

中国水仙 *NtPLATZ1* 正、反义植物表达载体构建及转化烟草的研究

王伟英, 李海明, 戴艺民, 林江波*

(福建省农业科学院亚热带农业研究所, 福建漳州 363005)

摘要: 通过构建中国水仙锌指蛋白基因 *NtPLATZ1* 正义和反义两种植物表达载体, 并用冻融法将其导入农杆菌 EHA105 菌株, 介导遗传转化烟草, 对遗传转化的烟草再生植株进行 PCR-Southern blot 和 RT-PCR 检测, 研究 *NtPLATZ1* 的功能。结果表明成功将 *NtPLATZ1* 转化烟草, 获得 5 株阳性转基因植株。*NtPLATZ1* 在转基因烟草中过表达能抑制烟草的生长, 抑制表达可促进烟草生长。

关键词: 中国水仙; *NtPLATZ1*; 表达载体; 遗传转化; 烟草

中图分类号: S 682.2⁺¹

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 12-2399-09

Research on Construction of Sense and Antisense Plant Expression Vectors of *NtPLATZ1* Gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and Genetic Transformation to Tobacco Plants

WANG Weiyang, LI Haiming, DAI Yimin, and LIN Jiangbo*

(Subtropical Agriculture Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China)

Abstract: To characterize the function of *NtPLATZ1* gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*, sense and antisense plant expression vectors were generated and transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. Then vectors were transformed into tobacco plants by using *Agrobacterium*-mediated method. Regenerated plants of tobacco were detected by PCR-Southern blot and RT-PCR. The results showed that the sense and antisense genes were successfully integrated into the genomes of tobacco cells and expressed in transgenic tobacco plantlets. Transgenic plants were obtained successfully, which were inhibited the growth when the gene was over expression, and were promoted the growth when the gene was inhibited expression.

Keywords: *Narcissus tazetta* var. *chinensis*; *NtPLATZ1*; expression vector; genetic transformation; tobacco

转录因子 (Transcription factor, TF) 基因通常以家族的形式存在 (陈清 等, 2009; 王传琦 等, 2013), 可以调控众多下游基因的表达 (王娜 等, 2014; 范中奇 等, 2015; 陈娜 等, 2016)。

锌指蛋白 (zinc finger protein), 通过结合 Zn^{2+} 来稳定一种很短的可自我折叠成“手指”状的蛋

收稿日期: 2017-06-22; 修回日期: 2017-12-10

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2014J01098); 福建省科技厅公益类项目 (2016R1012-5)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: 345953257@qq.com)

白结构 (Benjamin, 2007; 林江波 等, 2016)。锌指蛋白在植物的不同组织、不同发育阶段及不同胁迫下有一种或多种功能 (Xu et al., 2008; 李晓波和张俊武, 2009; 智冠华 等, 2013; 宁露露 等, 2014; 宣宁 等, 2015; 王伟英 等, 2016)。新型锌指蛋白 PLATZ 具有两个锌指结构域, 结合于 DNA 序列的 AT 富集区域起转录抑制作用 (Yukio et al., 2001)。

中国水仙 (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) 在观赏栽培过程中, 常因光照不足造成徒长, 观赏价值下降。适宜浓度的多效唑能使水仙植株矮化, 株形紧凑, 提高观赏性 (史素霞, 2009; 王伟英 等, 2010, 2011)。林江波等 (2016) 在构建多效唑处理中国水仙的抑制消减文库的基础上, 克隆差异表达基因——植物 AT 富集区域锌指蛋白基因 *NtPLATZ1*。为了进一步验证 *NtPLATZ1* 的功能, 本研究中构建了 *NtPLATZ1* 正、反义植物表达载体并利用农杆菌侵染法遗传转化烟草, 以期为了解多效唑矮化中国水仙的分子机理及利用分子生物手段培育矮化新品种奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及试剂

试验于 2014 年 7 月至 2016 年 11 月在福建省农业科学院亚热带农业研究所公共实验室进行。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 HB101、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 工程菌株 EHA105 和 PcxSN 植物表达载体由福建省农业科学院亚热带农业研究所实验室保存。

