

## 毛果杨*PtAREB9*基因启动子的克隆与功能初步分析

魏明, 王含, 李成浩\*

东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨150040

**摘要:** ABF属于碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子A亚族, 受脱落酸(ABA)调控, 参与植物生长发育及抗旱耐盐响应。为了研究杨树ABF同源基因的表达规律, 利用PCR技术从毛果杨基因组DNA中克隆出*PtAREB9*基因上游一段1 635 bp序列。使用PLACE和PlantCARE在线软件分析序列, 结果表明该序列含有水杨酸(SA)响应元件TCA-element、逆境胁迫响应元件TC-rich repeats、干旱胁迫响应元件CCAAT-box和MBS、ABA应答元件CE3。在序列分析的基础上, 构建了*PtAREB9*基因启动子驱动*GUS*报告基因的植物表达载体。利用农杆菌介导的花粉管通道法转化拟南芥, 结果表明*PtAREB9*启动子可以驱动*GUS*基因在拟南芥中表达, ABA、干旱、高盐和SA处理后在叶片和根尖中的表达量较高。说明*PtAREB9*启动子受SA响应元件调控, 与ABA、干旱和高盐胁迫应答相关。

**关键词:** 毛果杨; ABF转录因子; 启动子; 拟南芥

## Cloning and Functional Identification of Promoter Region of *PtAREB9* from *Populus trichocarpa*

WEI Ming, WANG Han, LI Cheng-Hao\*

State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** AREB binding factor (ABF) is a member of basic leucine zipper (bZIP) transcription factor A sub-family, which is regulated by ABA and involved in plant growth and drought and salt resistance. A 1 635 bp 5' flanking sequence of *PtAREB9* gene was isolated by PCR from genomic DNA of *Populus trichocarpa* to study the expression and regulation of ABF. Promoter sequence analysis showed that it contains a salicylic acid (SA)-responsive element (TCA-element), stress-responsive element (TC-rich repeats), dehydration-responsive element (CCAAT-box and MBS) and ABA-responsive element (CE3). Then, the *PtAREB9* promoter was fused to the *GUS* reporter gene to characterize its expression pattern in *P. trichocarpa*. *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* showed that the *GUS* gene was induced in leaves and root tip under ABA, drought, high salt and SA treatments, suggesting that the *PtAREB9* promoter was induced by SA-responsive element, and responded to ABA, drought and high salt stresses.

**Key words:** *Populus trichocarpa*; ABF transcription factor; promoter; *Arabidopsis thaliana*

植物在生命过程中具有感知环境变化和适应逆境的能力, 当植物生长环境受到复杂多变的逆境胁迫时, 在长期进化过程中植物会产生相应的胁迫应答反应。干旱、高盐是影响植物生长的主要非生物胁迫因素, 严重影响植物的生长发育。在植物中各种诱导型基因的表达主要受大多以家族形式出现的转录因子调控, 转录因子在提高植物的抗逆性、参与植物对生物和非生物胁迫的应答反应中发挥着重要作用(Zhang和Wang 2005)。启动子作为具有调控作用的反式作用因子, 通过与转录蛋白结合有效地控制基因转录起始时间、表达部位和表达程度(杜皓等2015)。

启动子是基因表达调控的重要元件, 并且已

经成为分子生物学研究领域的热点。对脱落酸(abscisic acid, ABA)调控下基因的启动子分析表明大多数基因能够受ABA调控, 主要是由于其启动子中含有调控元件(C/T)ACGTGGC (Busk和Pages 1998)。这类保守的元件称为ABA应答元件(ABA-responsive element, ABRE)。AREB (ABA-responsive element binding protein)/ABF (AREB binding factor)是可以与启动子中ABRE结合的碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)类中A亚族转录因子,

