

过表达香樟 *CcCBFb* 的烟草非生物胁迫抗性增强

张佳佳, 朱逢玲, 焦晓琳, 李勇鹏, 王建格, 周 婵, 杜 丽*

(南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南南阳 473000)

摘 要: 为探究香樟 *CcCBFb* 基因增强植株非生物胁迫抗性的功能, 通过农杆菌介导法将该基因转入烟草中, 经 PCR 和半定量 RT-PCR 技术鉴定阳性转基因株系后, 对获得的 T1 代转基因无性系 (T2 和 T4 株系) 以及野生型 (WT) 进行干旱 (0、150、300 和 450 mmol · L⁻¹ 的甘露醇)、高盐 (0、100、200 和 300 mmol · L⁻¹ 的 NaCl)、4 °C 低温、-4 °C 冰冻胁迫处理, 结果显示: 转基因烟草在干旱和高盐胁迫下, 幼苗的存活率均高于野生型; 经 4 °C 低温处理后, 转基因烟草植株的脯氨酸和可溶性糖含量均显著高于野生型植株, 而丙二醛 (MDA) 含量均低于野生型植株; 经 -4 °C 的冰冻处理 6 h 后, 野生型和转基因 T4 株系植株叶片均出现不同程度的萎蔫, 而转基因 T2 株系植株未出现不良现象。由此可见, 过表达 *CcCBFb* 基因不但能够增强烟草的抗旱和抗盐性, 而且能够显著增强抗寒性。

关键词: 香樟; *CcCBFb*; 烟草; 非生物胁迫

中图分类号: S 68

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 07-1397-08

Overexpression of *CcCBFb* from *Cinnamomum camphora* Confers Multiple Stress Tolerance to Tobacco

ZHANG Jiajia, ZHU Fengling, JIAO Xiaolin, LI Yongpeng, WANG Jiange, ZHOU Chan, and DU Li*
(School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473000, China)

Abstract: In order to explore the function of *CcCBFb* gene from *Cinnamomum camphora*, the effect of over-expression of this gene on abiotic stress resistance improvement is assessed by using transgenic tobacco. With the identification of positive transgenic tobacco by PCR and semi-quantitative RT-PCR technique, T1 clonal transgenic tobacco (Line 2 and Line 4) and wild type (WT) would be treated under the drought, salinity, low temperature and freezing stress. The results showed that survival rate of transgenic tobacco (Line 2 and Line 4) seedling was better to wild tobacco under drought, salinity stress. The proline and soluble sugar content of transgenic tobacco plants (Line 2 and Line 4) was higher than wild tobacco but the content of MDA was lower than wild tobacco under low temperature (4 °C) treatment. WT and Line 4 had the different degree wilting but the Line 2 had a good growth status under the freezing treatment (-4 °C) with 6 h. So, the overexpression of *CcCBFb* from camphor tree conferred tobacco

收稿日期: 2017-03-07; 修回日期: 2017-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31100511); 南阳师范学院 STP 项目 (2016001)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: dldldlucky@163.com)

plants enhanced the tolerance to cold, drought and salinity stress.

Keywords: *Cinnamomum camphora*; *CcCBFb*; tobacco; abiotic stress

香樟 (*Cinnamomum camphora*) 是亚热带常绿阔叶大乔木的代表树种, 全株具有芳香气味。香樟在中国主要分布于长江以南及西南地区, 广泛应用于城市绿化, 近来也被引种栽植至黄河流域的一些省份, 用以丰富当地绿化树种。但北方漫长而寒冷的冬季往往导致香樟生长受损, 严重时死亡 (Du et al., 2015)。