Xcm I 酶购自 NEB 公司, *Ex Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Southern blot 试剂盒 (DIG DNA Labeling and Detection Kit) 购自 Roche 公司 (德国); 乙酰丁香酮 (AS)、特诺菌素 (Timentin)、DNA 胶回收试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 引物合成及 DNA 序列测定委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *NtPLATZ1* 开放阅读框的扩增

以重组原核表达质粒 pGEX-*NtPLATZ1* (林江波 等, 2016) 为模板, 利用 P1 (5'-CGCATGGGAGGAGGTGAGGACAAC-3') 和 P2 (5'-CGCCTCCCCATCATAGAAGCACA-3') 扩增 *NtPLATZ1* 的开放阅读框。RT-PCR 扩增体系 20 μ L: 质粒 pGEX-*NtPLATZ1* 1 μ L, 引物 (10 mmol \cdot L⁻¹) 各 1 μ L, *Ex Taq* DNA 聚合酶 (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.1 μ L, dNTPs Mixture (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 1.6 μ L, ddH₂O 13.3 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收目的片段。

1.2.2 植物表达载体的构建

植物表达载体 PcxSN 经 *Xcm* I 酶切后, 与 *NtPLATZ1* 的胶回收产物在 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 连接体系 10 μ L: PcxSN 酶切产物 1 μ L、*NtPLATZ1* 胶回收产物 1 μ L、T4 DNA 连接酶 1 μ L、T4 DNA 连接酶 Buffer 1 μ L、ddH₂O 6 μ L。连接产物转化大肠杆菌 HB101 感受态细胞后, 在恒温振荡床 105 r \cdot min⁻¹、37 $^{\circ}$ C 条件下复苏 1 h。将菌液均匀涂在含有卡那霉素 50 mg \cdot L⁻¹ 的固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆在含有卡那霉素 50 mg \cdot L⁻¹ 的液体培养基, 37 $^{\circ}$ C, 180 r \cdot min⁻¹ 振荡培养过夜。经 PCR 鉴定为阳性的克隆用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 通过序列比对获得重组的正、反义 PcxSN-*NtPLATZ1* 植物表达载体质粒 (图 1)。

1.2.3 冻融法转化农杆菌

按照“冻融法”(王关林和方宏筠, 2004)将重组植物表达载体质粒 *PcxSN-NtPLATZ1* 导入农杆菌菌株 EHA105 中, 利用菌落 PCR 鉴定农杆菌转化子。

1.2.4 烟草的培育和重组质粒 *PcxSN-NtPLATZ1* 转化烟草

将烟草种子清洗后, 晾干, 用 0.1% 升汞消毒, 无菌水中清洗, 用无菌滤纸吸干, 接入 MS 基本培养基中培养, 培养温度 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$; 光照强度 1 800 ~ 2 000 lx; 光照时间 10 h · d⁻¹。种子发芽约 2 cm 时进行分瓶培育, 当烟草叶宽 2 ~ 3 cm 时用于侵染。

以含有重组植物表达载体质粒 *PcxSN-NtPLATZ1* 的农杆菌为介导, 以烟草叶片为材料进行遗传转化。具体操作如下: 用 1/2MS 液体培养基稀释含有目的基因的农杆菌培养物后, 加入终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS, 静置 2 h, 制成侵染液。取预培养的烟叶材料切成小块后置于侵染液中, 充分浸润 30 min, 不时摇动。将感染后的组织块取出, 晾干, 放入添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS 的 MS 固体培养基上, $25 ^\circ\text{C}$ 暗培养 3 ~ 5 d。挑取共培养的烟叶块, 无菌水冲洗 3 ~ 5 次, 在含 $100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 特泯菌的无菌水中静置 30 ~ 50 min 后, 吹晾干, 然后转接至添加 $250 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素的 MS 筛选培养基上, $25 ^\circ\text{C}$ 暗培养 7 d, 转入添加 $250 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素和 $30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素 (HygB) 的 MS + 6-BA $1.0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.3 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中, 每隔 20 d 更换 1 次新鲜的培养基。继代 2 ~ 3 次, 待分化出抗性芽后, 将其转移至 MS 固体培养基上, 待抗性芽长至约 2 cm 时, 用剪刀将其剪下接入生根培养基中诱导生根, 随后驯化移栽。

