

苹果 bZIP 转录因子基因 *MdAREB2* 功能的初步研究

刘亚静, 马齐军, 路 静, 郝玉金, 由春香*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 山东泰安 271018)

摘 要: 对‘嘎拉’苹果中的 1 个 bZIP 转录因子基因 *MdAREB2* (序列号: MDP0000248567) 进行功能初步研究。蛋白进化树分析表明, 苹果 *MdAREB2* 与拟南芥 *AtAREB2* 具有很高的同源性。利用 PlantCare 数据库进行启动子顺式作用元件的预测分析, *MdAREB2* 启动子序列中存在脱落酸响应元件 ABRE。实时定量 PCR 检测表明, *MdAREB2* 明显受 ABA 诱导。拟南芥种子萌发阶段经过 0.5 和 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理后发现突变体 *abi5* 中过量表达 *MdAREB2* 能够恢复对 ABA 的敏感性。拟南芥幼苗生长阶段, 经过 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理后发现, 突变体 *abi5* 中过量表达 *MdAREB2* 能够部分恢复对 ABA 的敏感性。

关键词: 苹果; bZIP; 转录因子; *MdAREB2*; 功能研究

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 01-0001-10

Primary Analysis of the Function of bZIP Transcription Factor Gene *MdAREB2* in Apple

LIU Yajing, MA Qijun, LU Jing, HAO Yujin, and YOU Chunxiang*

(State Key Laboratory of Crop Biology, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops in Huanghuai Region, Ministry of Agriculture, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: A bZIP transcription factor gene *MdAREB2* (MDP0000248567) was cloned from ‘Gala’ apple (*Malus × domestica* Borkh.). The evolutionary tree analysis indicated that *MdAREB2* had the very high homology with *AtAREB2*. The promoter of *MdAREB2* was analyzed and predicted by PlantCare databases, and the results showed that the promoter sequence contained abscisic acid response element ABRE. Quantitative real-time PCR showed that *MdAREB2* was significantly induced by ABA. This study found that with 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA and 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA treatment, excessive expression of *MdAREB2* in mutant *abi5* could restore its sensitivity to ABA in seed germination stage. In the seedling growth stage, with 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA treatment, excessive expression of *MdAREB2* in mutant *abi5* could partially restore its sensitivity to ABA.

Keywords: apple; bZIP; transcription factor; *MdAREB2*; function analysis

收稿日期: 2017-06-12; 修回日期: 2017-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471854); 农业部“948”国际交流项目子课题 (2016-X11)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: youchunxiang@126.com)

植物碱性亮氨酸拉链转录因子 (basic region/leucine zipper, bZIP) 是真核生物转录因子中分布最广泛、最保守的一类转录因子。几乎所有真核细胞中都发现了 bZIP 结构域的转录因子 (Rodriguez et al., 2006)。bZIP 参与脱落酸 (abscisic acid, ABA)、赤霉素 (gibberellin, GA) 等激素信号以及光信号传导, 并响应各种生物与非生物胁迫, 抵抗寒冷、干旱等不利条件, 并且可以通过调控抗逆相关基因的表达, 提高植物的抗逆性 (Lee et al., 2006; Nijhawan et al., 2008)。

植物 bZIP 转录因子依据其结构特点和功能被划分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 S, 共 10 个亚族 (Jakoby et al., 2002)。已克隆的 A 亚族植物 bZIP 转录因子包括 13 个成员, 如 ABF1、ABF2/AREB1、ABF3、ABF4/AREB2、GBF4、ABI5、AREB3、DPBF2 等 (Satoh et al., 2004)。在拟南芥中, ABI5 相关 bZIP 转录因子与顺式作用元件 ABA 响应元件 (AREB2) 结合, 激活种子中 ABA 介导的基因转录。ABI5 是影响种子萌发的重要转录因子 (Yu et al., 2016), ABI5 突变体对 ABA 的响应具有多效缺陷性, 包括对 ABA 抑制种子发芽的敏感性降低, 一些 ABA 调控基因的表达发生改变等 (马燕林 等, 2014)。

AREB 基因在多种胁迫适应性及抗性中具有重要作用 (洪岚 等, 2011)。在植物中通过 ABRE 表达的基因受 bZIP 类转录因子调控。在胁迫条件下, bZIP 转录因子可以与 ABA 诱导基因的启动子区域的 ABRE 结合来调节下游靶基因的表达 (Fujita et al., 2005)。在干旱和高盐等渗透胁迫下, 内源 ABA 含量增加。ABA 通过启动子区域的 ABA 响应元件 (AREBs) 激活了多种基因的表达 (Fujita et al., 2013)。

