

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.015

张哲敏, 孙萍, 王旺田, 等. 三种不同抗冻性葡萄中  $CBF_2$  基因的生物信息学分析及植物表达载体构建[J]. 广西植物, 2013, 33(1): 82–88

Zhang ZM, Sun P, Wang WT, et al. Bioinformatics analysis of  $CBF_2$  in three different chilling resistance grapes and construction of plant expression vector [J]. *Guihaia*, 2013, 33(1): 82–88

## 三种不同抗冻性葡萄中 $CBF_2$ 基因的生物信息学分析及植物表达载体构建

张哲敏, 孙萍, 王旺田, 栗孟飞, 李唯\*, 王雅琳

(甘肃农业大学 生命科学技术学院 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 兰州 730070)

**摘要:** 从赤霞珠、贝达和山葡萄三种不同抗冻性葡萄的基因组 DNA 中分别克隆了  $CBF_2$  全长基因, 并利用生物信息学的方法进行了分析。结果显示: 三种葡萄的  $CBF_2$  基因长均为 969 bp, 编码 253 个氨基酸, 与 GeneBank 公布的序列相比, 核苷酸相似性在 96.7%~97.94% 之间。生物信息学分析显示 3 种不同抗冻葡萄的  $CBF_2$  基因具有连续的开放阅读框, 推倒的氨基酸序列具有 AP2 结合域, 初步判断克隆的  $CBF_2$  具有诱导抗寒性产生的作用。但氨基酸序列、进化树、理化性质、疏水性/亲水性等在抗寒性较强的山葡萄、贝达与抗寒性较差的赤霞珠之间存在一些差异, 与 GenBank 上的原始序列同源性最低的是赤霞珠, 而且其  $CBF_2$  N 端 7 个氨基酸残基序列与山葡萄和贝达的氨基酸序列存在较大差异, 且具有较强的疏水性, 这些差异可能与赤霞珠较弱的抗寒特性有关。以带有 35S 启动子的载体 pBI121 为基础, 成功构建了植物表达载体 pBI121-CaMV35S- $CBF_2$ , 为深入研究  $CBF_2$  基因在葡萄抗寒性中的作用提供了基础资料。

**关键词:** 葡萄;  $CBF_2$  转录激活因子; 生物信息学分析; 克隆; 表达载体构建

中图分类号: Q7, Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)01-0082-07

## Bioinformatics analysis of $CBF_2$ in three different chilling resistance grapes and construction of plant expression vector

ZHANG Zhe-Min, SUN Ping, WANG Wang-Tian,

LI Meng-Fei, LI Wei\*, WANG Ya-Lin

(College of Life Sciences and Technology, Gansu Agricultural University, Gansu Provincial Key Lab of Aridland Crop Science, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The full-length gene of C-repeat binding factor 2 was amplified from the genomic DNA in three different chilling resistance grapes: *Cabernet sauvignon*, *Beta* and *Vitis amurensis*. The methods of bioinformatics were also applied to analyze the sequencing results. Sequencing results showed that the cloned  $CBF_2$  gene in three different chilling resistance grapes had 969 bp and encoded 253 amino acids, and had 96.7%–97.94% identity with the sequence published on GeneBank. The bioinformatics analysis showed that  $CBF_2$  from three different chilling resistance grapes had continuous opening reading frame, and the deduced amino acid sequence also had AP2 binding domain, so we should have preliminary judgement of cold resistance effect of cloned  $CBF_2$ . But the analysis from the homology of

\* 收稿日期: 2012-04-19 修回日期: 2012-06-14

基金项目: 甘肃省科技厅项目(1002NKDA031); 甘肃省农业生物技术研究与应用开发(GNSW-2010-16)

作者简介: 张哲敏(1986-), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 主要从事植物生理和分子生物学研究, (E-mail)295670437@qq.com。

\* 通讯作者: 李唯, 教授, 主要从事作物分子生态生理研究, (E-mail)liweili@sau.edu.cn。

amino acid sequences, phylogenetic tree, physico-chemical property and hydrophobicity and hydrophilia showed that there were some differences among the high chilling resistance grape *Vitis amurensis* and *Beta*, and the low chilling resistance grape *Cabernet sauvignon*. The comparison of sequence homology with the sequence published on GeneBank showed that the worst one was *C. sauvignon*; and the 7 amino acids from N terminal in *C. sauvignon* were totally different with *Vitis amurensis* and *Beta*; the difference might be related to the higher hydrophobicity in the head of amino acid residues from *Cabernet sauvignon*. Based on the vector pBI121 with promoter 35S, the plant expression vector pBI121-CaMV35S- $CBF_2$  was constructed successfully, which could offer the basic researching data to improve the cold-tolerance ability of grape.

