

夏金婵, 何奕昆. 敲除 *DWF4* 基因提高拟南芥对低温胁迫的抗性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 505-511.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.007

敲除 *DWF4* 基因提高拟南芥对低温胁迫的抗性

夏金婵¹, 何奕昆²

(1. 河南中医学院基础医学院, 河南 郑州 450008; 2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: 以拟南芥类固醇类 C22 α -羟化酶基因 *DWF4* 的 T-DNA 插入缺失突变体 *dwf4* 为研究材料, 通过观察突变体在低温胁迫条件下的表型, 检测 *dwf4* 突变体和野生型在低温胁迫条件下的相对电导率、叶绿素含量、可溶性糖含量、脯氨酸含量、抗冷基因表达量和过氧化物酶基因表达量的区别, 探讨了该基因在抗低温胁迫反应过程中的功能。结果表明, 敲除 *DWF4* 基因能够提高拟南芥对低温胁迫的抗性。*dwf4* 突变体的抗低温胁迫能力一方面源于在低温胁迫下, 与野生型相比, *dwf4* 突变体中相对较低的电导率和较高的叶绿素含量, 以及更多渗透调节物质可溶性糖和脯氨酸的积累, 另一方面源于低温胁迫条件下 *dwf4* 突变体中低温胁迫响应的下游基因 *RD29A* 及 *COR47* 的高表达。结果还表明尽管 *dwf4* 突变体中过氧化物含量增加, 但是过氧化物酶基因 *Prx22* 与 *Prx698* 的高表达对过氧化物的毒害起到了很好的抑制作用。说明在拟南芥中 *DWF4* 负调控拟南芥对低温胁迫的反应过程。

关键词: *DWF4* 基因; 低温胁迫; *COR47* 基因; *RD29A* 基因

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)03-0505-07

Improvement of cold tolerance by knockout of *DWF4* gene in *Arabidopsis*

XIA Jin-chan¹, HE Yi-kun²

(1. School of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. School of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: A T-DNA deletion mutant *dwf4* of *Arabidopsis* was used as material to investigate the role of *DWF4* gene in cold tolerance in plants by comparing the phenotypic performance and physiological characteristics between *dwf4* mutant and wild type seedlings. The *dwf4* mutant knockout of *DWF4* gene exhibited an increased tolerance to cold stress resulting from lower electrical conductivity, higher chlorophyll content, and higher concentrations of soluble sugar and proline and higher expression levels of *RD29A* and *COR47* compared with wild type. The higher levels of peroxidase genes *Prx22* and *Prx698* in *dwf* mutant effectively inhibited the harm caused by the increased reactive oxygen species. Taken together, it was suggested that *DWF4* gene might play a negative role in response to cold stress in *Arabidopsis*.

Key words: *DWF4* gene; cold stress; *COR47* gene; *RD29A* gene

低温是植物经常遭受的一种环境胁迫因子, 它限制作物的产量, 影响植物的自然分布^[1-2]。剖析植物对低温的应答反应机制、提高其抗低温能力在农业生

产上具有重要意义。为了适应和抵抗低温胁迫, 在长期进化过程中植物形成了相应的应答保护机制。目前, 通过筛选和克隆的方法已得到了许多与冷驯化信号途径相关的基因, 例如 *CBF*、*COR*、*KIN*、*RD* 等^[3], 对它们的功能分析为我们绘制了植物抗冷反应的信号传递网络, 其中 ICE1-CBF-COR 通路在植物的冷驯化过程中起重要作用。在冷驯化过程中, 膜是最先受到

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 河南中医学院博士基金项目 (BSJJ2010-35)

作者简介: 夏金婵 (1978-), 女, 河南郑州人, 博士, 讲师, 主要从事分子生物学研究。(E-mail) epsalon@163.com

低温影响的细胞结构^[4];低温诱导的质膜硬化可导致肌动蛋白细胞骨架的重排,诱导胞内 Ca^{2+} 的瞬时增加^[5]; IP_3 作为重要的信号分子介导细胞内钙库储存的 Ca^{2+} 释放到胞质,从而调控 *CBF* 和 *COR* 基因的表达^[6]。 *ICE1* 基因编码一个 MYB 类型的碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)转录因子,在上游调节 *CBF* 和其他转录因子的表达,提高抗冷性^[7]。 *HOS1* 蛋白通过泛素化介导的蛋白质降解负调控 *ICE1*^[8]。在不依赖于 *CBF* 的途径中,转录因子 *HOS9*、*HOS10*、RNA 修饰和核质转运在调节有关抗冷基因的表达和提高植物抗冷能力方面具有至关重要的作用^[9-10]。植物对冷胁迫的分子反应机制已经成为目前科学研究的热门领域,近几年的研究成果为改良作物的抗冷能力打下了坚实的基础。

