

新疆野苹果*MsCBF1*基因的克隆及表达分析

张克闯^{1,2}, 李心悦³, 张一弓¹, 张道远^{1,*}, 王玉成¹

¹中国科学院新疆生态与地理研究所, 中国科学院干旱区生物地理与生物资源重点实验室, 乌鲁木齐830011

²中国科学院大学, 北京100049

³新疆师范大学生命科学院, 乌鲁木齐830054

摘要: 新疆野苹果是现代栽培苹果的祖先, 对非生物胁迫具有很强的适应性, 是非常珍贵的天然基因资源库。本研究以新疆野苹果RNA为模板, RT-PCR扩增出*CBF1*基因cDNA序列, 命名为*MsCBF1*。*MsCBF1*基因完整开放阅读框ORF长660 bp, 编码219位氨基酸, 具有CBFs类转录因子典型的AP2保守结构域。亚细胞定位显示*MsCBF1*蛋白作用于细胞核; 转录激活活性分析显示*MsCBF1*蛋白具有转录激活活性, 其激活活性区域位于C端第166~219位氨基酸之间。基因表达分析显示, *MsCBF1*基因响应盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl)和冷(4°C)胁迫诱导, 不响应干旱(300 mmol·L⁻¹甘露醇)胁迫诱导。

关键词: 新疆野苹果; *MsCBF1*; 转录激活活性; 表达分析

新疆野苹果又名塞威氏苹果, 主要分布在中亚地区的天山山脉, 包括中国新疆伊犁的巩留、新源、霍城和裕民, 哈萨克斯坦的阿拉木图州、塔尔迪库尔干州, 及吉尔吉斯斯坦的伊塞克湖州等(林培钧和崔乃然2000)。新疆野苹果是现代栽培苹果的祖先(Duan等2017), 是非常珍贵的天然基因资源库。新疆野苹果能耐极端最低温-35°C~-30°C, 耐旱力较强, 并能耐瘠薄土壤, 适应性很强(王磊1989), 是栽培苹果遗传改良的优异基因来源。但是近些年由于人类活动及虫害病害暴发等原因, 新疆野苹果的面积已由1959年的8 786 hm²锐减到2005年的1 800 hm², 分布面积锐减了80%(侯博和许正2005; 林培钧和崔乃然2000)。因此开展新疆野苹果抗逆机制的研究以及抗逆基因深入挖掘, 也为新疆野苹果生态恢复提供理论支撑的同时, 为栽培苹果的异常改良提供优异抗逆基因资源。

CBFs/DREB1 (C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding factors 1)蛋白属AP2/EREBP家族转录因子(Riechmann和Meyerowitz 1998), 是植物特有的转录因子。在拟南芥中CBF转录因子又包括CBF1、CBF2、CBF3、CBF4、CBF5、CBF6, 它们可以特异性识别并结合CRT/DRE (C-repeat /dehydration responsive element)脱水响应元件(核心序列CCGAC), 增强植物对非生物胁迫的抵抗能力(Jagloottosen等1998)。在拟南芥中CBF1蛋白与CBF2、CBF3、CBF4蛋

白的相似性分别为81%、84%、64%, 而4种蛋白的AP2基序序列相似性达到91%(Chiang等2002)。在拟南芥中发现, 低温时, *CBF1*与*CBF3*基因的表达量上调时间优先于*CBF2*, 而在常温情况下*CBF2*的表达量比*CBF1*和*CBF3*高5~8倍, 因此推断在常温下*CBF2*负调控*CBF1*及*CBF3*基因, 确保了*CBF*基因的可控性(Novillo等2004)。在拟南芥中过表达*CBF4*基因可以提高植株的抗冷抗旱能力(Haake等2002), 而*CBF5*和*CBF6*均不受低温诱导(Sakuma等2002)。除了*CBF*之间的自控以外, *CBF*表达还受多种反式作用因子的调控, 上游调控因子*ICE1* (Chinnusamy 2003)、*LOS4* (Gong等2002)、*SFR6* (Knight和Knight 1999)、*SIZ1* (Miura等2007)等均正调控*CBF*基因的表达, 而*HOS1* (Dong等2006)、*ZAT12* (Doherty等2009)、*ADF5* (Ruzicka等2008)、*PIF3* (Jiang等2017)等均负调控*CBF*基因的表达, *CBF*基因参与的植物抗冷过程是由众多基因共同参与的复杂调控系统。

本研究克隆得到新疆野苹果CBF1编码基因*MsCBF1*, 并首次通过实验鉴定得出CBF1转录因子激活活性区位于C端, 同时也对*MsCBF1*基因在非生物胁迫下基因表达模式进行了研究, 为下一步基因功能鉴定及应用奠定基础。

收稿 2017-11-08 修定 2018-04-27

资助 国家重点研发计划(2016YFC0501505)和中国科学院特色研究所主要服务项目(TSS-2015-014-FW-4-3)。

* 通讯作者(zhangdy@ms.xjb.ac.cn)。

1 材料与方法

实验材料来源于新疆野苹果 [*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.] 组培苗, 该组培苗以当年生种子为外植体获得。新疆野苹果种子采自新疆新源县天然野苹果林 (82°07' E, 43°59' N)。

