

# 苹果 MdCYP707A 家族基因表达分析和 *MdCYP707A1* 的功能鉴定

张婷婷, 康 慧, 付璐璐, 由春香, 王小非\*, 郝玉金\*

(作物生物学国家重点实验室, 山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 对苹果 MdCYP707A 家族 4 个成员的蛋白序列进行比对, 并进行保守结构域分析发现, MdCYP707A 家族成员都含有细胞色素 P450 单加氧酶结构域。利用荧光定量 PCR 检测其在苹果不同组织(根、茎、叶、花、果实、种子)中的表达, 4 个基因在种子中的表达量最高, 并且在果实发育不同时期的表达量有明显差异。在苹果种子吸水膨胀和层积过程中的表达分析表明, MdCYP707A 家族成员参与了种子萌发过程中 ABA 的降解。通过检测 *MdCYP707A* 基因对不同非生物胁迫(干旱、盐、渗透胁迫)和对 ABA 的响应, 初步认为其在种子萌发中有重要作用, 其中, *MdCYP707A1* 对 ABA 的响应最为明显。另外, 利用农杆菌介导的遗传转化的手段, 鉴定了 *MdCYP707A1* 基因在苹果愈伤组织和拟南芥中的功能, 过表达 *MdCYP707A1* 能够降低对非生物胁迫的抗性, 说明其可能参与 ABA 的降解过程, 同时在拟南芥中异源表达 *MdCYP707A1* 能够提高拟南芥种子的萌发率。

**关键词:** 苹果; MdCYP707A 家族基因; ABA; 非生物胁迫; 表达分析

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2019) 08-1429-16

## Expression Analysis of Apple MdCYP707A Family Genes and Functional Characterization of *MdCYP707A1*

ZHANG Tingting, KANG Hui, FU Lulu, YOU Chunxiang, WANG Xiaofei\*, and HAO Yujin\*

(State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** In this study, we analyzed the protein sequences and conserved motif of four apple MdCYP707A family members, and found that the four MdCYP707A family proteins contained a cytochrome P450 monooxygenase domain. The expression levels of the four genes in different tissues (roots, stems, leaves, flowers, fruits, and seeds) were detected by real-time qPCR, and they exhibited the highest level in the seeds. The expression pattern of *MdCYP707As* also showed significant difference during fruit developmental stages. We also examined the transcription level of the MdCYP707A family members in the process of water swelling and stratification of apple seeds, and found that the MdCYP707A

**收稿日期:** 2018-12-28; **修回日期:** 2019-06-24

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31430074)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xfwang2004@163.com, haoyujin@sdau.edu.cn)

family members were involved in the degradation of ABA during seed germination. Furthermore, the response of *MdCYP707A* genes to abiotic stresses (such as drought, salt, osmotic stress) and ABA treatments indicated their important roles in seed germination, among them, the response to ABA is most obvious. In addition, the function of *MdCYP707A1* gene was identified through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to apple calli and *Arabidopsis*. The results demonstrated that overexpression of *MdCYP707A1* reduced the resistance to abiotic stress, which suggests that it may be involved in ABA degradation, and ectopic expression of *MdCYP707A1* in *Arabidopsis* increased the germination rate.

**Keywords:** apple; MdCYP707A family gene; ABA; abiotic stress; expression analysis

种子休眠是植物躲避恶劣环境的防御机制, 避免种子在逆境条件下萌发(付婷婷等, 2009)。种子休眠受多种环境因素(如光照、温度、水分等)和激素等的共同调控(Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein et al., 2008)。已经有研究表明, 赤霉素(GA)和脱落酸(ABA)的相对含量是调节种子休眠和种子萌发的关键因素(Bewley et al., 2013; Tuan et al., 2018)。ABA作为植物生长的负调节剂(余萍等, 2017), 在调控植物生长发育、响应生物和非生物胁迫以及控制种子萌发等方面发挥重要的作用(Nambara & Marion-Poll, 2005; Verslues & Zhu, 2007; Huang et al., 2017)。近年来, ABA信号途径介导种子萌发的研究取得了一定的进展(Holdsworth et al., 2008; Shu et al., 2016)。有研究表明, ABA合成和代谢信号途径的动态平衡是决定种子休眠或萌发的关键, 在种子休眠过程中, ABA的合成速率大于ABA降解速率, 而在种子萌发过程中, ABA的降解速率大于ABA合成速率, 且赤霉素的积累量大于ABA的积累量, 诱导种子萌发(Leng et al., 2014)。