近年来对 AREB (ABA responsive element binding protein) /ABFs (ABRE binding factors) 类转录因子关注度很高, AREB/ABFs 的同类物也被鉴定和研究。在拟南芥中, AREB/ABF 类转录因子亚家族共发现 4 个成员: AREB1/ABF2、AREB2/ABF4、ABF1 和 ABF3, 它们在植物营养组织中表达, ABF2/AREB1、ABF4/AREB2 和 ABF3 主要在除了种子以外的植物组织中表达 (Fujita et al., 2013)。ABI5 和 AREB3 基因则在拟南芥种子成熟期表达 (Bensmihen et al., 2002; 洪岚 等, 2011)。AREB/ABFs 是 bZIP 转录因子, 直接调节 ABRE 响应元件的表达来响应非生物胁迫。其中, ABF1 主要参与 ABA 胁迫应答反应、低温; ABF2、ABF4 主要参与 ABA、高盐、干旱、热、氧化胁迫应答反应; ABF3 主要参与 ABA、高盐、热、氧化胁迫应答反应、低温 (孙明岳 等, 2016)。在营养组织中 *AREB1/ABF2*、*AREB2/ABF4* 和 *ABF3* 能被 ABA 和渗透胁迫诱导, 进一步过表达分析发现 *AREB1/ABF2*、*AREB2/ABF4* 和 *ABF3* 参与 ABA 信号来响应渗透压力 (Yoshida et al., 2015)。

在拟南芥、小麦、番茄等一年生植物中对 AREB/ABFs 转录因子已有相对深入的研究, 但是在果树, 特别是苹果等多年生木本植物中相关研究报道还比较少。挖掘苹果 AREB 基因并进行功能研究, 可以有效提高果树的抗逆性, 具有重要的理论意义和广泛的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

2015 年 3 月开始, 分别取栽种在山东农业大学园艺科学与工程学院园艺试验站的 5 年生 ‘嘎拉’ 苹果树生长根、幼茎、新生叶、初生花和花后 30 d 的幼果各 3 份作为样品, 液氮冷冻, -80°C 保存, 备用于提取 RNA。

以培养 20 d 的 ‘嘎拉’ 组培苗为试材, 分别用低温 (4°C)、 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理, 3 次生物学重复。于处理 0、1、3、6、12 和 24 h 取样, 用液氮冷冻备用。

1.2 苹果中 *MdAREB2* 表达的 qRT-PCR 分析

采用 RNA plant plus Reagent 试剂盒 (天根) 提取样品的 RNA, 利用反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time, TaKaRa) 获得 cDNA。

采用实时定量 RT-PCR 方法, 以 cDNA 为模板检测苹果中 *MdAREB2* 表达水平。以苹果 18S RNA (上游引物 5'-ACACGGGGAGGTGTGACAA-3', 下游引物 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3') 作为等量上样参照。PCR 分析的特定引物序列 5'-AGTCACTAGTGGTTGTTGTG-3', 5'-TGTACATCCAAT TCACTCAG-3'。

用 UltraSYBR (with ROX) 试剂盒 (康为世纪) 进行实时荧光定量 PCR 分析。20 μ L 反应体系: 2 \times UltraSYBR Mixture 10.0 μ L, 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μ L, 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μ L, cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 7.0 μ L。每样本 3 次技术重复。荧光定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 40 次循环, 每次循环第 3 步进行荧光采集。最后采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行定量数据分析。

1.3 *MdAREB2* 同源性分析

从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索并下载 *MdAREB2* (基因序列号: MDP0000248567) 和拟南芥 AREB 家族蛋白, 通过 MEGA6.0 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树。利用 PlantCare 数据库进行启动子顺式作用元件的预测分析。

1.4 *abi5*/*MdAREB2* 互补株系的获得以及转基因拟南芥半定量 RT-PCR 分析

以 cDNA 为模板设计 *MdAREB2* 的引物进行 PCR 扩增。上游引物: AATGGGGTCT ATTTCAAC TTCAAG, 下游引物: TTACCAAGGGCCTGTCAATGTTC。PCR 产物连接 1256 表达载体, 提取质粒并转化 LBA4404 农杆菌, 用于侵染 *abi5* 拟南芥叶片。参照农杆菌转染拟南芥 (苏玲 等, 2016) 的方法得到拟南芥种子, 经潮霉素抗性筛选获得互补株系。

采用 PCR 和半定量 RT-PCR 对转基因拟南芥进行鉴定, 确定 *MdAREB2* 转入拟南芥 *abi5* 突变体中。用 cDNA 作为模板检测苹果中 *MdAREB2* 的表达水平。根据 *MdAREB2* 设计半定量 RT-PCR 引物。*MdAREB2*-F: 5'-GGTCTCCCTGGCATTTCATGT-3', *MdAREB2*-R: 5'-CACTAATACACGCGCTT TTG-3'。苹果 18S RNA 作为等量上样参照进行半定量 PCR 检测。20 μ L 反应体系为: 2 \times EsTaq MasterMix 10.0 μ L, 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μ L, 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μ L, cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 7.0 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 次循环。

