

研究报告

Research Report

干旱胁迫下大豆相关基因的表达特性

王伟威^{1,2} 林浩¹ 唐晓飞¹ 魏崃¹ 董兴月¹ 吴广锡¹ 刘丽君^{1*}

1 黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨, 150086; 2 黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所, 哈尔滨, 150086

*通讯作者, nkyssbd@126.com

摘要 干旱已成为限制大豆产量提高的突出问题。本研究以 12 个不同生态类型的大豆品种为试验材料, 研究水分胁迫条件下不同时段四个抗旱相关基因的表达特性, 揭示旱诱导条件下的基因表达与调控。研究结果表明: ①大豆在旱诱导条件下, 大豆叶片中 *MAPK2* 基因表达量下降, 抗旱品种 *MAPK2* 基因的表达量高于对照, 旱诱导的中后期, 品种间差异较大, 黑农 44 和丰收 24 表现了明显的抗旱性; ②大豆在旱诱导条件下, *GST* 基因活性明显增加, 提高了大豆清除活性氧的能力, 各品种叶片中 *GST* 基因相对表达量明显提高, 其中合丰 55、绥农 28、黑农 59、丰收 24 的表达量明显高于对照; ③大豆在旱诱导条件下, 内源热休克蛋白表达量均比自身 CK 有较大增高, 但品种间存在差异。到干旱处理后期, 与对照品种黑农 44 相比, 热休克蛋白表达量高的品种有哈 5489、黑农 56、绥农 28、黑农 59、黑农 50, 其余品种表达量相对较低; ④干旱对大豆中类似钙调素结构式的蛋白激酶的表达有一定的影响, 旱诱导初期, 参试品种 *CDPK* 基因较自身 CK 有小幅超量表达, 胁迫中期, 该基因表达与正常处理表现出明显的超量表达, 表达量最高的品种主要有哈 5489、绥农 28、黑农 56、黑农 59。研究结果证实: 旱诱导条件下, 大豆的抵御干旱胁迫的表现是由多个相关基因启动高表达, 同时调解不同代谢途径来适应干旱胁迫。

关键词 干旱胁迫, 大豆, 抗逆基因, 表达

Soybean Drought Resistance Related Genes Expression Characteristics Under Drought

Wang Weiwei^{1,2} Lin Hao¹ Tang Xiaofei¹ Wei Lai¹ Dong Xingyue¹ Wu Guangxi¹ Liu Lijun^{1*}

1 Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Haerbin, 150086; 2 Agricultural Products Quality and Safety Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Haerbin, 150086

* Corresponding author, nkyssbd@126.com

DOI: 10.13271/j.mpb.012.000903

Abstract Because of global warming, drought has become one of the most important factors limiting soybean production. With 12 soybean cultivars from different ecotypes as materials, we studied four drought resistance related genes expression characteristics on four different drought induction phases. And the results showed that: ① The expression of gene *MAPK2* in leaves declined, and the expression of gene *MAPK2* in drought resistance cultivar was higher than that in contrast. At the middle and later phases of drought induction, the drought resistances among soybean cultivars were significant different, such as Heinong44 and Fengshou24 showed drought resistance. ② The activity of gene *GST-Vsa* highly rose, which increased the ability of soybean to eliminate active oxygen. The relatively expression of gene *GST-Vsa* in leaves from different cultivars enhanced, and which from Hefeng55, Suinong28, Heinong59 and Fengshou24 were higher than that in contrast. ③ Endogenous heat shock protein expression is much higher after drought induction than control, but differs among different

收稿日期: 2013-11-25

接受日期: 2014-01-03

网络出版日期: 2014-08-27

URL: <http://biopublisher.cn/index.php/mpbopa/article/view/1657>

基金项目: 本研究由国家的抗逆转基因重大专项(2011ZX08004-002)、国际合作项目(2011DFR30840)、留学基金(LC2012 引/C0601)和大豆产业技术体系项目共同资助

cultivars. In the later stage of drought induction, the heat shock protein gene expressed higher in Ha5489, Heinong56, Suinong28, Heinong59 and Heinong50 compared with contrast cultivar Heinong44, but lower in other cultivars. ④ Drought had an influence on the expression of Calcium-Dependent Protein Kinase in soybean. Compared to under normal environment, the CDPK gene had little excess expression in the early drought stage, and apparently excess expression in the middle stage. Cultivars Ha5489, Suinon28, Heinong56 and Heinong59 had the highest expression. The study results confirmed that: under drought, multiple genes enabled high expression, and mediated diverse metabolic pathways to make soybean resistant to drought.