收稿 2015-08-04 修定 2015-10-29

资助 国家“863”计划重点项目(2013AA102704)。

\* 通讯作者(E-mail: chli0@163.com; Tel: 0451-82191556)。

可激活干旱胁迫下ABA依赖基因及下游许多耐盐和耐旱等抗性相关基因的表达(Choi等2000)。在拟南芥7 000个cDNA基因中已经鉴定出299个干旱诱导基因, 213个受到高盐诱导, 245个受到ABA诱导(Seki等2002)。一半以上的干旱诱导基因可以分别被高盐或ABA诱导, 说明干旱、高盐和ABA应答途径之间存在着复杂的相互作用。ABA能够在干旱和高盐的条件下对植物营养组织适应性有基础调节作用, 并促进植株保卫细胞气孔关闭以维持植株内的水分(Finatto等2015; Shinozaki等2003)。作为抗旱耐盐性诱导激发机制的一部分, ABA抑制了与活跃生长有关的基因, 并活化与抗旱耐盐诱导有关的基因, 从而提高了植物的抗逆性(郭贵华等2014)。ABA响应基因的表达需要多个AREB和AREB结合耦合元件(如CE1或CE3)来作为功能性的启动子(Narusaka等2003)。

近几年来, ABF转录因子已经成为拟南芥、水稻等模式植物抗旱性研究的热点之一。ABF基因在诸多非生物胁迫中被显著和快速地诱导表达。有研究从拟南芥中分离出4种bZIP蛋白, 其中ABF1主要参与低温、ABA胁迫应答反应; ABF3主要受ABA、高盐、低温、热、氧化胁迫诱导; ABF2/AREB1、ABF4/AREB2则主要参与ABA、干旱、高盐、热和氧化胁迫应答反应(杨颖等2009; Uno等2000)。ABF2启动子在胚胎成熟过程中有较高表达活性, 在营养组织中大部分能够高效表达, 在生殖器官中也有少数表达, 这种现象表明在植物器官中ABF2能够特异性表达, 从而影响了植物的整个生长发育过程。

为研究杨树AREB同源基因的表达特异性, 我们在NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中找到ABF2的同源基因*PtAREB9*, 对其启动子序列进行顺式作用元件的分析及克隆, 构建pBI121-*P<sub>PtAREB9</sub>*-*GUS*表达载体, 通过花粉管通道法(Bechtold和Pelletier 1998)转化拟南芥, 对该表达载体的GUS活性进行特异性分析。

## 材料与amp;方法

### 1 实验材料及试剂

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为哥伦比亚生态型, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株感受态DH5 $\alpha$ 、

pBI121-*GUS*载体、农杆菌EHA105均由本实验室保存。pMD18-T购自TaKaRa公司。

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、纯化试剂盒以及普通质粒小提试剂盒购自康为世纪公司; *LA Taq*酶、核酸分子量标准(DNA marker ladder)、T4 DNA连接酶、限制性内切酶*Hind*III和*Bam*HI等购自TaKaRa公司。葡萄糖苷酸酶(glucuronidase, GUS)组织化学染色底物5-溴-4-氯-3-吡啶-D葡萄糖苷酸酯(X-Gluc)购自Sigma公司。卡那霉素(kanamycin, Kan)购自Amresco公司; 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)购自Sigma公司; 利福平(rifampicin, Rif)购自MYM公司; 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)购自Sigma-Aldrich公司; 蛋白胨、酵母提取物、NaCl和琼脂等其余试剂均为国产分析纯。

