

转沙冬青锌指蛋白基因 *AmZFPG* 烟草非生物胁迫抗性分析

智冠华, 史军娜, 赵晓鑫, 刘胜利, 陈玉珍, 卢存福*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 教育部林木花卉遗传育种重点实验室, 北京 100083)

摘要: 分析了沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) 锌指蛋白基因 *AmZFPG* 在非生物胁迫下的表达特性, 结果显示 *AmZFPG* 受低温、干旱、高盐胁迫诱导表达, 表明该蛋白参与多种胁迫相关的信号转导和应答反应。为进一步探索 *AmZFPG* 的功能, 构建了真核表达载体 *AmZFPG*-pCAMBIA2300, 将该基因转入烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 对转基因烟草 T1 代进行非生物胁迫分析, 结果显示, 转基因烟草的耐寒性、耐旱性、耐盐性均获得了提高。

关键词: 沙冬青; *AmZFPG* 基因; 转基因烟草; 非生物胁迫

中图分类号: S 68

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 04-0713-11

Overexpression of a Zinc-finger Protein Gene *AmZFPG* from *Ammopiptanthus mongolicus* Confers Tolerance to Cold, Drought and Salt Stress in Transgenic Tobacco

ZHI Guan-hua, SHI Jun-na, ZHAO Xiao-xin, LIU Sheng-li, CHEN Yu-zhen, and LU Cun-fu*

(College of Biological Sciences and Biotechnology, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Education Ministry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The characterization of a novel gene designated *AmZFPG* from *Ammopiptanthus mongolicus* was described here. *AmZFPG* encodes a zinc-finger protein that is induced after different types of stresses, namely cold, desiccation, and salt. Overexpression of the gene in transgenic tobacco conferred tolerance to cold, dehydration, and salt stress at the seed-germination/seedling stage as reflected by the percentage of germination, the fresh weight of seedlings, and their growth pattern. Thus, *AmZFPG* seems to be an important determinant of stress response.

Key words: *Ammopiptanthus mongolicus*; *AmZFPG* gene; transgenic tobacco; abiotic stress

锌指蛋白 (Zinc Finger Protein) 是普遍存在于真核生物中的转录因子之一, 最初在非洲爪蟾的卵母细胞中发现, 后续研究表明其参与细胞的分化、增殖、凋亡等多种重要生命活动 (Miller et al.,

收稿日期: 2012-10-17; 修回日期: 2013-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270737, 30671476); 北京市自然科学基金项目 (6112016)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn)

1985; Lee et al., 1989)。有关植物锌指蛋白基因的研究,多以拟南芥、水稻等模式植物为材料,而以强抗逆植物及观赏植物为研究对象的报道甚少 (Saad et al., 2010)。

沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) 作为古老第三纪残遗种 (Wei et al., 2012), 是中国北方荒漠地区唯一的常绿阔叶灌木, 具有很强的抗逆性, 因此被认为是一种理想的抗逆基因资源植物 (Liu et al., 2005, 2006; Cao et al., 2009; Guo et al., 2010; Liu et al., 2010; 刘瑞玲 等, 2010; 师静 等, 2012; Song et al., 2013)。此外, 沙冬青树形优美, 四季常绿, 叶片肥厚, 开花早, 花期长, 花冠金黄色, 是中国西北地区重要的造林树种和园林绿化观赏树种, 是极具开发价值的城市街道、庭院绿化美化的上佳树种 (李慧卿 等, 2000; 李昌龙 等, 2004; 韩善华 等, 2005; 王华 等, 2007)。

史军娜等 (2011) 已从沙冬青中克隆得到锌指蛋白基因 *AmZFPG* 全长 cDNA 序列, 并对该基因进行了生物信息学分析。本试验在此基础上, 利用 real-time PCR 检测了该基因在低温、干旱、盐胁迫下的表达特性, 构建真核表达载体并成功将 *AmZFPG* 基因转入烟草中, 进而就转基因烟草对低温、干旱、盐胁迫的耐性做了测定, 以期揭示该基因用于转基因提高林木、花卉对非生物胁迫耐受性的可能性。

1 材料与方法

1.1 植物材料与逆境胁迫条件

沙冬青的种子采自内蒙古阿拉善荒漠地区, 2010 年 10 月获得种子并在北京林业大学林木细胞工程研究室实验室播种。种子播种于前一天浇透水的珍珠岩基质中, 播种后每 3 d 浇水 1 次 (干旱处理除外), 室温 (24 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗) 培养 12 d, 真叶初露时开始进行胁迫处理。低温处理条件设置为 4 °C, 分别取处理 0、1、2、4、8 和 16 d 的幼苗叶片。干旱处理: 播种之前浇水后不再浇水, 12 d 后开始计时取样, 分别取处理 0、1、2、4、8 和 16 d 的幼苗叶片。盐处理: 用浓度为 1% 的 NaCl 溶液浇灌 12 d 大小的沙冬青幼苗, 分别按时间取样, 取处理 0、1、2、4、8 和 16 d 的幼苗叶片, 取样后立即储存于 -80 °C 备用。

1.2 总 RNA 的提取和反转录反应

沙冬青及烟草 RNA 的提取方法按照 Biomiga RNA 提取试剂盒使用说明进行, 提取后的 RNA 经过电泳检测, 完整性较好, 之后进行 DNA 消化, 反应过程按照 promega RQ1 RNase-Free DNase 使用说明进行, 然后根据 promega M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行反转录。

1.3 *AmSTZF* 的 real-time PCR 反应体系

将不同样品的 RNA 反转录产物稀释 20 倍, 作为 real-time PCR 的模板。操作过程按照 TaRaKa SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒使用说明完成。反应体系为 25 μL, 其中 2 μL 的模板、0.5 μL 正负向引物 (10 μmol · L⁻¹)、12.5 μL SYBR Premix Ex Taq™ (2×)、灭菌蒸馏水 9.5 μL。qPCR 以沙冬青 *Actin* 为内参 (Shi et al., 2012), 数据处理按照内参的 ΔCT 法分析。每个样品设 3 个重复。

