

转二色补血草*LbDREB*基因烟草耐盐胁迫能力分析

李彦邦, 王玉成, 班巧英, 吴英杰, 郑磊*

东北林业大学, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨150040

摘要: 用盐胁迫处理转二色补血草*DREB*基因(*LbDREB*)的T₂代烟草和野生型烟草, 测定各转基因及野生型烟草的多项与植物抗逆相关的生理指标以及抗逆相关基因的表达水平, 结果显示过表达二色补血草*LbDREB*基因能提高盐胁迫下SOD活性和K⁺/Na⁺, 减少MDA含量, 并且还能调节抗逆相关的过氧化物酶基因(*PODs*)和脂质转移蛋白基因(*LTP*)的表达。表明*LbDREB*基因能增强植物的抗逆能力。

关键词: 烟草; 二色补血草; 盐胁迫; *LbDREB*基因; 生理应答; 实时荧光定量RT-PCR

Salt Tolerance Analysis of Tobacco Transformed with *LbDREB* Gene from *Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze

LI Yan-Bang, WANG Yu-Cheng, BAN Qiao-Ying, WU Ying-Jie, ZHENG Lei*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Dehydration responsive element binding proteins (DREB) are involved in transcriptional regulation of genes, and play important roles in plant growth, development and stress tolerance. To characterize the function of *DREB* in salt stress tolerance, the tobacco plants transformed with *LbDREB* from *Limonium bicolor* were subjected to NaCl stress. The results showed that overexpression of *LbDREB* elevated the activity of SOD, increased the ratio of K⁺ to Na⁺, and reduced the contents of MDA under NaCl stress. Moreover, overexpression of *LbDREB* can regulate the expression of some stress-related genes, such as *PODs* (for peroxidases) and *LTP* (for lipid transfer proteins). These results suggested that *LbDREB* can improve NaCl tolerance by regulating series of stress-related genes, thereby mediating some processes associated with stress to tolerance in plants.

Key words: tobacco; *Limonium bicolor*; NaCl stress; *LbDREB*; physiological responses; real-time PCR

DREB (dehydration responsive element binding)是植物特有的一种转录因子, 含有一个保守的AP2/EREBP结构域, 属于AP2/EREBP类转录因子中的EREBP亚族。DREB转录因子能够与脱水响应元件(dehydration-responsive element, DRE)特异性结合, 调控多个与植物干旱和高盐耐性有关的功能基因的表达, 从而综合提高植株的抗逆性(Dubouzet等2003; 刘强等2000; Xiong和Fei 2006)。DREB基因介导复杂的胁迫信号传递网络, 参与多种不同的信号传递。大部分DREB基因的表达受干旱、盐碱、低温或冻害等逆境胁迫的诱导, 从而提高植株的抗逆性。拟南芥DREB1/CBF基因的过量表达在转基因烟草或芸薹植物中能够诱导拟南芥CBF/DREB1靶基因的表达, 从而提高了转基因植物对低温和干旱胁迫的耐性(倪志勇等2008)。拟南芥中超表达*OsDREB1A*基因, 提高了

转基因植物对高盐和低温胁迫的耐性。另外, 有研究还发现, DREB转录因子也可能参与生物胁迫响应(Timmusk和Wagner 1999; Pernas等2000)。

在拟南芥中, 通过基因芯片等技术已经鉴定出了40多个受DREB/CBF转录因子调控的下游基因, 其产物包括一些转录调控因子、糖转运蛋白、碳水化合物代谢相关蛋白、胚胎发育晚期丰富蛋白、冷诱导蛋白、渗透保护生物合成蛋白等。通过这些基因产物的表达以及协同作用综合提高植物对逆境的抵抗能力(Seki等2001; Vogel等2005), 所以DREB类转录因子在基因的表达调控

收稿 2011-01-14 修订 2011-02-20

资助 新世纪优秀人才计划(NCET-08-0751)和国家自然科学基金(30972387)。

* 通讯作者(E-mail: zhenglei8123@126.com; Tel: 0451-82190607-14)。

方面起着非常重要的作用。

以前大量实验证明过表达*DREB*基因能调节转基因植株的多种生理指标变化,例如脯氨酸(Zhao等2007)、叶绿素(Chen等2009)、离子渗漏(Xiong和Fei 2006)。在以前的实验中,我们克隆了二色补血草的*LbDREB*基因,并将其转入烟草,共获得6个转基因烟草株系(Ban等2010)。在此基础上,本研究选择了2个抗重金属能力优良的转基因株系的T₂代烟草,进行盐胁迫,并测定和比较转基因和非转基因烟草的离子、丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性等各项抗逆生理指标以及相关植物抗逆相关基因的表达量,从而检验二色补血草*LbDREB*基因的耐盐功能,为将该基因在植物抗逆基因工程育种中的应用提供理论依据。