1.2.5 转基因烟草检测及其表型观测

剪取转基因烟草幼苗的新鲜叶片, CTAB 法微量提取基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板, 用引物 Hpt1 (5'-GATGTTGGCGACCTCGTATT-3') 和 Hpt2 (5'-TCGTTATGTTTATCGGCACTTT-3') 进行 PCR 扩增。反应程序为: $94 ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $94 ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $52 ^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 ^\circ\text{C}$ 延伸 40 s, 30 个循环, 最后 $72 ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 筛选转基因植株。

以转基因烟草提取的基因组 DNA 为模板, 以引物 P3: 5'-CGCGGATCCATGGGAGGAGGTGAG GACAAC-3' (*Bam*H I 酶切位点) 和 P4: 5'-CGCCTCGAGCTCCCCATCATAGAAGCACA-3' (*Xho* I 酶切位点) 进行 PCR 扩增。反应程序为: $94 ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $94 ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $50 ^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 ^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 $72 ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 进行 PCR-Southern blot。以限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 消化质粒 pGEX-*NtPLATZ1* 作为探针, 探针的制备及详细的 Southern blot 操作根据 DIG DNA Labeling and Detection Kit 手册进行。

提取转基因烟草叶片总 RNA 进行 RT-PCR, 检测基因在 mRNA 水平上的表达。

将检测为阳性的转基因株系和野生型烟草移栽到温室中, 观察转 *NtPLATZ1* 烟草的株形变化, 以未转基因植株作为对照。

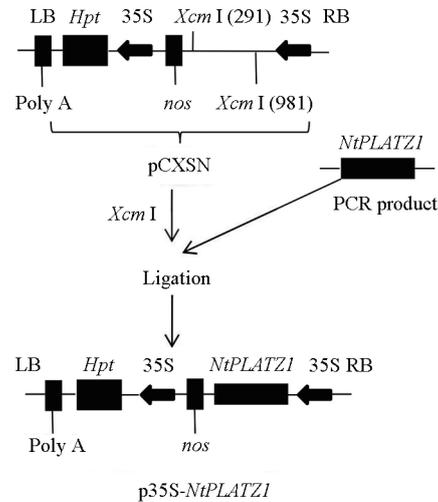


图 1 植物表达载体 *PcxSN-NtPLATZ1* 的构建

Fig. 1 Construction of plant expression vector *PcxSN-NtPLATZ1*

2 结果与分析

2.1 *NtPLATZ1* 开放阅读框克隆

以重组原核表达质粒 pGEX-*NtPLATZ1* 为模板, P1 和 P2 为引物, PCR 扩增 *NtPLATZ1* 的 ORF 序列, 扩增产物在 747 bp 出现特异性条带 (图 2), 大小与预期相符, 切胶回收目的片段。

2.2 表达载体的构建与鉴定

将 PcxSN 植物表达载体用 *Xcm* I 酶进行酶切 (图 3, A), 回收大片段, 与 *NtPLATZ1* 连接并转化大肠杆菌 HB101 感受态细胞, 挑取单克隆扩繁后 PCR 鉴定 (图 3, B), 结果表明:

连接产物已经成功转入大肠杆菌 HB101。由于 PcxSN 植物表达载体用 *Xcm* I 酶进行酶切后产生 T 尾, *Ex Taq* DNA 聚合酶的 PCR 产物带 A 尾, 经连接后会有正、反两种可能。提取部分经鉴定为阳性克隆菌株的质粒并进行测序, 通过序列比对分析, 成功构建了正义、反义 PcxSN-*NtPLATZ1* 植物表达载体。