ABA合成途径已经研究的比较清楚, 在这个过程中, ABA受体PYR/PYL/RCAR、蛋白磷酸酶PP2Cs、蛋白激酶SnRK2s等核心组分以及其他的转录因子发挥重要作用(Hauser et al., 2011; Rushton et al., 2012)。而ABA降解途径中的酶、基因及相关组分的研究还不是很清楚(Cutler & Krochko, 1999; Zeevaart, 1999)。近些年的研究表明, 高等植物体内的ABA失活途径主要是氧化失活(Cutler & Krochko, 1999; Zhou et al., 2004; Nambara & Marion-Poll, 2005), 其过程是ABA的第8位甲基被羟基替代, 生成8'-OH-ABA, 羟基化的ABA不能稳定存在, 极易自发异构化生成红花菜豆酸(phaseic acid, PA), 并最终被还原成无生物活性的二氢红花菜豆酸(dihydrophaseic acid, DPA), 参与该途径的关键酶是8'-羟化酶(8'-hydroxy lase)(Saito et al., 2004), 该酶属于细胞色素P450单加氧酶(Krochko et al., 1998), 它可以调控植物的生长发育, 提高植物对环境胁迫的耐受性(李茜茜, 2009)。外施ABA可以诱导8'-羟化酶的活性, 反馈调节植物体内ABA含量的升高, 从而参与到细胞色素依赖的ABA信号降解途径(Cutler et al., 1997; Krochko et al., 1998; Cutler & Krochko, 1999; Ren et al., 2007)。

王东岭等(2016)在油桃中克隆了3个ABA 8'-羟化酶CYP707A家族成员(*PpCYP707A1*、*PpCYP707A2*和*PpCYP707A3*), 以桃的花芽休眠为切入点, 证明CYP707A家族成员参与木本植物芽的休眠过程。另有研究表明, CYP707A基因(*HvABA8'OH-1*)表达量的降低, 促进了大麦种子的休眠, 而在种子后熟阶段, CYP707A基因上调, 缓解种子休眠(Millar et al., 2006; Gubler et al., 2008), 说明CYP707A基因也参与了种子休眠的调控。松柏等裸子植物、胚休眠的蔷薇科和一些种壳休眠的草本植物等的种子从休眠到解除休眠的过程中, 低温层积也是必不可少的过程。为了研究与解除休眠相关的转录途径, Leida等(2012)发现胚胎中低温依赖性表达相关的基因参与了桃的花蕾休眠。而在层积打破休眠的过程中, 种子中ABA的含量显著下降, 与ABA分解代谢相关的基

因上调, 说明短期的低温可能依赖 ABA 途径促进萌发。在吸胀休眠态的花生种子中, *AhCYP707A1* 的表达量降低, 而种子在解除休眠过程中, *AhCYP707A1* 的表达显著上调 (陈静 等, 2015)。

尽管 CYP707A 家族基因参与花芽和种子休眠的解除已有报道, 但在苹果中有关休眠解除的研究和机理还很少。本研究从苹果种子休眠的角度出发, 以‘皇家嘎拉’苹果为试材, 克隆了苹果的 *MdCYP707A1* 基因, 通过遗传转化获得了转基因的苹果愈伤组织和异源表达的拟南芥, 鉴定了该基因在非生物胁迫以及休眠种子中的功能, 为进一步深入研究 8'-羟化酶在木本植物休眠中的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与处理方法

本研究所用的 7 年生自根‘皇家嘎拉’苹果种植在山东农业大学南校区国家苹果工程中心 (山东泰安)。种植区春季干燥多风, 夏季炎热多雨, 秋季晴和气爽, 冬季寒冷少雪; 年平均气温 13 °C, 7 月气温最高, 平均 26.4 °C, 1 月最低, 平均 -2.6 °C; 年降水量 700 mm 左右。2017 年 5 月取‘皇家嘎拉’苹果同一株树的新生根、当年生新梢及梢部叶片、盛花期花序、盛花后 60 d 的果实以及不同发育时期 (花后 30、60 和 90 d) 的种子各 3 份, 液氮冷冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

将晒干的‘皇家嘎拉’苹果成熟种子进行吸水膨胀和 4 °C 层积处理, 分别在 0、3、12、24 和 48 h 以及 0、10、20、30 和 40 d 取样, 提取 RNA, 以反转录的 cDNA 为模板, 依据 MdCYP707A 基因各个成员的特异序列设计定量引物, 检测各基因的表达量。

