

文章编号:1001-1498(2013)04-0414-06

蓝花楹 *JaCBF1* 转录因子片段的序列分析及耐寒性功能验证

周 静^{1,2}, 张 炜³, 李大明³, 张锡九³, 陈其兵^{1*}

(1. 四川农业大学风景园林学院, 四川 成都 611130; 2. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610066;
3. 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081)

摘要: CBF类转录因子是调控植物冷害应答反应的关键因子。从蓝花楹中克隆到一个457 bp CBF类基因片段, 序列分析表明其编码142氨基酸的片段, 并与多个物种CBF1基因序列高度同源, 且具有CBF家族的AP2核心结构域, 因此将其命名为*JaCBF1*。原核表达的结果显示此基因片段编码16 kDa的蛋白, 表达分析结果显示*JaCBF1*于低温条件下在蓝花楹根、茎、叶中有差异性转录。Southern杂交结果揭示*JaCBF1*在蓝花楹基因组中存在至少2个拷贝。通过脓杆菌介导方法将*JaCBF1*异源转录到拟南芥中, 荧光共聚焦显微照相结果显示其编码的蛋白质定位于细胞核, 冷处理实验发现转基因拟南芥植株的耐冷性得到了显著提高, 表明此新片段具有CBF类植物耐冷因子的典型功能。

关键词: 蓝花楹; CBF; 转录因子; 诱导型表达; 耐寒性功能

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Sequence Analysis and Chilling Resistance about a New CBF-like Transcription Factor Fragment from *Jacaranda acutifolia*

ZHOU Jing^{1,2}, ZHANG Wei³, LI Da-ming³, ZHANG Xi-jiu³, CHEN Qi-bing¹

(1. College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China; 2. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, Sichuan, China; 3. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, Sichuan, China)

Abstract: CBFs (CRT/DRE-binding factor) are key transcription factors regulating the chilling response in plants. A 457 bp CBF-like fragment was cloned from *Jacaranda acutifolia*. Sequence analysis showed that the fragment (named as *JaCBF1*) encoded a protein of 142 amino acids, and was highly homologous to many known CBF1-like transcription factors with the AP2 core domain that belongs to CBF gene family. The recombinant plasmid containing *JaCBF1* sequence was introduced into *Escherichia coli*. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis showed that *JaCBF1* was translated into a 16 KDa protein. Expression pattern analysis indicated that *JaCBF1* could be induced with different patterns and degrees by low temperature in roots, stems, and leaves of *J. acutifolia*. Southern blot revealed that the *J. acutifolia* genome contained at least two copies of *JaCBF1*. Ectopic transcription in *Arabidopsis thaliana* revealed that *JaCBF1* functioned in the nuclei, and its expression could significantly improve the freezing resistance of transgenic *A. thaliana*. The results of study suggest that the novel *JaCBF1* is a typical CBF-like transcription factor, and plays an important role responding to cold stress in *J. acutifolia*.

Key words: *Jacaranda acutifolia*; CBF; transcription factor; induced expression; chilling resistance

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 四川省国际合作与交流项目(2012HH0039)

作者简介: 周 静, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学研究. Email: 17265117@qq.com.

* 责任作者: 陈其兵, 博士生导师, 教授, 主要从事园林植物遗传育种研究.

