

核桃 *JrCBF* 基因的克隆与表达和单核苷酸多态性分析

徐 丽, 陈 新, 张力思, 魏海蓉, 刘庆忠
(山东省果树研究所/山东省果树生物技术重点实验室, 泰安 271000)

摘要: 根据 *CBF* 基因氨基酸保守序列设计简并引物, 运用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆核桃 *JrCBF* 基因 cDNA 全长序列。用实时荧光定量 PCR 分析 *JrCBF* 基因在低温胁迫下的表达模式, 并分析 *JrCBF* 基因的单核苷酸多态性。结果获得长度为 879 bp 的 *CBF* 基因 cDNA 全长序列, 编码 214 个氨基酸, 命名为 *JrCBF*; 低温能诱导 *JrCBF* 基因的表达, 4 ℃ 处理 2 h 后表达量开始增加, 8 h 后达到最大值; 自然越冬条件下, *JrCBF* 基因在花芽中表达量呈现先上升后下降的趋势, 在寒冬时期 (1 月份) 表达量最高; 单核苷酸多态性分析 *JrCBF* 基因序列中有 28 个 SNPs 位点和 7 个 Indels 标记, 存在 2 个突变热点区; 单倍型分析显示 15 份材料可分为 9 个单倍型, 单倍型多样性为 0.9238。本研究为通过基因工程手段培育抗寒核桃品种和分子标记辅助育种提供了帮助。

关键词: 核桃; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR; 单核苷酸多态性

Molecular Cloning, Expression, and Single Nucleotide Polymorphisms Analysis of Transcription Factor Gene *JrCBF* in *Juglans regia* L.

XU Li, CHEN Xin, ZHANG Li-si, WEI Hai-rong, LIU Qing-zhong
(Shandong Institute of Pomology/ Shandong Province Key Laboratory of Fruit Tree Biotechnology, Tai'an 271000)

Abstract: The fragment of *CBF* cDNA was cloned with two degenerate primers from *Juglans regia* L. . The complete cDNA sequence was obtained using rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods, designated as *JrCBF* and the sequence was submitted to GenBank. Sequence analysis showed that the nucleotide sequence of *JrCBF* gene was 879 bp, encoding a protein with 214 amino acids. The real-time PCR technology was used to analyze the expression levels of *JrCBF* gene when seedlings were treated with cold stress. The expression of *JrCBF* gene was increased after treated with low-temperature of 4 ℃ for 2 hours and reached to a peak after 8 hours. Under the condition of natural overwintering, The expression of *JrCBF* gene increased firstly, reached to a peak in severe winter (in January), and then decreased. Furthermore, single nucleotide polymorphism was analyzed among 15 varieties. In the *J. regia* populations, 28 SNPs and seven Insertions/Deletions (indels) were detected and two hot mutation regions were found. Haplotype analysis showed that 15 varieties were divided into nine haplotypes, and the haplotype diversity was 0.9238. The study could provide help for cultivating cold resistance variety and molecular marker assistant breeding.

Key words: *Juglans regia* L. ; gene clone; real-time PCR; single nucleotide polymorphisms

收稿日期: 2013-07-02 修回日期: 2013-08-29 网络出版日期: 2014-01-24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jjpr.2014.02.014.html>

基金项目: 科技部科技基础工作资助项目 (2013-048); 农业部作物种质资源保护项目 (2014NWB009); 山东省农业良种工程项目 (鲁科农字 [2011]086); 中俄国际科技合作专项 (2012DFR30700)

