

干旱胁迫下柑橘叶片基因表达谱的 cDNA-AFLP 分析

肖金平, 陈俊伟, 张慧琴, 徐红霞, 王慧亮, 谢 鸣*

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

摘 要: 为分离和鉴定柑橘干旱胁迫应答基因, 应用 cDNA-AFLP 分析技术, 以盆栽‘天草’橘橙砧砧嫁接苗为试材, 对正常灌水和不同干旱胁迫处理下叶片的基因表达谱进行分析。利用 81 对引物组合进行扩增, 共筛选获得 113 条差异表达转录衍生片段 (TDF), 其中上调表达 71 条 (63%), 下调表达 29 条 (26%), 其余 13 条 (11%) 为瞬时表达。选取 70 个差异表达 TDF 进行克隆测序, 共得到 62 个有效序列, BLAST 结果表明: 33 个 TDF 与已知功能基因具较高同源性, 功能涉及信号转导、能量代谢、离子通道和蛋白合成等, 18 个 TDF 与功能未知基因或假定基因同源性较高, 其余 11 个 TDF 无同源序列, 可能为新的未知功能基因。

关键词: 柑橘; 干旱胁迫; 基因表达谱; cDNA-AFLP

中图分类号: S 666

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 03-0417-08

Gene Expression Profiling in Response to Drought Stress in Citrus Leaves by cDNA-AFLP

XIAO Jin-ping, CHEN Jun-wei, ZHANG Hui-qin, XU Hong-xia, WANG Hui-liang, and XIE Ming*
(Horticulture Institute, Zhejiang Academy of Agricultural and Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Transcripts involved in drought stress in ‘Amakusa’ tangor (*Citrus reticulata* × *C. sinensis*) were identified by cDNA-AFLP gene expression profiling in leaves under normal watering and water deficit condition. A total of 113 differentially expressed transcript-derived fragments (TDFs) were identified by selective PCR amplification using 81 primer combinations. The TDFs included 71 (63%) upregulated, 29 (26%) downregulated, and 13 (11%) transiently expressed genes. Seventy TDFs were recovered, sequenced, and functionally annotated using sequence homology to GenBank entries. Out of the 70 TDFs, 33 are homolog to genes with a known function, 18 are similar to genes with unknown function, and 11 have not sequence homology to GenBank entries. The function of homologous genes included signal transduction, energy metabolism, ion channel, and protein synthesis.

Key words: *Citrus*; drought stress; gene expression profiling; cDNA-AFLP

收稿日期: 2010 - 10 - 28; 修回日期: 2011 - 01 - 27

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2008BAD92B08-3, 2008BAD92B08-4-3)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xieming1957@yahoo.com.cn)

致谢: 诚挚感谢澳大利亚昆士兰大学 Quentin Kaas 博士对本文英文部分的审校。

水分亏缺是影响作物生产力最普遍的一种环境胁迫 (Bray, 1993)。随着全球气候变暖和生态环境的恶化, 干旱发生的频率和强度都有逐渐加剧的趋势。我国干旱和半干旱的土地面积占到全国土地面积的 1/2, 即使南方湿润地区也经常会发生区域性和季节性的干旱。柑橘是我国南方重要的果树, 大多栽培于山地丘陵地区, 立地条件远不如大田作物, 加之柑橘生长发育过程需水量大, 水分胁迫是其获得高产优质的主要限制性因子之一。目前植物抗旱适应的分子机理研究主要集中于拟南芥、水稻等模式植物上, 而以多年生木本果树作物为对象的研究相对较少, 已有的研究也多是涉及形态特征和生理生化变化等内容 (Kobashi et al., 2000; Arndt et al., 2001; 杨方云 等, 2006), 对柑橘植物干旱胁迫下基因表达谱的动态变化研究还未见有报道。本研究利用 cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996) 技术进行干旱胁迫下柑橘基因表达谱分析, 分离和鉴定差异表达基因, 揭示柑橘应答干旱胁迫的分子调控机制, 为柑橘抗旱分子改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和处理