CBF/DREB1 (CRT/DRE binding factor) 是一种可调控植物耐冷胁迫相关基因表达的转录因子, 它能感知上游传递的低温信号, 在低温诱导下迅速合成, 并与抗寒相关基因启动子上游相应的顺式作用元件 CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element) 结合, 促进下游抗逆基因的转录, 引导糖类、脯氨酸和膜稳定蛋白等物质的合成, 提高植物的耐寒性 (Dong et al., 2013; Gupta et al., 2014)。自从 Stockinger 等 (1997) 从拟南芥中分离获得 *AtCBF1* 以来, 研究者们在水稻 (Dubouzet et al., 2003)、甜瓜 (Mizuno et al., 2006)、棉花 (Gao et al., 2009)、玉米 (Wang et al., 2011) 和圆叶葡萄品种 (Wu et al., 2016) 等多种植物中克隆得到了 CBF 基因, 并对其功能进行了研究 (Akhtar et al., 2013)。在马铃薯 (Movahedi et al., 2012) 和矮牵牛 (Walworth et al., 2014) 中过表达拟南芥的 CBF 基因, 其抗寒性有较显著提高; 转棉花 *GbCBF1* 的烟草在低温胁迫下耐寒性也有明显提升 (郭惠明 等, 2011)。可见, CBF 基因广泛存在于多种植物中, 并且通过过表达 CBF 类似基因能够有效改良植物的抗寒性。

早期研究表明, DREB1/CBF 家族基因的表达主要受低温胁迫上调, 不受干旱和盐胁迫的影响; DREB2 家族基因的表达则主要被干旱和盐胁迫调控, 对低温胁迫无响应 (Liu et al., 1998)。据 Xiong 和 Fei (2006) 报道, 来自黑麦草的 *LpCBF3* 可以由低温诱导, 而不被干旱、高盐和 ABA 诱导。然而, 近年来随着越来越多的来自不同植物的 CBF 同源基因被相继鉴定, 其对非生物胁迫的响应模式趋于多样化。经研究发现, 来自羊草中的 *LcDREB3a* (Peng et al., 2011) 和来自山葡萄中的 *VaCBF1* (Dong et al., 2013) 不仅与低温胁迫相关, 同时也与干旱、高盐和 ABA 胁迫相关; 来自盐地碱蓬 (Sun et al., 2014a) 中的 *SsDREa* 和 *SsDREb* 对高盐和干旱胁迫极为敏感, 但并不受低温和 ABA 胁迫的影响。上述研究结果表明, 在不同的植物中, CBF 转录因子的作用途径并不完全一致, 需待深入研究才能判定其功能。

本实验室从香樟中分离获得 *CcCBFa* 和 *CcCBFb* (NCBI 登录号: KJ958932 和 KJ958933), 对其中 *CcCBFb* 进行生物信息学分析, 确定其具有 DREB1/CBF 类转录因子的特征序列, 其表达结果呈现出对低温胁迫响应迅速的表达特点 (李勇鹏 等, 2016)。但是该基因能否增强植物对非生物胁迫的抗性, 特别是对低温胁迫的抗性, 尚不清楚。

本研究中在烟草中过表达香樟 *CcCBFb* 基因, 通过对转基因烟草植株抗逆生理、生化的研究, 分析该基因对增强烟草抗逆性的影响, 探究该基因在增强植物抗逆方面的作用, 为香樟的抗寒育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用南阳师范学院生命科学与技术学院植物组织培养室中保存的烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)

无菌苗作为转化受体材料。大肠杆菌 TOP10 为本实验室保存, 农杆菌 EHA105、植物表达载体 pCAMBIA 2300 及烟草材料为华中农业大学园艺林学学院刘国锋教授惠赠。

1.2 植物表达载体的构建及烟草的遗传转化

设计目的基因引物 *CcCBFb*-F 和 *CcCBFb*-R (表 1), 利用反转录 PCR (RT-PCR) 对 *CcCBFb* 的编码区进行扩增, 所得产物与 pMD19-T 载体连接, 测序验证目的基因序列的正确性。用 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶分别对 *CcCBFb*-pMD19-T 与 pCAMBIA 2300 载体进行双酶切, 然后进行连接、转化、提质粒, 最终电泳检测并测序验证成功后, 转化农杆菌 EHA105。利用叶盘法将含有重组质粒 p2300-*CcCBFb* 的农杆菌进行烟草的遗传转化 (Horsch et al., 1985)。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>CcCBFb</i> -F	ATG GAT AGC ATC AGC AAC
<i>CcCBFb</i> -R	CTA ATA GCC AAT TGG ATT GG
35S-F	GAC GCA CAA TCC CAC TAT CC
<i>NtActin</i> -F	CGT TTG GA TCT TGC TGG TCG T
<i>NtActin</i> -R	CTG CAA TGC CAG GAA ACA TTG