1.5 拟南芥种子萌发率的统计和丙二醛、叶绿素含量的测定

将拟南芥的种子进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理 2 d, 然后分别播种在 MS、MS + 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 MS + 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 的培养基上 (每个拟南芥株系播 40 粒种子), 胚根露出种皮则视为种子已经萌发。每天统计发芽种子数, 统计 7 d。设 3 个生物学重复。

将在 MS 培养基中生长 4 d 的拟南芥野生型、突变体 *abi5* 幼苗、互补株系 *abi5*/*MdAREB2-1* 和 *abi5*/*MdAREB2-2* 分别转接至 MS 和 MS + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 的培养基上, 生长 10 d 后对 4 种株系的幼苗进行丙二醛和叶绿素的测定。丙二醛含量采用硫代巴比妥酸法测定, 叶片叶绿素含量采用 80% 的丙酮提取比色法测定 (刘亚静 等, 2017)。

1.6 试验数据的统计

各数据均 3 次以上重复，取平均值用于分析。采用 R (3.02) 软件进行数据统计分析 (An et al., 2017)。

2 结果与分析

2.1 *MdAREB2* 与拟南芥 AREB 家族蛋白进化树分析

系统进化树分析 (图 1) 表明, *MdAREB2* 与 *AtAREB2* 亲缘关系较近。



图 1 苹果 *MdAREB2* 与拟南芥 AREB 家族蛋白进化树分析

分支处的数值表示支持率。

Fig. 1 Phylogenetic relationship among *MdAREB2* and *Arabidopsis thaliana* AREB protein family

Numbers besides the branches indicate the support rate.

2.2 *MdAREB2* 在‘嘎拉’苹果不同组织中的表达

以‘嘎拉’组苗木的 cDNA 为模板, 采用 qRT-PCR 分析 *MdAREB2* 在不同组织与器官中的表达情况。

结果显示, *MdAREB2* 在苹果的根、茎、叶、花以及果实中都有表达, 其中在根、花和果实中的表达量较高, 在茎和叶中的表达量较低。

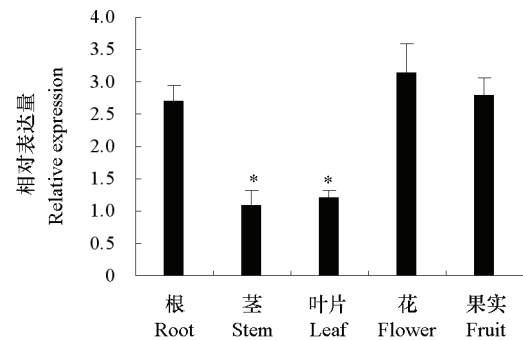


图 2 *MdAREB2* 在苹果不同组织中的表达水平

* 表示与根相比差异显著。

Fig. 2 Expression of *MdAREB2* gene in different tissues of apple

* Asterisks show significant difference compared with the root.

2.3 *MdAREB2* 启动子顺式作用元件分析

对 *MdAREB2* 启动子上顺式作用元件进行分析 (表 1), 其含有多个与抗逆性相关的调控元件 (高温胁迫响应元件 HSE、光响应调控元件 G-Box、低温响应元件 LTR), 表明 *MdAREB2* 可以调控抗逆相关基因的表达。

MdAREB2 基因启动子序列还含有激素响应作用元件 (脱落酸响应元件 ABRE、赤霉素响应元件 GARE-motif), 组织表达相关的调控元件 (分生组织表达响应调控元件 CAT-box、芽的特异表达和光响应 as-2-box), 表明 *MdAREB2* 可能参与脱落酸、赤霉素对植物组织生长发育的调控。

表 1 *MdAREB2* 基因上游调控序列重要顺式作用元件分析
Table 1 Some important *cis*-acting regulatory elements in the upstream regulatory sequence of *MdAREB2*

顺式作用元件 <i>cis</i> -acting regulatory element	位点功能 Function of site	序列 Sequence	位置 Location
5UTR Py-rich stretch	高转录水平响应元件 <i>cis</i> -acting element conferring high transcription levels	TTTCTTCTCT	+ 93
ABRE	脱落酸响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	CGTACGTGCA	- 782 + 912
CAAT-box	启动子增强区域顺式响应作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions	CAATT	+ 149
CAT-box	分生组织表达响应调控元件 <i>cis</i> -acting regulatory element related to meristem expression	GCCACT	+ 160 + 677
HSE	高温胁迫响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in heat stress responsiveness	AAAAAATTTC	- 159 AGAAAATTCG + 472
G-Box	光响应调控元件 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	CACGTT	- 911
LTR	低温响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness	CCGAAA	+ 558
as-2-box	芽的特异表达和光响应 Involved in shoot-specific expression and light responsiveness	GATAATGATG	- 102
GARE-motif	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element	AACAGA	- 98

