作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2021, 47(12): 2394–2406 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04259

甘蓝型油菜 CBF 基因家族的鉴定和表达分析

解 盼[1,4] 刘 蔚[1] 康 郁[1] 华 玮[1] 钱论文[1,2,3] 官春云[1,2,3,*]
何 昕[1,2,3,*]

[1] 湖南农业大学南方粮油作物协同创新中心, 湖南长沙 410128; [2] 湖南农业大学油料作物研究所, 湖南长沙 410128; [3] 国家油料作物改良中心湖南分中心, 湖南长沙 410128; [4] 湖南农业大学风景园林与艺术设计学院, 湖南长沙 410128

摘 要: 低温是影响植物生长发育的重要环境胁迫因子, *ICE1* (inducer of *CBF* expression1)–*CBF* (C-repeat (*CRT*)-binding factors)–*COR* (cold responsive)在植物响应低温胁迫的信号途径中具有重要作用。为探究 CBF (C-repeat-binding factors)基因在甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)中的进化以及在低温胁迫应答反应中的功能, 本研究以 4 个拟南芥 CBF 基因为基础序列, 鉴定出 11 个甘蓝型油菜、6 个白菜和 5 个甘蓝 CBF 基因, 并对它们的分子特性、蛋白保守结构域和系统进化树、基因结构及基因染色体分布、甘蓝型油菜 CBF 基因组织表达模式以及不同逆境和激素处理下的表达模式进行系统的比较分析。结果表明, 在 11 个甘蓝型油菜 CBF 基因中, 可分为亚组 I (*CBF1/2/3*)和亚组 II (*CBF4*) 2 个亚组。转录组测序结果表明, 所有甘蓝型油菜 CBF 基因受低温诱导表达, 其中亚组 Ib 的 4 个基因对冷胁迫响应迅速且持续时间长, 亚组 II 中 2 个基因对冷胁迫响应表达较弱, 但它们在根中表达量明显高于叶片, 并且参与盐胁迫和渗透胁迫响应; 甘蓝型油菜中 CBF 基因家族对冻害响应更强烈, 其中亚组 I 中的 *BnaA08g30930D*、*BnaCnng49280D*、*BnaAnng34260D*、*BnaC07g39680D* 和亚组 II 中 *BnaA10g07630D*、*BnaC09g28190D* 对冻害响应尤为显著。本研究将为进一步了解甘蓝型油菜 CBF 家族基因的生物学功能及其对低温尤其是冻害响应奠定基础, 同时为 CBF 家族基因在其他物种中的生物信息学研究提供参考。

关键词: 甘蓝型油菜; CBF; 低温; 冻害; 基因表达分析

Identification and relative expression analysis of CBF gene family in *Brassica napus* L.

XIE Pan[1,4], LIU Wei[1], KANG Yu[1], HUA Wei[1], QIAN Lun-Wen[1,2,3], GUAN Chun-Yun[1,2,3,*], and HE Xin[1,2,3,*]

[1] Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China; [2] Oil Crops Research, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China; [3] Hunan Branch of National Oilseed Crops Improvement Center, Changsha 410128, Hunan, China; [4] College of Landscape Architecture and Art Design, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: Low temperature is an important environmental stress factor affecting plant growth and development. The *ICE1-CBF-COR* [inducer of *CBF* expression1–c-repeat (*CRT*)-binding factors–cold responsive] plays an important role in the signaling pathway in response to low temperature stress in plants. To explore the evolution of CBF gene in *Brassica napus* L. and its function in response to low temperature stress, 11, 6, and 6 CBF genes were detected from *Brassica napus*, *Brassica rapa*, and *Brassica oleracea*, respectively. In addition, the molecular characteristics, protein conserved domains, phylogenetic tree, gene structure, and chromosome distribution were systematically investigated. The results showed that 11 *BnaCBF* genes could be divided into two subgroups including Subgroup I (*CBF1/2/3*) and Subgroup II (*CBF4*). Transcriptome sequencing revealed that all the CBF genes of *Brassica napus* were induced by low temperature, among which four genes in subgroup Ib responded rapidly

本研究由湖南省科技创新计划项目(2020RC2057)和国家自然科学基金项目(31801398)资助。
This study was supported by the Science and Technology Innovation Program of Hunan Province (2020RC2057) and the National Natural Science Foundation of China (31801398).

* 通信作者(Corresponding authors): 官春云, E-mail: guancy2011@aliyun.com; 何昕, E-mail: hexinzhsh@126.com
第一作者联系方式: E-mail: xiepan@hunau.edu.cn

Received (收稿日期): 2020-11-28; Accepted (接受日期): 2021-04-14; Published online (网络出版日期): 2021-05-21.
URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210521.1411.006.html

and durably to cold stress, and two genes in Subgroup II responded weakly to cold stress, however, the relative expression level of CBF genes in roots was significantly higher than that in leaves, which were involved in salt stress and osmotic stress responses. Further analysis demonstrated that the CBF gene family in *Brassica napus* responded more strongly to freezing stress, especially *BnaA08G30930D*, *BnaCnng49280D*, *BnaAnng34260D*, *BnaC07g39680D* in Subsection I, and *BnaA10g07630D*, *BnaC09G28190D* in Subsection II. This study lays a foundation for further understanding the biological function of the CBF family gene and its response to low temperature, especially freezing stress in *Brassica napus*., and provides a reference for bioinformation research of CBF family genes in other species.

Keywords: *Brassica napus* L.; CBF; low temperature; chilling stress; relative expression level

两熟制、三熟制是我国南方地区推广的主要种植模式[1], 为适应南方地区“稻–稻–油”轮作生产模式的变化趋势, 需要种植早熟、特早熟油菜品种。但大量的研究和生产实践表明, 油菜早熟性与抗逆性和丰产性之间始终存在着较大的矛盾, 早熟与低产、抗性差之间存在着连锁关系[2]。早熟品种生育进程快, 现蕾、抽薹、开花都较早, 抗冻性差并且花期耐春寒能力较弱, 一旦遭遇冰冻或持续的低温阴雨天气, 产量损失严重[3]。如2008年1月, 我国遭受了严重的低温冰雪灾害, 对冬油菜生产带来了严重的影响, 受灾面积约占全国冬油菜面积77.8%, 产量损失10.88%。在受灾区随机抽样调查发现, 受冻害影响较严重的品种主要为未经当地审定的早熟品种, 而经过正规审定的油菜品种的受灾程度较轻[4]。此外, 2010年春季“倒春寒”引起的持续低温阴雨天气给我国长江中下游油菜生产带来严重影响, 平均减产10%~20%, 部分地区减产高达30% [5]。因此, 需要我们加强对耐寒、抗冻性强的早熟油菜品种选育研究。

低温作为世界最为严重的自然灾害之一, 影响植物的生长发育以及地理分布, 严重时甚至会造成植物死亡。目前, 低温信号途径研究比较清楚的是 *ICE1* (inducer of *CBF* expression 1)–*CBF* (C-repeat (*CRT*)-binding factors)–*COR* (cold responsive)信号途径。研究表明, *ICE1*通过特异性结合*CBF3*启动子上的MYC结合位点(CANNTG), 正调控*CBF3*基因的表达[6]。CBF转录因子中的AP2 domain可直接与冷调节*COR*基因启动子中的CRT/DRE顺式元件结合, 进而诱导*COR*基因的表达。在拟南芥中, *CBF1/2/3*串联排列在第4条染色体上, 受冷诱导表达[7-10]。而*CBF4*不受冷诱导, 但在拟南芥中过表达*CBF4*可增强植物的抗冻性和耐旱性[11]。在拟南芥植株上过表达*CBF1/2/3*均明显增强其抗冻性[8-9,12]。与野生型相比, 敲除*CBF1*和*CBF3*基因拟南芥植株抗冻性降低约60% [13]。*CBF1/2/3*三突变体在非冷驯化时没有或具有轻微冻敏感表型, 而在冷驯化后表现出强烈的冻敏感表型[14-16]。通过对*CBF1/2/3*三突变体进行RNA-seq分析发现, *CBFs*突变影响了全转录组10%~20%的*COR*基因表达[15]。大量研究证明, CBF基因在植物抗寒方面是一个保守的信号路径。抗冷相关基因(*CBF4*、*COR6*、*COR15*和*COR25*)在抗冻性强的甘蓝型油菜1801中的表达量显著高于在抗冻性弱的C20中的[17]。Maryam等[18]在葡萄中发现4个受冷胁迫诱导表达的CBF基因, 这些CBF在冷处理后几分钟开始表达, 其中*CBF2*持续表达几个小时, *CBF4*持续表达到第10天。