Keywords Drought Stress, Soybean, Resistance Genes, Expression

随着全球气候变暖,对需水性作物如大豆等的增产带来了一定的难度。随着大豆主产区干旱或半干旱地区的面积在逐年扩大,提高大豆品种的抗旱能力是摆在每一位育种专家面前的主要难题。因此,挖掘大豆本身的抗逆潜力,改良大豆抗旱性,选育抗旱品种是大豆育种研究的首要任务(陈红等, 2010; 张剑侠等, 2010, 黑龙江气象, 27(1): 20-22)。目前研究人员已从野生大豆和高抗旱栽培豆中克隆了一些抗旱基因,但单一基因的转化未能实现品种抗旱性的改变。品种的抗旱性是由多个基因调控的,大豆的结荚-鼓粒期受干旱影响很大,常因干旱导致绝产(刘丽君等, 2011)。因此,研究旱诱导条件下大豆基因表达的特点,成为植物抗逆分子生物学的研究热点和抗逆基因工程重要的研究方向(陈善福和舒庆共, 1999; 郭卫东等, 1999; 沈元月等, 2002; 陈建中等, 2009; 唐益苗等, 2009)。部分研究人员对抗旱相关转录因子能够调节功能基因的表达和信号转导以及植物应答基因的表达调控进行了研究,为植物非生物胁迫研究提供了技术支持,也为大豆的抗旱性研究提供了途径和手段(Ito et al., 2006; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Lu et al., 2009)。

本研究选取不同调控途径的四个关键内源基因,分别为 *MAPK* 基因、*GST-Vsa* 基因、*Gm-Hsf1* 基因和 *CDPK* 基因。大豆中促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK),它接受外界刺激信号,并将信号传入细胞内,影响特定基因的表达,从而在大豆生长、发育、分化和调整等过程起着重要作用。大豆中的谷胱甘肽转移酶(glutathione transferase, GST),是一类多功能的细胞脱毒酶,该酶催化清除植物体内的自由基,是植物防止活性氧损伤的主要基因,其活性依赖于还原态的谷胱甘肽,干旱胁迫下 GST 活性明显增加,提高了大豆清除活性氧的能力,在大豆的抗氧化过程中起重要作用。*Gm-Hsf1* 基因是大豆的热休克蛋白基因,对高温和干旱胁迫有一定调解能力,高温胁迫下,大豆体内的

Gm-Hsf1 基因表达量增加,缓解高温对植物细胞的损伤。钙依赖蛋白激酶(calcium dependent protein kinase, CDPK)是大豆中类似钙调素结构域的蛋白激酶,它与胁迫反应密切相关,干旱和盐胁迫能够增强 CDPK 调控基因的表达,CDPK 是植物产生抗病反应的必要条件之一,病原菌侵染后发生超敏反应,产生坏死细胞阻止病原的进一步扩展。其活性的提高,是触发细胞活力坏死的原初反应,CDPK 还参与植物激素信号转导和光周期的调节及细胞肌动张力的植物营养代谢的调节。

本研究利用 Real Time PCR 方法,研究不同时段水分胁迫下 12 个不同抗旱性的大豆品种中内源调控关键基因的表达差异,从分子水平上推断和揭示大豆抗旱性机制。

1 结果与分析

1.1 干旱胁迫下 *MAPK2* 基因的表达特性

由结果可以看出,水分胁迫初期参试品种间 MAPK 调控基因 *MAPK2* 表达量呈现出明显差异。水分胁迫组,其基因表达量较对照处理多数呈下降趋势,由于品种间对水分胁迫耐性不同,*MAPK2* 基因的表达量受到了调控。黑农 44、黑农 50、合丰 55 和 M2 四个品种在旱诱导初期,基因表达量明显增加为正调控,表现出基因表达量高于同组对照处理,而且,黑农 50、M2、黑农 44 和合丰 55 干旱胁迫指数分别 4.40、4.39、2.13 和 1.47,只有合丰 55 低于对照品种黑农 44。