1.3 转基因烟草 PCR 鉴定及半定量 RT-PCR 分析

将侵染获得的转基因烟草幼苗移至含有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素 (Kan) 和 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素 (Cef) 的 MS 培养基 (Murashige & Skoog, 1962) 中进行初步的阳性筛选。选择生长健壮并正常生根的烟草植株 (T0 代烟草) 移栽至土壤中, 待长出新的叶片进行基因组 DNA 的提取, 并以此为模板利用引物 35S 和 *CcCBFb*-R (表 1) 进行 PCR 反应以鉴定阳性转基因植株, 将不同来源的 T0 代阳性转基因烟草命名为不同的无性系。

利用 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京艾德莱公司) 提取野生型 (WT) 和不同转基因无性系烟草叶片总 RNA, 并用无 RNA 酶的 DNase I 酶 (Thermo 公司) 去除样品中可能污染的基因组 DNA (gDNA)。

利用琼脂凝胶电泳和 Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) 检测 RNA 样品的浓度和质量, 根据 TaKaRa 公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明反转录获得 cDNA, 作为模板用于 RT-PCR 分析, 内参基因为 *NtActin*。反应程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 共 35 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 总延伸 10 min。筛选出 *CcCBFb* 正常表达的转基因烟草无性系, 其种子 (T1 代烟草) 用于后期的抗逆生理测定。

1.4 转基因烟草幼苗的抗旱和抗盐性分析

将收获的 T0 代烟草的种子 (T1 代烟草) 用 75% 的乙醇浸泡 30 s, 然后用 15% 的次氯酸钠 (活性氯 $\geq 10\%$) 浸泡 15 min, 最后用无菌水冲洗 5~7 遍。转基因烟草的种子置于含有 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 的 MS 培养基进行萌发培养, 野生型 (WT) 种子在不添加 Kan 的 MS 培养基中培养。一周后确定有无污染。

4 周后, 分别选择正常生长的不同无性系来源的 T1 代转基因烟草和野生型烟草幼苗用于一系列胁迫分析。将直径 7 cm 的定性滤纸置于培养皿中, 加入 1.2 mL 胁迫处理溶液或者蒸馏水, 然后将烟草幼苗放在滤纸上处理 1~2 周。利用甘露醇 (Mannitol) 溶液模拟干旱环境, 浓度分别为 0、150、300 和 $450 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 利用 NaCl 溶液模拟盐胁迫, 浓度分别为 0、100、200 和 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对照均为蒸馏水处理 (Kudo et al., 2014)。每个梯度处理设置 3 次重复, 每次重复 18 株幼苗。处理两

周后拍照，并对存活率进行统计。凡是含有绿色叶片的幼苗视为存活，存活率(%) = (存活的幼苗数/处理数) × 100。

1.5 转基因烟草植株抗寒生理指标的测定

将4个月大的转基因及野生型烟草幼苗进行0、6、12、24和48 h的4℃低温处理，在同一时间取叶片用于脯氨酸、可溶性糖和丙二醛(MDA)含量的测定。每个处理重复3次，取其平均值。

采用酸性水合茚三酮测定法(Bates et al., 1973; Yang et al., 2011)测定脯氨酸含量，根据蒽酮比色法(Brink et al., 1960; Sinay & Karuwal, 2014)测可溶性糖含量；采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法(Heath & Packer, 1968; Gupta et al., 2014; Guo et al., 2015)测定丙二醛(MDA)含量。

