

网络出版时间:2013-11-21 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20131121.1728.011.html>

# 山葡萄 VaCBF1 转录因子基因的克隆与表达分析

王法微<sup>a</sup>, 刘 洋<sup>b</sup>, 吴学彦<sup>b</sup>, 李晓薇<sup>b</sup>, 李海燕<sup>a,b</sup>

(吉林农业大学 a 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, b 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

**[摘 要]** **【目的】**克隆山葡萄(*Vitis amurens*)CBF1 转录因子基因(*VaCBF1*),为其功能的深入研究及其在植物抗寒基因工程中的应用奠定基础。**【方法】**根据植物 CBF 基因 AP2/EREBP 保守区设计 1 对简并引物,利用 PCR 法从山葡萄 cDNA 中扩增 *VaCBF1* 基因的中间片段。再根据中间片段区域设计 2 对特异引物,采用反向 PCR 法扩增 *VaCBF1* 基因的 5'端和 3'端序列。将中间片段与 5'端和 3'端序列拼接后得到山葡萄 *VaCBF1* 基因的 cDNA 全长序列,据此设计 1 对特异引物,PCR 扩增 *VaCBF1* 基因编码区的全长序列,并对其进行生物信息学分析。同时,利用荧光定量 PCR 分析山葡萄 *VaCBF1* 基因在不同逆境胁迫(干旱、低温、盐胁迫)下的表达情况。**【结果】**成功地从山葡萄中克隆得到 *VaCBF1* 基因 cDNA 全长序列,其长度为 762 bp,编码 253 个氨基酸,在 GenBank 注册号为 DQ517296。同源性分析证实, *VaCBF1* 属于 CBF 转录因子家族。荧光定量 PCR 分析发现,低温胁迫可以诱导山葡萄 *VaCBF1* 基因高表达,而该基因的表达不受盐及干旱处理诱导。**【结论】**首次从山葡萄中克隆了 *VaCBF1* 基因,并证实该基因参与了植物对低温胁迫的应答。

**[关键词]** 山葡萄;CBF 转录因子;基因克隆与表达

**[中图分类号]** S663.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2013)12-0086-07

## Cloning and expression analysis of the transcription factor CBF gene from *Vitis amurens* (*VaCBF1*)

WANG Fa-wei<sup>a</sup>, LIU Yang<sup>b</sup>, WU Xue-yan<sup>b</sup>, LI Xiao-wei<sup>b</sup>, LI Hai-yan<sup>a,b</sup>

(a Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development,

b College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

**Abstract:** **【Objective】** This study was conducted to clone and characterize the transcription factor CBF1 gene from *Vitis amurens* (*VaCBF1*) for further functional studies and cold resistance application. **【Method】** A pair of degenerate primers were designed based on AP2/EREBP domain of *VaCBF1* and a fragment of *VaCBF1* was cloned from cDNA of *V. amurens* using PCR. Then, two pairs of specific primers were designed based on middle fragment and the 5' and 3' end sequences of *VaCBF1* gene were obtained by inverse PCR. A full sequence for cDNA of *VaCBF1* was obtained by combining the middle fragment with sequences of 5' and 3'. And a pair of primers was designed and used for cloning and analyzing the full length of *VaCBF1* by PCR amplification and bioinformatics methods. The expression profiling of *VaCBF1* gene exposed to various abiotic stresses (low temperature, drought and salt) was investigated using real time PCR as well. **【Result】** The full-length of *VaCBF1* gene was 762 bp with 253 amino acids encoded (GenBank accession number DQ517296). Phylogenetic analysis confirmed that *VaCBF1* belonged to

**[收稿日期]** 2013-08-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31201144, 30400300);教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20122223120003);吉林农业大学博士科研启动基金项目(201206)

**[作者简介]** 王法微(1980—),男,吉林梅河口人,助理研究员,主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail:fw-1980@163.com

**[通信作者]** 李海燕(1971—),女,吉林舒兰人,教授,博士生导师,主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail:hyli99@163.com

CBF transcription factor. Real time PCR results showed that expression of *VaCBF1* was induced by low temperature treatment rather than drought and salt stresses. 【Conclusion】 This was the first clone and characterization of *VaCBF1* gene from *V. amurensis* and it confirmed that *VaCBF1* was related to the response to low temperature.