有研究表明,一些植物激素也参与了植物的抗逆反应过程。脱落酸(ABA)能够提高低温条件下植物的抗氧化能力,降低过氧化物(ROS)的积累^[11],诱导 *CBF* 基因的表达,但其表达量远远低于低温诱导的表达量^[12]。外施油菜素内酯(BR)在植物的生长发育过程中也具有重要的调节功能,例如参与光形态建成,促进植物细胞的生长、分裂和分化等。BR 不仅能够阻止低温对叶绿体的破坏,提高植物的抗冷能力,还能够恢复高盐胁迫条件下幼苗的生长状况^[13],但是 BR 在植物抗逆反应过程中所起作用的分子机制还不清楚。拟南芥的 *DWF4* 基因编码一个类固醇类 C22 α -羟化酶,催化油菜素内酯的生物合成过程。该基因在植物活跃生长的组织中表达,例如根与茎的顶端组织以及根与茎的结合部位^[14],表达量受乙烯和茉莉酸甲酯的调控^[15],参与植物的抗高温反应过程^[16],超表达 *DWF4* 的转基因植株表现出外加 BR 的特征,包括较长的下胚轴等^[17]。本试验采用反向遗传学的方法,利用拟南芥 *DWF4* 基因缺失突变体 *dwf4*,研究敲除 *DWF4* 基因后拟南芥对低温胁迫的响应,探讨该基因在抗低温胁迫反应过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 植物材料和生长条件

试验中所用的野生型拟南芥(*Arabidopsis*)和 *dwf4* 突变体均为 Col-0 生态型背景。在培养皿中无菌培养拟南芥,先对种子进行表面消毒,4℃同步化处理 2~3 d 后,均匀地种在含有 0.8% 琼脂的 1/2MS 培养基上,放在培养室中培养。培养室的培养条件:

温度为 22℃,光照度为 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗交替。低温胁迫处理:在培养皿中生长 21 d 的材料不经冷驯化置于 -20℃ 中 1 h,4℃解冻 12 h,于 22℃、16 h 光照/8 h 黑暗中恢复 7 d。

1.2 生理指标的测定

将在正常培养基上生长 14 d 的野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体幼苗移到 4℃条件下处理 2 d,测定野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体在低温胁迫下可溶性糖和脯氨酸含量^[18-19]。在营养土中生长 21 d 的野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体幼苗,移到 4℃条件下 2 d 进行低温处理,测定叶绿素含量^[20]。相对电渗透率的测定参考 Ishitani 等的方法^[21],其温度处理过程为:初始温度为 0℃,在此温度稳定 30 min 后降至 -1℃, -1℃维持 1 h 后加入碎冰,而后以 2℃/h 速度降温至 -12℃,每一个温度梯度取 1 个样。将在正常培养基上生长 10 d 的野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体幼苗,移到 4℃条件下进行低温处理 2 d,测定硫代巴比妥酸反应物(TBARS)的含量,测定方法参照文献[22]、[23]。

1.3 实时荧光定量 PCR

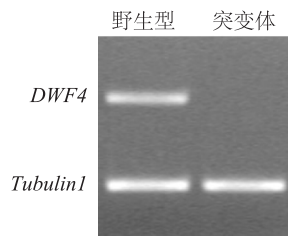
在正常培养基上生长 10 d 的野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体幼苗,移到 4℃条件下进行低温处理,分别在 0 h、12 h、24 h 时取样。用 TRIzol 试剂(Sigma, USA)提取总 RNA,用 AMV 反转录酶(TaKaRa, Dalian)合成第一条 cDNA。利用 Agilent Strata-gene 荧光定量 PCR 仪(Mx3005P)进行实时荧光定量 PCR。荧光染料试剂盒采用 SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa, 日本),以稀释 10 倍的植物 cDNA 为模板。20 μL PCR 反应体系中含 1 \times SYBR Premix Ex Taq、上下游引物各 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、2 μL 稀释的 cDNA,使用 *UBQ10*(Polyubiquitin 10)作为内参对目标基因进行相对定量。