田间试验于 2009 年 4—8 月在浙江省农业科学院园艺研究所避雨大棚内进行, 试材为两年生枳砧 ‘天草’ 橘橙 (*Citrus reticulata* × *C. sinensis*) 嫁接苗。在田间选取生长良好, 长势一致的植株带土移栽入高 44 cm, 上下口直径分别为 33 cm 和 25 cm 的塑料盆中。待树势完全恢复后开始进行干旱处理, 利用夏季自然高温条件, 分别在干旱 3、5、8、11 d 时收集叶片样品, 以正常充分灌水植株叶片为对照, 每个处理重复 5 株。取样时间统一在上午 9:00, 擦净叶片表面污物, 用剪刀剪取叶片后立即投入液氮, 带回实验室 -80 °C 保存备用。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

叶片总 RNA 的提取使用大提柱式植物 RNAout 试剂盒 (天恩泽基因科技有限公司, 北京), 用 DNase I 去除残留的微量 DNA; mRNA 的分离利用 PolyA Tract mRNA Isolation Systems (Promega) 进行, 具体操作参照产品手册, mRNA 质量和浓度通过测定 OD 值来确定。

采用 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) 合成双链 cDNA, 取用 0.1 µg mRNA, 使用 Oligo (dT) 引物进行 cDNA 第一链的合成, 第二链采用 LD-PCR 进行, 具体操作按试剂说明书进行, 双链 cDNA 浓度用紫外分光光度法测定。

1.3 cDNA-AFLP 分析

1 µg 双链 cDNA 被用来进行 AFLP 分析, 体系和操作参照文献 (Bachem et al., 1998) 进行。酶切组合为 *Taq* I + *Ase* I, 65 °C 和 37 °C 分别酶切 3 h, 80 °C 灭活内切酶; *Taq* I 预扩增和选择性扩增引物分别为: 5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3', 5'-GATGAGTCCTGACCGANN-3'; *Ase* I 预扩增和选择性扩增引物分别为: 5'-CTCGTAGACTGCGTACCTAAT-3', 5'-GACTGCGTACCTAA TNN-3' (其中 N 为任一碱基)。

预扩产物稀释 50 倍用于选择性扩增, 选择性扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上 75 W 功率电泳分离 2.5 h, 银染法显示条带, 银染操作参照银染测序试剂盒技术手册 (Promega)。

1.4 差异表达 TDFs (Transcript Derived Fragments) 的克隆测序与分析

用灭菌刀片切下目的条带放入 PCR 管中, 加入 10 µL 灭菌双蒸水, 室温放置 24 h, 4 000 r · min⁻¹ 离心 30 s, 抽取 1 µL 上清液作模板, 用相应的选扩引物来进行第 2 次扩增。

PCR 产物经割胶回收后连接到 *pEASY*TM-T1 载体（全式金生物技术有限公司，北京），转化 *Trans1*-T1 感受态细胞，蓝白斑挑选阳性克隆，M13 引物检测目的插入片段，菌液送上海生工进行测序。将去除载体序列的目的片段序列提交 NCBI 的 GenBank 数据库，利用 BLASTX 和 BLASTN 工具进行基因相似性比对，推测其可能的功能。

1.5 差异表达基因的半定量 RT-PCR 分析

挑取与已知功能基因同源性较高的 6 个差异表达 TDF，根据序列分别设计特异引物（表 1），以柑橘 *actin* 基因（上游引物：5'-GGAGTTCATTGTAGAAGGTG-3'，下游引物：5'-GGCGGTGTTCCCC AGTAT-3'）为内参照，通过半定量 RT-PCR 分析其在不同干旱处理下的表达模式。

PCR 扩增程序为：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，26~30 个循环；72 ℃ 延伸 3 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离，EB 染色拍照。

表 1 差异表达 TDF 半定量 RT-PCR 分析引物
Table 1 Primers for quantitative RT-PCR of TDFs

名称 Name	正向引物（5' - 3'） Forward primer	反向引物（5' - 3'） Reverse primer	扩增长度/bp Amplification size
TDF13	TACCTCTTCTGCGTTCCTGT	CTGCGTACCTAATACCAGTAAA	109
TDF24	AATACATCTCTGGTGCCATC	AGTCCTGACCGACTTTGATA	123
TDF34	GCAGTAGGTATCTCCTGTGC	GACTGCGTACCTAATCTGGA	144
TDF38	CTTGAAATTTGTAGCCTCTCA	TGCTTGATGAAACATGCTG	112
TDF64	GTACCAAGGACTTCTTCGC	TGGGAAATCTTCAACAAATC	113
TDF109	GGTGTGATGGAGTGTTTGT	GTACCTAATGCCACCATAG	158