研究人员开始利用CBF基因改良作物的抗寒、抗冻性。在冷胁迫下, 超表达拟南芥*CBF3*基因可以增加木薯、烟草、水稻、油菜和地被石竹中脯氨酸的积累, 减少丙二醛的产生以及电解质外渗, 从而增强它们的抗寒性[19-22]。此外, *OsCBF*基因转入水稻后, 脯氨酸及可溶性糖的含量明显提高, 使得水稻的抗寒性、抗旱性和抗盐性都有所提高[23]。但是有研究发现, 超表达甘蓝型油菜*BnCBF5*和*BnCBF17*可以提高植株抗冻性, 但会严重抑制植株的生长发育, 并推迟开花时间[24]。

为充分挖掘CBF基因, 利用CBF基因解决甘蓝型油菜早熟品种与抗冻性之间的矛盾, 本研究对拟南芥、甘蓝、白菜以及甘蓝型油菜的CBF家族进行系统地比较分析, 鉴定甘蓝型油菜、白菜和甘蓝CBF基因, 并对这些CBF成员的基因结构、分子特性、基因染色体分布、系统进化树、组织表达、不同逆境、不同激素以及不同低温胁迫处理下的表达模式进行比较分析, 筛选候选抗冻基因, 以期为进一步了解甘蓝型油菜CBF家族基因的生物学功能及其对低温尤其是冻害响应奠定基础, 同时为CBF家族基因在其他物种中的生物信息学研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

将甘蓝型油菜半冬性品种中双 11 号(Zhongshuang 11, ZS11)的种子在滤纸上发芽, 移栽到装有土壤或

蛭石的花盆中, 在生长室内生长 6 周。生长室中条件设置如下: 22℃ 14 h 光照/20℃10 h 黑暗, 相对湿度 60%。在 8:00 使用 100 μmol L^{-1} 脱落酸(abscisic acid, ABA)、100 μmol L^{-1} 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、1 mmol L^{-1} 水杨酸(salicylic acid, SA)和 10 μg mL^{-1} 乙烯利(ethephon, ETH)溶液喷洒叶片进行激素处理, 并在处理后的 3、6 和 12 h 时间点采集叶片样品。高温胁迫和低温胁迫, 在 8:00—20:00 期间, 生长室分别设置为 40℃和 4℃, 相对湿度 60%。在胁迫处理的 3、h 和 12 h 时间点采集叶片样品。盐胁迫和 PEG 胁迫处理, 分别在 8:00—20:00 期间用 200 mmol L^{-1} NaCl 或 20%聚乙二醇 6000 (PEG-6000)溶液灌溉幼苗, 并在处理期间的 3、6 和 12 h 时间点采集根系样本。对照幼苗用去离子水处理, 每个处理重复 3 次, 每个处理用 3~4 株幼苗。采集的叶和根样本立即在液氮中冷冻, 然后在–80℃下保存以提取 RNA[24]。

在光照培养箱中培育 2 个早熟的半冬性油菜品种(HX17 和 HX58)的幼苗, 生长室条件设置如下: 20℃ 14 h 光照(6:00—20:00)/16℃10 h 黑暗(20:00—6:00), 相对湿度 60%, 培养 4 周; 冷驯化冷害与冻害处理: 在 4℃条件下处理 14 d 后, 分别放入 4℃和–4℃处理 12 h; 非冷驯化冷害与冻害处理: 20℃ 14 h 光照(6:00—20:00)/16℃10 h 黑暗(20:00—6:00)处理 6 周后, 分别放入 4℃和–4℃处理 12 h; 其中, 4℃冷害/–4℃冻害处理 12 h 的时段为 20:00—8:00 (黑暗 10 h/光照 2 h), 在处理后的上午 8:00 收集从顶部往下数的第 3 片叶子并立即保存在–80℃, 直到提取 RNA[25]。

1.2 白菜、甘蓝及甘蓝型油菜 CBF 基因的筛选鉴定

从Ensembl Plants (http://plants.ensembl.org/index.html)数据库中获取拟南芥、白菜(*Brassica rapa*)、甘蓝(*Brassica oleracea*)、甘蓝型油菜(*Brassica napus*)的CBF基因全长DNA序列、CDS序列、蛋白的氨基酸序列及相关信息。首先在Ensembl Plants中下载拟南芥CBF基因的核酸序列和蛋白的氨基酸序列, 利用BLASTP比对甘蓝型油菜、白菜和甘蓝基因组, 以E<10^{-5}为阈值分别筛选出对应的*CBF*候选同源基因, 并利用BLASTP比对NCBI非冗余数据库鉴定候选基因是否为CBF同源基因。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMan6.0 软件对拟南芥、白菜、甘蓝和甘蓝型油菜 CBF 蛋白序列比对分析, 并使用 MEGA7 中的 Neighbour-Joining (NJ)系统发育方法构建系统发育树[26]。利用 MEME (http://MEME.nbcr.net/ MEME/cgi-bin/MEME.cgi)对拟南芥、白菜、甘蓝和甘蓝型油菜 CBF 进行保守结构域分析。使用 Compute-pI/Mw 工具(http://web.expasy.org/Compute-pI/)和 ProtComp 9.0 (http://linux1.softberry.com/)预测分子量(molecular weight, MW)、等电点(Isoelectric point prediction, pI)和亚细胞定位。使用 TBtools 软件(TBtools_v.6695)展示基因结构、具体的染色体分布情况。参考以往的研究报道[27], 在 100 kb 基因组范围内排列有 2 个及以上基因, 我们将其定义为串联重复基因。

1.4 表达热图分析

参考He等[24-25]以及本课题组尚未公开的数据进行热图分析, 采用TBtools软件(TBtools.v.6695)作图。

1.5 BnaCBF 基因表达情况检测

参照植物总RNA提取试剂盒说明书提取植物总RNA, 用反转录试剂盒合成cDNA。根据甘蓝型油菜*BnaCBF*参考基因序列, 通过Primer premier 6.0软件设计qRT-PCR特异性引物, 引物序列见表1。采用Bio-Rad CFX96-M实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad, 美

表 1 本研究所用 qRT-PCR 引物
Table 1 Primers for qRT-PCR used in this study

基因名称 Gene name	正向引物序列 Forward sequence (5′–3′)	负向引物序列 Reverse sequence (5′–3′)
BnaCBF4-RT	GAGACCACGGAAGAGAACGG	AGTCGTTATGATTCCATCCAAGTT
BnaCBF1-C09-RT	CGACTATGGTTGAGGCAGTGAAA	AAGTCGTTATGATTCCATCCAAGTT
BnaCBF3-RT	CCAAGCCGAGTCAGCAAAAT	GAGAAACTCAGGTAAATGGGTGTG
BnaCBF1-Cnn-RT	GAGACGACGGTGGAGGGTG	AAGTCATCATTATGTCCCCATTGTA
BnaC05g34300D/BnaACTIN	GGTTGGGATGGACCAGAAGG	TCAGGAGCAATACGGAGC

国)检测目标基因的表达。参照荧光定量试剂盒说明书配置20 μL的反应体系, 含2×Trans start, Tip Green qPCR Super Mix 10 μL、cDNA模板2 μL、正反向引物(0.2 μmol L^{-1})各0.5 μL、去离子水7 μL。qRT-PCR反应程序为95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 45 s, 40个循环。选用*BnaActin*作为内参基因, 采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法分析基因表达变化情况。

2　结果与分析

2.1　甘蓝型油菜、白菜和甘蓝 CBF 基因鉴定

利用4个AtCBF (*At4g25490*、*At4g25470*、*At4g25480*和*AT5G51990*)核苷酸和氨基酸序列分别在甘蓝型油菜、白菜和甘蓝的基因组数据库中进行同源序列搜索, 并结合SMART数据库、InterPro和NCBI数据库中的保守域(conservative domain, CD)搜索分析, 最终获得11个甘蓝型油菜CBF基因(BnaCBF)、6个白菜CBF基因(BraCBF)、5个甘蓝CBF基因(BoCBF)。其中11个甘蓝型油菜CBF基因编码区长度在576~663之间, 编码189~220个氨基酸, 预测等电点(Isoelectric point prediction, pI)在4.58~6.14之间, 为酸性蛋白, 分子量在20.57~24.56 kD之间。亚细胞定位预测表明, 这11个甘蓝型油菜CBF基因在细胞核中, 具体信息详见表2。

2.2　拟南芥、白菜、甘蓝及甘蓝型油菜 CBF 基因的序列比对分析

将鉴定得到的CBF家族蛋白的保守结构域通过DNAMAN软件比对(图 1)发现, 蛋白序列保守性较高, 甘蓝型油菜、白菜、甘蓝及拟南芥的26个CBF序列比对一致性为61.08%, 这些基因都具有相同的保守序列AP2 domain (图 1 红色框出部分)。与其他成员相比, *BnaCnng49280D*、*Bra010463*和*BnaA08g30930D* 3个基因在AP2 domain的前半部分有27个氨基酸序列缺失。

