

SIDREB1B 过量表达可促进番茄果实发育及成熟

李辰 范意娟 纪文龙 魏灵芝 姜金铸 李冰冰 贾文锁*

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要 为探讨 *DREBs* 在果实发育及成熟调控中的作用及机理,以番茄‘Micro-Tom’为试材,克隆得到 1 个 *DREBs* 转录因子 *SIDREB1B*。研究证实,在果实中 *SIDREB1B* 的表达可受脱水胁迫和温度胁迫诱导。将 *SIDREB1B* 构建到带有 *e-GFP* 报告基因的载体上,采用叶盘法将 *SIDREB1B* 基因转入番茄,经报告基因筛选和 *SIDREB1B* 表达检测,成功获得转基因阳性植株。和转空载基因的植株相比,转 *SIDREB1B* 植株的果实发育和成熟进程明显加速。进一步分析表明,*SIDREB1B* 的过量表达,可调控一系列与果实发育和成熟相关的基因表达,其中,色素合成相关基因和果实软化相关基因的表达受到强烈诱导,说明 *SIDREB1B* 可通过调节果实成熟相关基因的表达影响番茄果实发育和成熟进程。

关键词 番茄;Micro-Tom;*SIDREB1B*;转基因;果实

中图分类号 S 641.2

文章编号 1007-4333(2014)03-0073-07

文献标志码 A

Over-expression of *SIDREB1B* promotes fruit development and ripening in ‘Micro-Tom’ plant

LI Chen, FAN Yi-juan, JI Wen-long, WEI Ling-zhi, JIANG Jin-zhu, LI Bing-bing, JIA Wen-suo*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract This study aims to understand the roles of *DREBs* in fruit development and ripening. With ‘Micro-Tom’ as research materials, a member of *DREBs*, *SIDREB1B*, was cloned. It was found that *SIDREB1B* could be induced by dehydration and cold stress in ‘Micro-Tom’ fruit. *SIDREB1B* was constructed into *e-GFP*-containing vector and transformed into ‘Micro-Tom’. *SIDREB1B* transgenic plants were successfully obtained by *e-GFP* screening and *SIDREB1B* expressional analysis. Compared with control plants carrying empty vector, over-expression of *SIDREB1B* significantly promoted fruit ripening. Further analysis showed that over-expression of *SIDREB1B* resulted in a significant increase in many ripening related genes, especially for pigment metabolic genes and fruit softening related genes.

Key words tomato; Micro-Tom; *SIDREB1B* gene; transgene; fruit

DREBs (Dehydration responsive element binding protein) 是一类脱水响应元件 CRT/DRE 结合蛋白。近年来,国内外围绕 *DREBs* 转录因子与植物抗逆的关系开展了大量研究^[1-6]。拟南芥中,*DREB* 转录因子可分为 *DREB1* 和 *DREB2* 两个主要类型,*DREB1* 一般受冷胁迫诱导,*DREB2* 一般受干旱及盐胁迫诱导^[7-12]。在许多植物中的转基因研究证明,*DREBs* 转录因子在植物抗冷、抗旱和抗盐中

有着重要作用^[12-16]。在番茄、草莓和苹果等园艺作物中也发现了 *DREB* 转录因子并进行了基因功能验证^[11,17-20]。这些研究充分说明,*DREBs* 转录因子的核心功能在于调控了植物的抗逆性。

尽管 *DREBs* 在植物抗逆中的作用已得到广泛证实,但有关 *DREBs* 调控植物抗逆的机理尚不明确。一般认为,*DREBs* 调控植物抗逆的基础在于其调控了一系列逆境应答基因的表达,而这些逆境应

收稿日期: 2014-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171921)

