

利用基因芯片研究植物非生物逆境响应基因表达的进展

雷东阳^a, 旷浩源^b, 陈立云^{a*}

(湖南农业大学 a.水稻科学研究所; b.教务处, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 极端温度、干旱和高盐等逆境胁迫影响作物的正常生长, 会导致作物大幅度减产。分子遗传和基因组学研究表明, 大量基因受到逆境胁迫的诱导, 包含转录因子在内的许多信号因子参与了逆境响应。基因芯片能够进行整个基因组范围的基因表达分析, 利用基因表达谱分析, 结合代谢组学和蛋白组学研究, 已在阐明植物抗逆机制和发掘植物逆境胁迫响应相关基因方面取得重要进展。综述利用基因芯片对植物在极端温度、干旱和高盐等非生物逆境胁迫下基因表达的研究进展。

关 键 词: 植物; 逆境胁迫; 基因芯片; 基因表达

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)02-0156-06

Progress of microarray analysis for studying plant gene expression in response to abiotic stress

LEI Dong-yang^a, KUANG Hao-yuan^b, CHEN Li-yun^{a*}

(a.Rice Research Institute; b.Department of Educational Administration, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Extreme temperature, drought and high salinity are common stress conditions that affect both plant growth and crop production. Molecular and genomic studies have shown that expression of many genes with various functions are induced by extreme temperature, drought and high salinity, and various signaling factors including transcription factors are involved in the stress responses. Gene chip, a microarray-based expression profiling method which profiles the expression of genes in the whole genome, combined with metabolomics and proteomics has allowed significant progress in the characterization of plant genes related to stress response and in the elucidation of the underlying anti-stress mechanisms. In this review, we highlight the advances of microarray analysis of stress condition related genes in plants.

Key words: plant; biotic/abiotic stresses; gene chip; gene expression

生物和非生物逆境是影响植物生长发育的重要限制性因素。高温、低温、干旱和盐碱等非生物逆境胁迫严重影响作物的生长, 造成作物的大幅度减产, 亚洲地区每年由于非生物逆境造成作物减产达 15% 以上, 为生物逆境胁迫造成作物产量损失的 2 倍, 严重威胁全球粮食安全^[1], 培育抗逆性强的新品种成为作物育种的重要目标。研究表明, 植物为适应逆境, 会主动应答胁迫, 植物逆境胁迫响

应是一个涉及多基因、多信号途径的复杂过程, 逆境下植物的形态、生理生化特性会发生适应性变化, 但分子水平上的变化起决定性的作用。基于基因芯片技术^[2-3]的全基因组表达分析, 能揭示逆境胁迫下整个基因组水平的表达情况, 探明胁迫响应的分子调控网络, 发掘胁迫相关的重要基因, 将为从分子水平上剖析植物逆境胁迫抗性机理, 明确植物逆境胁迫抗性生物学机制, 克隆抗逆相关基因及

收稿日期: 2011-07-05

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(10JJ4012); 湖南省教育厅项目(09C500)

作者简介: 雷东阳(1980—), 男, 湖南邵阳人, 博士, 副教授, 主要从事水稻遗传育种研究, leidongyang1980@yahoo.com.cn; *通信作者, chenliyun996@163.com

选育耐逆作物新品种提供依据。迄今为止,利用基因芯片技术,已从转录水平上发掘出大量与逆境胁迫响应相关的基因^[4-5]。笔者综述利用基因芯片技术在植物极端温度、干旱和高盐等非生物胁迫响应相关基因表达的研究进展。

1 利用基因芯片研究植物在极端温度下的基因表达

1.1 利用基因芯片研究植物在高温胁迫下的基因表达

高温胁迫可诱导大量基因发生差异表达。Rizhsky 等^[6]利用 cDNA 芯片研究烟草在高温和干旱共同胁迫下的基因表达谱,发现热激蛋白(Hsp)、活性氧中间产物消除酶、代谢相关基因和胁迫响应等 4 类基因同时受高温和干旱控制,另外还发现 2 个高温和干旱同时胁迫特异诱导的转录因子 WRKY 和己烯应答转录共激活子。为阐明高温胁迫对谷物灌浆期代谢的影响,Yamakawa 等^[7]利用包含 21 938 个基因的水稻芯片研究了水稻灌浆期的基因表达谱,发现淀粉合成相关基因,如淀粉粒束淀粉合成酶、分支酶和胞质丙酮酸、正磷酸双激酶基因在热胁迫下下调表达,而 α 淀粉酶和热休克蛋白(Hsp)上调表达。

