

研究报告

Research Report

准噶尔无叶豆 *EsDREB2B* 基因在烟草中的抗逆功能分析

李士敏^{1,2} 李小双¹ 杨红兰¹ 张道远^{1*}

1 中国科学院干旱区生物地理与生物资源重点实验室, 中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐, 830011; 2 中国科学院大学, 北京, 100049

* 通讯作者, zhangdy@ms.xjb.ac.cn

摘要 DREB (dehydration responsive element binding protein) 转录因子在植物响应非生物胁迫上具有重要作用,是颇具潜力的植物抗逆育种候选基因。本研究旨在通过烟草体系,验证前期从准噶尔无叶豆中克隆的 *EsDREB2B* 基因在种子萌发和成苗成长阶段的抗逆功能,并初步探究其调控的下游靶基因。结果表明,转基因株系在干旱、高盐、冷和热胁迫处理下的萌发率都高于野生型烟草,其中盐 and 热胁迫下萌发率差异尤为显著,两月大转基因烟草与野生型植株进行干旱、高盐、冷和热胁迫处理后,转基因较野生型植株叶片萎蔫,黄化和伤害程度较轻,在热胁迫下差异最为显著,恢复培养后,大多野生型烟草表现为枯死状态,转基因植株则叶片萎蔫减轻并开始生长,并且转基因烟草存活率显著高于野生型,均达到了野生型的 3~4 倍。*ERD10B* 和 *Hsp70* 基因在四种胁迫后的转基因烟草中的表达量均较野生型高,*Hsp90* 在热胁迫下较野生型表达量升高,而 *MnSOD*、*P5CS* 等基因的表达量变化不显著。以上结果表明 *EsDREB2B* 基因能提高烟草抗干旱、高盐、冷和热胁迫的能力,是具有潜力的抗逆分子育种候选基因。

关键词 DREB 转录因子, 准噶尔无叶豆, 非生物胁迫, 转基因烟草

Analysis on Stress-resistant Functions of *EsDREB2B* Gene from *Eremosparton songoricum* in Tobacco

Li Shimin^{1,2} Li Xiaoshuang¹ Yang Honglan¹ Zhang Daoyuan^{1*}

1 Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, 830011; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049

* Corresponding author, zhangdy@ms.xjb.ac.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.014.000302

Abstract dehydration-responsive element-binding proteins (DREB) are important regulators in plant responses to abiotic stresses. DREB genes are very promising candidate genes for the research of plant resistance breeding. This study aims at verifying the resistance function of *EsDREB2B*, which was identified from the extreme drought-resistant plant *Eremosparton songoricum*, in the seeds germination and seedlings growth stage of model plant tobacco. We would also like to explore whether *EsDREB2B* regulates the reported downstream genes of DREB genes. Our results showed that transgenic lines germinated better than the WT plants under drought, high salt, heat and cold stresses, and especially for the high salt and heat stresses. For two-month-old seedlings, after drought, high salt, cold and heat stresses, transgenic plants showed less wilting, etiolation and injuries than WT, especially under heat stress. After returning to normal growth condition, most WT plants were still wilted and some plants even withered, while the transgenic lines turned green and began to grow. As compared to the WT plants, the transgenic plants maintained significant high survival rates after four treatments by increasing 3-4 times. The expression of *EsDREB2B* leads to elevated expression of *ERD10B* and *Hsp70* genes in the transgenic lines under four stresses, however the expression of *Hsp90* was enhanced only under heat stress, and other tested genes such as *MnSOD* and *P5CS* showed less obvious changes after treatments. These findings suggest that *EsDREB2B* is responsible for resisting drought, salt, cold and heat stresses, and maybe a helpful resistance gene for molecular breeding.

基金项目 本研究由新疆维吾尔自治区重大专项项目(201330122-3)资助

Keywords DREB transcription factor, *Eremosparton songoricum*, Abiotic stress, Transgenic tobacco

极端的环境例如干旱、盐、高温以及低温等,会严重影响植物的生长。为了适应环境,植物在生理生化及分子水平做出了响应,其中包括一些抗性基因的表达。抗性基因主要分为两种,功能基因和转录因子(Wang et al., 2003)。转录因子是一类重要的上游调控因子,通过与反式作用因子相互结合来调控下游一系列基因的表达(刘强等, 2000, 科学通报, 45(14): 1465-1474)。DREB (The dehydration-responsive element-binding proteins)作为植物特有的转录因子是目前抗逆基因研究的热点之一。