第一作者: 李辰, 硕士研究生, E-mail: lichen_year2012@163.com

通讯作者: 贾文锁, 教授, 主要从事果树逆境生理和分子生物学研究, E-mail: jiaaws@cau.edu.cn

答基因编码蛋白可能在渗透调节、自由基清除和亲水蛋白代谢等方面有着重要作用。事实上,人们逐渐注意到 *DREBs* 在植物抗逆中的功能可能与植物的发育调控有关,如转 *DREBs* 基因大多导致植物矮小、根系发达以及根冠比提高^[17-18]。因此, *DREBs* 在植物中的功能及机理仍有待深入探讨。

果实发育和品质调控是园艺作物研究的重要问题。生产经验表明,果实发育和品质形成可能与环境因素有密切的关系。如光照有利于着色,温度变化和干旱胁迫可影响果实糖/酸比和果实成熟进程等^[21-22]。多年来,人们围绕果实发育和成熟调控开展了很多研究,但是,这些研究多集中在生理、生化水平上的探讨,对果实发育的分子机理了解较少。如果说环境胁迫可以影响果实发育和品质形成,那么果实必然具备对环境胁迫‘感知’和‘反应’的能力。抗逆基因 *DREBs* 在果实中是否表达,其在果实中的生物学意义是什么至今研究尚少。因此,本研究以番茄品种‘Micro-Tom’为试材,首先建立基于 *e-GFP* 报告基因检测的高效稳定转基因体系。通过对转基因番茄果实中成熟相关基因表达的分析,探究 *SIDREB* 基因在果实发育中的特殊作用,为深入了解果实发育和成熟调控的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄品种‘Micro-Tom’购自南京苗木种业公司。选择饱满的番茄种子进行播种前处理。用 70%乙醇漂洗 30 s,无菌水冲洗 2 次,10%次氯酸钠消毒 8 min,无菌水冲洗 3 次后,接种于 1/2MS 培养基中。

载体 pK7WG2D 购自比利时 VIB 生物科学研究中心,T载体 pCR8/GW/TOPO 购自 Invitrogen 公司,农杆菌菌株 GV3101 为本实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 目的基因序列获得与引物设计

在 GenBank 中获得 *SIDREB1B* 基因(GenBank: NM_001247194.1)、番茄 *actin* 基因(GenBank: FJ532351.1)、35s-*CaM* 基因(GenBank: V00141)序列,采用 DNAMAN 软件设计引物。

1.2.2 番茄果实离体失水处理

选取发育良好的白果时期番茄果实,为尽量减小不同果实间基因表达差异带来的影响,将每个果实纵切为两半,一半放于湿度 100%的环境中防止失水,另一半放置于通风干燥处,失水 30%后进行

室温温育。分别提取温育 0、6、12 和 18 h 的未失水、失水处理的果实 RNA,检测 *SIDREB1B* 的转录表达量。生物学重复 3 次。

1.2.3 番茄果实低温处理

选取发育良好的白果时期番茄果实,为尽量减小不同果实间基因表达差异带来的影响,将每个果实纵切为两半,一半放于 4 °C 环境低温处理,另一半放于室温环境中。处理时将果实保湿。处理 0、12、24 和 36 h 后分别取样。提取未处理和处理后的果实 RNA,检测 *SIDREB1B* 的转录表达量。生物学重复 3 次。

1.2.4 植物表达载体构建及转化农杆菌

PCR 扩增得到 35s-*CaM*、*SIDREB1B* 基因片段。测序并比对正确后与 T 载体连接。重组 T 载体与表达载体 pK7WG2D 在 LR 交换酶的作用下连接,完成载体构建。将构建好的载体质粒转化农杆菌 GV3101,放于 -80 °C 保存。

1.2.5 番茄稳定遗传转化

活化菌株:将含质粒 pK7WG2D-*SIDREB1B* 的农杆菌 GV3101 在 LB 培养基(含 50 mg/L SPR 和 50 mg/L Rif)上划平板,28 °C 暗培养 2 d。挑取生长良好的单菌落,接种到 50 mL LB 液体培养基中,28 °C、220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值 0.4~0.6(约 12~16 h)。汲取摇菌后 OD 值适当的单菌落活化菌液 50 mL,5 000g 离心 8 min,去掉上清液,在无菌滤纸上倒扣离心管,尽量将上清液去除。