2.3　拟南芥、白菜、甘蓝及甘蓝型油菜的 CBF 基因进化树分析

为揭示甘蓝型油菜及其二倍体祖先种之间CBF家族基因的进化关系, 本研究利用MEGA7.0软件对拟南芥、白菜、甘蓝和甘蓝型油菜的CBF蛋白序列进行系统发育分析, 构建系统进化树(图2-A)。26个CBF蛋白被分为2个亚组, 与前人研究结果一致。亚组I中含有包括拟南芥*AtCBF1/2/3*在内的21个基因, 其中, 5个白菜CBF基因、4个甘蓝CBF基因以及9个甘蓝型油菜CBF基因, 它们与拟南芥*AtCBF1/2/3*基因比对一致性分别为79.77%、68.38%和72.98%; 亚组II中含有包括拟南芥*AtCBF4*在内的5个基因, 其中2个来自甘蓝型油菜, 白菜和甘蓝各1个, 它们与拟南芥*CBF4*比对一致性分别为91.07%、80.36%和79.91%。进一步分析发现, 除白菜基因*Bra010461*外, 其他白菜和甘蓝基因在甘蓝型油菜中均存在直系同源基因; 11个甘蓝型油菜CBF基因中, 除*BnaA08g30910D*外, 其他10个基因都能在白菜和甘蓝中找到同源基因。

2.4　基因结构分析和 MEME 分析

为进一步揭示甘蓝型油菜、白菜和甘蓝及拟南芥CBF基因家族的进化关系, 本研究对其基因结构(图2-B)和motif进行了预测分析(图2-C)。CBF基因具有相对保守的基因结构和蛋白功能结构域, *CBFs*内含子的数目在0~2之间, 亚组I中, 有7个CBF基因有内含子, 其中白菜中2个CBF基因、甘蓝型油菜1个CBF基因有1个内含子和2个外显子, 甘蓝型油菜中4个CBF基因有2个内含子和3个外显子, 其他14个CBF基因只有1个外显子没有内含子, 与拟南芥*AtCBF1/2/3*基因结构一致, 进化树关系也更近; 亚组II中5个CBF基因没有内含子, 基因结构一致, 具有保守性。进一步分析发现, 亚组I中白菜中*Bra010460*、*Bra010463*含有1个内含子, 甘蓝型油菜中与这2个基因进化同源关系*BnaA08g30950D*和*BnaA08g30930D*含有2个内含子, 因此推断这4个基因在进化过程中可能发生了变异; 另一方面, 甘蓝型油菜中*BnaUnng01150D*有1个内含子, *BnaCnng49280D*有2个内含子, 而它们对应的同源基因*Bo8g050800*和*Bo8g050740*没有内含子, 推测这2个甘蓝型油菜CBF基因进化过程可能发生了变异; 同时我们在进化树分析中推断*BnaA08g30910D*可能是*BnaA08g30950D*的拷贝基因, 两者基因结构一致。

Motif预测分析结果表明, Motif预测分析与进化树比对分析结果吻合, 可明显分为2个亚组, 2组保守基序组成高度相似。图2-C展示了保守性较高的6条基序在26条CBF蛋白序列中的分布情况, 可见各蛋白高度保守, 但不同亚组之间蛋白序列包含的保守基序的种类和数目存在一定的差异, 2个亚组内蛋白保守基序的组成模式更为相似。26条CBF蛋白序列都含有Motif 6、Motif 1、Motif 4和Motif 3, 由此推断这些区域可能是CBF家族蛋白共性的、保守的功能基序。进一步分析发现, 亚组I中的22个成员保守基序组成模式较为一致, 除了亚组I中*BnaUnng*

表 2　BnaCBF 基因信息汇总
Table 2　BnaCBF gene information

基因名称 Gene ID	核苷酸长度 Nucleotide length (bp)	氨基酸长度 Amino acid length	等电点预测 Isoelectric point prediction	分子量 Molecular weight (kD)	内含子数目 Number of introns	外显子数目 Number of exons	亚细胞定位 Subcellular localization	染色体定位 Chromosome location	白菜同源基因 Homologous gene in *Brassica rape*	甘蓝同源基因 Homologous gene in *Brassica oleracea*
BnaA08g30950D	666	221	4.97	24.56	2	3	核酸 Nuclear	chrA08_random:1781546..1782397	*Bra010460*	*Bo8g050800*
BnaUnng01150D	651	216	5.34	23.81	1	3	核酸 Nuclear	chrUnn_random:1448150..1448983		
BnaA08g30910D	654	217	5.13	24.02	2	3	核酸 Nuclear	chrA08_random:1768075..1768896	*Bra010461*	
BnaA08g30930D	570	189	4.73	20.57	2	3	核酸 Nuclear	chrA08_random:1771443..1772198	*Bra010463*	*Bo8g050740*
BnaCnng49280D	576	191	4.58	20.83	2	3	核酸 Nuclear	chrCnn_random:48753744..48754496		
BnaA03g13620D	645	214	4.58	20.82	0	1	核酸 Nuclear	chrA03:6228484..6229128	*Bra022770*	*Bo3g024240*
BnaC03g71900D	645	214	5.03	23.79	0	1	核酸 Nuclear	chrC03_random:417520..418164		
BnaAnng34260D	645	214	5.21	23.83	0	1	核酸 Nuclear	chrAnn_random:39020794..39021438	*Bra019162*	*Bo7g110320*
BnaC07g39680D	648	215	5.23	23.81	0	1	核酸 Nuclear	chrC07:40421468..40422115		
BnaA10g07630D	663	220	5.52	24.55	0	1	核酸 Nuclear	chrA10:6107845..6108507	*Bra028290*	*Bo9g104770*
BnaC09g28190D	663	220	6.14	24.50	0	1	核酸 Nuclear	chrC09:30491719..30492381		

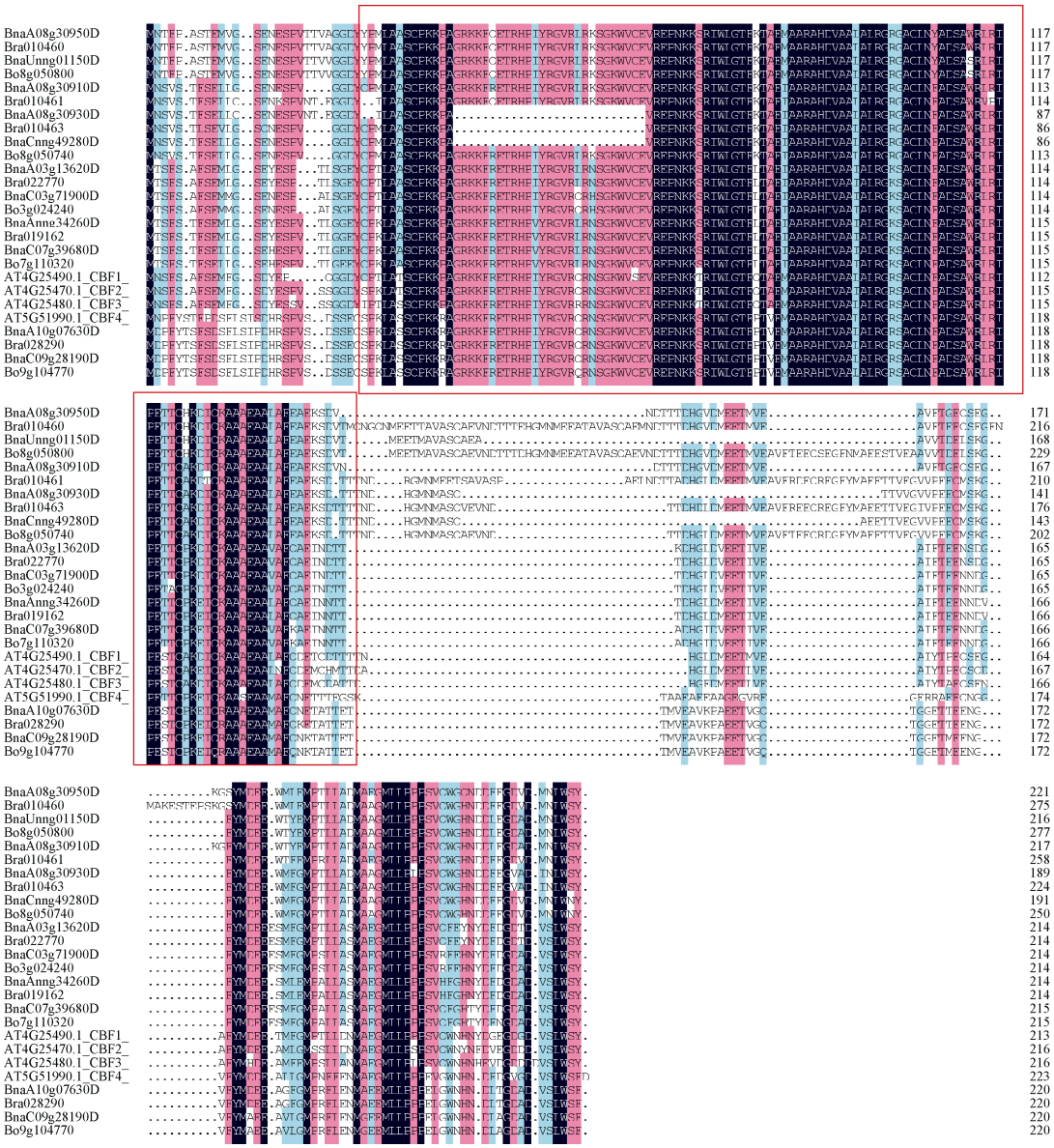


图 1　甘蓝型油菜、白菜、甘蓝和拟南芥 **CBF** 序列比对分析

Fig. 1　**Multiple alignment of CBF proteins of *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea*, and *Arabidopsis***

黑色: 26 条序列的共有碱基; 红色: 18~25 条序列的共有碱基; 蓝色: 9~17 条序列的共有碱基; 白色: 1~8 条序列的共有碱基。

Black: the same bases among 26 sequences; Red: the same bases among 18–25 sequences; Blue: the same bases among 9–17 sequences; White: the same bases among 1–8 sequences.