2.4 *MdAREB2* 对不同胁迫的响应

‘嘎拉’组培苗在 ABA 处理下 1 h 后 *MdAREB2* 的表达量迅速升高, 处理 6 h 时略有下降, 12 h 表达量达到最高水平, 之后表达量降低 (图 3); 在 4℃ 条件下, *MdAREB2* 表达量在处理 6 h 时显著升高 (图 3), 表明 *MdAREB2* 受 ABA 和低温 (4℃) 的诱导。

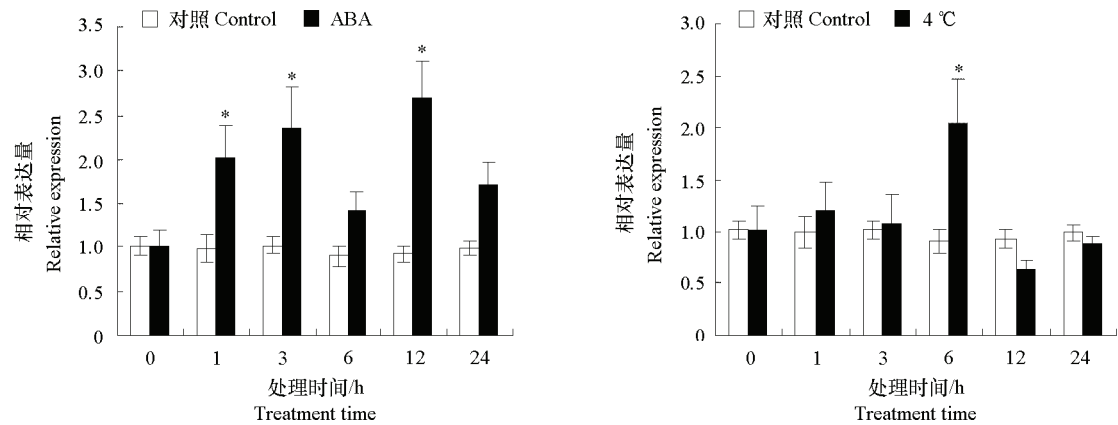


图 3 实时定量 PCR 检测 *MdAREB2* 对 ABA 和 4℃ 的响应

* 表示分别与同期对照相比差异显著。

Fig. 3 Expression analysis of *MdAREB2* gene in response to ABA and 4℃

* Asterisks show respectively significant difference compared with the concurrent control.

2.5 *MdAREB2* 能够恢复拟南芥 *abi5* 突变体萌发阶段对 ABA 的敏感性

在拟南芥中, ABI5 相关 bZIP 转录因子与顺式作用元件 ABA 响应元件 (AREB2) 结合, 能够激活种子中 ABA 介导的基因转录 (Yu et al., 2016)。ABI5 突变体 *abi5* 对 ABA 的响应具有多效缺

陷性，包括对 ABA 抑制种子发芽的敏感性降低 (Finkelstein & Lynch, 2000)。

用半定量方法检测转基因拟南芥苗，证明 *MdAREB2* 转进拟南芥 *abi5* 突变体中 (图 4)。

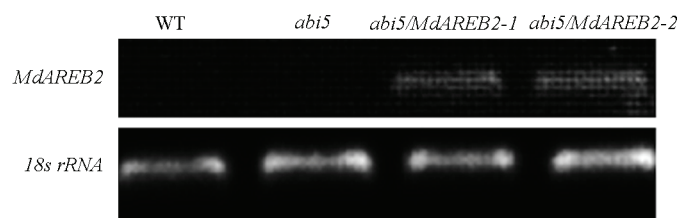


图 4 *MdAREB2* 表达的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *MdAREB2*

将拟南芥突变体 *abi5*、野生型、互补株系 *abi5/MdAREB2-1*、*abi5/MdAREB2-2* 播种在含有不同浓度 ABA 的 MS 培养基上，观察发现，突变体 *abi5* 的萌发对 ABA 不敏感，比野生型萌发快 (图 5)。

当在突变体 *abi5* 中过量表达 *MdAREB2* 时，能够恢复对 ABA 敏感性，萌发速率降低，低于 *abi5* 突变体的萌发率，直到 7 d 才全部萌发 (图 6)。