**Key words:** grapes;  $CBF_2$  transcriptional activator; bioinformatic analysis; cloning; expression vector construction

低温在很大程度上遏制了植物的生长发育以及缩小了它们的种植范围,是影响农业生产最重要的因素之一(Gilmour *et al.*, 1998)。我国北方葡萄栽培主要受冬季低温和春季干旱影响,遇特殊年份,南方低温胁迫也时常发生,严重影响我国葡萄产业化发展(牛锦凤等, 2005)。近年来,在模式植物拟南芥中发现的  $CBFs$ (CRT/DRE binding factors)低温反应途径,受到了分子生物学与基因工程研究者的极大关注。 $CBF$ (C-repeat binding transcription factor/de-hydrate responsive element binding factor,  $DREB$ )基因是植物  $CBF$  抗冷途径的枢纽,它通过  $CBF$  转录因子调控大量下游抗冷基因的表达来提高植物抗冷能力(Zhang *et al.*, 2004)。目前  $CBF_1$  和  $CBF_3$  基因在植物抗寒和抗旱性中的作用已得到不少研究者的肯定,但对  $CBF_2$  基因功能研究的结果却显得较为复杂(李新玲等, 2010)。Vogel *et al.* (2005)发现:拟南芥里受低温诱导而高表达的 25 个抗寒基因中,其中 19 个是受  $CBF_2$  转录因子诱导的,因此认为  $CBF_2$  能够高效地诱导下游抗寒基因的表达;但与上述观点冲突的是,Novillo *et al.* (2004)研究却发现, $CBF_2$  突变体(即通过基因工程的方法,使  $CBF_2$  基因不能正常表达)中的  $CBF_1$ 、 $CBF_3$  表达量会明显增加,抗寒能力高于三种基因均能正常表达的植株,因此认为  $CBF_2$  是  $CBF_1$ 、 $CBF_3$  的负调控因子。可见,对  $CBF_2$  转录因子更深入的研究是十分必要的。

据相关报道  $CBF_1$  为单拷贝或低拷贝数基因,不含有中断阅读框(open reading frame)的内含子; $CBF_2$  和  $CBF_3$  也不含有内含子(Gilmour *et al.*, 1998)。本研究以酿酒葡萄“赤霞珠”、抗冻葡萄砧木“贝达”和山葡萄“北冰红”为研究材料,以葡萄总 DNA 为模版克隆  $CBF_2$  转录因子,并进行生物信息学分析及表达载体构建,研究  $CBF_2$  转录因子在不同抗寒材料中的差异,为葡萄中其功能的研究提供

理论依据,也为  $CBF_2$  转录因子在酿酒葡萄抗寒性的改良利用方面提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 植物材料及菌种 酿酒葡萄“赤霞珠(*Cabernet sauvignon*)”、抗冻葡萄砧木“贝达(*Beta*)”和山葡萄“北冰红(*Vitis amurensis*)”的幼嫩叶片,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用,采自甘肃酒泉紫轩葡萄园; *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株及植物表达载体 pBI121 由甘肃省干旱生境作物学重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 TaqPCR Mix、pMD18-T、限制性内切酶、克隆时的  $T_4$  DNA 连接酶、Maker (2 000、5 000、15 000 bp)等均购自大连宝生物有限公司,PCR 产物回收试剂盒购自爱思进生物技术有限公司,表达载体构建时的  $T_4$  DNA 连接酶购自北京全式金生物技术有限公司。主要仪器有凝胶成像系统(RH-5.1),德国 Herolab 公司;PCR 仪(PTC-200),德国 Eppendorf 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 植物 DNA 的提取及 PCR 引物设计 以山葡萄、贝达及赤霞珠的幼叶为材料分别提取它们的基因组 DNA。参照 GenBank 上发表的葡萄  $CBF_2$  基因序列(DQ517297)设计引物,因后续构建载体的需要,上游引物 5c 端加 *Bam*H 酶切位点,下游引物 5c 端加 *Sac*I 酶切位点(上游引物 P1: 5c-CG-GATCCTCACTCACTCTT GCCTCCAACCTCT-3c; 下游引物 P2: 5c-GGAGCTCCCTTACCT-GAAGTCCATCCA-3c; 酶切位点用画线部分标出)。引物由北京华大基因有限公司合成。

1.2.2 三种葡萄  $CBF_2$  基因的克隆、连接转化以及测序 分别以提取的山葡萄、贝达及赤霞珠的总 DNA 为模板, P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增,程序

