

棉花*CBF2*基因克隆和超表达*CBF2*棉花增强抗冷性

马刘峰^{1,2}, 陈芸^{1,2}, 任羽^{1,2}, 司马义·巴拉提², 李玲^{2,3,*}

¹喀什大学生命与地理科学学院, 新疆喀什844000

²新疆维吾尔自治区教育厅叶尔羌绿洲生态与生物资源研究重点实验室, 新疆喀什844000

³华南师范大学生命科学学院, 广州510631

摘要: CBF (C-repeat binding factor)是一类植物特有的转录因子,其主要功能是提高植物的抗冷性。本研究从陆地棉(*Gossypium hirsutum*)‘柯字棉312’中克隆到1个棉花*CBF*基因,命名为*GhCBF2*。蛋白序列分析结果表明,*GhCBF2*与其他植物的CBF蛋白类似,含有一个由216个氨基酸组成的AP2转录因子保守结构域。在棉花幼苗受到冷处理后,*GhCBF2*基因的表达水平提高。在冷胁迫处理后,过量表达*GhCBF2*基因棉花的存活率要显著高于野生型棉花,其细胞膜的相对渗透率显著低于野生型棉花,而可溶性糖含量显著提高。以上研究表明,*GhCBF2*基因可能在提高棉花抗冷性发挥作用。

关键词: 超表达; 棉花; 抗冷性; *CBF*基因

低温是限制植物生长、发育、产量及地理分布的主要环境因子之一,也是作物生长发育中经常遇到的一种自然灾害。植物在长期的进化过程中形成了一套复杂而高效的低温胁迫应答机制,以抵御和适应低温胁迫的危害(Janmohammadi等2015)。许多育种工作者都把提高作物的抗冷性作为重要的育种目标之一。近年来,分子生物学和基因工程技术在作物育种领域的研究和应用越来越广泛。已有报道CBF (C-repeat binding factor)蛋白序列含有C-重复序列,能特异结合下游基因DRE/CRT (Dehydration Responsive Element/C-repeat)顺式作用元件,并激活其他一系列依赖DRE/CRT顺式作用元件的抗逆功能基因的表达,增强植物对低温等逆境的抗性(Agarwal等2006)受到广泛关注。

研究表明,*CBF/DREB*属于*AP2/ERF* (*APETA-LA2/ethylene responsive factor*)基因家族,编码的蛋白序列中含有1个约60个氨基酸组成的AP2/ERF保守结合域(Sakuma等2002; Mizoi等2012)。自从拟南芥中的*CBF*基因首次被证实能够参与植物抗冷调控的功能以来(Stockinger等1997),在油菜、大麦和白菜等多种植物中也陆续发现*CBF*基因的存在(Gao等2002; Skinner等2005; Lee等2012)。近年来,随着植物遗传转化技术的不断进步,越来越多植物的*CBF*基因的抗冷功能得以揭示,过量表达*CBF*基因的番薯和小麦等植物,皆显著提高转基因植物的抗冷能力(Takumi等2008; Jin等2017)。

棉花是重要的经济作物,但在栽培过程中经常会出现春季“倒春寒”等极端天气,对春季播种和

幼苗生长带来严重的危害。延迟型低温冷害是严重制约新疆棉花产量的主要农业气象灾害之一,对于棉花的产量和品质都造成十分严重的危害(陈玥煜和郭建平2008)。近年来,已从陆地棉中陆续克隆并鉴定了*GhAGP31*、*GhWRKY15*等相关抗冷基因(Gong等2012; Yu等2012),对*CBF*基因的克隆和功能分析尚处于初步阶段(Huang等2007; Ma等2014)。

在前期的研究中,我们从棉花中克隆到了一个*CBF/DREB*基因,命名为*GhCBF2* (GenBank号: KP780185) (Ma等2014)。并在此基础上,将*CBF2*基因构建到过量表达载体35S::*GhCBF2*并转化到棉花中,分析过表达转基因棉花的抗冷性,以期利用该基因进行棉花抗冷性的品种改良提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 棉花无菌苗的培养及RNA提取

将陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)‘柯字棉312’种子用70%的乙醇处理1 min,然后用10%的H₂O₂处理1 h,无菌水漂洗4~5次后,在25°C的培养室环境下,置于MS培养基上萌发并培养5 d后,在16 h光照/8 h黑暗的光周期下培养,用植物总RNA提取试剂盒RNeasy Plant Total RNA Isolation Kit (Qiagen)分别提取棉花不同组织(0~9 d的纤维和9 d

收稿 2017-10-13 修定 2018-01-05

资助 新疆维吾尔自治区自然科学基金(201442137-12)。

* 通讯作者(liling@senu.edu.cn)。

幼苗的下胚轴、根、子叶以及20 d的叶片等组织的总RNA, 反转录后用于RT-PCR分析。数据以*GhUBI1*基因作为内参进行标准化定量。棉花总RNA提取和逆转录为cDNA的方法参见Ma等(2014)的实验方法。

1.2 基因克隆

以cDNA为模板, 用特异性引物(表1)扩增*Gh-CBF2*基因片段并回收, 并将该基因片段与pBlue-script II SK (+)载体连接, 转化大肠杆菌DH5 α 后经质粒PCR检测后, 将阳性克隆进行测序。