DREB 转录因子属于 AP2/ERF 家族中的一个亚家族,由高度保守的结构域 AP2 和两个保守元件 YRG 以及 RAYD 组成(Agarwal et al., 2006),可以特异性的结合 DRE(dehydration responsive element)顺式作用元件,序列为(TACCGACAT) (Yamaguchishinozaki and Shinozaki, 1994),诱导下游相关基因的表达,使植株从整体水平获得抵抗环境胁迫的能力。DREB 转录因子可分 DREB1 和 DREB2 两类, DREB1 类受低温胁迫强烈诱导,而 DREB2 类受干旱、高盐 and 热胁迫强烈诱导。目前已从大量植物中分离鉴定出 DREB 基因(Challam et al., 2015; Huang et al., 2008; Liu et al., 2007; Stolf-Moreira et al., 2010),并通过转化这些基因得到了抗逆性增强的转基因植株(Mallikarjuna et al., 2011; Morran et al., 2011; Zhang et al., 2009)。但是,在过表达 DREB 基因的同时,许多植株出现了矮化和畸形(Matsukura et al., 2010),因此寻求不仅能增加植物的抗逆性,又不会影响植株生长状态的 DREB 基因成为亟待解决的问题(杜洪伟等, 2008)。

准噶尔无叶豆(*Eremosparton songoricum* (Litv.) Vass.)系多年生豆科、无叶豆属超旱生无叶灌木(张道远等, 2008),仅片断化分布于新疆古尔班通古特沙漠流动沙丘上(尹林克等, 2006)。作为西北干旱荒漠区的标志性植物种群,长期的环境压力使得该种具有抗旱、抗高温、抗风蚀沙埋等抵抗多种非生物胁迫的能力,而其中潜在的抗逆性基因鲜为报道。

前期研究中,项目组从极端抗旱植物准噶尔无叶豆中克隆得到一个新奇的天然截短型 *EsDREB2B* 基因,并在 2 周大的烟草幼苗中验证了该基因具有广谱的抗非生物胁迫性能(Li et al., 2014)。本研究进一步系统验证了该基因在烟草种子萌发和成苗生长两个阶段的抗逆特性,并初步探究该基因对可能下

游靶基因的调控作用。研究对于进一步深入理解 *EsDREB2B* 基因的抗逆功能和抗逆机理奠定基础;同时,研究结果可直接服务于抗逆分子育种,提供遗传背景清晰、抗逆性能优良的新的基因元件。

1 结果与分析

1.1 转基因烟草的鉴定

将潮霉素筛选的 T₁ 代阳性植株移入营养土中培养一段时间,随机挑选 14 株待检测的转基因株系,提取叶片 DNA 和 RNA 进行 PCR 和 RT-PCR 检测。通过 PCR 检测,14 株转基因植物中有 8 株可以扩增出特异的目的条带(图 1)。对这 8 株转基因株系进行进一步的 RT-PCR 检测,最终有 5 株扩增出特异的目的条带,分别为泳道 3、4、6、8、9 (图 2)。挑选了泳道 6、9 对应的株系,分别命名为 L1、L2 进行进一步的抗逆性分析。

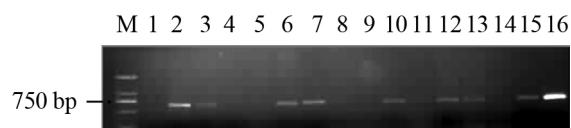


图 1 转基因烟草鉴定的 PCR 电泳图

注: M: Maker DL2000; 1: 阴性对照; 2~15: 待检测转基因烟草植株; 16: 阳性对照

Figure 1 PCR analysis of transgenic tobacco plants

Note: M: Maker DL2000; 1: Negative control; 2~15: Transgenic tobaccos for detecting; 16: Positive control

1.2 转基因烟草种子的萌发率

WT 和转基因(L1 和 L2) T₂ 代种子在各种胁迫下的萌发率(图 3)在正常的 MS 培养基上,WT 和转基因种子的萌发率没有明显的差异,萌发率都接近 100%。在高盐和热胁迫的情况下,WT 种子的萌发率

