

腰果 CBF 基因家族的鉴定及响应冷胁迫的表达模式

崔恒久^{1,2,3,4}, 曾教科^{1,4}, 李 雯^{1,4}, 黄海杰^{5,6}, 彭世清^{2,3}, 郭 冬^{2,3}, 蒲金基^{2,3}, 周永凯^{2,3}, 李辉亮^{2,3*}

1. 海南大学园艺学院, 海南海口 570228; 2. 海南热带农业资源研究院, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 4. 海南大学海南省热带园艺作物品质调控重点实验室, 海南海口 570228; 5. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 6. 国家热带果树品种改良中心, 海南海口 571101

摘 要: 腰果 (*Anacardium occidentale* Linn) 属于典型的热带果树, 主要在我国云南省、海南省等地种植。腰果具有重要的经济价值、社会价值、生态价值, 为农民增产创收, 实现共同富裕和乡村振兴战略具有重要价值。腰果对于低温十分敏感, 在 8 ℃ 时就会受到严重伤害, 生长停止。所以低温胁迫是制约腰果生长的重要非生物胁迫。CBF 转录因子是植物在应对低温、干旱、盐等非生物胁迫下中发挥重要作用的转录因子。然而 CBF 基因家族在腰果中的作用尚未阐明, 该家族在低温胁迫下的表达模式尚不清楚。本研究对腰果 AoCBF 基因家族的基本特性进行探究, 通过生物信息学方法, 在腰果转录组中鉴定并获得 6 个 AoCBF 基因家族成员, 分别对其系统发育、理化性质、蛋白结构、低温诱导下表达模式和启动子作用元件进行分析。理化性质分析结果表明: 6 个 AoCBF 蛋白长度为 189~334 aa, 蛋白分子量为 21.31~37.89 kDa, 等电点均小于 7, 表明该蛋白呈酸性, 且均包含 AP2/ERF 结构域。基序分析表明: AoCBF 基因存在 5 个基序, 不同 AoCBF 基因 Motif 的缺失暗示着相关功能的缺失性。系统发育树分析表明: 6 个 AoCBFs 可分为 A、B 两个亚组, 其中 A 组包含 1 个基因, B 组仅包含 5 个基因。启动子顺势作用元件分析得出, AoCBF 可能参与激素响应及非生物胁迫响应过程。荧光定量表达分析显示, AoCBFs 对低温冷胁迫均有不同程度的响应, 表明 AoCBF 在响应低温胁迫生物学过程中发挥着一定的作用。本研究分析了 AoCBF 基因家族的基本特性, 为后续 AoCBF 的深入研究和应用积累基础数据。

关键词: 腰果; 低温响应; CBF 转录因子; 基因家族; qRT-PCR

中图分类号: S667.9 **文献标识码:** A

Identification of CBF Gene Family in Cashew and Its Expression Pattern in Response to Cold Stress

CUI Hengjiu^{1,2,3,4}, ZENG Jiaoke^{1,4}, LI Wen^{1,4}, HUANG Haijie^{5,6}, PENG Shiqing^{2,3}, GUO Dong^{2,3}, PU Jinji^{2,3}, ZHOU Yongkai^{2,3}, LI Huiliang^{2,3*}

1. College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Hainan Academy of Tropical Agricultural Resources, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Key Laboratory for Quality Regulation of Tropical Horticultural Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 570228, China; 5. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 6. National Cultivar Improvement Center of Tropical Fruit Tree, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: *Anacardium occidentale* Linn is a typical tropical fruit tree, which is mainly planted in Yunnan and Hainan provinces of China. Cashew cultivation has important economic, social and ecological values. It is of great value to realize

收稿日期 2022-12-19; **修回日期** 2023-02-22

基金项目 海南省热带园艺作物品质调控重点实验室开放课题[No. HNZDSYS(YY)-02]; 海南省自然科学基金项目 (No. 322RC799); 国家科技资源共享服务平台项目“国家热带植物种质资源库”。

作者简介 崔恒久 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 腰果低温逆境胁迫。*通信作者 (Corresponding author): 李辉亮 (LI Huiliang), E-mail: lihuiliang@itbb.org.cn。

realize the strategy of rural revitalization in China, increase farmers' production and income, and achieve common prosperity. Cashews are very sensitive to low temperatures, and they will be severely damaged at 8 °C and the growth will stop. Therefore, low temperature stress is an important abiotic stress that restricts cashew growth. CBF transcription factors play important roles in plant response to abiotic stresses such as low temperature, drought and salt. However, the role of CBF gene family in cashews has not been elucidated, and the expression pattern of this family in response to low temperature stress is unknown. In this study, in order to explore the basic characteristics of the CBF gene family in cashew nuts, six AoCBF gene family transcription factors were identified and obtained from the cashew transcriptome by bioinformatics methods, and the physical and chemical properties, protein structure, phylogeny, promoter action elements and expression patterns under low temperature induction were analyzed. The length of the six AoCBF proteins ranged from 189 to 334 aa, and the molecular weight of the proteins ranged from 21.31 to 37.89 kDa. The isoelectric points of the six AoCBF proteins were less than 7, indicating that the proteins were acidic. The proteins all contained an AP2/ERF domain. Motif analysis showed that there were five motifs in AoCBF genes, and the absence of different AoCBF gene motifs implied the absence of related functions. Phylogenetic tree analysis showed that the six AoCBF genes could be divided into two subgroups, A and B, in which group A contained one gene and group B only contained five genes. The analysis of homeotropic elements of promoter showed that AoCBF gene might be involved in the response to hormone and abiotic stress. Fluorescence quantitative expression analysis showed that all the six AoCBF genes responded to low temperature and cold stress to different degrees, indicating that AoCBF played a role in the biological process of cashew nut in response to low temperature stress. The results summarized the basic characteristics of the AoCBF gene family and accumulated basic data for further molecular resistance research and application of cashews AoCBF genes.