将2个月大的转基因及野生型烟草置于黑暗的-4℃中冰冻处理6 h，对照为室温25℃下黑暗生长6 h的烟草，观察生长状况并拍照。

2 结果与分析

2.1 转基因烟草植株的鉴定

将从含有Kan的培养基上移栽至土壤中的待检测转基因烟草进行基因组DNA的提取，并以此为模板进行PCR检测，观察到16株转基因烟草成功扩增出目的条带(数据未列出)，分别命名为T1~T16。

通过反转录PCR(RT-PCR)检测*CcCBFb*在转基因烟草中的表达量，内参基因为*NtActin*，对照为野生型烟草。0.1%琼脂糖凝胶电泳结果(图1)显示：野生型(WT)中未见特异条带，只有*NtActin*内参基因条带；而转基因烟草无性系中只有T1、T2、T4、T6和T8系烟草扩增得到了*CcCBFb*特异条带和*NtActin*内参基因条带。依据条带亮度，选择表达量有差异的T2和T4烟草种子用于后期抗逆生理测定。

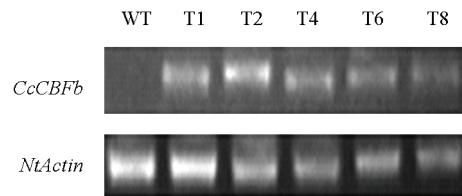


图1 野生型(WT)和转基因烟草(T1、T2、T4、T6、T8)中*CcCBFb*的半定量分析

Fig. 1 Semi-quantitative RT-PCR of analysis *CcCBFb* expression in WT and transgenic tobacco plants

2.2 过表达*CcCBFb*对抗旱和抗盐性的影响

在干旱胁迫中观察到，转基因烟草幼苗在不同浓度的甘露醇中存活率均为100%，野生型烟草则随着甘露醇浓度的增加而急剧降低，在350 mmol·L⁻¹甘露醇中存活率为65.0%，在450 mmol·L⁻¹甘露醇中仅为5.6%(图2)。

在盐胁迫下，转基因烟草的生长状态均较野生型健壮，存活率也显著高于野生型(图3)。当NaCl为0和100 mmol·L⁻¹时，转基因及野生型烟草存活率均为100%，NaCl为200和300 mmol·L⁻¹时，转基因烟草的存活率(96.3%~83.3%)均高于野生型(68.5%~24.1%)。

以上结果均显示转基因烟草的抗逆性较野生型好，转化香樟*CcCBFb*对增强烟草的抗盐和抗旱力具有一定的作用。

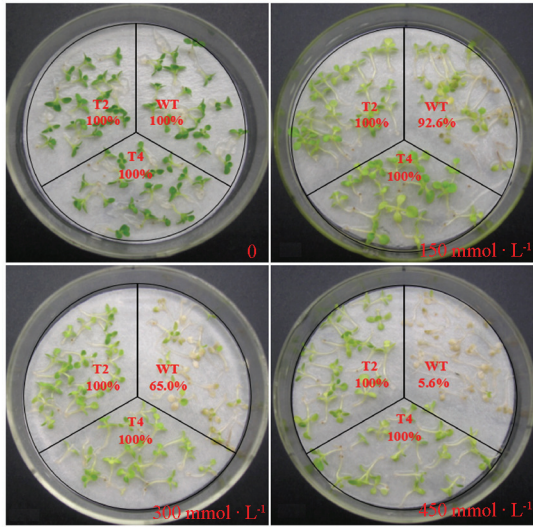


图2 野生型 (WT) 与转基因株系 (T2、T4) 幼苗在不同浓度甘露醇胁迫下 22 °C 生长 10 d 的情况
 Fig. 2 WT and transgenic lines (T2, T4) tobacco seedlings were transferred to various concentrations of mannitol and cultured for 10 days

