

# 拟南芥 rd29A 启动子在不同胁迫下 GUS 活性分析

柳 娜, 杨文雄, 王世红, 张雪婷, 杨长刚

(甘肃省农业科学院小麦研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 通过特异 PCR 扩增技术, 以拟南芥基因组 DNA 为模板, 克隆了 rd29A 基因上游 1 600 bp 的胁迫诱导型启动子序列。将此 1 600 bp 的调控序列与 GUS 基因连接构建植物表达载体 pBI101-rd29A-GUS, 并用农杆菌介导法转基因拟南芥。定量 PCR 结果显示, 干旱胁迫下转基因纯合株系中 rd29A 显著上调表达。GUS 组织化学染色及 GUS 定量分析结果表明, 在 ABA、甘露醇和 NaCl 等胁迫处理下, GUS 活性增强, 尤其是 ABA 胁迫处理。说明 rd29A 启动子可以增强逆境下 GUS 基因的表达, 可作为一种诱导型启动子应用于提高作物抗逆性的基因工程研究中。

**关键词:** rd29A; 干旱; ABA; NaCl; 甘露醇; 小麦

**中图分类号:** S336 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)05-0040-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.05.010

## GUS Activity Assay of Promoter rd29A from *Arabidopsis thaliana* under Different Stresses

LIU Na, YANG Wenxiong, WANG Shihong, ZHANG Xueting, YANG Changgang

(Institute of Wheat, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** About 1600bp stress inducible promoter of rd29A from *Arabidopsis thaliana* genomic DNA was cloned by PCR. The plant expression vector pBI101-rd29A-GUS was constructed with this regulatory region linked up with GUS gene, and then transferred to *Arabidopsis* by *Agrobacterium tumefaciens* system. The expression level of rd29A was up-regulated under drought stress in homozygous seedlings. Histochemical analysis and quantitative analysis results showed that the GUS activity was enhanced under ABA, NaCl and mannitol treatments. Therefore, rd29A promoter can strengthen the expression of GUS gene under stresses, and can be used as an inducible promoter in gene engineering for stress resistance improvement of crops.

**Key words:** rd29A; Drought; ABA; NaCl; Mannitol; Wheat

在复杂的自然生境下, 农作物的生长发育经常会遭受到干旱、低温、高盐和涝旱等逆境胁迫的影响, 进而影响农作物产量<sup>[1]</sup>。近年来, 现代生物育种技术在作物育种中的贡献愈加显著, 其中利用基因工程技术提高植物抗逆性已成为分子生物学研究的重要领

域之一<sup>[2-3]</sup>。转基因技术作为一项强有力的工具, 在不改变作物原有特性的基础上, 可以将控制植物抗逆的关键基因导入其中, 从而实现品种改良的目的。然而, 大部分的转基因是用 CaMV35S 植物组成型强启动子驱动目的基因表达, 使得目的基因在植物不需

**收稿日期:** 2019-03-06

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31560390); 甘肃省科技重大专项(17ZD2NA016-7); 甘肃省小麦产业技术体系(GARS-01-01); 公益性行业农业科研专项(201503125-1)资助。

**作者简介:** 柳 娜(1981—), 女, 甘肃靖远人, 副研究员, 主要从事小麦分子和常规育种工作。Email: 592905658@qq.com。

**通信作者:** 杨文雄(1964—), 男, 甘肃会宁人, 研究员, 主要从事小麦育种研究工作。Email: ywxm822@126.com。

要的情况下仍能强烈表达,进而改变植物正常的基因调控和代谢途径,而引起植物的形态发生改变,影响植物的生长发育,造成转基因植物生长缓慢、株型变小等<sup>[4-6]</sup>。

拟南芥 rd29A 启动子是逆境诱导型启动子,含有干旱、高盐、低温、ABA 诱导表达等相关的顺式作用元件(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994),可用于抗逆基因工程。因此,选择合适的逆境诱导型启动子进行克隆以替代 CaMV35S 启动子与特定的转录因子结合驱动目的基因表达,在提高植物的抗性并减小目的基因过量表达给转基因植物带来的不利影响等方面具有极大的优越性。