Keywords: cashew nut; low temperature response; CBF transcription factor; gene family; qRT-PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.03.004

植物生长受多种环境因素的控制,其中温度是重要的因素之一^[1]。低温胁迫会影响甚至破坏细胞的动态平衡,导致植物生长发育受到严重影响^[2]。C-repeat binding factor (CBF) 转录因子,也叫做 dehydration responsive element binding factor 1 蛋白 (DREB1 蛋白)^[3-4],在响应低温胁迫中起重要作用,冷应答途径是植物感受低温信号重要的调控途径之一。ICE-CBF-COR 是被研究最透彻的一条通路。植物对低温等非生物胁迫抗性的提高与脯氨酸、可溶性糖等物质的积累密不可分,而相关物质的积累需要下游基因的激活表达。下游基因的激活表达需要 CBF 转录激活因子与下游 COR 基因启动子中的 DRE/CRT (C-repeat/dehydration responsive element) 顺式作用元件特异性结合^[5-8]。

CBF 转录因子属于 Apetala2/Ethylene responsive factor 基因家族 (AP2/ERF 基因家族), AP2/ERF 由 AP2 亚家族、ERF 亚家族和 RAV 亚家族组成。目前, CBF 基因家族已经在多种植物中得以研究,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 研究表明,拟南芥基因组中含有 6 个 CBF 基因^[9]。此外, CBF/DREB1 转录因子还存在于其他植物中,如番茄^[10-13]、水稻^[14-20]、大豆^[21-25]等。CBF/DREB1 转录因子具有高度保守的 AP2/ERF 结构域。AP2/ERF 结构域

含约 60 个氨基酸^[26]。

腰果 (*Anacardium occidentale* Linn) 被誉为世界四大著名坚果之一。是典型的热带果树,原产地在巴西东北部地区,16 世纪被引入亚洲、非洲以及南美洲的热带国家和地区^[27]。栽培的纬度范围在北纬 20° 和南纬 20° 之间,但主要分布在 15° 以内地区。我国腰果种植主要集中在云南、海南等地。

腰果仁有丰富的营养价值,用途十分广泛,可作为甜品、点心、菜肴的原材料。副产品主要有果梨、果壳液等,果壳液被作为重要的工业原料被大量使用,果梨可以食用,用在果酒、果酱、腌菜等^[28]。因此,种植腰果可以带来很大的经济效益、社会效益和生态效益。在中国热带地区脱贫攻坚和乡村振兴中起到重要作用。腰果对低温比较敏感,当温度低于 15 °C 时生长缓慢,在 8 °C 时受到严重伤害,此前,海南等地的腰果因低温受灾严重。目前,对腰果的研究主要集中在生理层面,对于分子层面的研究较少。抗逆基因已经在许多物种中进行了挖掘和应用,本研究将腰果作为实验材料,对腰果的 CBF 基因家族进行相关生物信息学分析,分离鉴定得到 AoCBF 基因,为后续深入开展腰果耐寒性研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

将保存于中国热带农业科学院种质库的腰果种质资源 CJSX 作为实验材料。通过筛选得到有活力的种子，将筛选的种子进行催芽，长出真叶后移栽至育苗盘中，在温度为 25 ℃，16 h 光照，2800 lx 的环境下生长。生长到 6 片真叶时，移栽至人工气候屋，保持光照条件不变，对照温度 25 ℃（CK）不变，温度分别调至 8 ℃、16 ℃，2 个温度下处理时间为 6 h、24 h，共 4 个处理（T₁：8 ℃ 6 h，T₂：8 ℃ 24 h，T₃：16 ℃ 6 h，T₄：16 ℃ 24 h）。将低温处理过的腰果叶片采摘，液氮处理，送公司进行 Illumina 转录组测序。

1.2 方法

1.2.1 腰果 CBF 基因家族的鉴定和分析 在拟南芥资源网站 TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>) 上获取相关 AtCBFs 蛋白序列。将得到的 AtCBFs 蛋白序列进行本地 BLAST 分析，相关参数 E_value 设置为 10e⁻⁵⁰；蛋白的筛选标准为 identity ≥60%，align_ratio ≥60%。将蛋白是否含有 AP2 结构域作为重要的判断依据，使用 NCBI-CDD 数据库与 Pfam_scan 软件进行验证，由此得到具有 AP2 结构域的候选腰果 CBF 基因。利用在线软件 Expassy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析腰果 AoCBF 蛋白序列，对每个 AoCBF 蛋白的等电点、长度、相对分子质量进行预测^[29]。使用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线软件对候选的腰果 CBF 基因进行亚细胞定位预测^[30]。