CBF (CRT/DRE-binding factor) 转录因子是一类受低温特异诱导的反式作用因子,在植物中广泛存在,特定条件下(如低温)能快速高效启动和表达。该类因子可以激活下游多个耐寒基因的表达,从而激活植物体内的多种耐冷机制,使细胞表现出耐冷能力^[1-3]。自从1997年 Stockinger 等在拟南芥中克隆了 CBF1 的基因以来,许多研究已经从水稻^[4]、黑麦草^[5-6]、番茄^[7-8]、草莓^[9-10]、油菜和烟草^[11-12]等多种植物中分离和鉴定出 CBF 转录因子。CBF 是一大类基因家族,家族成员的核酸序列具有 AP2 结构域,它可以与下游抗逆基因启动子区的顺式作用元件(即 CRT/DRE 顺式作用元件)结合,进而诱导这些基因的表达^[13]。AP2 氨基酸结构在许多植物中是保守的^[14-15]。来自拟南芥、油菜、小麦、黑麦和番茄的 CBF 蛋白还含有两段保守的短多肽序列,即 PKK/RPAGR_xKFxETRHP 序列和 DSAWR 序列。前者位于 AP2 DNA 结合域的上游,可能与蛋白质运输相关;DSAWR 序列则位于 AP2 结合域的下游^[16]。目前,关于低温诱导 CBF 基因的表达过程还不是很清楚,研究者正在探索其表达调控机制。但基因工程研究已经验证了 CBF 基因在抗逆性方面的重要作用,并获得了多种抗逆水平不同程度提高的转化材料^[17-18]。

蓝花楹(*Jacaranda acutifolia* Humb. et Bonpl.), 别名蕨树、蓝雾树等,属紫葳科(Bignoniaceae)蓝花楹属(*Jacaranda* Juss.)速生落叶乔木,分布于我国长江以南,是重要的用材树种和优良的景观树种^[19]。其幼苗对低温较敏感,0℃以下便会出现冻梢现象。成年蓝花楹要求冬季夜间温度不低于15℃,虽能忍受短时间的8℃低温,但其生长受到严重阻碍。近年来,我国经常遭遇冬季严寒气候,霜雪天气时而袭击南方地区,蓝花楹的生长发育受到严重影响,进而使农林业遭受重大损失。为了探索蓝花楹低温敏感性的分子机制,本研究从蓝花楹叶片中克隆到一个新的 CBF 基因片段,研究其核苷酸和氨基酸序列特点与表达模式,并通过在拟南芥的异源表达,验证了该转录因子片段具有提高植物耐冷性的功能。

1 材料与方法

1.1 蓝花楹的低温处理

将3月龄的蓝花楹幼苗先置于光照培养箱中进

行适应性培养,培养条件为:白天16h(24000lx,28℃,60%湿度),夜晚(黑暗,25℃,80%湿度),适时浇灌 Hoagland 营养液,保持土壤30%含水量。两周后进行低温处理,条件为:12000lx,4℃,80%湿度。分别处理0、1、3、5、8、12、24和48h后,收取幼苗的第三片真叶、茎和根,速冻于液氮中备用。

1.2 CBF 基因片段的克隆及信息学分析

使用 TIANGEN 公司 RNAPrep pure Plant Kit (DP432) 和 DNasecure Plant Kit (DP320) 分别提取处理过的蓝花楹叶片组织的总 RNA 和 DNA。使用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (KR103) 将总 RNA 反转录成 cDNA。

根据拟南芥 *CBF1* 基因的核心序列设计引物 *JaCBF-S*(5-CATCCATATAAAAACGCACC-3) 和 *JaCBF-A*(5-GAGTTGTCCGAAGAAACC-3)。分别以蓝花楹叶片 cDNA 和 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化,纯化产物连接到 pMD-19T (TaKaLa, Dalian, China) 载体后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,挑取阳性克隆送 Invitrogen 公司(Shanghai, China) 进行双向测序。

将测序所得序列在 GenBank 中进行 BlastX 比对分析。使用 DNAMAN 5.1 将核苷酸序列翻译为氨基酸序列,并预测其分子量;同时将该氨基酸序列与其他已知的 CBF 蛋白进行比对,并搜索 AP2 以及 PKK/RPAGR_xKFxETRHP、DSAWR 保守序列。