**Key words:** *Vitis amurensis*; CBF transcription factor; gene cloning and expression

在植物抗寒研究的早期阶段,人们一直致力于低温诱导基因表达的研究以寻找专一的顺式作用元件来调控植物的耐寒性。1994 年,Yamaguchi-Skinnosaki 等<sup>[1]</sup>首次在拟南芥 *Rd29A* 基因的启动子区域中发现了一个 9 bp(TACCGACAT)的 DRE(Dehydration responsive element)元件,同年又从 *COR15a* 基因的启动子区域中鉴定出另一个 5 bp(CCGAC)的 DNA 调控元件 CRT(C-repeat)<sup>[2]</sup>。这 2 个元件均含 CCGAC 核心序列,即低温应答元件(Low-temperature responsive element,LTRE)<sup>[3]</sup>。C-重复序列结合因子转录因子(C-repeat binding factor,CBF)可以与其调控基因的上游 CRT/DRE 元件结合,从而调控该基因的表达。拟南芥 *CBF1*、*CBF2* 与 *CBF3* 在低温处理下表达量迅速上升,*CBF* 基因表达量的升高随之诱导了 *rd29A*、*rd17*、*COR15a*、*COR78*、*LT178*、*erd10*、*kin1* 等靶基因的表达,促进植株产生可溶性糖以及脯氨酸等抵抗低温胁迫<sup>[4-6]</sup>。Zhang 等<sup>[7]</sup>报道,过表达类番茄(*Solanum lycopersicoide*)*CBF1* 基因的拟南芥植株具有很强的耐寒与耐盐能力,并且 *CBF1* 基因也可以激活一系列下游基因的表达。*CBF* 基因表达诱导因子(Inducer of CBF expression,ICE)可以与 *CBF* 基因启动子区域结合并激活 *CBF* 基因表达。研究发现,拟南芥 *ICE* 基因的突变株使 *AtCBF3* 基因丧失了对 *COR* 等基因的调控作用,导致突变株对低温胁迫的抵抗能力下降<sup>[8-10]</sup>。山葡萄(*Vitis amurensis*)也称东北山葡萄,具有极强的耐寒能力,但关于其耐寒的分子机制尚未见报道。为此,本研究首次从山葡萄中分离并克隆了 *CBF1* 基因(*VaCBF1*),分析了其在不同逆境胁迫下的表达情况,并根据 *VaCBF1* 在不同逆境中的差异表达,分析 *VaCBF1* 基因在山葡萄抗逆分子机制中的作用,为其功能的深入研究及通过基因工程改良植物的抗逆性奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物与菌株 供试植物材料为山葡萄幼苗。

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  由吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心保存,克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 酶和生化试剂 Ex *Taq* DNA 聚合酶、SYBR Premix Ex *Taq*、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Maker (DL2000)及其他工具酶与 IPTG、X-gal 等,均购自大连宝生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒,购自 Invitrogen 公司;AMV 反转录试剂盒,购于 Promega 公司;植物基因组 DNA 小量提取试剂盒、DNA 清洁试剂盒,购自维特洁公司。本试验中引物合成由北京金唯智生物科技有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 山葡萄总 RNA 与 DNA 的提取 按照 Invitrogen 公司 RNA 提取试剂盒说明书,提取山葡萄叶片的总 RNA,电泳检测后将其反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 *VaCBF1* 基因中间片段的 PCR 扩增。另外,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书,提取山葡萄叶片的基因组 DNA,电泳检测后于 -20 °C 保存,用于 *VaCBF1* 基因侧翼序列的反向 PCR 扩增。

1.2.2 山葡萄 *VaCBF1* 基因中间片段的克隆 根据 GenBank 上已经发表的几种植物 *CBF* 基因中 AP2/EREBP 高度保守结构域序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对简并引物 P1 和 P2(序列见表 1),以山葡萄 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 25  $\mu$ L,包括 ddH<sub>2</sub>O 18.3  $\mu$ L、buffer 2.5  $\mu$ L、模板、dNTP、上下游引物各 1  $\mu$ L、*Taq* 酶 0.2  $\mu$ L。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 8 min;94 °C 变性 30 s,52 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,重复 35 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 反应结束后,取 5  $\mu$ L 产物与 1  $\mu$ L 的 Loading Buffer 混合,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的条带,与克隆载体 pMD18-T 连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经扩大培养、蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后,将阳性克隆送交北京金唯智生物科技有限公司进行测序。

