DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00295

青稞 *hblt14.2* 基因的克隆及功能分析

何 涛^{1,2} 贾敬芬^{2,*}

¹青海大学生物科学系, 青海西宁 810016; ²西北大学生命科学学院, 陕西西安 710069

摘 要: 根据大麦 *blt14.2* 基因序列设计引物, 用青稞基因组 DNA 为模板扩增低温反应基因的全长序列, 命名为 *hblt14.2*, 在 GenBank 登录号为 EF514912。该基因含 470 bp, 包括 249 bp 的开放阅读框、69 bp 的 5'非翻译区和 152 bp 的 3'非翻译区, 编码 82 个氨基酸残基, 富含 Gly、Ala、Leu 和 Val, 与其他冷诱导基因编码蛋白具相似性。与大麦 *blt14.2* 基因具 98.9% 同源性, 所编码的蛋白存在 2 个氨基酸的差别。将 *hblt14.2* 基因连接 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子后定向插入质粒 pCambia1301 的多克隆位点中, 构建植物表达载体 pCambia-BI-hblt, 通过农杆菌介导转化烟草, 并对转基因烟草进行抗寒性检测。结果表明, 青稞 *hblt14.2* 基因与植物的抗寒性有一定关系。

关键词: 青稞; 低温; *hblt14.2* 基因; 功能分析

Cloning and Function Analysis of *hblt14.2* Gene in Highland Barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.)

HE Tao^{1,2} and JIA Jing-Fen^{2,*}

¹Department of Biosciences, Qinghai University, Xining 810016, China; ²College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: The response to low temperature stress in highland barley indicates that there is a potential gene bank for cold resistance, which is helpful to develop the genes associated with resistance to cold and to survey the regulation mechanism. The objective of this study was to exploit a new gene with cold resistance, to validate its function. A pair of primer was designed based on the *blt14.2* gene sequence documented in GenBank. A low-temperature-responsive (LTR) gene *hblt14.2* was cloned by PCR from highland barley with GenBank accession number EF514912. Its length was 470 bp, containing 249 bp ORF, 69 bp 5' untranslated region (UTR) and 152 bp 3' UTR. Nucleotide sequence of *hblt14.2* gene shares 98.9% (only five base pairs difference) homology with that of *blt14.2* in barley, which encoded a protein of 82 amino acids. The protein was a highly hydrophilic small protein with rich Gly, Ala, Leu and Val amino acids, which were similar to proteins encoded by other LTR genes. The *hblt14.2* ligated with CaMV 35S promoter and NOS terminator was inserted into multiple clone site in plasmid Cambia1301 to construct plant expression vector pCambia-BI-hblt, which was transformed into tobacco mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic plants response to low temperature were investigated. The results suggested that the *hblt14.2* is related to cold resistance in highland barley.

Keywords: Highland barley; Low temperature; *hblt14.2* gene; Function analysis

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.), 因其种子成熟后可从颖壳中脱落, 所以又称裸大麦(naked barley), 是一种禾本科作物, 主要分布于青藏高原地区^[1]。由于海拔高, 其生长环境的温度相对较低。在青稞生长期, 经常出现霜冻以及雪、雹等天气, 夜间温度往往低于 0℃时青稞仍生长良好。因此, 青稞具有较强的抗低温胁迫的特性, 是一个潜在的抗寒基因资源库。开发这些抗寒相关基因,

研究其调控机制将具有十分重要的理论和实践意义。

blts(low-temperature-responsive barley genes)是一类存在于大麦(*Hordeum vulgare* L.)中的低温反应基因^[2]。目前, 已经报道的有 *blt4*(*blt4.2*、*blt4.6*、*blt4.9*)、*blt14*(*blt14.1*、*blt14.2*)、*blt63*、*blt101*(*blt101.2*)、*blt410* 和 *blt801* 等, 它们主要受低温诱导, 其中个别基因(如 *blt4* 等)也同时受干旱和 ABA 胁迫^[3-6]。在这些基

本研究由国家自然科学基金项目(30671082), 陕西省教育厅重点项目(05JS48)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 贾敬芬, E-mail: Jiajf38@nwnu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: hetaoxn@yahoo.cn

Received(收稿日期): 2008-05-26; Accepted(接受日期): 2008-10-24.