1.3 GhCBF2蛋白序列的进化树分析

将克隆到的棉花*CBF*基因利用DNASTAR (Ver. 5.01)软件完成ORF, 利用MEGA 5.0软件构建与其他植物*CBF*基因之间的系统进化树, 采用Neighbor-Joining (N-J)法的Complete deletion模式建树, Bootstrap值取1 000。

1.4 实时荧光定量PCR分析

将5 d苗龄的棉花无菌幼苗转至4°C冰箱中培养0~24 h, 提取其总RNA, 并反转录为cDNA, 用于基因表达分析实验。qRT-PCR扩增程序为: 94°C预变性10 min; 94°C变性1 min, 58°C复性30 s, 72°C延伸1 min, 共42个循环。内参基因为*GhUBI1* (GenBank号: EU604080), qRT-PCR实验数据的分析方法为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法, 每个处理设3个重复。所用的基因表达分析特异性引物见表1。

1.5 农杆菌介导法转化棉花植株

参考Li等(2005)的方法。将基因的开放阅读框(ORF)构建到过表达载体pMD上, 经PCR鉴定并再次用内切酶*Bam*HI和*Sac*I对构建载体进行酶切, 确定将片段正向连接到pMD载体上, 过量表达载体由花椰菜病毒(*Cauliflower mosaic virus*) 35S启动子驱动, 以电击法转入农杆菌LBA4404, 挑取经

PCR检测为阳性的菌落于含有卡那霉素(50 mg·L⁻¹)的液体LB培养基中, 28°C振荡培养过夜, 然后将菌液集于200 mL大离心管中, 4°C条件下3 555×g离心20 min集菌, 并用MS液体培养基重悬后作为转化菌液。将5 d左右的棉花无菌苗下胚轴用手术刀片切成1 cm长度的切段, 在含有LBA4404农杆菌的MS液体培养基中对棉花下胚轴进行农杆菌侵染和转化。棉花遗传转化过程中, 将菌液处理后的棉花无菌苗下胚轴段在愈伤组织诱导培养基CB_{2.1}上进行诱导, 然后分别经过CB₄培养基分化和CB₅培养基胚状体诱导, 最后在生根培养基CB₆上培养后生根成苗, 经炼苗后移栽(Li等2002; 黄俊锋2015)。

1.6 转基因棉花阳性苗的鉴定

当T₀代转基因棉花植株长至10片叶后, 提取叶片的基因组DNA, 用特异性引物(表1)检测转基因棉花是否为阳性, 对初步检测为阳性的转基因植株提取RNA, 并反转录为cDNA, 分析*GhCBF2*基因在各转基因株系中的基因表达量。

1.7 转基因棉花的抗冷性分析

将野生型和过量表达*GhCBF2*基因的棉花种子催芽后播种到营养土中(蛭石:壤土:草炭=1:1:0.5)生长至15和23 d后, 放于4°C冰箱中低温处理72 h, 然后分析表型。棉花存活率统计公式为: 存活率(%)=存活数/总数×100。每个处理设3次重复。

1.8 转基因棉花的生理生化分析

测定生长15 d的野生型和转基因棉花的叶片电导率(Chen等2013)和可溶性糖的含量(Sperdouli和Moustakas 2012)。

1.9 数据统计和分析

实验数据采用Excel软件进行统计分析。用*t*-检验法进行差异显著性分析。

表1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

目标基因	用途	引物名称及序列(5'→3')
<i>GhCBF2</i> (DQ409060)	基因克隆、阳性苗检测	P1: CTTGGATCCATGGATTTTTTAGTTCAAG P2: GGGGAGCTCTTAAATAGAATAACTCC
<i>GhCBF2</i>	基因表达RT-PCR引物	P1: GGAGACTTTCAGAACGGCTGAGCATT P2: CAATTGCCGGTGGCGATTTCTGTGAA
<i>GhUBI1</i>	内参引物	P1: CTGAATCTTCGCTTTCACGTTATC P2: GGGATGCAAATCTTCGTGAAAAC

2 实验结果

2.1 *GhCBF2*基因的克隆和序列的生物信息学分析

以陆地棉‘柯字棉312’的cDNA为模板,用特异性引物通过PCR扩增均得到长度约为700 bp的

DNA片段(图1-A)。将DNA片段分别与pSK克隆载体连接,转化大肠杆菌DH5 α 后经质粒PCR检测,测序结果表明,扩增得到DNA的ORF长度为678 bp(图2)。借助DNASTAR软件推导*GhCBF2*核酸序列