2 结果

2.1 *DWF4* 基因调节拟南芥对低温胁迫的反应过程

DWF4(基因编号 AT3g50660)位于拟南芥第 3 条染色体上,其中包含 8 个外显子和 7 个内含子,编码 513 个氨基酸^[14]。为了进一步探讨 *DWF4* 的生物学功能,从拟南芥信息资源中心(The Arabidopsis Information Resource, TAIR)获得

DWF4 基因的 T-DNA 插入突变体 (SALK_020761), 其插入位置在第 4 个外显子上。RT-PCR 结果显示由于 T-DNA 的插入, *DWF4* 基因被敲除 (图 1), 将该突变体命名为 *dwf4*。将在培养皿中正常生长 21 d 的野生型与 *dwf4* 突变体置于 -20°C 处理 1 h, 之后在 4°C 下解冻 12 h, 再置于正常培养条件下恢复生长 7 d。我们发现 *dwf4* 突变体在受到低温胁迫后能够继续生长出新的叶片, 而野生型拟南芥在受到低温胁迫后大多数叶片的叶绿素受到破坏而白化死亡 (图 2)。低温胁迫能够导致植物的细胞受到伤害, 造成相对电导率的变化。相对电导率能够反映低温胁迫对细胞膜的伤害程度, 是细胞膜在逆境条件下生理活性高低的重要指标之一。相对电导率低, 说明细胞膜的损伤程度小, 进而细胞受到的伤害就小, 抗寒能力就强。我们发现野生型和 *dwf4* 突变体经过低温处理后其相对电导率都表现出增加的趋势, 但是 *dwf4* 突变体的相对电导率比野生型的低, 例如, 经过 -9°C 低温处理, *dwf4* 突变体的相对电导率为 62%, 而野生型的为 75% (图 3)。植物中叶绿体对低温胁迫相当敏感, 低温胁迫会造成叶绿素的降解。在正常条件下, *dwf4* 突变体的叶绿素含量比野生型的稍低, 但是经过低温处理后野生型的叶绿素含量下降比较明显, 而 *dwf4* 突变体的叶绿素含量变化不大, 导致 *dwf4* 突变体的叶绿素含量比野生型的还要高 (图 4), 说明 *dwf4* 突变体抗冷能力强。



Tubulin1 为内参基因。

图 1 *DWF4* 基因在野生型 (WT) 与 *dwf4* 突变体中的表达

Fig. 1 Expression of *DWF4* gene in wild-type and *dwf4* mutant plants

2.2 低温胁迫下 *dwf4* 突变体可溶性糖和游离脯氨酸含量变化

在逆境条件下, 植物会积累一些渗透调节物质,

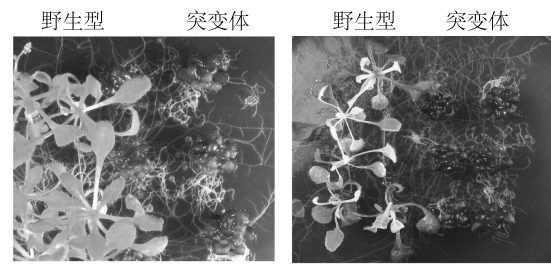


图 2 野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体在低温处理前 (左) 和低温处理后 (右) 的表型

Fig. 2 The phenotypes of wild-type and *dwf4* mutant plants before (left) or after (right) cold stress

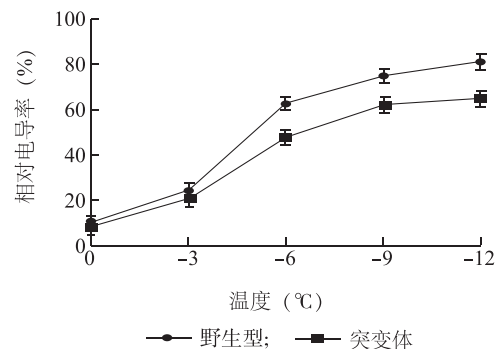


图 3 野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体在不同低温条件下的相对电导率

Fig. 3 Relative electronic conductivity of wild-type and *dwf4* mutant plants induced by cold stress