由图 1 所示,水分胁迫中期,黑农 44 和丰收 24 基因表达量高于自身 CK,其余各参试品种表达量均低于自身 CK。但整体上来看,与对照品种黑农 44 相比,黑农 56、黑农 59 和哈 5489 品种的 *MAPK2* 基因表达量较高,表现在正常水分和水分胁迫下均较高,在提高品种抗旱性方面起到了一定作用,可认为这三个品种为 *MAPK2* 基因高表达的品种,且在胁迫后

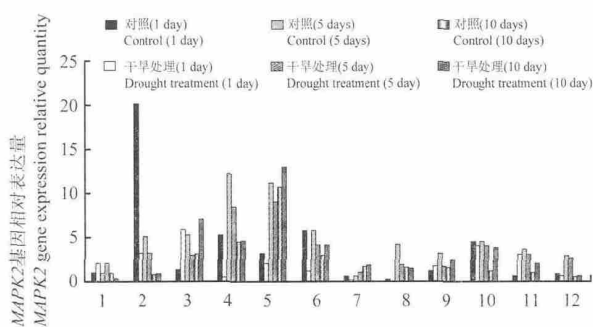


图1 不同大豆品种叶片中的 *MAPK2* 基因在干旱胁迫下的表达量比较

注: 1: 黑农 44; 2: 黑农 46; 3: 黑农 50; 4: 黑农 56; 5: 黑农 59; 6: 哈 5489; 7: 丰收 24; 8: 绥农 28; 9: 合丰 55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

Figure 1 *MAPK2* gene expression in leaves of different cultivars under drought stress

Note: 1: Heinong44; 2: Heinong46; 3: Heinong50; 4: Heinong56; 5: Heinong59; 6: Ha5489; 7: Fengshou24; 8: Suinong28; 9: Hefeng55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

期,也有类似的表现,黑农 56、黑农 59、哈 5489 和黑农 50 在干旱胁迫下该基因的表达呈现出高于自身正常处理的品种。旱诱导 *MAPK2* 基因的表达,在这几个品种中表现明显。

1.2 干旱胁迫下大豆内源 *GST-Vsa* 基因的表达特性

实验发现,干旱胁迫的 GST 调控基因 *GST-Vsa* 的表达量增加但参试品种间存在着差异(图 2)。

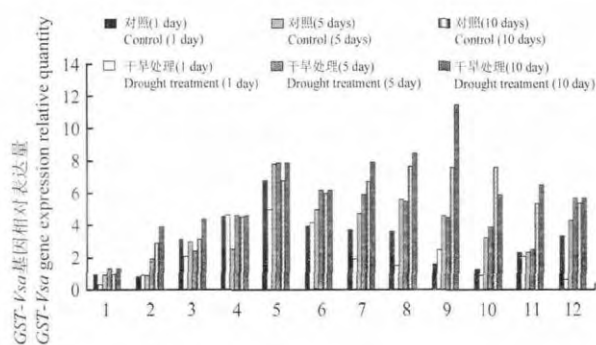


图2 不同大豆品种叶片中的 *GST-Vsa* 基因在干旱胁迫下的表达量比较

注: 1: 黑农 44; 2: 黑农 46; 3: 黑农 50; 4: 黑农 56; 5: 黑农 59; 6: 哈 5489; 7: 丰收 24; 8: 绥农 28; 9: 合丰 55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

Figure 2 *GST-Vsa* gene expression in leaves of different cultivars under drought stress

Note: 1: Heinong44; 2: Heinong46; 3: Heinong50; 4: Heinong56; 5: Heinong59; 6: Ha5489; 7: Fengshou24; 8: Suinong28; 9: Hefeng55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

干旱胁迫初期,哈 5489、黑农 56、合丰 55 和黑农 46 在干旱胁迫下 *GST-Vsa* 基因较正常水分下有小幅超量表达,其余品种都下调表达。与对照品种黑农 44 相比较,黑农 59、黑农 56 和哈 5489 品种的 *GST-Vsa* 基因相对表达量较高,黑农 50、丰收 24、M2 和合丰 55 表达量居中,其余品种相对表达量较低。

干旱胁迫中期,各品种中 *GST-Vsa* 基因相对表达量均较初期有所提高,这说明该基因的表达不仅与品种有关,还与水分胁迫有关。在干旱胁迫中期,除黑农 59、绥农 28 和合丰 55 外,其余品种在干旱胁迫下 *GST-Vsa* 基因较自身对照有超量表达。与对照品种黑农 44 相比较,黑农 59、哈 5489、丰收 24、绥农 28 和 M3 该基因表达量较高,合丰 55、黑农 56 和 M1 表达量居中,其余品种表达量较低。