1.3 *JaCBF1* 基因片段的融合表达

根据蓝花楹 CBF 核酸序列设计引物 *JaCBF1-ExS* (5-CGGAATTCAGTTGTCCGAAGAAACCG-GCGGGCCG-3) 和 *JaCBF1-ExA* (5-CCCTCGAGTTA-ATTCATCCATATAAAAACGCACCTTC-3), 并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。纯化后的 PCR 产物和 PET32a 质粒进行 *EcoRI*/*XhoI* 双酶切后使用 T4 ligase (TaKaLa, Dalian, China) 进行连接,所得到的重组表达载体命名为 *JaCBF1-PET32a*。将重组载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。将测序验证的重组菌置于含 50 μg · mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养过夜,以 1:100 稀释后扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.5, 37℃、0.5 mmol · L⁻¹ IPTG 浓度条件下诱导 10 h。4℃、4000 g 离心收集菌体,缓冲液(20 mmol · L⁻¹ 咪唑、0.5 mol · L⁻¹ NaCl、20 mmol · L⁻¹ Na₃PO₄, pH 7.5) 重悬后超声波破碎菌体(2S × 3S)。菌体裂解液于 4℃、20000 g 离心 30 min,分

别取少量超声前菌液、破碎离心后的上清液和沉淀,进行12% SDS-PAGE电泳。

1.4 *JaCBF1* 基因片段的表达模式分析

根据 *JaCBF1* 序列设计荧光定量引物 *JaCBF1qS* (5-TTACAGAGGAGTTCCTCAAAGA-3) 和 *JaCBF1qA* (5-CGTAGCCGCCAAGCCGAGTCA-3),以4℃冷处理的蓝花楹叶片、茎、根的cDNA为模板,18S rRNA为内参基因(Q18S-S: 5-CAACCATAAACGATGCCGACC-3/Q18S-A: 5-CAGCCTTGGCACCATACTCC-3),使用 SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, USA) 并按照说明书在 Bio-Rad iCycler MyiQ Real-Time PCR Systems 平台上进行荧光定量PCR。PCR程序为:95℃ 30 s,40循环(95℃ 5 s,60℃ 10 s),溶解曲线从65℃~95℃,升温程序每秒为:0.5℃,结果计算使用 $\Delta\Delta C_T$ 方法,实验设计3个PCR重复。

1.5 拷贝数分析

按照 PCR Digoxigenin (DIG) Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics) 说明书制备 Southern 杂交探针,扩增引物为 *JaCBF1-ExS* 和 *JaCBF1-ExA*,将蓝花楹总DNA分别用 *EcoRI*、*XhoI*、*BamHI* 酶切24 h, DNA用量均为12 μg。Southern 杂交过程参照 Hilario *et al.* [20] 的方法。

1.6 *JaCBF1* 片段的异源表达

根据蓝花楹 CBF 序列设计引物 *JaCBF1-pBI221S* (5-GCTCTAGAAGTTGTCCGAAGAAACCGCGGGCCG-3) 和 *JaCBF1-pBI221A* (5-CGGGATCCATTCATCCATATAAAAACGCACCTTC-3) 并进行PCR扩增,将纯化后的PCR产物与pBI221质粒分别用 *XbaI*/*BamHI* 双酶切、连接,构建重组植物表达载体,命名为35S-*JaCBF1*:GFP。拟南芥转基因采用GV3101脓杆菌介导、花序浸染的方式。使用空载的pBI221质粒做转基因对照。使用经氨苄青霉素筛选与PCR检验后的转基因拟南芥F2代种子做耐冷性检测。实验使用25 d生的拟南芥植株于-8℃冷冻(梯度降温)处理,叶片刚显现白霜(约24 h)时将拟南芥转入室温进行恢复培养。3 d后观察拟南芥生长情况,收取叶片测定丙二醛(MDA)及游离脯氨酸(Pro)含量,并分析 *JaCBF1* 在转基因植株中的表达模式。

使用 Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜系统检测 GFP 绿色荧光蛋白,观察倍数为40×,操作步骤