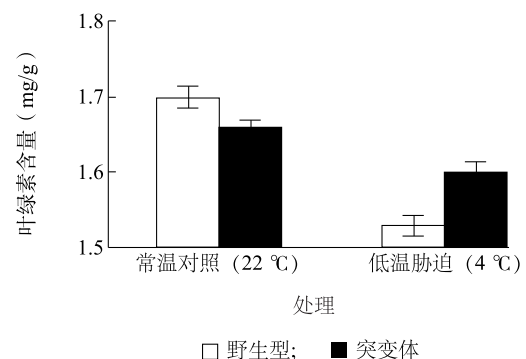


图 4 低温条件下野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体的叶绿素含量

Fig. 4 Chlorophyll contents of wild-type and *dwf4* mutant plants induced by cold stress

例如可溶性糖和脯氨酸, 用于平衡渗透压对胞质的损伤, 调节细胞膜的稳定性, 其含量的多少反映其抗逆能力的大小^[21,24]。因此, 测定植物体在低温胁迫

条件下可溶性糖和脯氨酸的含量,在一定程度上可以判断植物对低温胁迫的抵抗能力。从图 5 中可以看出,正常生长条件下 *dwf4* 突变体的可溶性糖与脯氨酸的含量都比野生型的高,分别是野生型的 1.29 与 5.10 倍。低温处理后 *dwf4* 突变体和野生型的可

溶性糖含量均有所提高,但此时 *dwf4* 突变体的可溶性糖与脯氨酸含量仍然比野生型的高,分别是野生型的 1.32 和 6.40 倍。低温胁迫条件下,*dwf4* 突变体中可溶性糖和脯氨酸的快速积累可能与相关的基因表达活跃有关。

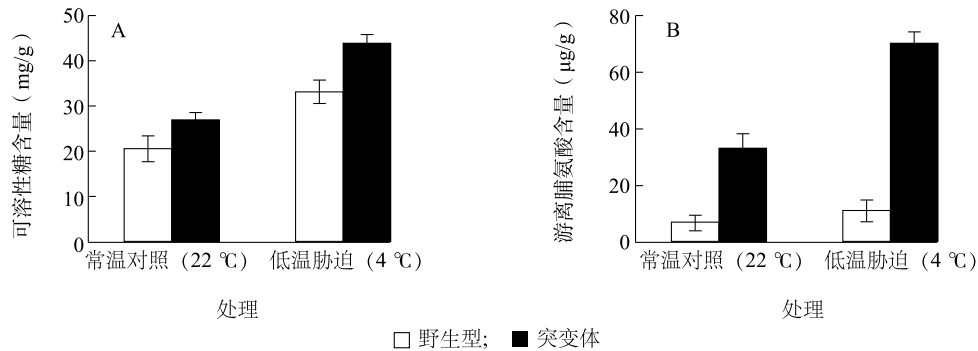


图 5 野生型拟南芥和 *dwf4* 突变体在低温胁迫下可溶性糖 (A) 和脯氨酸 (B) 含量

Fig. 5 Soluble sugar (A) and proline (B) contents of wild-type and *dwf4* mutant plants induced by cold stress

2.3 DWF4 负调控 RD29A 基因和 COR47 基因的表达

为了进一步探讨 *dwf4* 突变体抗低温胁迫的分子机制,选择参与低温胁迫反应的 CBF 转录因子与下游基因 *RD29A* 和 *COR47*,对它们的表达量进行分析。实时荧光定量 PCR 检测结果表明,*CBF1*、*CBF2*、*CBF3* 的表达量在低温处理条件下升高,但在 *dwf4* 突变体与野生型中的表达量并没有明显区别 (图 6)。*RD29A* 的表达量在突变体和野生型中都受低温胁迫的诱导,而且在突变体中的诱导表达量高,表达时间早。例如,在正常生长条件下,*dwf4* 突变体中 *RD29A* 的表达量是野生型的 1.22 倍,在低温处理 12 h 时,*dwf4* 突变体中 *RD29A* 的表达量是野生型中的 1.40 倍。在低温胁迫条件下 *dwf4* 突变体中 *COR47* 的表达量也高于野生型 (图 7),因此推测 *DWF4* 基因负调控 *RD29A* 和 *COR47* 的表达。

2.4 野生型和 *dwf4* 突变体中过氧化物酶基因的表达差异

低温胁迫能引起植物体内活性氧的积累,从而对细胞造成伤害,抑制生长^[11]。硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 含量是测定植物体内脂质过氧化和自由基形成的一个重要指标。为了验证低温胁迫条件下 *dwf4* 突变体抗氧化能力的强弱,我们检测了在不同条件下野生型和 *dwf4* 突变体中 TBARS 含量。结果表明,在正常生长条件下 *dwf4* 突变体中 TBARS