基因引物 ZFPGR5: 5'-CACGGAAGTGGATGTTGGCTTGG-3'; ZFPGR3: 5'-CTCCTTGGCATTGGATGCTGACC-3'。内参引物 Acn5: 5'-ACCTTGCTGGCCGTGATTAAACG-3'; Acn3: 5'-ATAGTGGACC CACCACTAAGCACG-3'。

1.4 目标基因转化烟草

利用 Primer 5.0 软件设计 1 对特异性引物 5'-TAGGATCCGGATGTGTGCCAAAATGTATCAG

TT-3' (含 *Bam*H I 酶切位点) 和 5'-TACTGCAGTAGTGCTGACTGGGAATGGAAGATA-3' (含 *Pst* I 酶切位点) 扩增 *AmZFPG* 的开放阅读框, 连接 pMD18-T 后用 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切, 同时双酶切载体 pCambia2300, 然后用 T4 DNA 连接酶连接获得融合载体 *AmZFPG*-2300。用农杆菌介导的叶盘浸染法将融合载体 *AmZFPG*-2300 转化到野生型烟草中 (Anoop & Gupta, 2003)。用含 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素和 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的分化培养基 (MS + $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA) 分化转基因植株 21 d, 然后转移到含 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素和 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的生根培养基 (1/2 MS) 诱导生根。

1.5 转基因烟草的分子鉴定

用 CTAB 法提取长势较好的 T0 代转基因烟草叶片 DNA, 以其为模板进行 PCR, 筛选阳性植株, 引物如 1.4。

温室培养 (24°C , 16 h 光照/8 h 黑暗) T0 代转基因烟草, 获得 T1 种子。种子经添加 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的 MS 培养基筛选, 获得 T1 代转基因烟草。T1 代转基因烟草 RNA 的提取及反转录按照 1.2 进行, 然后以稀释 20 倍的 cDNA 为模板进行 PCR, 以烟草的 *NtActin* 为内参, *AmZFPG* 基因引物如 1.3。

1.6 转基因烟草的抗性分析

1.6.1 抗寒性

野生型及转基因烟草 T1 代种子消毒后, 播种到 MS 培养基上。两周后, 选长势较好的烟草转移到基质 (蛭石: 营养土: 珍珠岩 = 2: 2: 1) 中培养 (24°C , 16 h 光照/8 h 黑暗)。两个月后, 选长势一致的野生型及转基因烟草 T1 代盆栽苗, 放于 -20°C 的冰箱中持续胁迫 90 min, 之后恢复正常生长条件, 1 周后拍照, 测鲜样质量和干样质量, 并与胁迫前比较 (Saad et al., 2010)。

1.6.2 抗旱性

野生型及转基因烟草 T1 代种子消毒后, 播种于甘露醇 (导使植物细胞失水, 模拟干旱) 浓度为 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上, 培养 (24°C , 16 h 光照/8 h 黑暗) 2 周后测种子的发芽率, 同时将相同株系的种子播种于不含甘露醇的 MS 培养基作对照。

按照 1.6.1 的方法获得野生型及转基因烟草 T1 代盆栽苗, 两个月后选长势一致的野生型及转基因烟草, 浇灌浓度为 15% 的 PEG6000 溶液 (模拟干旱) 1 次, 3 d 后改浇灌 20% 的 PEG6000, 每天观察, 待野生型及转基因烟草出现明显性状差别后, 拍照并比较根长。

1.6.3 抗盐性

野生型及转基因烟草 T1 代种子消毒后, 播种于 NaCl 浓度为 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上, 培养 (24°C , 16 光照 h/8 h 黑暗) 6 周后测种子的发芽率, 同样将相同株系的种子播种于不含 NaCl 的 MS 培养基作对照。

按照 1.6.1 的方法获得野生型及转基因烟草, 两个月后选长势一致的野生型及转基因烟草 T1 代盆栽苗, 进行 NaCl 浇灌处理, 第 1 次用浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液浇灌, 随后依次用 0.1、0.2 和 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液浇灌, 接着保持每 3 d 浇灌 1 次 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液。每天观察烟草的长势变化, 待转基因烟草和野生型烟草的表型发生明显差异时拍照并比较根长。

另外, 选择野生型及转基因烟草 T1 代长势一致的盆栽苗, 选取位置一致、大小一致的叶片, 打直径为 5 mm 的叶圆片, 浸泡在浓度为 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中, 同时将同等数量的叶圆片浸泡在同等体积的蒸馏水中作对照, 96 h 后观察叶圆片的变化, 拍照, 并用丙酮提取法 (Saad et al., 2010) 抽提叶绿素, 测其含量。

2 结果与分析

2.1 非生物胁迫下沙冬青叶片中 *AmZFPG* 的表达特性

用 real-time PCR 检测 *AmZFPG* 在低温、干旱、高盐胁迫下的表达特性 (图 1)。

在 4 °C 胁迫下, *AmZFPG* 的表达量在胁迫 2 d 时达到最大值, 将近是对照沙冬青叶片中的 5 倍, 之后随着胁迫时间的延长开始逐渐下降 (图 1, A)。

在干旱胁迫下, 该基因的表达量在胁迫后 2 d 达到最大, 将近是对照的 6 倍, 随后下降, 但相对比较缓慢, 至胁迫 8 d, 其表达量仍然保持在对照的 4 倍左右 (图 1, B), 但在干旱处理 16 d 后植株基本死亡, 很难提取 RNA。