1.1 菌株及主要试剂

酵母双杂交菌株 Y2H、酵母表达载体 pGB-KT7 以及植物融合表达载体 pB1121-GFP 均由本实验室保存。质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit 及琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒 Gel Extraction Kit 均购自 OMEGA 公司。10×TE Buffer、1 mol·L⁻¹ LiAc (10×)、50% PEG、反转录试剂盒 PrimeSmsipt RT reagent Kit with gDNA Eraser、DNA Marker 2000、Ex Taq RR001 聚合酶及限制性内切酶等均购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 DH5α 感受态、载体连接试剂盒 pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 均购自北京全式金公司。引物合成及序列测定由北京华大基因有限公司完成。

1.2 总RNA的提取和cDNA的合成

取1个月大的新疆野苹果组培苗, 利用CTAB法提取总RNA (王玉成2005)。用NanoDrop 2000 (美国赛默飞世尔) 检测RNA浓度, 并利用1%的凝胶电泳检测RNA的质量, 选择A₂₆₀/A₂₈₀ 值在1.9到2.1之间, 浓度大于200 ng·μL⁻¹ 且条带清晰的RNA用于

反转。利用PrimeSmsipt RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转试剂盒进行新疆野苹果总RNA的cDNA反转录, 合成第一链cDNA。

1.3 新疆野苹果MsCBF1基因的克隆

根据苹果 *MdCBF1* 基因序列 (GenBank 登录号 DQ074478) 设计特异性引物 *MsCBF1-F/R* (表1), 以cDNA为模板, 进行PCR扩增。使用1%的琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测回收, 并将回收产物纯化后连接到pMD19-T载体上, 转化大肠杆菌DH5α感受态细胞, 挑取单克隆菌落37°C培养12 h, 以基因全长引物进行菌液PCR, 将阳性菌株送北京华大基因公司测序。

1.4 新疆野苹果MsCBF1基因的生物信息学分析

利用DNAMAN软件将*MsCBF1*的cDNA序列翻译成氨基酸序列。利用ExPASy网站的ProtParam工具计算蛋白的理论分子量、等电点等基本参数。利用NCBI CDD工具分析序列的结构域及功能元件。利用MEGA 5.0软件通过邻近法构建CBF蛋白系统进化树。利用Phyre2分析*MsCBF1*的二维及三维结构。

1.5 新疆野苹果MsCBF1蛋白亚细胞定位分析

根据*MsCBF1*基因的ORF和载体序列特征, 设计带有*Sma*I限制性内切酶酶切位点及其两端的载体序列引物 *pB1121MsCBF1-F/R* (表1)。以pMD19-*MsCBF1*质粒为模板进行PCR扩增, 利用1%的琼脂

表1 引物的名称及序列

Table1 List of primers and sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>MsCBF1-F</i>	ATGGATGGTTGCTCTAATTAC
<i>MsCBF1-R</i>	TTAAATGGAAAACTCCATA
<i>pB1121MsCBF1-F</i>	GGGACTCTAGACTGGTACCCATGGATGGTTGCTCTAATTACT
<i>pB1121MsCBF1-R</i>	ACCATACTAGTCAGTCGACCCGCAATGGAAAACTCCATAAG
<i>pGBTk7MsCBF1-AF</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGATGGTTGCTCTAATTAC
<i>pGBKT7MsCBF1-AR</i>	CCGTCGAGGTCGACGGATCCCGTGCCGTGTCTCTAAACT
<i>pGBKT7MsCBF1-BF</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCCTTAATTTTGCTGACTCCGC
<i>pGBKT7MsCBF1-BR</i>	CCGTCGAGGTCGACGGATCCCGAGGCGGACCTGCCCTCAG
<i>pGBKT7MsCBF1-CF</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCCTTAATTTTGCTGACTCCGC
<i>pGBKT7MsCBF1-CR</i>	CCGTCGAGGTCGACGGATCCTGCGGACGTGGACTCCGATG
<i>pGBKT7MsCBF1-DF</i>	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCCTGAGCAGCAAGAAGTGT
<i>pGBTk7MsCBF1-DR</i>	CCGTCGAGGTCGACGGATCCTTAATGGAAAACTCCATAAG
<i>RTMsCBF1-F</i>	GGCAACACCGAGAACAAG
<i>RTMsCBF1-R</i>	CATTAAGCAGCGAAGACAAG
<i>EF-1α-F</i>	ATCAAGTATGCCTGGGTGC
<i>EF-1α-R</i>	CAGTCAGCCTGTGATGTTCC