2 结果与分析

2.1 差异表达 TDFs 的分离

cDNA-AFLP 被用来研究水分胁迫下柑橘应答基因的表达模式，分离与干旱相关的差异表达基因。为了调查在水分胁迫期间柑橘植株本身生长发育和大棚内条件变化对基因表达的影响，首先用随机挑选的 3 对引物组合对胁迫处理期间对照植株的叶片样品进行了 cDNA-AFLP 分析，结果显示基因表达谱基本一致，没有发现差异表达基因，表明在处理期间基因的差异表达只会来自干旱胁迫，而不会受到植株本身和其它外界因素的影响。

利用 81 对引物组合对不同干旱胁迫处理叶片 cDNA 进行选择性地扩增，所有引物组合均获得了较好的扩增结果，表明 cDNA-AFLP 技术对于柑橘植物差异表达基因筛选是一种比较有效的手段。根据统计结果，每对引物组合平均扩增得到 40~60 条 TDF，片段大小集中在 50~800 bp 之间。所有扩增反应被重复两次，银染结果显示条带扩增模式前后基本一致。片段小于 100 bp 的不统计，81 对引物组合共筛选得到 113 条差异表达 TDF，约占扩增条带总数的 3%。

根据条带的有无和扩增条带的强弱，TDF 的表达模式大致可以分为以下几种：（1）上调表达（图 1，A），这类基因受干旱诱导而特异表达或增强表达；（2）下调表达（图 1，B），这类基因受干旱而抑制表达或表达强度减弱；（3）瞬时表达（图 1，C），部分 TDF 只在干旱处理的特定时间段内出现，这类基因可能是具有特殊功能的调控因子，在植株受到的干旱胁迫达到一定程度后而启动表达，其基因产物在发挥作用后迅速降解；（4）持续表达（图 1，D），条带在正常灌水和所有干旱处理情

况下都出现, 不受水分亏缺胁迫的影响, 只是随着处理的不同表现出转录产物量的轻微差异, 这类条带所代表的可能是一些比较保守、组成型表达的基因。113 条差异表达 TDF 中, 上调表达 71 条 (63%), 下调表达 29 条 (26%), 另外 13 条 (11%) 为瞬时表达。

cDNA-AFLP 分析的结果表明, 柑橘植物在遭受到外界干旱胁迫时, 体内的基因表达会发生很大的变化, 而且大部分的基因都是被干旱诱导而上调表达, 其产物应该是参与提高植株对干旱的耐受性和抵御能力。

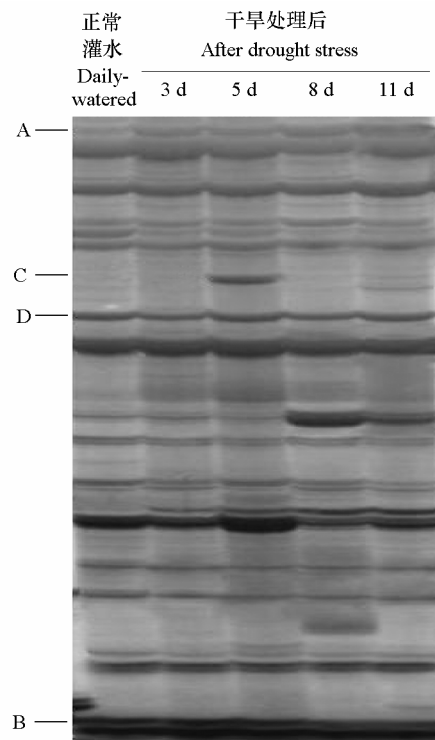


图 1 不同干旱处理材料部分 cDNA-AFLP 表达谱

A. 上调表达; B. 下调表达; C. 瞬时表达; D. 持续表达。

Fig.1 An example of cDNA-AFLP expression profile.