表 1 用于扩增山葡萄 CBF1 基因及 RT-PCR 的引物序列  
Table 1 Primers used for cloning of CBF1 gene and RT-PCR

| 引物<br>Primers                                       | 引物名称及序列(5'→3')<br>The names and sequences of primers(5'→3')                                                    |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 中间片段引物<br>Primers for middle fragment               | P1: TTYMRDgAgACDMgDCACCC<br>P2: ARRAGMADNCCYTCNGCCAT                                                           |
| 侧翼序列引物<br>Primers for 5' and 3' sequences           | PA1: AATGTGGAGTCGCCTAAGT<br>PA2: GGTGCCTAGCCATATCCTGG<br>PB1: TCAGAGAAGGTTGGAGATG<br>PB2: CCGCACGCCTCTGTATATTG |
| 基因编码区全长引物<br>Primers for full length sequence       | PZ1: ATGGACTCGGACCACGAAG<br>PZ2: TTAATCATCATTCACAAAGACAAGT                                                     |
| qRT-PCR 引物<br>Primers for qRT-PCR                   | qCBF-1: CGACACCCAATATACAGAGGCG<br>qCBF-2: AAGGTGCCTAGCCATATCCTGG                                               |
| 内参基因 EF1β qRT-PCR 引物<br>Primers for qRT-PCR of EF1β | EF1β1: AAGAGGACAAGAAGGCAGCA<br>EF1β2: CTAACCGCCTTCTCCAACAC                                                     |

1.2.3 *VaCBF1* 侧翼序列的克隆 为了克隆 *VaCBF1* 基因的 5'和 3'端序列,本研究采用嵌套式反向 PCR 进行扩增。根据中间片段序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对特异引物 PA1、PA2 和 PB1、PB2(引物序列见表 1),用于嵌套式反向 PCR。利用 *Hind* III 酶切山葡萄基因组 DNA,将酶切产物用清洁试剂盒清洗后,在 T4 DNA 连接酶的作用下将酶切产物环化,以环化后的 DNA 作为反向 PCR 的模板,用外侧引物 PA1 和 PA2 进行第 1 轮 PCR 反应。PCR 反应体系为 25 μL,其中包括 ddH<sub>2</sub>O 18.3 μL,buffer 2.5 μL,模板、dNTP、上下游引物各 1 μL, *Taq* 酶 0.2 μL。PCR 反应程序为: 94 ℃预变性 8 min;94 ℃变性 60 s,52 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 90 s,重复 20 个循环;最后 72 ℃延伸 8 min。将第 1 轮 PCR 产物进行 100 倍稀释后作为第 2 轮 PCR 反应的模板,用内侧引物 PB1 和 PB2 进行第 2 轮 PCR 反应。第 2 轮 PCR 反应体系同第 1 轮 PCR,反应程序为:94 ℃预变性 8 min;94 ℃变性 60 s,58 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 90 s,重复 25 个循环;最后 72 ℃延伸 8 min。取 PCR 产物,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的条带回收后与克隆载体 pMD18-T 连接,转化感受态大肠杆菌 DH5α,经扩大培养、蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后,将阳性克隆送交北京金唯智生物科技有限公司进行测序。

1.2.4 *VaCBF1* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析 将目的基因中间片段和侧翼序列相拼接,获得 *VaCBF1* 基因编码区的全长序列。根据拼接得到的基因编码区全长序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物 PZ1、PZ2 (序列见表 1),用于 *VaCBF1* 基因编码区全长序列的扩增。PCR 反应体系为 25 μL,其中包括 ddH<sub>2</sub>O 18.3 μL,buffer

2.5 μL,模板、dNTP、上下游引物各 1 μL, *Taq* 酶 0.2 μL。PCR 反应程序为:94 ℃预变性 8 min;94 ℃变性 60 s,60 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 90 s,重复 35 个循环;最后 72 ℃延伸 8 min。取 PCR 产物,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。将目的条带回收后与克隆载体 pMD18-T 连接,转化感受态大肠杆菌 DH5α,经扩大培养、蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后,将阳性克隆送交北京金唯智生物科技有限公司进行测序,分析测序结果与所拼接得到的序列的一致性。用 Primer Premier 5.0 软件推导 *VaCBF1* 基因编码的氨基酸序列,利用 DNAMAN 软件分析其与其他植物 *CBF* 基因编码的氨基酸序列的同源性,并构建进化树。