干旱胁迫后期,各参试品种 *GST-Vsa* 基因相对表达量均较正常水分条件下有超量表达。与对照品种黑农 44 相比,*GST-Vsa* 基因相对表达量均增高,合丰 55、绥农 28、黑农 59 和丰收 24 该基因相对表达量较高,哈 5489、M2 和 M3 相对表达量居中,其余品种相对表达量较低。

1.3 干旱胁迫下大豆内源热体克蛋白 *Gm-Hsf1* 基因的表达特性

干旱胁迫初期,黑农 50 和丰收 24 在干旱胁迫下体内 *Gm-Hsf1* 基因较正常水分处理下有小幅超量表达外,其余参试品种 *Gm-Hsf1* 基因表达量低于自身对照(图 3)。与对照品种黑农 44 相比较,哈 5489、

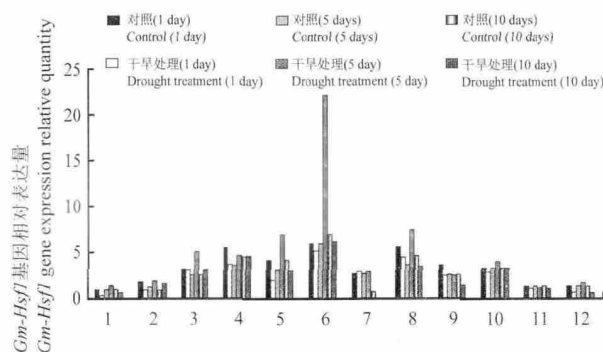


图3 不同大豆品种叶片中的 *Gm-Hsf1* 基因在干旱胁迫下的表达量比较

注: 1: 黑农 44; 2: 黑农 46; 3: 黑农 50; 4: 黑农 56; 5: 黑农 59; 6: 哈 5489; 7: 丰收 24; 8: 绥农 28; 9: 合丰 55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

Figure 3 *Gm-Hsf1* gene expression in leaves of different cultivars under drought stress

Note: 1: Heinong44; 2: Heinong46; 3: Heinong50; 4: Heinong56; 5: Heinong59; 6: Ha5489; 7: Fengshou24; 8: Suinong28; 9: Hefeng55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

黑农 56、绥农 28 和黑农 59 中 *Gm-Hsf1* 基因相对表达量较高,黑农 50、丰收 24、M1 和合丰 55 表达量居中,其余品种相对表达量较低。

干旱处理中期,合丰 55 和 M2 品种的内源 *Gm-Hsf1* 基因较自身对照的表达量均较初期有所提高,其中哈 5489 在干旱条件下该基因表达与对照相比有明显的超量表达,除该品种以外,绥农 28、黑农 59、黑农 56 也表现出不同程度上的超量表达(图 3)。其余各品种与对照品种黑农 44 相比有一定的超表达,但程度较轻。

水分胁迫后期,水分胁迫下各参试品种 *Gm-Hsf1* 基因相对表达量均较自身对照低(图 3)。各个品种与对照品种黑农 44 相比,*Gm-Hsf1* 基因相对表达量高的品种主要是:哈 5489、绥农 28、黑农 56、黑农 59;黑农 50、M1、合丰 55 相对表达量居中,其余品种相对表达量较低。

1.4 干旱胁迫下大豆 CDPK 基因的表达特性

干旱处理初期,黑农 44、黑农 50、丰收 24、绥农 28 和合丰 50 在旱诱导下 *CDPK* 基因表达量低于对照,其它参试品种在干旱胁迫下 *CDPK* 基因较对照有小幅超量表达(图 4)。与对照品种黑农 44 相比较,M3 品种中该基因相对表达量较高;黑农 56、黑农 59 和哈 5489 相对表达量低于对照品种黑农 44,其余各品种 *CDPK* 基因相对表达量居中。