因中, *blt4* 和 *blt801* 的基因功能研究比较清楚。Dunn 等^[3]认为, *blt4* 基因编码一种脂肪迁移蛋白, 可以通过改变质膜的组成来提高膜的冷稳定性, *blt801* 基因则可能编码一种 RNA 结合蛋白^[5]。而其他 *blts* 基因编码蛋白的功能尚未见报道, 它们是否和大麦的抗寒性有关还缺乏直接的实验证据^[2]。为此, 本文旨在开发 *hbtl14.2* 基因, 验证其功能, 丰富抗寒基因库, 为抗寒分子育种提供有益的数据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

青稞品种北青 6 号种子购自西宁市农牧局, 烟草品种秦烟 95 购自陕西省烟草研究所。

1.2 基因组 DNA 的提取

选取大小均匀的青稞种子置培养皿中, 在 $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 16 h d^{-1} 光照条件下水培, 待幼苗 5 cm 高时取样。采用 CTAB 法提取 DNA。

1.3 引物设计及目的基因 PCR 扩增

根据 GenBank 公布的大麦 *blt14.2* 基因(X 97917) 序列设计引物。正向引物为 5'-CGG GAT CCA GCC TAA GCT CAC TCA AAC A-3'; 反向引物为 5'-CGC GAG CTC ACG GAT ACA AAC GCT CAT T-3'。下划线部分为引入的酶切位点, 其中上游引物含 *Bam*H I 位点, 下游引物含 *Sac* I 位点。引物由 TaKaRa 公司合成。用上述引物, 以青稞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序为 94°C 5 min; 94°C 45 s, 60.5°C 45 s, 72°C 1 min, 30 次循环; 最后 72°C 延伸 10 min。Ex Taq 酶为 TaKaRa 公司产品。

1.4 PCR 产物连接和转化

用 Agarose Gel DNA Purification Kit (TaKaRa 公司)试剂盒回收 PCR 产物, 并与 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司)连接, 构建重组质粒 pMD-hbtl, 转化感受态大肠杆菌 TOP10。在含有氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上筛选阳性克隆。

1.5 目的基因测序及分析

重组质粒 pMD-hbtl 经酶切和 PCR 检测后, 送交上海基康生物公司进行序列测定。用 DNASTar(5.0) 软件分析序列。同时, 利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 Blast 在线工具对序列比对分析。

1.6 表达载体的构建

将 CaMV35S 启动子序列、*hbtl14.2* 和 NOS 终止子序列串连在一起构建 *hbtl14.2* 基因表达盒, 然后将其插入双元植物表达载体 pCambia-1301 质粒

T-DNA 区, 构建重组双元植物表达载体 pCambia-BI-hbtl (图 1)。用液氮冻融法将 pCambia-BI-hbtl 质粒导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 获得用于植物转化实验的工程农杆菌 LBA4404(pCambia-BI-hbtl)。

图 1 植物表达载体 pCambia-BI-hbtl
Fig. 1 Plant expression vector pCambia-BI-hbtl

1.7 *hbtl14.2* 基因遗传转化

农杆菌 LBA4404 (pCambia-BI-hbtl)在附加 Str 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、Rif 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 和 kan 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 YEB 液体培养基中常规活化, 培养至 OD_{600} 0.5。将烟草无菌苗叶片切成 $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 的小块, 放入农杆菌悬液侵染 8~12 min, 黑暗共培养 2 d, 然后转至含 30 mg L^{-1} 潮霉素、250 mg L^{-1} 头孢霉素的 MS 培养基(附加 1 mg L^{-1} BA)上, 温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 光强 $400\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, 光照 16 h d^{-1} , 诱导芽的分化。将分化后的小芽转入 1/2 MS₀ 培养基进行继代和生根培养。