第一作者主要从事种质资源研究。E-mail: xuli245@163.com

通信作者: 刘庆忠, 研究方向为果树生物技术与资源育种。E-mail: qzliu001@126.com

陈新, 研究方向为果树种质资源与分子生物学。E-mail: 63249324@qq.com

核桃属于核桃科 (Juglandaceae) 核桃属 (*Juglans*) 中的一个种, 多年生木本植物, 是我国重要传统经济树种之一。我国核桃栽培面积及产量均居世界首位, 但我国北方地区普遍存在春寒和晚霜对核桃花期的危害, 以致减产、绝收, 急需抗寒品种更替现有品种。果树等植物在长期进化过程中产生了各种各样的抗寒机制, 其中 CBF/DREB (C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding protein) 是一类与逆境胁迫有关的 AP2/EREBP 类转录因子, 能够识别并结合于 CRT/DRE 顺式作用元件, 调控许多功能基因的表达^[1]。1997 年 E. J. Stockinger 等^[2] 首次在拟南芥中分离到了 CBF1, 此后, CBF/DREB 类基因在油菜、水稻、大豆、樱桃、葡萄和番茄等植物中都得到了分离^[3-8]。K. R. Jaglo 等^[3] 研究表明 CBF/DREB 转录因子家族中的 CBF/DREB1 小家族是受低温诱导的, 由 CBF1/DREB1B、CBF2/DREB1C、CBF3/DREB1A 和 CBF4/DREB1D 等组成。P. K. Agarwal 等^[1] 研究表明 CBF/DREB 转录因子能被逆境胁迫诱导产生, 从而激活一系列依赖 CRT/DRE 顺式作用元件的抗逆功能基因的表达, 从而增强植物对干旱、低温及高盐等逆境的抗性。Q. Liu 等^[9] 低温处理拟南芥, *AtDREB1A*、*AtDREB1B* 和 *AtDREB1C* 基因在 15 min 内表达, 2 h 内达到最大表达量, 随后开始下降, 但在 24 h 内基因表达仍然高于对照。J. G. Dubouzet 等^[4] 低温处理水稻, 40 min 检测到 *OsDREB1A* 和 *OsDREB2A* 基因的表达量。CBF/DREB 类转录因子在植物抵抗逆境胁迫中具有重要作用^[8-10], 但在重要经济树种核桃中还没有关于这类基因的报道, 其功能也没有得到证实。本研究以核桃为材料, 利用同源克隆的方法获得核桃 *CBF* 基因, 并对其进行了序列分析和功能预测, 研究其在低温胁迫下的表达模式, 并分析了 *CBF* 基因的单核苷酸多态性 (SNP, single nucleotide polymorphism), 为通过基因工程手段培育抗寒品种和分子标记辅助育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试核桃品种 (系) 保存在国家核桃板栗资源圃, 包括 1: 阿克苏核桃 (*J. regia* L.); 2: 奇异核桃 (*J. hindsii* Rehd × *J. regia* L.); 3: 四川野核桃 (*J. cathayensis* Dode.); 4: 西藏 3 号 (*J. regia* L.); 5: 狮子头 (*J. hopeiensis* Hu.); 6: 鸡心 (*J. hopeiensis* Hu.); 7: 雅安野核桃 (*J. cathayensis* Dode.); 8: 丰辉 (*J. regia* L.); 9: 香玲 (*J. regia* L.); 10: 尤炳 (*J. regia*

L.); 11: 海兰 (*J. nigra* L.); 12: 泰山野核桃 (*J. cathayensis* Dode.); 13: 小果黑核桃 (*J. microcarpa* Engelm.); 14: 魁核桃 (*J. major* Heller); 15: 黑杂 1 号 (*J. nigra* × *J. regia*)。以香玲为材料分别在 2012 年 11 月 15 日、12 月 25 日和 2013 年 1 月 26 日、3 月 6 日等 4 个不同时期取花芽, 用于测定不同冷适应时期 *CBF* 基因的表达。无性系组培苗进行 4 ℃ 低温处理 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h, 分别采集叶片, 研究 *CBF* 基因响应低温的表达模式。所有供试材料采集后置于液氮, 保存在 -80 ℃ 冰箱。

T₄ DNA 连接酶、pMD18-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品; 大肠杆菌 DH5a、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 TIANGEN 产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 采集的所有供试核桃嫩叶按照快捷型植物基因组 DNA 提取试剂说明书 (TIANGEN) 描述的方法提取基因组 DNA。

1.2.2 总 RNA 的反转录和核桃 *CBF* 基因的克隆 采用北京天根 RNA plant plus Reagent 提取总 RNA, 用 DNaseI (TaKaRa) 消化去除 RNA 中的 DNA。反转录参照 Fermentas 公司说明书进行, 以 Oligo (dT)¹⁸ 为引物合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 发表的 *CBF* 氨基酸高度保守区域设计简并引物 CBF-JB1 和 CBF-JB2 (表 1), 以反转录 cDNA 为模板进行中间片段序列扩增。扩增产物回收、连接、转化、菌落 PCR 鉴定后由上海生工生物工程有限公司测序。根据正确的测序结果设计 2 个 5' RACE 特异引物 5GSP1 和 5GSP2 (表 1), 分别与通用引物 UPM 组成 2 对巢式引物进行 5' 端的克隆。设计 2 个 3' RACE 特异引物 3GSP1 和 3GSP2 (表 1) 进行 3' 端的克隆, 参照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书 (CLONTECH) 进行。将扩增出的 DNA 片段进行回收, 连接到 pMD18-T 载体, 克隆后进行测序。利用 DNA-MAN 软件将 5' 端序列、中间片段序列、3' 端序列进行拼接, 获得 *CBF* 基因全长 cDNA 序列。根据 RACE 拼接结果在 5' 端起始密码子上游和 3' 端终止密码子的下游设计特异引物 F1 和 R1 (表 1) 进行扩增, 然后将扩增的 DNA 片段连接 pMD18-T 载体, 进行序列测定, 比较测序结果和拼接结果, 用 GenBank 进行 BLAST 分析。用 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/ProtParam.html>) 预测编码蛋白的氨基酸序列组成、分子量、等电点等理化特性; 通过 ProtScale 软件 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 进行疏水性/亲水性分析。