干旱处理中期,旱胁迫下品种 *CDPK* 基因相对

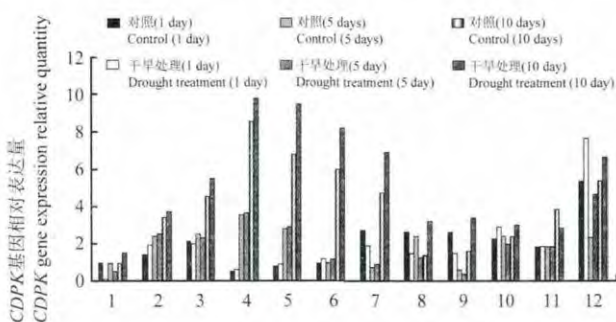


图 4 不同大豆品种叶片中的 *CDPK* 基因在干旱胁迫下的表达量比较

注: 1: 黑农 44; 2: 黑农 46; 3: 黑农 50; 4: 黑农 56; 5: 黑农 59; 6: 哈 5489; 7: 丰收 24; 8: 绥农 28; 9: 合丰 55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

Figure 4 *CDPK* gene expression in leaves of different cultivars under drought stress

Note: 1: Heinnong44; 2: Heinnong46; 3: Heinnong50; 4: Heinnong56; 5: Heinnong59; 6: Ha5489; 7: Fengshou24; 8: Suinong28; 9: Hefeng55; 10: M1; 11: M2; 12: M3

表达量与正常水分条件下的表达量差异不显著,其中 M3、黑农 56、黑农 59 在干旱条件下该基因表达与正常处理表现出明显的超量表达,除这几个品种以外,其余各品种与对照品种黑农 44 相比有一定的超表达,品种间该基因表达量上没有较大差别。

干旱处理后期,旱处理下除 M2 以外,各参试品种 *CDPK* 基因相对表达量均高于自身对照。参试品种与对照品种黑农 44 相比,*CDPK* 基因相对表达量高的品种主要是:哈 5489、绥农 28、黑农 56、黑农 59;黑农 50、M1。合丰 55 相对表达量居中,其余品种相对表达量较低。

2 讨论

结荚-鼓粒期的干旱是影响大豆产量的重要因素,研究这一时期抗旱相关基因的表达,能够揭示抗旱基因表达和调控作用,为优异基因挖掘和克隆提供基础数据。

从研究结果看到:旱诱导条件下在大豆的结荚期-鼓粒期 *MAPK2* 基因整体表达量较高,与对照品种黑农 44 相比,黑农 56、黑农 59 和哈 5489 品种的 *MAPK2* 基因表达量较高,表现在正常处理和干旱处理均较高,在提高品种抗旱性方面起到了一定作用,可以认为这三个品种为 *MAPK2* 基因高表达的品种。

在大豆的结荚期-鼓粒期旱诱导 *GST-Vsa* 基因整体表达量也较高,与对照品种黑农 44 相比,胁迫初期黑农 59、黑农 56 和哈 5489 的表达量较高;胁迫中期,黑农 59、哈 5489、丰收 24、绥农 28 和 M3 该基因表达量较高;胁迫后期,合丰 55、绥农 28、黑农 59 和丰收 24 该基因相对表达量较高。

Gm-Hsf1 基因在大豆的结荚期-鼓粒期整体表达量较低,与对照品种黑农 44 相比,胁迫初期,哈 5489、黑农 56、绥农 28 和黑农 59 该基因相对表达量较高;胁迫中期,哈 5489 在干旱条件下该基因表达与正常处理表现出明显的超量表达;胁迫后期,合丰 55、绥农 28、黑农 59 和丰收 24 该基因相对表达量较高。

CDPK 基因在大豆的结荚期-鼓粒期整体表达量较低,与对照品种黑农 44 相比较,胁迫初期,M3 品种该基因相对表达量较高;胁迫中期,M3、黑农 56 和黑农 59 在干旱条件下该基因表达与正常处理表现出明显的超量表达;胁迫后期,*CDPK* 基因相对表达量高的品种主要是:哈 5489、绥农 28、黑农 56 和黑农 59。

通过本研究结果发现,对不同类型大豆品种中

抗旱相关基因表达差异是存在的,由此也反映了品种对干旱胁迫的耐受性,为挖掘抗旱品种提供支撑。

植物适应水分胁迫的能力是受基因表达调控的,从本研究所述的4个基因在旱诱导条件下的表达可以看出,抗旱品种黑农59和丰收24,渗透调解基因的表达式高于自身对照,因此在非生物胁迫条件下,如果实现上述基因的过表达,就可提高品种的抗逆性。

由研究结果可以看出,旱诱导条件下,大豆抵御干旱胁迫的表现是由多个相关基因启动高表达,同时调解不同代谢途径来适应干旱胁迫,由此也可以看出大豆适应水分胁迫是细胞学和分子生物学共同作用的结果,提高大豆的抗旱性,应该从多基因聚合或实现多基因过表达的方法入手,才能大幅度地提高其抗旱性。