1.8 转化植株的分子生物学检测

采用 CTAB 法提取转化植株 DNA, PCR 检测、Southern 检测和 RT-PCR 检测均采用常规分子生物学方法。

1.9 转化植株的抗低温检测

采用酶法分离叶肉原生质体, 在 4°C 下作低温胁迫处理, 观察并统计原生质体的存活率; 采用酸性茚三酮法测定低温胁迫下烟草叶片中脯氨酸含量的变化。

2 结果与分析

2.1 青稞 *hbtl14.2* 基因的克隆

根据 Phillips 等^[6]报道, 在大麦 *blt14.2* 基因序列中不含任何内含子, 故用青稞基因组 DNA 为模板扩

增 *hb14.2* 基因。在 T_m 值范围内, 设计 55.5、60.5 和 65.5℃ 3 个退火温度, 均扩增出约为 487 bp 的 DNA 片段, 与预期的 *blt14.2* 基因大小一致, 其中以退火温度为 60.5℃ 时条带特异性最好(图 2)。

图 2 青稞 *hb14.2* 基因的 PCR 产物

Fig. 2 PCR product of *hb14.2* gene in highland barley
M: λ DNA/*EcoR* I+ *Hind* III marker; 1: negative control;
2: PCR product.

序列 Blast 表明, 本实验克隆的基因与 GenBank 公布的大麦 *blt14.2* 基因具有 98.9% 的同源性, 两者在核苷酸序列上只有 5 个碱基的差别, 分别是 43 位 (A--T)、196 位(G--C)、208 位(G--T)、450 位(G--T)和 470 位(G--T), 其中在开放阅读框(ORF)中有 2 个碱基

不同(图 3)。正是由于这两个碱基的差异, 导致第 53 位(丙氨酸--脯氨酸)和 57 位(丙氨酸--丝氨酸) 2 个氨基酸不同(图 4)。因此, 可以基本确定本实验克隆的基因就是 *blt14.2* 基因, 为了和大麦 *blt14.2* 基因相区别, 用 *hb14.2* 来表示, GenBank 登录号为 EF514912。

克隆的青稞 *hb14.2* 基因共有 470 个核苷酸, 其中包括 249 bp 的开放阅读框, 69 bp 的 5'非翻译区 (5'UTR)和 152 bp 的 3'非翻译区(3'UTR), 该基因共编码 82 个氨基酸残基(图 4)。氨基酸组成分析显示, *hb14.2* 蛋白富含 Gly、Ala、Leu、Val、Ser、Thr 和 Pro, 不含 Phe、Trp 和 Tyr 氨基酸, 与已报道的冷诱导基因编码蛋白在氨基酸组成上相似, 是一种高度亲水的小分子蛋白^[7-8]。

2.2 *hb14.2* 基因对烟草的遗传转化及分子生物学检测

应用农杆菌 LBA4404 (pCambia-BI-hb14.2)植物转化系统对秦烟 95 进行遗传转化, 初步获得 4 个潮霉素抗性烟草再生苗系。PCR(图 5)和 Southern(图 6)检测表明, *hb14.2* 基因已整合到烟草基因组中。