材料与方法

1 盐胁迫处理转基因烟草

我们共获得了6个独立的转*LbDREB*基因烟草(*Nicotiana tabacum* L.)株系(Ban等2010),选择2个具有抗重金属能力的转基因株系(Line 3、Line 4)和非转基因烟草(WT)的组培生根苗各60株,移栽到温室中培养,平均温度24℃,相对湿度70%。一个月后,在每个株系中各选取40棵长势相当的烟草,用100 mmol·L⁻¹ NaCl浇灌土壤,每天浇一次,每次浇200 mL进行盐胁迫试验。每个株系选取5株苗,于0、8、16 d取材(叶片)测定Na⁺、K⁺离子含量,在0、1、2、4 d取材测定丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性。分别收集转基因和非转基因烟草在盐胁迫0、1、2、4 d时叶片,保存于-70℃,备用。

2 转基因烟草植株的抗性分析

2.1 Na⁺、K⁺含量测定

将烟草叶片放入鼓风干燥箱,85℃恒温干燥10 h,然后将样品磨碎并称重。将样品转移到一个干净的试管中,加入1 mL HClO₄和5 mL HNO₃加热直到溶液变清。然后,在每个试管中加入3 mL 5 mol·L⁻¹ HCl,用去离子水将体积补到25 mL,用原子吸收分光光度法(TAS-986,北京普析通用仪器有限责任公司)测定Na⁺和K⁺含量。

2.2 丙二醛(MDA)含量测定

将烟草叶片用液氮速冻后研磨,放入2 mL离

心管内,加入1.5 mL 10%三氯乙酸,4℃放置30 min。12 000 r·min⁻¹离心10 min后吸取1 mL提取液,加入1 mL 0.6%硫代巴比妥酸(TBA),混匀,置于沸水浴中加热15 min。迅速冷却,12 000 r·min⁻¹离心20 min,取上清液分别测定532 nm和450 nm的OD值。对照管以2 mL水代替提取液。

根据以下公式即可计算样品提取液中丙二醛的含量C,然后再计算每克样品中丙二醛的含量(μmol·g⁻¹)。

$$C(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})=6.45\text{OD}_{532}-0.56\text{OD}_{450}$$

2.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

将烟草叶片用液氮速冻后研磨,放入2 mL离心管内。加入1.5 mL 1/15 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.8),4℃放置30 min。10 000 r·min⁻¹离心10 min,将上清液30 μL稀释到500 μL后加1.5 mL反应液[0.013 mol·L⁻¹甲硫氨酸(Met),6.3×10⁻⁶ mol·L⁻¹氮蓝四唑,1.3×10⁻⁶ mol·L⁻¹核黄素,1×10⁻⁴ mol·L⁻¹EDTA·Na₂和0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液,pH 7.8],置于温度为30℃、光照强度90 μmol·m⁻²·s⁻¹的光照培养箱内反应10 min,立即测定吸光值。用不加酶液的反应液(1 mL 1/15 mol·L⁻¹磷酸缓冲液,3 mL反应液)作对照,用稀释后的酶液调零。

将测得的吸光值代入以下公式,求得酶活性。其中:Δ*A*₅₆₀%为560 nm处被抑制的吸光值百分数;*V*为提取的酶液总体积(mL);*v*是反应的酶液体积(mL);*T*为反应时间(min);*W*为植物材料的净重(g)。

$$A_{\text{SOD}} = \frac{\Delta A_{560} \% \cdot V}{50 \% \cdot W \cdot T \cdot v}$$

2.4 盐胁迫后转*LbDREB*基因烟草和非转基因烟草生长比较

将转基因烟草和非转基因烟草用100 mmol·L⁻¹ NaCl浇灌,每天浇一次,每次浇200 mL。胁迫一个月后,比较其生长状况并计算其相对生长量(Ban等2010)。

