSAWR, respectively. These PgCBFs were mainly distributed on chromosome 1 and 4, respectively. The number of coding amino acid of PgCBFs was 201—267 aa, and the molecular mass was 21.69—29.81 ku. Phylogenetic analysis showed that PgCBFs were divided into Group II—IV, which were clearly distinguished from Group I that was composed of OsCBFs. Except *PgCBF2*, *PgCBF4*, *PgCBF5* contained 1—2 intron, the other members of PgCBF family genes were intron-less type, which were similar with other six species. MEME results showed that Motif 1—7 were conserved and presented in CBF protein sequences of all seven species. Secondary structure of the PgCBFs protein was mainly composed of random coils and alpha helix, and their three-dimensional structure was relatively similar each other. The syntenic analysis indicated that tandem repeat may play a major role in expansion of PgCBF gene family, and syntenic relationships showed that PgCBF

gene had two, five and four syntenic gene pairs with *Arabidopsis*, apple and peach, respectively. GO annotation analysis indicated that some PgCBFs genes participated in transcriptional regulation, low-temperature stress or hormone induce response. The analysis of cis-acting elements showed that there were various cis-acting elements related to stress, hormone, and light. RNA-seq and qRT-PCR analysis revealed that except for *PgCBF6*, most of PgCBFs were significantly expressed in the root, and the expression levels of PgCBFs were significantly induced by low-temperature stress in root and phloem, especially, *PgCBF7* could rapidly and continuously respond to low temperature induction. Combined with the results of phylogenetic tree, MCScan, cis-acting element and expression analysis, we speculated that *PgCBF7* might be involved in regulation of low-temperature tolerance of pomegranate. This study laid a foundation for exploration of the molecular function of the pomegranate CBF family genes.

Key words Pomegranate(*Punica granatum* L.); CBF(C-repeat binding factor) gene family; Bioinformatics; Gene expression analysis; Low-temperature stress; *PgCBF7*

Received 2021-08-29

Returned 2021-10-15

Foundation item Natural Science Research Project for Universities and Colleges in Anhui Province (No. KJ2020A0043, KJ2021B09); Natural Science Foundation for Youth of Anhui Province (No. 1908085QC108).

First author LIU Longbo, male, assistant research fellow. Research area: physiology and molecular biology of fruit tree. E-mail: Liulb@chnu.edu.cn

Corresponding author ZHENG Jie, female, lecturer. Research area: physiology and molecular biology of fruit tree. E-mail: Zhengjie@chnu.edu.cn

(责任编辑: 潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)