为:95 °C 预变性 3 min;然后 94 °C 40 s,60 °C/64 °C (山葡萄、贝达为 60 °C,赤霞珠为 64 °C)45 s,72 °C 50 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收目的片段并与克隆载体 pMD18-T 于 16 °C 水浴中连接过夜,转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,进行 Amp 抗性筛选,挑取单菌落活化培养,提取质粒,*Xba*I 和 *Hind*III 双酶切来鉴定重组子,分别将其命名为山葡萄/贝达/赤霞珠 pMD18T-*CBF*<sub>2</sub> 并送华大公司测序。

1.2.3 三种葡萄 *CBF*<sub>2</sub> 基因的生物信息学分析 对山葡萄、贝达及赤霞珠的 *CBF*<sub>2</sub> 转录因子的生物信息学分析利用 NCBI 中的 ORF Finder 软件进行开放阅读框识别,对它的编码区进行蛋白质保守结构域分析(Schaffer *et al.*, 2001);用 Clustalx 和 DNAMAN V6.0 软件进行氨基酸序列的比对及进化树的生成,在线(<http://cn.expasy.org/>)分析蛋白质结构及理化特性。

1.2.4 植物表达载体山葡萄 pBI121-*CBF*<sub>2</sub> 的构建 以克隆的山葡萄 pMD18-T-*CBF*<sub>2</sub> 质粒为模板,以 P1 和 P2 为上口下游引物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系和反应条件同 1.2.2,扩增产物经琼脂糖凝胶纯化回收后经 *Bam*H I、*Sac* I 双酶切后,与经同样双酶切的表达载体 pBI121-CaMV35S 连接,构建重组表达质粒,经酶切和测序检测,正确的阳性克隆,命名为 pBI121-CaMV35S-*CBF*<sub>2</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 三种葡萄 *CBF*<sub>2</sub> 基因的克隆以及重组质粒的鉴定

PCR 扩增得到的山葡萄、贝达及赤霞珠的 *CBF*<sub>2</sub> 基因片段大小均为 1 000 bp 左右(如图 1 所示),与预期结果一致。该片段经回收连接转化后得到的重组子 pMD18T-*CBF*<sub>2</sub> 经 *Xba*I 和 *Hind* III 双酶切后得到的片段与 PCR 结果相吻合(图 2),说明重组子构建成功。测序结果显示(图 3,以山葡萄为例),来自三种葡萄的 *CBF*<sub>2</sub> 基因片段的大小同为 969 bp,最长编码区为 762 bp,编码 253 个氨基酸,中间有 58 个氨基酸组成的与 DNA 结合的 AP2 结构域以及 PKKPAGRKKFRFTRHP 和 DSAWR 特异氨基酸,而 AP2 结构域与 *COR* 基因启动子中的 CRT/DRE 片段结合,诱导抗寒及抗旱的发生,初步说明克隆的 *CBF*<sub>2</sub> 具有诱导抗寒性发生的功能。山葡萄、贝达及赤霞珠的 *CBF*<sub>2</sub> 基因与 GeneBank 上

公布的 *CBF*<sub>2</sub> 基因相比对,其核苷酸相似性分别为 97.94%、97.83%和 96.7%。

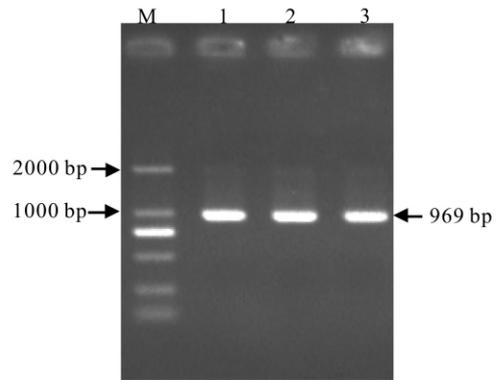


图 1 *CBF*<sub>2</sub> 基因 PCR 产物电泳

Fig.1 Electrophoresis of PCR products for *CBF*<sub>2</sub> gene  
M. DL2000; 泳道 1,2,3 分别为山葡萄、贝达、赤霞珠 PCR 产物。

M. Marker molecule DL2000; Lane 1,2,3 are the PCR products of *Vitis amurensis*, *Beta*, *Cabernet sauvignon* respectively.