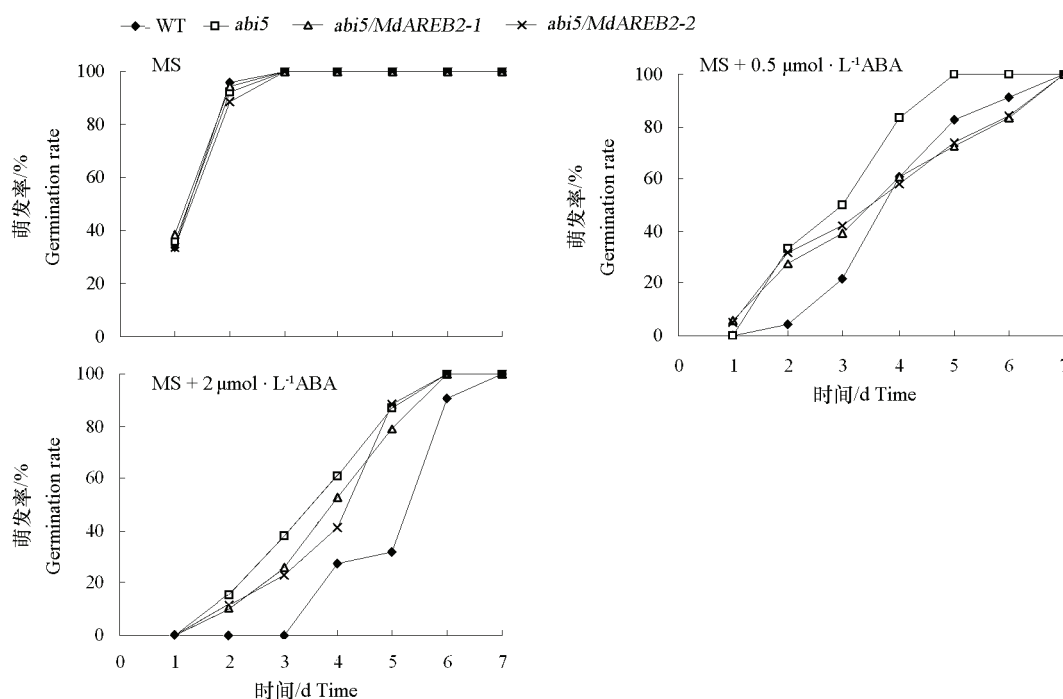


图 5 拟南芥野生型 (WT)、突变体 *abi5*、*abi5/MdAREB2-1*、*abi5/MdAREB2-2* 在 ABA 处理下的种子萌发率

Fig. 5 Germination rate of WT, *abi5*, *abi5/MdAREB2-1*, *abi5/MdAREB2-2* under ABA stress

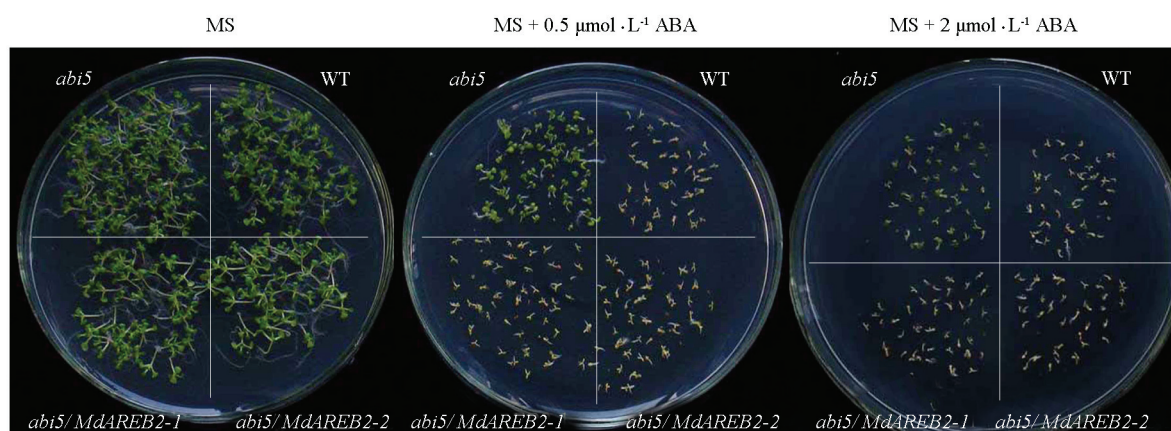


图 6 野生型 (WT)、突变体 *abi5*、*abi5/MdAREB2-1*、*abi5/MdAREB2-2* 在 ABA 处理下 7 d 的萌发情况
Fig. 6 Germination status of 7 d of WT, *abi5*, *abi5/MdAREB2-1*, *abi5/MdAREB2-2* under ABA treatment

2.6 *MdAREB2* 能够部分恢复拟南芥 *abi5* 突变体生长阶段对 ABA 的敏感性

将在 MS 培养基中生长 4 d 的拟南芥野生型、突变体 *abi5* 幼苗、互补株系 *abi5/MdAREB2-1* 和 *abi5/MdAREB2-2* 分别转接至 MS 和 MS + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 的培养基上, 培养 10 d 后观察表型, 发现在 MS 培养基上 4 种幼苗均生长良好, 生长状态相似 (图 7)。在 MS + ABA 培养基上野生型生长较弱, 叶片较小, 根长较短; 与野生型相比 *abi5* 突变体对 ABA 敏感性较弱, 生长较好; 在 *abi5* 突变体中过量表达 *MdAREB2* 的植株生长变弱 (图 7)。