菌液侵染番茄叶片:用适量 MS 液体培养基悬浮沉淀菌体。将 15 d 左右叶龄的番茄组培苗沿叶脉剪成约 3 cm² 大小的叶块。将悬浮的菌液倒入剪好的叶块中,轻摇,浸染 20~30 min。倒出菌液,将叶片放置于无菌滤纸上,吸干叶表面菌液。

共培养:将菌液侵染后的叶片接种在番茄共培养基中,放于 24 °C 培养箱暗培养 3 d。

筛选培养:将共培养 3 d 后的番茄叶片,接种在番茄筛选培养基上,使伤口与培养基充分接触,在培养室环境下光照培养,温度(25±2) °C。

生根培养:约 40 d 左右,侵染后的番茄叶片剪口处可分化出抗性芽,将抗性芽转入番茄生根筛选培养基上生根,获得完整的抗性苗。

1.2.6 转基因番茄植株鉴定

绿色荧光蛋白(*e-GFP*)鉴定:叶片剪口处长出愈伤组织时,将培养瓶放于本实验室自制的荧光显微镜下进行荧光观察,抗性植株愈伤组织有明显的绿色荧

光发出。分化出芽后,抗性芽在荧光显微镜下发绿光。据此可以直接将抗性植株初步筛选出来。坐果后,抗性植株果实在荧光显微镜下发出绿色荧光。

转基因植株 PCR 鉴定:保留 *e-GFP* 鉴定阳性株,选用 CTAB 法提取微量 DNA。扩增 *35S-CaM* 启动子序列,检测目的基因整合情况。

Real-Time PCR 检测:提取转空载对照植株、PCR 阳性株的总 RNA, Real-Time PCR 检测 *SIDREB1B* 基因在转基因植株中的表达情况。

1.2.7 转基因番茄 *SIDREB1B* 基因功能分析

转基因番茄移栽:分子水平的植株检测完成后,将转基因番茄继续培养在生根培养基中,待根系发育良好,长度达 3~4 cm 时将组培苗移栽至育苗钵中。盆土配比为 1:1(营养土:蛭石)。培养环境为本实验室培养室。

转基因番茄果实发育进程分析:转基因番茄移入育苗钵中后,实时追踪其生殖生长进程,包括开花时间、坐果时期等,观察记录果实的生长发育动态。

转基因番茄成熟相关基因的 Real-Time PCR 检测:选择番茄成熟过程中与果实颜色、软化、香气、糖酸含量以及影响果实成熟的激素相关的基因设计引物, Real-Time PCR 分析上述基因在转基因番茄始红期果实中的表达情况。 Real-Time PCR 使用 Bio-Rad 公司的荧光定量 PCR 仪完成。

2 结果与分析

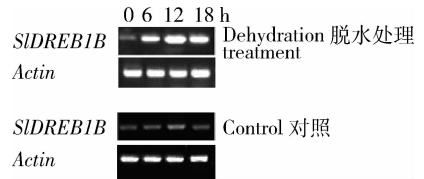
2.1 逆境胁迫对番茄果实中 *SIDREB1B* 表达的影响

在营养器官中 *SIDREB1B* 可受干旱和低温等胁迫的诱导。为探讨果实能否感受干旱和温度胁迫,本研究对干旱和低温胁迫下 *SIDREB1B* 的表达进行了分析。考虑到干旱胁迫直接影响到营养器官的发育,果实干旱采用离体脱水处理。 RT-PCR 分析表明,在非脱水胁迫下 *SIDREB1B* 基因在番茄果实中有微弱表达,脱水胁迫 6 h *SIDREB1B* 表达即可明显提高,到脱水胁迫 12 h *SIDREB1B* 表达达到最大值(图 1)。