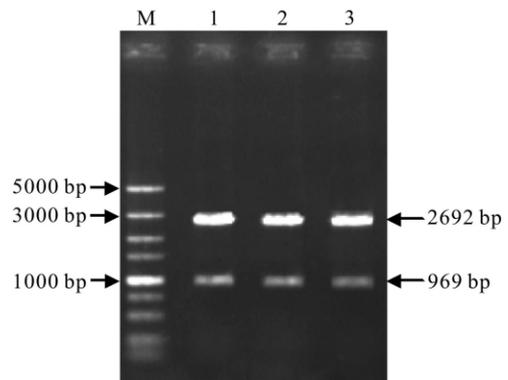


图 2 pMD18T-*CBF*<sub>2</sub> 双酶切电泳

Fig.2 Electrophoresis of the double enzyme-digested pMD18T-*CBF*<sub>2</sub>

M. DL5000; 泳道 1,2,3 分别为山葡萄、贝达、赤霞珠的质粒酶切产物

M. Marker molecule DL5000; Lane 1,2,3 are the enzyme-digested products of plasmids in *Vitis amurensis*, *Beta*, *Cabernet sauvignon* respectively.

### 2.2 三种葡萄 *CBF*<sub>2</sub> 基因的生物信息学分析

2.2.1 氨基酸序列比对及进化树分析 用 Clustalx 和 DNAMAN V6.0 软件进行氨基酸序列的比对及进化树的生成,来自山葡萄、贝达及赤霞珠的 *CBF*<sub>2</sub> 基因氨基酸序列的同源性达到 97%,都包含由 58 个氨基酸组成的保守的 AP2 DNA 结合域,以及 PKKPAGRKKFRFTRHP 和 DSAWR 特异氨基酸序列,但来自山葡萄(北冰红)和贝达的 *CBF*<sub>2</sub> 基因的 N 端的 7 个氨基酸残基与来自赤霞珠的不同(图

4)。由进化树图谱(图 5)可以看出,来自山葡萄  $CBF_2$  基因同来自贝达的  $CBF_2$  基因的同源性很高,位于同分支上,相比之下从赤霞珠中克隆得到  $CBF_2$  基因稍远些,位于另一条分支上。

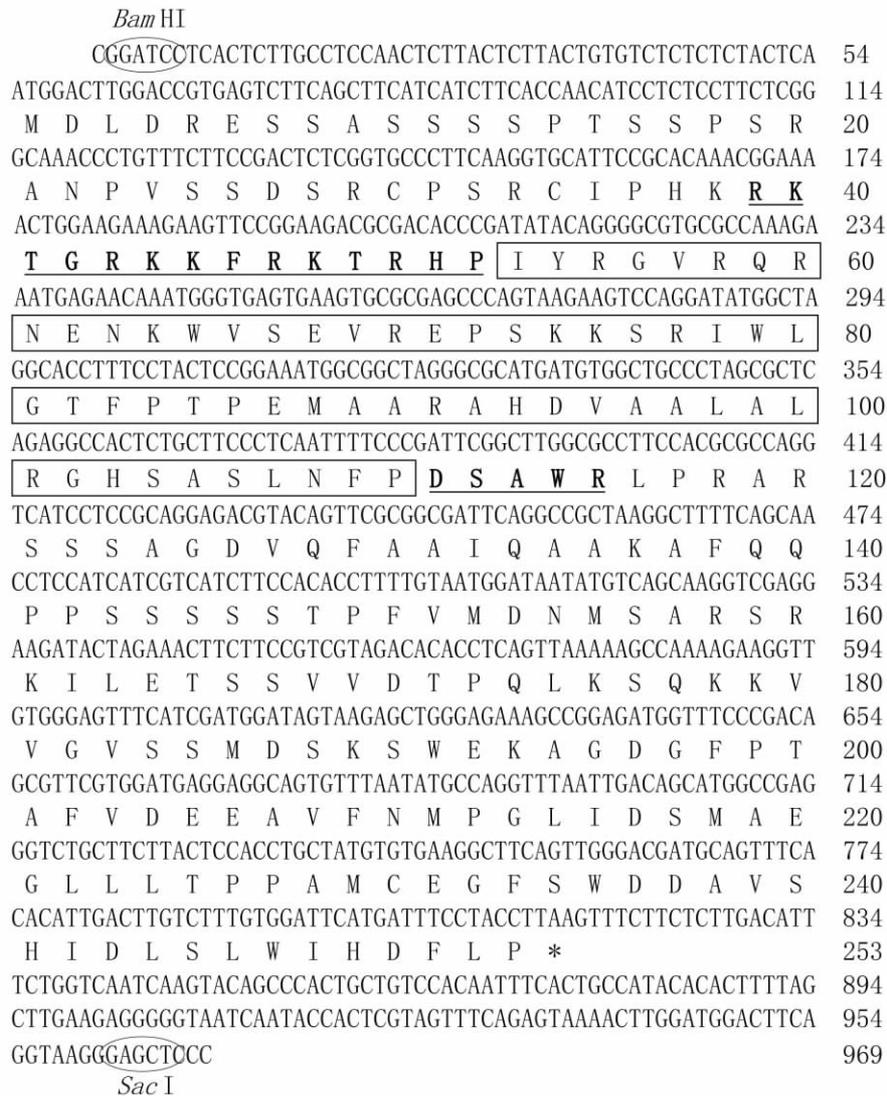


图 3 山葡萄(北冰红) $CBF_2$  基因测序结果及其推导氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the  $CBF_2$  gene in *Vitis amurensis*