表 1 扩增基因的引物序列

Table 1 Primers for gene amplification

引物名称	引物序列
Primer name	Sequence
CBF-JB1	5'-AAGAAGCCNGCNGGGCGGAAGAAGTT-3'
CBF-JB2	5'-CCAAGCNGAGTCNGCGAAGTT-3'
5GSP1	5'-GTTAAGCAAGCAGACCGACCACGC-3'
5GSP2	5'-TCGCTATTGCTGCGACATCGTGAGC-3'
3GSP1	5'-CCGGGCGGAAGAAGTTCAAGGAAAC-3'
3GSP2	5'-GGGTGTCAGGAGAAGGAAGTCCGGC-3'
UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCACT- GGTATCAACGCAGACT-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT-3'
F1	5'-CACTATCTACTTCTATTACACAAGC-3'
R1	5'-ATTATGGTACTATAAAACAGAAAC-3'
18S-F	5'-GGTCAATCTTCTCGTTCCCTT-3'
18S-R	5'-TCGCATTTTCGTACGTTCTT-3'
qF	5'-CTCACGATGTCGCAGCAATAG-3'
qR	5'-TGCAGCAGTCTCTGAATGTC-3'

N = A/T/G/C

1.2.3 qRT-PCR 分析 CBF 基因低温胁迫表达模式 根据克隆的 cDNA 序列设计 1 对特异引物 qF 和 qR(表 1),检测片段的长度为 122 bp。同时以核桃 18S 基因作为内参基因,引物序列为 18S-F 和 18S-R(表 1),扩增片段大小为 198 bp,用荧光定量 PCR 分析 *JrCBF* 基因的表达情况。反应在 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪上进行,方法参照 ABI Stepone plus 试剂指南和荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa)说明书,每个样品重复 3 次。最后用该基因的表达量和内参 18S 基因的表达的比值,即相对表达量来分析其表达模式。

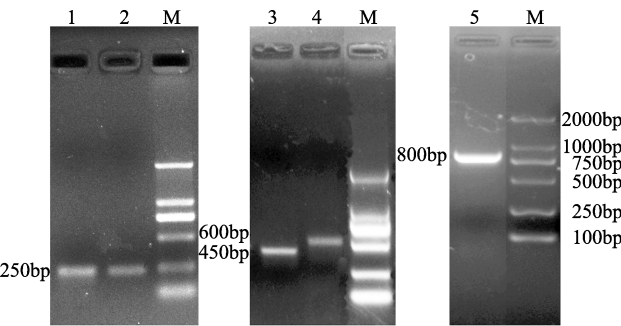
1.2.4 *JrCBF* 基因的单核苷酸多态性(SNP)检测 根据克隆的 *JrCBF* 基因的核苷酸序列设计特异引物 F1 和 R1(表 1),以 15 个核桃品种(系)基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5a 感受态细胞后挑取阳性克隆进行序列测定。每个品种选取 5 个阳性克隆进行测序。用 DNASTar SeqMan 软件对来自同一材料不同克隆的测序结果进行组装,得到一致序列。利用 DNASTar Megalign 软件分别对来自不同材料的序列进行多序列联配,用 DNASP5 分析目标序列的单核苷酸多态性及单倍型。

2 结果与分析

2.1 核桃 *JrCBF* 基因的克隆与序列分析

以反转录 cDNA 为模板,利用简并引物 CBF-

JB1 和 CBF-JB2 进行 PCR 扩增,获得 250 bp 大小的 *CBF* 基因中间片段(图 1)。用 5'RACE 和 3'RACE 特异引物进行 5'和 3'端序列扩增,获得约 450 bp 的 5'端和 600 bp 的 3'端片段(图 1),测序结果表明 5'端片段为 484 bp,3'端为 552 bp。将 3'端、5'端序列与中间片段序列进行拼接,得到了一条长度为 879 bp 的 cDNA 序列。用引物 F1 和 R1 进行扩增,得到一条约 800 bp 的特异条带(图 1),与预期结果一致,回收目的条带,插入 pMD18-T 克隆载体,转化大肠杆菌 DH5α,获得阳性重组质粒。测序结果表明该基因编码区序列与拼接结果序列完全一致。用 DNAMAN 软件分析表明,该基因具有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG,包含 1 个 645 bp 的完整开放阅读框序列,编码 214 个氨基酸,以及 169 bp 的 5'非编码区和 65 bp 的 3'非编码区,Genebank 注册号为 JX875914.1。利用 ProtParam 软件预测 *JrCBF* 基因编码蛋白质的分子量为 23.96 kD;理论等电点(PI)为 6.20;带负电荷的氨基酸残基数(Asp + Glu)为 32,带正电荷的氨基酸残基数(Arg + Lys)为 31;蛋白质不稳定系数估算为 56.34,为不稳定蛋白质,理论推导半衰期大约为 30 h。亲水性平均数为 -0.563,预测该蛋白均为亲水性蛋白。通过 ProtScale 软件对蛋白质整体分析显示,亲水性氨基酸均匀分布在多肽链中,没有明显的疏水性区域,推测 *JrCBF* 编码蛋白是一个亲水性蛋白,与 ProtParam 软件预测结果一致。