A. Up-regulated; B. Down-regulated; C. Transiently expressed; D. Constitutively expressed.

2.2 序列比对和功能分析

为了解柑橘应对干旱胁迫的分子调控机制, 对部分差异表达基因进行了测序和功能预测。113 条差异表达 TDF 中挑取 70 个进行二次 PCR 扩增、回收、克隆和测序, 最终得到 62 个有效序列。其中上调表达 42 个, 下调表达和瞬时表达分别为 15 个和 5 个。

BLAST 结果显示, 33 个序列与已知功能基因有较高的同源性, 18 个序列与功能未知基因和假定基因同源性较高, 其余 11 个序列与已知基因同源性过低或零匹配, 可能是一些新的柑橘干旱应答基因。33 个同源基因中, 许多与环境胁迫相关, 功能包括信号转导、能量代谢、DNA 结合、转录调控、蛋白合成、离子运输等 (表 2)。

由此可见, 柑橘植物抵御干旱胁迫的分子调控机制相当复杂, 有大量的各种类型的功能基因参与其中。

表 2 cDNA-AFLP 分析分离柑橘干旱胁迫差异表达基因的同源性分析
Table 2 Homologies of TDF sequences isolated by cDNA-AFLP analysis

名称 Name	登录号 Accession No.	功能描述* Function annotaion	物种 Organism	E 值 E-value	片段大小/ bp Size
TDF3	GW811259	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)	<i>Cucumis sativus</i>	5E-49	270
TDF10	GW811262	DNA-binding related protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7E-06	140
TDF13	GW811264	Cytochrome P450	<i>Citrus sinensis</i>	3E-34	145
TDF15	GW811265	18S ribosomal RNA gene	<i>Phaseoleae</i>	2E-24	176
TDF18	GW811267	18S rRNA gene	<i>Symplocos paniculata</i>	5E-25	171
TDF21	GW811270	Cleavage and polyadenylation specificity factor	<i>Ricinus communis</i>	1E-22	159
TDF24	GW811273	Putative fructose-bisphosphate aldolase	<i>Ricinus communis</i>	2E-45	188
TDF25	GW811274	Putative 2,4-dienoyl-CoA reductase	<i>Ricinus communis</i>	1E-20	149
TDF26	GW811275	d-alanyl-d-alanine carboxypeptidase	<i>Ricinus communis</i>	8E-32	205
TDF29	GW811278	AP2/ERF domain-containing transcription factor	<i>Populus trichocarpa</i>	6E-06	151
TDF33	GW811279	ATP binding protein	<i>Ricinus communis</i>	7E-06	260
TDF34	GW811280	26S proteasome regulatory subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-32	217
TDF38	GW811282	Cyclic nucleotide-gated ion channel	<i>Ricinus communis</i>	1E-35	219
TDF42	GW811284	Pyruvate kinase	<i>Ricinus communis</i>	3E-12	336
TDF43	GW811285	Dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>Ricinus communis</i>	5E-56	317
TDF57	GW811295	Eukaryotic translation initiation factor 3	<i>Ricinus communis</i>	9E-38	213
TDF60	GW811298	MutT-like protein	<i>Cucumis sativus</i>	4E-13	146
TDF62	GW811300	Miraculin-like protein 2	<i>Citrus jambhiri</i>	8E-12	174
TDF64	GW811302	Zinc finger protein	<i>Ricinus communis</i>	3E-44	237
TDF65	GW811303	Putative triacylglycerol lipase	<i>Ricinus communis</i>	2E-22	409
TDF67	GW811305	Cationic amino acid transporter (PtrCAT9)	<i>Populus trichocarpa</i>	7E-49	361
TDF72	GW811307	Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase	<i>Ricinus communis</i>	2E-16	158
TDF80	GW811311	Auxin response factor 3	<i>Cucumis sativus</i>	1E-20	203
TDF82	GW811312	Hypoxia-responsive family protein	<i>Citrus sinensis</i>	6E-85	239
TDF92	GW811314	Hypoxia-responsive family protein	<i>Citrus sinensis</i>	4E-35	202
TDF99	GW811315	Mitochondrial substrate carrier family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-09	143
TDF109	GW811317	Probable pyridoxal biosynthesis protein PDX1	<i>Vitis vinifera</i>	5E-22	213
TDF110	GW811318	Ethylene-inducible protein (ER1)	<i>Hevea brasiliensis</i>	5E-21	221
TDF115	GW811320	Iron-sulfur cluster scaffold protein ISU1	<i>Eucalyptus grandis</i>	4E-15	178
TDF116	GW811321	18S rRNA gene	<i>Symplocos paniculata</i>	5E-25	171
TDF120	GW811325	Beta-amylase/ catalytic/ cation binding (BMV3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6E-11	132
TDF126	GW811326	Putative glycerate dehydrogenase	<i>Ricinus communis</i>	1E-23	261
TDF132	GW811328	MATE efflux family protein (AT1G33080)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-05	224

*: 序列同源性分析使用 BLASTN 和 BLASTX 工具。
*: BLASTN and BLASTX tools were used for homology search.