1.2.5 山葡萄 *VaCBF1* 基因的表达分析 将山葡萄幼苗分别于盐(200 mmol/L NaCl)、干旱(150 g/L聚乙二醇 4000(PEG4000))及低温(4 ℃)条件下进行处理,分别提取处理 0.5,1,2,4 和 8 h 后山葡萄叶片的总 RNA,并反转录为 cDNA,进行荧光定量 PCR,分析 *VaCBF1* 基因表达量的变化,探讨山葡萄 *VaCBF1* 基因对 3 种逆境胁迫的应答情况。荧光定量 PCR 反应体系及程序按照大连宝生物公司 SYBR Premix Ex *Taq* 试剂盒(Code No. RR420A)说明书中的要求进行。试验以未处理的山葡萄叶片 cDNA 作为对照(CK),以 *EF1β* 为内参基因(引物序列见表 1)。

2 结果与分析

2.1 山葡萄 *VaCBF1* 基因的克隆

试验利用简并引物 P1 与 P2 扩增山葡萄 *VaCBF1* 基因中间片段,PCR 产物电泳结果显示,扩增到 1 个长度约为 500 bp 的条带和 1 条长度约

为 800 bp 的条带(图 1)。对 2 条带分别克隆测序后发现,800 bp 的条带为非特异性扩增,而 500 bp 的条带为 *VaCBF1* 基因的中间片段。反向 PCR 扩增后电泳检测结果显示,扩增到 1 条长度约为 1 100 bp 的条带(图 2),将此片段克隆到 pMD18-T 载体上进行测序,序列分析结果显示,反向 PCR 已成功地克隆到了 *VaCBF1* 基因的侧翼序列。将中间片段与侧翼序列拼接后得到 *VaCBF1* 基因的全长 cDNA 序列。利用引物 PZ1、PZ2 对 *VaCBF1* 基因的 cDNA 全长序列进行 PCR 扩增,得到 1 条长度为 762 bp 的特异条带(图 3),经克隆测序后证实,所克隆的片段为 *VaCBF1* 基因的 cDNA 全长序列,编码 253 个氨基酸,在 GenBank 中的注册号为 DQ517296。

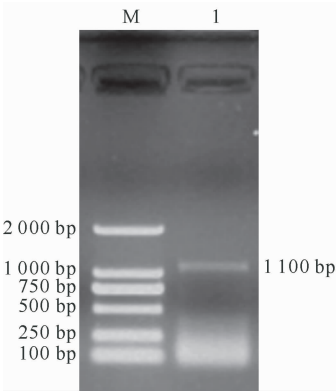


图 2 山葡萄 *VaCBF1* 基因侧翼序列的反向 PCR 扩增结果  
M. DNA Marker (DL2000);  
1. *VaCBF1* 基因侧翼序列的 PCR 扩增结果  
Fig. 2 Amplification of *VaCBF1* by inverse PCR  
M. DNA Marker (DL2000); 1. Inverse PCR product of *VaCBF1*

2.2 山葡萄 *VaCBF1* 基因的序列分析

利用 Primer Premier 5.0 软件将山葡萄 *VaCBF1* 基因的 cDNA 序列翻译为氨基酸序列,并通过 DNAMAN 软件分析 *VaCBF1* 与拟南芥、玉米、小麦以及甜樱桃 CBF 的同源性,结果发现, *VaCBF1* 与其他植物 CBF 均具有大小约为 60 个氨基酸的 AP2/EREBP 结构域,其在所有植物的 CBF 转录因子中均高度保守(图 4)。根据 CBF 转录因子蛋白的三维构象分析发现,该转录因子家族均含有 3 个  $\beta$ -折叠和 1 个  $\alpha$ -螺旋, *VaCBF1* 也具有这样的典型空间构象。另外,构建山葡萄 *VaCBF1* 与其他植物 CBF 的系统发育树,结果表明,山葡萄 *VaCBF1* 与黑麦草、玉米、小麦、甜樱桃、京桃、新疆桃、碧桃、高丛越橘等 CBF 转录因子均具有较高的同源性(图