01150D、*BnaA08g30930D*不含有Motif5, 其余成员保守基序组成模式与拟南芥*CBF1/2/3*蛋白保守基序完全一致, 均为Motif6-Motif2-Motif1-Motif4-Motif5-Motif3。亚组II中, 所有成员保守基序组成模式完全一致, 均为Motif6-Motif2-Motif1-Motif4-Motif3; 植物中的CBF家族蛋白含有1个高度保守的AP2 domain, AP2 domain包括Motif2-Motif1-Motif4保守基序。与亚组I相比, 亚组II少了1个保守基序Motif5, 由此推测Motif5为亚组I的特征Motif。

2.5　染色体定位分析

ATCBF1/2/3 基因在Chr4染色体上串联, *AtCBF4* 在Chr5染色体上(图3); 6个BrCBF基因分别在A03、A08 和 A10 染色体上分布, 其中 *Bra010460*、*Bra010461* 和 *Bra010463* 在 A08 号染色体上串联(图3); 6 个 BoCBF 基因被定位在 C03、C07、C08、C09 染色体上, 其中 *Bo8g050800* 和 *Bo8g050740* 在 C08 染色体上串联(图 3); 根据 Region Comparison (http://plants.ensembl.org/)分析, 我们对每个 CBF 成

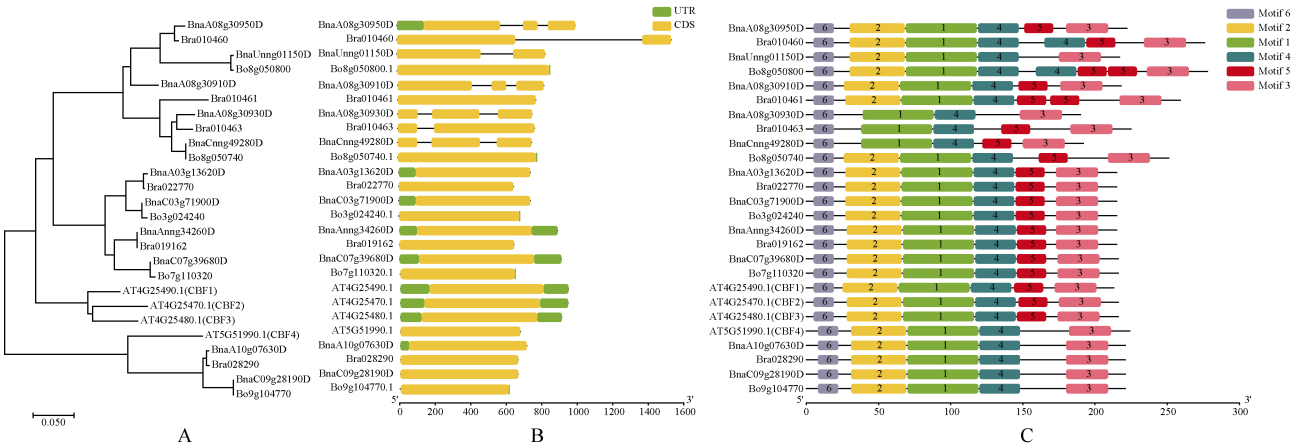


图 2 拟南芥、白菜、甘蓝、甘蓝型油菜 CBF 的系统比较分析

Fig. 2 Systematic comparative analysis of CBF of *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea*, and *Arabidopsis* chromosomes

A: 系统发育分析; B: 基因结构分析; C: 保守结构 MEME 分析。

A: Neighbor-Joining phylogenetic tree; B: gene structures; C: MEME motifs analysis.

员之间的共线性进行比较分析发现, *BnaA08g30950D* 和 *BnaA03g13620D* 与 *AtCBF1* 同源, *BnaUnng01150D* 、 *BnaA08g30910D* 、 *BnaCnng49280D*、*BnaC03g71900D*、*BnaAnng-34260D* 和 *BnaC07g39680D* 与 *AtCBF2* 同源, *BnaA08g30930D* 与 *AtCBF3* 同源, *BnaA10g07630D* 和 *BnaC09g28190D* 与 *AtCBF4* 同源,这些 *BnaCBFs* 基因被定位到 19 条染色体中的 9 条上(图 3), 其中 *BnaA08g30910D*、*BnaA08g30930D* 和 *BnaA08g30950D* 在染色体 A08 random 上串联重复。

2.6 甘蓝型油菜 BnaCBF 基因在不同组织中的表达模式分析

利用本课题组前期完成的中双11材料的转录组数据, 分析了甘蓝型油菜CBF基因家族在各组织器官中表达情况, 以及在不同非生物胁迫和激素处理下的表达情况。在正常情况下, 亚组I中9个BnaCBF成员可分为Ia类和Ib类, 其中Ia类5个CBF成员(*BnaA08g30950D* 、 *BnaUnng01150D* 、 *BnaA08g30910D*、*BnaA08g30930D*和*BnaCnng49280D*)在各个组织器官中表达量均较低或者不表达; Ib类4个成员(*BnaA03g13620D*、*BnaC03g71900D*、*BnaAnng34260D*和*BnaC07g39680D*)分别在茎、叶片和雌蕊中表达, 其中*BnaAnng34260D*在雌蕊中表达量较高; 亚组II中的2个*CBF4*成员(*BnaA10g07630D*和*BnaC09g28190D*)在根、叶片、花萼和雌蕊中均有表达, 并且在根部表达量明显高于其他组织器官(图4)。

2.7 甘蓝型油菜 BnaCBF 基因在不同非生物逆境和不同激素处理表达模式分析

所有BnaCBF在逆境处理下均存在不同程度的表达。在低温下, Ia类5个基因(*BnaA08g30950D*、*BnaUnng01150D*、*BnaA08g30910D*、*BnaA08g30930D*和*BnaCnng49280D*)对冷胁迫迅速响应表达, 并在3 h后表达量显著下降, 意味着这5个基因是早期冷诱导表达基因。Ib类4个基因(*BnaA03g13620D*、*BnaC03g71900D*、*BnaAnng34260D*和*BnaC07g39680D*)对冷胁迫响应迅速且持续时间长, 冷处理12 h仍有较高表达量; 而亚组II两个*CBF4*基因(*BnaA10g07630D*和*BnaC09g28190D*)在冷胁迫条件下表现为早期高表达, 而后降低, 6 h后恢复正常。*BnaA10g07630D*和*BnaC09g28190D*两个基因在根中表达量明显高于叶片, 并且参与盐胁迫和渗透胁迫响应, 而其他9个基因在根中表达变化不大(图5)。值得注意的是, Ib类4个CBF基因的表达表现出较明显的生物钟节律变化, 它们在11:00 (Leaf_3h)表达量较低, 14:00表达量较之前升高, 20:00表达量几乎为零, 表现出明显的昼夜节律; 亚组II中的2个*CBF4*基因(*BnaA10g07630D*和*BnaC09g28190D*)也呈现出明显的昼夜节律, 不同于Ib类CBF基因, 其在11:00和14:00几乎不表达, 但在20:00有较高的表达量。其他ABA、MeJA和ET等激素处理后表达量与对照无明显变化。

2.8 不同低温处理下甘蓝型油菜 BnaCBF 基因表达模式分析

为进一步分析这些CBF成员对不同低温的响应, 本研究利用本课题组前期完成的冷驯化和非冷驯化材料中不同低温处理的HX-17和HX-58材料的转录组数据, 对甘蓝型油菜BnaCBF基因家族的表达情