糖凝胶电泳对PCR产物进行检测回收, 利用pEASY[®]-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit试剂盒(由北京全式金公司生产)将基因片段连入pBI121-GFP线性载体, 重组载体命名为pBI121-*MsCBF1*-GFP。将重组载体转化大肠杆菌DH5 α , 选取PCR检测为阳性的菌液, 送北京华大基因公司测序。将序列比对正确的菌株37°C培养12 h, 提取质粒。转化农杆菌EHA105, 选取PCR检测为阳性的菌液浸染洋葱表皮, 同时以不含目的基因的空载体为对照, 利用激光共聚焦显微镜观察*MsCBF1*蛋白定位情况。

1.6 新疆野苹果*MsCBF1*转录因子激活活性分析

构建酵母表达载体pGBKT7-*MsCBF1*。首先利用核酸内切酶*Bam*HI和*Eco*RI将pGBKT7载体线性化, 根据*MsCBF1*基因的ORF和载体序列特征, 设计特异性引物(表1), 将*MsCBF1*蛋白截取为8段, 分别为1~219(全长)、1~55、1~110、1~165、56~165、56~219、111~219、166~219。以pMD19-*MsCBF1*质粒为模板进行PCR扩增, 利用1%的琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测回收。利用pEASY[®]-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit试剂盒(由北京全式金公司生产)将截取片段连入pGBKT7线性载体, 转化大肠杆菌DH5 α , 选取PCR检测为阳性的菌液, 送北京华大基因公司测序。将序列比对正确的菌株37°C培养12 h, 提取质粒。质粒转化酵母Y2H, 酵母的转化采用PEG/LiAc法(王留强2012)。转化后的酵母经SD/-Trp固体筛选培养基30°C倒置培养2~3 d, 挑取单菌落接种于SD/-Trp液体筛选培养基。30°C震荡培养至OD₆₀₀为2.0, 菌液分别稀释10倍、100倍、1 000倍和10 000倍后, 分别取2 μ L滴点于SD/-Trp、SD/-Trp/-His及SD/-Trp/-His/X- α -Gal固体筛选培养基上, 30°C倒置培养2~3 d, 观察菌落的生长情况。以转入空载pGBKT7的酵母作为阴性对照, 同时以Li等(2004)已经验证的*EsDREB2B*具有自激活活性的菌株为阳性对照(实验室保存)。

SD/-Trp培养基上生长的酵母菌斑说明重组质粒成功转入酵母感受态细胞内; SD/-Trp/-His/X- α -Gal筛选培养基上长出蓝色的酵母菌斑说明转入的截取片段具有转录自激活活性。

1.7 新疆野苹果*MsCBF1*基因的表达特性分析

qRT-PCR分析在干、盐、冷等非生物胁迫下

*MsCBF1*基因的表达特性。CFX96[™] Real-time PCR system作为荧光定量PCR平台。实验材料为1月大、长势一致的野苹果组培苗。设置3种处理: (1) 4°C低温诱导: 组培苗移植入1/2MS固体培养基; (2) 干旱诱导: 组培苗移植入浓度为300 mmol·L⁻¹甘露醇的1/2MS固体培养基; (3) 高盐诱导: 组培苗移植入浓度为200 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2MS固体培养基。取样时间设置为0、2、4、8、12和24 h, 样品用锡箔纸包裹然后迅速放入液氮中冷冻, 放置于-80°C超低温冰箱保存备用。样品总RNA的提取采用CTAB法(王玉成2005), 用NanoDrop 2000(美国赛默飞世尔)检测RNA浓度, 并利用1%的凝胶电泳检测RNA的质量, 选择A₂₆₀/A₂₈₀值在1.9到2.1之间, 浓度大于200 ng· μ L⁻¹且条带清晰的RNA用于反转。利用PrimeSMT[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser反转试剂盒进行总RNA的cDNA反转录。qRT-PCR反应体系为20 μ L, 使用全式金TransStart Tip Green qPCR SuperMix试剂盒, 扩增条件为: 94°C 30 s, 94°C 5 s, 58°C 30 s, 72°C 20 s, 40个循环; 72°C 2 min。以*EF-1 α* 为内参基因(Tao等2012), 0 h样品为校准样品。扩增引物分别为*EF-1 α -F/R*和*RTMsCBF1-F/R*(表1)。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法进行相对定量计算(Kenneth和Livak 2001)。每个实验3个生物学重复, 3个技术重复。作图软件使用GraphPad Prism 7.0。

2 实验结果

2.1 新疆野苹果*MsCBF1*基因的克隆

以新疆野苹果cDNA为模板, 利用全长引物*MsCBF1-F/R*进行PCR扩增。把纯化的PCR产物连接到pMD19-T载体后送样测序, 得到*MsCBF1*基因完整的cDNA序列。结果(图1)显示, 新疆野苹果*MsCBF1*基因开放阅读框长度为660 bp, 共编码219个氨基酸, 且含有CBF转录因子的特征短肽序列PKK/RPAGR_xKFxETRHP和DSAWR。

2.2 新疆野苹果*MsCBF1*基因的生物信息学分析

ExPASy ProtParam tool分析显示*MsCBF1*蛋白分子量为23.96 kDa, 理论等电位点(pI)为5.11。NCBI CD Search tool分析显示*MsCBF1*蛋白属于AP2/EREBP家族转录因子, 在第58位氨基酸到116位氨基酸之间是AP2/ERF保守序列。Phyre2对*MsCBF1*蛋白的二级结构预测分析显示, 数量最多