1.2.2 AoCBF 蛋白保守结构域和保守基序 (motif) 分析 对每个 AoCBF 氨基酸序列使用 MEGA-X 软件进行比对，使用 MEME 在线软件 (<https://meme-suite.org/meme/>) 对 AoCBF 蛋白保守结构域对进行分析。对相关 AoCBF 蛋白的保守基序进行分析^[31]，设置为 5 个基序，设置基序为 10~200 个氨基酸长度，其他参数均为默认值。使用 SWISS 软件对 AoCBF 蛋白进行三维结构预测^[26]。

1.2.3 AoCBF 蛋白系统进化分析 为了进一步研究腰果和拟南芥之间的进化关系，将 6 个 AoCBF 蛋白和 6 个 AtCBF 蛋白采取 Neighbor-joining (NJ) 法在 MEGA-X 软件上构建系统发育树^[24]，Bootstrp method 参数值设为 1000。

1.2.4 AoCBF 基因上游序列的顺式作用元件分析 从 JGI ([https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Ao-](https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Ao-ccidentale_v0_9)

[ccidentale_v0_9](https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Ao-ccidentale_v0_9)) 网站上获取 AoCBF 基因上游 2000 bp 的序列，利用 PlantCARE 软件对其进行顺式作用元件预测分析^[32]。

1.2.5 AoCBFs 在冷胁迫下的表达模式 用 TBtools (v1.082) 软件提取转录组数据库中腰果 CBF 基因家族的 CDS 序列，并通过 IDT (<https://sg.idtdna.com/pages>) 在线网站进行引物设计 (表 1)。使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (成都福际生物技术有限公司) 按照说明书从每个样品中提取总 RNA，并对其浓度和纯度进行检测，结果显示 A₂₆₀/A₂₈₀ 和 A₂₆₀/A₂₃₀ 的参数均在 2.0 左右，表明 RNA 无明显的 DNA 和蛋白污染，此外，通过琼脂糖电泳也检测 RNA 的完整性。随后通过逆转录试剂盒 (苏州莫纳生物科技有限公司) 按照说明书合成 cDNA 第一链并检测其浓度，稀释后备用。并使用 2^{-ΔΔC_T} 方法计算每个 AoCBFs 的最终相对表达水平。使用 GraphPad Prism 8 软件制图，每个处理 3 个生物学重复。

表 1 本研究引物序列
Tab. 1 Primers sequence of this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
AoCBF1-F	GCTGAATCTAAAATCAATACTGAGCCTG
AoCBF1-R	TGTGCATCCCTCCAACAGTCGT
AoCBF2-F	CATAAGAAAGACTGCAGCTGAGGC
AoCBF2-R	AACGCTTCTTCATCCATAAAGTAAACAC
AoCBF3-F	TGGAAAATTTTGACTTGGCATCAGTG
AoCBF3-R	ACTTTGTAACCAAGGTGGTGTGTAC
AoCBF4-F	GGACAAATTTGAGTCCGCATCAGTA
AoCBF4-R	CTTTGTAACCAAGGCGGTGTGTA
AoCBF5-F	AGCAAGGTGAGATAACATTCGGGATA
AoCBF5-R	AGCTGGTGGTGTAAGAATCAAAGC
AoCBF6-F	FGGAGGCTTTCAGGCCTCACCAT
AoCBF6-R	CACTTTCACATCTTCCAGTTCACATC
AoTubF	TAGTGACAAGACAGTAGGTGGAGGT
AoTubR	GTAGGTTCCAGTCCTCACTTCATC

2 结果与分析

2.1 腰果 CBF 基因家族成员的鉴定和分析

用转录组数据库和 6 个已知的拟南芥 AtCBFs 序列进行本地 BLAST 分析，共得到 15 个注释的 DREB 基因。经过结构域分析，鉴定出 11 个腰果 CBF 基因。设计特异性引物进行 PCR 扩增，获得 6 条腰果序列 (AoCBF1~AoCBF6)。

理化性质分析结果显示，AoCBFs 编码的氨基

酸序列存在较大差异，预测蛋白的长度为 189~334 aa，最长的为 AoCBF1，最短的为 AoCBF4。蛋白分子量介于 21.31~37.89 kDa 之间；6 个 AoCBFs 全部呈酸性，其理论等电点（pI）介于 4.93~5.79 之间。通过亚细胞定位分析得出所有 AoCBFs 都有核定位信号（表 2）。

表 2 AoCBF 基因家族成员信息
Tab. 2 Information of AoCBF gene family

蛋白名称 Protein name	登录号 Gene ID	氨基酸长度 Length of amino acid	等电点 pI	分子质量 Molecular weight/kDa	亚细胞定位 Subcellular localization
AoCBF1	Anaoc.0016s0971.1	334	4.93	37.89	Nucleus
AoCBF2	Anaoc.0004s0666.1	258	5.56	28.87	Nucleus
AoCBF3	Anaoc.0019s0135.1	248	5.17	27.21	Nucleus
AoCBF4	Anaoc.0001s0720.1	189	5.79	21.31	Nucleus
AoCBF5	Anaoc.0015s0493.1	224	5.41	24.79	Nucleus
AoCBF6	Anaoc.0013s0375.1	248	4.99	27.36	Nucleus