相对生长量=(盐胁迫一个月植株高度-胁迫前植株高度)/胁迫前植株高度×100%。

3 实时定量RT-PCR分析下游基因表达

3.1 样品的制备

采用CTAB法(王玉成等2003)提取不同处理的烟草叶片组织中总RNA,经DNase I (Promega)消化去除DNA。以0.5 μg总RNA为模板,应用Prime-

Script™ RT reagent Kit (TaKaRa)进行cDNA的合成。将合成的第一链的cDNA稀释10倍, 用作定量RT-PCR模板。

3.2 实时荧光定量RT-PCR

选择3个与逆境相关的基因作为研究对象进行实时荧光定量分析, 用烟草 α -*tublin*和*ubiquitin*基因作为内参基因, 所选基因及引物序列见表1, 引物由上海生工生物公司合成。实时定量PCR反应试剂盒是SYBR Green Realtime PCR Master mix (Toyobo, Japan)。反应体系为2×SYBR Green Realtime PCR Master mix 10 μ L, 引物各0.3 μ L (20 μ mol·L⁻¹), 水6.9 μ L, 模板2.5 μ L。定量PCR反应条件为: 94 °C 预变性30 s; 94 °C 12 s, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 78.4 °C 读板1 s, 45个循环。然后在荧光定量PCR仪(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)上完成RT-PCR。用 α -*tublin*和*ubiquitin*基因作为内参基因。用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法进行基因的相对定量分析, 用Graphpad InStat3.0软件进行基因表达数据的显著性分析(Comic 2000)。

表1 实时定量RT-PCR研究下游基因表达所用引物序列

Table 1 The primer sequences of down-stream gene used real-time RT-PCR

基因	GenBank登录号	引物序列(5'→3')
α - <i>tublin</i>	AJ421412	TAACCATCATAGAAGAGGGTTC
		GCAATCCTTCTTGACAATGAGG
<i>ubiquitin</i>	DQ830978	TGGTCGGGTGGGATTCCTCT
		GCCAAGATACAGGATAAGGAGG
<i>TOBPXD</i>	D11396	GAAATCCTGGCTCCGCTCTG
		TGGAGTTGCCTTGGAAGAG
<i>poxN1</i>	AB044154	ATCGGTCCACAGCTTCTGGTCTG
		AGGGTCTCAACTCAAGATC
<i>ltp1</i>	X62395	TCAGCAGGAATGATGTCTCC
		TCATGGAAGCTGCTGCTGTC

实验结果

1 盐胁迫下转*LbDREB*基因烟草和非转基因烟草离子含量比较

为了研究NaCl对烟草中Na⁺和K⁺含量的影响, 我们对100 mmol·L⁻¹ NaCl处理0、8及16 d的转基因烟草和非转基因烟草中Na⁺、K⁺含量进行测定(图1)。胁迫前, 转*LbDREB*基因烟草与非转基因烟草相比, Na⁺含量差异不显著($P>0.05$)。NaCl处理

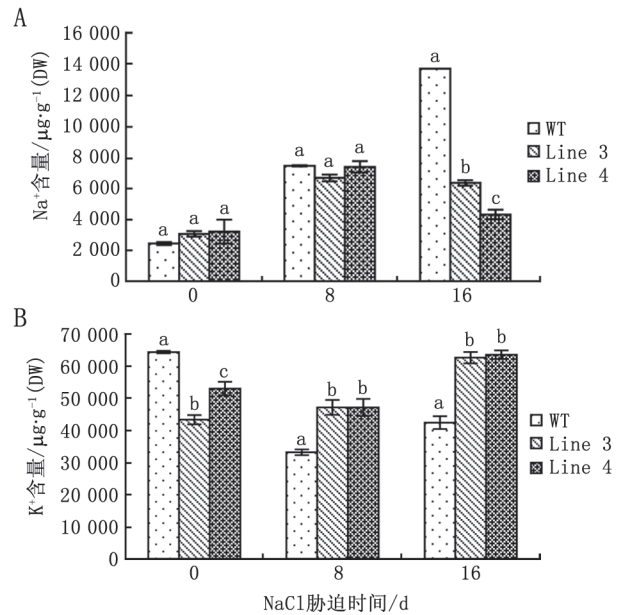


图1 盐胁迫对非转基因和转基因烟草中Na⁺和K⁺含量变化的影响

Fig.1 Effect of salinity stress on the accumulation of inorganic ions (Na⁺ and K⁺) in the leaves of untransformed control plants and transgenic tobacco lines