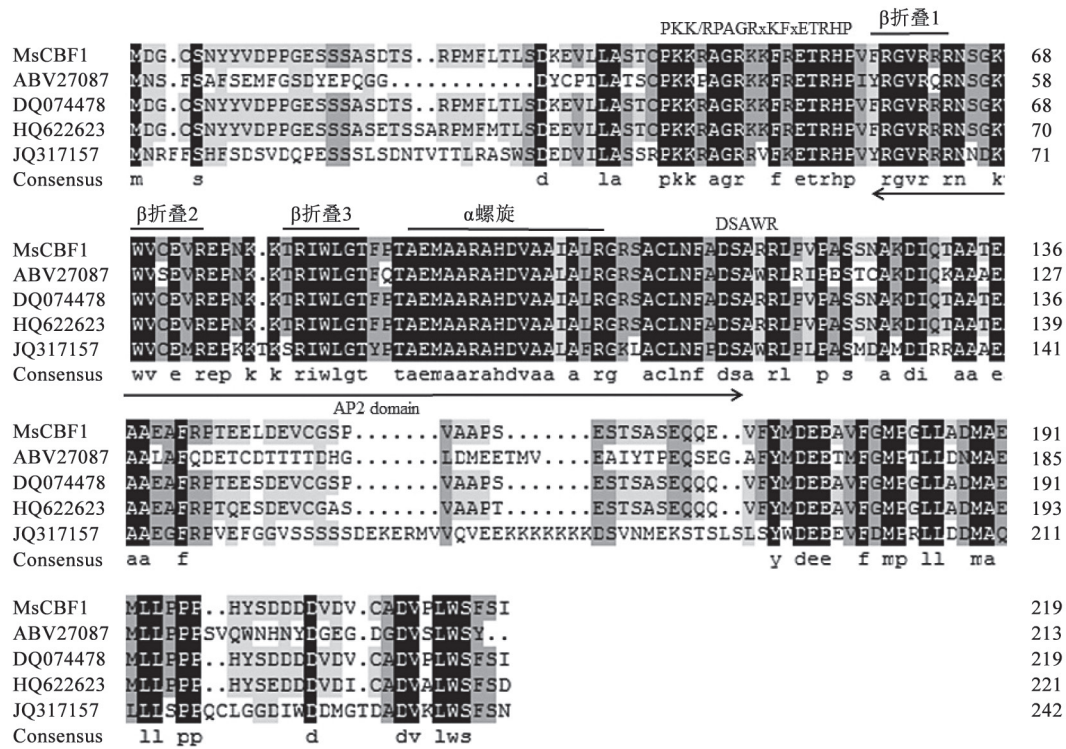


图1 新疆野苹果MsCBF1蛋白与其它植物CBF1蛋白的多重序列比对
 Fig.1 Homology comparison of CBF1 protein in *M. sieversii* and other plants
 ABV27087: 拟南芥; DQ074478: 苹果; HQ622623: 沙梨; JQ317157: 扁桃。

的为无规卷曲结构(random coil)占比为50%，其次为α螺旋(alpha helix)占比为23%，最后为β折叠(beta turn)占比为8%。DNAMAN序列比对显示MsCBF1蛋白与拟南芥AtCBF1蛋白、苹果MdCBF1蛋白、

沙梨PyCBF1蛋白、扁桃PrCBF1蛋白相似性分别为55.11%、99%、93%和51%，它们的AP2结构域蛋白序列相似性高达92%。

利用MEGA 5.0软件, 通过邻接法构建MsCBF1

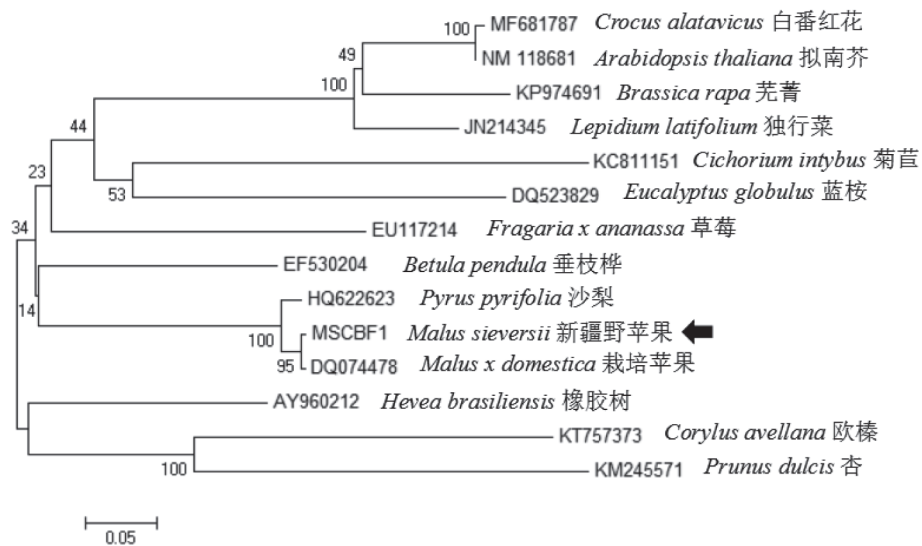


图2 新疆野苹果MsCBF1蛋白进化树分析
 Fig.2 Phylogenetic tree analysis of MsCBF1 protein in *M. sieversii*

