

辣椒 *CaCBF1A* 基因的克隆及非生物胁迫下表达分析

魏小春¹,李艳²,姚秋菊¹,原玉香¹,赵艳艳¹,王志勇¹,
姜俊²,段俊枝³,蒋武生¹,张晓伟^{1*}

(1. 河南省农业科学院园艺研究所,河南 郑州 450002; 2. 驻马店市农业科学院,河南 驻马店 463000;

3. 河南省农业科学院农业经济与信息研究所,河南 郑州 450002)

摘要:为揭示 *CaCBF1A* 基因在辣椒抗逆机制中发挥的功能,对辣椒 *CaCBF1A* 基因进行克隆与分析。以豫椒 101 为材料,根据参考基因组序列设计引物,通过 PCR 技术从辣椒基因组 cDNA 中获得 CBF 基因 *CaCBF1A*。经生物信息学分析,该基因具有一个完整的 ORF(471 bp),编码 156 个氨基酸。*CaCBF1A* 编码的蛋白质包含保守的 AP2 DNA 结合域。对其亚细胞定位、跨膜结构进行分析,预测其定位在叶绿体中,存在跨膜结构。荧光定量 PCR 检测结果表明,低温、高温和盐胁迫均可诱导 *CaCBF1A* 基因的表达,其表达量在迅速达到峰值后又降低,说明 *CaCBF1A* 是一个逆境胁迫快速响应基因,推测其在辣椒抗逆机制中起着重要的作用。

关键词: 辣椒; CBF 基因; 基因克隆; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: S641.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2016)12-0110-06

Cloning and Expression Analysis of *CaCBF1A* Gene from *Capsicum annuum* L. under Abiotic Stress

WEI Xiaochun¹, LI Yan², YAO Qiuju¹, YUAN Yuxiang¹, ZHAO Yanyan¹, WANG Zhiyong¹,
JIANG Jun², DUAN Junzhi³, JIANG Wusheng¹, ZHANG Xiaowei^{1*}

(1. Institute of Horticulture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhumadian Institute of Agricultural Sciences, Zhumadian 463000, China;

3. Institute of Agricultural Economy and Information, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To reveal the roles of *CaCBF1A* gene played in pepper, the *CaCBF1A* gene was cloned and analyzed. According to the CBF gene sequence from *Capsicum annuum* genome, the primer was designed. Yujiao 101 was taken as material and *CaCBF1A* was acquired from the genome of pepper by PCR. The bioinformatics analysis results indicated that the gene possessed complete ORF with length of 471 bp, encoding 156 amino acids. Protein encoded by *CaCBF1A* gene in pepper contained conservative AP2 DNA binding domain. Besides, the subcellular localization and membrane structure were analyzed. It was predicted that protein encoded by *CaCBF1A* was located in chloroplasts, and contained transmembrane structure. Furthermore, the results by fluorescence quantitative PCR showed that cold, high temperature and salt stress could induce the expression of *CaCBF1A* gene, the expression level of which was decreased rapidly after peak point. These could provide some indication that *CaCBF1A* was rapid response gene, which played important roles in the resistance mechanisms of pepper.

Key words: *Capsicum annuum* L.; CBF gene; gene cloning; abiotic stress; expression analysis

收稿日期:2016-07-20

基金项目:国家大宗蔬菜产业技术体系豫北综合试验站项目(CARS-25-G-27);河南省重大科技专项(151100110400)

作者简介:魏小春(1983-),男,河南项城人,助理研究员,博士,主要从事植物生理与分子生物学研究。

E-mail:jweixiaochun@126.com

* 通讯作者:张晓伟(1965-),男,河南平舆人,研究员,硕士,主要从事蔬菜育种与分子生物学研究。

网络出版时间:2016-11-25 14:24:33

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1092.S.20161125.1424.028.html>

辣椒(*Capsicum annuum* L.)原产于中南美洲热带雨林地区的墨西哥、秘鲁等地, 属茄科辣椒属植物, 果实内含有丰富的维生素C、糖类和辣椒素等营养物质。辣椒在我国各地普遍栽培, 但在整个生育过程中, 从播种到果实收获, 其会时时刻刻受到干旱、低温、高温等非生物胁迫, 轻者使植物生长发育受阻, 重者导致植株死亡。