WT: 非转基因烟草; Line 3、Line 4: 不同的转基因烟草株系。数据为3次重复的平均值。无相同字母表示差异显著(Tukey法 $\alpha=0.05$)。下图同。

8 d后, 转*LbDREB*基因烟草中K⁺含量较非转基因烟草明显升高, Na⁺含量与非转基因株系差异并不明显。在NaCl胁迫16 d时, 所有转*LbDREB*基因烟草中的Na⁺含量均低于非转基因烟草, 而K⁺含量高于非转基因烟草, 且差异显著($P<0.05$)。

转*LbDREB*基因烟草和对照烟草的K⁺、Na⁺比率(K⁺/Na⁺)如图2所示。在胁迫前, 非转基因烟草中的K⁺/Na⁺大于转基因烟草。盐胁迫导致了K⁺/Na⁺在非转基因烟草和转*LbDREB*基因烟草中的快速下降, 但是在16 d时转基因烟草株系中又表现上升的趋势。在整个盐胁迫过程中, 所有转*LbDREB*基因烟草中的K⁺/Na⁺均高于非转基因烟草, 尤其是在胁迫16 d时, 转基因烟草Line 4株系比非转基因烟草高出4.7倍。显然, *LbDREB*基因的过表达显著提高了转基因烟草在盐胁迫下的K⁺/Na⁺。

2 盐胁迫下转*LbDREB*基因烟草和非转基因烟草丙二醛(MDA)含量比较

由图3所示, 在非胁迫时, 转基因烟草与非转基因烟草MDA含量无明显差异。但在盐胁迫1、2

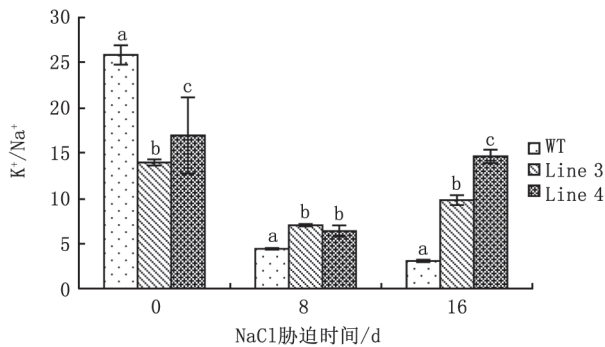


图2 盐胁迫下转基因株系和非转基因株系K⁺/Na⁺比率
Fig.2 The ratio of K⁺ to Na⁺ in transgenic lines and untransformed control plants after salt stress

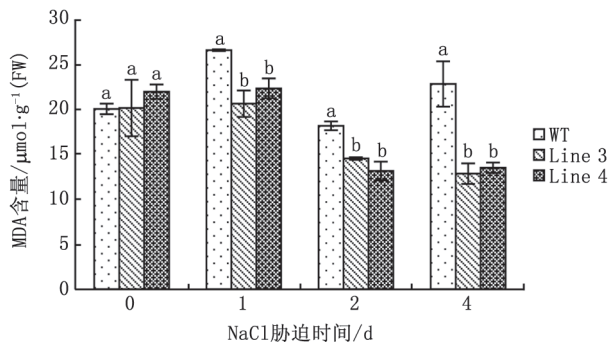


图3 盐胁迫对转基因和非转基因株系MDA含量变化的影响

Fig.3 Effect of salinity stress on MDA content of transgenic and untransformed control plants

和4 d时,各转基因烟草株系的MDA含量较非转基因烟草明显降低。方差分析表明,在盐胁迫的第1、2、4天,转基因株系与非转基因株系间的MDA含量差异显著($P < 0.05$),特别是在胁迫第4天时非转基因株系中MDA的含量达到了转基因株系的1.8倍,但各个转基因株系之间差异并不显著。这些结果表明,*LbDREB*的过量表达减少了NaCl胁迫时转基因烟草中的MDA含量。