研究发现,rd29A 的表达受多种环境因素诱导,可响应冷、干旱、盐和脱落酸(ABA)等胁迫<sup>[7]</sup>。我们根据拟南芥 rd29A 起始密码子上游 1600bp 的启动子序列设计引物,以 DNA 为模板,克隆获得了该启动子,将其与植物表达载体 pBI101-GUS 连接,检测了其在不同胁迫下的活性,以期为今后利用该诱导型启动子培育抗性作物品种(如小麦)提供研究基础和应用依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试材料 以拟南芥野生型(Col-0 生态型)种子为材料。种子在 4℃ 春化 3 d 后,用 15% 次氯酸钠消毒,点种在 MS 培养基上。培养 7 d 后,取材提取 RNA,反转录合成 cDNA 第一链后进行基因克隆。同时将幼苗移至营养土(土与蛭石按体积比 3:1 配制)中,在 23℃ 培养室培养(光照 16 h、黑暗 8 h)28 d 左右,用于转基因实验。

1.1.2 主要试剂 植物总 RNA 提取试剂盒(Tiangen)、反转录酶(Thermo Fisher)、MS 粉(Duchefa)、高保真酶 Prime STAR(Takara)、凝胶回收试剂盒(康润生物)、内切核酸酶(NEB)、SYBR Green I(Takara)、0.2 mL PCR

八连管(Bio-Rad)。卡那霉素、利福平、NaCl、甘露醇、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、SDS 和 Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 购自索莱宝,ABA 购自 Sigma 公司,X-Gluc 和 MUG 购自 Goldbio 公司。Triton X-100、β-巯基乙醇、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、考马斯亮蓝 G250 和牛血清白蛋白 BSA 购自上海生物工程有限公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 载体构建 参照 CTAB 法<sup>[8]</sup>提取基因组 DNA 作为模板。选取 rd29A 的 5' 上游序列 1 600 bp 设计特异性引物进行 PCR 扩增。引物由华大基因公司合成。将克隆得到的片段回收后,由 Hind III 酶和 XbaI 酶进行双酶切,同时对载体 pBI101-GUS 用相同的酶双酶切后,与酶切片段进行连接,得到由拟南芥 rd29A 基因启动子驱动的植物表达载体 pRD29A-pBI101-GUS。双酶切鉴定获得阳性克隆,测序,序列合适后提取质粒,转入农杆菌 GV3101。

1.2.2 转基因纯合株系获得 利用浸花法<sup>[9]</sup>,将 1.2.1 中获得的阳性克隆侵染拟南芥野生型(Col-0),获得 T0 代种子。将干燥的 T0 代种子在含卡那霉素的 MS 培养基上大量播种,挑取有抗性的幼苗移入土中继续培养,单株收取得到 T1 代种子。将 T1 代种子按照 3:1 的原则继续经卡那霉素筛选,存活的株系单株收种子得到 T2 代种子。T2 代种子继续经抗生素筛选,全部存活没有分离的则定为纯合株系,用于后续实验。

1.2.3 定量 PCR 分析 将纯合株系种子在 4℃ 下春化 3 d 后,用 15% 次氯酸钠消毒,点种在 MS 培养基上。7 d 后将幼苗移至营养土中,在 23℃ 培养室中培养(16 h 光照/8 h 黑暗)12 d 后进行干旱处理。

试验设计分为 2 组,一组为对照组,正常浇水;一组为处理组,不浇水。处理 7 d 后分别取材。参照植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,检测其完整性并测定