参照 Barnes *et al.* [21] 和 Kuo *et al.* [22]。

2 结果与分析

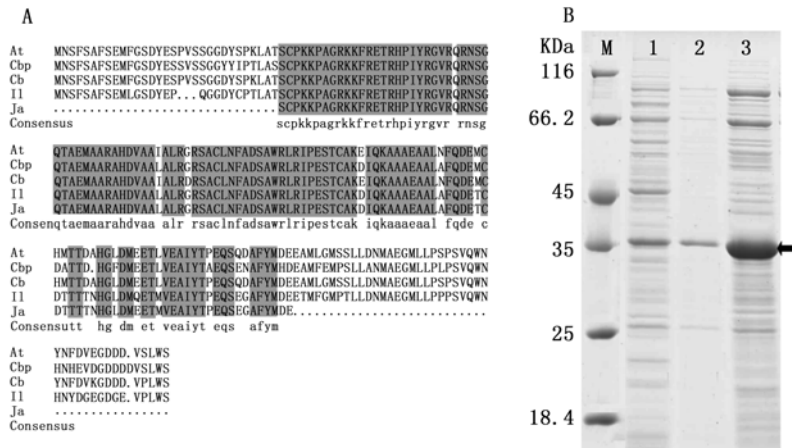
2.1 *JaCBF1* 基因的克隆与信息学分析

分别以4℃处理后的蓝花楹叶片cDNA和基因组DNA为模板,使用引物 *JaCBF1-S* 和 *JaCBF1-A* 进行PCR扩增,均克隆得到457 bp的核苷酸片段,表明该片段中没有内含子。序列比对结果显示其与 *IlCBF1* (AAZ57434.1)、*AtCBF2* (ABV27090.1)、*AtCBF1* (NP_567719.1)、*CbCBF* (AAY21899.2) 和 *CbpDREB1* (ABM21468.1) 等 CBF1 类转录因子的相似性在90%以上,其中与 *IlCBF1* 相似度达到99% (图1A)。根据 DNAMAN 5.1 预测分析,该核苷酸片段编码氨基酸个数为142,分子量为16.0 kDa。根据文献对 CBF1 蛋白质的结构分析,此氨基酸链含有 CBF 类转录因子典型的 AP2、PKK/RP-AGR_xKFxETRHP 以及 DSAWR 保守序列 [16], 预示其具有结合植物耐冷基因启动子从而调控耐冷基因表达的功能(图1A)。序列比对与氨基酸结构分析表明,从蓝花楹叶片中克隆得到的基因片段属于 CBF1 类转录因子家族,命名为 *JaCBF1*。

将 *JaCBF1* 构建到 PET32a 中,在37℃、终浓度为0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 的诱导条件下,该重组蛋白主要以可溶形式表达。SDS-PAGE 电泳分析表明, *JaCBF1*-PET32a 融合蛋白质的可溶性达到90%以上,分子量为36.5 kDa,与预测分子量完全吻合(其中,PET32a 质粒载体的标签蛋白为20.5 kDa) (图1B)。

2.2 *JaCBF1* 的表达模式分析

使用 qRT-PCR 方法研究 *JaCBF1* 的组织表达模式,结果显示在持续72 h的4℃低温胁迫条件下,蓝花楹根、茎、叶片中 *JaCBF1* 的转录水平都升高,但升高的趋势与强度不同(图2)。 *JaCBF1* 在根中于8 h达到最高转录水平,之后稳定表达; *JaCBF1* 在茎中0~72 h内的转录水平稳定升高;而4℃诱导 *JaCBF1* 在叶片中表现出倒V型的转录变化趋势,峰值出现于5 h,为根中最高表达量的3倍,同时间段茎中表达量的4倍,说明冷胁迫的早期 *JaCBF1* 表达的主要部位是蓝花楹叶片,并且在叶片中最先达到峰值。冷处理48 h后 *JaCBF1* 转录水平在蓝花楹茎中达到最高水平,而在根中的转录始终较低。