3 盐胁迫下转*LbDREB*基因烟草和非转基因烟草超氧化物歧化酶(SOD)活性比较

从图4可见,随着盐胁迫时间的延长,非转基因烟草和转*LbDREB*基因烟草的SOD活性均呈现先升高、后降低的趋势。未胁迫时,所有株系中的SOD活性没有明显差异。盐胁迫1、2 d后,转*LbDREB*基因烟草中的SOD活性高于非转基因烟草,尤其是Line 4株系在胁迫第1天时,其SOD活性

比非转基因烟草高出近1倍。不同的转基因株系间的SOD活性也不相同并且差异明显($P < 0.05$) (图4)。胁迫处理4 d后,非转基因和转基因株系的SOD含量比胁迫前均明显降低,且非转基因和转

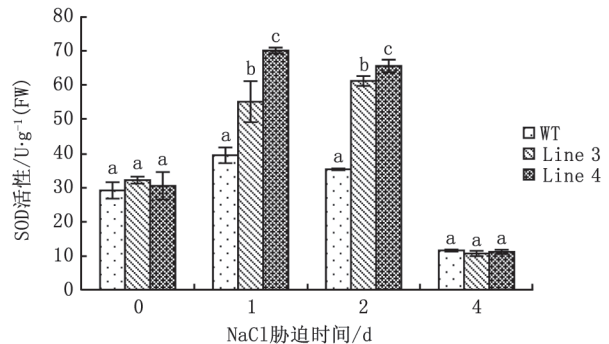


图4 盐胁迫对转基因和非转基因株系SOD活性变化的影响
Fig.4 Effect of salinity stress on SOD activity of transgenic and untransformed control plants

基因株系间无显著差异。

4 盐胁迫后转*LbDREB*基因烟草和非转基因烟草生长比较

盐胁迫30 d后,转*LbDREB*基因烟草较非转基因烟草长势好(图5)。转基因烟草的相对生长量显著高于非转基因烟草(图6),特别是Line 4株系的相

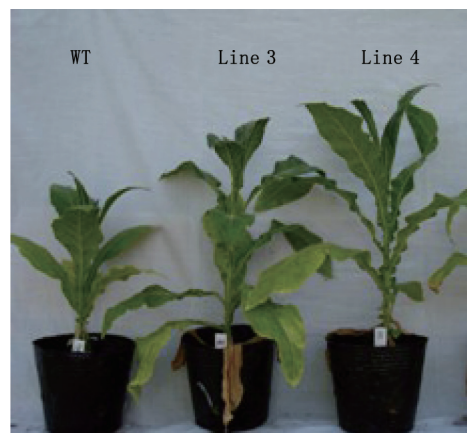


图5 盐胁迫30 d后非转基因烟草和转基因烟草的生长
Fig.5 Growth of untransformed control and transgenic tobacco after salt stress for 30 days

对生长量是非转基因株系的近4倍。

5 *LbDREB*基因对植物抗逆相关基因的调控

为了鉴定外源*LbDREB*是否能调控转基因烟

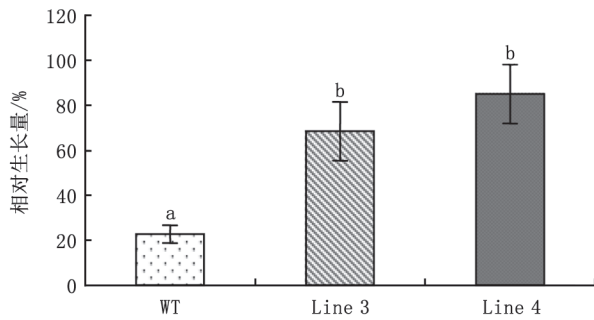


图6 盐胁迫30 d后转基因烟草和非转基因烟草相对生长量的对比

Fig.6 Comparison of relative growth between transgenic and WT tobacco plants after salt stress for 30 days

草中抗逆相关基因的表达, 我们选择了3个基因作为研究对象, 用实时荧光定量RT-PCR分析了它们在盐胁迫前和胁迫后的相对表达量, 从而初步鉴定出*LbDREB*对胁迫相关基因的表达调控机制。

从图7中我们可以看出, 在正常生长条件下, 转基因株系中*TOBPXD*基因和*poxNI*基因被外源*LbDREB*显著下调($P<0.05$)。在NaCl胁迫4 d后, *ltp1*在转基因株系中的表达量高于非转基因植株, 且差异显著($P<0.05$), 但转基因植株中*TOBLTP*和*poxNI*表达量虽然比胁迫前增加, 但与非转基因株系差异不显著。