在盐胁迫下, *AmZFPG* 的表达量在 4 d 时达到最大, 是对照的 2 倍多, 随后下降, 甚至低于对照的表达量 (图 1, C)。以上结果表明, *AmZFPG* 的表达受低温、干旱、高盐诱导, 初步推断该基因参与了沙冬青对低温、干旱、高盐胁迫的防御反应。

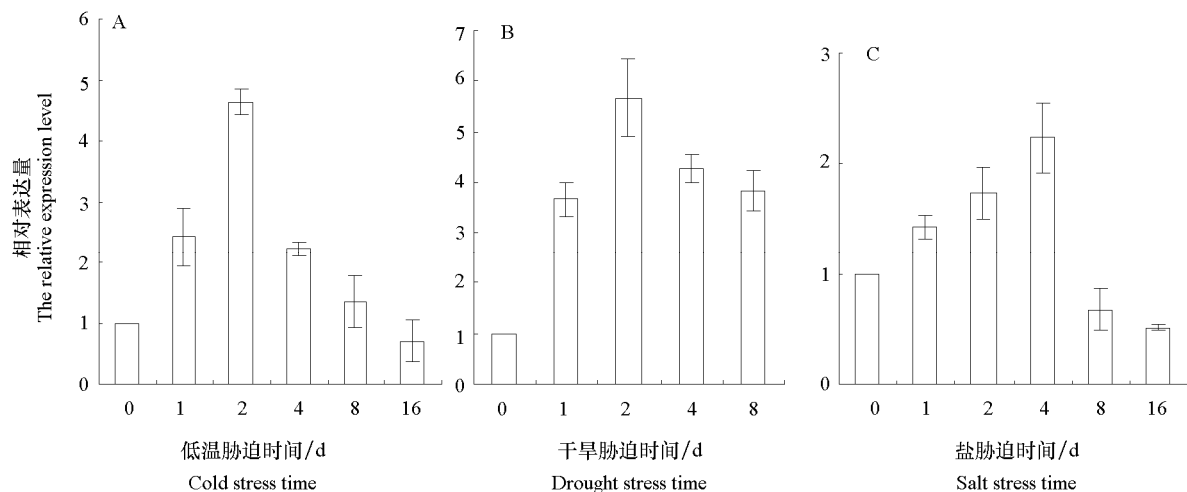


图 1 低温 (A)、干旱 (B)、盐 (C) 胁迫下 *AmZFPG* 在沙冬青叶片中的表达特性

Fig. 1 Expression patterns of *AmZFPG* in leaves of *Ammopiptanthus mongolicus* seedlings after cold (A), drought (B) and salt (C) stresses were revealed by real-time PCR

2.2 转 *AmZFPG* 基因烟草株系的筛选

以候选转 *AmZFPG* 基因烟草 T0 代植株的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 法筛选阳性植株。共筛选出 10 个转基因烟草株系, 在约 670 bp 处稳定扩增出与目的基因大小一致的特异性条带 (图 2), 表明 *AmZFPG* 已整合到烟草基因组中。

提取野生型及候选转基因烟草 T1 代植株的 RNA, 反转录后以 cDNA 为模板 PCR, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离检测, 图 3 显示了其中 3 个稳定表达株系的扩增结果。在烟草内参基因稳定表达的情况下, 野生型烟草没有扩增出 *AmZFPG* 基因, 而 3 个转基因株系都扩增出了该基因, 因此在转录水平上证明了 3 个转基因烟草株系都表达了该基因。

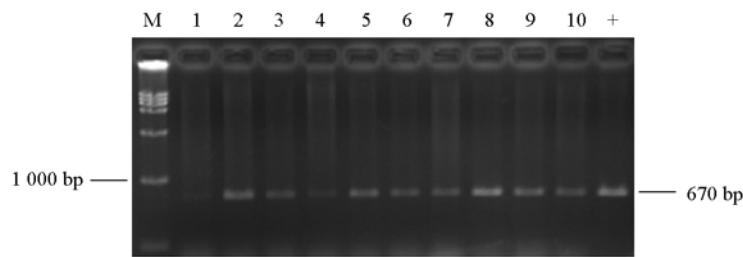


图2 T0代转基因烟草基因组 DNA PCR 扩增结果

M: DNA marker (DL15000); 1~10: 候选转基因植株; +: 重组质粒。

Fig. 2 PCR amplification of transgenic plant (T0 progenies) genomic DNA with primers from *AmZFPG* gene

M: DNA marker (DL15000); 1-10: Candidate transgenic plants; +: Recombination plasmid.

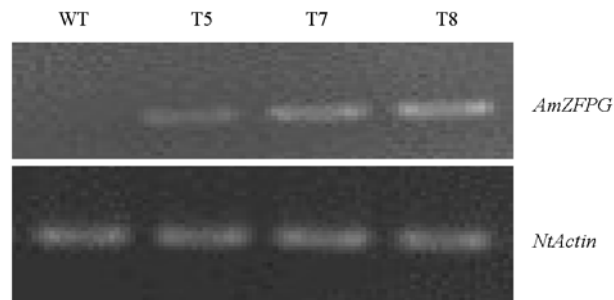


图3 T1代转基因植株的反转录 PCR 扩增结果

WT: 野生型烟草; T5、T7、T8: 转基因烟草 3 个株系。

Fig. 3 Expression of *AmZFPG* gene in transgenic tobacco plants (T1 progenies) were revealed by reverse transcription PCR

WT: Untransformed plant (control); T5, T7, T8: Three lines of candidate transgenic plants.