低温(4℃)处理也可诱导 *SIDREB1B* 表达。但和脱水胁迫相比,果实对低温胁迫的响应弱。低温处理 12 h 后, *SIDREB1B* 表达与对照相比没有明显变化。胁迫 24 h 后, *SIDREB1B* 表达明显上调,36 h 达到高峰(图 2)。

2.2 转基因番茄植株的获得

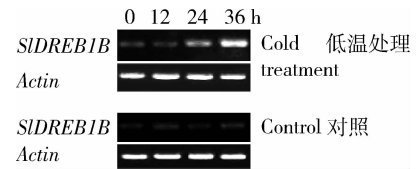
基因功能的研究有赖于转基因材料的获得。为



所注时间为果实脱水 30% 后室温温育时间。
Time marked is the incubation time at room temperature after 30% of fruit dehydration.

图 1 脱水处理对番茄果实 *SIDREB1B* 表达的影响

Fig. 1 Expression of *SIDREB1B* in tomato fruit in response to dehydration treatment



所注时间为果实低温处理时间。
Time marked is the fruit cold processing time.

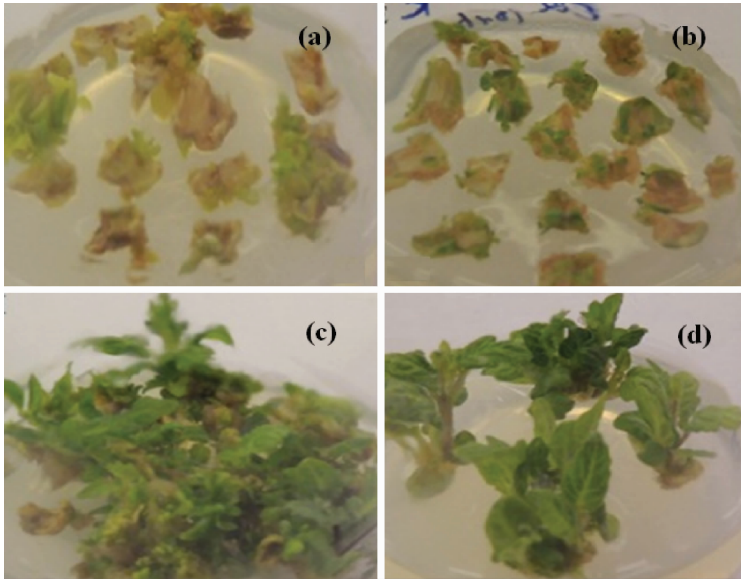
图 2 低温处理对番茄果实 *SIDREB1B* 表达的影响

Fig. 2 Expression of *SIDREB1B* in tomato fruit as affected by hypothermia treatment

为了提高番茄转基因效率,本研究首先对转基因体系进行了优化。图 3 显示的是转基因材料的获得过程。目的基因首先克隆到带有报告基因 *e-GFP* 的质粒载体上,经农杆菌介导侵染、培养和筛选后,得到转基因植株。在转基因材料的培养中,抗生素浓度的确定是至关重要的。本试验体系中的抗生素为卡那霉素。经试验确定,在 100 mg/L 质量浓度下卡那霉素的选择压力最为合适。在此浓度下,番茄叶片外植体愈伤组织形成容易,转基因未成功的材料因不能分化形成不定芽而被淘汰(图 3)。