2.2 AoCBF 蛋白保守基序分析

保守基序（motif）预测结果表明（图 1），AoCBFs 含有 5 个保守 motifs。motif 1、motif 2 存在所有 AoCBFs 中，表明 2 个基序高度保守。AoCBF1 只包含 motif1、motif2，AoCBF2、AoCBF3、

AoCBF4、AoCBF5、AoCBF6 包含 motif1、motif2、motif3、motif5，原因可能是串联重复过程中碱基丢失造成的。对上述保守基序检测发现 motif 1 含有 AP2 结构域。根据其在结构上有所不同，推测不同 AoCBF 在功能上存在一定差异。

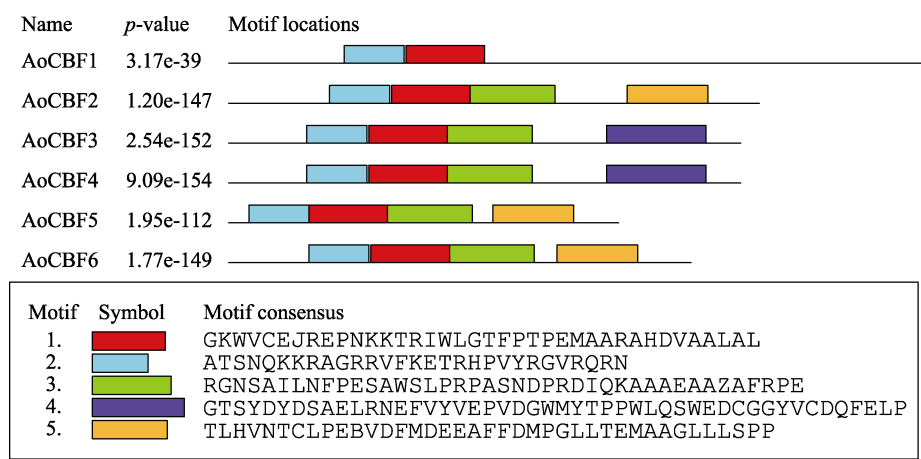


图 1 AoCBFs 保守基序分析
Fig. 1 Analysis of motifs of AoCBF proteins

2.3 腰果和拟南芥 CBF 蛋白的系统发育树分析

将 6 个 AoCBFs 氨基酸序列和 6 个 AtCBFs 氨基酸序列构建系统发育树。结果显示，上述 CBF 氨基酸序列可分成 A、B 两个亚家族。AoCBFs 在 A 组有 1 个，B 组有 5 个。AtCBFs 在 A 组有 2 个，B 组有 6 个（图 2）。

2.4 AoCBFs 三维结构及序列特征分析

6 个 AoCBF 蛋白序列相似性在 46%~58% 之间。一段长度为 60 个氨基酸左右较为保守的序列在 N 段被发现，软件预测其为 CBF 蛋白的 DNA 结合结构域（图 3）。AoCBFs 的 identity 最高为

AoCBF4 和 AoCBF6。最高的同源性为 58.21%。对 AoCBFs 进行三维结构建模分析，1 个 α -螺旋和 2 个 β -折叠构成 AoCBFs 的三维结构。

2.5 AoCBFs 上游序列的顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 软件注释 AoCBFs 基因上游 2000 bp 启动子区域序列，在其上游发现了参与激素反应的相关顺式作用元件（茉莉酸甲酯、脱落酸、赤霉素、生长素、水杨酸有关的顺式作用元件）、参与低温、干旱和高盐诱导胁迫相关的响应元件、光响应元件。此外，普遍存在于启动子与增强子区的核心元件、生长发育相关调控顺式

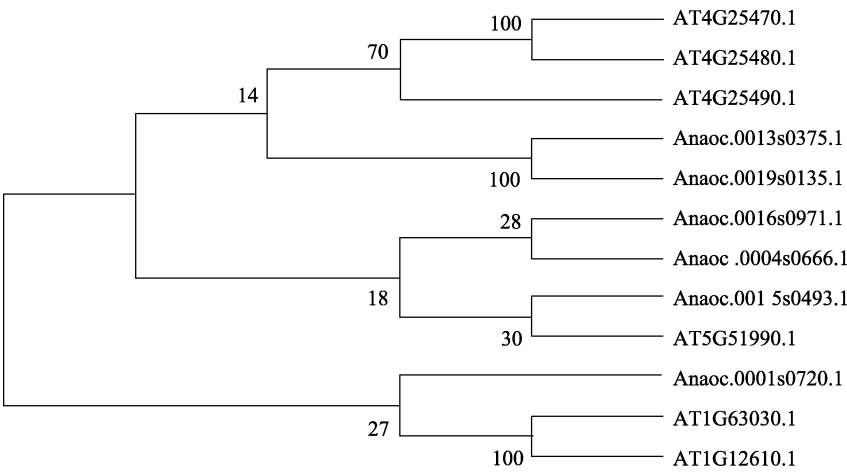


图 2 AoCBFs 和 AtCBFs 的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of AoCBFs and AtCBFs