RNA 浓度和纯度。取 2  $\mu\text{g}$  RNA, 按照反转录酶的说明书进行 cDNA 合成。反转录后用于定量分析。

1.2.4 组织表达分析 纯合株系种子在 4  $^{\circ}\text{C}$  下春化 3 d 后, 用 15% 次氯酸钠消毒, 点种在 MS 培养基上。7 d 后, 幼苗移至处理培养基上。试验设计分为 4 组, 对照组不作任何处理, 继续在 MS 培养基上正常生长; 其他 3 组分别为 200 mM NaCl 处理、150  $\mu\text{M}$  ABA 处理, 以及 300 mM 甘露醇处理。处理 2 h 后, 对 4 组试验取材进行 GUS 染色。GUS 染色按照文献的方法进行<sup>[10]</sup>。

1.2.5 GUS 活性分析 首先提取植物总蛋白。取 200 mg 新鲜的植物组织, 液氮速冻后迅速磨碎, 将研磨后的组织转到 1.5 mL 离心管里, 加入 1 mL GUS 提取缓冲液[0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 50 mL; 10% SDS 1 mL; 0.5M EDTA (pH 8.0) 2 mL; Triton X-100 100  $\mu\text{L}$ ;  $\beta$ -巯基乙醇 100  $\mu\text{L}$ ; 加水定容至 100 mL], 充分混匀。4  $^{\circ}\text{C}$  11 600 rpm 离心 5 min, 将上清转至另一新的离心管中, 冰上放置。

接着以牛血清白蛋白 BSA 作标曲, 参照 Bradford 的方法对蛋白浓度进行测定<sup>[11]</sup>。

最后对 GUS 表达水平进行定量分析: 取 100  $\mu\text{L}$  蛋白上清, 加入 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的 GUS 提取缓冲液 400  $\mu\text{L}$  后再加入 500  $\mu\text{L}$  MUG 底物(2 mM), 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴。在 0 min、15 min、30 min、45 min 和 60 min 时分别取混合反应

物 200  $\mu\text{L}$  加入到 800  $\mu\text{L}$  反应终止液(0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )中, 室温下避光保存。利用荧光分光光度计在激发波长 365 nm、发射波长 455 nm 下, 狭缝 10 nm 时测定不同时间点的荧光强度值。以荧光强度值对反应时间作曲线, 求出单位时间荧光强度变化。用单位时间荧光强度变化除以参加反应的蛋白量, 求得单位质量的蛋白在单位时间的荧光强度变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 rd29A 启动子的扩增及酶切鉴定

以拟南芥 DNA 为模板, 加入特异性引物(表1)进行扩增。电泳结果(图1)表明, 克隆得到约 1 600 bp 的预期片段(命名为 pRD29A)。利用 HindIII 酶和 XbaI 酶对目的片段和植物表达载体 pBI101-GUS 进行双酶切, 将 pRD29A 插入到载体, 得到由拟南芥

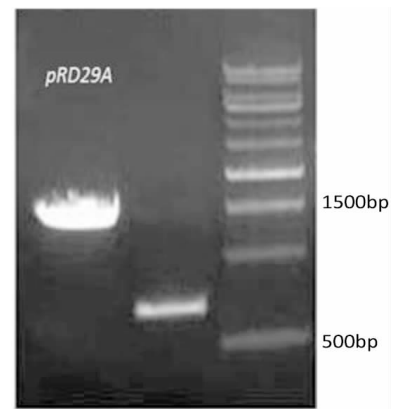
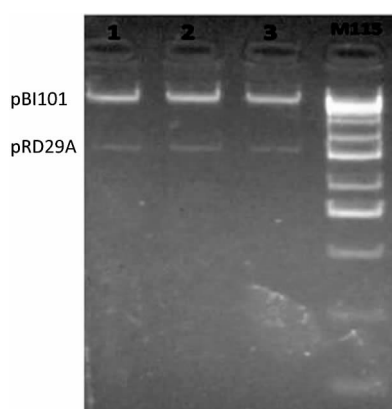