植物在应对非生物胁迫的过程中通常会发生一系列的生理生化反应, 并且形成了一定的胁迫防御机制^[1], 胁迫防御机制主要是通过防御反应基因的转录激活与抑制发生作用的^[2]。在防御反应基因的转录调控中, 转录因子起着重要的作用。转录因子通过转录调控功能区域与基因启动子区域中的顺式作用元件结合, 从而来调控基因的表达。当然, 一些转录因子其自身也受诱导调控, 改变特定转录因子的表达条件会使植物的胁迫抗性发生很大变化^[3]。CBF基因属于AP2/EREBP基因家族, 是一种受逆境特异诱导表达的转录因子, 可激活下游多个效应基因的表达, 从而提高植物对低温、干旱等多种逆境胁迫的抗性^[4,5]。

目前, 辣椒中 *CaCBF1A* 功能尚未明确。为此, 对辣椒 *CaCBF1A* 基因进行生物信息学分析, 同时, 利用荧光定量 PCR 技术研究低温、高温和盐胁迫与 *CaCBF1A* 基因表达量之间的关系, 以期从一定程度上揭示该基因的分子功能。

1 材料和方法

1.1 材料

辣椒材料豫椒 101, 由河南省农业科学院园艺研究所蔬菜育种课题组繁育。完全营养液为霍格兰 - 阿农配方。基质有机质、速效氮、速效钾、速效磷的含量分别为 219 g/kg、1.765 9 g/kg、1.730 g/kg、

0.093 6 g/kg, pH 值为 5.46。

1.2 方法

1.2.1 辣椒苗的准备 供试辣椒种子用纱布包好, 先在 55 ℃ 的热水中温汤浸种 20 min, 然后室温条件下充分吸水 6~8 h, 播于营养钵(6 cm × 8 cm)中, 每穴 1~2 粒种子。待子叶出土后放于光照强度为 300~600 μmol/(m² · s) 的培养架上进行培养, 生长温度控制在 25 ℃/18 ℃(昼/夜), 出苗后浇 1/2 营养液, 每钵留壮苗 1 株, 长至四叶一心时转苗至大营养钵(10 cm × 10 cm)中。当幼苗第 5 片真叶展开时移入人工气候箱进行处理。

1.2.2 材料处理 低温处理: 当植株 6~8 片真叶展平时, 将穴盘放入预先降温到 4 ℃(昼)/0 ℃(夜)的光照培养箱内进行低温处理, 光照强度为 160 μmol/(m² · s)、光周期为 12 h 光/12 h 暗。高温处理: 当植株 6~8 片真叶展平时进行高温处理, 控制昼/夜温度为 (45 ± 2) ℃/(35 ± 2) ℃。盐处理: 设置 CK(不加 NaCl) 和加 NaCl 200 mmol/L 2 个处理。每个处理重复 3 次, 每个重复 10 株。每处理的材料数 30 株, 未处理材料为对照。处理时间为 0、6、12、24、48、96 h。取样后立即浸入液氮中, 并放入 -80 ℃ 超低温冰箱保存。

1.2.3 辣椒总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 总 RNA 的提取采用 TRIZOL 法(USA)。cDNA 第一链合成采用 Thermo Scientific 公司 cDNA 合成试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit。

1.2.4 基因引物设计与合成 根据辣椒基因组数据库(<http://peppergenome.snu.ac.kr/>)中 CBF 基因(CA03g15650)的序列, 在 5'UTR 及 3'UTR 设计引物(表 1), 委托 Invitrogen 生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 辣椒 *CaCBF1A* 基因克隆及其表达检测所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')	用途	片段大小/bp
CBFF	GTTGGTTGTGAAGTAAGAGAA	扩增 cDNA 全长	596
CBFR	CGTAAATTAAAGGAGGGAGTA	扩增 cDNA 全长	
qCBFF135	TGAGGCTGTCGACTCTTC	检测 <i>CaCBF1A</i> 的表达	205
qCBFR339	AGGTGGAGGTAGCGTTAGT	检测 <i>CaCBF1A</i> 的表达	
cACTINF228	TATTGTCAGCAACTGGGATG	扩增内参基因	157
cACTINR384	GGTCTCAAACATAATCTGGGT	扩增内参基因	

1.2.5 *CaCBF1A* 基因 cDNA 全长克隆 以第一链 cDNA 为模板, 用 CBF 基因引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 54 ℃ 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 反应 35 个循环。

PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 回收片段与 pMD19-T 载体(TaKaRa 公司)连接, 热击法转化 DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 挑选阳性单克隆送公司测序, 得到目的片段序列。PCR 酶

试剂 (SeqAmpTM DNA Polymerase) 购自 Clontech 公司, Marker DL2000 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2.6 序列分析 利用 ClustalX 2 软件对克隆的 *CaCBF1A* 基因的核苷酸及其编码氨基酸序列与其他物种的对应序列进行比对分析；根据所得的 cDNA 序列，利用 NCBI 的 Blastp 分析工具对基因所编码的氨基酸进行同源序列比对，并结合 MEGA 4.0 构建进化树；利用软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 *CaCBF1A* 基因编码的氨基酸组分、分子量和等电点进行分析；利用软件 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析氨基酸序列的亲/疏水性；利用软件 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 对蛋白质二级结构进行预测；利用软件 BaCellLo (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm>) 进行亚细胞定位的预测。

1.2.7 实时荧光定量分析 对上述高温、低温及盐胁迫处理后的辣椒叶片提取总 RNA, 反转录成 cDNA。定量 PCR 反应体系为 20.0 μ L, 含有 10.0 μ L 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Thi RNaseH Plus), 2.0 μ L cDNA, 上、下游引物 (qCBFF135 及 qCBFR339) 各 1 μ L (引物浓度 10 μ mol/L), 6 μ L ddH₂O。运行程序为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 40 次循环。每个样品重复 3 次。

以 *Actin* 基因为内参,扩增引物为 cACTINF228 和 cACTINR384。实时荧光定量 PCR 仪为罗氏公司 LightCycler® 96。采用 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 法计算基因相对表达量^[6]。