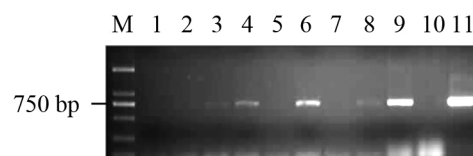


图 2 转基因烟草鉴定的 RT-PCR 电泳图

注: M: Maker DL2000; 1: 阴性对照; 2~10: 待检测转基因烟草植株; 11: 阳性对照

Figure 2 RT-PCT analysis of transgenic tobacco plants

Note: M: Maker DL2000; 1: Negative control; 2~10: Transgenic tobaccos for detecting; 11: Positive control

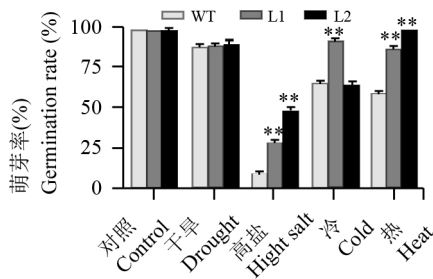


图3 转基因烟草种子萌发率

注: WT: 野生型烟草; L1,L2: 转基因烟草

Figure 3 The seed germination rate of transgenic tobacco

Note: WT: Wild-type tobacco; L1,L2: transgenic tobacco

分别为 9%和 60%，而转基因株系 L1 萌发率分别为 29%和 88%，L2 为 48%和 98%，通过数据显示转基因株系 L1 和 L2 萌发率都显著的高于 WT。在经受干旱胁迫后，转基因株系 L2 在萌发的数量上高于 WT。除此之外，与其它 DREB2 类转录因子不同的是转基因株系 L1 的种子在 4℃ 条件下的萌发率为 93%，表现出了明显的抗冷性，WT 萌发率则为 66%，显著性的低于转基因株系 L1。

1.3 四种胁迫对 WT 和转基因烟草生长和存活率的影响

挑选转基因 L1 和 L2 株系和 WT 植株，进行干旱、高盐、冷和热胁迫，并在胁迫后复水，观察表型并统计存活率(图 4)。表型观察显示(图 4A)：在各种胁迫处理前，转基因植株和对照植株长势相当；在干旱胁迫后，转基因和 WT 均呈现叶片边缘卷曲并呈暗绿色的表型，WT 植株甚至出现下部叶片枯黄的症状，而转基因的植株萎蔫和受伤害程度较轻，且复水后，WT 植株呈现枯死状态，而转基因植株却能成活并恢复生长；在高盐胁迫后，转基因和 WT 植株均呈现不同程度的萎蔫症状，然而 WT 整株都呈现黄化

表象，转基因植株则只有下部叶片黄化，而恢复培养后，WT 基本不能恢复，转基因植株虽仍有轻微萎蔫症状，但较胁迫时状态已有了一定程度的恢复；冷胁迫后，转基因植株和 WT 植株均呈现严重冻害的表型，植株整体严重萎蔫，叶片颜色呈墨绿色，厚而脆，恢复后，WT 植株大部分死亡，而转基因植株却基本长出新叶；在热胁迫后，WT 和转基因植株都出现严重的萎蔫，移至正常室温恢复生长后，WT 植株基本枯死，而转基因植株则有少部分恢复正常生长。胁迫后存活率的统计结果发现(图 4B)：无论是转基因还是 WT 株系在胁迫后都出现了一定程度的死亡，然而总体上转基因植株较 WT 表现出了更高的存活率。在干旱和盐胁迫后，转基因植株的成活率大约是 WT 的 3 倍，转基因植株的为 65%，WT 为 20%。而在冷和热胁迫后，转基因植株的存活率分别为 60%和 20%，而 WT 只有 15%和 5%，转基因植株的存活率达到了野生型的 4 倍。

以上实验证明，转 *EsDREB2B* 基因植株较 WT 具有更强的抵抗胁迫能力和更高的自我恢复能力。

1.4 下游基因表达分析

选取已经报道过的 *DREB* 基因的下游基因如脱水相关基因 *ERD10B*、*ERD10C*、*LEA*，抗氧化相关基因 *APX*、*MnSOD*、*Cu/ZnSOD*、*CAT*，脯氨酸合成关键酶基因 *P5CS*，热激蛋白相关 *Hsp70*、*Hsp90*、*HSF* 等来初步探索 *EsDREB2B* 的可能的下游基因。结果显示(图 5)，在转基因烟草当中，*EsDREB2B* 表达量在胁迫前和胁迫后均有表达；下游基因 *ERD10B* 胁迫前不表达(如冷胁迫)或者只有少量的表达(如干旱、盐和热)，当胁迫 3 小时后，各种胁迫下的转基因植株当中 *ERD10B* 的表达量都表现为不同程度的增加，转基因植株中 *Hsp70* 除在冷胁迫后没有出现明显的表达量变化外，经过其它三种胁迫后都出现表达量上调的