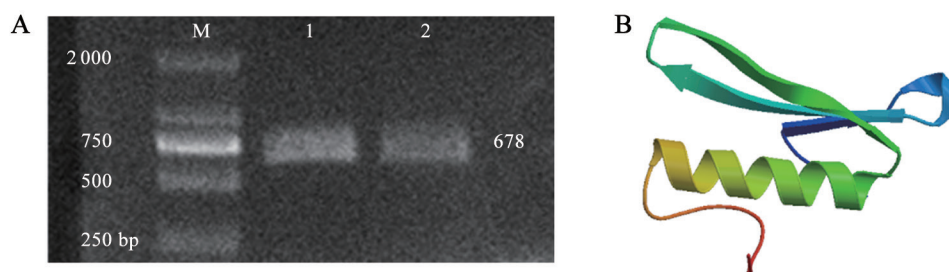


图1 *GhCBF2*基因的克隆和蛋白三维结构

Fig.1 Cloning of *GhCBF2* gene and 3-D structure of its protein

A: *GhCBF2*基因的克隆, M: DNA Marker, 1和2: 以棉花cDNA为模板的*GhCBF2*基因PCR扩增结果; B: *GhCBF2*蛋白的三维结构。

```

GAATATCCTTTCTTGAAATATACTCTTTTCAAGTCAAAGCTTTGTTTAA 51
CTGGAACTTAAACTGATTTACTGTTTGGGTTTTTTAAAATGGATTTTTTA 102
                                     M D F L 4
GTTCAAGATTATGATATGGTTGATTCTGGGTCGGTTCTGAAAGTGGAACT 153
V Q D Y D M V D S G S V S E S G T 21
GATCGTCCGGTGAATTTTCCGATGGCTATGTGATGTTAGCTTCGAGTTAT 204
D R P V N F S D G Y V M L A S S Y 38
CCAAAGAGGCGAGCTGGGAGGAAGAAGTTCGGGAGACTCGACACCCGGTG 255
P K R R A G R K K F R E T R H P V 55
TACCGTGGAGTTCGCCGGAGGAATCCCGGAAGTGGGTTTCTGAAAGTGAGG 306
Y R G V R R R N P G K W V S E V R 72
GAGCCTAATAAGAAGTCGAGGATTTGGCTTGAACTTTCCCGAAGCGGGAT 357
E P N K K S R I W L G T F P K A D 89
ATGGCGGCGCGTGCTCACGACGTGGCAGCTATAGCACTGAGAGGGAAGTCA 408
M A A R A H D V A A I A L R G K S 106
GCTTGTGTGAACTTCGCTGACTCAGCTTGAAGCTTCCGGTCCCGGCTTCT 459
A C L N F A D S A W K L P V P A S 123
TCCGACCAAAGGATATCCAAAAGACGGTGGCGGAGGTGGCGGAGACTTTC 510
S D P K D I Q K T V A E V A E T F 140
AGAACGGCTGAGCATTGAGCGGGAATTCTAGAAACGATGCAAAGAGAAGT 561
R T A E H S S G N S R N D A K R S 157
GAAAACACGGAGATGGAGAAAGGGTTTTACTTGGACGAAGAAGCGTTGTTT 612
E N T E M E K G F Y L D E E A L F 174
GGGACACAAAGATTTTGGGCAAAATATGGCTGCCGGTATGATGATGTCACCT 663
G T Q R F W A N M A A G M M M S P 191
CCTCGTCCGGTCATGACGGAGGATGGGAAGAACATGAAGTCGATGATTAT 714
P R S G H D G G W E E H E V D D Y 208
GTACCTTTATGGAGTTATCTATTTAAAAGTAAAATTTTTCAGACATTTTC 865
V P L W S Y S I * 216

```

图2 *GhCBF2*的核苷酸及氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and amino acid sequence of *GhCBF2*

划“—”线部分为*GhCBF2*蛋白的AP2保守结构域;划“---”线部分为*GhCBF2*蛋白的NLS(核定位序列)。

可编码216个氨基酸,含有由60个氨基酸组成的保守序列和由14个氨基酸组成的核定位序列NLS,在保守序列中含有CBF蛋白特有的DSAW序列(图2)。ExPasy在线软件分析结果表明GhCBF2蛋白序列含有1个 α 螺旋和3个 β 折叠结构(图1-B),蛋白质分子量为24.39 kDa,等电点为7.84。

为了研究GhCBF2基因在双子叶植物CBF基因中的进化关系,选取拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、油菜(*Brassica napus*)等20种双子叶植物中选择29个DREB/CBF蛋白,使用MEGA 5.0软件构建了棉

花GhCBF2和其他植物DREB/CBF的进化树。分析结果表明,GhCBF2基因与藜科植物海蓬子(*Salicornia brachiata*)的SbDREB2A基因(GU592205)之间的亲缘关系较近(图3)。

2.2 GhCBF2基因在棉花的组织表达和冷诱导下的表达

利用qRT-PCR方法对GhCBF2基因在0~9 d棉花组织中的表达模式进行分析,结果表明,GhCBF2基因在营养器官中的表达量相对较高,尤其在根和叶片组织中表达量最高,而在子叶和下胚轴中的表达量则相对较少。但是在棉花纤维各发育时期