蛋白与其它物种CBF1的同源关系进化树。系统进化树分析(图2)显示: 野苹果*MsCBF1*蛋白与栽培苹果*MdCBF1*蛋白的进化关系非常近, 除此之外, 还与蔷薇科的沙梨进化关系比较近, 与其它乔木如垂枝桦、橡胶树、蓝桉及杏的进化关系都比较远, 与草本类植物如草莓、拟南芥、独行菜及芜菁等的进化关系也比较远。

2.3 新疆野苹果*MsCBF1*蛋白亚细胞定位分析

利用含有融合表达载体pBI121-*MsCBF1*-GFP的农杆菌浸染洋葱表皮, 激光共聚焦显微镜观察

洋葱表皮细胞显示目的蛋白携带GFP发出的绿色荧光定位于细胞核, 空载GFP发出的荧光定位于细胞核和细胞膜(图3)。表明新疆野苹果*MsCBF1*蛋白定位于细胞核, 此结果和拟南芥*AtCBF1*蛋白定位结果一致(Stockinger 1997)。

2.4 新疆野苹果*MsCBF1*转录因子激活活性分析

观察SD/-Trp/-His/X- α -Gal固体筛选培养基上菌株的生长及显色情况来检测基因的自激活活性。结果如图4所示, *MsCBF1*转录因子全长具有自激活活性, 含有前165位氨基酸的蛋白片段没

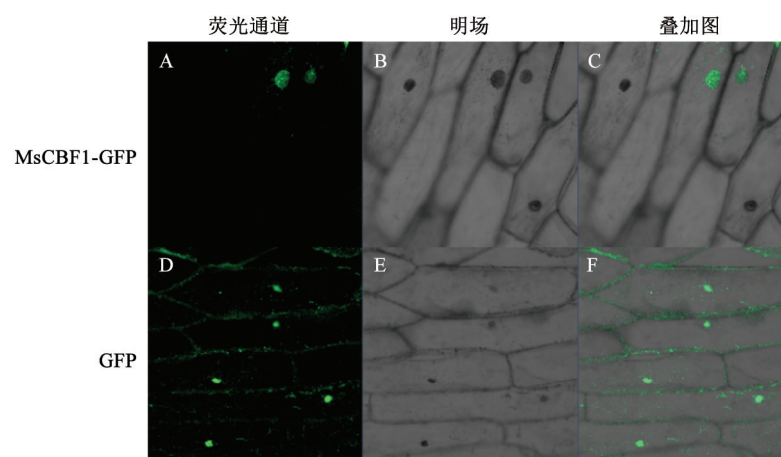


图3 新疆野苹果*MsCBF1*蛋白在洋葱表皮中的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of *MsCBF1* protein in onion epidermal cell

A~C: *MsCBF1*蛋白在洋葱表皮中的表达情况; D~F: 空载pBI121-GFP的表达情况; A: *MsCBF1*荧光通道; B: 明场; C: A和B的叠加图; D: pBI121-GFP荧光通道; E: 明场; F: D和E的叠加图。

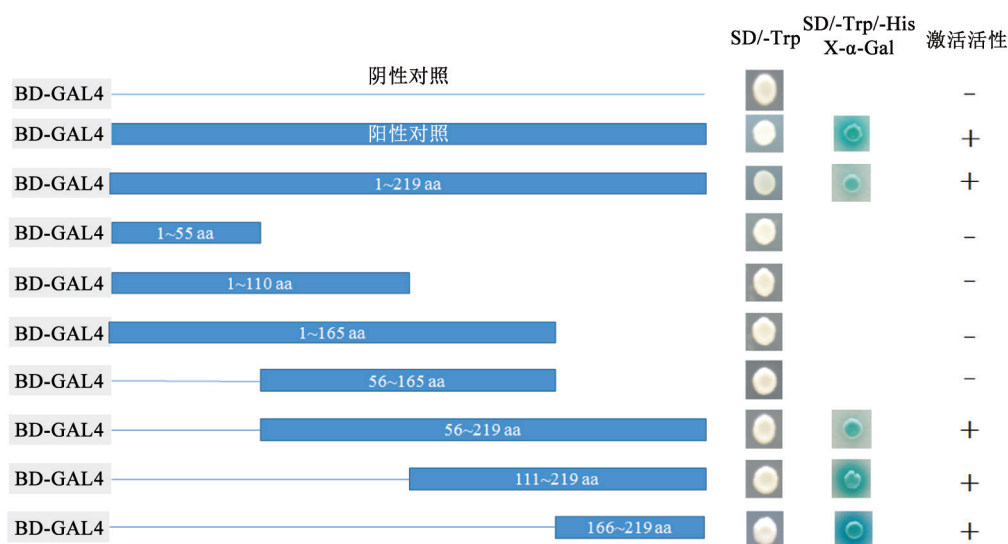


图4 *MsCBF1*转录因子激活活性分析

Fig.4 Transactivation activation activity assay of *MsCBF1* protein in yeast cells