2.3 转基因烟草非生物胁迫抗性

2.3.1 抗寒性分析

两个月大小的盆栽苗经 -20°C 低温处理 90 min, 室温恢复 1 周后, 转基因烟草两个株系的长势没有明显变化, 只有个别组织受损, 而野生型烟草处理后, 植株整体损伤严重 (图 4, A)。同时发现, 在处理前较为一致的情况下, 处理后转基因烟草两个株系的鲜质量是野生型烟草的 2 倍之多 (图 5, A); 干物质积累量也显著高于野生型 (图 5, B)。

2.3.2 抗旱性分析

烟草种子在添加 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇 (模拟干旱) 的 MS 培养基上培养 2 周后, 野生型烟草的发芽率低于 20%, 而转基因烟草 3 个株系的发芽率都在 80% 以上; 在不加甘露醇 (对照) 的 MS 培养基上二者的发芽率都在 90% 以上 (图 4, B; 图 6)。说明 *AmZFPG* 有助于转基因烟草种子抵抗干旱胁迫。

用 15% 的 PEG6000 浇灌 (模拟干旱) 两个月大小的野生型及转基因烟草 T1 代盆栽苗, 二者较处理前没有出现明显差异, 3 d 后改浇灌浓度为 20% 的 PEG6000 溶液, 浇灌 2 d 后二者出现明显差异 (图 4, C), 转基因烟草盆栽苗较处理前没有明显变化, 植株挺立, 叶片舒展, 而野生型烟草植株倒伏, 叶片萎蔫。比较二者的根长 (图 4, D), 虽然转基因各株系之间存在一定差异, 但总体比野生型烟草根系发达, 推测转基因烟草通过发展根系提高耐旱性。

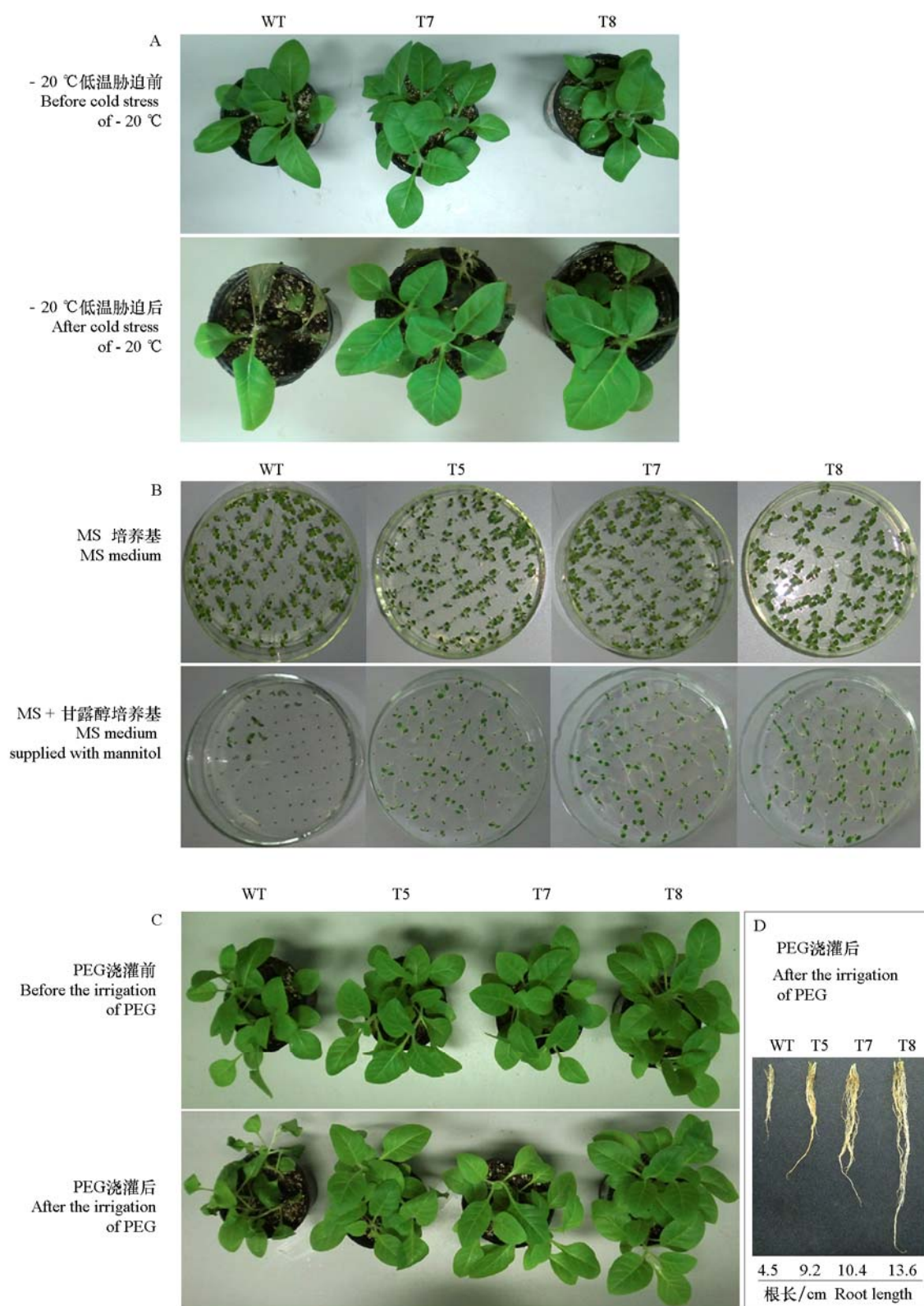


图 4 低温、干旱胁迫后 T1 代烟草表型

A: - 20 °C 处理幼苗; B: 甘露醇 (模拟干旱) 胁迫种子; C, D: PEG 溶液浇灌 (模拟干旱) 胁迫幼苗。

Fig. 4 The phenotype of T1 progenies tobacco lines after cold and drought stresses

A: Seedlings treated with - 20 °C; B: Mannitol (simulated drought) stress on seeds;

C and D: Seedlings irrigated with PEG solution (simulated drought) .