黑体部分为  $CBF_2$  家族蛋白特征序列 PKK/RPAGRXXFXETRHP 和 DSAWR; 方框部分为 AP2/ERE BP DNA 结构域; 圆圈部分为酶切位点。

The bold part is PKK/RPAGRXXFXETRHP and DSAWR, representing the distinctive sequences of the  $CBF_2$  family protein; the section in the frame is AP2/ERE BP DNA binding domain; section in circle is enzyme cutting site.

2.2.2 氨基酸组成及其理化性质 据 ProtParam 软件(<http://www.au.expasy.org/tools/protparam.html>)预测结果显示:从山葡萄(北冰红)、贝达、赤霞珠克隆到的  $CBF_2$  基因编码的蛋白质的分子式为  $C_{1201-1214}H_{1895-1919}N_{353-359}O_{370-375}S_{9-11}$ , 分子量为 27.49~27.85 KD; 理论等电点为 9.34~9.67; 带负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 24~28, 带正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 32~33, 说明碱性氨基酸在整个  $CBF_2$  中占据较多百分含量, 而酸性氨基

酸相对含量较低; 不稳定系数为 52.54~60.19, 均为不稳定蛋白(标准 40 以下为稳定蛋白), 理论推导半衰期大约为 30 h, 脂肪系数平均为 62.13~64.86, 含量较高的氨基酸依次为 Arg(67~7.9%)、Asp(5.5~6.7%)、Glu(4.0~4.3%)、Leu(5.9~6.7%)、Lys(5.9~6.3%)、Pro(6.3~7.9%)、Ser(15.8~16.6%)、Gly(4.3~5.5%)、Val(5.5%), 亲水性平均数为 -0.542~-0.452, 预测该蛋白均为亲水性蛋白(表 1)。

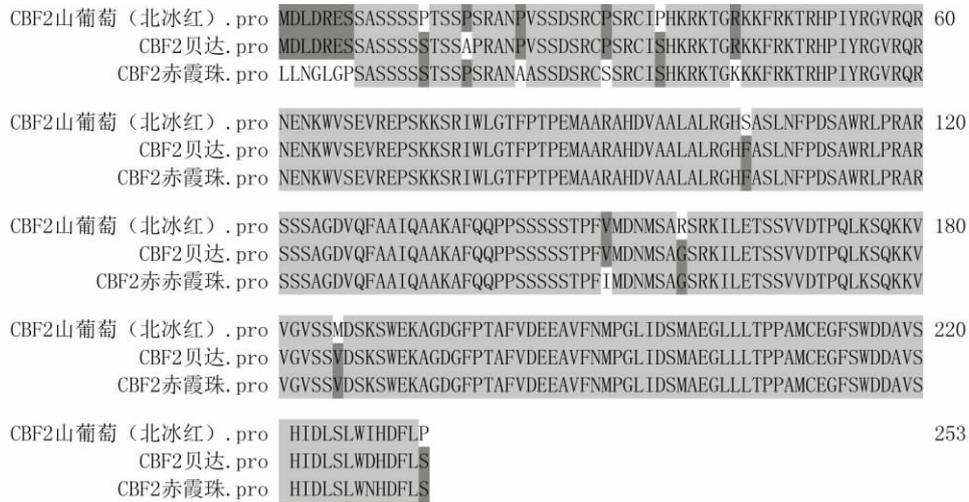


图 4 三种葡萄 CBF<sub>2</sub> 基因的氨基酸序列比对

Fig. 4 Aligment of CBF<sub>2</sub> gene from thee different varieties of grapes

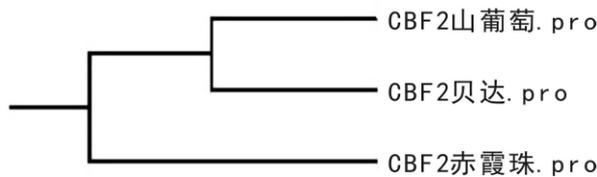


图 5 三种葡萄 CBF<sub>2</sub> 基因的进化树分析

Fig. 5 Anaslysis of evolutionary trees for CBF<sub>2</sub> gene from thee different varieties of grapes