2.3 转基因番茄的鉴定

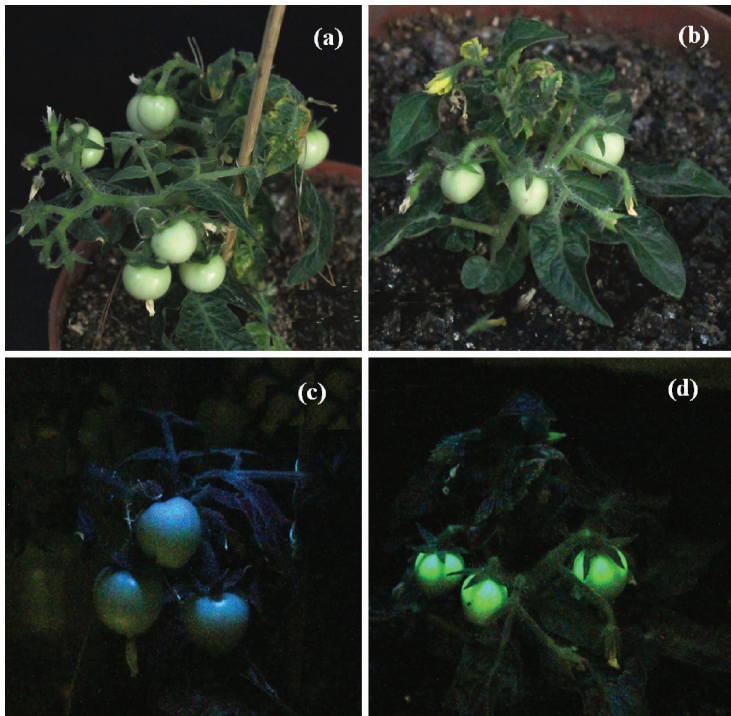
本研究采用 Gateway 体系,载体上带有报告基因 *e-GFP*。 *e-GFP* 的应用为转基因材料的筛选提供了方便。菌液侵染番茄叶片后约 20 d,荧光下可观察到番茄的叶片剪口处有白色或淡黄色的愈伤组织。目的基因成功转化的抗性愈伤组织显示亮绿色荧光,而非抗性愈伤组织基本上看不到颜色。根据愈伤组织的荧光观察,淘汰未成功转化的材料。抗性愈伤组织继续培养直至长出抗性苗。将筛选得到的植株移栽至生根培养基中,待根系生长良好后再将其移栽至土壤中,直至开花结果。图 4 显示的是转基因植株的荧光观察结果。转基因成功的植株中,果实显出亮绿色荧光(图 4(d)),而非转基因番茄果实没有荧光出现(图 4(c))。



(a)目的基因转化番茄叶片在筛选培养基上培养3周分化的愈伤组织;(b)目的基因转化番茄叶片在筛选培养基上培养5周分化的不定芽;(c)番茄抗性芽;(d)番茄抗性苗。
 (a) Callus of leaf explants of tomato, transformed the genes on selection medium cultured for 3 weeks;(b) Adventitious buds regeneration of leaf explants of tomato, transformed the genes on selection medium cultured for 5 weeks;(c) Tomato resistance buds;(d) Tomato resistance seedlings.

图3 叶盘法转化番茄叶片过程

Fig. 3 Tomato leaf disc transformation process

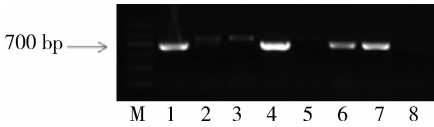


(a)正常光照下非转基因番茄果实;(b)正常光照下转基因番茄果实;
 (c)荧光显微镜下非转基因番茄果实;(d)荧光显微镜下转基因番茄果实。
 (a) Non-transgenic tomato fruit in normal light;(b) Transgenic tomato fruit in normal light;
 (c) Non-transgenic tomato fruit in fluorescence;(d) Transgenic tomato fruit in fluorescence.