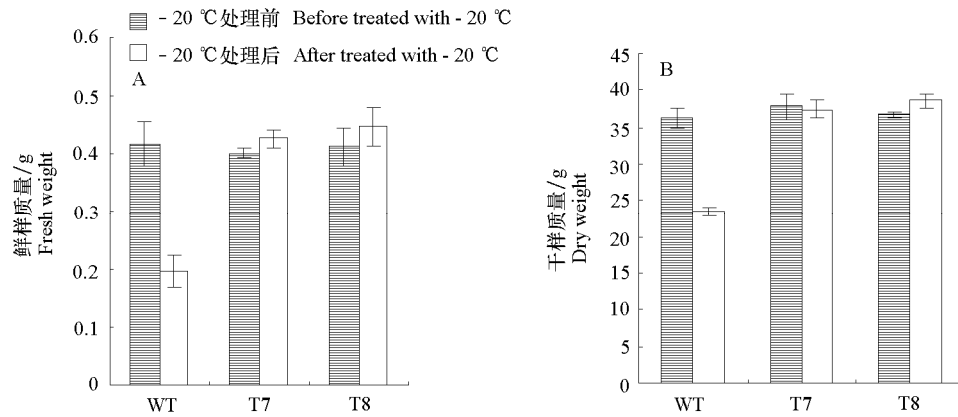


图5 低温胁迫后 T1 代烟草鲜样 (A) 及干样 (B) 质量变化

Fig. 5 The change of fresh weight (A) and dry weight (B) of T1 progenies tobacco seedlings after cold stress

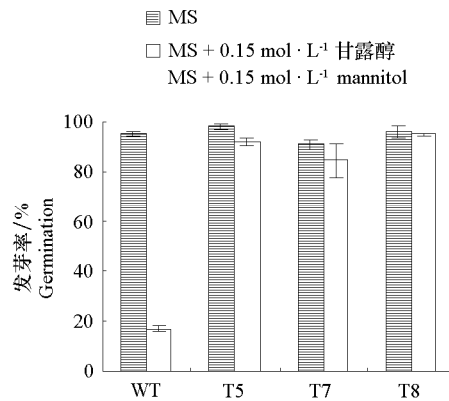


图6 干旱胁迫后 T1 代烟草发芽率

Fig. 6 The germination percentage of T1 progenies tobacco lines after drought stress

2.3.3 抗盐性分析

烟草种子在添加 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 的 MS 培养基上培养 6 周后,野生型烟草的发芽率低于 10%,而 3 个转基因烟草株系发芽率都显著高于野生型,其中 T7 株系的发芽率最高,接近 70%。而对照,即不含 NaCl 的 MS 培养基上二者的发芽率都在 90%以上(图 7, A; 图 8, A),说明 *AmZFPG* 有助于转基因烟草种子抵抗盐胁迫。

两个月大小的野生型及转基因烟草 T1 代盆栽苗,经浓度为 0.05 、 0.1 和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液依次浇灌 1 次, $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液浇灌 2 次后,转基因烟草盆栽苗较处理前没有明显变化,植株挺立,叶片舒展,而野生型烟草的生命力则显著下降,植株倒伏,叶片萎蔫(图 7, B)。比较二者根长,虽然转基因烟草各株系间存在一定差异,但总体比野生型烟草根系发达(图 7, C),推测转基因烟草通过发展根系提高耐盐性。

野生型和转基因烟草 T1 代的叶圆片在 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中浸泡 96 h,野生型烟草叶片失绿严重,叶片呈白色,而转基因烟草虽然 3 个株系之间存在一定差异,但叶片总体呈淡绿色。对照,即用蒸馏水浸泡的叶圆片,无论野生型烟草还是转基因烟草,基本没有失绿(图 7, D)。定量分析发现,对照叶圆片的残留叶绿素含量均约为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而经过盐胁迫后,野生型烟草叶圆片的残留叶绿素含量大幅下降至 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,3 个转基因烟草株系叶圆片的残留叶绿素含量虽然有所下降,但是降幅明显小于野生型烟草(图 8, B)。