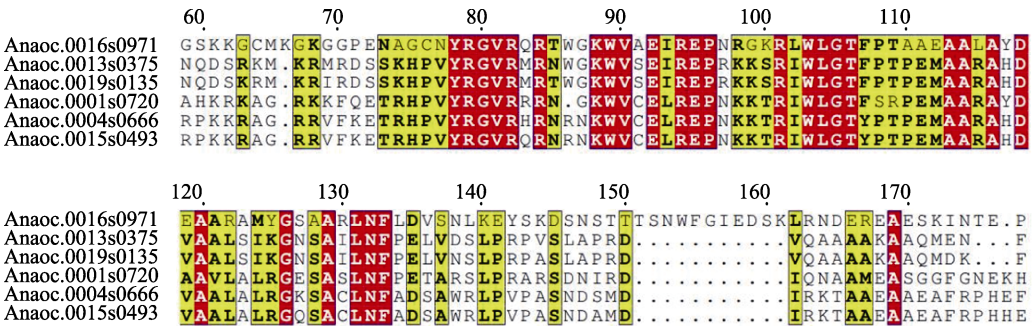


图 3 AoCBFs 多重序列比对分析
Fig. 3 Multiple sequence alignment analysis of AoCBF proteins

作用元件也被发现。结果表明，*AoCBF* 基因在抵御非生物胁迫、生长发育、激素调控中发挥重要作用（表 3）。

2.6 *AoCBFs* 在冷胁迫下的表达模式

为了探明 *AoCBFs* 在冷胁迫下的表达模式，对 *AoCBFs* 进行实时荧光定量 PCR 分析。结果表明，经 8 ℃ 和 16 ℃ 低温诱导处理 6 h 和 24 h 后，除了 *AoCBF5* 在 8 ℃ 时相对表达量变化较少，在 16 ℃ 表达变化较大，其他基因在 8 ℃ 的表达量均显著升高。表明 *AoCBF* 基因参与响应冷胁迫相关

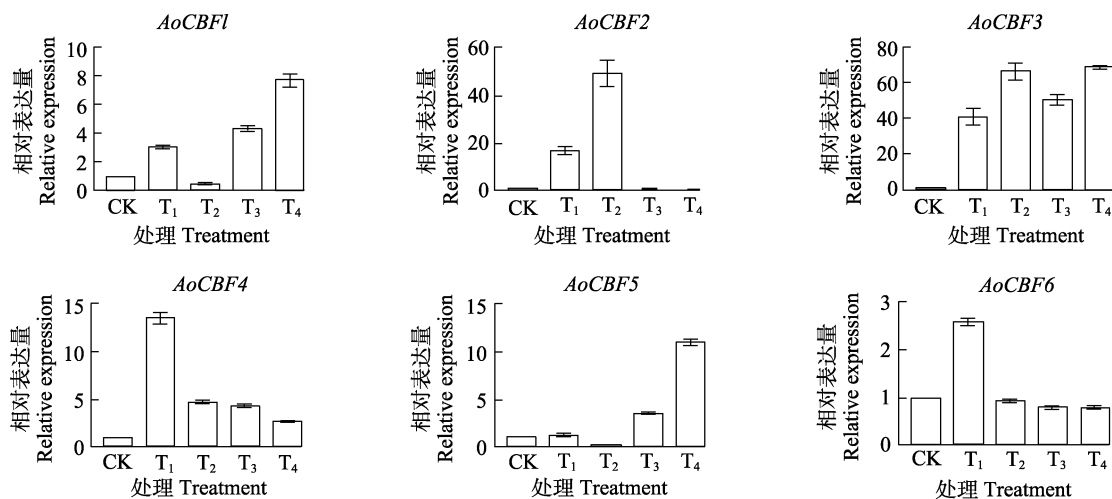
生物学过程（图 4）。

3 讨论

腰果是典型的热带果树，对低温极敏感。主要在我国热区的海南、云南等地种植。但是近年来冬季寒潮频发，温度降低使腰果受到冷害的问题愈加严重。植物中 CBF 家族在面对低温时发挥调控作用，减少低温对植株的损伤。因此，本课题组对腰果 CBF 家族进行生物信息学分析，以期发现腰果 CBF 基因在低温胁迫下的调控机制。

表 3 *AoCBFs* 上游序列中的顺式作用元件
Tab. 3 Cis-acting elements in upstream sequence of *AoCBF* genes

基因名称 Gene name	顺式作用元件 Cis-acting elements								
	ABRE	CAAT-box	CGTCA-motif	G-box	MBS	MYB	MYC	TATA-box	TGACG-motif
<i>AoCBF1</i>	4	22	3	3	1	1	0	70	3
<i>AoCBF2</i>	10	42	8	0	3	5	90	1	10
<i>AoCBF3</i>	1	29	1	4	3	3	47	1	1
<i>AoCBF4</i>	2	39	3	2	4	3	61	1	2
<i>AoCBF5</i>	8	31	4	4	4	6	83	0	8
<i>AoCBF6</i>	10	44	4	0	2	2	33	1	10