### 2 毛果杨*PtAREB9*基因启动子的克隆及序列分析

根据Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>)提供的序列设计一对*PtAREB9*基因启动子特异引物。上游引物: 5'-CCAAGCTTCAA-CTCGCATGCAATCCCCT-3' (划线部位为增加的*Hind*III酶切位点, 酶切位点前加两个保护碱基); 下游引物: 5'-CGGGATCCTTTCCAAAGTTCTT-GAAGTCCCAA-3' (划线部位为增加的*Bam*HI酶切位点, 酶切位点前加两个保护碱基)。利用CTAB法提取毛果杨(*Populus trichocarpa*)基因组DNA, 以毛果杨基因组DNA当模板, 用*LA Taq* (TaKaRa, Japan)进行PCR反应, 扩增出*PtAREB9*启动子。扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性3 min; 然后95  $^{\circ}$ C 30 s, 65  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 共35个循环; 最后72  $^{\circ}$ C 延伸7 min。扩增产物经1.2%琼脂凝胶电泳分离, 回收扩增片段, 纯化后插入pMD18-T载体, 热激转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 菌株感受态细胞, 接种到含50 mg $\cdot$ L $^{-1}$  Amp的LB固体培养基(1 L LB固体培养基含10 g蛋白胨、5 g酵母提取物、10 g NaCl和12 g琼脂)平板上, 于37  $^{\circ}$ C 倒置培养14~16 h, 挑取单菌落进行PCR获得阳性克隆。阳性克隆委托吉林省库美生物科技有限公司进行测序, 并与毛果杨基因组序列进行BLAST比对。将pBI121-*GUS*质粒和基因重组质粒分别进行*Hind*III和*Bam*HI双酶切, 回收纯化目的片段, 用T4 DNA连接酶连接, 并将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞DH5 $\alpha$ , 经50 mg $\cdot$ L $^{-1}$  Kan筛选和PCR扩增后, 进行双酶切验证, 获得pBI121-*P<sub>PtAREB9</sub>*-

*GUS*启动子植物表达载体。

### 3 农杆菌介导的花粉管通道法转化拟南芥

通过电击法将pBI121-*P<sub>PtAREB9</sub>*-*GUS*启动子表达载体转化到根癌农杆菌EHA105中。用花粉管通道法将拟南芥花絮放入用蔗糖水悬浮的农杆菌菌液(OD=0.8~1.2)中浸泡3 s,取出后用保鲜膜包好,并遮盖不透光的塑料袋,暗培养16~24 h,取下袋子和保鲜膜,正常光照培养。侵染1周后,按照上述方法进行第二次侵染。待角果成熟发黄后,收集T<sub>0</sub>代种子,于37℃烘箱中烘干2 d,放入4℃中3~5 d后,筛选种子。种子消毒后,播种于含50 mg·L<sup>-1</sup> Kan的1/2MS培养基中,种子萌发生长后,取抗性植株种子土壤中,成熟后收T<sub>1</sub>代种子,并通过PCR鉴定出转基因植株。重复以上步骤,筛选出T<sub>3</sub>代转基因株系。

### 4 胁迫处理及GUS染色

将T<sub>3</sub>代转基因种子用20%白猫牌漂水消毒25 min,双蒸水清洗干净,均匀播种在添加50 mg·L<sup>-1</sup> Kan的1/2MS培养基上。将生长7 d的转基因植株分别转移至含200 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇、300 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇、150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、200 μmol·L<sup>-1</sup> ABA、100 μmol·L<sup>-1</sup>水杨酸(salicylic acid, SA)的培养基上进行幼苗期干旱、盐、ABA、SA处理,2 d后取样。取处理后的植株进行GUS组织化学染色分析,37℃染色20 h,然后用70%乙醇脱色,观察并拍照。GUS活性检测液包含0.1 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>、0.1 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>、50 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钠缓冲液(pH 7.0)、10 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA、0.001% (V/V) Triton X-100、0.5 mg·mL<sup>-1</sup> X-Gluc。

## 实验结果

### 1 毛果杨*PtAREB9*基因启动子的克隆

以毛果杨基因组DNA为模板,通过PCR扩增得到大小约为1 635 bp的片段(图1),与预期基本一致。将此片段回收,与pMD18-T载体连接,经菌液PCR验证后,证明该启动子片段已克隆到pMD18-T载体上。阳性克隆测序结果表明,该序列长度为1 635 bp。