2.2.3 氨基酸序列疏水性/亲水性分析 氨基酸序列疏水性/亲水性对蛋白质结构和功能预测有一定作用。由图 6 和图 7 显示,抗寒性较弱的赤霞珠 CBF<sub>2</sub> 前部(N-端)有数个疏水性较强的氨基酸,而抗寒性极强的山葡萄 CBF<sub>2</sub> 前部(N-端)有数个亲水性较强的氨基酸,这可能是导致山葡萄 CBF<sub>2</sub> 亲水性(亲水性平均数-0.542)强于赤霞珠 CBF<sub>2</sub> 亲水性(亲水性平均数-0.452)的一个重要原因。山葡萄

表 1 三种葡萄 CBF<sub>2</sub> 蛋白一级结构分析结果

Table 1 Results of CBF<sub>2</sub> protein primary structure analysis in three different varieties of grapes

品种 Varieties	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	天冬氨酸 +谷氨酸 Asp+Glu	精氨酸+ 赖氨酸 Arg+Lys	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	亲水性平均数 Grand average of hydrophaticity
山葡萄(北冰红) <i>Vitis amurensis</i>	C <sub>1214</sub> H <sub>1919</sub> N <sub>359</sub> O <sub>372</sub> S <sub>11</sub>	27.85	9.60	27	35	60.19	62.13	-0.542
贝达 Beta	C <sub>1208</sub> H <sub>1902</sub> N <sub>356</sub> O <sub>375</sub> S <sub>10</sub>	27.73	9.34	28	34	52.54	62.13	-0.514
赤霞珠 <i>Cabernet sauvignon</i>	C <sub>1201</sub> H <sub>1895</sub> N <sub>353</sub> O <sub>370</sub> S <sub>9</sub>	27.49	9.67	24	33	53.02	64.86	-0.452

和赤霞珠的前 15 个氨基酸疏水性趋势差异较大,赤霞珠的疏水性质明显较强。

### 2.3 植物表达载体山葡萄 pBI121-CaMV35S-CBF<sub>2</sub> 的鉴定

本实验用分别用 BamHI 和 SacI 双酶切带有 35S 启动子的 pBI121 和山葡萄 pBI121-CaMV35S-CBF<sub>2</sub> 纯化质粒。酶切结果显示构建的植物表达载体山葡萄 pBI121-CaMV35S-CBF<sub>2</sub> 酶切后的大片段与切去 *gus* 基因的 pBI121 大小相同,而双酶切出的小片段大小在 1 000 左右,与山葡萄 CBF<sub>2</sub> 基因大小一致(图 8)。进一步对植物表达载体 pBI121-

CaMV35S-CBF<sub>2</sub> 纯化质粒进行测序,结果显示表达载体 pBI121-CaMV35S-CBF<sub>2</sub> 中 CBF<sub>2</sub> 基因与从山葡萄上克隆的 CBF<sub>2</sub> 基因同源性达到 99.07%。上述结果说明来自山葡萄的 CBF<sub>2</sub> 基因已正确插入带有 35S 启动子的 pBI121 中,植物表达载体 pBI121-CaMV35S-CBF<sub>2</sub> 构建成功,其结构如图 9 所示。

### 3 结论与讨论

植物抗寒性的基因表达过程属于数量性状控制的遗传现象,是多个抗寒基因共同表达作用的结果。

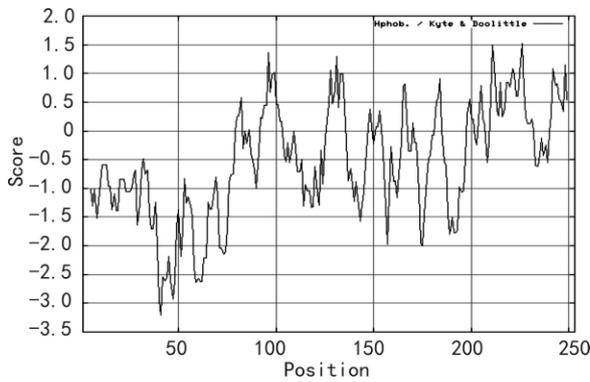


图 6 山葡萄  $CBF_2$  蛋白质疏水性分析

Fig. 6 Hydrophobicity profile of *Vitis amurensis*  $CBF_2$  protein

横坐标为编码的氨基酸顺序；纵坐标为亲/疏水值；“-”表示亲水性；“+”表示疏水性。下同。

Abscissa is the amino acid sequence of the encoded protein; ordinate is the pro-hydrophobic value; “-” represents hydrophilic; “+” refers to hydrophobic. The same below.