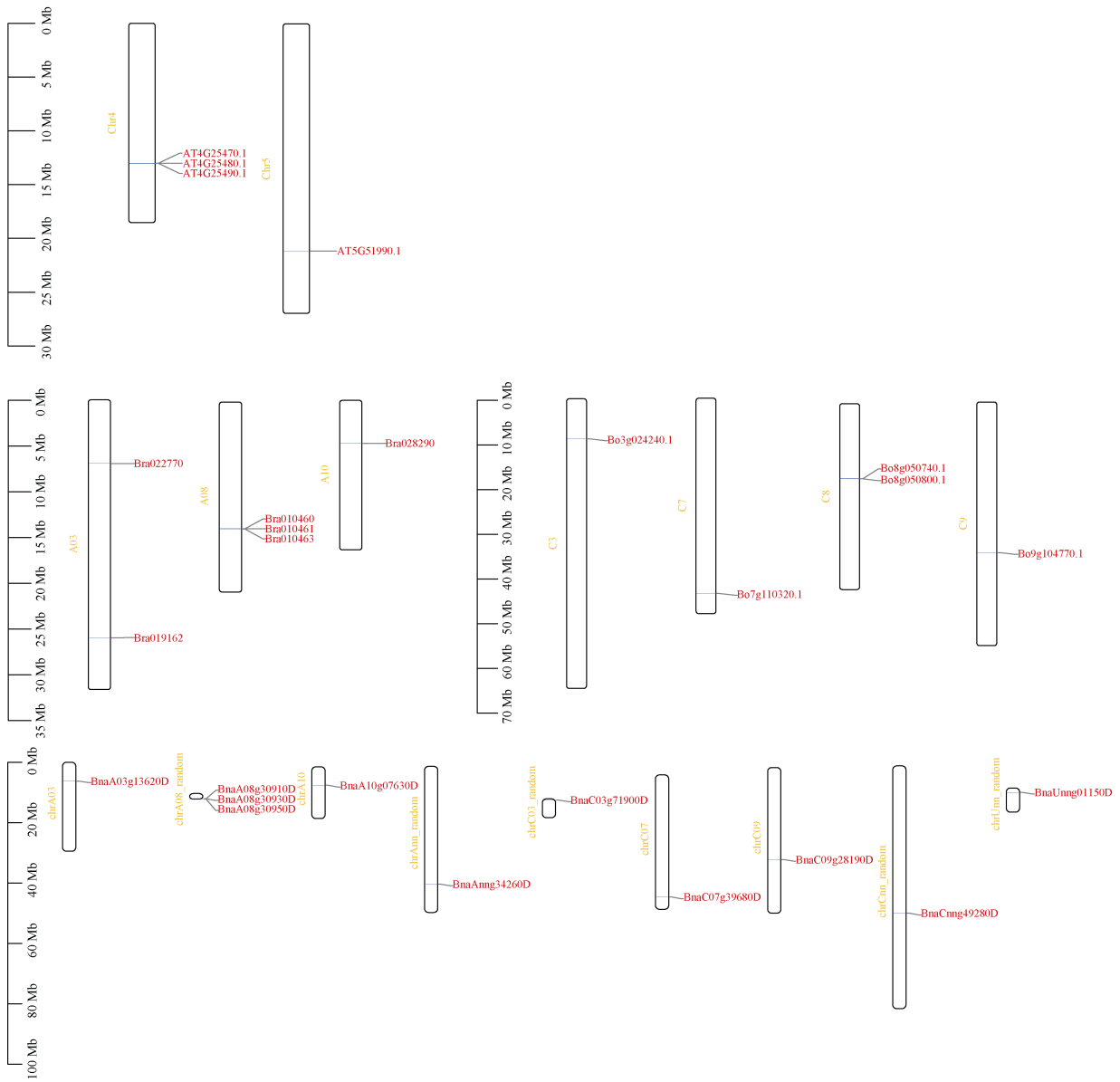


图 3　拟南芥、白菜、甘蓝、甘蓝型油菜染色体上 CBF 基因的分布

Fig. 3　Distribution of the CBF genes of *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica oleracea*, and *Arabidopsis* chromosomes

染色体编号标记在每个染色体的左侧。Chr 是拟南芥染色体; A 和 C 分别是白菜和甘蓝的染色体; chrA 和 chrC 分别是甘蓝型油菜的 A 亚组和 C 亚组染色体; Random 表示该基因不确定在此条染色体的具体位置, chrAnn 和 chrCnn 分别表示属于 A 亚基因组和 C 亚基因组但不确定染色体信息, chrUnn 表示不确定亚基因组及染色体信息。

The numbers of chromosomes are labeled on the left side of each chromosome. Chr is the chromosome of *Arabidopsis*; A and C are the chromosomes from *Brassica rapa*, *Brassica oleracea*; chrA and chrC are the chromosomes of the A-subgenomes and C-subgenomes from *Brassica napus*, respectively; Random means genes are randomly distributed to the specific chromosome, and chrAnn and chrCnn are unanchored scaffolds that cannot be mapped to a specific chromosome from the A-subgenomes and C-subgenomes, respectively, chrUnn is also an unanchored scaffold.

况进一步分析(图6)。亚组I中有3个CBF基因在冷胁迫下表达较弱甚至不表达，冻害胁迫下表达量升高; 其他6个成员在4℃冷害处理和–4℃冻害胁迫下均有不同程度响应，且–4℃冻害胁迫下表达量更高。亚组II 2个*CBF4*成员仅在冻害胁迫条件响应表达，意味着甘蓝型油菜中CBF基因家族对冻害响应更强烈。分析发现，冷驯化和非冷驯化的材料对低温胁迫和冻害胁迫的响应表达的影响无明显差异。

2.9　BnaCBF 基因相对表达量结果分析

为验证上图中的RNA-seq数据，本研究从油菜CBF基因家族亚组Ia、Ib和II中挑选4个具有代表性的基因进行qRT-PCR验证，分别是亚组Ia类基因

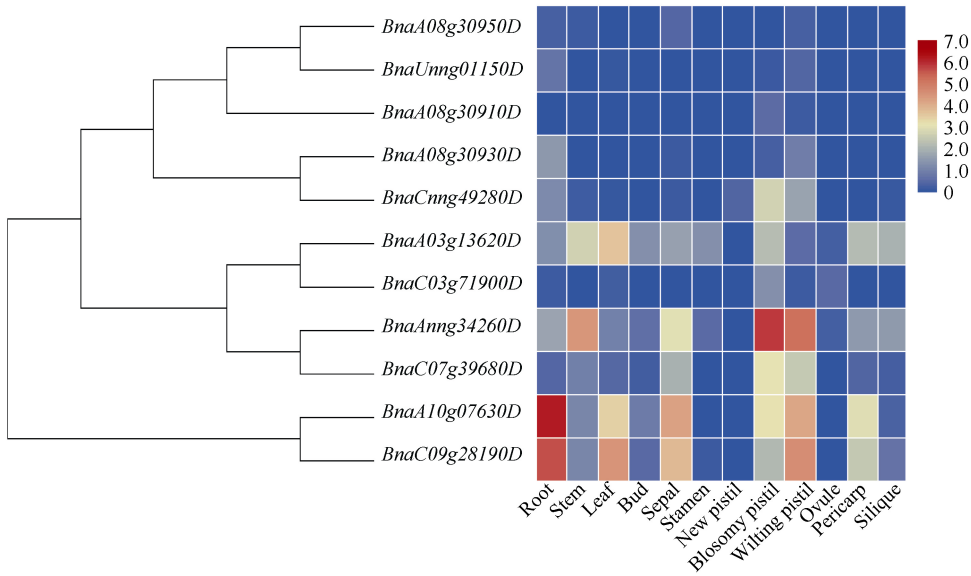


图 4 BnaCBF 基因在不同组织器官中的表达热图

Fig. 4 Heat map of relative expression level of BnaCBF genes in the different tissues and organs

每个样本中每个基因的表达水平(FPKM 值)由不同颜色的矩形表示。红色表示高表达; 蓝色表示低表达。

The expression levels of each gene (FPKM values) in each sample are indicated by different colored rectangles. Red block indicates relative higher expression level. Blue block indicates relative lower expression level.