3 材料与方 法

3.1 实验材料

选用不同生态类型的大豆品种黑农44、黑农46、黑农50、黑农56、黑农59、哈5489、丰收24、绥农28、合丰55、M1、M2和M3,受体品种抗旱性可参见刘丽君等(2011)的前期工作。

3.2 实验处理

实验材料种植于塑料桶中,每个品种种12盆,每盆3株,每个品种设CK和水分胁迫处理。在大豆结荚-鼓粒期,于水分胁迫第1天,胁迫后第5天,胁迫后第10天,3次采集叶片,提取总RNA,并把RNA反转录成cDNA,获得12个品种cDNA样品。材料采用盆栽称重法,对照组正常浇水,土壤含水量保持在18%,干旱处理组土壤含水量保持9%。

调控关键基因:选择不同调控途径的4个与抗旱相关的基因,即促分裂原活化蛋白激酶基因MA-PK2、蛋白激酶CDPK、谷胱甘肽转移酶基因GST和热休克蛋白Hsf(Mizoguchi et al., 1993; 1996; 1997; Hrabak et al., 1996; Sharma and Komatsu, 2002; Ludwig et al., 2004; Novillo et al., 2004)。根据GenBank上注释基因序列,利用Primer Premier 5.0应用软件,设计引物,由上海生工合成。

3.3 大豆 RNA 提取

RNA提取采用RNAPrep Plant Kit方法, RNA浓度及纯度检测采用紫外分光光度仪检测,利用琼脂糖凝胶检测采用凝胶浓度2%,0.5XTB电泳缓冲

液150 V 30 min。利用Supermo RT Kit cDNA试剂盒合成cDNA第一链。

3.4 mRNA 的反转录

配制反应混合体积49 μL ,由A管和B管两个体系组成。其中A管包括1 μL Oligo(dT),2 μg 总RNA,并用RNase-free H₂O补足至25 μL ;B管包括5 μL 10 \times Buffer,5 μL 25 mmol/L MgCl₂,5 μL DTT(0.1 mol/L),0.5 μL RNase inhibitor(40 U/ μL),2.5 μL 10 mmol/L dNTP,并用RNase-free H₂O补足至24 μL 。

冰上混匀,与前一个反应管一起50 $^{\circ}\text{C}$ 温浴5 min后混合,加入1 μL SuperScript II,50 $^{\circ}\text{C}$ 保温50 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 保温15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.5 Real-time PCR 扩增

根据Triz01方法进行改良应用:以大豆Tublin基因为内参,目的基因及Tublin基因各设计了1对引物。引物设计应用Primer Premier 5.0软件,由Invitrogen公司合成。反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$,变性退火温度60 $^{\circ}\text{C}$,40个循环。

3.5.1 相对定量

在实时定量PCR仪中,设置看家基因为Normal,黑农44叶片cDNA为Calibrator,其他11个大豆品种的植株叶片cDNA为Unknow,重复3次,设目的基因和看家基因NTC各一个。绘制扩增曲线,溶解曲线。

3.5.2 数据分析

将相对定量实验的所有结果放在一个坐标图上,取3次重复的数据的平均值。

采用CT法($\Delta\Delta\text{CT}$)比较方法进行计算:

$$\begin{aligned} \text{相对表达量} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 2^{-(\Delta\text{CT}_{\text{样品}} - \Delta\text{CT}_{\text{对照}})} \\ &= 2^{-[(\text{CT}_{\text{样品}} - \text{CT}_{\text{内参}}) - (\text{CT}_{\text{对照}} - \text{CT}_{\text{内参}})]} \end{aligned}$$

胁迫指数=干旱条件下数值/正常条件下数值 \times 100%。

作者贡献

王伟威是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成数据分析和论文初稿的写作;林浩参与实验设计和实验执行;唐晓飞和魏崧参与实验设计,试验结果分析;董兴月和吴广锡参与部分实验的执行工作;刘丽君是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家的抗逆转基因重大专项(2011ZX08004-002)、国际合作项目(2011DFR30840)、留学基金(LC2012 引 /C0601)和大豆产业技术体系项目共同资助。感谢大豆研究所张书利、张影在实验中给予的帮助。