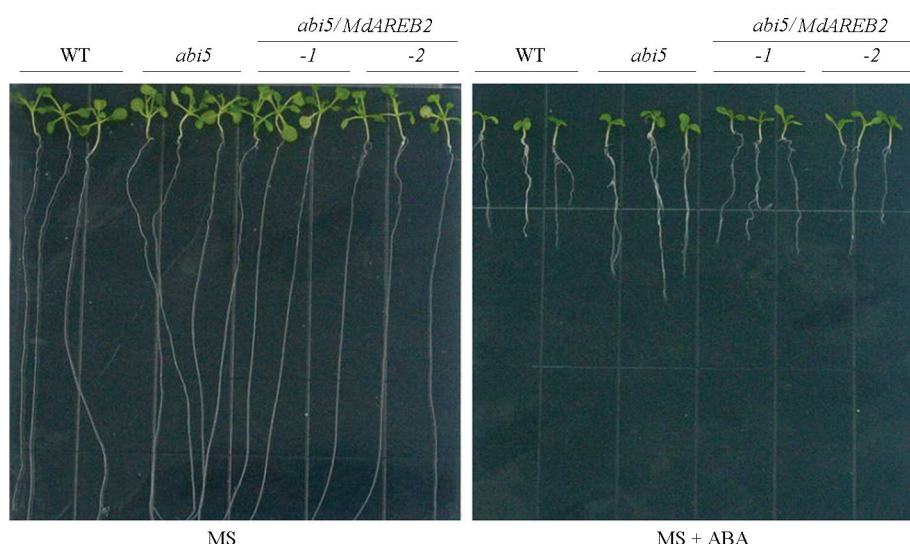


图 7 拟南芥野生型 (WT)、突变体 *abi5*、*abi5/MdAREB2-1*、*abi5/MdAREB2-2* 幼苗在 ABA 处理下的生长情况
Fig. 7 Growth status of WT, *abi5*, *abi5/MdAREB2-1*, *abi5/MdAREB2-2* under ABA stress

对 4 种幼苗的丙二醛、叶绿素含量进行测量, 结果表明: 4 个株系在 ABA 处理下的 MDA 含量都高于未经 ABA 处理, 叶绿素含量都低于未经 ABA 处理。在 ABA 处理下 *abi5* 突变体 MDA 含量低于互补株系和野生型; *abi5* 突变体叶绿素含量高于互补株系和野生型 (图 8)。结果表明在生长阶段 *abi5* 突变体中过量表达 *MdAREB2* 能够部分恢复 *abi5* 突变体在生长阶段对 ABA 的敏感性。

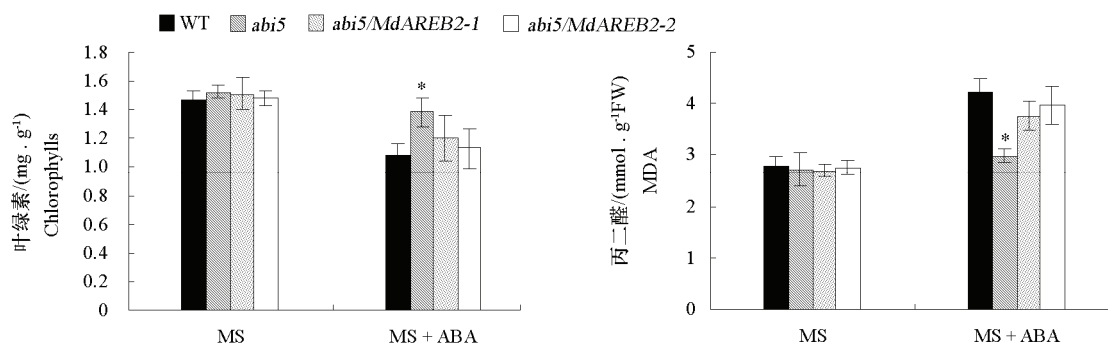


图 8 拟南芥野生型 (WT)、突变体 *abi5*、*abi5/MdAREB2-1*、*abi5/MdAREB2-2* 幼苗在 ABA 处理下丙二醛和叶绿素含量

* 表示与野生型 (WT) 相比差异显著。

Fig. 8 MDA and chlorophylls contents of WT, *abi5*, *abi5/MdAREB2-1*, *abi5/MdAREB2-2* under ABA stress

* Asterisks show the significant difference compared with the wild type (WT).