Qin 等^[8]利用基因芯片研究耐热性不同的小麦苗期叶片在高温处理下的基因表达谱,共鉴定了 6 560 个热胁迫响应探针,这些探针所编码的基因不仅包含热激蛋白和热激转录因子,还包括其他转录因子、植物激素代谢与信号转导相关基因、RNA 代谢、钙信号、核糖核酸体蛋白以及其他非生物胁迫相关基因,其中 313 个探针在耐热基因型和热敏感基因型间存在响应差异。Larkindale 等^[9]利用基因芯片研究了拟南芥在直接高温胁迫及 2 种不同高温锻炼过程的基因表达谱,结果表明,在高温胁迫中,分子伴侣蛋白剧烈上调、RNA 翻译、转录的抑制都可能与植物的耐热性相关。为鉴定对植物获得性耐热起作用的基因,分析了经热锻炼处理中特异响应的 57 个上调基因和 69 个下调基因,其中上调基因主要包括转录因子(HsfA3 和 DREB2B)、胁迫相关蛋白(热激

蛋白 Hsp70、低温胁迫耐性相关蛋白 kin1/ COR6.6 和 USP)及能量代谢相关基因,下调基因主要为生物胁迫相关基因。此外,通过分析与植物耐热性相关基因启动子区域的顺式作用元件,鉴定了一些可能参与这些基因表达模式相关的基序,上调基因的元件中主要包括 HSE、site II 基序、DRE 和 ABRE,下调基因的元件主要是 W-box 基序。王曼玲等^[10]利用 Affymetrix 公司开发的水稻全基因组芯片分析了培矮 64S 在孕穗期和抽穗开花期高温胁迫下的叶片基因表达谱,并发掘了一些高温诱导表达基因。

笔者最近利用包含 57 194 个探针的水稻全基因组芯片对耐热亲本特青及其以特青为轮回亲本的 1 个热敏感野生稻渗入系在苗期高温处理后的基因表达谱进行分析,利用荧光实时定量 PCR 对野生稻染色体片段渗入区域内的部分基因表达谱进行了验证。结合 QTL 初定位结果,利用生物信息学方法,对野生稻染色体片段渗入区域内的差异表达基因进行分析和验证,筛选出 4 个与水稻苗期耐热相关的基因(待发表)。

1.2 利用基因芯片研究植物在低温胁迫下的基因表达

植物在低温胁迫下许多基因的表达会发生变化,低温诱导蛋白表达的变化主要发生在转录水平上^[11-13]。基于基因芯片分析拟南芥转录组的研究表明,随着低温胁迫时间从 24 h 增加到 24 d,分别有 4% 和 20% 的基因受低温胁迫的调控^[5]。Seki 等^[14]利用低温和干旱共同胁迫下的 cDNA 文库制备的 cDNA 微阵列分析低温胁迫响应基因,结果表明共有 19 个 cDNA 探针受到低温的诱导表达,其中 10 个基因在以前的的研究中没有报道过,11 个基因属于与低温胁迫诱导相关的 DREB1A 因子。Winfield 等^[15]利用包含 62 000 个寡核苷酸探针,涵盖 55 000 个基因的小麦芯片研究 3 个小麦品种在低温处理下的全基因组表达谱,共有 3 113 个探针对应的转录本至少在 1 个品种中的转录水平发生 2 倍以上的变化(上调的 1 711 个,下调的 1 402 个),但仅有 394 个转录本在 3 个品种中同时上调或下调表达,推测这些可能是植物响应低温胁迫最基础的基因,而另外

217 个基因在其中 1 个春小麦品种的表达模式不同于 2 个冬小麦品种, 推测这些基因可能是决定小麦耐冷性差异的基因。低温驯化是提高植物对低温胁迫抗性的重要现象, 已有研究^[12]表明, 低温驯化过程与 CBF 转录因子的活化诱导有关。Fowler 等^[16]利用包含 8 000 个探针的基因芯片在转录组水平研究了拟南芥对低温的胁迫响应, 发现 306 个与低温胁迫相关的基因, 其中有 218 个为上调表达基因, 88 个(27%)为下调表达基因。分析表明在这些低温胁迫相关基因中, 有 12%属于 CBF 基因家族, 另外有 28%的基因不受 CBF 因子的调控, 这其中包括 15 个已知或推测的转录因子。