A: *JaCBF1* 与多个 CBF1 转录因子氨基酸比对。氨基酸序列为: At, *Arabidopsis thaliana* CBF1 (NP_567719.1); Cbp, *Capsella bursa-pastoris* DREB1 (ABM21468.1); Cb, *Chorispora bungeana* CBF1 (AAY21899.2); Il, *Iris lactea* var. *lacteal* CBF1 (AAZ57434.1); Ja, *Jacaranda acutifolia* CBF1。直线区域标注的为 AP2 结构域, 黑色圆点与方块标注的分别是 PKK/RPAGRkxFxETRHP 和 DSAWR 保守结构域。B: *JaCBF1* 原核表达的 SDS-PAGE 电泳。M, 蛋白 Marker; 1~3 分别为超声前菌液、破碎后沉淀和上清液的电泳带; 黑色箭头标注的为融合蛋白 *JaCBF1*-PET32a。

图 1 蓝花楹 *JaCBF1* 氨基酸序列比对与原核表达

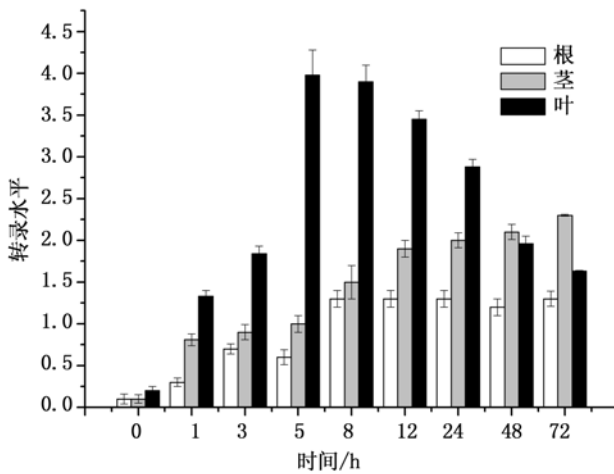


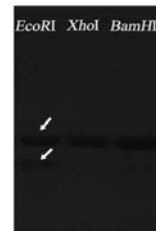
图 2 *JaCBF1* 在 4 °C 冷诱导条件下的组织表达模式

2.3 *JaCBF1* 的基因组拷贝数分析

为研究 *JaCBF1* 在蓝花楹基因组中的拷贝数, 使用 Southern 杂交技术分析 *EcoR* I、*Xho* I、*Bam*HI 酶切的总 DNA, 杂交显影后分别观察到 2、1、1 条杂交带, 说明蓝花楹总基因组中至少存在 2 个 *JaCBF1* 拷贝(图 3), 这与拟南芥、烟草中 CBF1 转录因子的拷贝数是一致的。

2.4 *JaCBF1* 在拟南芥中的异源表达

为进一步验证 *JaCBF1* 基因片段的功能, 构建了带有 GFP 标签的重组载体 35S-*JaCBF1*::GFP, 并用 GV3101 根瘤杆菌介导浸染到 Columbia 野生型拟南芥中。经 -8 °C 冷冻处理后, 使用 qRT-PCR 检



白色箭头指示蓝花楹基因组中存在的 *JaCBF1* 拷贝
图 3 *JaCBF1* 在蓝花楹基因组的 Southern 杂交结果

测 *JaCBF1* 的表达模式, 发现其转录水平升高了 3 倍(图 4B), 而转基因拟南芥植株中 MDA 和 Pro 的含量水平都低于对照组 1/2 以下(图 4C, D)。相对于野生型与空载对照组, 转 *JaCBF1* 基因的拟南芥植株表现出了较好的生长恢复状态, 没有明显的叶片白枯现象(图 4A), 说明转 *JaCBF1* 基因的拟南芥在冷冻胁迫条件下受到的伤害较小, 具备了高于对照组的耐冷冻性, 从而验证了 *JaCBF1* 能够增强拟南芥的耐冷冻性的功能。