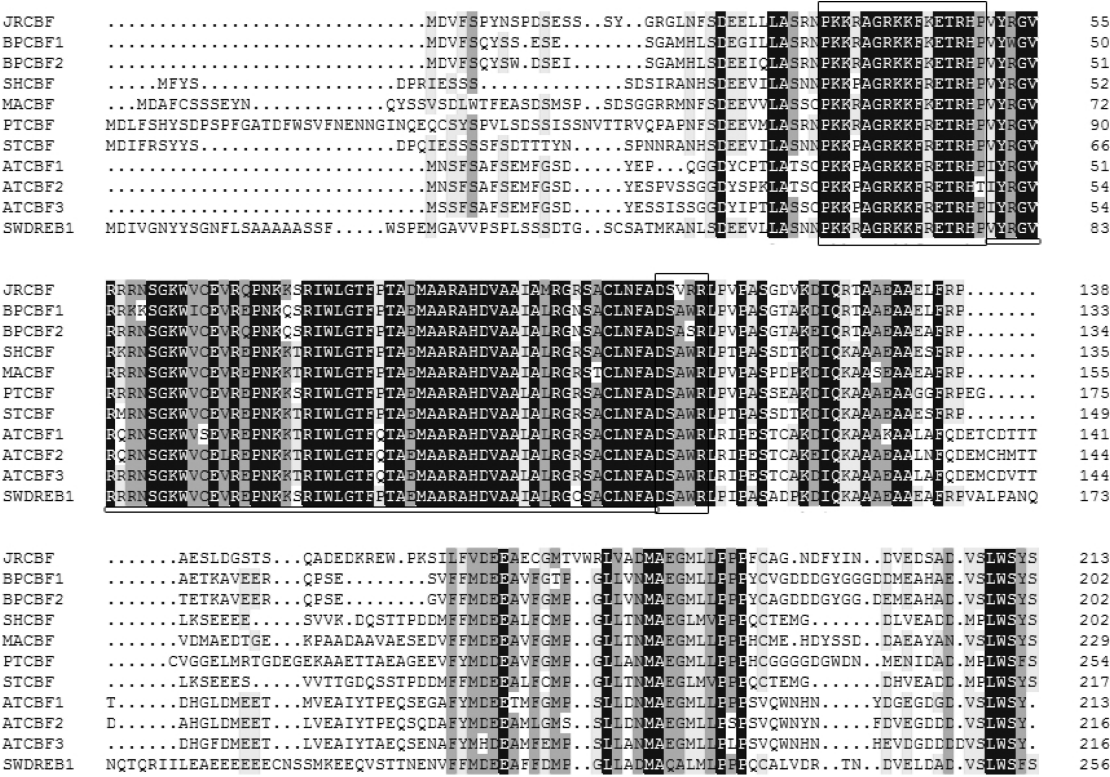
1~2:*JrCBF* 基因中间片段 PCR 产物;3:RACE 巢式 PCR 扩增 3'端产物;4:RACE 巢式 PCR 扩增 5'端产物;
5:*JrCBF* 基因全长 PCR 产物;M:DNA 标准
分子质量 DL2000
1-2:Conserved fragment of *JrCBF*,3:The nested PCR product of 3'RACE,4:The nested PCR product of 5'RACE,
5:The PCR product of full length of *JrCBF*,M:DL2000 Marker

图 1 核桃 *JrCBF* 基因扩增电泳图
Fig.1 Agrose gel electrophoresis analysis of *JrCBF* gene fragments in walnut

2.2 *JrCBF* 编码氨基酸的同源性分析与系统进化分析

利用 BLAST 的 blastx 程序进行序列分析,发现 *JrCBF* 基因有保守结构域 AP2,利用 DNAMAN 软件分析序列发现存在特征序列区域 PKRRA-GRKKFRETR 和 DSAWR(图 2),说明 *JrCBF* 基因可能是 CBF/DREB 家族成员。将推导的氨基酸序列

与其他植物 *CBF* 基因编码的氨基酸序列进行比较,结果表明 *JrCBF* 与桦木属植物 *CBF* 基因氨基酸序列具有较高的相似性,相似性为 70%,与桑树相似性为 68%,与毛果杨相似性为 66%(图 2),这与核桃和桦木属植物在分类学上同属于壳斗科是一致的。