Fujino 等^[17]利用高代回交导入系定位到 1 个控制水稻低温发芽势的主效 QTL, 并利用 44K 水稻基因芯片分析了发芽势低的亲本及 1 个该位点具有低温下强发芽势功能等位基因的近等基因系的基因表达谱, 结果表明, 共有 4 587 个基因的表达水平在这 2 个材料之间有显著差异, 大部分差异基因可能与种子萌发过程本身相关, 其中 29 个基因位于低温胁迫发芽势主效 QTL 的定位区间, 推测这些基因可能参与了水稻低温胁迫的响应过程。徐孟亮等^[18]采用包含 51 279 个水稻转录本的 Affymetrix 60K 水稻基因芯片, 系统分析了低温、高温和干旱等多种逆境胁迫下水稻培矮 64S 的苗期、孕穗期、抽穗开花期叶片和穗中全基因组的转录水平, 筛选到 1 个类糖基转移酶基因 *OsCrGtl*, 该基因在不同生育期、不同组织器官中对低温都有响应且显著上调, 而且在其启动子区域包含一些逆境响应相关的顺式作用元件, 尤其是与低温响应相关的元件 LTR 及脱落酸胁迫响应元件 ABR。

2 利用基因芯片研究植物在干旱胁迫下的基因表达

Seki 等^[19]利用包含 7 000 个拟南芥全长 cDNA 的芯片分析了在干旱、低温、盐胁迫和 ABA 处理下的信号传导途径, 检测到分别有 299、54、213 和 245 个基因受到干旱、低温、高盐和 ABA 的诱导。在受干旱诱导的这些基因中, 有一半以上同时还受到盐和 ABA 处理的诱导, 认为植物在 ABA 处

理、干旱和盐胁迫环境中有很多交叉的信号传导途径, 并形成一个复杂的信号网络系统来抵御逆境胁迫对自身的伤害。Rabbani 等^[20]采用包含 1 700 个探针的水稻 cDNA 基因芯片研究了不同逆境条件下的基因表达, 并用 Northern 杂交对逆境胁迫响应候选基因进行验证, 发现 73 个胁迫诱导基因。分析还表明, 大约有 40%的干旱胁迫或者高盐胁迫诱导的基因同时也受到低温胁迫的诱导, 而 98%以上的盐胁迫诱导基因和所有的 ABA 诱导基因都同时受到干旱的诱导, 这说明在干旱和高盐、干旱和 ABA 之间存在共同的调控系统或者重要的结点, 而干旱和低温、低温和 ABA 之间的应答途径的相关性相对要弱一些。总的来看, 干旱胁迫响应的调控网络比较复杂, 不同逆境胁迫之间存在共同的应答网络。植物生长素 ABA 在植物应答包括干旱在内的多种非生物逆境中起着非常重要的作用, 许多研究表明, ABA 的累积是控制下游基因响应逆境胁迫的关键因子。Huang 等^[21]利用寡核苷酸芯片分析了干旱条件下拟南芥全基因组表达谱, 共有 1 969 个基因受到干旱的诱导, 这些干旱诱导基因的表达量大多数在复水 3 h 后恢复到原来正常的水平, 其中约有 2/3 的干旱响应基因(1 310 个)受 ABA 或 ABA 类似物 PBI425 的调控, 其余的基因也多数受到 ABA 信号传导的影响。

Ozturk 等^[22]利用 cDNA 芯片分别研究了大麦在干旱和盐胁迫下的基因表达, 在干旱胁迫下共有 15%的转录本的表达发生了显著变化, 其中上调表达的转录本主要包括茉莉酸反应相关基因、类金属硫蛋白、晚期胚胎富集蛋白和 ABA 反应蛋白等, 下调的转录本主要为光合作用功能相关基因。马延臣等^[23]利用 Affymetrix 水稻 60K 芯片分析了 PEG 模拟干旱下 2 个不同耐旱性水稻品种根系对 PEG 毒害响应的转录本表达变化, 共发现 27 个对 PEG 毒害响应的转录本, 其中 10 个表现为上调表达, 17 个表现为下调表达, 这 17 个下调表达基因包括 5 个功能为水解酶相关转录本、3 个编码蛋白酶的转录本及 9 个功能未知基因, 在以前研究中没有被报道过。Bray^[24]比较了 3 个利用基因芯片研究拟南芥干旱胁迫响应基因的结果, 只有 27 个基因受干旱