图4 转基因植株的e-GFP荧光观察

Fig. 4 Observation of e-GFP fluorescence for transgenic plants

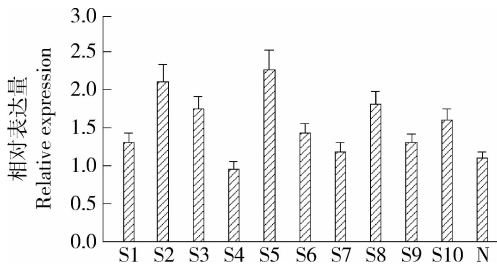
荧光观察提高了转基因材料的筛选效率,但不可避免地出现假阳性。因此,为确定转基因的成功,本研究进一步对转基因材料中 35S-*CaM* 启动子的水平及目的基因的表达进行了检测。PCR 分析表明,大多数经卡那霉素抗性筛选得到的荧光显示阳性植株中都能检测出 35S-*CaM* 启动子的存在,但水平有明显差异。说明,不同株系中基因插入的拷贝数是不同的(图 5)。



M 为 Marker; 1~7 为不同转基因株系; 8 为转空载对照。
M, DNA Marker; 1-7, different lines of transgenic plants;
8, control plant carrying empty vector.

图 5 不同转基因株系中 35S-*CaM* 启动子的 PCR 检测
Fig. 5 PCR analysis for 35S-*CaM* promoter in transgenic plants

为进一步筛选优异的转基因材料,本研究采用 Real-Time PCR 对目的基因的表达进行分析。检测结果显示,不同转基因植株中目的基因的表达水平有所差异(图 6)。转基因材料中目的基因表达水平最高的植株(S5)最终确定为基因功能研究试材。



S1-S10: 转 *SIDREB1B* 基因番茄抗性植株 N: 转空载对照植株
S1-S10, kanamycin resistant tomato plants of transformed *SIDREB1B* gene; N, control plant carrying empty vector.

图 6 转基因番茄植株的 Real-Time 检测
Fig. 6 Real-Time detection of transgenic tomato plants

2.4 *SIDREB1B* 对果实发育的影响

图 7 显示的是转 *SIDREB1B* 基因对番茄果实发育和成熟的影响。和转空载基因的植株相比,转 *SIDREB1B* 基因对植株的营养生长没有明显影响。本研究的核心目的是考察 *SIDREB1B* 对果实发育与成熟调控的影响,因此没有对转基因材料的抗性进行研究。结果表明,和对照相比,转基因植株的果实

大小和形状没有明显差异(图 7)。当对照果实仍处于绿果期时,转基因材料果实已进入始红期,说明转 *SIDREB1B* 基因大大加速了果实发育和成熟进程。

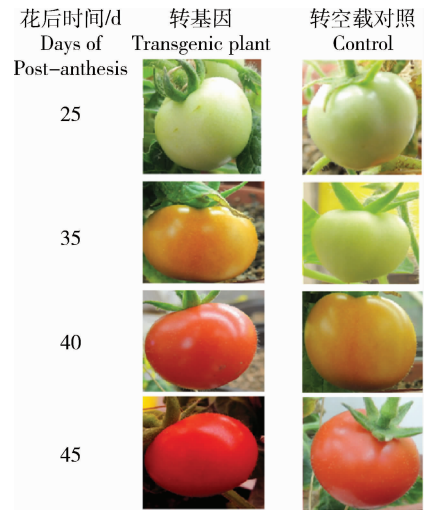


图 7 *SIDREB1B* 过量表达对果实发育进程的影响
Fig. 7 Effect of *SIDREB1B* over-expression on tomato fruit development and ripening

为进一步分析 *SIDREB1B* 调控果实发育的机理,本研究对转 *SIDREB1B* 成熟相关基因进行了分析。果实成熟是一系列代谢变化的结果,其中包括色素代谢、香气代谢和细胞壁代谢等。研究表明:*SIDREB1B* 的过量表达调控了一系列与果实成熟代谢相关的基因表达,其中,果实成熟相关基因 *DDTFR* (Differential display tomato fruit ripening)、色素合成相关基因 *SlCHS* (Naringenin-chalcone synthase) 和 *SlPDS* (Phytoene desaturase) 与对照相比提高了 10 倍以上;果实软化相关基因 *SlEXP1* (Expansion) 的表达也提高了 10 倍以上。此外,*SIDREB1B* 的过量表达还提高了乙烯合成关键酶 ACC (ACC oxidase) 基因的表达水平。