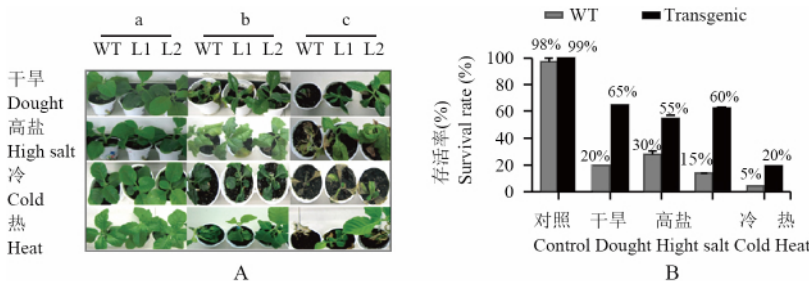


图4 两月大转基因和野生型烟草植株在干旱、高盐、冷和热胁迫下的表型和存活率

注: WT: 野生型烟草; L1,L2: 转基因烟草; a: 胁迫前; b: 胁迫后; c: 恢复

Figure 4 Phenotype and survival rate of two-month old transgenic and WT tobacco plants in drought, high salt, cold and heat stress

Note: WT: Wild type; L1,L2: Transgenic tobacco; a: Before stress; b: After stress; c: Restore

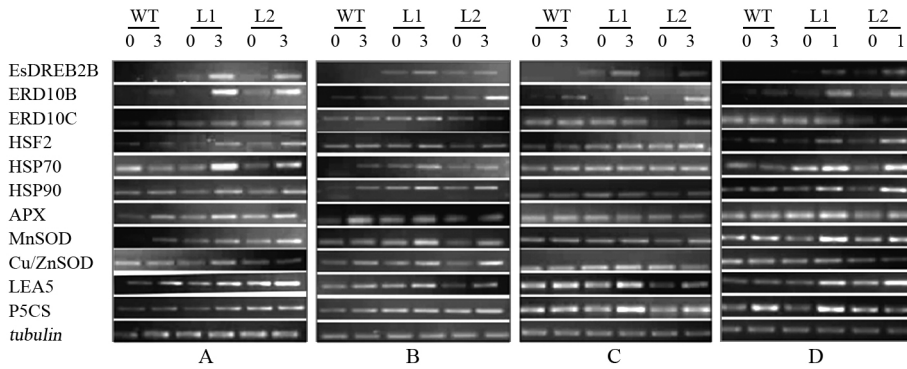


图5 下游基因半定量 RT-PCR 分析

注: WT: 野生型烟草; L1,L2: 转基因烟草株系; A: 干旱; B: 高盐; C: 冷; D: 热

Figure 5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of expression of downstream genes

Note: WT: Wild type; L1,L2: Transgenic tobacco; A: Drought; B: High salt; C: Cold; D: Heat

趋势,在干旱和热胁迫下上调最为明显;经过热胁迫后 *Hsp90* 基因在转基因株系 L1 和 L2 中出现明显的上调。而在 WT 当中,无论是胁迫前还是胁迫后,基因表达量均无明显的变化趋势。以上结果说明, *ERD10B*、*Hsp70* 和 *Hsp90* 不同程度的响应了 *EsDREB2B* 的表达,而其它下游基因(*ERD10C*, *LEA*, *APX*, *MnSOD*, *Cu/ZnSOD*, *CAT*、*P5CS*, *HSF*)可能不参与 *EsDREB2B* 调控的信号通路。

2 讨论

目前, *DREB2* 类基因提高转基因植物抗逆性的报道较多,但都局限于某一个或两个特定胁迫抗性。通过对一些主要的 *DREB2* 基因过表达的转基因植株的抗性研究的文献整理发现,过表达 *AtDREB2A-CA* (Sakuma, 2006)、*OsDREB2B;2* (Matsukura et al., 2010)、*ZmDREB2A* (Qin et al., 2007) 和 *GmDREB2A* (Mizoi et al., 2013) 的转基因拟南芥显著增强了抗干旱、热胁迫的能力,但抗高盐的能力则没有提高。过表达 *CAP2* (Shukla et al., 2006; Shukla et al., 2009)、*PgDREB2A* (Agarwal et al., 2010) 和 *LcDREB* (Ban et al., 2011) 基因提高了转基因植物的干旱、高盐和热胁迫的耐受能力。而过表达 *EsDREB2B* 却能全面提高转基因烟草的抗旱、高盐、冷和热的能力。