讨 论

植物抗逆能力的形成是由多个基因协同参与完成的, 转入单一功能基因提高植物的抗逆性具有一定的局限性。因此, 近年来转录调控因子基因的遗传转化已经成为当今的研究热点。调控基因包括调控基因表达的转录因子和参与蛋白质翻译的翻译因子。研究表明转录因子在植物基因组中的过表达, 可明显增强植物的抗逆性(刘文奇等2002)。DREB转录因子在植物的抗逆性中发挥着重要的作用, 很多研究已经表明DREB基因能够在植物抵抗多种非生物胁迫(Gutha和Reddy 2008; Dubouzet等2003; Liu等2007)中起重要作用。

细胞质中许多酶的加工过程受到高浓度的 Na^+ 或者较高的 Na^+/K^+ 的抑制(Tester和Davenport 2003)。无论是淡土植物还是盐土植物其细胞之中的酶都对 Na^+ 十分敏感(Obata等2007), 所以限制 Na^+ 进入细胞内对提高植物的抗盐性起重要的作

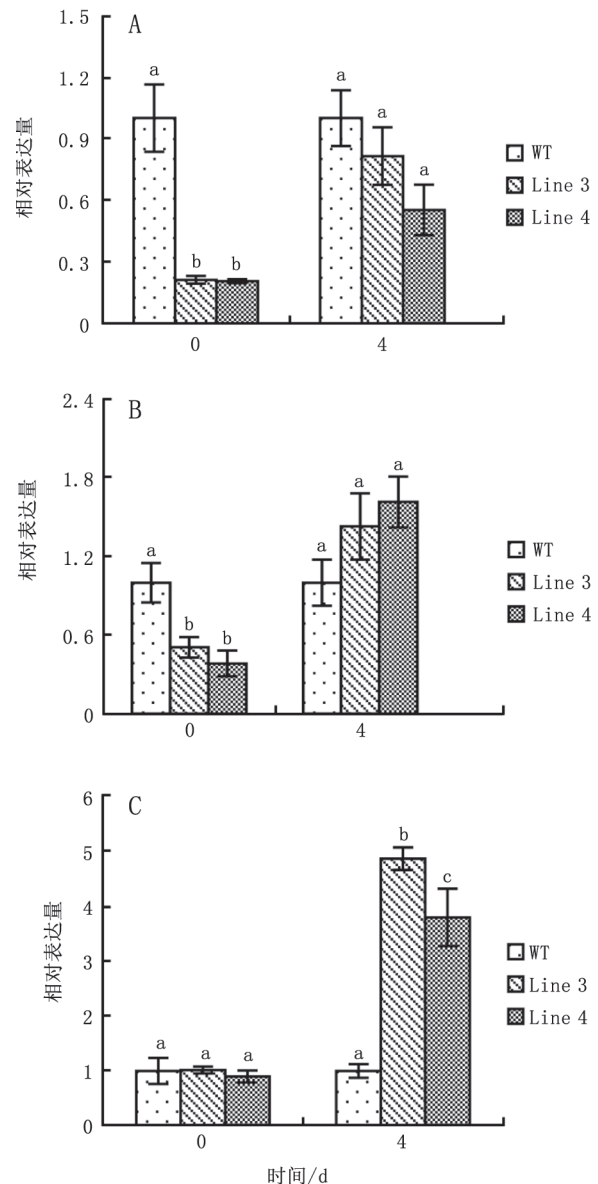


图7 实时定量RT-PCR分析盐胁迫后转基因烟草中目标基因的相对表达

Fig.7 Relative expression level of target genes in transgenic lines after salt stress by real-time RT-PCR

A: *TOBPXD* (D111396); B: *poxNI* (AB044154); C: *ltp1* (X62395)。

用。一般认为, K^+/Na^+ 的比值是植物耐盐能力的一个指标(Garg等2002)。本研究发现, 盐胁迫时, 转*LbDREB*基因烟草比非转基因烟草含有更多 K^+ 以及更少 Na^+ , 在转*LbDREB*基因烟草中的 K^+/Na^+ 高于非转基因烟草(图2), 表明在盐胁迫下*LbDREB*基因能显著提高植物体内 K^+/Na^+ , 减少了盐分对细胞内膜和蛋白因子等的毒害, 从而降低盐胁迫对植物