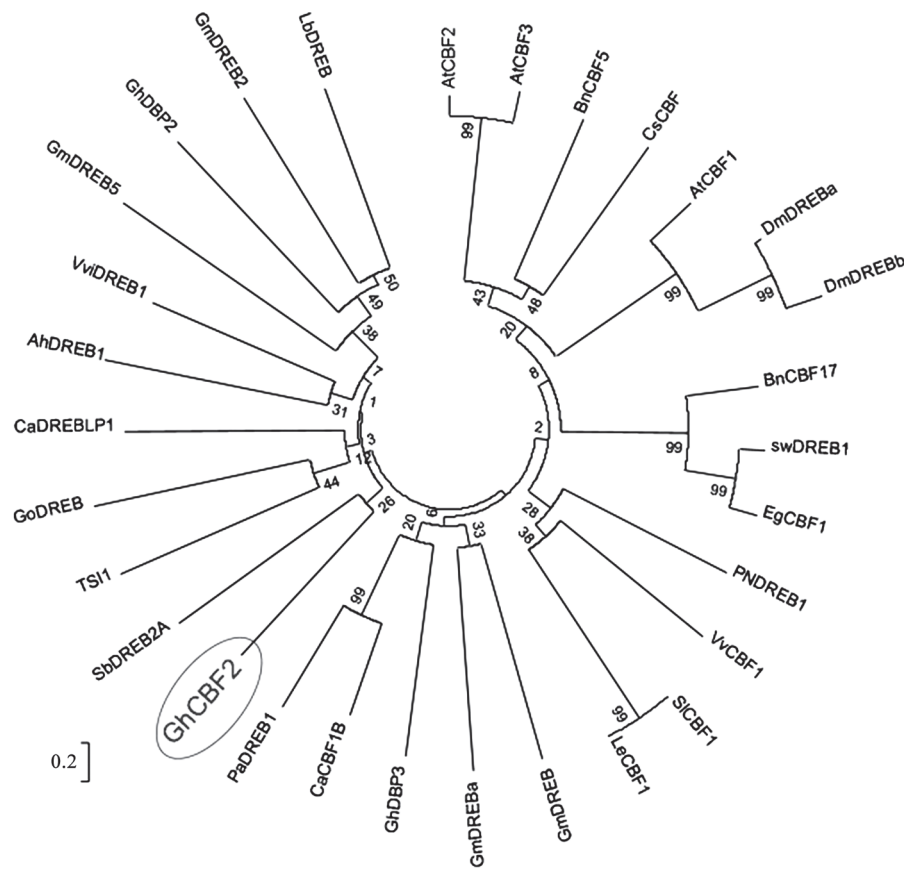


图3 GhCBF2蛋白和其他植物DREB/CBF蛋白的系统进化关系

Fig.3 Phylogenetic relationship of GhCBF2 protein and some dicotyledon CBF proteins

图中各植物的DREB/CBF在GenBank中的登记号如下,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtCBF1 (AT4G25490), AtCBF2 (AT4G25470), AtCBF3 (AT4G25480); 花生(*Arachis hypogaea*): PNDREB1 (FM955398); 山菠菜(*Atriplex hortensis*): AhDREB1 (AF274033); 油菜(*Brassica napus*): BnCBF5 (AF499031), BnCBF17 (AF499034); 茶树(*Camellia sinensis*): CsCBF (EU857638); 辣椒(*Capsicum annuum*): CaCBF1B (AY368483), CaDREBLP1 (AY496155); 菊花(*Chrysanthemum x morifolium*): DmDREBb (EF487535), DmDREBa (EF490996); 油棕(*Elaeis guineensis*): EgCBF1 (DQ497736); 陆地棉(*Gossypium hirsutum*): GhDBP2 (AY619718), GhDBP3 (DQ224382); 东方山羊豆(*Galega orientalis*): GoDREB (FJ223566); 大豆(*Glycine max*): GmDREB (AY244760), GmDREB2 (DQ054363), GmDREB5 (EF583447), GmDREBa (XM_003539835); 番薯(*Ipomoea batatas*): swDREB1 (EF433457); 二色补血草(*Limonium bicolor*): LbDREB (FJ872558); 番茄(*Lycopersicon esculentum*): LeCBF1 (AY497899), SICBF1 (AY034473); 烟草(*Nicotiana tabacum*): TSI1 (AF058827); 甜樱桃(*Prunus avium*): PaDREB1 (AB080966); 海蓬子(*Salicornia brachiata*): SbDREB2A (GU592205); 越橘(*Vaccinium vitis-idaea*): VviDREB1 (FJ429388); 葡萄(*Vitis vinifera*): VvCBF1 (AY390372)。

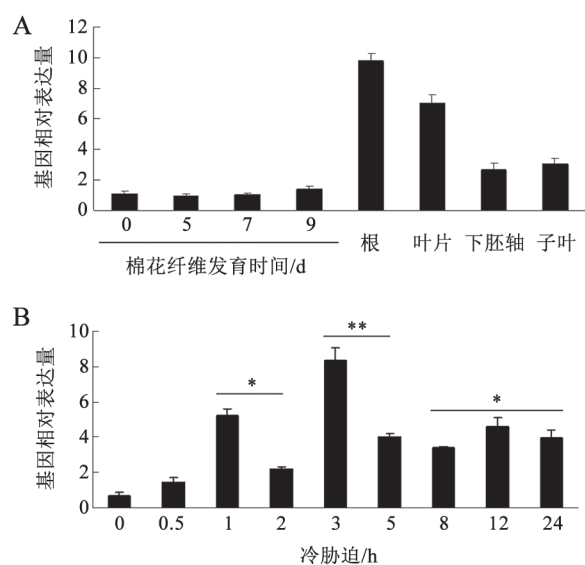


图4 *GhCBF2*基因在棉花各组织中(A)以及在冷胁迫下(B)的表达

Fig.4 The expression of *GhCBF2* gene in cotton tissues (A) and under cold stress (B)

图中*表示显著性差异($P < 0.05$), **表示极显著差异($P < 0.01$), 图7-E和图8同此。

中的表达量则很低(图4-A), 表明该基因可能主要参与棉花的营养器官发育过程。

经4°C处理1 h的棉花幼苗中*GhCBF2*基因的

表达量比对照显著增加, 低温处理3~5 h范围内, 与对照相比该基因的表达量差异极显著(图4-B), 表明*GhCBF2*基因积极响应棉花的冷胁迫应答, 在参与棉花抗冷过程中可能发挥调控作用。