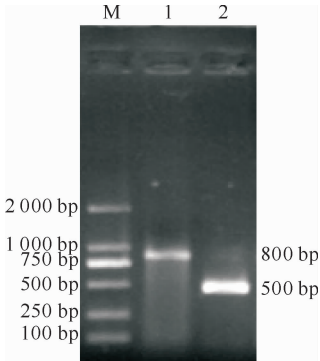


图 1 山葡萄 *VaCBF1* 基因中间片段的 PCR 扩增结果  
M. DNA Marker (DL2000); 1, 2. *VaCBF1* 基因的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 Amplification of *VaCBF1* middle fragment by PCR  
M. DNA Marker (DL2000); 1, 2. PCR product of *VaCBF1*

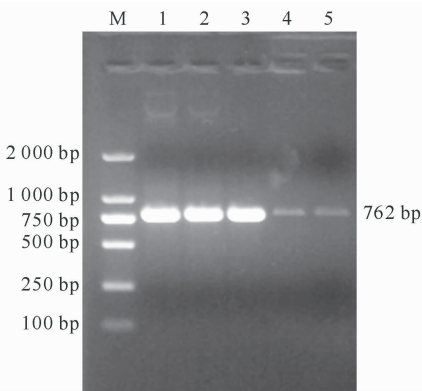


图 3 山葡萄 *VaCBF1* 基因全长 cDNA 序列的克隆  
M. DNA Marker (DL2000); 1~5. PCR 扩增结果  
Fig. 3 Cloning of the full length cDNA of *VaCBF1*  
M. DNA Marker (DL2000); 1~5. Products of PCR

5)。上述结果表明,山葡萄 *VaCBF1* 符合 CBF 转录因子的特征,说明山葡萄 *VaCBF1* 基因属于 CBF 转录因子基因家族。

2.3 山葡萄 *VaCBF1* 基因的表达分析

通过荧光定量 PCR 分析发现,用 200 mmol/L NaCl 处理后,山葡萄 *VaCBF1* 基因的表达量在 0~8 h 均无变化。在 150 g/L PEG4000 处理后,山葡萄 *VaCBF1* 基因的表达量只在 1~2 h 略微升高,而在其他时间点并无明显变化。在低温(4℃)处理下 *VaCBF1* 基因的表达量从 0.5 h 开始升高,在处理 2 h 时表达量达到峰值,为对照表达量的 11.33 倍;之后表达量逐渐降低,至 8 h 时表达量仅为对照的 1.55 倍(图 6)。

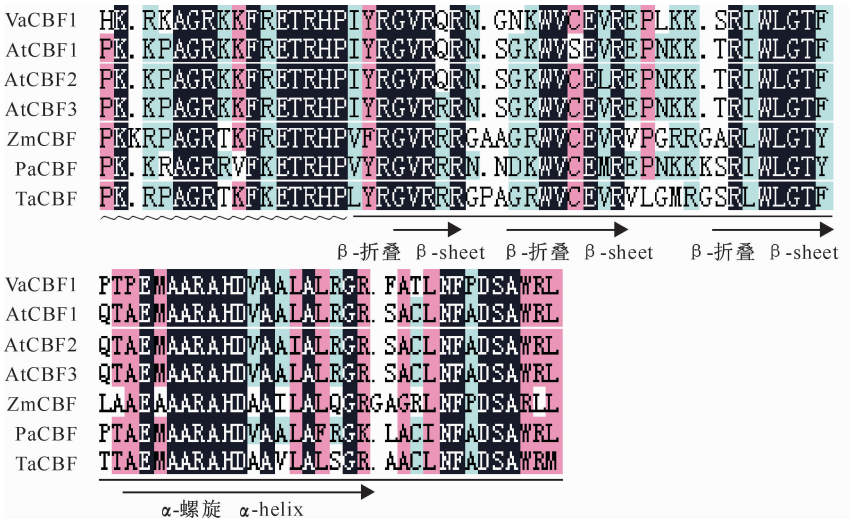


图 4 山葡萄 VaCBF1 与其他植物 CBF 保守区的结构域分析

波浪线部分为信号肽序列,横线部分为 AP2/EREBP 结构域;PaCBF. 甜樱桃;TaCBF. 小麦; ZmCBF. 玉米;AtCBF1~AtCBF3. 拟南芥