使用荧光共聚焦显微照相技术观察转 35S-*JaCBF1*::GFP 重组质粒的拟南芥, 发现 *JaCBF1* 蛋白主要在细胞核中表达(图 5), 预示 *JaCBF1* 具有转录因子的特点, 即可作用于靶基因的启动子区以调控其表达。*JaCBF1* 的核定位结果进一步验证了其作为 CBF 类转录因子, 在蓝花楹冷敏感性与耐受应答中的重要作用。

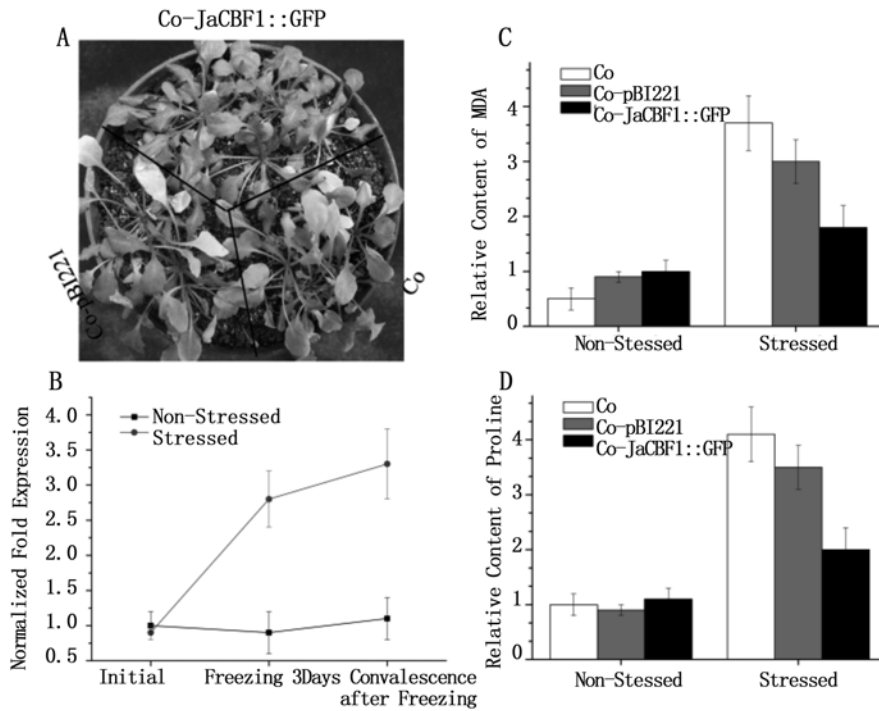


图4 *JaCBF1* 基因转拟南芥的异源功能验证
A: -8°C 处理 24 h 后室温恢复 3 d 的拟南芥。Co, 哥伦比亚型野生型拟南芥 (Columbia); Co-pBI221 为转入 pBI221 质粒的拟南芥; Co-JaCBF1::GFP 为转入 *JaCBF1* 基因的拟南芥; B: *JaCBF1* 在转基因拟南芥 (Co-JaCBF1::GFP 型) 中的转录检测。使用 qRT-PCR 分别检测了 *JaCBF1* 于冷冻前 (Initial)、冷冻过程 (Freezing) 和恢复生长 3 d (3 Days Convalescence after Freezing) 3 个时间段的转录水平; C, D: 分别为冷冻前后拟南芥植株中 MDA 和 Pro 含量变化。

图4 *JaCBF1* 基因转拟南芥的异源功能验证

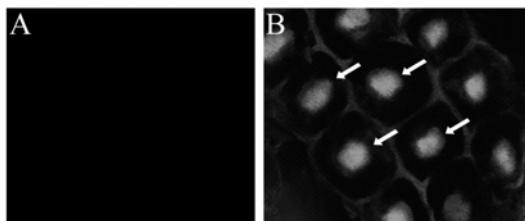


图5 荧光共聚焦纤维照相技术观察 *JaCBF1*::GFP 的细胞定位
拟南芥幼苗在黑暗条件下萌发。A: 无光条件下拟南芥叶片;
B: 绿色荧光条件下拟南芥叶片, 白色箭头指向为细胞核