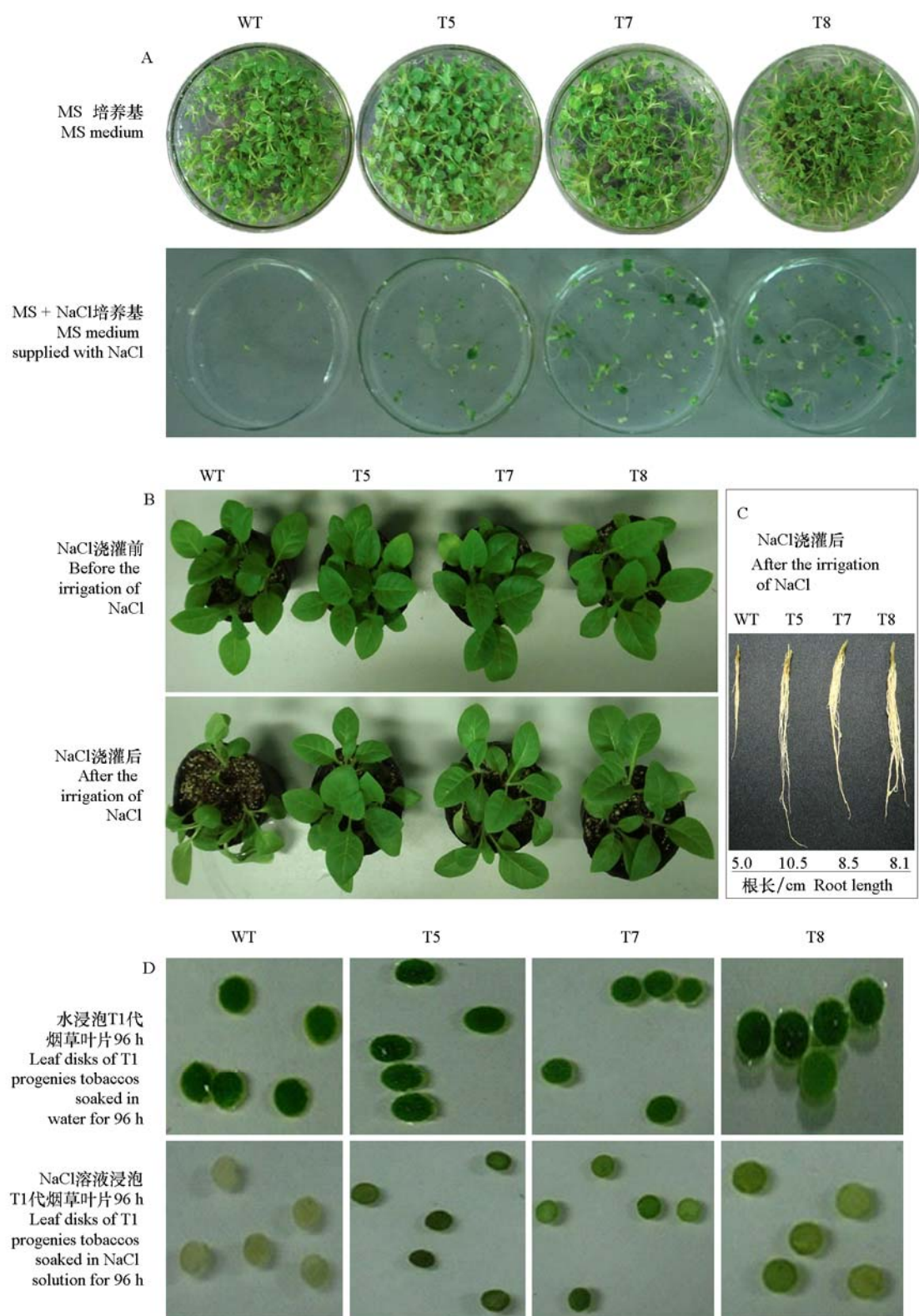


图 7 盐胁迫后 T1 代烟草表型

A: NaCl 胁迫种子; B、C: NaCl 溶液浇灌幼苗; D: NaCl 溶液胁迫叶片。

Fig. 7 The phenotype of T1 progenies tobacco lines after salt stress

A: NaCl stress on seeds; B and C: Seedlings irrigated with NaCl solution; D: Leaf disks soaked in NaCl solution.

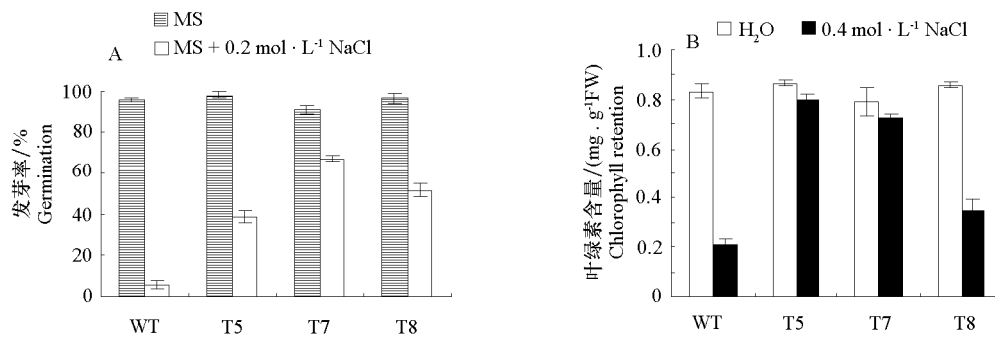


图8 盐胁迫后 T1 代烟草种子发芽率 (A) 和叶片叶绿素含量 (B)

Fig. 8 The germination percentage (A) and chlorophyll retention (B) of T1 progenies tobacco lines after salt stress

3 讨论

多种环境因子能够诱导锌指蛋白的表达。Kim 等 (2001) 从大豆中克隆得到一个 C2H2 型锌指蛋白基因 *SCOF-1*, 该基因受低温和 ABA 诱导表达; ugano 等 (2003) 的研究表明, 矮牵牛锌指蛋白基因 *ZPT2-3* 的表达受低温、干旱、重金属、机械损伤等诱导; Wang 等 (2008) 研究了胡杨锌指蛋白基因 *PSTZ*, 该基因受干旱胁迫和高盐胁迫诱导表达; 在菠萝上也有类似报道 (杨祥燕 等, 2009)。与前人研究类似, 本研究结果显示, 沙冬青 *AmZFPG* 受多种非生物胁迫诱导表达, 包括低温、干旱、高盐胁迫, 说明 *AmZFPG* 可能在多种信号转导过程中充当重要角色, 初步推断该基因参与了沙冬青抵抗非生物胁迫的防御反应。其中, *AmZFPG* 受低温和干旱胁迫诱导表达较高盐胁迫更敏感, 这可能与该植物长期生存的环境条件即常年干旱缺水, 冬季寒冷有关。此外, 吴学闯等 (2010) 还发现大豆中一个锌指蛋白基因 *GmRZFP1* 的表达不仅受低温、干旱、高盐胁迫诱导, 还受乙烯的诱导表达, 表明锌指蛋白不仅参与非生物胁迫应答反应, 在生物胁迫的防御反应过程中也起重要作用, 因为乙烯信号途径是生物胁迫应答过程中的重要信号转导途径 (王贤智 等, 2007)。因此, 推测同为豆科植物的沙冬青, 其锌指蛋白可能也会参与植物对生物胁迫的防御反应。