<i>hb14.2</i>	1	AGCCTAAGCTCACTCAAACACAGCCACACAACACTTCCTCAGAAGCATATCAGAACCTCC	60
<i>blt14.2</i>	1	AGCCTAAGCTCACTCAAACACAGCCACACAACACTTCCTCAGTAGCATATCAGAACCTCC	60
<i>hb14.2</i>	61	CAGCTAGCAATGGCGAAGTGTCTTGCCGTCGCGCTCCTGCTACTGGTGGTGTCTCGCGTCC	120
<i>blt14.2</i>	61	CAGCTAGCAATGGCGAAGTGTCTTGCCGTCGCGCTCCTGCTACTGGTGGTGTCTCGCGTCC	120
<i>hb14.2</i>	121	TGCGATGGGAGGGAGCTGAGCCAGAAGGACAGCGCACTGGAGCGGCGCGTGGTGCCGGC	180
<i>blt14.2</i>	121	TGCGATGGGAGGGAGCTGAGCCAGAAGGACAGCGCACTGGAGCGGCGCGTGGTGCCGGC	180
<i>hb14.2</i>	181	GCCGGAGGTGGCGTCCCGAGTCCAAGCTTCTTCGGGTTCGGGGTTGCCGGACTTGCCG	240
<i>blt14.2</i>	181	GCCGGAGGTGGCGTCCCGAGTCCAAGCTTCTTCGGGTTCGGGGTTGCCGGACTTGCCG	240
<i>hb14.2</i>	241	GTGGTGGGAACCGGTACCGGTACCAGTACCATTAAACGGCCCGCTGGTGGTGATTCTCTGGG	300
<i>blt14.2</i>	241	GTGGTGGGAACCGGTACCGGTACCAGTACCATTAAACGGCCCGCTGGTGGTGATTCTCTGGG	300
<i>hb14.2</i>	301	GCCCCACTCATGCATGATCATCTTGTGTGCATGTGCTGACTTGATACATACATACAAG	360
<i>blt14.2</i>	301	GCCCCACTCATGCATGATCATCTTGTGTGCATGTGCTGACTTGATACATACATACAAG	360
<i>hb14.2</i>	361	CTGAAGCTGAACCTGTGGGTTTACTAGATTTCTATAGCCGGCATCGCCCGGAAGAAAAA	420
<i>blt14.2</i>	361	CTGAAGCTGAACCTGTGGGTTTACTAGATTTCTATAGCCGGCATCGCCCGGAAGAAAAA	420
<i>hb14.2</i>	421	CACCTGCGTTTCGCTCATGTCCACGTTCCCAATGAGCGTTTGTATCCGG	470
<i>blt14.2</i>	421	CACCTGCGTTTCGCTCATGTCCACGTTCCCAATGAGCGTTTGTATCCGG	470

图 3 青稞 *hb14.2* 基因与大麦 *blt14.2* 基因序列比较

Fig. 3 Comparison of the nucleotide sequences between *hb14.2* and *blt14.2* genes

黑区代表同源性为 100%, 白区没有同源性。

There is 100% similarity in sequences with black background; no similarity in sequences in white background.

<i>hb14.2</i>	1	MAKCLAVALLLLVVLASCDGRELSQKDSALGAARGAGAGGGVVAESKASSG	50
<i>blt14.2</i>	1	MAKCLAVALLLLVVLASCDGRELSQKDSALGAARGAGAGGGVPESKSSSG	50
<i>hb14.2</i>	51	SGLPDLPVVGTGTGTSTINGPLVVIPGAPTHA*	83
<i>blt14.2</i>	51	SGLPDLPVVGTGTGTSTINGPLVVIPGAPTHA*	83

图 4 推测的青稞 *hb14.2* 蛋白与大麦 *blt14.2* 蛋白氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of the deduced amino acid sequences between *hb14.2* and *blt14.2* proteins

阴影区代表同源性为 100%, 白区没有同源性。

There is 100% similarity in sequences with black background; no similarity in sequences in white background.

图 5 转基因烟草的 PCR 检测
Fig. 5 PCR detection of transgenic tobaccos
M: λ DNA/*EcoR* I+ *Hind* III marker; 1: non-transgenic plants; 2–5: transgenic plants.

图 6 转基因烟草的 Southern 检测
Fig. 6 Southern detection of transgenic tobacco
1: positive control; 2: negative control; 3: transgenic plant.

对检测呈阳性的 1 和 2 号转基因烟草及对照植株进行 RT-PCR 扩增(图 7)。结果显示, 对照植株没有扩增信号, 而 2 个转基因植株的总 RNA 逆转录产物都能扩增出目标产物, 目的基因在转基因植株中获得了转录水平上的表达。

图 7 转基因烟草的 RT-PCR 检测
Fig. 7 RT-PCR detection of transgenic tobaccos
M: λ DNA/*EcoR* I+ *Hind* III marker; 1: non-transgenic plants; 2–3: transgenic plants.