有激活活性,而含有C端第166~219位氨基酸的截取片段都具有激活活性。表明MsCBF1转录因子的激活域在C端第166~219位氨基酸之间。

2.5 新疆野苹果MsCBF1基因的表达特性分析

利用qRT-PCR分析MsCBF1基因在干、盐、冷3种非生物胁迫下处理不同时间的表达情况(图5)。在干旱处理下,MsCBF1基因的表达量基本没很大变化。在高盐处理下,MsCBF1基因的表达量先上调,在处理8 h的表达量最高,达到对照的5~6倍;之后表达量降低,至24 h达对照的3~4倍。在4°C冷处理下,MsCBF1基因的表达量先上调,在2 h时达到最高值,为对照的2倍左右;之后开始下调,但其表达量依然略高于对照。

3 讨论

本实验克隆得到了新疆野苹果MsCBF1基因的cDNA序列,序列分析表明,MsCBF1蛋白有一个由59个氨基酸组成的AP2结构域,且含有CBF转录因子的特征短肽序列PKK/RPAGRxKFxETRHP和

DSAWR (Jaglo和Thomashow 2001)。转录激活活性分析显示MsCBF1转录因子全长具有转录激活活性,其转录激活区在C端第166~219位氨基酸之间,为酸性氨基酸富集类(acid-rich) (Sadowski等1988),Phyre2分析显示在这区间含有2个 α 螺旋结构。Xie等(2000)曾发现拟南芥AtNAC1转录因子全长具有微弱的激活活性,而含有C端181位氨基酸的截取片段却具有非常强烈的激活活性,将C端进一步截取发现不同截取片段的激活活性强弱各有差异。本研究也发现类似的现象,含有MsCBF1转录因子C末端片段的截取片段(111~219、166~219)其X- α -GAL显色要比MsCBF1全长片段(1~219)显色深很多。推断可能是由于全长片段和截取片段形成的蛋白三维结构各不相同会影响活性的强弱。Roberts和Green (1995)曾发现果蝇KRUPPEL蛋白可以根据其在细胞内的浓度来改变其四级结构进而实现激活活性在激活和抑制之间的转换,而Lehming等(1994)发现果蝇HMG1蛋白可以通过与其它蛋白互作进而实现激活活性在激