将在固体培养基 [MS + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> IAA + 30 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 7.5 g · L<sup>-1</sup> 琼脂 (pH 6.0)] 上生长 35 d 的‘皇家嘎拉’组培苗, 分别放在含有 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl (盐胁迫)、3% PEG6000 和 100 mmol · L<sup>-1</sup> 甘露醇 (PEG 和甘露醇模拟渗透胁迫) 的营养液中水培处理, 在 0、6、12 和 24 h 取样; 同一批组培苗, 用脱落酸 (ABA, 100 μmol · L<sup>-1</sup>) 处理, 在 0、1、3、9 和 24 h 取样。取样时茎和叶一同剪碎, 液氮速冻备用。组培苗的培养条件为光 (16 h) 暗 (8 h) 交替, 温度 26 °C。

用于转基因验证的‘王林’苹果愈伤组织所用培养基为 [MS + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D + 30 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 7.5 g · L<sup>-1</sup> 琼脂 (pH 5.8)], 暗培养, 温度 26 °C, 两周继代 1 次。

拟南芥所用材料为 Col-0 (哥伦比亚生态型), 所用培养基为 [1/2MS + 10 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 7.5 g · L<sup>-1</sup> 琼脂 (pH 5.7)], 生长条件为光 (16 h) 暗 (8 h) 交替, 温度是 20 °C。

### 1.2 植物 DNA 的提取、总 RNA 的提取和荧光定量 PCR 分析

RNA 的提取参照 RNA plant plus Reagent 试剂盒 (天根), 用反转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa) 进行反转录, 所得的 cDNA 用于后续的荧光定量 PCR 的模板。以 18S RNA 为内参基因, 其正向引物为 5'-ACACGGGGAGGTAGTGACAA-3', 反向引物为 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3', qRT-PCR 所用的荧光染料为 UltraSYBR Mixture (with ROX), 反应体系中各反应物的量如下: 2× UltraSYBR Mixture 10.0 μL, 上游引物 (10 mmol · L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, 下游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, cDNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.0 μL, 共 20 μL。每个模板 3 次生物学重复。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 15 s, 65 °C 延伸 10 s, 40 次循环。最后采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法进行定量数据分析。PCR 所用引物在表 1 中列出。

拟南芥 DNA 的提取采用 CTAB 法（余海霞 等，2016）。

表 1 基因克隆和定量 PCR 所用引物  
Table 1 Primers used for gene cloning and quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
MdCYP707A1(MDP0000859733)(qRT)	F: GGCAAGCAAAGAGAGGATGTT; R: ATGGATTCAATGTCAGGGATG
MdCYP707A2(MDP0000326412)(qRT)	F: GCAATAAAAGAGTCGGTCTCAGA; R: CAAGTGGGGAGAAGATTGATAAC
MdCYP707A3(MDP0000291544)(qRT)	F: TCACTTGTTCAAGCCACGT; R: CCAAATTCGAATAATATCAAGGG
MdCYP707A4(MDP0000037814)(qRT)	F: GTTCAAACCCACATACCCAAA; R: CTTTTCGTCCTTCAGCCCAT
MdCYP707A1 (MDP0000859733)	F: GTCGACATGGAGCTGAATCTCCTAACTCC; R: GAATTCGGAGTATTATGGGGTTATATGA
MdCYP707A1 (MDP0000859733) Anti	F: GAATTCCTCTCACAACACTACTGGTTGTT; R: GTCGACACAGATGGGCTCGAGAAAGCACG

### 1.3 基因克隆和载体构建

从拟南芥网站(<http://www.arabidopsis.org/>)上搜索到 4 个 *AtCYP707A* 基因,并通过 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对,获得苹果 4 个 *MdCYP707A* 基因,ABA 处理的组培苗的表达分析表明, *MdCYP707A1* 对 ABA 响应最明显,因此,克隆了 *MdCYP707A1* 的编码区,所用引物见表 1。以反转录的‘皇家嘎拉’的 cDNA 为模板,利用 HiFi 高保真酶进行 PCR 扩增。反应体系 25  $\mu\text{L}$ : 17.25  $\mu\text{L}$  无菌 ddH<sub>2</sub>O, 0.25  $\mu\text{L}$  酶, 2  $\mu\text{L}$  HiFi buffer II, 2.5  $\mu\text{L}$  dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  模板, 正、反向引物各 1  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  后延伸 10 min。

PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,将目的基因片段切下进行胶回收,连接克隆载体 pMD18-T 后测序,将测序正确的 *MdCYP707A1* 和 *MdCYP707A1-Anti* 提质粒,分别用 *Sal* I -*Eco*R I 和 *Eco*R I -*Sal* I 进行双酶切,并同时酶切过表达载体 pRI101,利用 T4 连接酶,16  $^{\circ}\text{C}$  将两者过夜连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素抗性板上筛选阳性克隆,获得过表达载体的质粒。

### 1.4 蛋白保守结构域和进化树分析

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库网站上下载苹果、拟南芥、水稻的 CYP707A 家族基因的蛋白序列。通过 NCBI 网站和 DNAMAN 软件进行蛋白保守结构域分析。MEGA7.0 软件 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

### 1.5 农杆菌介导的苹果愈伤组织和拟南芥的遗传转化

苹果愈伤组织的侵染参照 Hu 等 (2012) 的方法。将培养 15 d 状态一致的‘王林’愈伤组织浸泡在菌液 OD 值为 0.8 ~ 1.0 的侵染液中,在暗处摇床 (120  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 培养 15 ~ 20 min 后滤出,吸干残留的菌液,放在空的固体 MS 培养基上暗适应 2 d,将其均匀地铺在含有 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  头孢霉素和 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素抗性板上筛选 30 d 左右,多次侵染,直到获得转基因愈伤组织(提取 RNA,荧光定量 PCR 检测)。继代 3 ~ 4 代,利用稳定遗传的转基因材料进行后续试验。

拟南芥的遗传转化参照 Clough & Bent (1998) 的方法。将侵染获得的 T<sub>0</sub> 代拟南芥种子进行消毒处理,消毒方法为 70%的无水乙醇 5 min, 2%次氯酸钠溶液 8 min, 无菌水清洗 5 ~ 7 遍后,将其均匀铺在含有 60  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素的 1/2MS 固体培养基上,4  $^{\circ}\text{C}$  春化 2 ~ 3 d, 筛选 10 ~ 15 d, 将成活幼苗转移到基质中,收获 T<sub>1</sub> 代种子,反复筛选 3 代,直到获得纯合的 T<sub>3</sub> 代种子。提取 DNA, 用半定量方法检测是否为转基因株系。

## 1.6 苹果愈伤组织的表型观察和相关生理指标检测

将状态一致的野生型、MdCYP707A1 以及 MdCYP707A1-Anti 的转基因‘王林’苹果愈伤组织, 团成球体 (大小一致), 同时放在 MS、100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl、3% PEG6000、100 mmol · L<sup>-1</sup> 甘露醇培养基上处理 20 d, 观察拍照。

愈伤组织鲜质量的获得: 用天平称取不同处理的愈伤组织的鲜质量。

相对电导率的测定: 用去离子水冲洗 3 次愈伤组织, 吸干表面的水分, 快速称取鲜质量为 0.1 g 的 3 份样品, 分别置于含有 10 mL 纯净水的试管中, 盖上塞子, 在常温 (25 °C) 下静置 2 h, 用相对电导率仪 (Mettler Toledo Inlab<sup>®</sup> 738) 测定浸提液的电导率 (R0, μS · cm<sup>-1</sup>), 然后再在沸水浴中煮沸 0.5 h, 混匀, 冷却至室温, 测定此时的电导率为 R1, 计算相对电导率 (%) = R0/R1 × 100。

苹果愈伤组织中丙二醛 (MDA) 含量的测定采用硫代巴比妥酸法 (赵世杰 等, 1994)。

## 1.7 过表达拟南芥萌发率的统计

将同一时间段收获的具有相同萌发活力的 Col-0、MdCYP707A1 (OX-2、OX-4、OX-6) 拟南芥种子, 用 1.5 节的方法进行种子消毒, 将其春化 3 d 后, 用无菌牙签点播在含有 0、0.5 和 2.0 μmol · L<sup>-1</sup> ABA 的固体培养基上, 在光照 16 h, 黑暗 8 h, 温度 20 °C 条件的光照培养箱中培养, 分别在 12、24、36、48、60 和 72 h 统计种子萌发率, 所有观察均在显微镜下进行。并在光下 4 d 时进行表型观察和拍照。

## 1.8 数据统计与分析

以上试验结果至少 3 次生物学重复。数据分析采用 Data Processing System (DPS 7.55) 软件, 显著性差异分析采用 Tukey 方法。