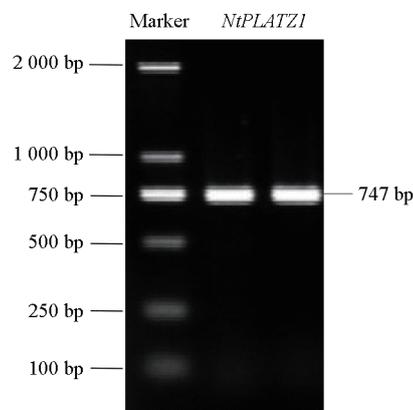


图 2 *NtPLATZ1* 基因的获得
Fig. 2 Obtaining of *NtPLATZ1* gene

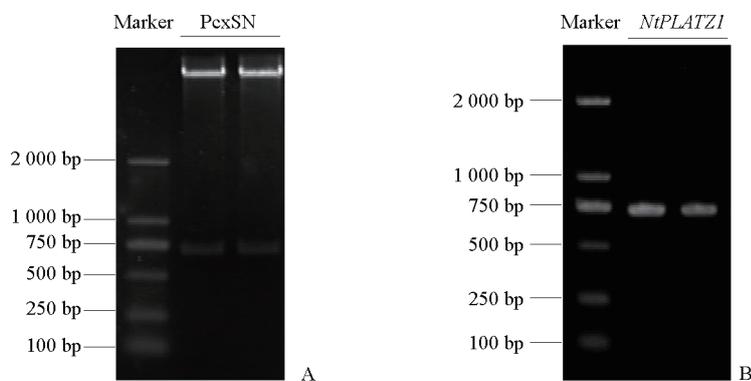


图 3 载体质粒 PcxSN 的酶切 (A) 和重组质粒 PcxSN-*NtPLATZ1* 的检测 (B)

Fig. 3 PcxSN digested by enzyme digestion (A) and PCR detection and identification of recombinant plasmid (B)

2.3 质粒 PcxSN-*NtPLATZ1* 转化农杆菌

采用冻融法将正义、反义植物表达载体质粒 PcxSN-*NtPLATZ1* 转化根癌农杆菌 EHA105 菌株中, 挑取单克隆做菌落 PCR 鉴定, 结果 (图 4) 表明: 正、反义植物表达载体质粒 PcxSN-*NtPLATZ1* 已成功转入根癌农杆菌中, 可用于烟草的遗传转化。

2.4 PcxSN-*NtPLATZ1* 植物表达载体对烟草的转化

以含有 PcxSN-*NtPLATZ1* 正、反向重组质粒的农杆菌为介导, 对烟草叶片进行遗传转化。待农杆菌生长至可见叶片下有少量菌斑时 (图 5, A), 挑取共培养的叶片置于无菌三角瓶中, 洗菌后转

入筛选培养基中进行筛选, 待抗性组织诱导出愈伤并分化出小芽后 (图 5, B), 将其转移至 MS 固体培养基上。共侵染 6 次转外植体各 360 块, 获得转化正、反向重组质粒的烟草抗性芽分别为 53、71 个, 部分抗性芽已经分化成苗 (图 5, C), 最后各成活植株 14、16 个。

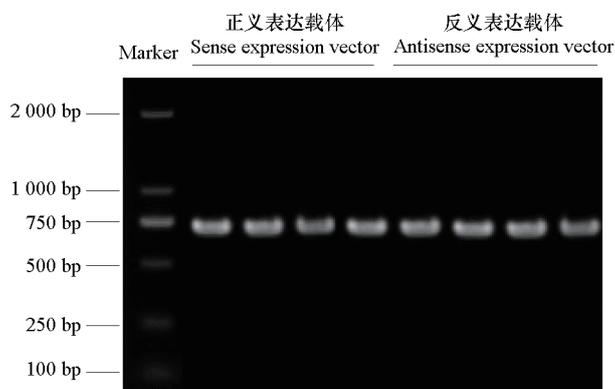


图 4 正反义表达载体转农杆菌的检测
Fig. 4 PCR detection of sense and antisense expression vector



图 5 烟草转化的培养
A. 烟草叶片与农杆菌共培养; B. 抗性愈伤分化; C. 再生植株。

Fig. 5 Transformation culture of tobacco
A. Tobacco leaf co-cultured with *Agrobacterium*; B. Differentiation of resistant callus; C. Regeneration of *Narcissus* plant.