JRCBF:核桃 (AFV93473. 1);BPCBF1:白桦 (ADZ23479. 1);BPCBF2:白桦 (ADZ23480. 1);SHCBF:番茄 (ACB45086. 1);MACBF:湖桑 (AFQ59977. 1);PTCBF:毛果杨 (XP_002318846. 1);STCBF:马铃薯 (ACJ26757. 1);ATCBF1:拟南芥 (AAV80413. 1.);ATCBF2:拟南芥 (AF062924);ATCBF3:拟南芥 (AF062925);SWDERB1:甘薯 (ABR23056. 1)。下划线部分表示 AP2/ERF 结构域,

方框表示 *CBF* 基因氨基酸特征序列区域 (PKRRA-GRKKFRETR 和 DSAWR)。

括号内的表示各物种 *CBF* 基因氨基酸的 Genebank 注册号,下同

JRCBF:*Juglans regia* L. (AFV93473. 1),BPCBF1:*Betula platyphylla* (ADZ23479. 1),BPCBF2:*Betula platyphylla* (ADZ23480. 1),SHCBF:*Solanum habrochaites* (ACB45086. 1),MACBF:*Morus alba* var. *multicaulis* (AFQ59977. 1),PTCBF:*Populus trichocarpa* (XP_002318846. 1),STCBF:*Solanum tuberosum* (ACJ26757. 1),ATCBF1:*Arabidopsis thaliana* (AAV80413. 1.),ATCBF2:*Arabidopsis thaliana* (AF062924),ATCBF3:*Arabidopsis thaliana* (AF062925),SWDERB1:*Ipomoea batatas* (ABR23056. 1)。AP2/ERF

domain is marked with a line and the signature sequences (PKRRA-GRKKFRETR and DSAWR) of *CBF* gene are boxed.

The Genebank registration of amino acid of *JrCBF* among species are bracketed,the same as below

图 2 核桃 *JrCBF* 基因氨基酸序列与其他植物氨基酸序列同源性比对

Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequence of *JrCBF* and other plants *CBF* transcription factors

为进一步分析核桃 *JrCBF* 与 AP2/ERF 家族转录因子间的进化关系,选取部分 AP2/ERF 家族转录因子构建系统进化树,结果显示 *JrCBF* 属于 DREB 亚族中的 A1 组,与拟南芥 DREB1 进化关系最近(图 3)。

2.3 *JrCBF* 基因低温胁迫下的表达分析

利用 qRT-PCR 的方法检测核桃叶片 *JrCBF* 在 4℃低温胁迫下的表达模式,结果表明:低温处理后 *JrCBF* 表达量在处理 8 h 后达到最高,然后开始降低,在 24 h 后表达量降至对照表达量的 24 倍(图

4),说明该基因可能在响应低温胁迫中起作用。同时对自然越冬条件下4个时间点花芽中*JrCBF*的表达模式进行了初步的研究,结果表明在自然条件下进入冷适应期后花芽*JrCBF*基因表达呈现先上升后下降的趋势,寒冬时期(1月份)表达量达到最大,是对照时期的35倍(图5),脱除冷适应时期表达量下降,进一步表明*JrCBF*基因在响应低温胁迫中起作用。

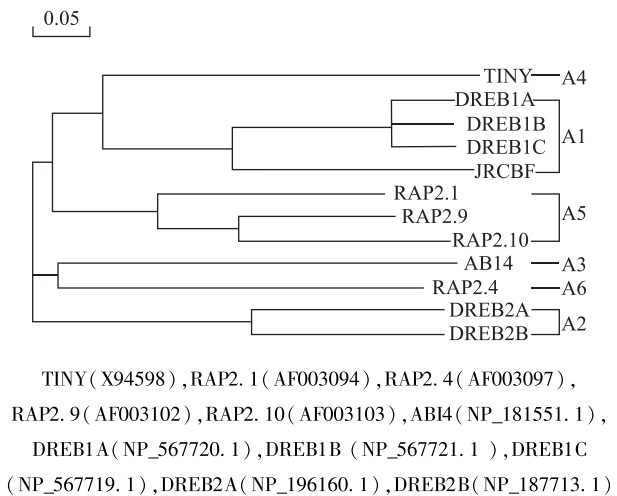


图3 *JrCBF* 与 AP2/ERF 家族转录因子间的进化关系
Fig. 3 The phylogenetic relationship between *JrCBF* and AP2/ERF transcription factors

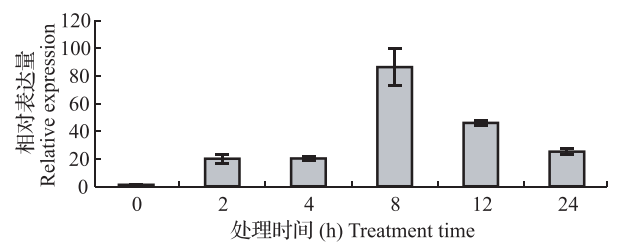


图4 核桃叶片 *JrCBF* 基因在低温胁迫下不同处理时间的表达分析
Fig. 4 Real-time PCR analysis of *JrCBF* gene under low-temperature stress for times