参考文献

- Chen H., Zhang L.J., Li W.L., Zhang J.F., and Gao Y.H., 2010, Study on risk assessment and zoning of agricultural arid disaster in Heilongjiang province, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 26(3): 245-248 (陈红, 张丽娟, 李文亮, 张金峰, 高玉宏, 2010, 黑龙江省农业干旱灾害风险评价与区划研究, *中国农学通报*, 26(3): 245-248)
- Chen J.Z., Ge S.L., and Li L., 2009, Progress of genetic engineering in crop drought tolerance mechanisms, *Hubei Nongye Kexue* (Hubei Agricultural Sciences), 48(2): 475-477 (陈建中, 葛水莲, 李磊, 2009, 作物抗旱基因工程研究进展, *湖北农业科学*, 48(2): 475-477)
- Chen S.F., and Shu Q.G., 1999, Biological mechanism of and genetic engineering for drought stress tolerance in plants, *Zhiwuxue Tongbao* (Chinese Bulletin of Botany), 16(5): 555-560 (陈善福, 舒庆共, 1999, 植物耐干旱胁迫的生物学机理及其基因工程研究进展, *植物学通报*, 16(5): 555-560)
- Guo W.D., Rao J.P., Xu Y., Li J.R., and Zheng X.Q., 1999, Construction of a plant expression vector for the drought tolerant gene, *HDCS1*, *Xibei Zhiwu Xuebao* (*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 19(3): 371-375 (郭卫东, 饶景萍, 徐炎, 李嘉瑞, 郑学勤, 1999, 抗旱基因 *HDCS1* 的植物表达载体构建, *西北植物学报*, 19(3): 371-375)
- Hrabak E.M., Dickmann L.J., Satterlee J.S., and Sussman M.R., 1996, Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 31(2): 405-412
- Ito Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2006, Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice, *Plant Cell Physiol.*, 47(1): 141-153
- Liu L.J., Lin H., Tang X.F., and Pu G.F., 2011, Drought stress influence soybean yield morphogenesis in different growth stages, *Dadou Kexue* (*Soybean Science*), 30(3): 405-412 (刘丽君, 林浩, 唐晓飞, 蒲国峰, 2011, 干旱胁迫对不同生育阶段大豆产量形态建成的影响, *大豆科学*, 30(3): 405-412)
- Lu G.J., Gao C.X., Zheng X.N., and Han B., 2009, Identification of OsZIP72 as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice, *Planta*, 229(3): 605-615
- Ludwig A.A., Romeis T., and Jones J.D., 2004, CDPK-mediated signaling pathways: specificity and cross-talk, *J. Exp. Bot.*, 55(395): 181-188
- Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada H., and Shinozaki K., 1993, ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.*, 366(3): 440-444
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., and Shinozaki K., 1996, A gene encoding mitogen activated protein kinase is induced simultaneously with genes for a mitogenactivated protein kinase and a S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(2): 756-759
- Mizoguchi T., Lchimura K., and Shinozaki K., 1997, Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinase, *Trends Biotechnol.*, 15(1): 15-19
- Nakashima K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2006, Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants, *Physiologia Plantarum*, 126(1): 62-71
- Novillo F., Alonso J.M., Ecker J.R., and Salinas J., 2004, CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(11): 3985-3990
- Sharma A., and Komatsu S., 2002, Involvement of a Ca²⁺-dependent protein kinase component downstream to the gibberellin-binding phosphoprotein, RuBisCO activase, in rice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290(2): 690-695
- Shen Y.Y., Huang C.L., Zhang X.H., and Cao M.Q., 2002, Plant drought tolerance molecular mechanism, *Zhongguo Shengtai Nongye Xuebao* (*Chinese Journal of Eco-Agriculture*), 10(1): 30-34 (沈元月, 黄丛林, 张秀海, 曹鸣庆, 2002, 植物抗旱的分子机制研究, *中国生态农业学报*, 10(1): 30-34)
- Tang Y.M., Zhao C.P., Gao S.Q., Tian L.P., Shan F.H., and Wu J.X., 2009, Advances in genes related to plant drought tolerance, *Mailei Zuowu Xuebao* (*Journal of Triticeae Crops*), 29(1): 166-173 (唐益苗, 赵昌平, 高世庆, 田立平, 单福华, 吴敬新, 2009, 植物抗旱相关基因研究进展, *麦类作物学报*, 29(1): 166-173)