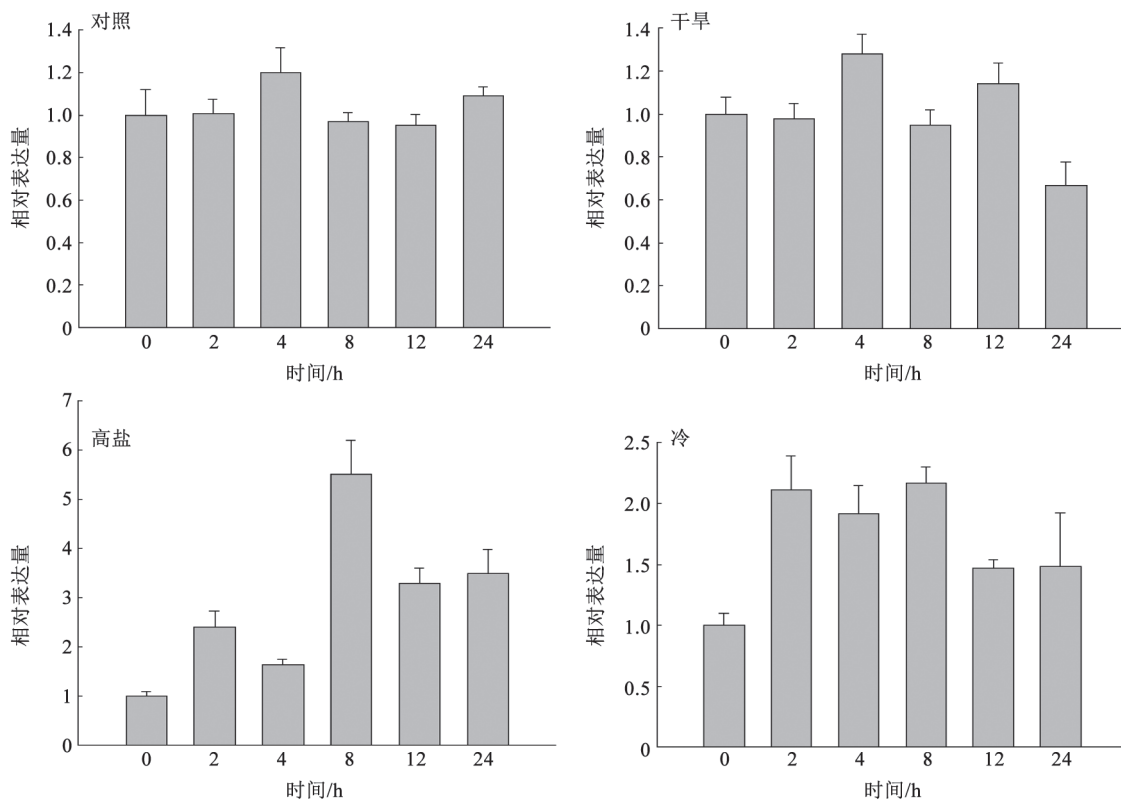


图5 干旱、高盐及冷胁迫下MsCBF1基因相对表达分析

Fig.5 Relative expression of MsCBF1 gene under drought, salt and cold treatment

活和抑制之间转换。因此, 转录因子的激活活性是受自身结构、外界环境以及其它作用因子等多种因素共同调控的复杂系统。本研究中*MsCBF1*转录因子激活域的精确位置、作用机制等尚需进一步实验进行验证与解析。

*CBF*的表达是由外界多种因素与植物体内多种转录因子共同调控的。当拟南芥受低温处理时, *CBF1*基因的转录水平会在15 min内显著提高, 在2 h达到高峰, 之后开始下降(Jagloottosen等1998)。此外, *CBF*基因的表达特性还与植株所处生长阶段及植株的不同器官相关(Xiao等2006; Zhao等2009)。这些研究表明*CBF*基因的表达具有时空特异性。Xue等(2014)研究发现在拟南芥中过表达苹果*MdCBF1*基因可以明显提高转基因株系的抗冷性。本研究表明, *MsCBF1*基因基本不响应干旱胁迫, 但对冷胁迫、尤其是高盐胁迫, 表现出很强的诱导表达特性。暗示*MsCBF1*基因可能参与新疆野苹果抵抗外界冷胁迫及盐胁迫的调控过程, 但不参与抵抗干旱胁迫。

*CBF*基因参与抵抗非生物胁迫处理的研究较多, 包括拟南芥中过表达*CBF4*基因可以提高植株对干旱胁迫的抵抗力(Haake等2002)。在番茄中异源表达拟南芥*AtCBF1*基因可以提高番茄对缺水 and 寒冷的抵抗力(Hsieh等2002)。在盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)的研究中发现*SsCBF1*基因不仅响应低温胁迫, 还响应盐及PEG胁迫; 而*SsCBF2*基因不响应盐和PEG胁迫, 但低温胁迫能显著诱导它的表达(孙晓波等2016)。李丹等(2010)在黄瓜(*Cucumis sativus*)的研究中发现, *CBF1*基因响应低温和高盐诱导而不响应干旱诱导。在拟南芥中异源表达水稻*OsDREB1A/OsCBF3*基因可以显著提高拟南芥对干旱、高盐以及寒冷的抵抗力(Dubouzet等2003), 表明CBFs/DREB1在植物抵抗非生物胁迫方面起着重要的作用。有关*MsCBF1*转录因子的抗非生物胁迫功能研究尚在进一步进行当中。

参考文献

- Chiang DA, Keh HC, Huang HH, et al (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 130 (2): 639–648
- Chinnusamy V (2003). *ICE1*: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 17 (8): 1043–1054
- Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, et al (2009). Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21 (3): 972–984
- Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, et al (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (21): 8281–8286
- Duan N, Yang B, Sun H, et al (2017). Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nat Commun*, 8 (1): doi: 10.1038/s41467-017-00336-7
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, et al (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 33 (4): 751–763
- Gong Z, Lee H, Xiong L, et al (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (17): 11507–11512
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, et al (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 130 (2): 639–648
- Hou B, Xu Z (2005). Relationship of the occurrences and evolutions of wild-fruit forests with climatic factors in the Tianshan Mountain. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 25 (11): 2266–2271 (in Chinese with English abstract) [侯博, 许正(2005). 天山野果林的发生、演变与气候因素的关系. *西北植物学报*, 25 (11): 2266–2271]
- Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, et al (2002). Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol*, 130 (2): 618–626
- Jaglo KR, Thomashow MF (2001). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol*, 127 (3): 910–917
- Jagloottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, et al (1998). *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280 (5360): 104–106
- Jiang B, Shi Y, Zhang X, et al (2017). *PIF3* is a negative regulator of the *CBF* pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (32): E6695
- Kenneth J, Livak TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Method*, 25 (4): 402–408
- Knight H, Knight MR (1999). The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif. *Plant Cell*, 11 (5): 875–886
- Lehming N, Thanos D, Brickman JM, et al (1994). An HMG-