图 2 *CaCBF1A* 基因编码蛋白的保守结构域分析

Populus		- - - - -	MLASRNPKRAGKKFRETTRPVYRGVRERNRSGKWWCEVREB	42
Hevea	MDVPPCQSYEDSLPFT	- - - - -	-HSCSLHYPESTLSDCTCSAL-- RANLSEDEVILASSAYPKKRAKGKKFRETTRPVYRGVRERNRSGKWWCEVREB	86
Morus	MDAPCQSSEYYNQYS	- - - - -	- VSDLWTFEASDMSMPDSGG- RNNMNPSEDEVILASSAYPKKRAKGKKFRETTRPVYRGVRERNRSGKWWCEVREB	87
Betula	MDVPS-	- - - - -	- QYS - - - - - SNSEG- - AMHLSEDEIRLNLASRNPKRAGKKFRETTRPVYRGVRERNRSGKWWCEVREB	65
Mangifera	MEFFSSFSLSPHSGNSQFWSPGSDLPTAASSPIGDSNNSISRNRGKPSDEDEVILASSAYPKKRAKGKKFRETTRPVYRGVRERNRSGKWWCEVREB	- - - - -	- - - - - 91	
Capsicum	MNIFRSEYYSDPLTES	- - - - -	- SSSFDSSSIYSPNRAIPSDEVILASNNFKPAGKKFRETTRPVYRGVRERNRSGKWWCEVREB	79
pepper				
Solanum	MNIPEIIVYSDPLIT	- - - - -	- ESSSSSSSSSSSHIIILASNNPKRPGRKPFRETTRPHPIYRGIRMRNSGKWWCEVREB	73
Populus		* * * * * : * * * : * * * * : * * * : * * : * * : * * : * .	* * * * * : * * * : * * * * : * * * : * * : * * : * * : * .	
Hevea	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	SAWLPVPASS	- AKDIQKAAAHAGGPFPE- - - CGVGGEMLRTGDEGEKAH	129
Morus	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	BSWLPVPASR	- AKDIQKAAAHAGGPFPE- - - FSGELQKENK	169
Betula	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	SAWLPVPASR	- AKDIQKAAAHAGGPFPE- - - GTEG- - - DFGQ	168
Mangifera	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	SAWLPVPASR	- AKDIQKAAAHAGGPFPE- - - DNAED- - - TGEKPAA	144
Capsicum	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	SAWLPVPASR	- AKDIQKAAAHAGGPFPE- - - ESKAV- - - LDRQP	175
pepper	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	SAWLPVPASR	- AKDIQKAAAHAGGPFPE- - - QEEGG- - - LKOESRMVE	155
Solanum	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	SAWLPVPASR	- - - KLEG- - - ISK	72
Populus	- - - - -	MAAHRHVAALALRGRSACLNPFADS	- - - KLEG- - - ISK	163
Hevea	NKKSRIWLGTPTAAEMAARHVAALALRGRSACLNPFADS	SAWLPVPASR	- - - ESEGVSGEADSSSPOT- - - SDNSTPETP	
Morus				
Betula				
Mangifera				
Capsicum				
pepper				
Solanum				
Populus		: : : : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * .	: : : : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * .	
Hevea	BTIAAEAGBEEVF	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- GDWNMENIDADPLWLSWPSI- -	192
Morus	WITTEASPDHFV-	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- GEIDMADAATPLWLSWPSI- -	231
Betula	YMDAEAEVAMP-	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- YSSDADABAYANVLSWLSYSD- -	230
Mangifera	DAAAVEAFAV-	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- YSSDADABAYANVLSWLSYSD- -	202
Capsicum	- - - - -	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- YSSDADABAYANVLSWLSYSD- -	234
pepper	- - - - -	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- YSSDADABAYANVLSWLSYSD- -	215
Solanum	HMERTTMSDWFV-	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- EA- - - RICHEVLSWLSYSD- -	156
Populus	YSSSSTPSMF-	- - - - -	- YMDEAEVGPMGLANNAEAGMLLPPHCIGGGGD- EA- - - RICHEVLSWLSYSD- -	228
Hevea	FMDDEALFCMPGTLANNAEAGMLLPPCOCAGIC-	- - - - -	- - - RICHEVLSWLSYSD- - - DVETATAADTPLWLSWLSYSD- -	
Morus	BSVFFNMNNEVEZSRF-	- - - - -	- - - RICHEVLSWLSYSD- - - DVETATAADTPLWLSWLSYSD- -	
Betula	FMDDEALFCMPGTLANNAEAGMLLPPCOCAGIC-	- - - - -	- - - RICHEVLSWLSYSD- - - DVETATAADTPLWLSWLSYSD- -	
Mangifera	BSVFFNMNNEVEZSRF-	- - - - -	- - - RICHEVLSWLSYSD- - - DVETATAADTPLWLSWLSYSD- -	
Capsicum	FMDDEALFCMPGTLANNAEAGMLLPPCOCAGIC-	- - - - -	- - - RICHEVLSWLSYSD- - - DVETATAADTPLWLSWLSYSD- -	
pepper	BSVFFNMNNEVEZSRF-	- - - - -	- - - RICHEVLSWLSYSD- - - DVETATAADTPLWLSWLSYSD- -	
Solanum	BSVFFNMNNEVEZSRF-	- - - - -	- - - RICHEVLSWLSYSD- - - DVETATAADTPLWLSWLSYSD- -	
Populus				
Hevea				
Morus				
Betula				
Mangifera				
Capsicum				
pepper				
Solanum				

图 3 辣椒 *CaCBF1A* 编码氨基酸序列与其他作物 CBF 编码氨基酸序列比对

2 结果与分析

2.1 辣椒 *CaCBF1A* 基因的克隆

以辣椒 cDNA 第 1 条链为模板,用引物 CBFF/CBFR 扩增出 600 bp 左右的目的片段(图 1),将目的片段回收后连接转化,挑取阳性克隆用引物检测后测序。测序结果显示,该片段与辣椒基因组数据库中目的片段完全一致,大小为 596 bp,该基因从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAG 具有一个完整的 ORF(471 bp),编码 156 个氨基酸。

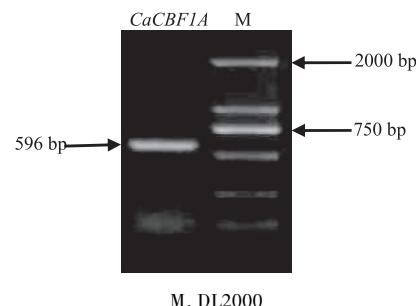


图 1 辣椒 *CaCBF1A* 基因 PCR 扩增

2.2 辣椒 *CaCBF1A* 基因编码氨基酸序列的同源性分析

对辣椒 *CaCBF1A* 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 中进行 Blastp 比对分析,结果显示其蛋白质含有 AP2/EREBP 基因家族保守的 AP2 DNA 结合域(图 2)。将辣椒 *CaCBF1A* 基因编码的氨基酸序列与其他物种的 CBF 基因编码的氨基酸序列进行比对,结果表明,辣椒 CBF1A 氨基酸与其他作物 CBF 氨基酸有高度的相似性,属于 CBF 家族(图 3)。