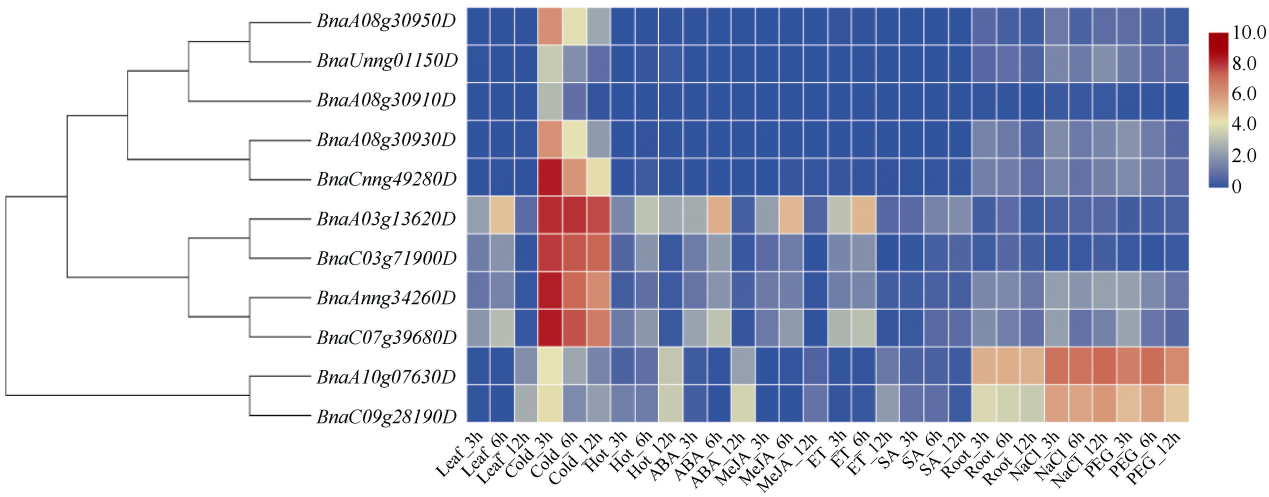


图 5 不同非生物胁迫和植物激素处理下 BnaCBF 基因的表达热图

Fig. 5 Heat map of the BnaCBF genes under different abiotic stresses and plant hormone treatments

每个样本中每个基因的表达水平(FPKM 值)由不同颜色的矩形表示。红色表示高表达; 蓝色表示低表达。Leaf_3h、Leaf_6h、Leaf_12h: 正常生长 3 h、6 h、12 h 的叶片; Cold_3h、Cold_6h、Cold_12h: 4℃处理 3 h、6 h、12 h 的叶片; Hot_3h、Hot_6h、Hot_12h: 40℃处理 3 h、6 h、12 h 的叶片; ABA_3h、ABA_6h、ABA_12h: 脱落酸处理 3 h、6 h、12 h 的叶片; MeJA_3h、MeJA_6h、MeJA_12h: 茉莉酸甲酯处理 3 h、6 h、12 h 的叶片; ET_3h、ET_6h、ET_12h: 乙烯处理 3 h、6 h、12 h 的叶片;SA_3h、SA_6h、SA_12h: 盐胁迫处理 3 h、6 h、12 h 的叶片; Root_3h、Root_6h、Root_12h: 正常生长 3 h、6 h、12 h 的根;NaCl_3h、NaCl_6h、NaCl_12h: 氯化钠处理 3 h、6 h、12 h 的根; PEG_3h、PEG_6h、PEG_12h: 聚乙二醇处理 3 h、6 h、12 h 的根。

The relative expression levels of each gene (FPKM values) in each sample are indicated by different colored rectangles. Red block indicates relative higher expression level, blue block indicates relative lower expression level. Leaf_3h, Leaf_6h, and Leaf_12h indicates normal growth leaf of 3, 6, and 12 hours, respectively; Hot_3h, Hot_6h, and Hot_12h indicates 40℃ treatment growth leaf of 3, 6, and 12 hours, respectively; ABA_3h, ABA_6h, and ABA_12h indicates abscisic acid treatment growth leaf of 3, 6, and 12 hours, respectively; MeJA_3h, MeJA_6h, and MeJA_12h indicates methy jasmonate treatment growth leaf of 3, 6, and 12 hours, respectively; ET_3h, ET_6h, and ET_12h indicates Ethylene treatment growth leaf of 3, 6, and 12 hours, respectively; SA_3h, SA_6h, and SA_12h indicates salt stress treatment growth leaf of 3, 6, and 12 hours, respectively; Root_3h, Root_6h, and Root_12h indicates normal growth root of 3, 6, and 12 hours, respectively; NaCl_3h, NaCl_6h, and NaCl_12h indicates sodium chloride treatment growth root of 3, 6, and 12 hours, respectively; PEG_3h, PEG_6h, and PEG_12h indicates drought stress treatment growth root of 3, 6, and 12 hours, respectively.

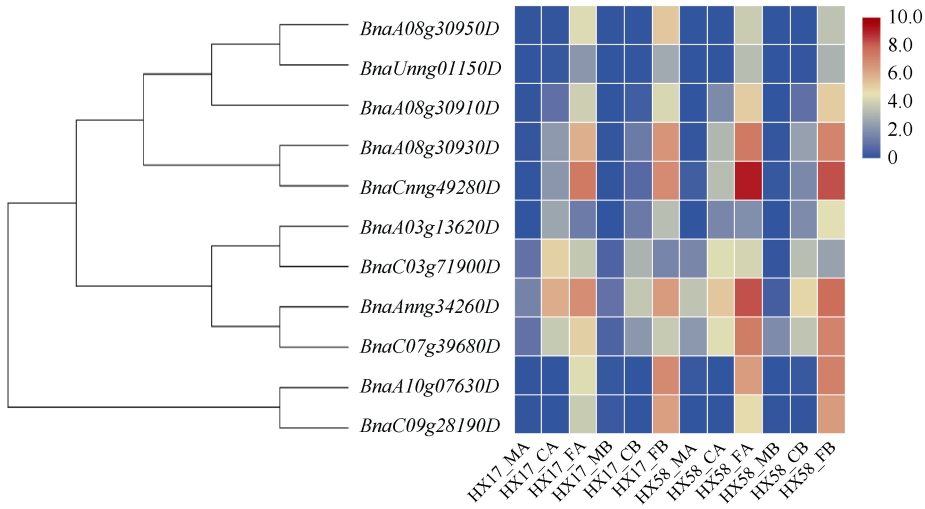


图 6　不同低温处理下 BnaCBF 基因表达热图的研究

Fig. 6　Heat map of the BnaCBF genes under different low-temperature treatments

HX17_MA: 正常生长条件下的 HX17 材料; HX17_CA: 驯化 14 d 后 4℃处理的 HX17 材料; HX17_FA: 驯化 14 d 后–4℃处理 HX17 材料。HX17_MB: 正常生长条件下 HX17 材料; HX17_CB: 4℃处理 HX17 材料; HX17_FB: –4℃处理 HX17 材料。HX58_MA: 正常生长条件下的 HX58 材料; HX58_CA: 驯化 14 天后 4℃处理的 HX58 材料; HX58_FA: 驯化 14 d 后–4℃处理 HX58 材料。HX58_MB: 正常生长条件下 HX58 材料; HX58_CB: 4℃处理 HX58 材料; HX58_FB: –4℃处理 HX58 材料。

HX17_MA: mock A, HX17 material under normal growth conditions; HX17_CA: cold A, HX17 material treated at 4℃ after 14 days of domestication; HX17_FA: freezing A, HX17 material treated at –4℃ after 14 days of domestication. HX17_MB: mock B, HX17 material under normal growth condition; HX17_CB: cold B, HX17 material treated at 4℃; HX17_FB: freezing B, HX17 material treated at –4℃. HX58_MA: Mock A, HX58 material under normal growth conditions; HX58_CA: cold A, HX58material treated at 4℃ after 14 days of domestication; HX58_FA: freezing A, HX58 material treated at –4℃ after 14 days of domestication. HX58_MB: mock B, HX58 material under normal growth condition; HX58_CB: cold B, HX58 material treated at 4℃; HX58_FB: freezing B, HX58 material treated at –4℃.

BnaCnng49280D, Ib 类基因 *BnaAnng34260D* 以及亚组 II 的 *BnaA10g07630D* 和 *BnaC09g28190D*。结果显示，表达情况与图 5 和图 6 中完全吻合，说明表达谱数据可靠(图 7 和图 8)。

3　讨论

甘蓝型油菜是我国最主要的栽培品种，在湖南、湖北、江西、浙江、云南等多地大面积种植[4]。南方地区推广的稻–稻–油轮作生产模式需要种植早熟、特早熟油菜品种，但早熟型油菜推广面临抗冻性差、产量受影响等问题[2]。CBF 基因家族在植物抗冻性研究中具有重要作用[28]，因此，系统的比较分析甘蓝型油菜 CBF 基因以及在油菜二倍体祖先中的进化关系，对解析 CBF 基因调控油菜低温及冻害胁迫反应的机制具有重要的意义。

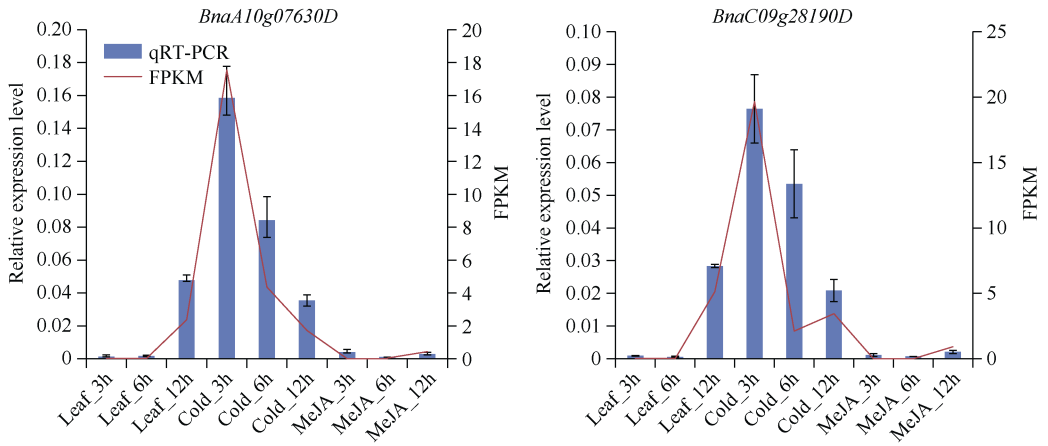


图 7　低温胁迫与茉莉酸甲酯处理下 *BnaA10g07630D* 和 *BnaC09g28190D* 基因表达模式的 qRT-PCR 分析

Fig. 7　Relative expression patterns of BnaCBF genes under cold and MeJA treatments

处理同图 5。Treatments are the same as those given in Fig. 5.