### 2 毛果杨*PtAREB9*基因启动子的序列分析

通过PLACE (<http://www.dna.afifrc.go.jp/PLACE/>)数据库及PlantCARE (

图1 *PtAREB9*基因启动子的PCR检测

Fig.1 PCR detection of the *PtAREB9* promoter

M: DNA Marker DL2000.

ics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)数据库对*PtAREB9*基因起始密码子ATG上游1 635 bp的启动子序列进行启动子作用元件的分析。结果表明:*PtAREB9*基因启动子序列上存在多个与植物抗逆功能相关的顺式作用元件,有厌氧诱导反应过程中的顺式作用元件ARE和SA顺式作用元件TCA-element,尤其还存在逆境胁迫响应元件TC-rich repeats、干旱胁迫响应元件CCAAT-box、MBS和ABA应答元件CE3(表1)。

### 3 pBI121-*P<sub>PtAREB9</sub>*-*GUS*植物表达载体的构建及工程菌制备

为研究*PtAREB9*启动子的功能,将pBI121-*GUS*质粒与引入酶切位点的*P<sub>PtAREB9</sub>*-T重组质粒分别进行HindIII和BamHI双酶切,使用T4 DNA连接酶连接,新的重组质粒经菌落PCR和双酶切验证

表1 毛果杨*PtAREB9*基因启动子中顺式元件预测

Table 1 Predicted *cis*-elements in the promoter of the *PtAREB9* gene from *P. trichocarpa*

元件名称	核心序列	功能注释
ARE	TGGTTT	厌氧诱导元件
CE3	GACGCGTGTC	ABA应答元件
CCAAT-box	CAACGG	干旱应答
MBS	TAACTG	干旱诱导元件
TCA-element	CCATCTTTTT	SA应答元件
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯应答元件
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯应答元件
ERE	ATTTCAAA	乙烯应答元件
GARE-motif	AAACAGA	赤霉素应答元件
TATC-box	TATCCCA	赤霉素应答元件
HSE	AAAAAATTTT	高温应答顺式作用元件
LTR	CCGAAA	低温应答顺式作用元件
TC-rich repeats	ATTTCTTCA	逆境胁迫应答元件
circadian	CAANNNNATC	节律顺式作用元件

(图2-B), 获得植物表达载体pBI121- $P_{PtAREB9}$ -*GUS*。采用电击转化法, 将其转入根癌农杆菌EHA105感受态细胞中, 菌液经PCR鉴定(图2-A), 获得阳性克隆, 完成工程菌制备。

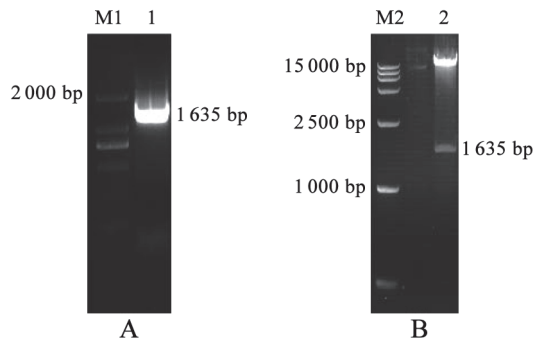


图2 pBI121- $P_{PtAREB9}$ -*GUS*的PCR (A)和双酶切(B)验证  
Fig.2 Identification of pBI121- $P_{PtAREB9}$ -*GUS* by PCR (A) and double restriction-enzyme digestion (B)  
M1: DNA Marker DL2000; M2: DNA Marker DL15000.

#### 4 转基因拟南芥植株的获得

用花粉管通道法浸染野生型的拟南芥, 收获的种子在添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Kan的1/2MS固体培养基上筛选转染成功的植株, 直到筛选到 $T_3$ 代6个转基因株系, 并用*GUS*特异的引物进行PCR验证, 扩增出相应条带(图3), 证明是转基因成功的植株。