2.3 辣椒 CaCBF1A 蛋白理化性质的预测

利用 ProtParam 软件预测辣椒 CaCBF1A 蛋白分子质量为 17.058 ku, 理论等电点为 4.29, 分子式为 $C_{765}H_{1153}N_{191}O_{236}S_8$ 。该蛋白质中含量最高的氨基酸为 Ser, 相对含量达到了 12.2%, 含量较低的氨基酸有 Cys、His 和 Trp, 共计为 1.2%, 不含有 Pyl 和 Sec。其脂肪系数为 77.63, 疏水性平均值为 0.043。说明该蛋白质为疏水性蛋白。

2.4 辣椒 CaCBF1A 蛋白亚细胞定位、二级结构及疏水性分析

利用 BaCelLo 软件对辣椒 CaCBF1A 进行亚细胞定位的预测, 结果表明其定位在叶绿体中(图 4)。

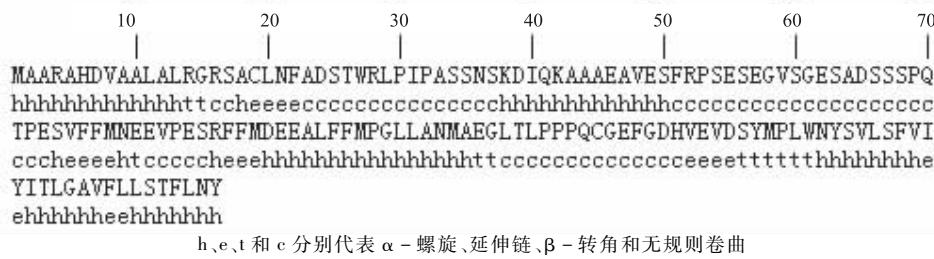


图 5 辣椒 CaCBF1A 蛋白二级结构预测

采用 ProtScale 对 CaCBF1A 蛋白的疏水性进行分析(图 6), 整体来看, 亲水性氨基酸和疏水性氨基酸在整个蛋白质中分布不均匀, 有明显的疏水区。

2.5 辣椒 CaCBF1A 蛋白进化树分析

使用 NCBI 中 Blastp 工具对辣椒 CaCBF1A 氨基酸序列进行同源性检索, 对检索到的数据再利用 MEGA 4.0 软件构建系统进化树。结果表明, 辣椒 CaCBF1A 与茄属 (*Solanum*) 植物 CBF1 亲缘关系最近, 而与杨属 (*Populus*)、葡萄属 (*Vitis*) 植物等亲缘关系较远(图 7)。

蛋白质的多肽链通过折叠、螺旋和卷曲等二级结构形成比较稳定的空间结构, 利用软件分析 CaCBF1A 的二级结构, 发现多个氨基酸参与 α -螺旋、无规则卷曲和延伸链等二级结构的形成, 其中 α -螺旋、延伸链、 β -折叠和无规则卷曲分别占 42.95%、12.18%、7.05% 和 37.82% (图 5)。这 4 个结构是构成 CaCBF1A 蛋白的基本结构。