2.3 农杆菌介导*GhCBF2*基因遗传转化棉花

以野生型棉花的下胚轴作为外植体(图5-A), 在含卡那霉素的CB_{2.1}培养基上进行愈伤组织诱导。在分化培养基CB₄培养基上培养后(图5-B), 在胚性愈伤组织培养基CB₅上进行胚状体诱导(图5-C), 然后在CB₆成苗培养基上完成器官分化过程(图5-D和E), 通过雾化培养法, 即在移栽苗床上安装了雾化装置, 每隔1 h, 雾化5 min, 使组培幼苗度过最初移栽的10 d, 从而提高移栽成活率。

2.4 转*GhCBF2*基因棉花的抗冷性

通过RT-PCR方法对过量表达*GhCBF2*基因的各棉花株系的表达水平进行检测, 在13个受检测的阳性转基因棉花株系中, 有7个株系的RNA表达水平较高, 即L1、L2、L3、L5、L7、L9和L15株系, 而L8、L12和L16株系的RNA表达水平较低, 其他株系表达量微弱(图6)。

选取表达量较高的L3和L15株系作为研究对象, 用于抗冷功能分析。将L3和L15株系的T₁代种子经催芽后播种在营养土中, 培养15和23 d后, 分

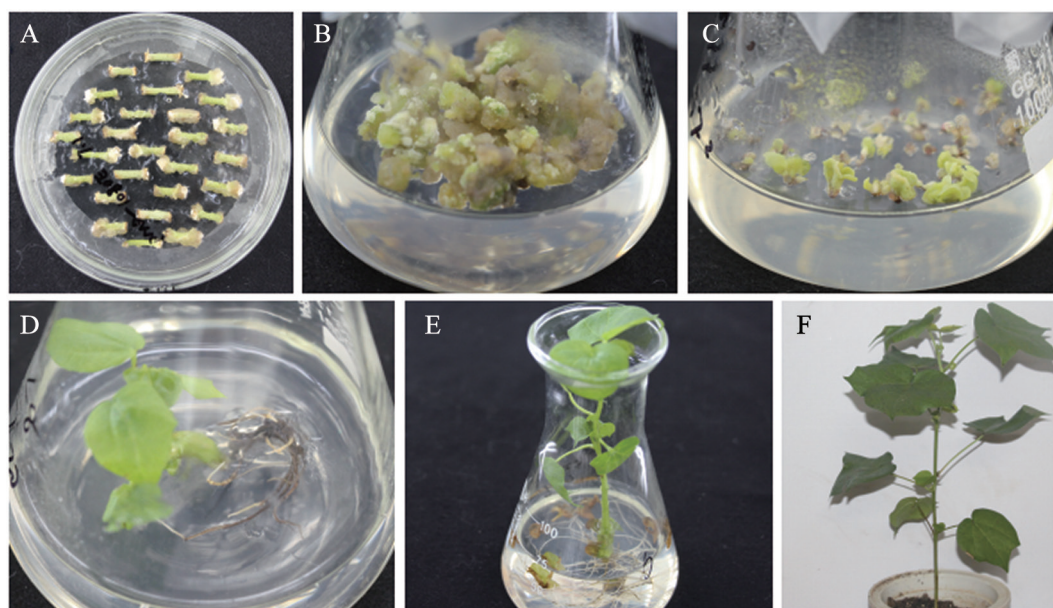


图5 过量表达*GhCBF2*基因棉花的遗传转化体系及移栽

Fig.5 Genetic transformation system of overexpressed *GhCBF2* in cotton and optimization of transplanting process

A~B: 棉花外植体和愈伤组织诱导; C: 胚性愈伤组织诱导; D-E: 诱导棉花植株的分化; F: T₀代转基因植株。

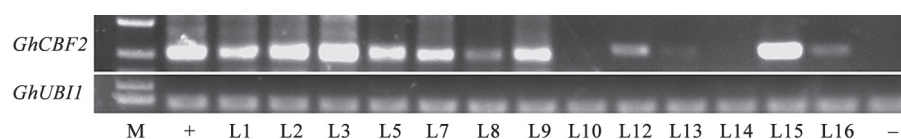


图6 在RNA水平上PCR检测T₀代转基因棉花中*GhCBF2*基因的表达

Fig.6 PCR analysis of *GhCBF2* expression in T₀ transgenic cottons at RNA level

“—”为阴性对照,即以ddH₂O为模板进行PCR检测;“+”为阳性对照,以含*GhCBF2*基因片段的过表达载体pMD作为模板进行PCR检测;L代表株系。

析转基因植株和野生型植株的抗冷能力。结果如图7-A~D所示,在正常生产条件下,转*GhCBF2*基因棉花幼苗和野生型棉花幼苗没有明显的差异,但经过72 h的4°C冷胁迫处理后,野生型棉花幼苗的叶片,无论是子叶还是真叶都出现明显的叶片失水萎蔫现象,而转*GhCBF2*基因棉花幼苗只有个别叶片有萎蔫现象。同时,对转基因和野生型棉花的存活率统计结果如图7-E,发现冷处理后转基因棉花的存活率要显著高于野生型棉花。表明转*GhCBF2*基因棉花幼苗的抗冷性要明显强于野生型棉花幼苗,即*GhCBF2*基因在提高转基因棉花幼苗时期的抗冷性方面起着重要的作用。