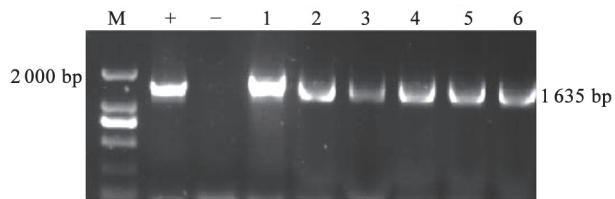


图3  $T_3$ 代转基因植株的PCR检测  
Fig.3 PCR detection of  $T_3$  transgenic plants  
M: DNA Marker DL2000; +: pBI121- $P_{PtAREB9}$ -*GUS*; -: 野生型拟南芥; 1-6: 转基因拟南芥 $T_3$ 代。

#### 5 $PtAREB9$ 基因启动子的*GUS*活性分析

对 $T_3$ 代 $P_{PtAREB9}$ -*GUS*转基因植株进行幼苗期冷、甘露醇、ABA、SA和盐胁迫处理, 通过显微镜观察处理前后转基因植株的*GUS*染色情况, 以确定启动子表达特异性。由图3可见, 未胁迫时 $P_{PtAREB9}$ -*GUS*转基因幼苗在叶片、根尖部位表达较低, 着色较浅; 在甘露醇、ABA、SA、盐胁迫下,

叶片表达较高, 染色加深, 且茎尖也有表达。相同胁迫时间下, 200和 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇胁迫下的幼苗叶片、茎尖的染色均有不同程度的加深; 在 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇和SA胁迫下, 根尖表达较高, 颜色加深; 在盐胁迫下, 根上部表达较高, 颜色加深; 在ABA胁迫下, 根上部和根尖都有表达, 颜色较深。值得一提的是, 200  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇胁迫下的幼苗新生子叶未染色, 而在 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇胁迫下的染色明显(图4)。从总体来看, 甘露醇、ABA、盐、SA胁迫都能促进*GUS*的表达。

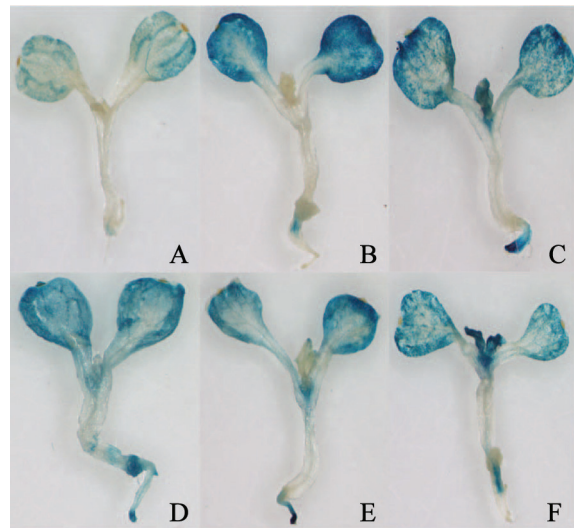


图4 转 $P_{PtAREB9}$ -*GUS*植株在不同胁迫下*GUS*的组织化学定位  
Fig.4 GUS histochemical localization of transgenic  $P_{PtAREB9}$ -*GUS* plants under different stresses  
A: 未处理; B:  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇; C:  $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇; D:  $200 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA; E:  $100 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA; F:  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl。

## 讨 论

目前, 全球性的环境恶化已经得到了人们的重视。在影响杨树生长过程的诸多环境因子中, 水是不可或缺的一部分(莫康乐等2014)。因此, 研究杨树抗旱机理是非常必要的。ABA依赖途径是干旱胁迫应答途径之一(洪岚等2011)。ABA在植物干旱适应中很重要, 大量研究表明ABA含量可作为评价植物抗旱能力的指标之一(季孔庶等2006)。AREBs是ABA反应元件结合蛋白。每个ABF转录因子在不同胁迫条件下的应答反应有不同的趋势, 比如, ABF2和ABF3在盐胁迫下有明显的应答反应, ABF4在低温、盐和干旱条件下存在