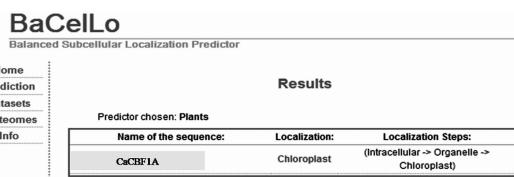


图 4 辣椒 CaCBF1A 蛋白亚细胞定位预测

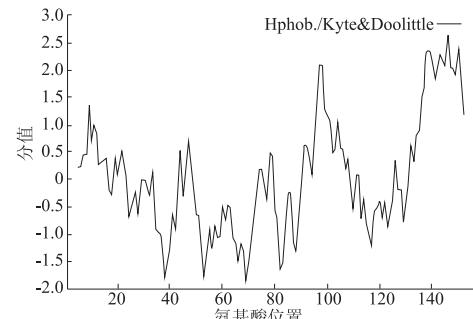


图 6 辣椒 CaCBF1A 蛋白亲疏水性预测

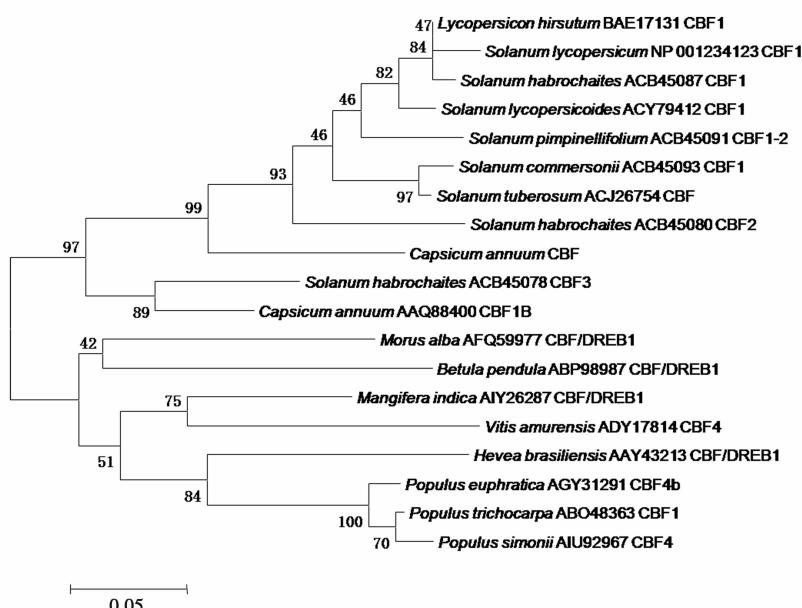


图 7 辣椒及其他物种 CBF 蛋白进化树分析

2.6 辣椒 *CaCBF1A* 基因在不同逆境胁迫下的表达分析

利用荧光定量 PCR 仪分别检测辣椒 *CaCBF1A* 在低温胁迫、高温胁迫和盐胁迫下的相对表达量。结果表明, *CaCBF1A* 基因在低温胁迫后表达量迅速升高后又下降, 在 12 h 时表达量迅速达到峰值, 约为对照的 135 倍, 24 h 后仅为对照的 28 倍(图 8a);

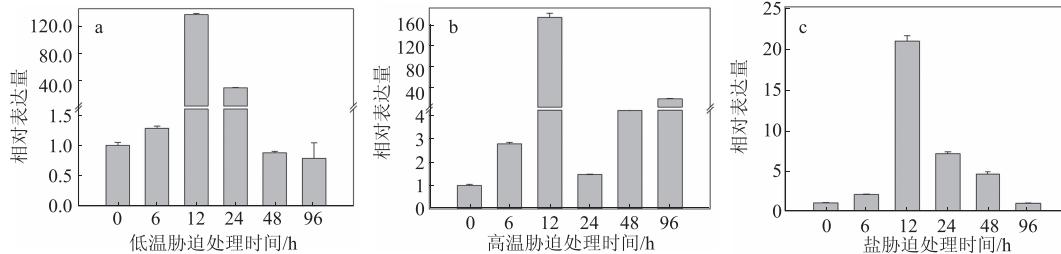


图 8 逆境胁迫下 *CaCBF1A* 基因在叶片中的表达情况

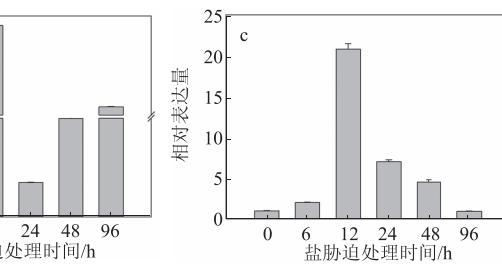
3 结论与讨论

AP2/EREBP 是一种受逆境特异诱导的转录因子, 可激活下游多个效应基因的表达^[4]。CBF 基因属于 AP2/EREBP 基因家族, 具有 AP2 DNA 结合域, 该结合域是植物基因特有的结合域^[7]。CRT/DRE 是高等植物抗逆相关基因中的一种顺式作用因子, CBF 基因中的 AP2 DNA 结合域能够识别 CRT/DRE 顺式作用元件, 并调控抗逆相关功能基因的表达, 从而提高植物对环境的耐受性。