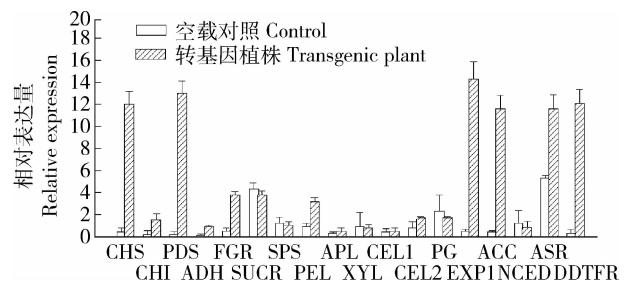


图 8 转 *SIDREB1B* 基因番茄成熟相关基因分析
Fig. 8 Effect of over-expression of *SIDREB1B* on the expressions of ripening related genes

3 讨论

基因过量表达或沉默是探讨基因功能的必要手段。为探讨 *SIDREB1B* 在番茄果实发育中的作用,本研究首先克隆了番茄 *SIDREB1B* 基因。将 *SIDREB1B* 基因构建到含有 35S-CaM 驱动的 *e-GFP* 报告基因的 Gateway 载体上,采用农杆菌介导的叶盘法进行转基因体系的建立。*e-GFP* 报告基因可发出强烈荧光,因此可以通过荧光观察筛选转基因阳性材料,这大大提高了转基因的效率。但是,值得注意的是,某些转基因材料通过荧光观察可能会有假阳性存在。前人研究表明,假阳性的存在是不可避免的,如在草莓遗传转化体系中,以 *GUS* 做报告基因也常常会存在假阳性^[23-25]。因此,除报告基因检测外,转基因是否成功必须进行进一步的基因表达检测。35S-CaM 启动子检测的阳性株系是可靠的转基因材料,Real-Time PCR 分析表明,转基因阳性植株中 *SIDREB1B* 基因的表达远高于转空载的对照,说明转基因材料可用于后续的基因功能的研究。

长期以来,*SIDREB1B* 一直被认为是抗逆专一基因,即 *SIDREB1B* 操纵植物抗逆性的基础在于操纵了一系列与植物抗逆代谢相关的基因,如渗透调节代谢、自由基及其清除代谢以及亲水蛋白的合成等等。本研究发现,在番茄果实中 *SIDREB1B* 的表达同样受脱水及低温胁迫诱导,说明就细胞对胁迫的感知来讲,其信号传导机理可能是共通的。有趣的是在番茄果实中,*SIDREB1B* 的过量表达诱导了很多成熟相关基因的表达。如 *SIDREB1B* 的过量表达极大地提高了色素合成相关基因(*SlCHS* 和 *SlPDS*)和果实软化相关基因(*SlXYL1*、*SlPG* 和 *SlEXP1*)的表达。本研究旨在探讨 *SIDREB1B* 在果实发育中的调控作用,因此,没有就抗逆机理开展深入研究。*SIDREB1B* 操纵果实发育和成熟基因的表达意味着,*SIDREB1B* 不仅调控抗逆代谢,而且在植物发育代谢,至少在果实发育代谢中也起着重要作用。这在 *SIDREB1B* 功能及机理探讨中是一个新的发现,对 *SIDREB1B* 功能的进一步揭示有重要的参考价值。

植物抗逆特别是抗旱机理是非常复杂的。抗逆代谢和发育代谢是难以分开的。如上所述,一般认为 *SIDREB1B* 提高植物抗逆特别是抗旱的机理是操纵了一批与抗逆代谢相关的基因表达。事实上,