Fig. 4 Alignment analysis of VaCBF1 and CBF domains of other plants

NLS sequence is indicated by wave line,AP2/EREBP domains are indicated by solid lines; PaCBF. *Prunus avium*; TaCBF. *Triticum aestivum*; ZmCBF. *Zea mays*; AtCBF1—AtCBF3. *Arabidopsis*

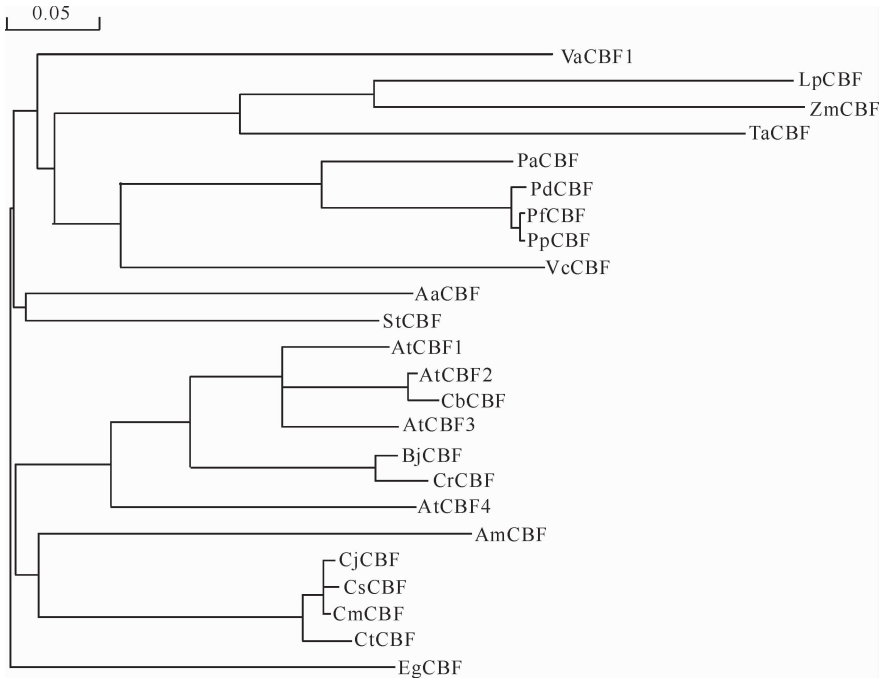


图 5 山葡萄 VaCBF1 与其他植物 CBF 的系统发育树

VaCBF1. 山葡萄;AtCBF1~AtCBF4. 拟南芥;AaCBF. 紫茎泽兰; AmCBF. 沙冬青;BjCBF. 芥菜; CrCBF. 长春花;CbCBF. 离子芥;CjCBF. 柠檬;CsCBF. 甜橙;CtCBF. 柑橘;CmCBF. 柚子;EgCBF. 蓝桉;LpCBF. 黑麦草; PaCBF. 甜樱桃;PdCBF. 京桃;PfCBF. 新疆桃;PpCBF. 碧桃;StCBF. 马铃薯;TaCBF. 小麦;VcCBF. 高丛越橘;ZmCBF. 玉米

Fig. 5 Phylogenetic tree of VaCBF1 and CBF of other plants

VaCBF1. *Vitis amurensis*; AtCBF1—AtCBF4. *Arabidopsis thaliana*; AaCBF. *Ageratina adenophora*; AmCBF. *Ammopiaptanthus mongolicus*; BjCBF. *Brassica juncea*; CrCBF. *Catharanthus roseus*; CbCBF. *Chorispora bungeana*; CjCBF. *Citrus jambhiri*; CsCBF. *Citrus sinensis*; CtCBF. *Citrus trifoliolate*; CmCBF. *Citrus maxima*; EgCBF. *Eucalyptus globulus*; LpCBF. *Lolium perenne*; PaCBF. *Prunus avium*; PdCBF. *Prunus davidiana*; PfCBF. *Prunus ferganensis*; PpCBF. *Prunus persica*; StCBF. *Solanum tuberosum*; TaCBF. *Triticum aestivum*; VcCBF. *Vaccinium corymbosum*; ZmCBF. *Zea mays*