同时,有些 *DREB2* 基因的转基因植物虽然提高了逆境胁迫下的抗性,但是正常生长条件下,转基因植物表现出严重的生长抑制或缺陷 (Matsukura et al., 2010; Qin et al., 2007)。虽然 RD29 诱导型启动子的应用,改善了对正常情况下转基因植物长势的影响 (如 *OsDREB2B;2*),但综合抗性的提高却一直是个难题。*EsDREB2B* 和 *CAP2* 基因是目前极少数能够同时

提高转基因植物三大非生物胁迫抗性(干旱,高盐和热胁迫),且正常生长条件下不会造成转基因植物生长缺陷的 *DREB2* 类基因。此外,转 *EsDREB2B* 基因的烟草还显示出了一定的抗冷能力。而如上所提到的能广泛响应干旱、高盐、冷、热和脱落酸胁迫的 *OsDREB2B* 基因,其转基因植株仅表现出了抗干旱和热胁迫的能力。

DREB 作为一个逆境胁迫相关的转录因子基因,一个重要的特征就是它能调控下游许多基因的表达,从而快速、高效的启动植物体内一系列的抗逆调控途径。*EsDREB2B* 转基因烟草植株在胁迫后除了 *ERD10B*、*Hsp70* 等少数几个基因表现出在干旱胁迫后是上调表达的,其余大部分基因如 *APX*、*MnSOD*、*P5CS*、*Lea*、*Hsp90*、*HSF* 等在转 *EsDREB2B* 基因烟草里上调不明显,而这些基因却在 *AtDREB2A* (Sakuma, 2006)、*LbDREB* (Ban et al., 2011)、*PgDREB2A* (Agarwal et al., 2010) 的转基因植株里被证明强烈诱导表达。这些结果初步说明了 *EsDREB2B* 的下游调控基因可能与非截短型的 *DREB2* 基因的有所不同,更加细致和大规模的深入分析需要开展。

因此, *EsDREB2B* 不以牺牲植物生物量为成本,是目前报道的极少数抗逆广谱的作物抗逆分子育种的候选基因。同时也为进一步的探讨沙漠植物准噶尔无叶豆的抗逆分子机理提供了分子水平上的理论依据。

3 材料与方法

3.1 试验材料

实验用烟草种子为 Petite Havana SR1。pMD19-T-*EsDREB2B* 质粒由本实验室保存。农杆菌菌株

LBA4404 由中科院新疆理化与技术研究所肖向文研究员提供。植物表达载体 pCAMBIA1301 由新疆大学生命科学与技术学院张富春教授提供。

3.2 试验方法

3.2.1 真核表达载体的构建与鉴定

用 *Kpn*I 和 *Pst*I 分别酶切 pMD19-T-EsDREB2B 质粒载体和植物真核表达载体 pCAMBIA1301, 分别回收酶切产物, 连接, 转化大肠杆菌细胞。用 *EsDREB2B* 基因 ORF 引物 ORF-f 5'-ATGAGTGCAACTTGCATGCA-3' 和 ORF-r 5'-AGACAATGAAGGATCGGAGG-3' 做质粒 PCR, 同时以 *Kpn*I 和 *Pst*I 做质粒双酶切来确定重组质粒 pCAMBIA1301-EsDREB2B 的成功构建。pCAMBIA1301-EsDREB2B 植物表达载体构建的示意图(图 6)所示。

3.2.2 农杆菌介导的烟草遗传转化

烟草的转化采用叶圆盘法(Fisher and Gultinan, 1995)。烟草种子用浓度 75%酒精浸泡 30 s, 1% NaClO 浸泡 10 min, 然后用无菌水冲洗 5 遍, 接种于 MS 培养基上, 16 h 光照, 28℃ 培养 30 d。将剪好的叶盘(直径约为 5 cm)叶片放入 OD_{600} 值为 0.6~0.8 农杆菌侵染液, 10 min 后 28℃ 黑暗条件下进行共培养。4~6 d 后, 放于选择分化培养基上培养, 每 10~15 d 继代一次。选择培养 2~3 周后, 待叶盘周围分化出抗性芽, 且抗性芽长至 2~3 cm 时, 切下插入到选择生根培养基中, 进行生根培养。待有 5~7 条幼根且长 3~4 cm 的时候, 移出炼苗 4~6 d, 再转入沙土培养。