胁迫的诱导,这些基因按其功能可以分为代谢、转运、信号传输、转录、亲水蛋白和功能未知 6 类。造成这些研究结果差异较大的原因可能是不同的基因芯片包含的基因存在差异,另外不同试验中植株生长和胁迫处理的条件也存在一定的差异。

3 利用基因芯片研究植物在高盐胁迫下的基因表达

Jiang 等^[25]采用包含 23 686 个基因的拟南芥芯片研究了 150 mmol/L NaCl 处理下植株根系的基因表达情况,分别检测到 2 433 和 2 774 个基因受到盐胁迫的诱导和抑制,这些基因包括以往研究中被认为与逆境胁迫有关的一些基因及转运子家族、信号分子、碳水化合物活性酶、转录因子等基因。该研究有助于进一步完善植物耐盐的调控网络。朱素琴等^[26]利用水稻表达谱芯片,分析了水稻在响应高盐、低温胁迫下转录因子的表达特征,筛选出 491 个差异表达的转录因子基因,分别属于 56 个转录因子家族。其中 17 个转录因子在高盐低温处理后表达均显著上调,4 个转录因子在高盐低温下表达均显著下调,9 个转录因子经高盐、低温处理后表达水平向相反方向变化,说明一些转录因子仅参与某一特定环境胁迫反应的调控,而部分转录因子既能调控高盐逆境,也能参与低温胁迫响应,表明植物逆境的转录调控网络具有特异性和交叉性。

对典型的耐盐和盐敏感品种,尤其是只有少数基因存在差异的材料进行近等基因系的分析,能较好地阐明植物的耐盐机理。Chao 等^[27]采用包含 9 000 个水稻基因的 cDNA 微阵列分析了耐盐品种 Nona 在盐处理后幼苗的基因表达情况,共检测到 486 个盐胁迫响应相关基因。多数转录因子在盐胁迫的初期就受到诱导,一些编码解毒作用、保护剂和转运相关蛋白的转录本在盐胁迫下表达量明显增加,这可能是水稻品种 Nona 耐盐的重要原因,而光合作用相关基因的表达受到抑制并导致碳水化合物代谢发生改变。比较还发现,Nona 中的许多盐胁迫响应基因的表达模式与盐敏感品种 IR28 不一样。Walia 等^[28]就利用 Affimetrix 水稻芯片从全基因组水平研究了盐敏感品种 IR29 及其与耐盐品种杂交

形成的耐盐重组自交系 FL478 营养生长期在盐胁迫下的基因表达差异,发现大量与类黄酮合成途径有关的基因在 IR29 中被诱导表达,但在 FL478 中没有表达,而细胞壁相关基因在 2 个材料中都有较高的表达。

4 逆境胁迫响应相关基因在植物抗逆上的应用

植物芯片尤其是拟南芥和水稻全基因组芯片的出现和利用,大大促进了对植物逆境诱导基因的表达谱分析、逆境基因的分离和逆境条件下信号传导途径的研究。基于基因芯片的基因表达谱分析是发掘逆境响应相关基因的有效方法。对逆境诱导相关基因的功能分析也有助于探明逆境响应的信号传导途径。近年来,采用基因芯片在拟南芥和水稻等高等植物中已鉴定出大量与逆境诱导相关的基因,通过基因工程手段,充分利用这些逆境响应的关键基因是改良作物抗逆性的重要方法之一。一些编码功能蛋白的逆境胁迫响应相关基因已成功用于植物抗逆性的改良^[29-30]。目前,用来改良作物抗逆性的逆境相关基因的编码蛋白主要包括:渗透保护代谢蛋白,如肌醇半乳糖苷、脯氨酸、多聚胺^[31-33];保护蛋白,如胚发育后期丰度蛋白、活性氧清除蛋白^[34-35];转录子及 ABA 代谢相关蛋白,如 ABA 生物合成关键酶基因(NCED)^[36-37]。

一些正调控逆境响应相关基因的转录激活子,如 DREB1/CBF,已被用于抗逆转基因植株的培育^[38-39]。目前,DREB1/CBF 基因已被成功应用于改良油菜、菊花、水稻、花生、马铃薯等不同物种的非生物胁迫抗性。