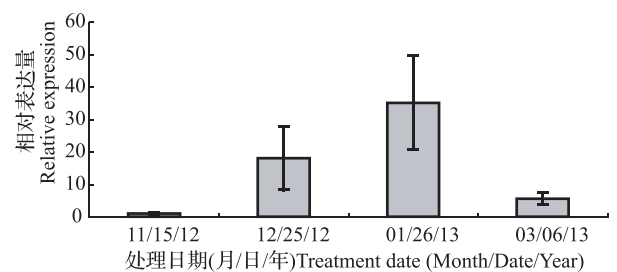


图5 核桃花芽 *JrCBF* 基因在冷适应过程中的表达分析
Fig. 5 Real-time PCR analysis of expression of *JrCBF* gene in flower bud of walnut

2.4 *JrCBF* 基因的单核苷酸多态性 (SNPs) 分析

利用 SNP 分子标记,可以进行进化、资源分类和分子标记辅助育种研究。在分析 *JrCBF* 基因序列的基础上,以 15 株核桃为试材,对包含 162 bp 的 5'UTR、642 bp 编码区和 31 bp 的 3'UTR 等共 835 bp 的核苷酸序列进行了单核苷酸多态性分析。长度为 835 bp 的序列中共有 28 个 SNP 位点和 7 个 Indel 标记(insertions/deletions),发生频率分别为 28/835 bp 和 7/835 bp,其中 5'UTR 和编码区的 SNP 位点分别为 9 个和 19 个,3'UTR 没有 SNP 位点。5'UTR 有 6 个 indel,编码区有 1 个 indel,且 indel 只出现在泰山野核桃、小果黑核桃、海兰和魁核桃中。进一步分析发现 *JrCBF* 基因序列中有 2 个突变的热点区:一个位于 80 ~ 162,共 8 个 SNPs,占全部 SNP 的 2/7;第 2 个突变热点区在 468 ~ 657 位点之间,共发现 15 个 SNPs,占全部 SNP 的 15/28,这 2 个热点区分别位于 5'UTR 和编码区。

在 SNP 检测的基础上,对 *JrCBF* 基因区域的 28 个 SNPs 进行变异类型统计,有 11 个属于转换(transition),包括 7 个 A → G 和 4 个 T → C。共检测到 16 个颠换类型(transversion),包括 2 个 G → T、5 个 A → C、2 个 C → G 和 7 个 A → T,转换与颠换的比值为 0.69。为检测 *JrCBF* 基因编码区内 SNP 位点变异是否影响了其编码氨基酸序列的改变,在分析 SNP 位点多态性的基础上进行了氨基酸的多样性分析。对编码区内的 19 个 SNP 进行了同义突变和非同义突变,结果表明有 10 个属于同义突变,有 9 个属于非同义突变。在同义突变中,均位于密码子的第 3 个核苷酸上。在非同义突变中,有 3 个位于密码子的第 1 个核苷酸上,其密码子由原来的 AGG、GCG 和 AAG 分别转变为 TGG、ACG 和 GAG,氨基酸由原来的精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)和赖氨酸(Lys)转变为色氨酸(Trp)、苏氨酸(Thr)和谷氨酸(Glu);3 个位于密码子的第 2 个核苷酸上,其密码子由原来的 GAG、CAG 和 TTT 转变为 GCG、CCG 和 TGT,氨基酸由原来的谷氨酸(Glu)、谷酰胺(Gln)和苯丙氨酸(Phe)转变为丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Phe)和半胱氨酸(Cys);3 个位于密码子的第 3 个核苷酸上,密码子由原来的 TTG、GAA 和 GAA 转变为 TTC、GAT 和 GAC,氨基酸由原来的亮氨酸(Leu)、谷氨酸(Glu)和谷氨酸(Glu)转变为苯丙氨酸(Phe)、天冬氨酸(Asp)和天冬氨酸(Asp)。在核桃 *JrCBF* 基因编码区内部发生的非同义突变与同义突变的比率 0.9 (<1),表示 *JrCBF* 基因受负向选择的影响,属