2.3 基因差异表达模式的 RT-PCR 分析

为确保 cDNA-AFLP 分析结果的可靠性，以柑橘 *actin* 基因为内参照，利用半定量 RT-PCR 对 6 个差异表达 TDF 进行了验证。结果表明，片段 TDF13、TDF24、TDF34、TDF38 和 TDF109 在不同胁迫处理间呈现差异表达，且与 cDNA-AFLP 结果基本吻合（图 2），而 TDF64 的 RT-PCR 结果与 cDNA-AFLP 表达模式差别较大（结果未列出），这可能是由于设计的 RT-PCR 引物不特异，扩增效率较低，因此其表达量会出现较大的差异。

在正常灌水情况下，TDF13（细胞色素 P450）维持较高水平表达，干旱处理后下调表达，在干旱后第 11 天转录水平降到最低；TDF24（果糖二磷酸醛缩酶）和 TDF38（环核苷酸门离子通道）在

干旱胁迫后均上调表达,所不同的是 TDF24 在干旱处理的早期就出现明显的上调表达,且在随后的一段时间内始终维持在较高水平,暗示 TDF24 可能参与了干旱早期的响应过程,对抵御干旱起着关键的作用,而 TDF38 的转录水平是随着干旱程度增加逐渐上升;TDF34 (26S 蛋白酶体调控因子)和 TDF109 (维生素 B6 合成蛋白)总体上都是由干旱诱导而上调表达,但在干旱期间转录水平出现先上调后下调的变化,TDF34 在干旱后第 8 天达到表达最高值,而 TDF109 从干旱后第 3 天到第 8 天均维持高水平表达,在干旱后第 11 天这两个片段的转录显著下降,这类基因的表达首先被干旱信号所诱导,而被持续或严重的干旱抑制。上述结果表明,本研究得到的差异表达 cDNA 片段真实可靠,cDNA-AFLP 用于柑橘干旱胁迫应答基因表达分析完全可行。

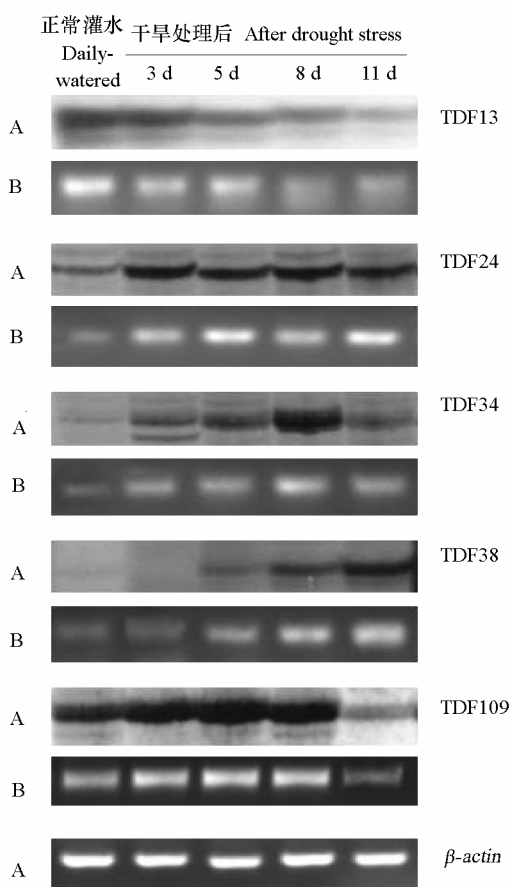


图2 差异表达 cDNA 片段的 RT-PCR 检测

A. cDNA-AFLP 分析; B. 半定量 RT-PCR 检测; 柑橘 β -actin 为内参照基因。

Fig. 2 Comparison of TDF expression patterns produced by cDNA-AFLP (A) analysis and RT-PCR (B) under drought stress

Citrus β -actin gene was used as internal standard for relative amount of RNA.