2.5 转基因烟草的检测

2.5.1 PCR 检测

对 30 株再生植株进行潮霉素基因片段 (517 bp) 的 PCR 扩增检测, 结果 (图 6, A) 表明, 转化正义基因的潮霉素抗性植株中, 有 3 株能扩增到潮霉素基因片段, 转化反义基因的潮霉素抗性植株, 2 株能扩增到潮霉素基因片段。

以烟草遗传转化再生植株的 DNA 为模板, 无转基因植株的 DNA 为阴性对照 (CK-), pMD19-T-*NtPLATZ1* 为阳性对照 (CK+), 以 P1 和 P2 为引物 PCR 扩增 *NtPLATZ1* 基因 (747 bp) 检测转基因再生植株的结果 (图 6, B) 与利用 Hpt1 和 Hpt2 为引物 PCR 扩增潮霉素基因检测结果相吻合。

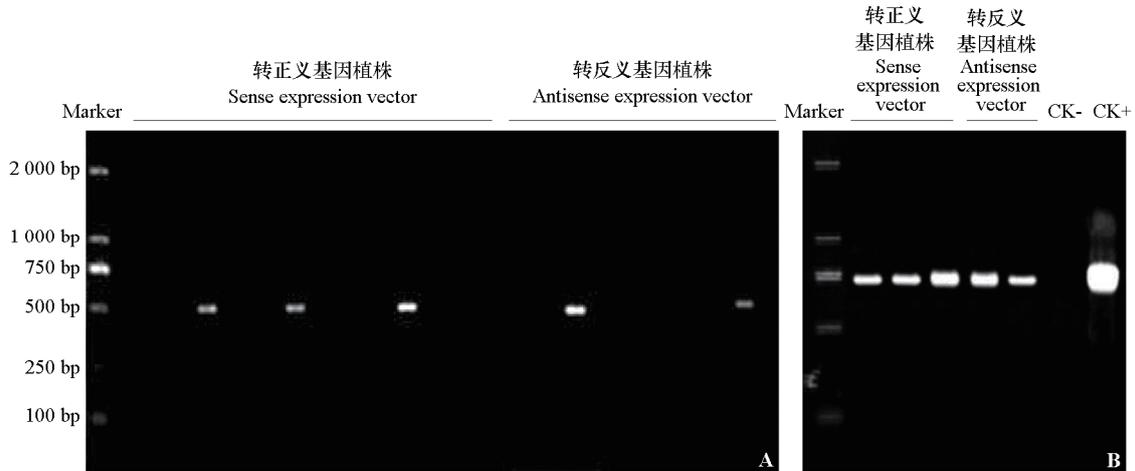


图 6 PCR 扩增潮霉素基因片段 (517 bp) (A) 和 *NtPLATZ1* (B) 转基因再生植株检测

Fig. 6 517 bp fragment of hygromycin gene (A) and *NtPLATZ1* gene (B) amplified by PCR to identified of transgenic plant regeneration

2.5.2 PCR-Southern blot 检测

提取已经过 PCR 检测验证为阳性的烟草遗传转化再生植株的基因组 DNA, 以 P3 与 P4 为引物扩增的 *NtPLATZ1* 基因进行杂交检测, 以 *Bam*H I 消化未遗传转化的烟草基因组 DNA 和 ddH₂O 作为阴性对照, 以 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切质粒 pGEX-*NtPLATZ1* 作为阳性对照。PCR-Southern blot 的结果见图 7。从图 7 可见, 未遗传转化的烟草基因组 DNA 没有杂交条带的出现, 5 株遗传转化的烟草有杂交信号, 均呈现与 pGEX-*NtPLATZ1* 质粒 DNA 相同的杂交带。由此可见, *NtPLATZ1* 已整合入烟草的基因组中。

2.5.3 RT-PCR 检测

由于目的基因整合到基因组中是随机的, 可能会出现基因沉默现象, 因此需要对 PCR 阳性植株进一步的检测, 检测目的基因是否正常表达。对 PCR 和 PCR-Southern blot 皆为阳性的植株进行 RT-PCR 检测, 发现转基因株系在 747 bp 处均扩增出与阳性对照一致的专一条带, 而未转基因对照植株未扩增出相应条带 (图 8)。结果表明, 整合到烟草基因组中的正义或反义 *NtPLATZ1* 基因已被 CaMV35S 启动子启动, 转录为完整的 mRNA, 在 RNA 水平上得到了表达。