的伤害程度。

各种各样的非生物胁迫(如盐、干旱、极端温度、重金属等)都可能引起植物细胞中活性氧(ROS)的过量积累,进而使细胞遭受快速过氧化的伤害(Sunkar等2003)。由于MDA是生物膜内过氧化反应的终产物,因此MDA含量代表了过氧化反应以及膜受伤害的程度,通常将其作为脂质过氧化损伤的指标。MDA积累越多表明细胞膜脂损伤的程度越高(肖雯等2000)。本研究中,在胁迫前转基因株系和非转基因株系中MDA含量差异并不显著,但是在盐胁迫下,转*LbDREB*基因烟草中的MDA含量比非转基因烟草显著降低(图3)。所以*LbDREB*基因能够调节植物体内MDA的合成,植物受到盐胁迫后*LbDREB*的过量表达减少了植物体内MDA的合成,从而降低了植物受伤害的程度。

超氧化物歧化酶(SOD)是植物细胞内的重要保护酶,在抗氧化防御系统中处于核心地位。它能催化超氧阴离子自由基的歧化反应,从而清除超氧阴离子自由基,减少其对膜结构和功能的破坏,该酶的活性与植物的抗逆性密切相关(白爽等2006)。本研究中,盐胁迫前转基因株系和非转基因株系中SOD含量并无明显差异。但在盐胁迫第2天时,转*LbDREB*基因烟草的SOD活性较非转基因烟草显著增高,在第4天时SOD活性又剧烈下降到与非转基因株系相同的水平(图4)。可能开始SOD活性迅速上升是植株为了适应盐胁迫而产生的应激反应,以减小盐胁迫对植物细胞的伤害,但是随着胁迫时间的延长植株受到的伤害相应增加,植物体内超氧化物歧化酶系受到损害,所以胁迫第4天时的SOD活性又有降低,有待于进一步研究。总之*LbDREB*基因可能参与调节SOD家族基因的表达,从而增加植物体内SOD的活性以增强植物体的抗胁迫能力。

过氧化物酶(peroxidase, POD)在植物抗氧化胁迫中具有清除氧自由基、维持活性氧代谢平衡的功能,是防止质膜过氧化、保护膜系统的关键酶。植物细胞中含有POD等多种抗氧化酶类和抗氧化化合物来清除细胞内的活性氧。植物在逆境条件下受伤害的程度及植物对逆境的抵抗能力与其体内的POD活性有关,其活性越高,植物的抗逆性越强(Flexas和Medrano 2002; 赵丽英等2005)。

在本试验中我们研究了两个POD基因(*TOBPXD*和*poxN1*)的表达模式,比较转基因和非转基因烟草各株系POD基因表达水平可以发现,在NaCl处理前,*TOBPXD*基因和*poxN1*基因在转基因株系中表达量明显低于非转基因植株。NaCl胁迫4 d后转基因株系中两个基因的表达量增加,但与非转基因植株差异并不显著。说明,*LbDREB*基因能够调控POD家族基因的表达。

由于*LbDREB*基因能够调控POD、SOD等基因的表达,而POD、SOD等是植物体内重要的活性氧清除酶类,可以清除氧自由基减少膜脂质过氧化程度。我们研究表明*LbDREB*基因的过表达能够提高POD、SOD等基因的表达量。因此,可能由于POD、SOD等基因的表达量提高,使得植物的抗氧化能力加强,减少了盐胁迫下的膜脂质过氧化程度,从而减少了MDA含量。

脂质转移蛋白(lipid transfer protein, LTP)是在高等植物生命活动中一类重要的活性蛋白质,其显著的结构特征是分子内有一个疏水孔穴,在体外能够可逆地结合和转运多种类型的疏水分子。LTP蛋白不仅在植物生殖发育及信号转导中行使着重要的功能(李诚斌等2006; 徐民俊等2002),而且在植物抗盐胁迫(Choi等2008)和抗重金属胁迫(Hollenbach等1997)发挥着重要的作用。本实验中我们比较了非转基因烟草和转基因烟草各株系LTP基因(*ltp1*)表达量,可以发现在非盐胁迫下,非转基因植株和转基因植株中*ltp1*的表达量基本相同,而在盐胁迫后,转基因植株中*ltp1*的表达量明显高于非转基因植株,说明在盐胁迫下*LbDREB*的过表达,提高了*ltp1*的表达量,从而增强了LTP的活性,提高了植物的耐盐能力。