3 讨论

植物的耐旱性是由多基因控制的复杂数量性状 (Wang et al., 2003), 大多数基因产物在植物细胞水平上发挥用来对干旱作出响应或忍受干旱 (Bartels & Sunkar, 2005)。大量干旱胁迫诱导基因的鉴定和分析使得人们对植物抗旱性的分子调控机制有一个深入的理解, 同时也为植物抗旱基因工程提供理论依据和目的基因。通过拟南芥和水稻等模式植物上的深入研究, 已有超过数百个干旱胁迫

胁迫诱导基因被鉴定 (Seki et al., 2002; Rabbani et al., 2003)。本研究中获得 33 个 cDNAs 所对应的基因与已鉴定的胁迫相关功能基因有较高的同源性, 表明高等植物对干旱胁迫的耐受性在一定程度上具有相似的分子基础。

TDF13 编码的细胞色素 P450 是广泛存在于动植物及微生物体内的一个古老基因超家族的产物, 参与植物体的基础代谢, 在植物防御体系中起重要作用, 最近的研究证实细胞色素 P450 家族成员 CYP707A 作为 ABA 的羟化酶, 在脱水胁迫期间降解 ABA, CYP707A3 的 T-DNA 插入突变体表现出耐旱性提高, 同时伴有蒸腾速率降低 (Umezawa et al., 2006b), TDF13 的下调表达提高了柑橘中 ABA 的积累, 促进了叶片气孔的关闭, 减少了细胞内水分丧失, 从而提高耐旱能力。果糖二磷酸醛缩酶 (TDF24) 催化果糖二磷酸 $\leftrightarrow$ 二羟丙酮磷酸 + 三磷酸甘油醛的可逆反应, 干旱、盐渍和外源 ABA 处理均能提高果糖二磷酸醛缩酶基因转录产物在植物叶片和茎组织中的积累, 转果糖二磷酸醛缩酶基因烟草中脯氨酸含量增加, 其抗盐能力得到了提高 (张晓宁 等, 2003; Qaisar et al., 2010), 这可能是由于醛缩酶活性促进糖酵解产生丙酮酸, 通过三羧酸循环转变为 α -酮戊二酸, 而 α -酮戊二酸作为脯氨酸的前体物质加快了脯氨酸的合成, 但其与干旱之间的关系还有待进一步深入研究。泛素/26S 蛋白酶体 (TDF34) 在植物蛋白降解系统中起重要的作用, 结合了泛素的蛋白能被 26S 蛋白酶体降解, 释放的泛素再循环利用 (Smalle & Vierstra, 2004)。在热激、干旱、强光和重金属等胁迫下积累的异常或受损的蛋白质能通过这条途径得以消除, 从而保证了细胞结构和功能的完整性。TDF34 的诱导表达表明 26S 蛋白酶体可能参与了柑橘干旱胁迫后有害物质的清除过程。植物环核苷酸门离子通道 (TDF38) 属于多基因编码的离子通道超家族成员, 是信号转导级联系统的组成部分, 它们将细胞外部信号转变为能够跨过细胞膜的阳离子流对细胞起作用; 研究表明, 植物 CNGC 参与调控胁迫后信号的转导, 并且能够单独或与其它基因共同来控制胁迫诱导基因的表达, 从而使植物在胁迫发生时及时作出反应并提高耐受能力 (Chan et al., 2003)。锌指蛋白 (TDF64) 是真核生物中最普遍存在的一类具有指状结构的 DNA 结合蛋白, 通过与特定的靶 DNA 或靶蛋白结合来调控基因的表达, 转锌指蛋白基因的矮牵牛和拟南芥都表现出较强的抗干旱能力, 同时伴有植株矮化现象 (Sugano et al., 2003; Sakamoto et al., 2004)。维生素 B6 生物合成蛋白 (TDF109) 在维生素 B6 合成途径中起着关键的作用, 维生素 B6 不但对植物生长和发育非常必要, 而且在植物胁迫耐受性和光合保护方面也发挥着重要的作用, B6 含量的降低会使植物对盐、渗透和光等胁迫变得非常敏感 (Titiz et al., 2006), TDF109 的表达在干旱后第 8 天达到最高值, 但在干旱后第 11 天其表达明显减弱, 这表明重度干旱会破坏维生素 B6 的合成途径, 使柑橘植株遭受胁迫伤害。