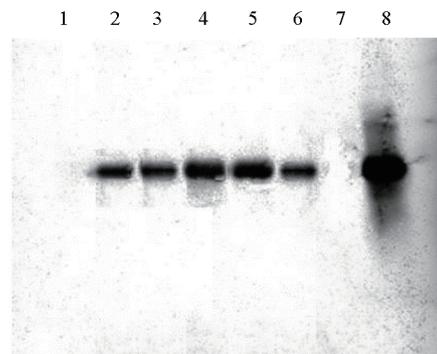


图 7 转基因再生植株的 PCR-Southern 鉴定

1. 阴性对照 (ddH₂O); 2~4. 转化正义基因再生植株; 5、6. 转化反义基因再生植株; 7. 未转化植株; 8. 阳性对照 (pMD19-T-*NtPLATZ1*)。

Fig. 7 Identification of transformants by PCR-Southern blotting

1. Negative control (ddH₂O); 2 - 4. Sense transformants; 5, 6. Antisense transformants; 7. Non-transgenic plantlet; 8. Positive control (pMD19-T-*NtPLATZ1*) .

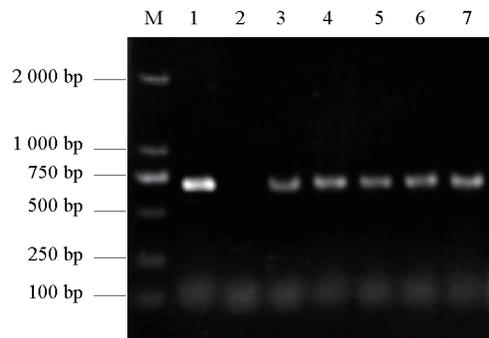


图8 转基因烟草和野生型植株的 RT-PCR 基因表达鉴定

M. 分子量标记; 1. 阳性对照 (质粒 pMD19-T-NtPLATZ1); 2. 未转化烟草; 3~5. 转正义基因植株; 6、7. 转反义基因植株。

Fig. 8 RT-PCR analysis of totacco transformants and wild types

M. Marker; 1. Plasmid of pMD19-T-NtPLATZ1; 2. Non-transgenic plantlet; 3 - 5. Sense expression vectors; 6, 7. Antisense expression vectors.

2.6 过表达和抑制表达对转基因烟草株形的影响

为了初步探索转 *NtPLATZ1* 烟草的株形变化, 以未遗传转化植株作为对照 (CK), 表型观测显示: 过表达转基因 (P+) 烟草植株的株高比对照和抑制表达转基因 (P-) 烟草植株株高矮小, 植株生长迟缓, 叶片小; P- 植株与对照植株的株高在种植 30 d 时无明显差别; 60 d 后, P- 植株株高高于对照和 P+ 植株 (图 9)。说明 *NtPLATZ1* 能调节转基因烟草植株生长, 该基因过表达时抑制植株生长, 抑制表达时促进植株生长。



图9 转基因系与野生型植株烟草的株形比较

Fig. 9 Comparison of agricultural characters between transgenic lines and wild type

3 讨论

光信号通过调节基因的表达来控制植物的生长发育。光照抑制豌豆上胚轴伸长区 GTPase 基因 *pra2* 的表达 (Nagano et al., 1995), *PLATZ1* 能与 *pra2* 的 12 bp 的顺式作用元件 DE1 上游的 A/T-rich DNA 序列结合, 下调 *pra2* 的表达; *PLATZ1* 还能与 *petE* 增强子的 A/T rich DNA 序列结合, 减弱该增强子的功能, 下调 *petE* 的表达 (Yukio et al., 2001)。因此, 光信号转导调控植物生长的过程可能有 *PLATZ* 参与。