Medina 等^[8]研究发现, 拟南芥 CBF 基因家族成员 *AtCBF1*、*AtCBF2* 和 *AtCBF3* 基因只对低温产生了响应, 对干旱和 ABA 没有反应。对辣椒 *CaCBF1A* 和 *CaCBF1B* 研究发现, 低温情况下, 这 2 个基因受诱导表达; 而如果长期持续低温, 这 2 个基因会一直表达, *CaCBF1A* 上调 10~15 倍^[9]。

秦红霞等^[10]研究了银新杨转录因子 *PaDREB2* 的表达模式, 发现其表达受低温、干旱和盐胁迫的诱导。通过转录组分析及突变试验研究低温胁迫下拟南芥基因表达情况, 结果表明, *CBF2* 能够诱导 44 个基因上调, 其中有 25 个基因至少上调 15 倍^[11]。Wang 等^[12]研究柠条锦鸡儿 *CkCBF* 基因, 发现其在低温、干旱、高盐及 ABA 等逆境条件下表达量上调; 在烟草中超量表达该基因, 与非转基因植株相比, 其提高了植株的耐盐性和渗透力。周洲等^[13]对毛白杨转录因子 *PtCBF5* 在逆境下的表达模式进行分析发现, 其在低温和干旱胁迫下表达量有显著变化, 而对高盐和 ABA 胁迫没有反应。将甜椒 (*Capsicum frutescens*) *CfCBF3* 基因转到烟草中, 结果表明, 在冷胁迫下, *CfCBF3* 急速上调; 而在盐胁迫及干旱胁迫

CaCBF1A 基因在高温胁迫 12 h 后表达量迅速升为对照的 172 倍, 在 24 h 时迅速恢复正常, 总体上表达量先逐渐升高达到峰值后下降, 随着处理时间的延长又呈逐渐上升的趋势(图 8b); *CaCBF1A* 基因在盐胁迫后表达量逐渐升高后又逐渐下降, 在盐胁迫 12 h 时表达量达到峰值, 约为对照的 20 倍(图 8c)。



下, 该基因诱导差异不显著^[14]。将南极发草 *DaCBF7* 基因转到水稻中, 逆境胁迫后分析表明, 该基因大大提升了转基因植株耐低温胁迫能力, 而对干旱及盐胁迫作用不大^[15]。

本试验通过同源克隆的方法从辣椒基因组中克隆到 *CaCBF1A* 基因(CA03g15650), 并利用生物信息学软件对其编码氨基酸序列进行了分析, 该基因具有一个完整的 ORF(471 bp), 编码 156 个氨基酸。*CaCBF1A* 编码的蛋白质包含保守的 AP2 DNA 结合域。对其亚细胞定位、跨膜结构进行分析, 预测其定位在叶绿体中, 存在跨膜结构。进一步研究了辣椒 *CaCBF1A* 基因对低温胁迫、高温胁迫和盐胁迫的响应。对胁迫环境下其相对表达量的分析表明, 随着胁迫处理时间的延长, 其表达量呈现先升高后下降的趋势。由于 CBF 转录因子在许多与抗逆相关功能基因的表达中发挥重要作用, 因此, 利用 CBF 基因增强植物抗逆性成为改良植物的重要途径。

参考文献:

- [1] Glazebrook J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Biology, 2001, 4 (4): 301-308.
- [2] Rushton P J, Somssich I E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens [J]. Plant Biology, 1998, 4: 311-315.
- [3] Chen W, Provart N J, Glazebrook J, et al. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses [J]. The Plant Cell, 2002, 3 (14): 559-574.
- [4] Yang T W, Zhang L J, Zhang T G, et al. Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher

- plants [J]. Plant Science, 2005, 169: 987-995.
- [5] Thomashow M F. Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the CBF cold response pathway [J]. Plant Physiol, 2010, 154(2): 571-577.
- [6] 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.
- [7] Sieber A N, Longin C F, Leiser W L, et al. Copy number variation of CBF-A14 at the Fr-A2 locus determines frost tolerance in winter durum wheat [J]. Theor Appl Genet, 2016, 129(5): 1-11.
- [8] 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 Physiol, 1999, 119(2): 463-469.
- [9] Kim S, An C S, Hong Y N, et al. Cold-inducible transcription factor, *CaCBF*, is associated with a homeodomain leucine zipper protein in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Mol Cells, 2004, 18(3): 300-308.
- [10] 秦红霞, 贾志平, 张海超, 等. 银新杨中与 DRE 元件结合的转录因子的克隆及鉴定分析 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 906-910.
- [11] Vogel J T, Zarka D G, Van Buskirk H A, et al. Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2005, 41(2): 195-211.
- [12] Wang X M, Dong J, Liu Y, et al. A novel dehydration-responsive element-binding protein from *Caragana korshinskyi* is involved in the response to multiple abiotic stresses and enhances stress tolerance in transgenic tobacco [J]. Plant Mol Biol Rep, 2010, 28(4): 664-675.
- [13] 周洲, 李永丽. 毛白杨转录因子 *PtCBF5* 的表达模式分析 [J]. 林业科学, 2010, 46(4): 58-63.
- [14] Yang S, Tang X F, Ma N N, et al. Heterologous expression of the sweet pepper *CBF3* gene confers elevated tolerance to chilling stress in transgenic tobacco [J]. J Plant Physiol, 2011, 168(15): 1804-1812.
- [15] Byuna M Y, Leeb J, Cuia L H, et al. Constitutive expression of *DaCBF7*, an antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved cold tolerance in transgenic rice plants [J]. Plant Science, 2015, 236: 61-74.

(上接第 104 页)

- [4] 陈旭, 刘晓飞, 叶辉. 云南主要有害实蝇种类及区划 [J]. 生态学报, 2010, 30(3): 717-725.
- [5] 刘莉, 赵家升. 云南柯街地区桔小实蝇种群动态及主要影响因子分析 [J]. 河南农业科学, 2010(6): 87-91.
- [6] 太红坤, 李正跃, 罗红英, 等. 颜色和糖醋液对番石榴实蝇引诱效果 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(14): 6481-6482.
- [7] 陆永跃, 曾玲, 梁广文, 等. 对性引诱剂监测桔小实蝇雄成虫技术的改进 [J]. 昆虫知识, 2006, 43(1): 123-126.
- [8] 刘奎, 钟义海, 卢辉, 等. 几种诱剂对杧果园桔小实蝇的引诱作用测定 [J]. 中国南方果树, 2010, 39(4): 45-46.
- [9] 李安国, 袁辉, 黄超艳, 等. 柑桔小实蝇监测与防控技术研究 [J]. 现代农业科技, 2011(12): 186-187.
- [10] 王琳, 潘志萍. 简述引诱剂在实蝇防治中的作用 [J]. 环境昆虫学报, 2011, 33(1): 117-121.
- [11] 孙文, 伍苏然, 袁盛勇, 等. 糖酒醋液对甲基丁香酚引诱桔小实蝇成虫效果的影响 [J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(6): 809-813.
- [12] 金菊, 阮贊誉, 黄珍富, 等. 莲雾果实挥发物对桔小实蝇的引诱作用 [J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 71-77.
- [13] 梁帆, 梁广勤, 赵菊鹏, 等. 实蝇引诱物的研究概况 [J]. 生物灾害科学, 2014, 37(3): 204-210.
- [14] 袁盛勇, 孔琼, 薛春丽, 等. 几种果实香精诱集桔小实蝇成虫的效果 [J]. 中国南方果树, 2015, 44(1): 34-35.
- [15] 太红坤, 李正跃, 蒋小龙, 等. 甲基丁香酚与糖醋液对番石榴实蝇的引诱效果 [J]. 昆虫知识, 2010, 47(1): 105-109.
- [16] 邱飞, 冯光春, 黄庆文, 等. 5 种引诱剂诱集实蝇类害虫比较试验 [J]. 南方园艺, 2014, 25(2): 16-18.
- [17] 管云. 几种实蝇引诱剂的田间诱虫活性评价 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2010.
- [18] 庄剑隆, 赖洞森, 黄强, 等. 几种物质对桔小实蝇的引诱力测定 [J]. 华东昆虫学报, 2006, 15(2): 99-102.
- [19] Ma Y F, Xiao C. Push-pull effects of three plant secondary metabolites on oviposition of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* [J]. Journal of Insect Science, 2013, 13: 128.
- [20] Shelton A M, Badenes-perez F R. Concepts and applications of trap cropping in pest management [J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51: 285-308.