3 讨论

CBF 类转录激活因子自从拟南芥中发现, 就被确认为反式作用因子。这类因子在拟南芥、烟草等植物组织中表达并无组织特异性, 当植株处于低温或冷冻胁迫时瞬时表达, 且 1 h 内就达到转录高峰。然而, 本研究发现, 冷敏感植物蓝花楹中 *JaCBF1* 基因在 4°C 低温胁迫条件下的诱导转录比较迟缓, 在叶片中 5 h 才达到转录高峰, 而根、茎中的诱导表达还要延迟 2~3 h。Singh 等^[23]认为氧化还原系统的低温应答速度是区分耐冷植物与冷敏感植物的特征之一, 一些热带植物体内的 SOD、POD、CAT 和

APX 等自由氧清除酶类在冷胁迫中的反应严重滞后于组织的冷害时间, 这是导致植株低温不耐性的重要原因。近来, 植物冷害应答的滞后性研究从生理生化角度逐渐转向分子生物学的基因组与转录组水平^[24]。本研究结果提示, 在蓝花楹中 CBF 类冷应答因子的反应滞后性也是导致植株低温敏感性的重要因素。

Medina *et al.*^[15]发现 CBF1 的氨基酸链由 4 个区域组成: 氨基末端区、核酸定位信号区、AP2 区和酸性区^[13-14]。研究表明, AP2 区能与 COR 基因启动子区的 CRT/DRE 序列结合, 从而激活后者转录表达。CBF 基因片段缺失实验表明其 AP2 区与酸性区是发挥功能的重要区域, 氨基末端则是非必需的^[14-15, 25]。本研究从蓝花楹中新克隆到的 *JaCBF1* 因子包含 AP2 区和部分酸性区, 缺失氨基末端, 在拟南芥中的异源表达证明其能增强转基因植株的低温耐受性, 此结果不仅验证了氨基末端的非必需性, 也说明酸性区的完整性也不是 CBF 正常发挥功能的必要条件。

CBF 类转录因子的冷应答反应通路一直是学者

们研究的热点,涉及各种生物学方法与多种模式植物,但至今未取得共识性的突破进展。CBF 通路简略步骤为:植物接受低温信号,结构性表达的 ICE 类上游因子激活 CBF 基因家族的转录,后者级联诱导 COR 类逆境基因的表达,之后植物体启动多种生理生化以及代谢反应来应对低温伤害。同时, CBF 通路还与 ABA 等信号通路交叉反应,预示了植物冷应答反应的网络化、系统化与复杂性^[24, 26]。值得注意的是,虽然本研究中蓝花楹的 *JaCBF1* 因子能够增强拟南芥的耐冻性,其是否能够提高蓝花楹自身的耐冷性,还需要深入探索。这是因为,耐冷植物 CBF 通路与低温敏感植物的 CBF 通路可能并不相同。鉴于蓝花楹中 *JaCBF1* 基因至少存在 2 个拷贝,有功能分工的可能性。