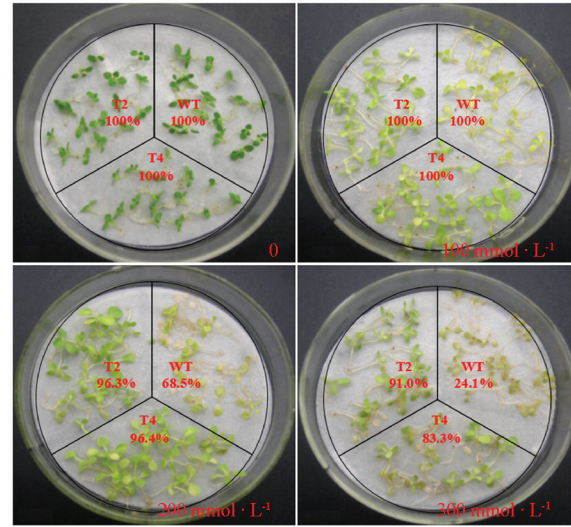


图3 野生型 (WT) 与转基因株系 (T2、T4 系) 幼苗在不同浓度 NaCl 胁迫下 22 °C 生长 7 d 的情况
 Fig. 3 WT and transgenic lines (T2, T4) tobacco seedlings were transferred to various concentrations of NaCl and cultured for 7 days

2.3 低温胁迫下转基因烟草植株的抗寒生理指标分析

如图 4 所示, 在 -4 °C 的冰冻胁迫中处理 6 h 后, 转基因 T4 株系和野生型烟草的叶片均呈现出不同程度的萎焉, 而转基因 T2 株系烟草的生长状态较好 (图 4)。



图4 转基因烟草株系 (T2 和 T4) 和野生型 (WT) 在 25 °C 和 -4 °C 下黑暗处理 6 h 的生长状态
 Fig. 4 Phenotype of transgenic lines (T2 and T4) and control (WT) seedlings were subjected to 25 °C and -4 °C for 6 h in dark

将野生型和转基因株系在 4 °C 低温下胁迫处理, 如图所示转基因烟草叶片中脯氨酸的含量均高于野生型 (图 5)。野生型在低温刺激 6 h 时, 脯氨酸含量虽有上升趋势, 但随着低温处理的持续, 脯氨酸含量开始下降; 转基因 T4 株系在低温胁迫 6 h 时, 脯氨酸含量虽有下降趋势, 但随着低温处理的持续, 脯氨酸含量又有明显的上升现象, 尤其在处理 24 h 时, 脯氨酸含量出现峰值。

可溶性糖含量的变化呈下降趋势(图5),然转基因 T2 株系均比野生型高。转基因 T4 株系在低温胁迫 12 h 时显著高于转基因 T2 株系和野生型,其他处理时间与野生型不显著。