图 1 琼脂糖凝胶检测 rd29A 启动子 pRD29A 的克隆

表 1 PCR 引物序列

基因	引物名称	序列(5'>3')
pRD29A(Clone)	Rd29AFP	CCCAAGCTTAGATTTGGGGTTTTGCTTTTG
	Rd29ARP	GCTCTAGATCCAAAGATTTTTTCTTTCC
actin2	actin2FP	CTTGTACGCCAGTGGTCCG
	actin2RP	GCAAGGTCAAGACGGAGG
rd29A(qPCR)	RD29AFP	GCCGAGAACTTCAGATTGG
	RD29ARP	CCATTCCTCCTCCTCTTTC
gus835	gus835FP	TCAGTGGCAGTGAAGGGCC
	gus835RP	GCGAGGTACGGTAGGAGTTGG

rd29A 启动子驱动 GUS 报告基因的植物表达载体 pBI101-rd29A-GUS。HindIII 酶和 XbaI 酶双酶切鉴定重组克隆(图2), 表明 rd29A 启动子完整的插入到表达载体中, 同时通过测序确定为所需阳性克隆。



泳道 1, 2, 3 为三个不同的阳性克隆双酶切鉴定结果; 泳道 M 为 DNA Marker。

图 2 HindIII 和 XbaI 双酶切鉴定阳性克隆

## 2.2 转基因植株筛选

利用农杆菌介导的方法, 将上述成功的阳性克隆转基因进入拟南芥中。对转基因获得的种子进行抗生素(卡那霉素)筛选。转基因植株具有抗性, 幼苗较绿, 根能够伸长生长, 未转入成功的植株因缺乏抗性而黄化死去(图3)。多次筛选后获得纯合株系。

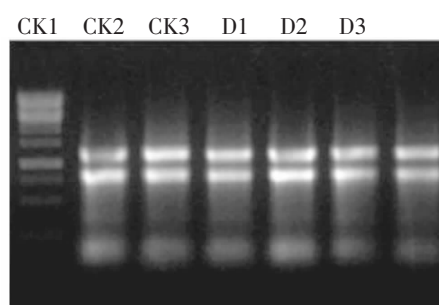


图 3 转基因植株筛选

## 2.3 干旱胁迫下 rd29A 及 GUS 基因表达量变化

rd29A 是干旱胁迫响应的关键基因, 因

此检测了干旱胁迫和未处理条件(CK)下转基因纯合株系中 rd29A 以及 GUS 报告基因表达量变化。对照组和处理组各取 3 个生物学重复, 提取总 RNA 后进行凝胶电泳检测。结果显示 6 个样本的 RNA 完整性均较好(图 4)。测定浓度和纯度后, 反转录为 cDNA 用于实时荧光定量分析。



CK1-3 表示对照组 3 个重复的 RNA 提取结果; D1-3 表示干旱胁迫处理组 3 个重复的 RNA 提取检测结果。

图 4 凝胶电泳检测 RNA 提取的完整性结果

定量分析结果(图5)显示, 与对照组相比, 干旱处理后 rd29A 基因显著上调表达, 而 GUS 基因表达略有上调。

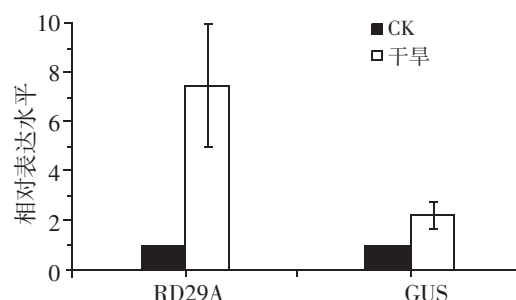


图 5 干旱胁迫下 rd29A 和 GUS 基因表达量变化

## 2.4 GUS 染色及活性分析

分析了不同胁迫处理下转基因株系中 GUS 活性是否发生变化。将培养 7 d 的幼苗经不同处理 2 h 后进行 GUS 染色, 脱色后在体视显微镜观察。结果(图6)显示, 与对照组相比, 3 种处理下下胚轴、叶片及整株幼苗中 GUS 活性均升高。其中 ABA 处理下 GUS 活性显著高于对照组与其他 2 个处理组, 尤其在子叶中。甘露醇和 NaCl 处理与对照相比 GUS 活性略有升高。