图 4 低温胁迫下 *AoCBFs* 表达模式分析Fig. 4 Expression pattern of *AoCBF* genes under low temperature stress

本研究共鉴定获得 6 个 *AoCBF* 基因。并对其理化性质、亚细胞定位、系统发育进化树、蛋白三维结构、顺式作用元件以及对低温胁迫下的表达方式进行研究。由于 *AoCBFs* 的等电点为 4.93~5.79, 蛋白呈酸性, 故在酸性亚细胞环境下, *AoCBF* 蛋白可能会发挥作用。*AoCBFs* 可以分为 2 个亚族: *AoCBF1* 为 A 族, *AoCBF2*、*AoCBF3*、*AoCBF4*、*AoCBF5*、*AoCBF6* 为 B 族。而 B 族中 *AoCBF3*、*AoCBF4* 具有更高亲缘性, *AoCBF2*、*AoCBF5*、*AoCBF6* 可能具有类似的调控方式。

目前 *CBF* 基因在十字花科植物、禾本科植物、豆科植物、漆树科植物、茄科植物中均有研究。最早是 STOCKINGER 等^[33]在模式植物拟南芥中克隆得到相关 *CBF* 基因。拟南芥的 6 个家族成员, 受外源 ABA 诱导的有 *CBF1*、*CBF2* 和 *CBF3*。*CBF1* 和 *CBF3* 的表达受 *CBF2* 的负调控。*CBF4* 不能响应低温胁迫诱导但是能够响应干旱和 ABA 诱导^[34]。*DREB1E* 和 *DREB1F* 均可以受高盐胁迫诱导。本研究在 6 个 *AoCBFs* 启动子上不仅筛选到响应低温诱导、干旱诱导、光响应元件有关的顺式作用元件, 而且筛选到与茉莉酸、生长素、水杨酸、脱落酸、赤霉素等激素有关的顺式作用元件。后续可开展分子对激素和冷信号调控的相关机制。

AoCBF 基因家族 6 个成员均不存在内含子, 所以 *AoCBF* 基因为内含子缺失型。内含子缺失型基因在面对胁迫时, 可通过减少转录处理的方法提高转录本积累的效率^[35]。

本研究发现, 腰果经过冷胁迫处理后, 6 个 *AoCBF* 基因均对低温产生响应, 除了 *AoCBF1*、

AoCBF3、*AoCBF4*、*AoCBF5* 在 16 °C 表达量显著提高, 其余的基因均在 8 °C 时表达量显著提高。

相较于传统的杂交育种、诱变育种等方式, 基因工程技术有高效率、短周期、提高植物抗逆性等优势。科研工作者可以利用基因克隆技术、基因重组技术、转基因技术等基因工程技术提升植物抵御低温胁迫的能力。本研究通过对 *AoCBF* 基因家族进行生物信息学分析, 分析 *AoCBF* 基因在低温胁迫下的调控机制, 为未来的腰果抗性分子辅助育种研究工作奠定基础。

参考文献

- [1] TANG W, TANG A Y. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* malonyl-coa synthetase gene enhances cold stress tolerance by activating mitogen-activated protein kinases in plant cells[J]. Journal of Forestry Research, 2021, 32(2): 741-753.
- [2] GAO T, MO Y, HUANG H, YU J, WANG Y, WANG W D. Heterologous expression of *Camellia sinensis* late embryogenesis abundant protein gene 1 (*cslea1*) confers cold stress tolerance in *Escherichia coli* and yeast[J]. Horticultural Plant Journal, 2021, 7(1): 89-96.
- [3] 雷恒久, 苏淑钗, 马履一, 马仲. 平欧杂交榛 *CBF/DREB1* 转录因子 *ChaCBF1* 基因的克隆与功能分析[J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(10): 69-79.
- [4] LEI H J, SU S C, MA L Y, MA Z. Cloning and functional analysis of *ChaCBF1*, a *CBF/DREB1*-like transcriptional factor from *Corylus heterophylla* x *C. avellana*. [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2016, 38(10): 69-79. (in Chinese)
- [4] 柏星轩, 闫雪, 要宇晨, 宁蕾, 王曙光, 孙黛珍.