丙二醛的含量在低温胁迫 48 h 后,转基因和野生型烟草均有明显的升高,但转基因 T2 和 T4 株系都比野生型低(图5)。

以上试验结果均表示过表达香樟 *CcCBFb* 基因的转基因烟草的抗寒性较野生型烟草有较显著的增强。

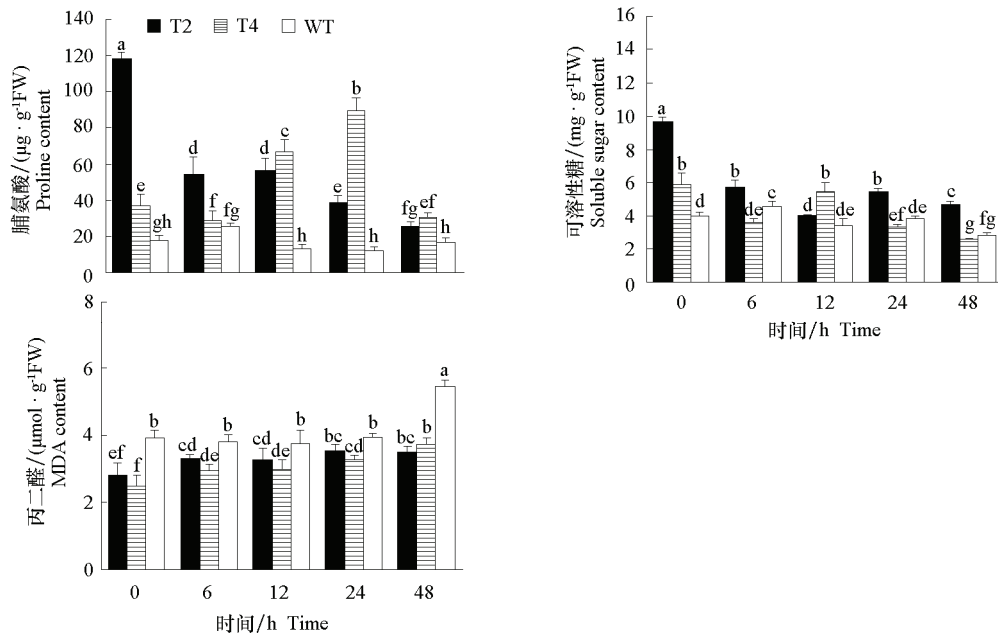


图5 低温胁迫下(4 °C)转基因烟草(T2和T4)和野生型(WT)中脯氨酸、可溶性糖及丙二醛的含量
不同字母代表显著性差异水平不同(P<0.05)。

Fig. 5 Estimation of proline, soluble sugar and MDA content in transgenic and WT tobacco plants under low temperature stress (4 °C)
The mean values significantly different at P<0.05 within treatment are indicated by different alphabets.

3 讨论

CBF/DREB1 转录因子能够在转录水平上调控多个抗逆基因,且具有保守的结构域,是提高植物非生物逆境耐受力的关键调节因子(Sun et al., 2014b; Peng et al., 2015)。有研究表明,过表达来自柠条锦鸡儿(Wang et al., 2010)、羊草(Peng et al., 2011)、山葡萄(Dong et al., 2013)和麻风树(Wang et al., 2015)等植物中的CBF基因对不同非生物胁迫的耐逆性均有提高,可见,从香樟中克隆并中筛选出对低温胁迫响应迅速的CBF基因进而加以利用,通过分子育种改良植物的抗寒性是可行的。

然而也有研究报道,过表达拟南芥的CBF基因虽可增强其抗寒力和抗旱力,但会致使转基因植株呈现发育不良现象,延迟开花并降低种子产量(Liu et al., 1998; Jaglo & Thomashow, 2001)。来自荠菜的*CbCBF*在烟草中的表达也具有类似现象(Zhou et al., 2014)。在本研究中,过表达*CcCBFb*基因,在对T0代转基因烟草观测时,未发现生长畸形或开花延迟等不良现象,而且显著增强了T1代转基因烟草的多种抗逆能力。可见香樟*CcCBFb*基因在植物转基因抗性改良中具有潜在的应用价

值, 同时也为香樟的抗寒分子育种奠定了研究基础。

当植物受低温胁迫时, 常通过有机渗透物质的积累来对细胞进行保护, 如脯氨酸和可溶性糖均是细胞平衡渗透压的有效调节剂 (Koster & Lynch, 1992; Wanner & Juntila, 1999; Yang et al., 2011; Zhou et al., 2012)。丙二醛 (MDA) 作为膜脂过氧化的重要产物之一, 是衡量膜损伤程度的一个重要指标, 同时也可作为评价植株抗逆性的标准 (Mohammadi et al., 2013)。植株显示出较低的 MDA 含量, 表明膜脂分解少, 具有较强的抗性 (Gupta et al., 2014)。本研究中转基因烟草在低温胁迫期间脯氨酸和可溶性糖含量均高于野生型, 这说明其可能通过增加细胞中的保护物质来抵抗寒冷。另外转基因烟草中 MDA 的含量均低于野生型, 表明其细胞膜的受损程度降低, 其抗寒性相应提高。