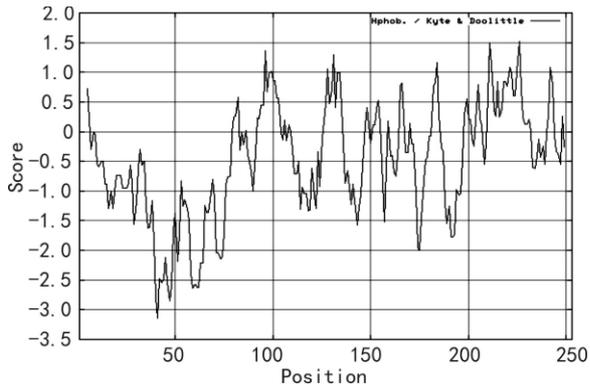


图 7 赤霞珠  $CBF_2$  蛋白质疏水性分析

Fig. 7 Hydrophobicity profile of *Cabernet sauvignon*  $CBF_2$  protein

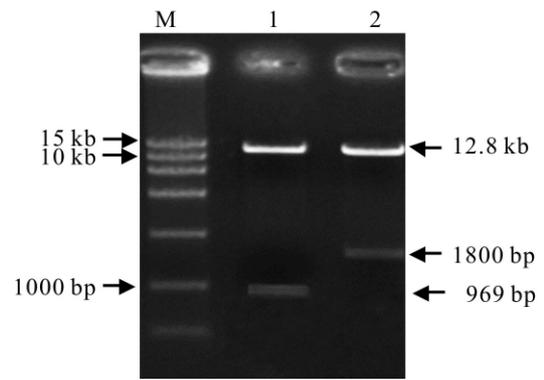


图 8 山葡萄 pBI121-CaMV35S- $CBF_2$  植物表达载体和 pBI121 的双酶切电泳

Fig. 8 Electrophoresis of the double enzyme-digested plant expression vector pBI121-CaMV35S- $CBF_2$  of *Vitis amurensis* and pBI121

M. DL15000; 泳道 1 为山葡萄 pBI121-CaMV35S- $CBF_2$  植物表达载体双酶切产物；泳道 2 为 pBI121。

M. Marker molecule DL15000; Lane 1 is the double enzyme-digested plant expression vector pBI121-CaMV35S- $CBF_2$  of *Vitis amurensis*; Lane 2 is pBI121.

如果采用单一的抗寒功能基因进行转基因操作，虽然该转基因植物的抗寒性有所提高，但效果并不理想，而且随着植物的世代交替，很有可能在下一代植物中该功能基因会丢失，从而降低其抗寒性。而  $CBF$  基因是多个抗旱基因的上游转录因子，它能通过与这些抗逆基因中 DRE 调控元件特异性的结合，使其下游的抗逆基因进行，因此转入  $CBF$  转录因子的植物的抗逆性要比转入单一的抗逆功能性基因强。 $CBF$  转录因子家族在拟南芥中最先发现，在后来的研究中，人们又发现  $CBF$  冷反应途径在开花植物中普遍存在，而不只是局限于能进行冷驯化的植物，并且其核心序列高度保守(Liu *et al.*, 1998)。搜索蛋白质