3.2.3 转基因烟草的鉴定

将获得的转基因烟草的种子进行潮霉素抗性筛选, 并对具有抗性的植株进行 DNA 水平的 PCR 检测和 RNA 水平的 RT-PCR 检测。植株总 DNA 的提取采用 CTAB 法(Porebski et al., 1997), 总 RNA 用 TaKaRa 公司 RNAiso 试剂提取。以野生型(WT)烟草总 DNA 或 cDNA 为阴性对照, 以阳性重组质粒 pCAMBIA1301-EsDREB2B 为阳性对照。挑选 DNA 和 RNA 水平均能检测到特异目的条带的株系为转

基因阳性植株。每代种子进行如上筛选, 直至筛选获得 T_2 代种子。

3.2.4 转基因烟草的萌发率分析

转基因两个株系(L1 和 L2)的 T_2 代种子和野生型烟草种子各 150 粒平铺在各种 MS 胁迫培养基中进行萌发实验。用 MS+200 mmol/L 甘露醇并置于正常生长温度 28℃ 培养 20 d 来模拟干旱胁迫; 用 MS+150 mmol/L NaCl 并置于正常生长温度 28℃ 培养 20 d 来模拟盐胁迫(于瑞等, 2013); 将 MS 培养基放入 4℃ 培养 4 d 用来模拟冷胁迫, 置于 37℃ 培养 5 d 模拟热胁迫处理。各种胁迫结束后, 统计转基因烟草和野生型烟草的萌发率。

3.2.5 转基因烟草的抗逆性分析

将在 MS 培养基上正常生长至两周大的转基因株系 T_3 代幼苗 L1, L2 以及 WT 植株移栽到营养土的花盆中, 正常生长至两个月大时, 开始实施各种胁迫。转基因各个株系和野生型烟草各 20 株用于此实验。对于干旱胁迫, 用 10% PEG6000 浇两月大苗, 每株(每盆)每次浇灌 200 mL, 每 3 d 浇一次, 持续 12 d 后正常浇水进行复水培养 14 d; 对于盐胁迫, 用 300 mmol/L NaCl 溶液浇灌幼苗, 每株每次 200 mL, 每 3 d 浇一次, 持续 12 d 后进行复水 14 d; 对于冷胁迫, 将两月大苗置于温度 4℃ 培养箱中进行冷锻炼, 正常浇水(每 3 d 浇灌一次, 每株每次 200 mL 自来水), 培养 6 d 后移至温度 -20℃ 胁迫 1 h, 之后转移至正常温室(28℃)中进行恢复培养 14 d。对于热胁迫, 将两月大苗置于温度 45℃ 培养箱中胁迫 12 h 后移至正常温室(28℃)中进行恢复培养 14 d。

胁迫前, 胁迫后和恢复三个阶段均拍照观察植株表型, 并统计在各个胁迫情况下转基因株系和野生型植株的存活率。

3.2.6 下游基因表达量分析

对胁迫后的两月大转基因和 WT 植株进行 RNA 提取, 然后挑选与植物脱水、抗氧化和热胁迫等相关的 10 个被报道过的 DREB 下游基因, 用烟草 TUB2 作为内参基因, 进行半定量 RT-PCR 实验, 来探讨 *EsDREB2B* 基因可能的下游调控基因。以 Genbank 下载的各个基因序列为模板, 用 Primer premier5 设计各基因引物, 实验中所用各参考基因的登录号, 功能及引物序列等信息见表 1。

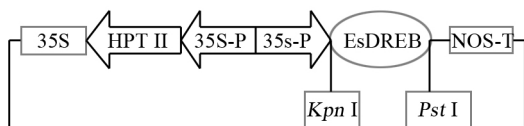


图 6 pCAMBIA1301-EsDREB2B 植物表达载体构建示意图
Figure 6 Construction diagram of pCAMBIA1301-EsDREB2B recombinant