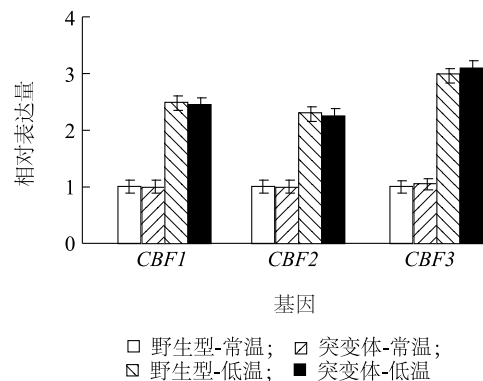


图 6 野生型和 *dwf4* 突变体在低温处理下 CBF 基因的表达量 (以 *UBQ10* 作为内参)

Fig. 6 The expression levels of CBF gene of wild-type and *dwf4* mutant plants induced by cold stress (*UBQ10* internal control)

含量比野生型中的高,低温胁迫能使拟南芥植株中 TBARS 含量升高,但 *dwf4* 突变体中 TBARS 含量仍高于野生型,即 *dwf4* 突变体中过氧化物的积累比野生型中的多 (图 8)。但是,*dwf4* 突变体抵抗低温胁迫的能力却比野生型强,为此我们用实时荧光定量 PCR 检测了抗氧化防御系统相关基因表达水平的变化。过氧化物酶在清除植物体内过氧化物毒害方面起着重要作用,是植物抗氧化防御体系中的一个重要组成成分,参与抗逆反应。我们检测了过氧化物酶基因 *Prx22* (AT2g38380) 和 *Prx69* (AT5g64100)

表达量的变化,发现在正常生长条件下,*dwf4* 突变体中 *Prx22* 和 *Prx69* 的表达量就比野生型中的高

(图8),这对低温条件下 *dwf4* 突变体中高含量的过氧化物所产生的毒害起到了很好的抑制作用。

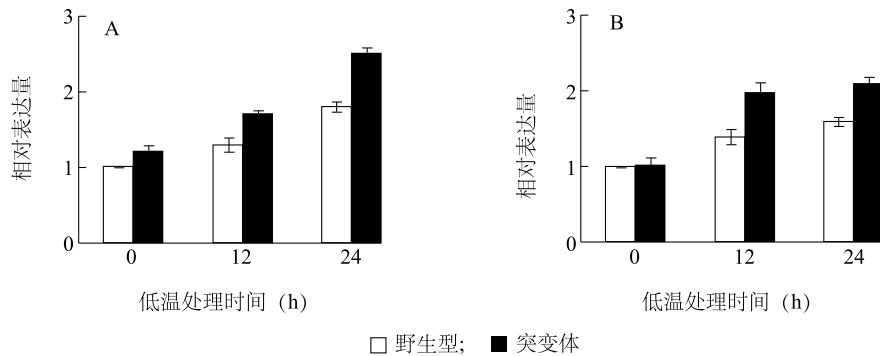


图7 野生型和 *dwf4* 突变体在低温处理下 *RD29A* 基因 (A) 和 *COR47* 基因 (B) 的表达量 (以 *UBQ10* 作为内参)

Fig. 7 The expression levels of *RD29A* gene (A) and *COR47* gene (B) of wild-type and *dwf4* mutant plants induced by cold stress (*UBQ10* as internal control)

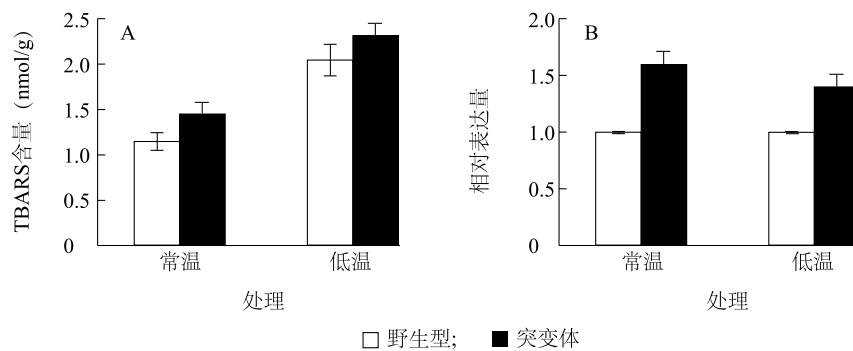


图8 野生型和 *dwf4* 突变体中低温条件下的 TBARS 含量 (A) 以及过氧化物酶 *Prx22* 与 *Prx69* 表达量 (B) (以 *UBQ10* 作为内参)