- like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor. *Nature*, 371 (6493): 175–179
- Li D, Jiang XM, Yu XH (2010). Expression analysis of *CBF1* from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol J*, 46 (3): 245–248 (in Chinese with English abstract) [李丹, 蒋欣梅, 于锡宏(2010). 黄瓜中*CBF1*基因的克隆及其表达分析. *植物生理学报*, 46 (3): 245–248]
- Li X, Zhang D, Li H, et al (2014). EsDREB2B, a novel truncated DREB2-type transcription factor in the desert legume *Eremosparton songoricum*, enhances tolerance to multiple abiotic stresses in yeast and transgenic tobacco. *BMC Plant Biol*, 14 (1): 44–60
- Lin P, Cui N (2000). The Study About Tianshan Forest Resources. Beijing: The Forest of China Press (in Chinese) [林培钧, 崔乃然(2000). 天山野果林资源——伊犁野果林综合研究. 北京: 中国林业出版社]
- Miura K, Jin JB, Lee J, et al (2007). *SIZ1*-mediated sumoylation of *ICE1* controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (4): 1403–1414
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, et al (2004). *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in, stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (11): 3985–3990
- Riechmann JL, Meyerowitz EM (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem*, 379 (6): 633–646
- Roberts SGE, Green MR (1995). Dichotomous regulators. *Nature*, 375 (6527): 105–106
- Ruzicka DR, Kandasamy MK, Mckinney EC, et al (2008). *Arabidopsis* actin depolymerizing factor5 functions in multicellular development and is a novel repressor of the CBF cold response transcription factors. *Dev Biol*, 319 (2): 565–565
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, et al (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, 335 (6190): 563–564
- 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
- Stockinger EJ (1997). *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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (3): 1035–1040
- Sun X, Su J, Jia X, et al (2016). Cloning and expression analysis of two *DREB1/CBF* genes in *Suaeda salsa* L. *Sci Agric Sin*, 49 (12): 2418–2429 (in Chinese with English abstract) [孙晓波, 苏家乐, 贾新平等(2016). 盐地碱蓬2个*DREB1/CBF*基因的克隆与表达调控分析. *中国农业科学*, 49 (12): 2418–2429]
- Tao Z, Dong L, Ping W, et al (2012). Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Mol Genet Genomics*, 287 (5): 423–436
- Wang L (1989). *Malus sieversii* and *Armeniaca vulgaris* L. *Xinjiang Agric Sci*, (6): 33–34 [王磊(1989). 新疆野苹果和新疆野杏. *新疆农业科学*, (6): 33–34]
- Wang LQ (2012). Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A (*eIF5A*) from *Tamarix androssowii* (dissertation). Harbin: Northeast Forestry University (in Chinese with English abstract) [王留强(2012). 柽柳真核起始因子5A (*eIF5A*)基因的功能研究 (学位论文). 哈尔滨: 东北林业大学]
- Wang Y (2005). Studies of molecular mechanism of stress tolerance in *Tamarix. sp* and cloning of related genes (dissertation). Harbin: Northeast Forestry University (in Chinese with English abstract) [王玉成(2005). 柽柳抗逆分子机理研究与相关基因的克隆(学位论文). 哈尔滨: 东北林业大学]
- Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, et al (2006). Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell Environ*, 29 (7): 1410–1421
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, et al (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*, 14 (23): 3024–3036
- Xue Y, Wang YY, Peng RH, et al (2014). Transcription factor *MdCBF1* gene increases freezing stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant*, 58 (3): 499–506
- Zhao D, Shen L, Fan B, et al (2009). Ethylene and cold participate in the regulation of *LeCBF1* gene expression in postharvest tomato fruits. *FEBS Lett*, 583 (20): 3329–3334

Cloning and expression analysis of *MsCBF1* gene from *Malus sieversii*

ZHANG Ke-Chuang^{1,2}, LI Xin-Yue³, ZHANG Yi-Gong¹, ZHANG Dao-Yuan^{1,*}, WANG Yu-Cheng¹

¹*Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Urumqi 830011, China*

²*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*

³*School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China*

Abstract: *Malus sieversii* in Xinjiang of China is the ancestor of cultivated apples, showing a strong adaptability to abiotic stress, which is an extreme precious natural gene pool. In this study, the *M. sieversii* *CBF1* (*MsCBF1*) gene were obtained by RT-PCR, the open reading frame (ORF) was 660 bp in length, encoding a amino acid sequence of 219 residues. The *MsCBF1* protein contained a typical AP2 domain. The result of sub-cellular localization indicated that *MsCBF1* was targeted to nucleus. The transcriptional activation activity analysis indicated that the C-terminal region (166–219 bp) of *MsCBF1* had transcriptional activation ability. The result of qRT-PCR showed that *MsCBF1* gene were up-regulated under salt stress (200 mmol·L⁻¹ NaCl) and cold treatment (4°C), but did not response to drought stress (300 mmol·L⁻¹ mannitol).

Key words: *Malus sieversii*; *MsCBF1*; transcriptional activation activity; expression analysis

Received 2017-11-08 Accepted 2018-04-27

This work was supported by the National Key Research Project (2016YFC0501505) and the Scientific Service Project of CAS (TSS-2015-014-FW-4-3).

*Corresponding author (zhangdy@ms.xjb.ac.cn).