作者贡献

李士敏执行本研究的试验设计、试验研究与论

表 1 半定量 RT-PCR 引物信息表

Table 1 Primer information for semi-quantitative RT-PCR

基因 Gene	登录号 Accession	功能 Function	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')	长度(bp) Length (bp)
<i>NtERD10B</i>	AB049336	脱水相关 Dehydration	ACGGACGAATACGGCAATC TCTCCTTAATCTTCTCCTTCATCC	307
<i>NtERD10C</i>	AB049337	脱水相关 Dehydration	AGGTTGAAGAGGGTAGCGCAAACG TCCTCTTGGGCATGAGTTGGCT	100
<i>NtLea5</i>	AF053076	脱水相关 Dehydration	GTCCAGGTGGAGTGAGAGG GGGACGTGGTATGGTAACCA	300
<i>NtHSF2</i>	ABO14484	热激因子 Heat shock factor	AGAGTTGGATGAATCTACAAGTTG CACTGTCTACTGGTTTGTCTTC	314
<i>NtHsp70</i>	AY253326	热激蛋白 Heat shock protein	TCGAGAGCATCTGCAATCCC ACGAGCACTGATCACTCCACACA	158
<i>NtHsp90</i>	AB264546	热激蛋白 Heat shock protein	TGACATGCCGGCTTTGGAGGA CACAAATGCCAAACCAAAAGAGCCA	230
<i>NtAPX</i>	U15933	自由基清除 Radicals scavenging	TCTGATCCTGCTTCCGCCCC TGCCACCACTCCCACTCTTCT	152
<i>NtMnSOD</i>	AB093097	自由基清除 Radicals scavenging	GCAACTCCACGGCTTCCAGACC CGATAGCCCAACCAAGAGAACC	300
<i>NtCu/ZnSOD</i>	EU12352	自由基清除 Radicals scavenging	TGTCACGGGACCACATTAC CACCAGCATTCCAGTAGC	251
<i>NtP5CS</i>	HM854026	脯氨酸合成 Proline synthesis	GACGCTATCAGTACGCGGAA GGAATGCCAGCATAAGCAGC	296
<i>NtTUB2</i>	AJ421412	内参基因 Reference gene	CGTCGTTTCTGTTCCAT CCACCTCCAATAGTCTTGTC	205
<i>EsDREB2B</i>	HQ687367	目的基因 Interest gene	AGCCGAGAAGCCTGTTA CCCAAGTCCTTTGCCTA	185

文的撰写；李小双完成后期试验数据的整理与图片的处理；杨红兰参与试验的指导；张道远负责试验设计的指导以及论文审校与修改等。

致谢

本研究由新疆维吾尔自治区重大专项项目(201330122-3)资助。

参考文献

- Agarwal P., Agarwal P.K., Joshi A.J., Sopory S.K., and Reddy M. K., 2010, Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes, *Molecular Biology Reports*, 37(2): 1125-1135
- Agarwal P.K., Agarwal P., Reddy M.K., and Sopory S.K., 2006, Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants, *Plant Cell Rep.*, 25(12): 1263-1274
- Ban Q., Liu G., and Wang Y., 2011, A DREB gene from *Limonium*

bicolor mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco, *Journal of Plant Physiology*, 168(5): 449-458

Challam C., Ghosh T., Rai M., and Tyagi W., 2015, Allele mining across *DREB1A* and *DREB1B* in diverse rice genotypes suggest a highly conserved pathway inducible by low temperature, *Journal of Genetics*, 94(2): 231-238

Du H.W., Chen F., and Xiao G.Y., 2008, Study on DREB Transcriptional factors for improvement of crop drought tolerance, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, (6): 1-6 (杜洪伟, 陈芬, 肖国樱, 2008, 提高作物耐旱性的 DREB 转录因子研究进展, *生物技术通报*, (6): 1-6)

Fisher D.K., and Guiltinan M.J., 1995, Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol, *Plant Molecular Biology Reporter*, 13(3): 278-289

Huang B., Jin L., and Liu J.Y., 2008, Identification and characterization of the novel gene *GhDBP2* encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*), *Journal of Plant*