已有的研究证明, 在模式植物中表达锌指蛋白基因能增强其抵抗逆境胁迫的能力。Kim 等 (2001) 从大豆中克隆得到一个锌指蛋白基因 *SCOF-1*, 该基因在拟南芥和烟草中过表达使二者的抗寒性明显提高, Wang 等 (2008) 发现胡杨的一个锌指蛋白基因 *PSTZ* 在烟草中过表达使转基因烟草的抗盐性较野生型显著提高, Lin 等 (2011) 发现过表达拟南芥锌指蛋白基因 *AtTZF1* 能显著提高植物的抗寒性和抗旱性。本研究中, 转 *AmZFPG* 基因烟草的抗寒性较野生型烟草有所提高, 低温胁迫后, 转基因植株受伤程度轻, 表现为叶片的鲜、干样质量减少量均比野生型烟草少。在抗旱性和抗盐性方面, 转 *AmZFPG* 基因烟草也显著强于野生型烟草, 主要表现在胁迫下的种子发芽率及盆栽苗的生长状况差异。NCBI 搜索显示, 烟草本身有其内源的锌指蛋白基因, 但是基因组 PCR 和 RT-PCR 检测发现在野生型烟草中没有扩增出特异条带, 而 3 个转 *AmZFPG* 基因株系有明显的特异条带, 说明扩增出的基因是外源沙冬青锌指蛋白基因 *AmZFPG*, 而不是烟草内源的锌指蛋白基因。因此, 转基因烟草抗逆性的提高是外源沙冬青 *AmZFPG* 基因表达的结果。

AmZFPG 在烟草中的异源表达增强了转基因烟草对低温、干旱、高盐胁迫的耐受性。此结果与该基因在沙冬青中的表达特性结果互相印证。本研究及已有的文献资料表明, 锌指蛋白是低温、干旱、高盐胁迫信号转导通路中的重要调控因子, 调控下游效应基因的表达, 进而调节植物生理生化

过程,提高植物的抗逆性。因此,对 *AmZFPG* 的研究不仅有益于揭示沙冬青强抗逆性形成的分子机制,而且为林木、花卉抗逆分子育种提供了可用的优良基因。

References

- Anoop N, Gupta A K. 2003. Transgenic indica rice cvIR-50 overexpressing *Vigna aconitifolia* delta-1-pyrroline-5-carboxylase synthetase cDNA shows tolerance to high salt. *Plant Biochem Biotechnol*, 12: 109 – 116.
- Cao P, Song J, Zhou C, Weng M, Liu J, Wang F, Zhao F, Feng D, Wang B. 2009. Characterization of multiple cold induced genes from *Ammopiptanthus mongolicus* and functional analyses of gene *AmEBP1*. *Plant Mol Biol*, 69 (5): 529 – 539.
- Guo L L, Yu Y H, Xia X L, Yin W L. 2010. Identification and functional characterisation of the promoter of the calcium sensor gene *CBL1* from the xerophyte *Ammopiptanthus mongolicus*. *BMC Plant Biology*, 10: 18.
- Han Shan-hua, Wang Shuang. 2005. Origin of vesicular inclusion in the vacuolus of *Ammopiptanthus mongolicus*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 25 (6): 1072 – 1076. (in Chinese)
- 韩善华, 王 双. 2005. 冬季沙冬青叶肉细胞液泡中泡状内含物的研究. *西北植物学报*, 25 (6): 1072 – 1076.
- Kim J C, Lee S H, Cheong Y H. 2001. A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, *SCOF-1*, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant Journal*, 25: 247 – 259.
- Lee M S, Gippert G P, Soman K V, Case D A, Wright P E. 1989. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science*, 245: 635 – 637.
- Li Chang-long, Yu Qiu-shi, Li Ai-de. 2004. Study and application of the endangered plant *Ammopiptanthus*. *Chinese Wild Plant Resources*, 23 (5): 21 – 23. (in Chinese)
- 李昌龙, 尉秋实, 李爱德. 2004. 孑遗植物沙冬青的研究进展与展望. *中国野生植物资源*, 23 (5): 21 – 23.
- Li Hui-qing, Ma Wen-yuan, Li Hui-yong. 2000. The resistant capability and prospects of *Ammopiptanthus*. *World Forestry Research*, 13 (5): 67 – 71. (in Chinese)
- 李慧卿, 马文元, 李慧勇. 2000. 沙冬青抗逆性及开发利用前景分析研究. *世界林业研究*, 13 (5): 67 – 71.
- Liu M Q, Lu C F, Shen X, Yin W L. 2006. Characterization and function analysis of a cold-induced *AmCIP* gene encoding a dehydrin-like protein in *Ammopiptanthus mongolicus*. *DNA Sequence*, 17 (5): 342 – 349.
- Liu M Q, Shen X, Yin W L, Lu C F. 2005. Functional analysis of cold-inducible cDNA clones in the legume *Ammopiptanthus mongolicus*. *Cryo Letters*, 24 (6): 213 – 222.
- Lin P C, Pomeranz M C, Jikumaru Y, Kang S G, Hah C, Fujioka S, Kamiya Y, Jang J C. 2011. The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein *AtTZF1* affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses. *The Plant Journal*, 65: 253 – 268.
- Liu R L, Liu M Q, Liu J, Chen Y Z, Chen Y Y, Lu C F. 2010. Heterologous expression of a *Ammopiptanthus mongolicus* late embryogenesis abundant protein gene (*AmLEA*) enhances *Escherichia coli* viability under cold and heat stress. *Plant Growth Regul*, 60: 163 – 168.
- Liu Rui-ling, Liu Mei-qin, Shi Jun-na, Chen Yu-zhen, Lu Cun-fu. 2010. Heterologous expression of *Ammopiptanthus mongolicus* cysteine proteinase inhibitor gene *AmPI* enhances *Escherichia coli* viability under cold and heat stresses. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 16 (3): 341 – 346. (in Chinese)
- 刘瑞玲, 刘美芹, 史军娜, 陈玉珍, 卢存福. 2010. 过量表达沙冬青巯基蛋白酶抑制剂基因 *AmPI* 提高大肠杆菌低温与热胁迫抗性. *应用与环境生物学报*, 16 (3): 341 – 346.
- Miller J, Mclachlan A D, Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J*, 4 (6): 1609 – 1614.
- Saad R B, Zouari N, Ramdhan W B, Azaza J, Meynard D, Guiderdoni E, Hassairi A, Walid B R. 2010. Improved drought and salt stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing a novel A20/AN1 zinc-finger “*AtSAP*” gene isolated from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Plant Mol Biol*, 72: 171 – 190.