为进一步从生理学角度研究转基因棉花是否具有较强的抗冷性,选取表达量较高的L3和L15转基因株系作为研究对象,对转基因和野生型棉花叶片中的细胞膜渗透性和可溶性糖含量等生理指标进行了分析。结果表明,在未经过冷胁迫处理前,转基因和野生型棉花叶片的相对电导率和可溶性糖含量均无显著差异,经12 h冷处理后,转基因和野生型棉花叶片的相对电导率均有所上升,但转基因棉花的相对电导率要显著低于野生型棉花(图8-A)。同时,转基因和野生型棉花中可溶性糖的含量在受到冷处理后均显著上升,转基因棉花中可溶性糖含量显著高于野生型水平(图8-B)。以上结果说明,过量表达*GhCBF2*基因棉花植株对冷胁迫具有更强的耐受性。

3 讨论

AP2/ERF超级基因家族主要特征是所有蛋白含有1~2个约60个氨基酸组成的AP2/ERF保守DNA结合域,CBF/DREB是AP2/ERF超级基因家族中的一个重要的成员。本研究中从棉花中克隆1个长678 bp的*GhCBF2*基因,其ORF序列编码216个

氨基酸,含有1个典型的AP2/ERF保守结构域,在上游和下游分别有1个核定位信号区NLS和DSAW序列,具有典型的植物DREB/CBF转录因子的特征(Stockinger等1997),同样在保守区也含有1个 α 螺旋和3个 β 折叠结构。

研究表明,在受到冷胁迫处理后,毛竹(*Phyllostachys edulis*)、盐芥(*Thellungiella salsuginea*)等植物体内的PeTIFY(蛋白保守区含TIFY基序)、TsTIP(tonoplast intrinsic protein)和TsPIP(plasma membrane intrinsic proteins)等抗冷相关基因会显著增加其表达量(Huang等2016; Wang等2017),以此来适应外界环境的变化。本研究也证实,*GhCBF2*基因能积极响应棉花的冷胁迫应答(图4),表明该基因对低温环境比较敏感,在参与棉花抗冷过程中可能发挥一定的调控作用。

为了进一步研究*GhCBF2*基因的功能,通过农杆菌介导法,以野生型棉花的下胚轴作为外植体,在组织培养条件下,经愈伤组织诱导、胚状体诱导及器官分化诱导等过程,将*GhCBF2*基因在棉花中进行过量表达。基因表达量较高的L3和L15株系(图6)的表型与野生型棉花相比抗冷能力更强,且冷处理后转基因棉花幼苗的死亡率要显著低于野生型棉花幼苗(图7)。有研究表明,拟南芥主要通过直接调控其下游的COR(cold responsive)基因来调节植物的抗冷过程(Shi等2017);将拟南芥*AtCBF3*基因在木薯(*Manihot esculenta*)中过量表达,可激活木薯中CBF3下游*MeATDI21*、*MeCOR15b*、*MeCOR47*以及*MeERD7*等基因的表达,来提高转基因木薯的抗冷性(An等2016),表明COR作为CBF的下游基因,在调控植物应对冷胁迫过程中发挥着重要的作用。*GhCBF2*基因是否能通过调控其下游的COR基因表达来提高转基因棉花的抗冷性,还有待进一步研究。