Fig. 8 TBARS content (A) and the expression levels of peroxidase genes *Prx22* and *Prx69* (*UBQ10* as internal control) (B) in wild-type and *dwf4* mutant plants under cold stress

3 讨论

在世界范围内,低温是一个重要的环境因子,影响植物的分布,限制作物的产量。低温不仅能直接对细胞产生伤害导致植株的死亡,还可以造成氧化与渗透胁迫。为了克服这种限制因素提高农作物产量,研究植物抗冷反应分子机制,进而通过分子生物学手段提高农作物的抗冷能力,显得至关重要。本研究中我们第一次发现敲除 *DWF4* 基因能够提高拟南芥的抗冷能力。

拟南芥 *dwf4* 突变体中,油菜素内酯 (BR) 合成过程中的一个限速酶 C22 α -类固醇水解酶发生缺失突变,导致突变体内油菜素内酯含量减少^[17]。*dwf4*

突变体表现为极度矮化、叶片圆而短小卷曲、侧根多且短、叶色深绿、下胚轴短且开花晚等特征。本试验发现缺失突变体 *dwf4* 的抗冷能力明显高于野生型。低温胁迫条件下 *dwf4* 突变体中高含量的可溶性糖和脯氨酸降低了细胞水势,有利于减少低温条件下渗透胁迫对植物的损伤。特别是脯氨酸含量,在正常生长条件下, *dwf4* 突变体中脯氨酸的含量就是野生型的 6.4 倍,这与 Strizhov 等^[25] 的发现一致。油菜素内酯能够模拟黑暗对 *P5CS1-GUS* 表达的抑制,从而导致 ABA 处理或干旱胁迫下植株脯氨酸含量下降^[25],而 *dwf4* 突变体中油菜素内酯含量低而导致细胞中脯氨酸含量升高。BR 是一种新型植物激素,在植物体内含量极低,但生理活性很高,不仅对

植物的生长发育有影响,与植物抗性也有一定的关系,外用 BR 处理油菜和番茄植株可以增强它们的耐热性^[26],还可以增强油菜和拟南芥的抗干旱和抗冻能力^[27]。*dwf4* 突变体体内油菜素内酯含量低而抗冻性强的分子机制可能与外施油菜素内酯后植株抗性增强的分子机制不同。Kagale 等用 BR 处理拟南芥和油菜,发现 *CBF* 的表达量在拟南芥中只有微量变化,在油菜中根本没有变化,下游的 *RD29A*、*COR47* 基因表达明显高于对照^[27]。我们也发现在低温条件下 *dwf4* 突变体中 *CBF* 基因的表达量与野生型中的并没有明显区别,而 *RD29A* 和 *COR47* 的表达则高于野生型,说明 BR 对植物抗冷能力的调控可能不依赖 *CBF* 转录因子而是通过其他因子影响下游基因 *RD29A* 和 *COR47*。许多非生物胁迫,例如干旱、高盐、低温等,都可以诱导过氧化物的产生,对植物体造成氧化胁迫,损伤 DNA 和蛋白质分子,抑制植物正常的生长和发育^[28]。研究发现,尽管 *DWF4* 缺失导致突变体中过氧化物含量的增加,但是 *dwf4* 突变体中高表达的过氧化物酶 *Prx22* 与 *Prx698*,对过氧化物的毒害起到了很好的抑制作用,这 2 个基因都属于植物特有的过氧化物酶(Ⅲ)家族,我们推测该家族基因的高表达可能是 *dwf4* 突变体具有强抗冷能力的重要原因。同时,我们也注意到 *dwf4* 突变体的一些表型特征,例如下胚轴短、叶片圆而肥厚、叶色深绿等,一般在抗冻植物中多见,例如,过量表达 *CBF* 转录因子的植株^[29]。野生型植株在低温下生长数日到数月也会表现出矮化、叶色深绿并且叶片增厚的特征^[18],这也说明在正常生长条件下 *dwf4* 突变体中可能有抗冷相关基因的表达,我们的研究也证明在正常情况下 *dwf4* 突变体中 *RD29A* 基因的表达量就高于野生型。