5 展 望

大量研究表明,植物抗逆的机制非常复杂,也并非由单个或者几个基因控制,而是大量基因相互作用形成的调控网络。基因芯片从整个转录水平入手,能够揭示大量基因的表达情况,完善植物逆境胁迫的调控网络,发掘逆境胁迫响应的关键基因。

非编码 RNA 如小 RNA、选择性剪接和染色体重塑等在非生物胁迫中具有重要作用^[40]。最近研究

表明,全基因组的 tiling array 是发掘逆境胁迫相关的非编码 RNA、分析选择性剪接和染色质重塑等的重要工具^[41]。新一代的测序技术有助于鉴定大量与非生物胁迫相关的小 RNA^[42]。运用基于生物信息学方法的比较基因组学能更好地研究这些非编码 RNA,如小 RNA 的功能和生物学意义。

近年来,代谢组学研究已成为研究植物逆境胁迫下代谢变化的热点。通过代谢谱分析能够鉴别大量与逆境相关的代谢产物的增加或者减少。结合逆境条件下转录组和代谢组等数据有助于鉴别出代谢途径相关的关键基因,发现逆境胁迫响应的新途径,阐明植物对逆境胁迫响应的抗性机制。随着基因组学、代谢组学、蛋白组学和生物信息学等学科的发展和结合,利用基因工程手段改良植物抗逆性的愿望将得以实现。

参考文献:

- [1] Isola N R ,Arundhati A ,Lakshmi T V R ,et al .Gene- chips in plant genetics[J] . Plant Tissue Cult , 2002 , 12(2) : 195-213 .
- [2] 李勇,马峙英.基因芯片技术及其应用[J].河北农业大学学报,2002,25(z1):8-10.
- [3] Dey M M , Upadhaya H K . Yield Loss Due to Drought , Cold and Submergence in Asia ,Progress and Priorities[M]. Oxford : Oxford University Press , 1996 : 231-242 .
- [4] Zhu J K . Salt and drought stress signal transduction in plants[J] . Annu Rev Plant Biol , 2002 , 53 : 247-273 .
- [5] Lee B H , Henderson D A , Zhu J K . The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1[J] . Plant Cell , 2005 , 17 : 3155-3175 .
- [6] Rizhsky L , Liang H , Mittler R . The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco[J] . Plant physiology , 2002 , 130(3) : 1143-1151 .
- [7] Yamakawa H , Hirose T , Kuroda M , et al . Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray[J] . Plant Physiol , 2007 , 144(1) : 258-277 .
- [8] Qin D D , Wu X Y , Peng H R , et al . Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array[J] . BMC Genomics , 2008 , 9 : 1-19 .
- [9] Larkindale J , Vierling E . Core genome responses involved in acclimation to high temperature[J] . Plant Physiol , 2008 , 146 : 748-761 .
- [10] 王曼玲, Rocho P, 李落叶.应用基因表达芯片分析水稻高温胁迫相关基因[J].农业生物技术学报,2009,17(10):92-97.
- [11] Guy C L , Niemi K J , Branbl R . Altered gene expression during cold acclimation of spinach[J] . Proc Natl Acad Sci USA , 1985 , 82 : 3673-3677 .
- [12] Thomashow M F . Plant cold acclimation , freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J] . Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol , 1999 , 50 : 571-599 .
- [13] 沈漫,王明麻.植物抗寒机理研究进展[J].植物学报,1997,14(2):1-8.
- [14] Seki M , Ishida J , Fujita M , et al . Monitoring the expression profile of ca . 7000 *Arabidopsis* genes under drought , cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J] . The Plant Journal , 2002 , 31 : 279-292 .
- [15] Winfield M O , Lu C G , Wilson L D , et al . Plant responses to cold : Transcriptome analysis of wheat[J]. Plant Bio Jour USA , 2010 , 8(7) : 749-771 .
- [16] Fowler S , Thomashow M F . *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway[J] . Plant Cell , 2002 , 14(8) : 1675-1690 .
- [17] Fujino K , Matsuda Y . Genome-wide analysis of genes targeted by *qLTG3-1* controlling low-temperature germinability in rice[J] . Plant Mol Biol , 2010 , 72 : 137-152 .
- [18] 徐孟亮,李落叶,陈荣军,等.一个新的水稻低温应答类糖基转移酶基因(*OsCrGtl*)的表达分析与克隆[J].农业生物技术学报,2010,18(4):663-669.
- [19] Seki M , Narusaka M , Abe H , et al . Monitoring the expression pattern of 1 300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray[J]. Plant Cell , 2001 , 13(1) : 1-72 .
- [20] Rabbani Maruyama K , Abe H , Khan M A , et al . Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold , drought and high-salinity stress , and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses[J] . Plant Physiol , 2003 , 133 : 1755-1767 .
- [21] Huang D Q , Wu W R , Abrams S R , et al . The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors[J] . J Exp Bot , 2008 , 59 : 2991-3007 .