综上所述,*LbDREB*能够通过调节抗逆相关基因的表达来调节植物相关生理活动,从而提高转基因烟草对盐胁迫的抗性。

参考文献

- 白爽, 宋启平, 刘桂丰, 姜莹, 林士杰(2006). 转*beta*基因的小黑杨花粉植株耐盐性分析. 分子植物育种, 4 (1): 41-44
- 李诚斌, 施庆珊, 疏秀林, 欧阳友生, 陈仪本(2006). LTP在植物抗环境胁迫中的作用. 生物技术通报, (6): 19-22
- 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000). *DREB*转录因子在提高植物抗逆性中的作用. 科学通报, 45 (1): 11-16
- 刘文奇, 陈旭君, 徐晓晖, 凌建群, 郭泽建(2002). ERF类转录因子

- OPBP1*基因的超表达提高烟草的耐盐能力. 植物生理与分子生物学学报, 28 (6): 473~478
- 倪志勇, 徐兆师, 李连城, 陈明, 马有志(2008). DREB转录因子在植物抗逆胁迫中的作用机理及应用研究进展. 麦类作物学报, 28 (6): 1100~1106
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2003). 胡杨、柽柳总RNA 提取方法的建立. 东北林业大学学报, 31 (5): 99~100
- 肖雯, 贾恢先, 蒲陆梅(2000). 几种盐生植物抗盐生理指标的研究. 西北植物学报, 20 (5): 818~825
- 徐民俊, 刘桂茹, 杨学举, 王丽军(2002). 水分胁迫对抗旱性不同冬小麦品种可溶性蛋白质的影响. 干旱地区农业研究, 20 (3): 85~88
- 赵丽英, 邓西平, 山仑(2005). 活性氧清除系统对干旱胁迫的响应机制. 西北植物学报, 25 (2): 413~418
- Ban QY, Liu GF, Wang YC (2010). A *DREB* gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco. *J Plant Physiol*, 168 (5): 449~458
- Chen J, Xia X, Yin W (2009). Expression profiling and functional characterization of a *DREB2*-type gene from *Populus euphratica*. *Biochem Biophys Res Commun*, 378 (3): 483~487
- Choi AM, Lee SB, Cho SH, Hwang I, Hur CG, Suh MC (2008). Isolation and characterization of multiple abundant lipid transfer protein isoforms in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. *Plant Physiol Biochem*, 46: 127~139
- Comic G (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci*, 5 (5): 187~188
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet ED, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encoded transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 33: 751~763
- Flexas J, Medrano H (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C_3 plant: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot*, 89: 183~189
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Raneala AP, Chio YD, Kochian LV, Wu RJ (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (25): 15898~15903
- Gutha LR, Reddy AR (2008). Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 68 (6): 533~555
- Hollenbach B, Schreiber L, Hartung W, Dietz KJ (1997). Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta*, 203: 9~19
- Liu N, Zhong NQ, Wang GL, Li LJ, Liu XL, He HL, Xia GC (2007). Cloning and functional characterization of *PpDBF1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta*, 226: 827~838
- Obata T, Hiroko K, Kitamoto, Nakamura A, Fukuda A, Tanaka Y (2007). Rice shaker potassium channel *OsKAT1* confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. *Plant Physiol*, 144: 1978~1985
- Pernas M, Sanchez-Mong R, Salcedo G (2000). Biotic and abiotic stresses can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Lett*, 467: 206~210
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001). *Arabidopsis* encyclopedia using full-length cDNAs and its application. *Plant Physiol Biochem*, 39: 211~220
- Sunkar R, Bartels D, Kirch HH (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J*, 35: 452~464
- Tester M, Davenport R (2003). Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Ann Bot*, 91: 503~527
- Timmusk S, Wagner EH (1999). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant Microbe Interact*, 12: 951~959
- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcription of *Arabidopsis*. *Plant J*, 41: 195~211
- Xiong Y, Fei SZ (2006). Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Planta*, 224: 878~888
- Zhao JS, Ren W, Zhi DY, Wang L, Xia GL (2007). *Arabidopsis DREB1A/CBF3* bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep*, 26: 1521~1528