除了上述这些基因, 其它分离获得的高同源功能基因与柑橘干旱防御也必然存在直接或间接的联系。总之, 植物抗旱的分子调控网络非常复杂, 本研究中鉴定的 TDF 可以通过 RACE 等技术获得全长基因的基础上进一步探明其与干旱胁迫之间的关系, 以便为柑橘和其它果树作物的耐旱分子机制研究提供借鉴和参考。另外, 一些瞬时表达和先上调后下调的基因在以往同类研究中较少报道, 这些基因在干旱胁迫的应答和防御中起着特殊的作用, 在今后的研究中应该给予更多的关注。

References

- Arndt S K, Clifford S C, Wanek W, Jones H G, Popp M. 2001. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. *Tree Physiology*, 21: 705 - 715.
- Bachem C W B, Heoven R S van der, Bruijn S M de, Vreudenhil D, Zabeau M, Visser R G F. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 9: 745 - 753.
- Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F. 1998. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology*

- Reporter, 16: 157 – 173.
- Bartels D, Sunkars R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 24: 23 – 58.
- Bray E A. 1993. Molecular response to water deficit. *Plant Physiol*, 103: 1035 – 1040.
- Chan C W M, Schorrak L M, Smith R K Jr, Bent A F, Sussman M R. 2003. A cyclic nucleotide-gated ion channel, CNGC2, is crucial for plant development and adaptation to calcium stress. *Plant Physiol*, 132: 728 – 731.
- Kobashi K, Gemma H, Iwahori S. 2000. Absciscic acid content and sugar metabolism of peaches grown under water stress. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 125 (4): 425 – 428.
- Qaisar U, Irfan M, Meqbool A, Zahoor M, Khan M Y, Rashid B, Riazuddin S, Husnain T. 2010. Identification, sequencing and characterization of a stress induced homologue of fructose biphosphate aldolase from cotton. *Canadian Journal of Plant Science*, 90 (1): 41 – 48.
- Rabbani M A, Maruyama K, Abe H, Khan M A, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiology*, 133: 1755 – 1767.
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Arabidopsis Cys2/His2-Type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology*, 136: 2734 – 2746.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 30: 279 – 292.
- Smalle J, Vierstra R D. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 555 – 590.
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H. 2003. Stress-responsive zinc finger gene *ZPT2-3* plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant Journal*, 36: 830 – 841.
- Titiz O, Tambasco-Studart M, Warzych E, Apel K, Amrhein N, Laloi C, Fitzpatrick T B. 2006. PDX1 is essential for vitamin B6 biosynthesis, development and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 48 (6): 933 – 46.
- Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, Nambara E, Oono Y, Seki M, Kobayashi M, Koshiha T, Kamiya Y, Shinozaki K. 2006b. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 46: 171 – 182.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1 – 14.
- Yang Fang-yun, Wei Chao-fu, Liu Ying. 2006. Protective enzyme systems in orange leaves under drought stress. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 12 (1): 119 – 124. (in Chinese)
- 杨方云, 魏朝富, 刘 英. 2006. 干旱胁迫下甜橙叶片保护酶体系的变化研究. *植物营养与肥料学报*, 12 (1): 119 – 124.
- Zhang Xiao-ning, Lin Chang-fa, Chen Huo-ying, Wang Hao, Qu Zhi-cai, Zhang Hong-wei, Yao Jian-hong, Shen Da-ling. 2002. Cloning of the fructose-1,6-diphosphate aldolase full-length cDNA of *Dunaliella salina* induced by NaCl and expression in tobacco. *Science in China: Series C*, 32 (5): 392 – 398. (in Chinese)
- 张晓宁, 林长发, 陈火英, 王 昊, 曲志才, 张宏伟, 姚剑虹, 沈大棱. 2002. 受 NaCl 诱导的盐藻果糖 - 1, 6 - 二磷酸醛缩酶 cDNA 的克隆及其在烟草中的表达. *中国科学: C 辑*, 32 (5): 392 – 398.