参考文献:

- [1] 戴红燕,华劲松,张荣萍,等.低温胁迫对高原粳稻幼苗生长的影响[J].江苏农业科学,2014,42(11):85-88.
- [2] 李孝凯,沙伟,国春晖,等.低温胁迫对毛尖紫萼藓、东亚砂藓生理生化及光合特性的影响[J].江苏农业科学,2014,42(10):355-359.
- [3] THEOCHARIS A, CLEMENT C, BARKA E A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures[J]. *Planta*, 2012, 235(6):1091-1105.
- [4] SANGWAN V, ORVAR B L, BEYERLY J, et al. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways[J]. *Plant J*, 2002, 31(5):629-638.
- [5] CATALA R, SANTOS E, ALONSO J M, et al. Mutations in the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ transporter *CAX1* increase *CBF/DREB1* expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(12):2940-2951.
- [6] CHINNUSAMY V, ZHU J K, ZHU J H. Gene regulation during cold stress acclimation in plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 126(1):52-61.
- [7] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, et al. *ICE1*: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(8):1043-1054.
- [8] ZHU J, DONG C H, ZHU J K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(3):290-295.
- [9] ZHU J, SHI H, LEE B H, et al. An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, *HOS9*, mediates cold tolerance through a *CBF2*-independent pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26):9873-9878.
- [10] DONG C H, HU X, TANG W, et al. A putative *Arabidopsis* nucleoporin, *AtNUP160*, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(24):9533-9543.
- [11] LIU Y, JIANG H, ZHAO Z, et al. Absciscic acid is involved in brassinosteroids-induced chilling tolerance in the suspension cultured cells from *Chorispora bungeana* [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168(9):853-862.
- [12] KNIGHT H, ZARKA D G, OKAMOTO H, et al. Absciscic acid induces *CBF* gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(3):1710-1717.
- [13] ANURADHA R, RAO S S R. Effects of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Growth Regul*, 2001, 33(2):151-153.
- [14] KIM H B, KWON M, RYU H, et al. The regulation of *DWARF4* expression is likely a critical mechanism in maintaining the homeostasis of bioactive brassinosteroids in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2):548-557.
- [15] CHUNG Y, MAHARJAN P M, Lee O, et al. Auxin stimulates *DWARF4* expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2011, 66(4):564-578.
- [16] MAHARJAN P M, CHOE S. High temperature stimulates *DWARF4* (*DWF4*) expression to increase hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Biol*, 2011, 54(6):425-429.
- [17] CHOE S, FUJIOKA S, NOGUCHI T, et al. Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2001, 26(6):573-582.
- [18] RISTIC Z, ASHWORTH E N. Ultrastructural evidence that intracellular ice formation and possibly cavitation are the sources of

- freezing injury in supercooling wood tissue of *Cornus florida* L. [J]. Plant Physiol, 1993, 103(3):753-761.
- [19] SHI H T, YE T T, CHEN F F, et al. Manipulation of arginase expression modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*; effent on arginine metabolism and ROS accumulation[J]. J Exp Bot, 2013, 64(5):1367-1397.
- [20] LICHTENTHALER H K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes [J]. Methods Enzymol, 1987, 148:350-382.
- [21] ISHITANI M, XIONG L, LEE H, et al. *HOS1*, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10(7):1151-1161.
- [22] HAN Y, ZHANG J, CHEN X, et al. Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa* [J]. New Phytol, 2008, 177(1):155-166.
- [23] XIE Y, LING T, HAN Y, et al. Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defence in wheat seedling roots [J]. Plant Cell Environ, 2008, 31(12):1864-1881.
- [24] LV W T, LIN B, ZHANG M, et al. Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress[J]. Plant Physiol, 2011, 156(8):1921-1933.
- [25] STRIZHOV N, ÁBRAHÁM E, ÖKRÉSZ L, et al. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 1997, 12(3):557-569.
- [26] DHAUBHADEL S, CHAUDHARY S, DOBINSON K F, et al. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings [J]. Plant Mol Biol, 1999, 40(2):333-342.
- [27] KAGALE S, DIVI U K, KROCHKO J E, et al. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses [J]. Planta, 2007, 225(2):353-364.
- [28] ASADA K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions [J]. Plant Physiol, 2006, 141(2):391-396.
- [29] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(3):1035-1040.

(责任编辑:张震林)