在本研究中观察到不同转基因无性系烟草抵御低温胁迫的能力不同, 这显然与 *CcCBFb* 在植株中表达量不同有关。

References

- Akhtar M, Jaiswal A, Jaiswal J P, Qureshi M I, Tufchi M, Singh N K. 2013. Cloning and characterization of cold, salt and drought inducible C-repeat binding factor gene from a highly cold adapted ecotype of *Lepidium latifolium* L. *Physiol Mol Biol Plants*, 19 (2): 221 - 230.
- Bates L S, Waldren R P, Teare I D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205 - 208.
- Brink R H J, Dubach P, Lynch D L. 1960. Measurement of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Science*, 67 (89): 157 - 166.
- Dong C, Zhang Z, Qin Y, Ren J P, Huang J F, Wang B L, Lu H L, Cai B H, Tao J M. 2013. VaCBF1 from *Vitis amurensis* associated with cold acclimation and cold tolerance. *Acta Physiol Plant*, 35: 2975 - 2984.
- Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet E G, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 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: 751 - 763.
- Du L, Li Y P, Yao Y, Zhang L W. 2015. An efficient protocol for plantlet regeneration via direct organogenesis by using nodal segments from embryo-cultured seedlings of *Cinnamomum camphora* L. *PLoS ONE*, 10 (5): e0127215. doi: 10.1371/journal.pone.0127215.
- Gao S Q, Chen M, Xia L Q, Xiu H J, Xu Z S, Li L C, Zhao C P, Cheng X G, Ma Y Z. 2009. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, *GhDREB*, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. *Plant Cell Reports*, 28 (2): 301 - 311.
- Guo Hui-ming, Li Zhao-chun, Zhang Han, Xin Yue-zhi, Cheng Hong-mei. 2011. Cloning of cotton CBF gene and its cold tolerance expression in transgenic tobacco. *The Crops Journal*, 37 (2): 286 - 293. (in Chinese)
- 郭惠明, 李召春, 张 晗, 信月芝, 程红梅. 2011. 棉花 CBF 基因的克隆及其转基因烟草的抗寒性分析. *作物学报*, 37 (2): 286 - 293.
- Guo R G, Zhao J, Wang X H, Guo C L, Li Z, Wang Y J, Wang X P. 2015. Constitutive expression of a grape aspartic protease gene in transgenic *Arabidopsis* confers osmotic stress tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 121: 275 - 287.
- Gupta K, Jha B, Agarwal P K. 2014. A dehydration-responsive element binding (DREB) transcription factor from the succulent halophyte *Salicornia brachiata* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Mar Biotechnol*, 16: 657 - 673.
- Heath R L, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125: 189 - 198.
- Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, Eichholtz D, Rogers S G, Farley R T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229 - 1231.
- Jaglo K R, Thomashow M F. 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 Physiology*, 127 (3): 910 - 907.
- Koster K K, Lynch D V. 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of *pumarye*. *Plant Physiol*, 98: 108 - 113.
- Kudo K, Oi T, Uno Y. 2014. Functional characterization and expression profiling of a *DREB2*-type gene from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 116: 97 - 109.
- Li Yong-peng, Zhang Li-wei, Zhang Jia-jia, Chen Hui-ru, Cao Yue-hua, Du Li. 2016. Cloning and expression profiling of *CcCBF* genes in