- DREB/CBF 转录因子在植物非生物胁迫中的作用及研究进展[J]. 生物学杂志, 2017, 34(4): 88-93.
- BO X X, YAN X, YAO Y C, NING L, WANG S G, SUN D Z. The role and research progress of DREB/CBF transcription factors in plant abiotic stress[J]. Journal of Biology, 2017, 34(4): 88-93. (in Chinese)
- [5] SHI Y, HUANG J, SUN T, WANG X F, ZHU C Q. The precise regulation of different *cor* genes by individual *cbf* transcription factors in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(2): 118-133.
- [6] TANG K, ZHAO L, REN Y, YANG S H, ZHU J K, ZHAO C Z. The transcription factor *Ice1* functions in cold stress response by binding to the promoters of *Cbf* and *Cor* genes[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62(3): 258-263.
- [7] 万红, 刘惠民, 何承忠, 王连春, 缪福俊, 夏清柱. 自然低温胁迫下腰果幼苗抗寒生理指标的研究[J]. 北方园艺, 2011, 243(12): 42-44.
- WAN H, LIU H M, HE C Z, WANG L C, MIAO F J, XIA Q Z. Nutrition of stems in basal part of one-year old shoots and cold hardiness of plants[J]. Northern Horticulture, 2011, 243(12): 42-44. (in Chinese)
- [8] 夏清柱, 刘惠民, 何承忠, 王连春, 万红. 人工低温胁迫对腰果叶片抗寒生理生化指标的影响[J]. 北方园艺, 2012, 266(11): 24-27.
- XIA Q Z, LIU H M, HE C Z, WANG L C, WAN H. Effects of artificial low temperature stress on physiological and biochemical indexes of cold resistance in cashew blade[J]. Northern Horticulture, 2012, 266(11): 24-27. (in Chinese)
- [9] AKHTAR M, JAISWAL A, TAJ G, JAISWAL J P, QURESHI M I, SINGH N K. DREB1CBF transcription factors their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants[J]. Journal of Genetics, 2012, 91(3): 385-395.
- [10] 刘宇麒. 类番茄 *CBF1* 基因转化烟草及生理检测[D]. 牡丹江: 牡丹江师范学院, 2016.
- LIU Y Q. Transformation of tomato *solanum CBF1* gene into tobacco and its physiological detection[D]. Mudanjiang: Mudanjiang Normal University, 2016. (in Chinese)
- [11] 李志友. *COR* 和 *CBF3* 基因导入番茄的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- LI Z Y. Study of *COR* and *CBF3* on the tomato[D]. Chongqing: Southwest University, 2007. (in Chinese)
- [12] 李新玲, 徐香玲, 张月学. 转 *CBF2* 基因番茄抗 NaCl 胁迫研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(12): 160-162.
- LI X L, XU X L, ZHANG Y X. Study on resistance to NaCl stress in transgenic tomato with *CBF2* gene[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(12): 160-162. (in Chinese)
- [13] 张丽丽, 宋云鹏, 刘凯歌, 龚繁荣. 番茄 *CBF1* 转录因子提高拟南芥抗性[C]//第七届长三角园艺论坛论文集, 2016: 145.
- ZHANG L L, SONG Y P, LIU K G, GONG F R. Tomato *CBF1* transcription factor enhances *Arabidopsis* resistance[C]//Proceedings of the 7th Yangtze River Delta Horticultural Forum, 2016: 145. (in Chinese)
- [14] 金建凤. *AtCBF1* 基因转化水稻和拟南芥的比较研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- JIN J F. Comparative investigation of transferring *AtCBF1* into rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis thaliana*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004. (in Chinese)
- [15] 曹云飞. 水稻新型 CBF 转录因子基因 *OsCBF1* 的克隆、表达和表达载体构建[D]. 保定: 河北农业大学, 2007.
- CAO Y F. Cloning, expression of a novel CBF transcription factor gene (*OsCBF1*) in rice and expression vector construction of *OsCBF1*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [16] 吴关庭, 郎春秀, 胡张华, 陈笑芸, 王伏林, 金卫, 陈锦清. 转 *CBF1* 基因增强水稻的耐逆性[J]. 核农学报, 2006(3): 169-173.
- WU G T, LANG C X, HU Z H, CHEN X Y, WANG F L, JIN W, CHEN J Q. Enhancement of stress resistance of transgene rice *CBF1* gene transformation[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2006(3): 169-173. (in Chinese)
- [17] 林秀锋, 郭喜英, 刘志明, 韦正乙, 邢少辰. 转 *CBF1* 基因提高水稻抗寒能力的初步研究[J]. 吉林农业科学, 2008, 153(5): 6-8, 11.
- LIN X F, GUO X Y, LIU Z M, WEI Z Y, XING S C. Transformation of rice with *CBF1* gene maybe confer resistance to cold[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2008, 153(5): 6-8, 11. (in Chinese)
- [18] 金建凤, 高强, 陈勇, 王君晖. 转移拟南芥 *CBF1* 基因引起水稻植株脯氨酸含量提高[J]. 细胞生物学杂志, 2005(1): 73-76.
- JIN J F, GAO Q, CHEN Y, WANG J H. Transfer of *Arabidopsis CBF1* gene leads to increased proline contents in rice plants[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2005(1): 73-76. (in Chinese)
- [19] 潘孝武, 黎用朝, 李小湘, 刘文强, 闵军. CBF 调节子在水稻品种日本晴和 93-11 低温驯化过程中的差异调控机制[J]. 中国水稻科学, 2012, 26(5): 521-528.
- PAN X W, LI Y C, LI X X, LIU W Q, MIN J. Differential regulatory mechanism of CBF regulon between *nipponbare (japonica)* and 93-11 (*indica*) during cold acclimation[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2012, 26(5): 521-528. (in Chinese)
- [20] 张瑛, 罗志祥, 施伏芝, 阮新民, 周俊峰. 耐旱转录因子 *CBF3* 水稻育种应用研究初报[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 87-91.
- ZHANG Y, LUO Z X, SHI F Z, RUAN X M, ZHOU J F. Preliminary report on the study of the application of tran-