- Shi J, Liu M Q, Shi J N, Zheng G S, Wang Y P, Wang J Y, Chen Y Z, Lu C F, Yin W L. 2012. Reference gene selection for qPCR in *Ammopiptanthus mongolicus* under abiotic stresses and expression analysis of seven ROS-scavenging enzyme genes. *Plant Cell Rep*, 31: 1245 – 1254.
- Shi Jing, Liu Mei-qin, Shi Jun-na, Zhao Xiao-xin, Lu Cun-fu, Yin Wei-lun. 2012. Sequence analysis and expression pattern of *AmLEA14* encoding a late embryogenesis abundant protein in *Ammopiptanthus mongolicus*. *Journal of Beijing Forestry University*, 34 (4): 114 – 119. (in Chinese)
- 师 静, 刘美芹, 史军娜, 赵晓鑫, 卢存福, 尹伟伦. 2012. 沙冬青胚胎晚期发生丰富蛋白基因序列及表达特性分析. *北京林业大学学报*, 34 (4): 114 – 119.
- Shi Jun-na, Liu Mei-qin, Shi Jing, Wang Yan-ping, Zhi Guan-hua, Chen Yu-zhen, Lu Cun-fu. 2011. Sequence analysis and expression pattern of *AmZFPG* encoding a GATA type zinc finger protein in *Ammopiptanthus mongolicus*. *Journal of Beijing Forestry University*, 33 (3): 21 – 25. (in Chinese)
- 史军娜, 刘美芹, 师 静, 王艳萍, 智冠华, 陈玉珍, 卢存福. 2011. 沙冬青 GATA 型锌指蛋白基因序列及表达分析. *北京林业大学学报*, 33 (3): 21 – 25.
- Song J, Liu J, Weng M L, Huang Y Y, Luo L, Cao P X, Sun H W, Liu J, Zhao J H, Feng D Q, Wang B. 2013. Cloning of galactinol synthase gene from *Ammopiptanthus mongolicus* and its expression in transgenic *Photinia serrulata* plants. *Gene*, 513: 118 – 127.
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Takagi M O, Takatsuji H. 2003. Strsee-responsive zinc finger gene *ZPT2-3* play a role in drought tolerance in petunia. *The Plant Journal*, 36: 830 – 841.
- Wang Hua, Liang Shou-hua, Wang Hui, Jia Gui-xia. 2007. Rare and precious wild flower resources in Inner Mongolia derset region and their utilization prospect in landscape gardening. *Scientia Silvae Sinicae*, 43 (3): 59 – 65. (in Chinese)
- 王 华, 梁守华, 王 惠, 贾桂霞. 2007. 内蒙古荒漠地区的一些较珍稀野生花卉资源及其园林应用前景. *林业科学*, 43 (3): 59 – 65.
- Wang J Y, Xia X L, Wang J P, Yin W L. 2008. Stress responsive zinc-finger protein gene of *Populus euphratica* in tobacco enhances salt tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (1): 56 – 61.
- Wang Xian-zhi, Zhang Xiao-juan, Zhou Rong, Sha Ai-hua, Wu Xue-jun, Cai Shu-ping, Qiu De-zhen, Zhou Xin-an. 2007. QTL analysis of seed and pod traits in soybean RIL population. *Acta Agronomica Sinica*, 33 (3): 441 – 448. (in Chinese)
- 王贤智, 张晓娟, 周 蓉, 沙爱华, 吴学军, 蔡淑平, 邱德珍, 周新安. 2007. 大豆重组自交系群体荚粒性状的 QTL 分析. *作物学报*, 33 (3): 441 – 448.
- Wei Q, Hu P, Kuai B K. 2012. Ectopic expression of an *Ammopiptanthus mongolicus* H⁺-pyrophosphatase gene enhances drought and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 110: 359 – 369.
- Wu Xue-chuang, Cao Xin-you, Chen Ming, Zhang Xiao-ke, Liu Yang-na, Xu Zhao-shi, Li Lian-cheng, Ma You-zhi. 2010. Isolation and expression pattern assay of a C3HC4-type RING zinc finger protein gene *GmRZFP1* in *Glycine max* (L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 11 (3): 343 – 348. (in Chinese)
- 吴学闯, 曹新有, 陈 明, 张晓科, 刘阳娜, 徐兆师, 李连城, 马有志. 2010. 大豆 C3HC4 型 RING 锌指蛋白基因 *GmRZFP1* 克隆与表达分析. *植物遗传资源学报*, 11 (3): 343 – 348.
- Yang Xiang-yan, Cai Yuan-bao, Wu Qing-song, Sun Guang-ming. 2009. Cloning and expression analysis of a zinc finger prote in gene *AcRCHY1* from pineapple. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (11): 1589 – 1596. (in Chinese)
- 杨祥燕, 蔡元保, 吴青松, 孙光明. 2009. 菠萝锌指蛋白基因 *AcRCHY1* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 36 (11): 1589 – 1596.