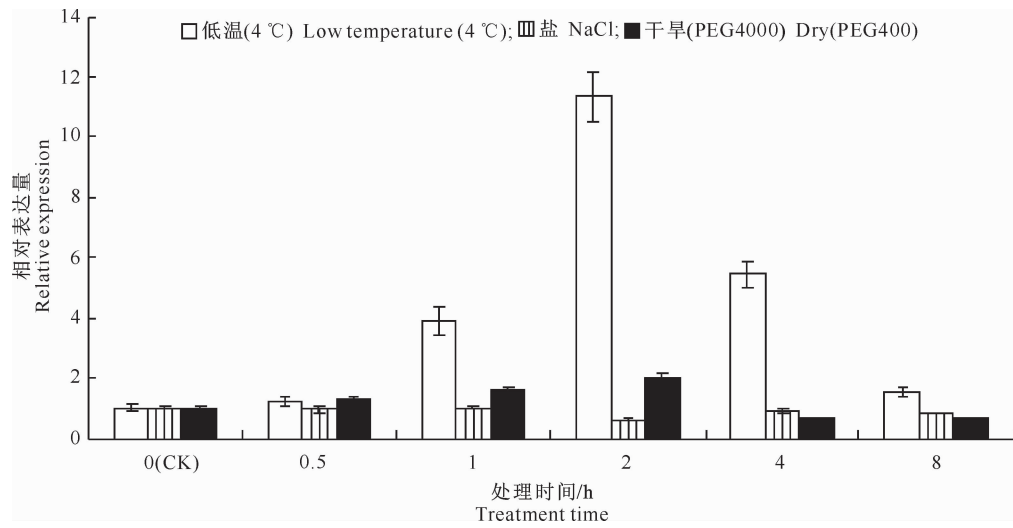


图 6 不同逆境胁迫下山葡萄 VaCBF1 基因的表达量

Fig. 6 Expression analysis of VaCBF1 under various stresses

### 3 讨 论

在自然条件下,植物生长发育不可避免的要受到低温、盐碱和干旱等环境胁迫的影响。其中,温度是影响植物生长、发育,甚至是导致植物死亡最常见的环境因子之一。为了适应和抵御低温胁迫,植物在长期的进化过程中形成了低温驯化的应答机制<sup>[11]</sup>。植物 CBF 转录因子在植物抗逆信号转导过程中起着重要的调控作用,因而其是逆境分子机制研究最多的一类转录因子家族。本研究所克隆的山葡萄 VaCBF1 具有 CBF 转录因子家族保守的核定位信号以及 AP2/EREBP 结构域,并且通过对 VaCBF1 蛋白三维结构的分析发现, VaCBF1 具有 1 个  $\alpha$ -螺旋与 3 个  $\beta$ -折叠,这些结构都是 CBF 转录因子的特征结构<sup>[6,12]</sup>。另外, VaCBF1 也具有 CBF 转录因子的另外 2 个特征序列,即 PKKR/PAGR<sub>x</sub>KFxETRHP 和 DSAWR 结构域<sup>[11]</sup>。对 VaCBF1 结构的分析证实,其具有 CBF 转录因子家族的多个特征序列,所以本研究所克隆的 VaCBF1 属于 CBF 转录因子家族。

目前,关于 CBF 转录因子基因的克隆以及功能研究已经取得了较大的进展,现已从拟南芥、水稻、大豆和杨树等多种植物中克隆到了 CBF 转录因子基因。研究表明,类番茄(*Solanum lycopersicoides*) CBF1 转录因子基因(*SsCBF1*)可以被盐、干旱及低温胁迫所诱导,该基因可以与 *COR15a* 的启动子结合并激活 *COR15a* 基因的表达,从而增强过表达 *SsCBF1* 基因拟南芥植株的抗冻与耐盐能力<sup>[7]</sup>。本研究所克隆得到的山葡萄 VaCBF1 基因的表达只

受低温胁迫所诱导,而对盐及干旱处理不敏感,说明 VaCBF1 基因只参与了植株对低温胁迫的应答。这说明 VaCBF1 基因的表达可能对非生物逆境的响应具有物种特异性,也说明基因的转录水平与基因功能之间可能存在错位性。如 Novillo 等<sup>[13]</sup>报道,低温处理下,拟南芥 CBF1、CBF2 和 CBF3 基因的表达量均明显升高,但敲除 CBF2 的拟南芥突变株却具有更强的耐寒能力,这提示基因表达量的变化只能说明该基因参与了植物对逆境胁迫的应答。所以山葡萄 VaCBF1 基因在植物耐寒信号调控中起正调控还是负调控作用,还有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsive to drought, low-temperature, or high-salt stress [J]. Plant Cell, 1994, 6(2): 251-264.
- [2] Baker S S, Wilhelm K S, Thomashow M F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-drought and ABA-regulated gene expression [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24(5): 701-713.
- [3] Jiang C, Iu B, Singh J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus* [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 30(3): 679-684.
- [4] Lee C M, Thomashow M F. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2012, 109(37): 15054-15059.
- [5] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. Plant Physiology, 2000, 124(4): 1854-1865.