于相对保守基因,进化速度中等。

利用 DNASTar 软件和 DNASP5 软件对来自不同材料的序列进行多序列联配、聚类分析和单倍型 (H, haplotype) 分析。结果表明, *JrCBF* 基因在不同材料之间差异较大, 可分为 9 个单倍型 (图 6), 单倍型的多样性为 0.9238。单倍型 H2 和 H3 各包含 3 份材料, 分别是狮子头、鸡心、雅安野核桃和丰辉、香玲、尤炳; 单倍型 H1 和 H4 各包含 2 份材料, 分别是阿克苏核桃、奇异核桃和海兰、泰山野核桃; 单倍型 H5、H6、H7、H8 和 H9 都只包含 1 份材料。15 个样本定义的 9 种单倍型在进化上分别聚为 2 组, 单倍型 H1、H2、H3、H7 和 H9 聚为一组, 单倍 H4、H5、H6 和 H8 聚为一组。泰山野核桃位于单倍型 H4 中, 该单倍型还包括黑核桃海兰, 两者距离较近, 说明两者之间可能存在相似的 *CBF* 序列变异。也说明核桃品种的起源和亲缘关系较为复杂, 也可能反映了地区之间核桃品种的广泛交流。

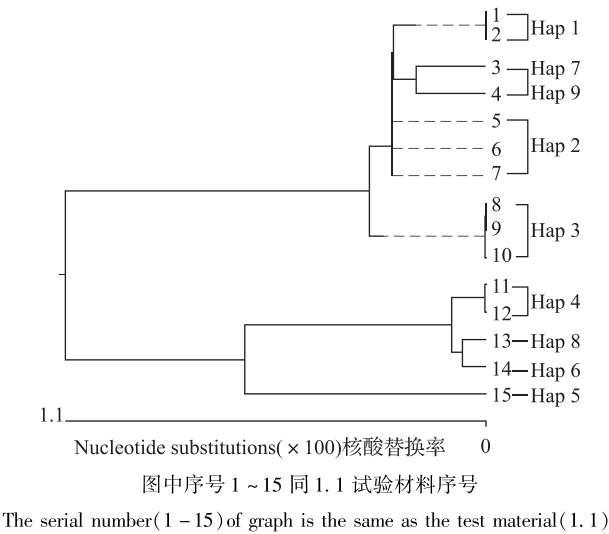


图 6 15 个核桃品种 *JrCBF* 基因的单倍型关系
Fig. 6 *JrCBF* haplotype relationship of 15 walnut accessions

3 讨论

本研究首次从核桃中分离得到了 *JrCBF* 基因全长 cDNA 序列。氨基酸序列同源性分析表明该基因与其他植物的 CBF/DREB 基因具有较高的同源性, 与壳斗科桦木属植物亲缘关系最近, 这与核桃和桦木属植物在分类学上同属于壳斗科是一致的。研究表明 A1 组转录因子是 DREB 亚族中比较重要的成员, 对提高植物抗逆性具有一定作用^[9,11]。本研究分析表明 *JrCBF* 属于 DREB 亚族中的 A1 组, A1 组转录因子上游是保守的核定位信号区 (NLS, nu-

clear localization signal): PKK/RPAGR_xKFxETRHP, 下游是 DSAWR 的保守序列, 这 2 个特征序列在 A1 组转录因子中保守存在, 是 CBF 蛋白的特征序列^[3,12]。同源性分析表明 *JrCBF* 具有这 2 个特征序列, 进一步表明 *JrCBF* 属于 A1 组, 是 *CBF* 基因家族成员。

受非生物胁迫诱导, 一些基因能够对胁迫做出快速应答来适应逆境带来的伤害。本研究中核桃 *JrCBF* 基因在 4 ℃ 低温胁迫下均有不同程度的上调表达, 并且在处理 8 h 后达到最大值。这与已报道的八棱海棠 *MrDREBA6* 基因^[13]、月季 *RhCBF* 基因^[14]、平榛 *ChCBF*^[15] 等植物 *CBF* 类基因在低温胁迫下的表达模式相似, 说明 *JrCBF* 基因受低温信号的调节。核桃花芽中 *JrCBF* 基因在自然低温条件下的表达模式表明, 寒冬时期 (1 月份) *JrCBF* 基因的表达量最高, 随着气温的回升表达量开始下降, 表明 *JrCBF* 受低温诱导表达, 可能在植物适应寒冷的过程中起着重要的作用。

单核苷酸多态性具有数量大、分布广、稳定性强、易于分型等优点, 被认为是能稳定遗传的第 3 代分子标记^[16-20]。如 D. Chagné 等^[22] 对苹果基因组的研究表明平均每 149 bp 就有 1 个 SNP, N. O. I. Cogan 等^[23] 在白花苜蓿 (*Lolium perenne* L.) 基因组中发现平均每 54 bp 就会有 1 个 SNP。已有研究结果表明, SNP 有助于解释不同群体或个体之间的表型差异^[24-25], 而且分析 SNP 的差异还可以了解物种间的亲缘关系和进化生物学信息。本研究表明 *JrCBF* 基因在核桃中存在着丰富的 SNP 多态性, SNP 频率为 28/835 bp, 平均每 30 bp 有 1 个 SNP, 且编码区 SNPs 位点多于非编码区, 这与李静等^[26] 对牛枝子 *LpDREB* 的 SNP 分析相似, 编码区 17 个 SNPs, 非编码区共 6 个 SNPs, 而与大豆^[27] 和玉米^[28] 等研究结果相反, 可能是由于选取的样本量较少或者是非编码区没有被全部扩增所引起的。