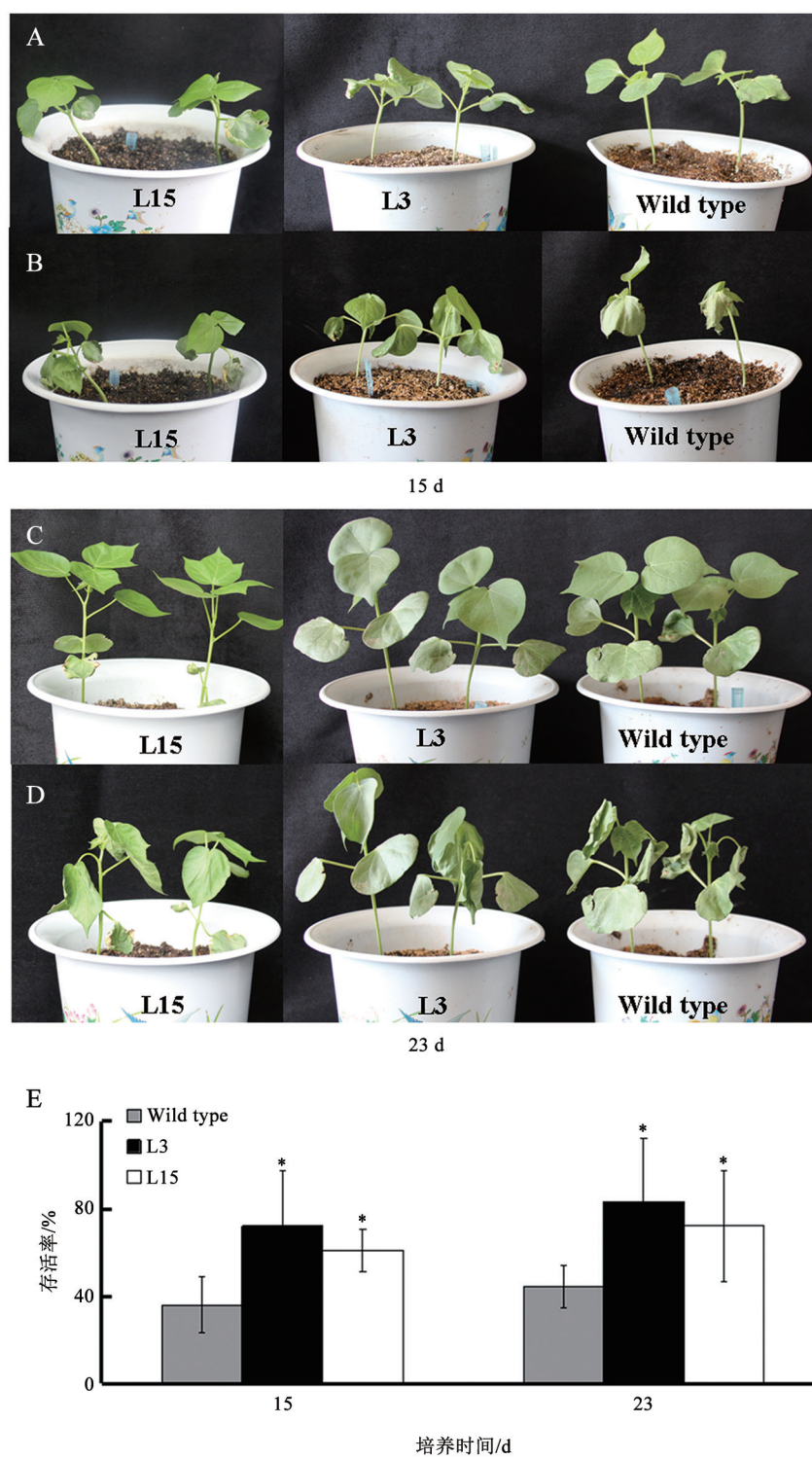


图7 转*GhCBF2*基因棉花抗冷性

Fig.7 Cold tolerance of transgenic cotton which overexpressed *GhCBF2* under low temperature treatment

A和C: 未冷处理的转*GhCBF2*基因和野生型棉花表型; B和D: 经4°C冷处理72 h的转*GhCBF2*基因和野生型棉花表型; Wild type为野生型, E: 棉花存活率统计。

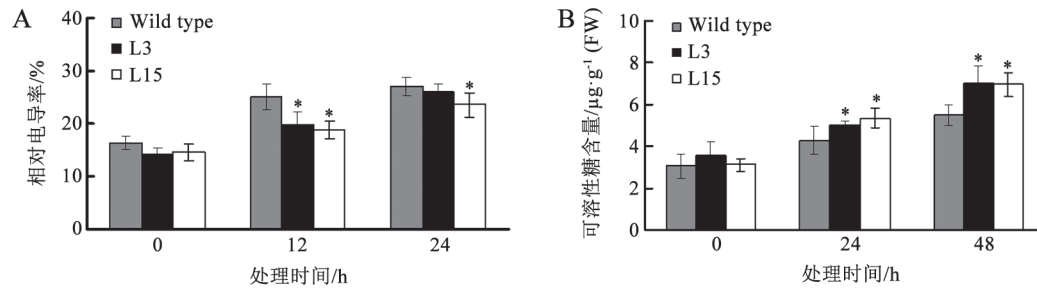


图8 转*GhCBF2*基因棉花叶片在低温处理下生理指标的变化

Fig.8 Determination of physiological index of *GhCBF2* transgenic and WT cotton seedlings

可溶性糖是与低温逆境密切相关的生理指标, 作为低温胁迫下植物呼吸作用的底物, 既承担着渗透保护物质的作用, 同时又提高了细胞液浓度, 降低细胞质的冰点, 从而增强植物的耐冷性, 是衡量植物抗冷性的重要生理指标(Ling等2014; 曲彦婷等2016; 位杰等2017)。同时, 低温也会造成植物细胞膜的流动性降低甚至膜物理结构的改变, 导致膜透性增加, 细胞质溶液外渗(Dowgert和Steponkus 1983)。本实验中, 经冷处理后的转基因棉花叶片细胞中电解质的泄漏程度显著低于野生型棉花, 可溶性糖的含量显著提高(图8), 说明*GhCBF2*基因可能通过降低低温对叶片细胞膜的伤害和提高转基因棉花中细胞液浓度的方式来增强其抗冷性。

参考文献(References)

- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, et al (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*, 25 (12): 1263–1274
- An D, Ma Q, Yan W, et al (2016). Divergent regulation of CBF regulon on cold tolerance and plant phenotype in cassava overexpressing *Arabidopsis CBF3* gene. *Front Plant Sci*, 7: 1866
- Chen L, Wang QQ, Zhou L, et al (2013). *Arabidopsis* CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA. *Mol Biol Rep*, 40 (8): 4759–4767
- Chen YY, Guo JP (2008). Stepwise regression prediction model for cotton cold damage in Xinjiang Uygur autonomous region. *Chin J Agrometeorol*, 9 (4): 485–490 (in Chinese with English abstract) [陈玥煜, 郭建平(2008). 新疆棉花低温冷害逐步回归预测模型. *中国农业气象*, 29 (4): 485–490]
- Dowgert MF, Steponkus PL (1983). Effect of cold acclimation on intracellular ice formation in isolated protoplasts. *Plant Physiol*, 72 (4): 978–988
- Gao MJ, Allard G, Byass L, et al (2002). Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 49 (5): 459–471
- Gong SY, Huang GQ, Sun X, et al (2012). GhAGP31, a cotton non-classical arabinogalactan protein, is involved in response to cold stress during early seedling development. *Plant Biol*, 14 (3): 447–457
- Huang B, Jin L, Liu J (2007). Molecular cloning and functional characterization of a *DREB1/CBF*-like gene (*GhDREB1L*) from cotton. *Sci China C Life Sci*, 50 (1): 7–14
- Huang JF (2015). Cotton (*Gossypium hirsutum*) MYB7 regulates the secondary cell wall biosynthesis (dissertation). Wuhan: Central China Normal University (in Chinese with English abstract) [黄俊锋(2015). 棉花MYB7调控次生细胞壁合成的研究(学位论文). 武汉: 华中师范大学]
- Huang Z, Jin SH, Guo HD, et al (2016). Genome-wide identification and characterization of *TIFY* family genes in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) and expression profiling analysis under dehydration and cold stresses. *PeerJ*, 4: e2620
- Janmohammadi M, Zolla L, Rinalducci S (2015). Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry*, 117: 76–89
- Jin R, Kim BH, Ji CY, et al (2017). Overexpressing *IbCBF3* increases low temperature and drought stress tolerance in transgenic sweetpotato. *Plant Physiol Biochem*, 118: 45–54
- Lee SC, Lim MH, Yu JG, et al (2012). Genome-wide characterization of the *CBF/DREB1* gene family in *Brassica rapa*. *Plant Physiol Biochem*, 61: 142–152
- Li L, Jiang JF, Li JG, et al (2014). Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Sci Rep*, 4: 5859
- Li XB, Cai L, Cheng NH, et al (2002). Molecular characterization of the cotton *GhTUB1* gene that is preferentially expressed in fiber. *Plant Physiol*, 130 (2): 666–674
- Li XB, Fan XP, Wang XL, et al (2005). The cotton *ACTIN1*

- gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell*, 17 (3): 859–875
- Ma LF, Zhang JM, Huang GQ, et al (2014). Molecular characterization of cotton C-repeat/dehydration-responsive element binding factor genes that are involved in response to cold stress. *Mol Biol Rep*, 41 (7): 4369–4379
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 86–96
- Qu YT, Xiong Y, Han H, et al (2016). Physiological response to low temperature stress and comprehensive evaluation of cold resistance on different *Phlox* varieties. *Plant Physiol J*, 52 (4): 487–496 (in Chinese with English abstract) [曲彦婷, 熊燕, 韩辉等(2016). 不同福禄考品种对低温胁迫的生理响应及抗寒性综合评价. *植物生理学报*, 52 (4): 487–496]
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold- inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 290 (3): 998–1009
- Shi Y, Huang J, Sun T, et al (2017). The precise regulation of different *COR* genes by individual CBF transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol*, 59 (2): 118–133
- Skinner JS, von Zitzewitz J, Szucs P, et al (2005). Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large *CBF* gene family in barley. *Plant Mol Biol*, 59 (4): 533–551
- Sperdoui I, Moustakas M (2012). Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *J Plant Physiol*, 169 (6): 577–585.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997). *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcription 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (3): 1035–1040
- Takumi S, Shimamura C, Kobayashi F (2008). Increased freezing tolerance through up-regulation of downstream genes via the wheat *CBF* gene in transgenic tobacco. *Plant Physiol Biochem*, 46 (2): 205–211
- Wang J, Zhang Q, Cui F, et al (2017). Genome-wide analysis of gene expression provides new insights into cold responses in *Thellungiella salsuginea*. *Front Plant Sci*, 8: 713
- Wei J, Jiang Y, Wang G, et al (2017). Research progress of cold resistance in Korla fragrant pear. *Plant Physiol J*, 53 (6): 949–959 (in Chinese with English abstract) [位杰, 蒋媛, 王刚等(2017). 库尔勒香梨抗寒性研究进展. *植物生理学报*, 52 (6): 949–959]
- Yu FF, Huaxia YF, Lu WJ, et al (2012). GhWRKY15, a member of the WRKY transcription factor family identified from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), is involved in disease resistance and plant development. *BMC Plant Biol*, 12: 144

Overexpression of cotton *CBF2* gene enhances cold tolerance in transgenic *Gossypium hirsutum*

MA Liu-Feng^{1,2}, CHEN Yun^{1,2}, REN Yu^{1,2}, Simayi BALATY², LI Ling^{2,3,*}

¹College of Life and Geography Science, Kashgar University, Kashgar, Xinjiang 844000, China

²The Key Laboratory of Ecology and Biological Resources in Yarkand Oasis at Colleges & Universities under the Department of Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashgar, Xinjiang 844000, China

³School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: CBF/DREB proteins are transcription factors in plants, which play important biological functions in the cold stress resistance. In this study, a *CBF/DREB* gene, named *GhCBF2*, was cloned from *Gossypium hirsutum*. The sequence analysis indicated that *GhCBF2* coded a protein consisted of 216 amino acids and contained a typical AP2 conservative domain, which was similar to CBF proteins in other plant species. The expression level of *GhCBF2* gene was increased after cotton seedlings were cold treated. The survival rate of overexpressing *GhCBF2* cotton was significantly higher than that of wild type cotton. Meanwhile, the soluble sugar content in the leaves of transgenic plants was higher than wild type cotton, while the cell electrolyte leakage was lower than wild type cotton. The above results showed that *GhCBF2* may enhance the transgenic plants tolerance to cold stress.

Key words: overexpression; cotton; cold resistance; *CBF* gene

Received 2017-10-13 Accepted 2018-01-05

This work was supported by the Nature Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (201442137-12).

*Corresponding author (liling@scnu.edu.cn).