# 2 结果与分析

## 2.1 MdCYP707A 家族基因的亲缘关系和蛋白保守结构域分析

通过拟南芥网站 (<http://www.arabidopsis.org/>) 找到拟南芥中 CYP707A 家族的 4 个基因, 利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 与拟南芥中的 AtCYP707A 基因比对, 获得苹果中的 MdCYP707A 基因序列 MdCYP707A1 (MDP0000859733)、MdCYP707A2 (MDP0000326412)、MdCYP707A3 (MDP0000291544) 和 MdCYP707A4 (MDP0000037814)。

在 DNAMAN 软件上对 MdCYP707A 家族基因进行比对, 并通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对其蛋白保守结构域进行分析。结果发现苹果中的 CYP707A 家族基因都含有细胞色素 P450 单加氧酶结构域, 通过 InterPro 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) 和 ExPASy 软件 (<https://prosite.expasy.org>) 预测该结构域的保守氨基酸序列为 FGXGXHXCPG (图 1)。

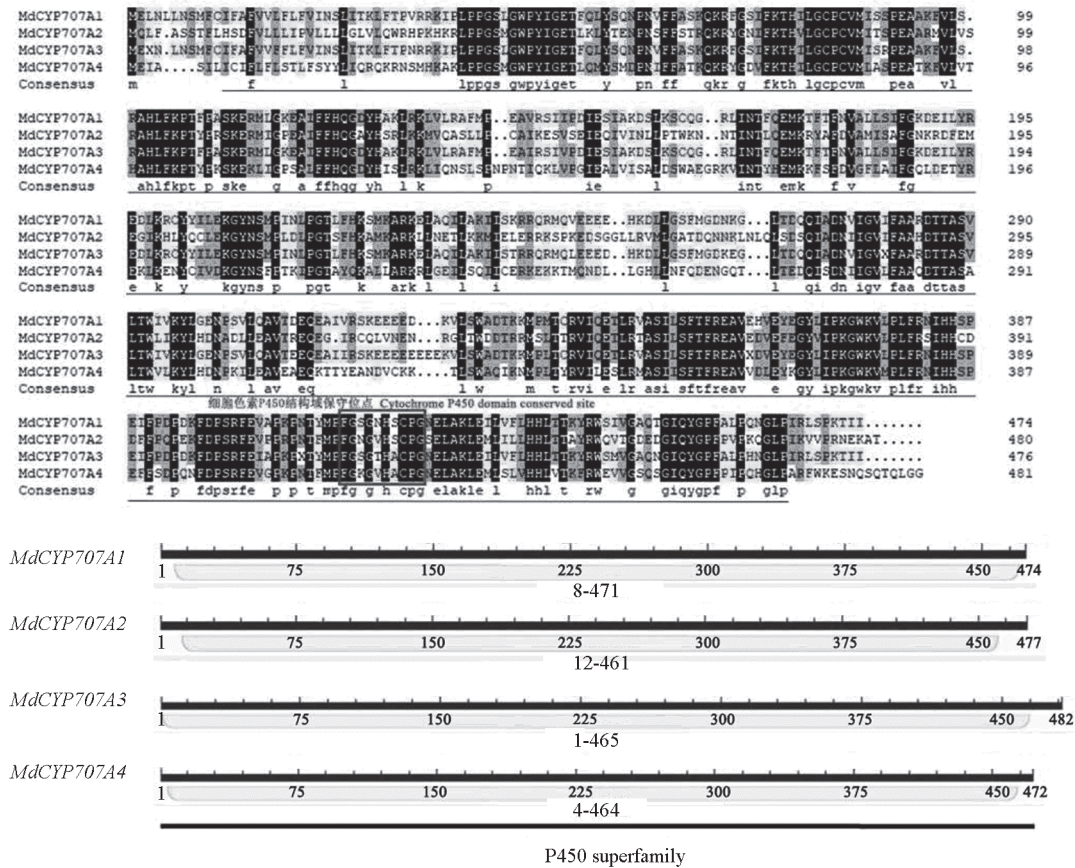


图 1 苹果 MdCYP707A 家族基因蛋白保守结构分析

Fig. 1 Analysis of the conserved domains of the apple MdCYP707A family

将 MdCYP707A 家族基因的蛋白序列与拟南芥、水稻等不同物种的 CYP707A 家族基因进行同源关系分析并构建进化树。结果（图 2）显示，苹果的 MdCYP707A 与拟南芥的 AtCYP707A 的亲缘关系都比较近。