喷施多效唑能克服中国水仙室内水养因光照不足引起的徒长问题。喷施多效唑后, *NtPLATZ1* 在中国水仙叶片中的表达量先上升后下降, 抽葶期叶片的表达量最高 (林江波 等, 2016)。本研究中构建了中国水仙 *NtPLATZ1* 正、反义两种植物表达载体, 导入农杆菌后遗传转化烟草, 当 *NtPLATZ1* 过表达时转基因烟草植株表现为生长速度减慢, 植株矮小; 当 *NtPLATZ1* 抑制表达时植株表现为生长速度加快, 说明 *NtPLATZ1* 的表达量能改变转基因烟草的生长。*NtPLATZ1* 是通过调控哪些基因的表达, 从而达到改变转基因烟草的株形还有待进一步研究。

References

- Benjamin L. 2007. Gene IX. Boston, Toronto, London, Singapore: Jones and Bartlett Publishers: 654 - 656.
- Chen Na, Chi Xiao-yuan, Cheng Guo, Pan Li-juan, Chen Ming-na, Wang Tong, Wang Mian, Yang Zhen, Yu Shan-lin. 2016. Profiling of genes encoding cold stress-related transcription factors in peanut. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 30 (1): 19 - 27. (in Chinese)
- 陈娜, 迟晓元, 程果, 潘丽娟, 陈明娜, 王通, 王冕, 杨珍, 禹山林. 2016. 花生中低温胁迫相关转录因子基因的筛选. *核农学报*, 30 (1): 19 - 27.
- Chen Qing, Tang Hao-ru, Dong Xiao-li, Hou Yan-xia, Luo Ya, Jiang Yan, Huang Qiong-yao. 2009. Progress in the study of plant Myb transcription factors. *Genomics and Applied Biology*, 28 (2): 365 - 372. (in Chinese)
- 陈清, 汤浩茹, 董晓莉, 侯艳霞, 罗娅, 蒋艳, 黄琼瑶. 2009. 植物 Myb 转录因子的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 28 (2): 365 - 372.
- Fan Zhong-qi, Kuang Jian-fei, Lu Wang-jin, Chen Jian-ye. 2015. Advances in research of the mechanism of transcription factors involving in regulating fruit ripening and senescence. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (9): 1649 - 1663. (in Chinese)
- 范中奇, 邝健飞, 陆旺金, 陈建业. 2015. 转录因子调控果实成熟和衰老机制研究进展. *园艺学报*, 42 (9): 1649 - 1663.
- Li Xiao-bo, Zhang Jun-wu. 2009. Structure and function of zinc finger proteins in eucaryon. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 25 (3): 206 - 211. (in Chinese)
- 李晓波, 张俊武. 2009. 真核生物中锌指蛋白的结构与功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 25 (3): 206 - 211.
- Lin Jiang-bo, Wang Wei-ying, Li Hai-ming, Wu Shui-jin, Zou Hui, Li Yue-sen, Dai Yi-min. 2016. Cloning and expression analysis of *NtPLATZ1* gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 44 (10): 165 - 170. (in Chinese)
- 林江波, 王伟英, 李海明, 吴水金, 邹晖, 李跃森, 戴艺民. 2016. 中国水仙锌指蛋白 *NtPLATZ1* 的克隆与表达分析. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 44 (10): 165 - 170.
- Nagano Y, Okada Y, Narita H, Asaka Y, Sasaki Y. 1995. Location of light-repressible, small GTP-binding protein of the YPT/rab family in the growing zone of etiolated pea stems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 6314 - 6318.
- Ning Lu-yun, Li Bei, Li Pei, Bao Man-zhu, Zhang Wei. 2014. Cloning and expression analysis of a B-box-type zinc-finger protein gene *PhBBX8* in *Petunia hybrida*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (12): 2437 - 2445. (in Chinese)
- 宁露云, 李蓓, 李佩, 包满珠, 张蔚. 2014. 矮牵牛 B-box 型锌指蛋白基因 *PhBBX8* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 41 (12): 2437 - 2445.
- Shi Su-xia. 2009. The effects of plant growth retardants on *Narcissus tazetta*. *Northern Horticulture*, (11): 161 - 163. (in Chinese)