- [22] Ozturk Z N , Talamel V , Deyholos M , et al . Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley[J] . *Plant Mol Biol* , 2002 , 48(5/6) : 551-573 .
- [23] 马延臣, 陈荣军, 余蓉蓉, 等 . 在 PEG 模拟干旱下水稻根系几个疑似 PEG 毒害响应转录本研究[J] . *基因组学与遗传学* , 2010 , 8(6) : 1090-1094 .
- [24] Bray E A . Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*[J] . *J Exp Bot* , 2005 , 139 : 822-835 .
- [25] Jiang Y Q , Deyholos M K . Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes[J] . *BMC Plant Biology* , 2006 , 47 : 6-25 .
- [26] 朱素琴, 季本华, 陈名尉, 等 . 高盐低温胁迫下水稻转录因子基因表达谱分析[J] . *科技通报* , 2010 , 26(6) : 844-851 .
- [27] Chao D Y , Luo Y H , Shi M , et al . Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis[J] . *Cell Research* , 2005 , 15(10) : 796-810 .
- [28] Walia H , Wilson C , Condamine P , et al . Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage[J] . *Plant Physiol* , 2005 , 139 : 822-835 .
- [29] Umezawa T , Fujita M , Fujita Y , et al . Engineering drought tolerance in plants : Discovering and tailoring genes to unlock the future[J] . *Curr Opin Biotechnol* , 2006 , 17 : 113-122 .
- [30] Valliyodan B , Nguyen H T . Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants[J] . *Curr Opin Plant Biol* , 2006 , 9(2) : 189-195 .
- [31] Taji T , Ohsumi C , Iuchi S , et al . Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J] . *Plant J* , 2002 , 29 : 417-426 .
- [32] Kasukabe Y , He L , Nada K , et al . Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and upregulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J] . *Plant Cell Physiol* , 2004 , 45 : 712-722 .
- [33] Yamada M , Morishita H , Urano K , et al . Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress[J] . *J Exp Bot* , 2005 , 56 : 1975-1981 .
- [34] Chandra Babu R , Zhang J , Blum A , et al . HVA1 , a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L .) via cell membrane protection[J] . *Plant Sci* , 2004 , 166 : 855-862 .
- [35] De Block M , Verduyn C , Brouwer D D , et al . Poly (ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis , cell death and stress tolerance[J] . *Plant J* , 2005 , 41 : 95-106 .
- [36] Shi H , Lee B H , Wu S J , et al . Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J] . *Nat Biotechnol* , 2003 , 21 : 81-85 .
- [37] Iuchi S , Kobayashi M , Taji T , et al . Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase , a key enzyme in abscisic acid biosynthesis , in *Arabidopsis*[J] . *Plant J* , 2001 , 27 : 325-333 .
- [38] Liu Q , Kasuga M , Sakuma Y , et al . The transcription factors , DREB1 and DREB2 , with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression , respectively , in *Arabidopsis*[J] . *Plant Cell* , 1998 , 10 : 1391-1406 .
- [39] Kasuga M , Liu Q , Miura S , et al . Improving plant drought , salt , and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J] . *Nat Biotechnol* , 1999 , 17 : 287-291 .
- [40] Liu J , Zhu J K . A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance[J] . *Science* , 1998 , 280 : 1943-1945 .
- [41] Matsui A , Ishida J , Morosawa T , et al . *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought , cold , high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array[J] . *Plant Cell Physiol* , 2008 , 49 : 1135-1149 .
- [42] Margulies M , Egholm M , Altman W E , et al . Genome sequencing in microfabricated high density picolitre reactors[J] . *Nature* , 2005 , 437 : 376-380 .

责任编辑: 罗慧敏