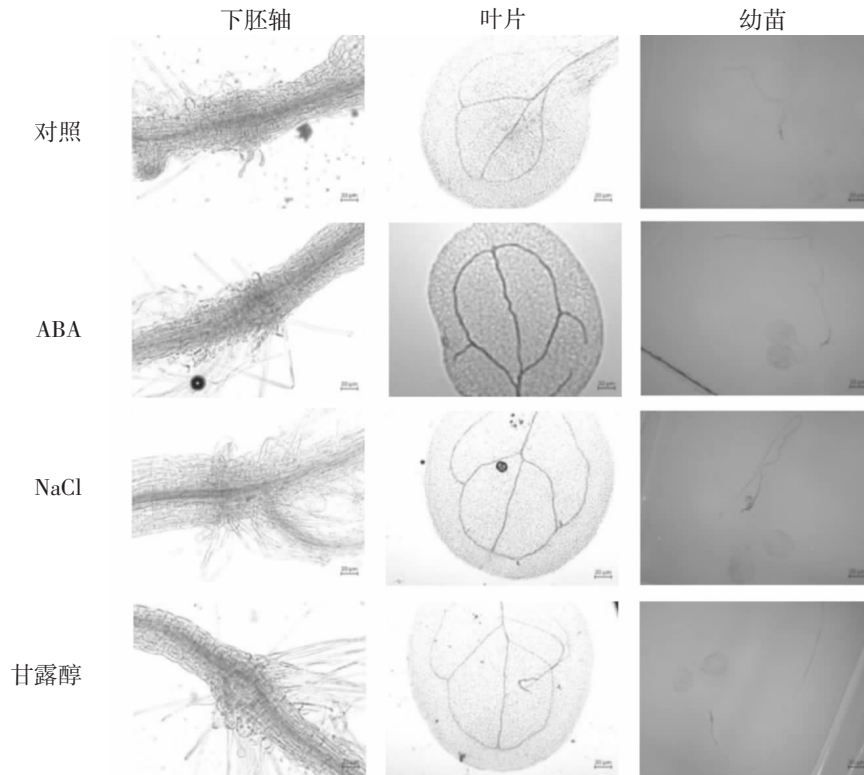


图 6 不同胁迫下 rd29A 的表达模式分析

为进一步分析不同处理下 GUS 活性变化, 将培养 7 d 的幼苗经不同处理 2 h 后的 GUS 活性进行定量分析。结果(图7)显示, 与对照组相比, 3 种处理下 GUS 活性在整株幼苗中均升高。其中 ABA 处理下 GUS 活性高于对照组与其他两个处理组。甘露醇和 NaCl 处理下与对照相比 GUS 活性略有升高, 这与 GUS 染色结果一致。

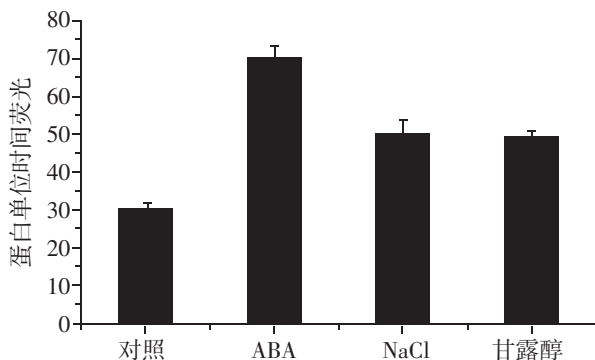


图 7 不同胁迫下转基因株系的 GUS 定量分析

### 3 小结与讨论

启动子是提供 RNA 聚合酶识别和结合的一段 DNA 序列和相关的调控元件, 通常

位于基因的上游, 驱动基因转录。根据启动子的作用方式, 可分为组成型启动子、组织特异型启动子和诱导型启动子。在作物的遗传转化中, 绝大多数用组成型启动子 CaMV35S 驱动目的基因表达, 这可能造成转基因作物的生长发育受到限制, 因此诱导型和特异型启动子的研究受到越来越广泛的关注。