3 讨论

本研究中以 *MdAREB2* 为研究对象, 进化树分析表明 *MdAREB2* 与 *AtAREB2* 具有很高的同源性。定量 PCR 分析表明 *MdAREB2* 在 ABA 处理后, 表达量迅速升高, 表明其受 ABA 诱导, 与前人的研究结果 (Huang et al., 2010; 庞少萍 等, 2017) 一致。本研究中发现 *MdAREB2* 在苹果组织中特异性表达, 这与前人的研究结果 (Hossain et al., 2010; Orellana et al., 2010) 一致。不同的 bZIP 类转录因子在植物不同组织中表达存在差异。许多植物 bZIP 类转录因子在根中组成型表达, 在茎和叶片的表达量很少或没有表达 (Zhang et al., 2008)。本研究中发现 *MdAREB2* 在根、花、果实中的表达量较高, 在茎和叶片的表达量较低, 表明 *MdAREB2* 可能参与根、花、果实的生长发育调控。

以前的研究发现在拟南芥中过量表达 bZIP 转录因子 ABF3 和 ABF4 / AREB2, ABA 处理后生长受到抑制 (Kang et al., 2002)。Yang 等 (2011) 发现水稻中 ABL1 (ABI5-Like1) 转录因子定位核内, ABL1 与拟南芥 ABI5 同源, 结合 ABRE 元件调控 ABA 途径和生长素响应途径, *abl1* 突变体中 ABA 敏感性被抑制。植物 bZIP 类转录因子在 ABA 信号途径中起着调控作用。过量表达 bZIP 类转录因子 A 类亚家族成员中 ABF2/AREB1、ABF3 和 ABF4 / AREB2, 该转基因植物对 ABA 敏感, 说明这些基因是 ABA 调控信号中的正调控因子 (Fujita et al., 2005)。本研究中发现拟南芥的突变体 *abi5* 对 ABA 敏感性被抑制, 在萌芽阶段, 在 *abi5* 突变体中过量表达 *MdAREB2* 能够恢复 *abi5* 突变体对 ABA 敏感性, 萌发速率降低, 低于 *abi5* 突变体的萌发率。生长阶段 MS + ABA 培养基上野生型生长较弱, 叶片较小, 根长较短。与野生型相比 *abi5* 突变体对 ABA 敏感性较弱, 生长较好。当在 *abi5* 突变体中过量表达 *MdAREB2* 植株生长变弱。表明在幼苗生长阶段 *abi5* 突变体中过量表达 *MdAREB2* 能够部分恢复 *abi5* 突变体在生长阶段对 ABA 的敏感性。

植物 bZIP 转录因子在植物的生命过程中具有十分重要的作用, 它们不仅参与植物的生长发育

过程, 包括种子形成、花发育和植物衰老等, 并且可以调控抗逆相关基因的表达, 提高植物的抗逆性(张计育 等, 2011)。烟草 bZIP 转录因子参与植物营养生长到生殖生长的过渡, 参与生长素反应和病原菌侵染反应。本研究中对 *MdAREB2* 启动子顺式作用元件进行分析, 发现 *MdAREB2* 启动子上含有多个与抗逆性相关的调控元件(高温胁迫响应元件 HSE、光响应调控元件 G-Box、低温响应元件 LTR), 表明 *MdAREB2* 可以调控抗逆相关基因的表达。*MdAREB2* 基因启动子序列还含有激素响应作用元件(脱落酸响应元件 ABRE、赤霉素响应元件 GARE-motif), 组织表达相关的调控元件(分生组织表达响应调控元件 CAT-box、芽的特异表达和光响应 as-2-box), 表明 *MdAREB2* 可能参与脱落酸、赤霉素对植物组织生长发育的调控。

AREB 参与的 ABA 信号网络系统, 极大的促进了植物抗逆基因工程分子基础的研究。另外, 与过量表达个别功能基因相比, 在作物体内过量表达一个转录因子是提高作物抗逆性更有效的方法和途径。因此, 对 AREB/ABF 类转录因子在信号转导中的作用机理进行深入的研究, 为利用转录因子进行植物抗逆基因工程改良提供了理论依据, 具有广泛的应用前景。

References

- An J P, Wang X N, Yao J F, Ren Y R, You C X, Wang X F, Hao Y J. 2017. Apple MdMYC2 reduces aluminum stress tolerance by directly regulating *MdERF3* gene. *Plant and Soil*, 418: 255 - 266.
- Bensmihen S, Rippa S, Lambert G, Jublot D, Pautot V, Granier F, Parcy F. 2002. The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *The Plant Cell*, 14 (6): 1391 - 1403.
- Finkelstein R R, Lynch T J. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell*, 12 (4): 599 - 609.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez M M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17 (12): 3470 - 3488.
- Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K. 2013. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia plantarum*, 147 (1): 15 - 27.
- Hong Lan, Liu Xiu, Li Ling. 2011. AREB/ABF transcription factors and their involvement in ABA signal transduction. *Plant Physiology Journal*, 47 (3): 211 - 217. (in Chinese)
- 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.
- Hossain M A, Cho J I, Han M, Ahn C H, Jeon J S, An G, Park P B. 2010. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice. *Journal of Plant Physiology*, 167 (17): 1512 - 1520.
- Huang X S, Liu J H, Chen X J. 2010. Overexpression of *PtrABF* gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology*, 10 (1): 230.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F. 2002. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 7 (3): 106 - 111.
- Kang J Y, Choi H I, Im M Y, Kim S Y. 2002. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 14 (2): 343 - 357.
- Lee S C, Choi H W, Hwang I S, Choi D S, Hwang B K. 2006. Functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor, CAbZIP1, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses. *Planta*, 224 (5): 1209 - 1225.
- Liu Ya-jing, Ma Qi-jun, Li Hao-hao, Lu Jing, Hao Yu-jin, You Chun-xiang. 2017. Molecular cloning and functional characterization of *MdCBL3* in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (1): 1 - 10. (in Chinese)
- 刘亚静, 马齐军, 李浩浩, 路 静, 郝玉金, 由春香. 2017. 苹果 *MdCBL3* 基因的克隆与功能鉴定. *园艺学报*, 44 (1): 1 - 10.
- Ma Yan-lin, Ma Jian-zhong, Wang Yong-gang. 2014. Molecular cloning, prokaryotic expression and purification of *abi5* gene from *Arabidopsis*