SIDREB1B 可提高植物的根冠比,根冠比的提高自然可以提高植物的抗旱性,而根冠比的调控本质上是一个发育调控,所以从营养器官抗逆的角度看,*SIDREB1B* 抗逆功能的发挥在很大程度上在于操纵了植物的发育过程。因此,*SIDREB1B* 可以调控果实发育和成熟进程也是不难理解的。此外,从不同的角度分析,*SIDREB1B* 有不同的生物学意义:从抗逆的角度分析,*SIDREB1B* 可加速果实成熟进程,这也意味着可加速种子成熟的进程,种子一旦形成,自然可以抵御极端逆境。从进化的层面分析,*SIDREB1B* 调控种子成熟实际上是更为强大的抗逆机制。从果实发育和成熟调控的角度分析,*SIDREB1B* 调控果实发育和成熟也是果实发育和成熟调控分子机理的组成部分。目前,有关果实发育机理的研究很多,但大多集中在对其生理、生化及结构基因的研究上,对操纵果实成熟的上游基因了解甚少,因此,*SIDREB1B* 参与发育和成熟控制的发现,为深入揭示番茄果实成熟调控的分子机理提供了重要信息。

参 考 文 献

- [1] 李科友,朱海兰. 植物非生物逆境胁迫 DREB/CBF 转录因子的研究进展[J]. 林业科学,2011,47(1):124-131
- [2] 李志亮,吴忠义,叶嘉,等. DREB 类转录因子及其在植物抗逆基因工程改良中的应用进展[J]. 北方园艺,2010(20):206-210
- [3] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. 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*[J]. Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406
- [4] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290: 998-1009
- [5] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought responsive gene expression[J]. Plant Cell, 2006a, 18: 1292-1309
- [6] Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, et al. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor *DREB2A* in water stress responsive and heat stress responsive gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006b, 103: 18822-18827
- [7] Rae L, Lao N T, Kavanagh T A. Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors[J]. Planta, 2011, 234: 429-444

- [8] Marcotte J W R, Russell S H, Quatrano R S. Abscisic acid responsive sequences from the *Em* gene of wheat[J]. *Plant Cell*, 1998, 23: 969-976
- [9] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 251-264
- [10] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 781-803
- [11] 刘金戈. 八棱海棠和水稻抗逆相关转录因子的克隆及功能鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2007
- [12] Choi D W, Rodriguez E M, Close T J. Barley *CBF3* gene identification, expression pattern, and map location[J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1781-1787
- [13] Gao M J, Allard G, Byass L, et al. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49: 459-471
- [14] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L, encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression[J]. *Plant J*, 2003, 33: 751-763
- [15] Shen Y G, Zhang W K, He S J, et al. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 923-930
- [16] Xue G P. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator *HvCBF2* involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature[J]. *Plant J*, 2003, 33: 373-383
- [17] Hsieh T H, Lee J T, Charng Y Y, et al. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 618-626
- [18] Hsieh T H, Lee J T, Yang P T, et al. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato[J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1086-1094
- [19] 武丽娟. 水稻和八棱海棠中 ERF 类转录因子的克隆及功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007
- [20] 付晓燕. 八棱海棠与水稻 AP2/EREBP 类转录因子的克隆及功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2007
- [21] 邓文生, 张大鹏. 葡萄浆果不同生长期对干旱胁迫敏感性变化的水分生理机制[J]. *园艺学报*, 1998, 25(2): 123-128
- [22] 刘洪涛, 黄卫东, 郝燕燕. 果实对高温逆境的响应及其信号转导机理[J]. *中国食品学报*, 2004, 4(2): 95-98
- [23] 张志宏, 吴禄平. 草莓主栽品种 Tudla 遗传转化体系的建立[J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6(2): 200-204
- [24] 金万梅, 尹淑萍, 鲁韧强, 等. *GO* 基因对草莓遗传转化及抗病性鉴定[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(6): 797-800
- [25] 秦永华. 丰香草莓高效再生的机理及遗传转化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005

责任编辑: 袁文业