诱导型启动子通常是指在某些特定的信号刺激下可以大幅度提高基因转录水平的启动子。诱导型启动子对基因表达的调控, 可以改善植物在发育过程中对环境变化的适应, 同时可避免基因过量表达对植物造成的潜在危害。诱导型启动子包括多种类型: 可被激素如脱落酸、生长素等诱导表达的启动子 ABRE 和 E1<sup>[12-13]</sup>; 可在低温、脱水以及高盐等逆境因子的作用下被诱导表达的启动子 Fro1、ABA2 和 Rab16A<sup>[14-16]</sup>; 能够对人工合成的化学诱导物作出反应的启动子 IN2-2<sup>[17]</sup>。此外还存在一些能够被光诱导

Sgt1<sup>[18-19]</sup>和机械创伤诱导 Win3<sup>[20]</sup>表达的启动子类型。

rd29A 启动子作为诱导型启动子中研究最广泛的启动子,已被许多学者应用于提高转基因作物抗性的育种研究中<sup>[21-22]</sup>。rd29A 作为 DREB1 调控的目的基因,其启动子区域含有 DRE 核心序列和 ABA 响应的顺式作用元件(ABRE)<sup>[23]</sup>。在植物细胞缺水时,体内产生的 ABA 通过信号传导,可以产生与 rd29A 启动子区 ABRE 序列相结合的转录因子,启动 rd29A 的表达。同时 DREB1 转录因子与 rd29A 启动子 DRE 核心序列结合也可以诱导该基因的表达。细胞不缺水时 rd29A 并不表达<sup>[24-25]</sup>,因此认为 rd29A 是一个干旱诱导型启动子。

本研究经过定量分析,已经证明干旱胁迫下转基因株系中 rd29A 显著上调表达。同时通过 GUS 染色和 GUS 活性定量分析发现,在 ABA、甘露醇和 NaCl 等非生物胁迫下,转基因株系的叶脉和下胚轴处的 GUS 染色加深,说明 rd29A 启动子在胁迫诱导下活性增强,可以有效地驱动 GUS 基因的表达。前人的研究同样表明将拟南芥 rd29A 启动子转入烟草中,经 GUS 染色分析发现胁迫处理下转基因烟草叶脉处蓝色较深<sup>[26]</sup>。

Kasuga 等<sup>[27]</sup>分别构建了 CaMV35S 启动子和 rd29A 启动子驱动 DREB1A 基因的表达载体,转基因到拟南芥中区别其抗逆能力。结果显示,CaMV35S 驱动的 DREB1A 基因过表达后激活转基因株系中其他胁迫基因的表达,如 rd29A、Kin1、Cor6.6、Cor15a、rd17 和 P5CS 等,虽然具有更强的抗旱、抗盐等能力,但其在正常条件下生长迟缓。而由 rd29A 驱动的 DREB1A 基因表达后,转基因株系既可获得更强的胁迫耐性,同时植株生长受到的影响较小。因此 rd29A 诱导型启动子在植物抗逆基因工程中具有广泛的应用前景和极大的研究价值。我

们在前人的基础上构建了 Rd29A 启动驱动的 GUS 基因表达,不仅在组织染色水平上验证了其在干旱胁迫条件下的响应,同时多角度做了关联验证,如自身 RD29A 基因的诱导表达分析,GUS 活性定量分析,更加精确地明确了 Rd29A 启动子的功能。希望通过进一步构建 rd29A 干旱诱导型启动子驱动 DREB 转录因子的植物表达载体,利用农杆菌介导法将其成功转入小麦中,以提高甘肃旱地小麦产量。