蓝花楹是我国重要的木材及景观用优良树种,冷敏感性是影响其推广与栽培的弊病。本研究首次从蓝花楹中克隆到一个新的类 CBF 转录因子片段,并通过转基因拟南芥的异源表达方式进行了功能验证,表明其能够增强植物低温/冻害耐受性,对蓝花楹的冷害机制研究与良种改善工程奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Enevoldsen E. CBF in head injury [J]. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 1986, 36:133-136
- [2] Friedman A D. Leukemogenesis by CBF oncoproteins[J]. *Leukemia*, 1999, 13 (12):1932-1942
- [3] Gilbert J. Estimation of CBF by cerebral venous oxygen difference [J]. *J Neurosurg*, 1989, 71 (5 Pt 1):790-791
- [4] Ito Y, Katsura K, Maruyama K, *et al.* Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice[J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47 (1):141-153
- [5] Tamura K, Yamada T. A perennial ryegrass CBF gene cluster is located in a region predicted by conserved synteny between Poaceae species[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114 (2):273-283
- [6] Xiong Y, Fei S Z. Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Planta*, 2006, 224 (4):878-888
- [7] Mboup M, Fischer I, Lainer H, *et al.* Trans-species polymorphism and allele-specific expression in the CBF gene family of wild tomatoes[J]. *Mol Biol Evol*, 2012, 29 (12):3641-3652
- [8] Zhang X, Fowler S G, Cheng H, *et al.* Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2004, 39 (6):905-919
- [9] 金万梅,董 静,尹淑萍,等. 冷诱导转录因子 CBF1 转化草莓及其抗寒性鉴定[J]. *西北植物学报*, 2007(2):223-227
- [10] 张 勇. 草莓冷诱导转录因子 CBF 的克隆与结构分析及其抗寒特性研究[D]. 四川雅安:四川农业大学, 2009
- [11] 刘荣梅,李凤兰,胡国富,等. 转 CBF3 基因烟草的抗寒性研究[J]. *东北农业大学学报*, 2011(1):119-123
- [12] Takumi S, Shimamura C, Kobayashi F. Increased freezing tolerance through up-regulation of downstream genes via the wheat CBF gene in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46 (2):205-211
- [13] Sinha S, Maity S N, Lu J, *et al.* Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92 (5):1624-1628
- [14] Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, *et al.* Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression[J]. *Plant J*, 1998, 16 (4):433-442
- [15] Medina J, Bagues M, Terol J, *et al.* 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[J]. *Plant Physiol*, 1999, 119 (2):463-470
- [16] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, *et al.* Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127 (3):910-917
- [17] Jayasinghe D, Gill A B, Levene M I. CBF reactivity in hypotensive and normotensive preterm infants[J]. *Pediatr Res*, 2003, 54 (6):848-853
- [18] 吕胜男,生吉萍,赵丹莹,等. CBF 基因调控植物抗冷途径的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2011(6):1275-1281
- [19] 刘 湘. 一种蓝花楹属植物的植化和抗菌活性的研究[J]. *国外医药(植物药分册)*, 1992 (3):127
- [20] Hilario E, Mackay J. *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*[M]. Humana Press, 2007, x:321
- [21] Kuo J. *Electron Microscopy: Methods and Protocols*[M]. Humana Press, 2007, xv:608
- [22] Barnes S H. Ultrastructural imaging of freeze-fractured plant cells in the scanning electron microscope[J]. *Microsc Res Tech*, 1992, 22 (2):160-169
- [23] Singh A, Sarkar A, Singh S, *et al.* Investigation of supplemental ultraviolet-B-induced changes in antioxidative defense system and leaf proteome in radish (*Raphanus sativus* L. cv Truthful): an insight to plant response under high oxidative stress[J]. *Protoplasma*, 2010, 245 (1-4):75-83
- [24] Morrow D, Cullen J P, Cahill P A, *et al.* Cyclic strain regulates the Notch/CBF-1 signaling pathway in endothelial cells: role in angiogenic activity[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27 (6):1289-1296
- [25] Dutta A, Sen J, Deswal R. Downregulation of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway by low temperature and cloning of a AP2 type C-repeat binding factor (CBF) from *Catharanthus roseus* (L). G. Don[J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26 (10):1869-1878
- [26] Wang Y, Hua J. A moderate decrease in temperature induces COR15a expression through the CBF signaling cascade and enhances freezing tolerance[J]. *Plant J*, 2009, 60 (2):340-349