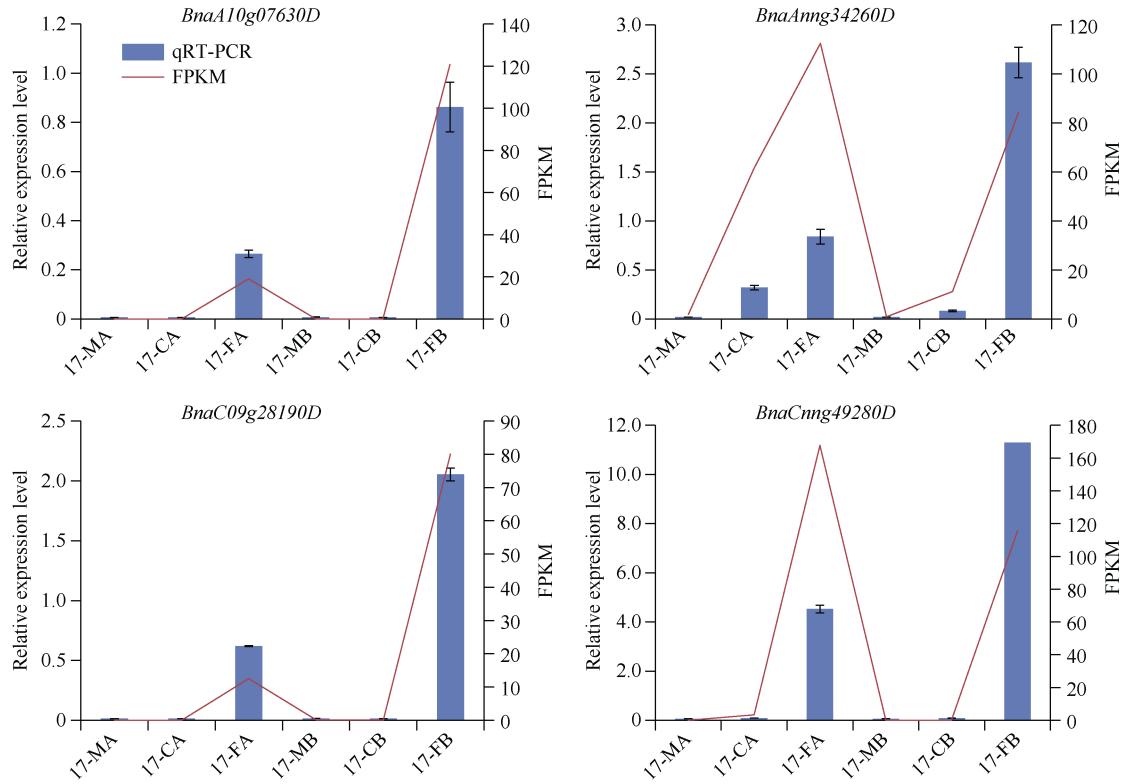


图 8 低温胁迫处理下 BnaCBF 基因表达模式的 qRT-PCR 分析

Fig. 8 Relative expression patterns of BnaCBF genes under cold stresses treatments

17_MA: 正常生长条件下的 HX17 材料; 17_CA: 驯化 14 d 后 4℃处理的 HX17 材料; 17_FA: 驯化 14 d 后–4℃处理 HX17 材料。17_MB: 正常生长条件下 HX17 材料; 17_CB: 4℃处理 HX17 材料; 17_FB: –4℃处理 HX17 材料。

17_MA: mock A, HX17 material under normal growth conditions; 17_CA: cold A, HX17 material treated at 4℃ after 14 days of domestication; 17_FA: freezing A, HX17 material treated at –4℃ after 14 days of domestication. 17_MB: mock B, HX17 material under normal growth condition; 17_CB: cold B, HX17 material treated at 4℃; 17_FB: freezing B, HX17 material treated at –4℃.

CBF/DREB1 依赖的冷信号通路在过去的 20 年中取得了长足的进展。从最早发现的一种对干旱、寒冷和高盐胁迫有响应的顺式作用元件 C-反应/脱水响应元件(CRT/DRE)开始[29], 研究者陆续从拟南芥、油菜、小麦(*Triticum aestivum*)、黑麦(*Secale cereale*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、水稻(*Oryza sativa*)及玉米(*Zea mays*)等植物中分离克隆出许多 CBF 的 ESTs 序列, 发现其都具有冷诱导特性[30-32], 过表达拟南芥及其他 CBF 基因均可以增强植物的抗冻性[12,19]。大量研究证实, 在植物中这些 CBF 是参与冷胁迫信号传导, 并在不同物种间具有保守性。

本研究发现, *AtCBF* 在甘蓝型油菜、白菜和甘蓝基因组都存在直系同源基因, 且这些 CBF 成员序列高度保守, 根据基因结构和 Motif 等结果分析, 推测 *BnaA08g30910D* 可能是 *BnaA08g30950D* 的拷贝复制。甘蓝型油菜 CBF 家族蛋白的结构域保守性较高, 所有成员都有且只有 1 个 AP2 domain, 在此结构域的上下游, 各有一段保守的氨基酸序列 PKKP/PKK PAGR (RAGRxxKFx ETRHP)和 DSAWR[33], 该保守序列在 CBF 发挥其转录因子功能中扮演着非常重要的角色。

基因中内含子和外显子的组成对于其进化分析研究具有非常重要的作用[34], 本研究对 *CBF* 基因家族各成员的基因结构分析推断含有内含子的 CBF 基因在进化过程中可能发生了变异。Motif 预测分析发现, 所有的 CBF 基因中 Motif1、Motif3、Motif4 和 Motif6 这 4 个 Motif 是 CBF 基因家族的特征性 Motif。保守基序分析发现, *BnaCnng49280D*、*BnaA08g30930D* 和 *Bra010463* 三个基因缺失的 27 个氨基酸序列位于 AP2 domain 上游, 结构域分析发现该缺失部分在 Motif2 区段, 由此推测可能会影响它们结合靶基因启动子中顺式元件 CRT/DRE 的能力, 从而影响它们激活下游靶基因(如 *COR*)的表达。染色体定位分析表明, 11 个甘蓝型油菜 CBF 基因在染色体上的分布是不均匀的, 这可能是由于在全基因组加倍过程中, 一些同源基因可能发生丢失或扩张。

CBF 参与多种逆境响应和植株生长发育等过程[35-36]。本研究发现, 甘蓝型油菜 CBF 基因的表达强烈受低温诱导, 且具有明显的组织特异性, 由此推断甘蓝型油菜 CBF 基因可能在功能上产生细化。A 亚基因组 *BnaA03g13620D*、*BnaAnng34260DCBF* 的表达量明显高于对应的 C 亚基因组 *BnaC03g71900D*、*BnaC07g39680D* 的表达量, 说明 A、C 亚基因组的基因对表达量存在明显偏移不对称。

Haake 等[11]研究表明, *CBF1/2/3* (*CBF1/DREB1b*、*CBF2/DREB1c*、*CBF3/DREB1a*)属于冷诱导 CBF 基因, 还有一个 CBF 基因(*CBF4*)不受冷诱导表达; 但过表达 *CBF4* 会增强植物的抗冻性和耐旱性的。本研究发现, 11 个 BnaCBF 中, 与 *AtCBF1/2/3* 同源的 9 个基因对冷胁迫迅速响应, 并且冻害胁迫比冷胁迫响应更为强烈; *AtCBF4* 同源的 2 个 *BnaCBF* 基因 *BnaA10g07630D* 和 *BnaC09g 28190D* 轻微冷胁迫响应, 但强烈响应冻害胁迫。由于前人主要以非典型的越冬植物如水稻、拟南芥、番茄等作为研究材料, 相关冻害研究开展的较少, 但由于甘蓝型油菜本身是越冬性作物, 生育期通常会经历一段较长的低温冻害时期, 因此 *BnaCBFs* 基因在低温时的诱导表达没有冻害胁迫下强烈。另外, 本研究中发现, 冷驯化的冻害和非冷驯化冻害下表达差异不大, 说明 *BnaCBFs* 基因驯化和非冷驯化条件下均起作用。