#### 参考文献:

- [1] ZHU J K. Cell signaling under salt, water and cold stresses [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4: 401-406.
- [2] 尹祥佳,李艳枚,郝楠. CRISPR/Cas9 基因编辑系统及其在水稻育种中的应用综述[J]. *甘肃农业科技*, 2017(10): 80-84.
- [3] 张俊儒,张磊,刘忠元,等. 布劳格小麦育种模式反思与节水专用型品种选育探讨[J]. *甘肃农业科技*, 2017(10): 63-67.
- [4] HSIEH T H, LEE J T, CHANG Y Y, et al. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 618-626.
- [5] MIE K, SETUKO M, KAZUO S. et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter drought and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer[J]. *Plant Physiol*, 2004, 45 (3): 346-350.
- [6] GILMOUR S J, SEBOLT A M, SALASAR M P, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation[J]. *Plant Physiol*, 1600, 124: 1854.
- [7] YAMAGUCHI S K, SHINOZAKI K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 251-264.
- [8] JUNGHANS, H, METZLAFF M. A simple and

- rapid method for the preparation of total plant DNA[J]. *Biotechniques*, 1990, 8: 176.
- [9] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16: 735-743.
- [10] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6: 3901-3907.
- [11] BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 6: 3177-3188.
- [12] YAMAGUCHI S K, SHINOZAKI K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stressresponsive promoters[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 88-94.
- [13] LIU Z B, HAGEN G, GUILFOYLE T J. AG-Box-Binding protein from soybean binds to the E1 auxin-response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline-rich repression domain[J]. *Plant Physiol*, 1997, 115(2): 397-407.
- [14] BYEONG H L, HOJOUNG L, LI M, et al. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression [J]. *The Plant Cell*, 2002(14): 1235-1251.
- [15] RAI M, HE C K, WU R. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice[J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(5): 787-799.
- [16] ARYADEEP R, CHAITALI R, DIBYENDU N S. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *lea* gene *Rab16A* from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress[J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(10): 1839-1859.
- [17] 孙芳芳. 乙酰苯胺和 2-氯苯磺酰胺诱导启动子 IN2-2 在植物中的表达研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [18] 李为民, 王志兴, 裴新梧, 等. 中棉光诱导基因 *Cacab* 启动子的克隆及其功能分析[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(3): 253-257.
- [19] 魏桂民, 张金文, 王 蒂, 等. 马铃薯 *Sgt1* 基因启动子的结构及功能分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(10): 969-977.
- [20] BRADSHAW H D, HOLLICK J B, PARSONS T J, et al. Systemically wound-responsive genes in poplar trees encode proteins similar to sweet potato spormins and legumekunitz trypsin inhibitors[J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 14(1): 51-59.
- [21] 张 宁, 司怀军, 王 蒂. 拟南芥 *rd29A* 基因启动子克隆及其在马铃薯抗胁迫转基因中的应用[J]. *作物学报*, 2005, 31(2): 159-164.
- [22] 押辉远, 秦广雍, 霍裕平. *Prd29A* 及 *DREB1A* 的克隆和干旱诱导型植物表达载体的构建与鉴定[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(3): 371-375.
- [23] YAMAGUCHI I, SHIONZAKI K, TOKIYAMA M. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants[J]. *Molecular & General Genetics*, 1993, 236(2-3), 331-340.
- [24] 江香梅, 黄敏仁, 王明麻. 植物抗盐碱、耐旱基因工程研究进展[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2001, 25(25): 57-62.
- [25] LIMING XIONG, KAREN S SCHUMAKER, JIAN-KANG ZHU. Cell signaling during cold, drought and salt stress[J]. *The Plant Cell*. 2002, 14: 166-183.
- [26] 杨春霞, 陈 英, 黄敏仁, 等. 拟南芥逆境诱导型启动子 *rd29a* 的克隆及活性检测[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2008, 32(1): 6-10.
- [27] 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]. *Nature Biotechnology*, 1999(17): 287-291.

(本文责编: 陈 珩)