- 史素霞. 2009. 植物生长延缓剂对水仙生长的影响. 北方园艺, (11): 161 - 163.
- Wang Chuan-qi, Kong Wen-wen, Li Jing. 2013. Current research method of transcription factors in plants. Letters in Biotechnology, 24 (1): 118 - 123. (in Chinese)
- 王传琦, 孔稳稳, 李 晶. 2013. 植物转录因子最新研究方法. 生物技术通讯, 24 (1): 118 - 123.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2014. Plang genetic engineering. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2014. 植物基因工程. 北京: 科学出版社.
- Wang Na, Zhang Zhen-bao, Huang Feng-zhu, Li Hong-you, Zhang Su-zhi. 2014. Advance on the role of WRKY tanscription factors in abiotic stress response. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 28 (10): 1819 - 1827. (in Chinese)
- 王 娜, 张振葆, 黄凤珠, 李洪有, 张素芝. 2014. WRKY 转录因子参与植物非生物胁迫应答的研究进展. 核农学报, 28 (10): 1819 - 1827.
- Wang Wei-ying, Li hai-ming, Dai Yi-min, Lin Jiang-bo. 2016. Advances on the function of plant zinc finger protein. Chinese Horticulture Abstract, (7): 3 - 5, 12. (in Chinese)
- 王伟英, 李海明, 戴艺民, 林江波. 2016. 植物锌指蛋白的功能研究进展. 中国园艺文摘, (7): 3 - 5, 12.
- Wang Wei-ying, Zou Hui, Chen Yong-kuai, Lin Jiang-bo. 2010. The effect of salicylic acid on the ornamental traits of carved *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Journal of Tropical Crops, 31 (11): 1947 - 1950. (in Chinese)
- 王伟英, 邹 晖, 陈永快, 林江波. 2010. 水杨酸处理对雕刻水仙观赏性状的影响. 热带作物学报, 31 (11): 1947 - 1950.
- Wang Wei-ying, Zou Hui, Dai Yi-min, Lin Jiang-bo. 2011. The dwarfing effect of paclobutrazol treatment on *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Journal of Tropical Crops, 32 (9): 1661 - 1664. (in Chinese)
- 王伟英, 邹 晖, 戴艺民, 林江波. 2011. 多效唑喷雾对中国水仙的矮化效应. 热带作物学报, 32 (9): 1661 - 1664.
- Xu D Q, Huang J, Guo S Q, Yang X, Bao Y M, Tang H J, Zhang H S. 2008. Overexpression of a TFIIIA - type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Febs Letters, 582 (7): 1037 - 1043.
- Xuan Ning, Liu Xu, Zhang Hua, Chen Gao, Liu Guo-xia, Bian Fei, Yao Fang-yin. 2015. The response of a putative maize zinc-finger protein gene *ZmAN14* in transgenic tobacco to abiotic stress. Scientia Agricultura Sinica, 48 (5): 841 - 850. (in Chinese)
- 宣 宁, 柳 絮, 张 华, 陈 高, 刘国霞, 边 斐, 姚方印. 2015. 玉米锌指蛋白基因 *ZmAN14* 过表达转基因烟草对非生物胁迫的响应. 中国农业科学, 48 (5): 841 - 850.
- Yukio N, Hirofumi F, Takehito I, Yukiko S. 2001. A novel class of plant- specific zinc-dependent DNA-binding protein that binds to A/T-rich DNA sequence. Nucleic Acids Res, 29 (20): 4097 - 4105.
- Zhi Guan-hua, Shi Jun-na, Zhao Xiao-xin, Liu Sheng-li, Chen Yu-zhen, Lu Cun-fu. 2013. Overexpression of a zinc-finger protein gene *AmZFPG* from *Ammopiptanthus mongolicus* confers tolerance to cold, drought and salt stress in transgenic tobacco. Acta Horticulturae Sinica, 40 (4): 713 - 723. (in Chinese)
- 智冠华, 史军娜, 赵晓鑫, 刘胜利, 陈玉珍, 卢存福. 2013. 转沙冬青锌指蛋白基因 *AmZFPG* 烟草非生物胁迫抗性分析. 园艺学报, 40 (4): 713 - 723.