- Physiology, 165(2): 214-223
- Li X.S., Zhang D.Y., Li H.Y., Wang Y.C., Zhang Y.M., and Wood A.J., 2014, *EsDREB2B*, a novel truncated DREB2-type transcription factor in the desert legume *Eremosparton songoricum*, enhances tolerance to multiple abiotic stresses in yeast and transgenic tobacco, BMC Plant Biology, 14: 44
- Liu N., Zhong N.Q., Wang G.L., Li L.J., Liu X.L., He Y.K., and Xia G.X., 2007, Cloning and functional characterization of PpDBF1 gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*, Planta, 226(4): 827-838
- Mallikarjuna G., Mallikarjuna K., Reddy M.K., and Kaul T., 2011, Expression of OsDREB2A transcription factor confers enhanced dehydration and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.), Biotechnology Letters, 33(8): 1689-1697
- Matsukura S., Mizoi J., Yoshida T., Todaka D., Ito Y., Maruyama K., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2010, Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes, Molecular Genetics and Genomics, 283(2): 185-196
- Mizoi J., Ohori T., Moriwaki T., Kidokoro S., Todaka D., Maruyama K., Kusakabe K., Osakabe Y., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2013, *GmDREB2A;2*, a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is post-translationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression, Plant Physiol., 161(1): 346-361
- Morran S., Eini O., Pyvovarenko T., Parent B., Singh R., Ismagul A., Eliby S., Shirley N., Langridge P., and Lopato S., 2011, Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors, Plant Biotechnology Journal, 9(2): 230-249
- Porebski S., Bailey L.G., and Baum B.R., 1997, Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components, Plant Molecular Biology Reporter, 15(1): 8-15
- Qin F., Kakimoto M., Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Tran L.S., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2007, Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L., The Plant Journal, 50(1): 54-69
- Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2006, Functional analysis of an arabidopsis transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression, The Plant Cell, 18(5): 1292-1309
- Shukla R.K., Raha S., Tripathi V., and Chattopadhyay D., 2006, Expression of *CAP2*, an APETALA2-family transcription factor from chickpea, enhances growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco, Plant Physiology, 142(1): 113-123
- Shukla R.K., Tripathi V., Jain D., Yadav R.K., and Chattopadhyay D., 2009, CAP2 enhances germination of transgenic tobacco seeds at high temperature and promotes heat stress tolerance in yeast, The FEBS Journal, 276(18): 5252-5262
- Stolf-Moreira R., Medri M.E., Neumaier N., Lemos N.G., Brogin R.L., Marcelino F.C., de Oliveira M.C., Farias J.R., Abdelnoor R.V., and Nepomuceno A.L., 2010, Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soy bean, Genetics and Molecular Research, 9(2): 858-867
- Wang W., Vinocur B., and Altman A., 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, Planta, 218(1): 1-14
- Yamaguchishinozaki K., and Shinozaki K., 1994, A Novel Cis-Acting element in an arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress, Plant Cell, 6(2): 251-264
- Yin L.K., Tan L.X., and Wang B., eds., 2006, Rare endangered endemic higher plants in Xinjiang of China, Xinjiang Scientific and Technical Publishing House, Urumq, pp.74-75 (尹林克, 谭丽霞, 王兵, 2006, 新疆珍稀濒危特有高等植物, 新疆科学技术出版社, 新疆, pp.74-75)
- Yu R., Hu Y., Huang X.X., Shen Z.D., Han Y.S., Deng S.R., Zhao R., Shen X., and Chen S.L., 2013, Overexpression of kandelia candel C2H2 zinc-finger protein gene *KcZFP* enhanced salinity tolerance in tobacco plant, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 32(2): 149-158 (于瑞, 胡月, 黄旭新, 申泽丹, 韩彦莎, 邓澍荣, 赵瑞, 沈昕和陈少良, 2013, 过表达秋茄 C2H2 型锌指蛋白基因 *KcZFP* 提高烟草耐盐性, 基因组学与应用生物学, 32(2): 149-158)
- Zhang D.Y., Ma W.B., Shi X., Wang J.C., Wang X.Y., 2008, Distribution and bioecological characteristics of *Eremosparton songoricum* a Rare Plant in Gurbantunggut Desert, Zhongguo Shamo (Journal of Desert Research), (28): 430-436 (张道远, 马文宝, 施翔, 王建成, 王习勇, 2008, 准噶尔无叶豆的地理分布、群落学特征及生物生态学特性, 中国沙漠, (28): 430-436)
- Zhang Y., Chen C., Jin X.F., Xiong A.S., Peng R.H., Hong Y.H., Yao Q.H., and Chen J.M., 2009, Expression of a rice *DREB1* gene, *OsDREB1D*, enhances cold and high-salt tolerance in transgenic Arabidopsis, BMB Reports, 42 (8): 486-492