2.3 转基因烟草的抗低温检测

对烟草叶肉原生质体进行低温胁迫处理(表 1)显示, 低温对原生质体的生长有一定的影响, 且随着胁迫时间的延长, 原生质体的存活率呈下降趋势。在低温胁迫下, 转基因烟草的原生质体存活率略高于对照植株。

此外, 在低温胁迫下, 转基因烟草和对照植株中脯氨酸含量均提高, 且随着胁迫时间的延长, 脯氨酸含量呈上升趋势(表 2)。然而, 与对照植株相比, 转基因烟草中的脯氨酸含量偏低, 在低温处理 72 h 后, 对照叶片中脯氨酸含量为 1.23 mg g^{-1} , 而转基因烟草中只有 0.57 mg g^{-1} 。

3 讨论

以原生质体作为胁迫的受体, 来研究转基因植

表 1 低温胁迫下烟草原生质体存活率
Table 1 Survival rate of protoplasts from transgenic and non-transgenic plants under low-temperature stress (%)

检测样株 Samples of detection	低温(4℃)胁迫时间 Stress time under low temperature (4℃)					
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
转化植株 Transgenic plants	86.7±3.2	74.5±1.7	70.1±2.3	67.4±2.6	60.3±1.1*	56.7±1.3*
非转化植株 Non-transgenic plants	87.1±2.9	72.9±2.1	67.9±1.8	59.8±1.0	49.6±1.5	43.2±0.7

* Represents significant difference ($P < 0.05$) based on Student's *t*-test.

表 2 低温胁迫下烟草脯氨酸含量的变化
Table 2 Proline contents in transgenic and non-transgenic plants under low-temperature stress (mg g⁻¹ FW)

检测样株 Samples of detection	低温(4℃)胁迫时间 Stress time under low temperature (4℃)				
	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
转化植株 Transgenic plants	0.31±0.04	0.36±0.07	0.39±0.05	0.53±0.08	0.57±0.06
非转化植株 Non-transgenic plants	0.63±0.09	0.71±0.05*	0.74±0.09*	0.82±0.11	1.23±0.17*

* Represents significant difference ($P < 0.05$) based on Student's *t*-test.

物对低温胁迫的抗性已有报道。Artus 等^[9]将冷诱导基因 *cor15a* 连接强启动子 CaMV35S 后, 转入拟南芥中, 在 $-8 \sim -4^{\circ}\text{C}$ 范围内, 转基因植株的原生质体存活率高于对照植株, *cor15a* 基因的表达可以稳定膜的结构, 提高原生质体的耐冻性。本研究与此类似, 转基因烟草与对照植株原生质体在存活率上的这种差异, 可间接说明青稞 *hblt14.2* 基因与植物的抗寒性有一定的关系。

脯氨酸是一种渗透调节物质, 具有极强的亲水性, 能稳定原生质胶体及组织内的代谢过程, 从而降低冰点, 提高质膜的稳定性, 防止细胞脱水^[10-11]。因此, 测定脯氨酸含量可以作为植物抗寒性的生理指标。一般情况下, 植物体内游离脯氨酸含量占总游离氨基酸含量的 2% 左右, 植物在受到低温、干旱、盐碱和 UV-B 辐射等胁迫时, 脯氨酸含量将发生明显变化, 通常会增加 40%~50%^[12]。本文的结果也证实了这一点。然而, 与对照植株相比, 转基因烟草中的脯氨酸含量偏低, 这与 Hsieh 等^[13]和 Kavi^[14]在其他转基因植物中测量的脯氨酸含量刚好相反。推测有两种可能原因: (1) 低温胁迫下, 由于转基因烟草中 *hblt14.2* 基因的高效表达, 在一定程度上提高了植株对低温的抵抗力, 从而使另一条抗低温代谢途径——脯氨酸合成途径被削弱, 结果导致转基因烟草中积累的脯氨酸低于对照。与此类似, 刘艳红等^[15]在对高山冰缘植物的研究中发现, 大多数高山植物积累有较高含量的脯氨酸, 但也有少数植物如珠芽蓼、高山红景天和雪莲等的脯氨酸含量较低, 然而在这 3 种植物中却存在抗冻糖蛋白, 于是推测这 3 种植物可能是通过抗冻基因的表达来适应严酷的低温环境的, 而脯氨酸合成途径则被相应削弱。(2) 虽然植物在逆境条件下积累脯氨酸是一种较普遍的现象。但是, 脯氨酸的积累是植物对逆境的一种适应^[16], 还是胁迫造成的一种结果^[17], 目前还没有明确的结论。本文推测, 如果脯氨酸的积累是逆境对植物造成伤害的一种结果, 那么正是由于 *hblt14.2* 基因的高效表达, 提高了转基因植物的抗寒性, 减弱了低温对细胞结构和功能造成的损伤, 从而只产生少量伤害产物——脯氨酸。