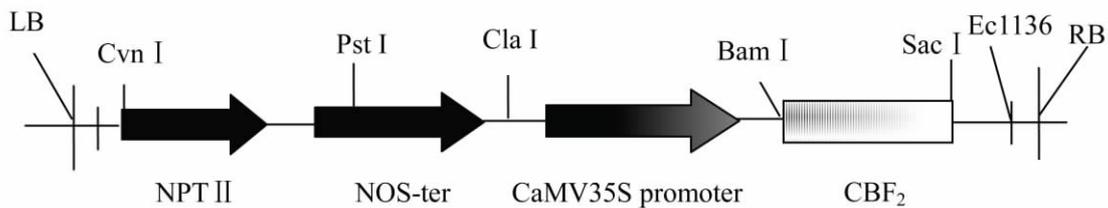


图 9 pBI121-CaMV35S- $CBF_2$  表达框架示意图

Fig. 9 Structure map of pBI121-CaMV35S- $CBF_2$  expressing framework

和核酸数据库后发现，大量植物中具有潜在的  $CBF$  同源基因，这表明在很多双子叶及单子叶植物中都存在有  $CBF$  转录因子及类似的抗逆调控机制。所

以在一些经济林木和作物的抗逆性综合改良中， $CBF$  转录因子具有广泛的应用前景和利用价值。

本研究利用抗寒葡萄砧木山葡萄(北冰红)、较

强抗寒砧木贝达及抗寒能力差的营养系赤霞珠品种,从它们的基因组中分别克隆出  $CBF_2$  转录因子,都包含由 58 个氨基酸组成的保守的 AP2 DNA 结合域,以及 PKKPAGRKKFRFRTRHP 和 DSAWR 特异氨基酸序列,与在其他植物中发现的特征序列一致(Liu *et al.*, 2000),由此说明克隆的  $CBF_2$  基因具有转录激活活性。通过三种葡萄的  $CBF_2$  基因同源性及氨基酸序列理化性质和亲/疏水性的分析,与 GenBank 上登录的原始序列(DQ517297)同源性最低的是赤霞珠,而且其  $CBF_2$  基因 N-端的 7 个氨基酸序列与山葡萄(北冰红)和贝达的不同,具有较强的疏水性。而在实际的农业生产中贝达和山葡萄(北冰红)能耐  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的低温,而赤霞珠则不能(许宏等, 2003)。那么,  $CBF_2$  转录因子序列同源性较低和 N-端氨基酸及其亲/疏水性的差异是否可能与葡萄品种间抗寒特性的不同有关?尚待于更多的试验资料来证明。

#### 参考文献:

- Gilmour SJ, Stockinger EJ, Zarka DG, *et al.* 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activation as an early step cold-induced COR gene expression [J]. *Plant J*, **16**(4):436
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, *et al.* 1998. 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*, **10**(8):1391-1406
- Liu Q, Zhang GY, Chen SY. 2000. Isolation and structural analysis of DRE-Binding transcription factor from Maize [J]. *Chin Sci Bull*, **45**(14):1465-1474
- Li XL(李新玲), Xu XL(徐香玲), Wang QW(王全伟). 2010. Study on desiccation tolerance of  $CBF_2$  gene in *Arabidopsis thaliana* (拟南芥  $CBF_2$  基因的抗旱性研究) [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), **10**(1):97-103
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, *et al.* 2004.  $CBF_2/DREB1C$  is a negative regulator of  $CBF_1/DREB1B$  and  $CBF_3/DREB1A$  expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(11):3985
- Niu JF(牛锦凤), Wang ZP(王振平). 2005. Comparison of the cold hardiness of five wine grape Varieties (宁夏地区酿酒葡萄品种抗寒性的比较) [J]. *Sino-overseas Grapevine & Wine* (中外葡萄与葡萄酒), **3**:17-19
- Schaffer AA, Aravind L, Madden TL. 2001. Improving the Accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements [J]. *Nucleic Acids Res*, **29**:2994-3005
- Vogel JT, Van Buskirk HA, Zarka DG, *et al.* 2005. Roles of the  $CBF_2$  and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, **41**:200
- Xu H(许宏), Wang XD(王孝娣), Zou YN(邹英宁)等. 2003. Study on the cold resistance of grape rootstocks and wine grape cultivars (葡萄砧木及酿酒品种抗寒性比较) [J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine* (中外葡萄与葡萄酒), **6**:51-53
- Zhang X, Fowler SG, Cheng H, *et al.* 2004. 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*, **39**(6):905-919
- 鉴定[C]/李法曾等. 山东植物研究. 北京:科学技术出版社:358-364
- Chen W(陈韦), Shang HW(商晗武), Gao YS(高永生), *et al.* 2010. The flower and pollen morphology of *Solidago* (一枝黄花属植物的花及花粉形态) [J]. *Guihaia* (广西植物), **30**(1):55-59
- Henderson *et al.* 1968. Pollen Morphology of *Salvia* and Some Related Genera [J]. *Gran Palynol*, **8**(1):70-85
- P. D 摩尔, J. A 韦布. 1987. 花粉分析指南 [M]. 李文漪, 等(译). 广西:广西人民出版社:1
- Sun Q(孙群), Liang ZS(梁宗锁), Li SJ(李绍军), *et al.* 2004. Study on configuration fabric and germinative conditions of *Salvia miltiorrhiza* seeds (丹参种子形态结构与吸水萌发特性) [J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **29**(10):934-937
- Wang CH(王彩红), Wen XH(文雪花), Li LH(李连怀), *et al.* 2007. Identification of *Salvia miltiorrhizae* Bge., *S. przewalskii* Maxim. and *S. umbratica* hance seeds by SEM (丹参、甘西鼠尾、荫生鼠尾种子的扫描电镜鉴别) [J]. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), **28**(3):186-187
- Yang DK(杨德奎), Sun JT(孙京田), Wang BQ(王丙全). 2003. Pollen morphology and taxonomic significance of *Salvia* from Shandong (山东鼠尾草属花粉形态的研究及其在分类上的意义) [J]. *Shandong Sci* (山东科学), **16**(1):15-16
- Zhang L(张利), Yang ZJ(杨在君), Huang X(黄霞), *et al.* 2008. Study on the leaf epidermal structural characters of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia* from Sichuan (丹参及四川鼠尾草属植物叶表皮微形态研究) [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Edit* (四川大学学报·自然科学版), **45**(3):674-680

(上接第 24 页 Continue from page 24)