单倍型亲缘关系分析显示 15 个品种 (系) 主要分为 2 个群体。H1-3、H7 和 H9 为一个群体, 主要是核桃、麻核桃和野核桃, 其中奇异核桃的亲本之一是普通核桃。H4-6 和 H8 为另一个群体, 主要是黑核桃和泰山野核桃, 其中黑杂 1 号的亲本之一是黑核桃。可见单倍型结构呈现明显的二态性, 这种分布在拟南芥和其他基因中也是十分普遍的。核桃属包括黑核桃组、核桃楸组及核桃组等, 核桃组先与核桃楸组聚在一起, 最终与黑核桃组共同聚为核桃属。由此可见, 核桃组与核桃楸组的亲缘关系相对较近,

二者与黑核桃组的亲缘关系相对较远,这与其地理分布是一致的。其中奇异核桃和黑杂 1 号是黑核桃与核桃的杂交种,进一步分析发现黑杂 1 号中有 indel 存在,而奇异核桃中没有,可能是因此两者聚在不同的组中。泰山野核桃可能也是因为存在 indel,所以与黑核桃聚在一起。序列进化能够将泰山野核桃与黑核桃聚在一起,表明泰山野核桃和黑核桃具有相似的 *CBF* 序列变异,但是两者是否源于共同的祖先还有待进一步研究证明。

参考文献

- [1] Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25 (12): 1263-1274
- [2] 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
- [3] 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 Physiol*, 2001, 127 (3): 910-917
- [4] 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]. *Plant J*, 2003, 33 (4): 751-763
- [5] Li X P, Tian A G, Luo G Z, et al. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 1355-1362
- [6] Owens C L, Thomashow M F, Hancock J F, et al. *CBF1* Orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of *CBF1* in strawberry [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 2002, 127: 482-494
- [7] Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, et al. Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid [J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 1410-1421
- [8] Hsieh T H, Lee J T, Chang Y Y, et al. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 618-626
- [9] 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]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391-1406
- [10] 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 J*, 1998, 16 (4): 433-42
- [11] Shen Y G, Zhang W K, He S J, et al. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 923-930
- [12] Okumuro J K, Caster B, Villarroel R. The AP2 domain of APETA-LA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (13): 7076-7081
- [13] 付晓燕, 彭日荷, 章镇, 等. 八棱海棠中转录因子基因 *MrDREBA6* 的克隆及表达分析 [J]. *果树学报*, 2009, 26 (6): 761-768
- [14] 翟俊峰, 王法微, 王南, 等. 月季 *CBF* 转录因子基因的克隆及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2012, 39 (8): 1596-1602
- [15] 陈新, 王贵禧, 梁丽松, 等. 平榛冷适应相关基因 *CBF* 的克隆及时空表达特性分析 [J]. *林业科学*, 2012, 48 (1): 167-172
- [16] Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5 (2): 94-100
- [17] Wu S B, Wirthensohn M G, Hunt P, et al. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs [J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 118: 1-14
- [18] Bus V G M, Bassett H C M, Bowatte D, et al. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated mildew immune selection [J]. *Tree Genet Genomes*, 2010, 6: 477-487
- [19] Mammadov J A, Chen W, Ren R, et al. Development of highly polymorphic SNP markers from the complexity reduced portion of maize (*Zea mays* L.) genome for use in marker-assisted breeding [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 121 (3): 577-588
- [20] Trebbi D, Maccaferri M, de Heer P, et al. High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 123: 555-569
- [22] Chagné D, Gasic K, Crowhurst R N, et al. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of apple [J]. *Genomics*, 2008, 92: 353-358
- [23] Cogan N O I, Ponting R C, Vecchies A C, et al. Gene-associated single nucleotide polymorphism discovery in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Mol Genet Genomics*, 2006, 276 (2): 101-112
- [24] Aulchenko Y S, de Koning D J, Haley C. Genome wide rapid association using mixed model and regression: a fast and simple method for genome wide pedigree-based quantitative trait loci association analysis [J]. *Genet*, 2007, 177 (1): 577-585
- [25] Ingvarsson P K. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., *Salicaceae*) [J]. *Genet*, 2005, 169 (2): 945-953
- [26] 李静, 袁虎威, 李伟, 等. 牛枝子抗旱候选基因 *LpDREB* 的克隆与表达及单核苷酸多态性分析 [J]. *林业科学*, 2012, 48 (6): 40-46
- [27] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean [J]. *Genet*, 2003, 163 (3): 1123-1134
- [28] Ching A, Caldwell K S, Jung M, et al. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines [J]. *BMC Genet*, 2002, 3: 19