4 结论

从青稞中克隆了 *hblt14.2* 基因, 与大麦的 *blt14.2* 基因具有 98.9% 的同源性, 在编码蛋白上存在 2 个氨基酸的差别。青稞 *hblt14.2* 基因是一个抗

寒相关基因。

References

- [1] Guo B-Z(郭本兆). Flora of Qinghai. Xining: Qinghai People's Press, 1987. p 701 (in Chinese)
- [2] Hughes M A, Dunn M A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot*, 1996, 47: 291-305
- [3] Dunn M A, Hughes M A, Zhang L, Pearce R S, Quigley A S, Jack P L. Nucleotide sequence and molecular analysis of the low temperature induced barley gene, BLT4. *Mol Gen Genet*, 1991, 229: 389-394
- [4] Dunn M A, Hughes M A, Pearce R S. Molecular characterization of a barley gene induced by cold treatment. *J Exp Bot*, 1990, 41: 1405-1413
- [5] Dunn M A, Brown K, Lightowlers R, Hughes M A. A low-temperature-responsive gene from barley encodes a protein with sing-stranded nucleic acid-binding activity which is phosphorylated in vitro. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 947-959
- [6] Phillips J R, Dunn M A, Hughes M A. mRNA stability and localization of the low-temperature- responsive barley gene family blt14. *Plant Mol Biol*, 1997, 33: 1013-1023
- [7] Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* as A model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In: Meyerowitz E, Somerville C, eds. *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. pp 807-834
- [8] Kurkela S, Borg-Franck M. Cloning and characterization of a cold- and ABA- inducible *Arabidopsis* gene. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 137-144
- [9] Artus N N, Uemura M, Steponkus P L, Gilmour S J, Lin C T, Thomashow M F. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1340-1349
- [10] Raymond M J, Smirnoff N. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Ann Bot*, 2002, 89: 813-823
- [11] Alia-Prasad K V S K, Saradhi P P. Effect of zinc on free radicals and proline in *Brassica* and *Cajanus*. *Phytochemistry*, 1995, 39: 45-47
- [12] Purvis A C, Yelenosky G. Translocation of carbohydrates and proline in young grapefruit trees at low temperatures. *Plant Physiol*, 1983, 73: 877-880
- [13] Hsieh T H, Lee J T, Yang P T, Chiu J H, Chang Y Y, Wang Y C, Chan M T. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic

- tomato. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1086–1094
- [14] Kavi K. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1387
- [15] Liu Y-H(刘艳红), An L-Z(安黎哲), Zhang M-X(张满效), Chen T(陈拓), Xu S-J(徐世健), Liu G(刘光), Wang X-L(王勋陵). Analysis of free amino acids of alpine periglacial plants. *J Glaciol Geocryol* (冰川冻土), 2005, 27(4): 608–614(in Chinese with English abstract)
- [16] Hare P D, Cress W A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul*, 1997, 21: 79–102
- [17] Wanner L A, Junttila O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1999, 120: 391–399