明显应答反应(Uno等2000)。有研究表明, 水稻中bZIP转录因子第三亚族中*OsbZIP46*是ABF转录因子相似度比较高的基因, 该基因的过表达在植物幼苗时期对ABA敏感性较高并在干旱和渗透胁迫下能够高效表达(Tang等2012)。bZIP转录因子家族中的水稻*OsAREB8*基因在植物营养阶段能够响应干旱胁迫(Maruyama等2012)。

生物在生长发育过程中对外界环境的响应有着明显的有序性。这种有序性来自于该基因的有序表达, 这需要归功于启动子对该基因的精确调控。因此, 研究启动子的功能是研究基因表达特异性的首要条件。由于启动子中存在着不同的顺式元件, 因此不同顺式元件调控的方式不同, 有的是组织特异性启动子, 有的是诱导型启动子, 而干旱响应的启动子包含保守的干旱响应元件(dehydration responsive element, DRE)和ABRE等。本文构建了*PtAREB9*基因的启动子融合*GUS*表达载体, 通过*GUS*活性来研究*PtAREB9*启动子的功能。由于*PtAREB9*基因与*ABF2*同源, 由此推测*PtAREB9*与*ABF2*基因功能相似。预测分析*PtAREB9*启动子序列的顺式作用元件, 发现该启动子含有干旱和ABA应答相关的应答元件, 如CE3、MBS、CCAAT-box、LTR、TCA-element、circadian识别位点等, 初步推测*PtAREB9*可能与逆境胁迫下植物应答相关。所以分析了转*P<sub>PtAREB9</sub>-GUS*的拟南芥植株的*GUS*活性, 结果显示, 在ABA、盐、甘露醇和SA胁迫下, *PtAREB9*表达量都显著提高, 表明*PtAREB9*基因主要应答于ABA、盐和渗透胁迫。Fujita等(2005)在之前的研究中已经证明*PtAREB9*的同源基因*ABF2*在ABA、高盐和缺水条件下上调表达。由于*PtAREB9*基因启动子中含有SA的应答元件, 所以转入该启动子的T<sub>3</sub>代转基因拟南芥在SA的胁迫下也有明显的反应。Harms等(1995)的研究表明, SA在环境胁迫反应中是驱动植物防御基因表达信号传递的重要组成部分。在本研究中发现, ABA、盐、甘露醇和SA胁迫可诱导*PtAREB9*启动子在拟南芥叶片和根部的表达, 推测逆境胁迫下*PtAREB9*基因主要在毛果杨叶片和根部诱导表达。在不同胁迫下, 转*PtAREB9*启动子的T<sub>3</sub>代拟南芥根部的表达区段不同, 推测*PtAREB9*在毛果杨根上部及根尖部位的表达机制可能不同。

有研究表明, bZIP转录因子家族中的ABI5在ABA胁迫下在根部表达较强(Yang等2011)。水稻*OsAREB1*基因的表达受ABA、盐和干旱的诱导, 在水稻根、茎、叶中都有表达, 但根中表达量最高(金晓芬2008)。在本研究中发现, 200 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇胁迫下转*P<sub>PtAREB9</sub>-GUS*的幼苗新生子叶中*GUS*未表达, 300 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇胁迫下的表达较高, 说明新生子叶表达可能存在一定的阈值, 当甘露醇浓度达到一定程度时, *PtAREB9*启动子才可以驱动*GUS*基因在幼苗新生子叶中的特异表达。有研究表明, 在一定干旱阈值(drought threshold)胁迫范围内, 很多植物进行相关抗旱基因的表达, 随后产生一系列生理、生化及形态结构等方面的变化, 从而表现出抗旱性的综合性状(赵雅静等2009)。值得一提的是, 在ABA和渗透胁迫下, 转基因T<sub>3</sub>代拟南芥叶片的*GUS*表达情况显著提高, 可以推测该基因可能通过ABA依赖途径来控制叶片气孔开关。有研究证明, 在逆境条件下, ABA在植物体内合成或者已经存储的ABA被释放, 诱导气孔开关, 从而有效调控植物体内水分平衡, 来达到响应干旱胁迫的目的(Liang等2015)。