- scription factor CBF3 to rice breeding[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(15): 87-91. (in Chinese)
- [21] 李艳杰. 大豆 DREB/CBF 转录因子 *GmDREB1A* 的克隆及功能鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- LI Y J. Isolation and characterization of a DREB/CBF transcription factors, *GmDREB1A*, from soybean (*Glycine max* L.)[D]. Changchun: Jilin University, 2014. (in Chinese)
- [22] 王庆钰, 李艳杰, 王英, 李景文, 杨旭光. 大豆 DREB/CBF 转录因子 *GmDREB1A* 的克隆及功能鉴定[C]//第 24 届全国大豆科研生产研讨会论文摘要集, 2014: 58.
- WANG Q Y, LI Y J, WANG Y, LI J W, YANG X G. Isolation and characterization of a DREB/CBF transcription factors, *GmDREB1A*, from soybean (*Glycine max* L.)[C]//Abstract collection of the 24th National Symposium on Soybean Research and Production, 2014: 58. (in Chinese)
- [23] 王兴宇, 魏崑, 王伟威, 薛永国, 唐晓飞. 转 *AtCBF4* 基因大豆株系的抗旱性评价[J]. 大豆科学, 2014, 33(3): 365-369.
- WANG X Y, WEI L, WANG W W, XUE Y G, TANG X F. Drought resistance evaluation of *AtCBF4* transgenic soybean[J]. Soybean Science, 2014, 33(3): 365-369. (in Chinese)
- [24] 彭诗巧, 卢梦丹, 杨梦琦, 李佳雯, 岳岩磊. 大豆 PPR 基因家族生物信息学分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 177-185.
- PENG S Q, LU M D, YANG M Q, LI J W, YUE Y L. Bioinformatic analysis of PPR gene family in soybean[J]. Soybean Science, 2021, 40(2): 177-185. (in Chinese)
- [25] 魏崑, 王兴宇, 唐晓飞, 薛永国. 过表达 *AtCBF4*、*BoWS* 大豆对干旱胁迫的响应[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2): 424-430.
- WEI L, WANG X Y, TANG X F, XUE Y G. Response of over-expression *AtCBF4* or *BoWS* soybean lines to drought stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(2): 424-430. (in Chinese)
- [26] 叶正, 高崇伦, ZAKARIA G, 舒黄文, 包文龙. 中国辣椒低温响应转录因子 CBF 全基因组鉴定与分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(15): 4903-4910.
- YE Z, GAO C L, ZAKARIA G, SHU H W, BAO W L. Genome-wide identification and analysis of the cold responsive transcription factor (CBF) in capsicum Chinese[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(15): 4903-4910. (in Chinese)
- [27] 黄伟坚, 黄海杰, 张中润, 王金辉, 梁李宏. 中国腰果种质资源研究进展[J]. 热带作物学报, 2012, 33(10): 1914-1919.
- HUANG W J, HUANG H J, ZHANG Z R, WANG J H, LIANG L H. The collection, preservation and utilization of cashew germplasms resources in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(10): 1914-1919. (in Chinese)
- [28] 万红. 腰果抗寒性生理生化研究[D]. 昆明: 西南林业大学, 2011.
- WAN H. Study on the physiological and biochemical characters of cashew cold resistance[D]. Kunming: Southwest Forestry University, 2011. (in Chinese)
- [29] 马培杰, 李亚娇, 舒健虹, 王小利. 百脉根 WRKY 基因家族生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(14): 4606-4617.
- MA P J, LI Y J, SHU J H, WANG X L. Bioinformatics analysis of RKY gene family in the *Lotus corniculatus*[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(14): 4606-4617. (in Chinese)
- [30] 戴晓港, 刘景胜, 李淑娴. 望春玉兰 WRKY 基因家族生物信息学分析[J]. 江苏林业科技, 2021, 48(6): 1-9.
- DAI X G, LIU J S, LI S X. Bioinformatics analysis of WRKY gene family in *Yulania biondii*[J]. Journal of Jiangsu Forestry Science and Technology, 2021, 48(6): 1-9. (in Chinese)
- [31] 乔刚, 李莉, 姜山. 小立碗蕨 WRKY 基因家族生物信息学分析[J]. 广西植物, 2022, 42(2): 267-276.
- QIAO G, LI L, JIANG S. Bioinformatics analysis of WRKY gene family in *Physcomitrella patens*[J]. Guihaia, 2022, 42(2): 267-276. (in Chinese)
- [32] 刘畅畅, 黄敏. 玉米 LEC1 基因家族的鉴定与生物信息学分析[J]. 甘肃农业科技, 2022, 53(1): 31-37.
- LIU C C, HUANG M. Identification and bioinformatics analysis of LEC1 gene family in maize[J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2022, 53(1): 31-37. (in Chinese)
- [33] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMAS 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(3): 1035-1040.
- [34] HAAKE V. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2): 639-648.
- [35] GIRI J, DANSANA P K, KOTHARI K S, SHARMA G, VIJ S, TYAGI A K. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants[J]. BioEssays, 2013, 35(7): 639-648.