- Cinnamomum camphora*. Journal of Northeast for Forestry University, 44 (8): 35 - 40. (in Chinese)
- 李勇鹏, 张力维, 张佳佳, 陈慧茹, 曹玥华, 杜 丽. 2016. 香樟 *CcCBFB* 基因的克隆及表达模式. 东北林业大学学报, 44 (8): 35 - 40.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1998. 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*, 10: 1391 - 1406.
- Mizuno S, Hirasawaa Y, Sonodaa M, Nakagawab H, Sato T. 2006. Isolation and characterization of three DREB/ERF-type transcription factors from melon (*Cucumis melo*). *Plant Science*, 170 (6): 1156 - 1163.
- Mohammadi R, Maali-Amiri R, Abbasi A. 2013. Effect of TiO₂ nanoparticles on chickpea response to cold stress. *Biol Trace Elem Res*, 152: 403 - 410.
- Movahedi S, Sayedatababaei B E, Alizade H, Ghobadi C, Yamchi A, Khaksar G. 2012. Constitutive expression of *Arabidopsis DREB1B* in transgenic potato enhances drought and freezing tolerance. *Biologia Plantarum*, 56 (1): 37 - 42.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473 - 497.
- Peng X J, Ma X Y, Fan W H, Su M, Cheng L Q, Alam I, Lee B H, Qi D M, Shen S H, Liu G S. 2011. Improved drought and salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a novel DREB gene from *Leymus chinensis*. *Plant Cell Reports*, 30: 1493 - 1502.
- Peng Y L, Wang Y S, Cheng H, Wang L Y. 2015. Characterization and expression analysis of a gene encoding *CBF/DREB1* transcription factor from mangrove *Aegiceras corniculatum*. *Ecotoxicology*, 24 (7): 1 - 11.
- Sinay H, Karuwal R L. 2014. Proline and total soluble sugar content at the vegetative phase of six corn cultivars from Kisar Island Maluku, growth under drought stress conditions. *International Journal of Advance Agricultural Research*, 2: 77 - 82.
- Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. 1997. *Arabidopsis 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. *PNAS*, 94: 1035 - 1040.
- Sun J W, Peng X J, Fan W H, Tang M J, Liu J, Shen S H. 2014b. Functional analysis of *BpDREB2* gene involved in salt and drought response from a woody plant *Broussonetia papyrifera*. *Gene*, 535: 140 - 149.
- Sun X B, Ma H X, Jia X P, Chen Y, Ye X Q. 2014a. Molecular cloning and characterization of two novel *DREB* genes encoding dehydration-responsive element binding proteins in halophyte *Suaeda salsa*. *Genes & Genomics*, 37 (2): 199 - 212.
- Walworth A E, Song G Q, Warner R M. 2014. Ectopic *AtCBF3* expression improves freezing tolerance and promotes compact growth habit in petunia. *Mol Breeding*, 33: 731 - 741.
- Wang C T, Yang Q, Wang C T. 2011. Isolation and functional characterization of *ZmDBP2* encoding a dehydration-responsive element-binding protein in *Zea mays*. *Plant Mol Biol Rep*, 29: 60 - 68.
- Wang L H, Gao J H, Qin X B, Shi X D, Luo L, Zhang G Z, Yu H W, Li C Y, Hu M C, Liu Q F, Xu Y, Chen F. 2015. *JcCBF2* gene from *Jatropha curcas* improves freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* during the early stage of stress. *Molecular Biology Reports*, 42 (5): 937 - 945.
- Wang X M, Dong J, Liu Y, Gao H W. 2010. A novel dehydration-responsive element-binding protein from *Caragana korshinskii* involved in the response to multiple abiotic stresses and enhances stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol Rep*, 28: 664 - 675.
- Wanner L A, Junttila O. 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 120: 391 - 399.
- Wu J, Folta K M, Xie Y F, Jiang W M, Lu J, Zhang Y L. 2016. Overexpression of *Muscadinia rotundifolia CBF2* gene enhances biotic and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Protoplasma*, DOI: 10.1007/s00709-015-0939-6.
- Xiong Y W, Fei S Z. 2006. Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Planta*, 224: 878 - 888.
- Yang S, Tang X F, Ma N N, Wang L Y, Meng Q W. 2011. Heterology expression of the sweet pepper *CBF3* gene confers elevated tolerance to chilling stress in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 168 (15): 1804 - 1812.
- Zhou M Q, Wu L H, Liang J, Shen C, Lin J. 2012. Cold-induced modulation of *CbICE53* gene activates endogenous genes to enhance acclimation in transgenic tobacco. *Mol Breeding*, 30: 1611 - 1620.
- Zhou M Q, Xu M, Wu L H, Shen C, Ma H, Lin J. 2014. *CbCBF* from *Capsella bursa-pastoris* enhances cold tolerance and restrains growth in *Nicotiana tabacum* by antagonizing with gibberellin and affecting cell cycle signaling. *Plant Mol Biol*, 85: 259 - 275.