### 参考文献

- 杜皓, 丁林云, 何曼林, 蔡彩平, 郭旺珍(2015). 受多逆境诱导表达的*GhWRKY64*基因启动子克隆与功能分析. 作物学报, 41 (4): 593~600
- 郭贵华, 刘海艳, 李刚华, 刘明, 李岩, 王绍华, 刘正辉, 唐设, 丁艳锋(2014). ABA缓解水稻孕穗期干旱胁迫生理特性的分析. 中国农业科学, 47 (22): 4380~4391
- 洪岚, 刘旭, 李玲(2011). 植物AREB/ABF转录因子及其参与的ABA信号转导. 植物生理学报, 47 (3): 211~217
- 季孔庶, 孙志勇, 方彦(2006). 林木抗旱性研究进展. 南京林业大学学报(自然科学版), 30 (6): 123~128
- 金晓芬(2008). 水稻bZIP类转录因子OsAREB1的功能分析[硕士论文]. 扬州: 扬州大学
- 莫康乐, 陈立欣, 周洁, 方显瑞, 康满春, 张志强(2014). 永定河沿河沙地杨树人工林蒸腾耗水特征及其环境响应. 生态学报, 34 (20): 5812~5822
- 杨颖, 高世庆, 唐益苗, 冶晓芳, 王永波, 刘美英, 赵昌平(2009). 植物bZIP转录因子的研究进展. 麦类作物学报, 29 (4): 730~737
- 赵雅静, 翁伯琦, 王义祥, 徐国忠(2009). 植物对干旱胁迫的生理生态响应及其研究进展. 福建稻麦科技, 27 (2): 45~50
- Bechtold N, Pelletier G (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. Methods Mol Biol, 82: 259~266
- Busk PK, Pages M (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. Plant Mol Biol, 37 (3): 425~435

- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem*, 275 (3): 1723~1730
- Finatto T, de Oliveira AC, Chaparro C, Da Maia LC, Farias DR, Woyann LG, Mistura CC, Soares-Bresolin AP, Llauro C, Panaud O et al (2015). Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. *Rice*, 8: 13
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17 (12): 3470~3488
- Harms K, Atzorn R, Brash A, Kuhn H, Wasternack C, Willmitzer L, Pena-Cortes H (1995). Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant Cell*, 7 (10): 1645~1654
- Liang S, Lu K, Wu Z, Jiang SC, Yu YT, Bi C, Xin Q, Wang XF, Zhang DP (2015). A link between magnesium-chelatase H subunit and sucrose nonfermenting 1 (SNF1)-related protein kinase SnRK2.6/OST1 in *Arabidopsis* guard cell signalling in response to abscisic acid. *J Exp Bot*, 66 (20): 6355~6369
- Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, Yoshida T, Kidokoro S, Matsukura S, Takasaki H, Sakurai T, Yamamoto YY, Yoshiwara K et al (2012). Identification of *cis*-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA Res*, 19 (1): 37~49
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Fujita M, Ishida J, Nakashima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Kamiya A et al (2003). Expression profiles of *Arabidopsis phospholipase A IIA* gene in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol*, 44 (11): 1246~1252
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T et al (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*, 31 (3): 279~292
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 6 (5): 410~417
- Tang N, Zhang H, Li X, Xiao J, Xiong L (2012). Constitutive activation of transcription factor OsbZIP46 improves drought tolerance in rice. *Plant Physiol*, 158 (4): 1755~1768
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (21): 11632~11637
- Yang X, Yang YN, Xue LJ, Zou MJ, Liu JY, Chen F, Xue HW (2011). Rice ABI5-Like1 regulates abscisic acid and auxin responses by affecting the expression of ABRE-containing genes. *Plant Physiol*, 156 (3): 1397~1409
- Zhang YJ, Wang LJ (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol Biol*, 5: 1