- [6] Akhtar M, Jaiswal A, Taj G, et al. DREB1/CBF transcription factors; Their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants [J]. Journal of Genetics, 2013, 91(3): 385-395.
- [7] Zhang L L, Li Z J, Li J F, et al. Ectopic overexpression of Ss-CBF1, A CRT/DRE-binding factor from the nightshade plant *Solanum lycopersicoides*, confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e61810.
- [8] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Genes Development, 2003, 17(8): 1043-1054.
- [9] Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(395): 225-236.
- [10] Huang G T, Ma S L, Bai L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(2): 969-987.
- [11] Thomashow M F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 50: 571-599.
- [12] Peng Y L, Wang Y S, Cheng H, et al. Characterization and expression analysis of three CBF/DREB1 transcriptional factor genes from mangrove *Avicennia marina* [J]. Aquatic Toxicology, 2013(140/141): 68-76.
- [13] Novillo F, Alonso J M, Ecker J R, et al. CBF2/DREB1C is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(11): 3985-3990.

(上接第 85 页)

- [8] Snook M E, Mason P F, Sisson V A. Polyphenols in the nicotiana species [J]. Tobacco Science, 1986(30): 43-49.
- [9] Stedman R L. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke [J]. Chemical Reviews, 1968(68): 153-207.
- [10] Schlotzhauer W S, Chortyk O T. Recent advances in studies on the pyrosynthesis of cigarette smoke constituents [J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 1987, 12: 193-222.
- [11] 徐照丽. 云南生态环境与云南烤烟香气品质关系的探讨 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 196-200.
- Xu Z L. The relationship between ecological environment and aroma quality of flue-cured tobacco in Yunnan Province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(8): 196-200. (in Chinese)
- [12] Bernard S M, Møller A L, Dionisio G, et al. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 67(1/2): 89-105.
- [13] 金永明, 张明福, 刘百战. 烟草中多元酸和高级脂肪酸的分析 [J]. 烟草科技, 2002(4): 21-24.
- Jin Y M, Zhang M F, Liu B Z. Analysis of polybasic and higher fatty acids in tobacco [J]. Tobacco Science & Technology, 2002(4): 21-24. (in Chinese)
- [14] Yang S S, Smetena I, Huang C B. Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection [J]. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2002 (373): 839-843.
- [15] Cai K, Xiang Z M, Zhang J, et al. Determination of eight tobacco alkaloids in flue-cured tobacco samples by gas chromatography with nitrogen chemiluminescence detection (NCD) [J]. Analytical Methods, 2012, 4: 2095-2100.
- [16] 全国烟草标准化技术委员会. YC/T 202—2006 烟草及烟草制品多酚类化合物绿原酸、茛菪亭和芸香苷的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- National Standardization Technical Committees of Tobacco. YC/T 202—2006 Tobacco and tobacco products-determination of polyphenols-chlorogenic acid, scopletin and rutin [S]. Beijing: Standards Press of China, 2006. (in Chinese)
- [17] 向章敏, 张 婕, 蔡 凯, 等. 衍生化气相色谱质谱联用法同时测定烟叶多种植物甾醇 [J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 11-15.
- Xiang Z M, Zhang J, Cai K, et al. Simultaneous determination of phytosterol in tobacco by gas chromatography mass spectrometry with derivative [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2011, 28(5): 11-15. (in Chinese)
- [18] 王树会, 李天福, 邵 岩, 等. 不同烤烟品种及海拔对烟叶中有机的影响 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(1): 127-130.
- Wang S H, Li T F, Shao Y, et al. Organic acid contents in different flue-cured tobacco cultivars grown at different altitudes [J]. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science, 2006, 28(1): 127-130. (in Chinese)