- thaliana* L. *Plant Physiology Journal*, 50 (2): 185 - 191. (in Chinese)
- 马燕林, 马建忠, 王永刚. 2014. 拟南芥 *abi5* 基因的分子克隆及其在原核细胞中的表达和纯化. *植物生理学报*, 50 (2): 185 - 191.
- Nijhawan A, Jain M, Tyagi A K, Khurana J P. 2008. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiology*, 146 (2): 333 - 350.
- Orellana S, Yañez M, Espinoza A, Verdugo I, González E, Ruiz-Lara S, Casaretto J A. 2010. The transcription factor SlAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, Cell & Environment*, 33 (12): 2191 - 2208.
- Pang Shao-ping, Dong Cui-cui, Ma Yan-yan, Qian Chun, He Shao-lan, Xie Rang-jin, Deng Lie. 2017. The roles of two CsAREB transcription factors in the development of citrus fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (3): 441 - 451. (in Chinese)
- 庞少萍, 董翠翠, 马岩岩, 钱 春, 何绍兰, 谢让金, 邓 烈. 2017. CsAREB 转录因子在柑橘果实发育中的作用. *园艺学报*, 44 (3): 441 - 451.
- Rodriguez-Urbe, Laura, Mary A, O'connell. 2006. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). *Journal Of Experimental Botany*, 57 (6): 1391 - 1398.
- Sato R, Fujita Y, Nakashima K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 45 (3): 309 - 317.
- Su Ling, Wang Shu-hui, Hao Yu-jin, Wang Xiao-fei, You Chun-xiang. 2016. Molecular cloning and functional characterization of the ethylene signaling related gene *MdEIL1* in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (3): 409 - 418. (in Chinese)
- 苏 玲, 王淑惠, 郝玉金, 王小非, 由春香. 2016. 苹果乙烯信号转导相关基因 *MdEIL1* 的克隆及功能鉴定. *园艺学报*, 43 (3): 409 - 418.
- Sun Ming-yue, Zhou Jun, Tan Qiu-ping, Fu Xi-ling, Chen Xiu-de, Li Ling, Gao Dong-sheng. 2016. Analysis of basic leucine zipper genes and their expression during bud dormancy in apple (*Malus × domestica*). *Scientia Agricultura Sinica*, 49 (7): 1325 - 1345. (in Chinese)
- 孙明岳, 周 君, 谭秋平, 付喜玲, 陈修德, 李 玲, 高东升. 2016. 苹果 bZIP 转录因子家族生物信息学分析及其在休眠芽中的表达. *中国农业科学*, 49 (7): 1325 - 1345.
- Yang X, Yang Y N, Xue L J, Zou M J, Liu J Y, Chen F, Xue H W. 2011. Rice ABI5-Like1 regulates abscisic acid and auxin responses by affecting the expression of ABRE-containing genes. *Plant Physiology*, 156 (3): 1397 - 1409.
- Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, Mogami J, Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi Shinozaki, Kazuko. 2015. Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 38 (1): 35 - 49.
- Yu Y, Wang J, Shi H, Gu J, Dong J, Deng X W, Huang R. 2016. Salt stress and ethylene antagonistically regulate nucleocytoplasmic partitioning of COP1 to control seed germination. *Plant Physiology*, 170 (4): 2340 - 2350.
- Zhang Ji-yu, Qu Shen-chun, Gu Zhong-ren, Du Xiao-li, Du Bei-bei, Zhang Zhen. 2011. Biology function of bZIP transcription factors in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia*, 31 (5): 1066 - 1075. (in Chinese)
- 张计育, 渠慎春, 郭忠仁, 杜小丽, 都贝贝, 章 镇. 2011. 植物 bZIP 转录因子的生物学功能. *西北植物学报*, 31 (5): 1066 - 1075.
- Zhang Y, Zhang G, Xia N, Wang X J, Huang L L, Kang Z S. 2008. Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73 (4): 88 - 94.