4　结论

本研究鉴定出甘蓝型油菜中 11 个 CBF 基因家族成员, 并将 BnaCBFs 分为亚组 I (*CBF1/2/3*)和亚组 II (*CBF4*) 2 个亚组。所有甘蓝型油菜 CBF 基因受低温诱导表达, 其中亚组 Ib 的 4 个基因 *BnaA03g13620D*、*BnaC03g71900D*、*BnaAnng34260D*、*BnaC07g39680D* 对冷胁迫响应迅速且持续时间长, 亚组 II 中 2 个基因 *BnaA10g07630D* 和 *BnaC09g28190D* 对冷胁迫响应表达较弱, 但它们在根中表达量明显高于叶片, 并且参与盐胁迫和渗透胁迫响应; BnaCBF 对冻害响应更强烈。本研究将为进一步了解甘蓝型油菜 CBF 家族基因的生物学功能、低温胁迫尤其是冻害胁迫研究及耐寒、抗冻品种培育奠定了基础。

References

[1] 陈明, 叶川, 吕伟生, 肖国滨, 应国勇, 王瑞平, 刘桅, 郑伟. 稻稻油三熟制下油菜早熟高产品种的筛选. 江苏农业科学, 2018, 46(17): 61–64.
Chen M, Ye C, Lyu W S, Xiao G B, Ying G Y, Wang D P, Liu Z, Zheng W. Screening of early-maturing and high-yielding rapeseed varieties under the three-cropping system of rice-rice-oil. *Jiangsu Agric Sci*, 2018, 46(17): 61–64 (in Chinese with English abstract).

[2] 张尧锋, 余华胜, 曾孝元, 林宝刚, 华水金, 张冬青, 傅鹰. 早熟甘蓝型油菜研究进展及其应用. 植物遗传资源学报, 2019, 20: 258–266.
Zhang Y F, Yu H S, Zeng X Y, Lin B G, Hua S J, Zhang D Q, Fu Y. Progress and application of early maturity in rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Plant Genet Resour*, 2019, 20: 258–266 (in Chinese with English abstract).

[3] 王必庆, 王国槐. 油菜早熟性研究进展. 作物研究, 2009, 23(5): 336–338.
Wang B Q, Wang G H. Research progress on early maturity of rape. *Crop Res*, 2009, 23: 336–338 (in Chinese with English abstract).

[4] 张学昆, 张春雷, 廖星, 王汉中. 2008 年长江流域油菜低温冻害调查分析. 中国油料作物学报, 2008, 30: 122–126.
Zhang X K, Zhang C L, Liao X, Wang H Z. Investigation on 2008' low temperature and freeze injure on winter rape along Yangtze River. *Chin J Oil Crop Sci*, 2008, 30: 122–126 (in Chinese with English abstract).

[5] 涂玉琴, 戴兴临. 花期低温阴雨对甘蓝型油菜产量和种子含油量的影响. 中国油料作物学报, 2011, 33: 470–475.
Tu Y Q, Dai X L. Effects of continuous low temperature overcast and rainy weather on yield and oil content of *Brassica napus* during flowering stage. *Chin J Oil Crop Sci*, 2011, 33: 470–475 (in Chinese with English abstract).

[6] Meshi T, Iwabuchi M. Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 1405–1420.

[7] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1035–1040.

[8] Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, Salazar M P, Houghton J M, Thomashow M F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis CBF* family of *AP2* transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J*, 1998, 16: 433–442.

[9] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 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*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391–1406.

[10] Ding Y L, Shi Y T, Yang S H. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytol*, 2019, 20: 1690–1704.

[11] Haake V, Cook D, Riechmann J L, Pineda O, Thomashow M F, Zhang J Z. Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 130: 639–648.

[12] Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, Schabenberger O, Thomashow M F, Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G.

Arabidopsis CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 1998. 280: 104–106.

[13] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 21002–21007.

[14] Park S, Lee C M, Doherty C J, Gilmour S J, Kim Y, Thomashow M F. Regulation of the *Arabidopsis CBF* regulon by a complex low temperature regulatory network. *Plant J*, 2015, 82: 193–207.

[15] Jia Y X, Ding Y L, Shi Y T, Zhang X Y, Gong Z Z, Yang S H. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of *CBFs* in cold acclimation and allow the definition of *CBF* regulons in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2016, 212: 345–353.

[16] Zhao C Z, Zhang Z J, Xie S J, Si T, Li Y Y, Zhu J K. Mutational evidence for the critical role of *CBF* transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2016, 171: 2744–2759.

[17] Yan L, Shah T, Cheng Y, Lyu Y, Zhang X K, Zou X L. Physiological and molecular responses to cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Integr Agric*, 2019, 18: 2742–2752.

[18] Karimi M, Ebadi A, Mousavi S A, Salami S A, Zarei A. Comparison of *CBF1*, *CBF2*, *CBF3* and *CBF4* expression in some grapevine cultivars and species under cold stress. *Sci Hortic*, 2015, 197: 521–526.

[19] An D, Ma Q X, Yan W, Zhou W Z, Liu G H, Zhang P. Divergent regulation of *CBF* regulon on cold tolerance and plant phenotype in cassava overexpressing *Arabidopsis CBF3* gene. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1866.

[20] 甄伟, 陈溪, 孙思洋, 胡鸢雷, 林忠平. 冷诱导基因的转录因子CBF1转化油菜和烟草及抗寒鉴定. 自然科学进展, 2002, 10: 1104–1109.
Zhen W, Chen X, Sun S Y, Hu Y L, Lin Z P. Transformation of cold-induced gene transcription factor CBF1 into rape and tobacco and identification of cold tolerance. *Prog Nat Sci*, 2002, 10: 1104–1109 (in Chinese with English abstract).

[21] Hsieh T, Lee J T, Charng Y Y, Chan M T. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol*, 2002, 130: 618–626.

[22] 金建凤, 高强, 陈勇, 王君晖. 转移拟南芥 *CBF1* 基因引起水稻植株脯氨酸含量提高. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1): 73–76.
Jin J F, Gao Q, Chen Y, Wang J H. Transfer of *Arabidopsis CBFl* gene leads to increased proline contents in rice plants, *Chin J Cell Biol*, 2005, 27(1): 73–76 (in Chinese with English abstract).

[23] Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M. Shinozaki K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 141–153.

[24] He X, Xie S, Xie P, Yao M, Liu W, Qin L W, Liu Z S, Zheng M, Liu H F, Guan M, Hua W. Genome-wide identification of stress-associated proteins (*SAP*) with *A20/AN1* zinc finger domains associated with abiotic stresses responses in *Brassica napus*. *Environ Exp Bot*, 2019, 165: 108–119.

[25] He X, Ni X C, Xie P, Liu W, Yao M, Kang Y, Qin L W, Hua W. Comparative transcriptome analyses revealed conserved and novel responses to cold and freezing stress in *Brassica napus* L. *G3: Genes Genom Genet*, 2019, 9: 2723–2737.

[26] Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33: 1870–1874.

[27] Smith T F, Waterman M S. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 1981, 147: 195–197.

[28] Savitch L V, Allard G, Seki M, Robert L S, Tinker N A, Huner N P, Shinozaki K, Singh J. The effect of overexpression of two *Brassica CBF/DREB1*-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 1525–1539.

[29] Shi Y, Ding Y, Yang S. Molecular regulation of *CBF* signaling in cold acclimation. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 623–637.

[30] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, Zhang X, Haake V, Zhang J Z, Deits T, Thomashow M F. 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*, 2001, 127: 910–917.

[31] Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 346–350.

[32] Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y Q, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 1042–1052.

[33] Canella D, Gilmour S J, Kuhn L A, Thomashow M F. DNA binding by the *Arabidopsis CBF1* transcription factor requires the PKKP/RAGRxKFxETRHP signature sequence. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799: 454–462.

[34] Medina J, Bargues M, Terol J, Perez-Alonso M, Salinas J. 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. *Plant Physiol*, 1999, 119: 463–470.

[35] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P, Everard J D, Thomashow M F. Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1854–1865.

[36] Zhang X, Fowler S, Cheng H M, Lou Y, Rhee S Y, Stockinger E J, Thomashow M F. Freezing-sensitive tomato has a functional *CBF* cold response pathway, but a *CBF* regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J*, 2004, 39: 905–919.