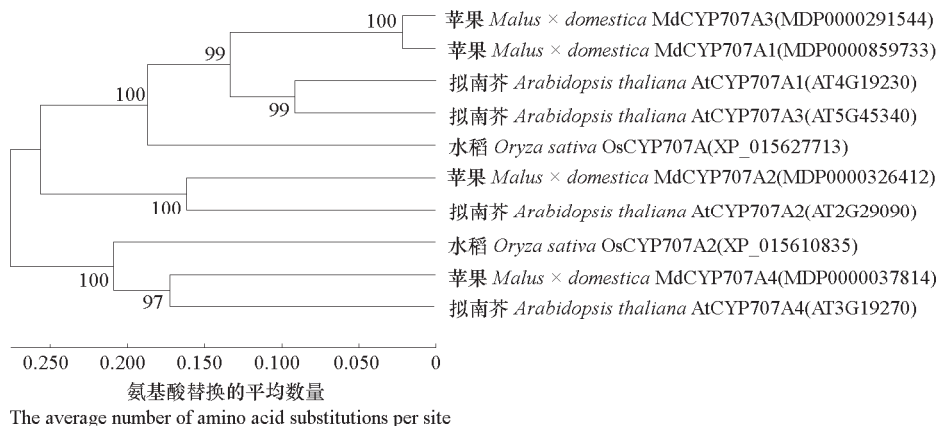


图 2 苹果 MdCYP707A 与拟南芥、水稻 CYP707A 家族基因蛋白的进化树分析

分支上的数值表示自展值。

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis among MdCYP707A, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* CYP707A family proteins

The numbers on the branch represent the Bootstrap value.



2.2 MdCYP707A 在苹果各组织中的表达

实时荧光定量 PCR 的结果表明, MdCYP707A 在‘皇家嘎拉’苹果各个组织中均有表达 (图 3); 同时在种子成熟的不同阶段也有表达 (图 4)。

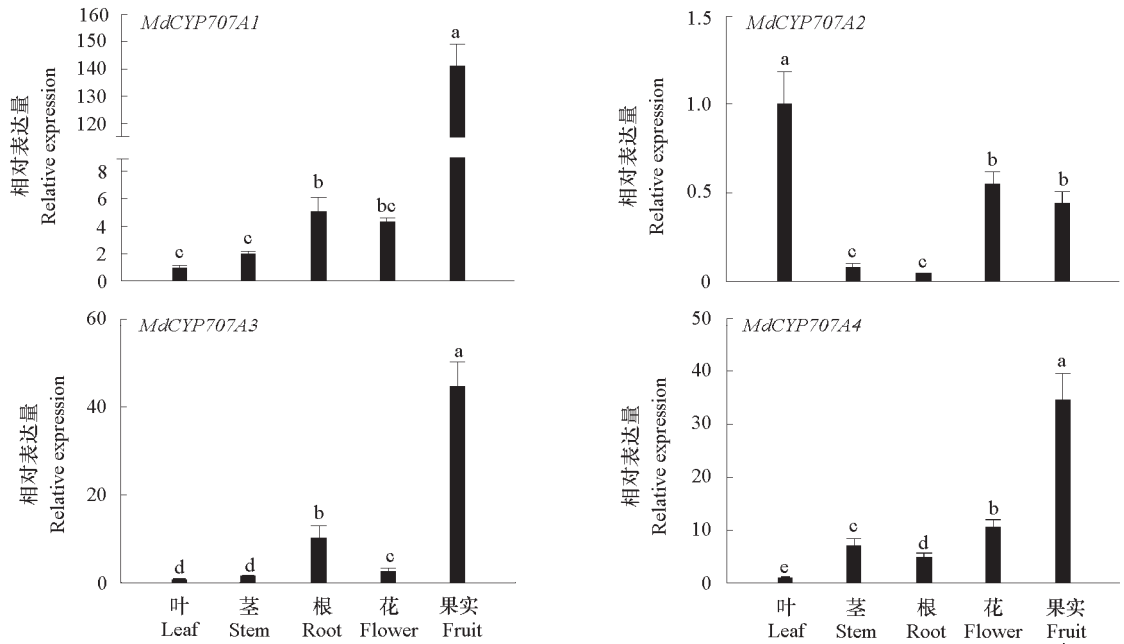


图 3 荧光定量 PCR 检测 ‘皇家嘎拉’ 苹果 MdCYP707A 在根、茎、叶、花和果实中的表达

不同字母表示处理间差异显著,  $P < 0.05$ 。下同。

Fig. 3 Expression analysis of MdCYP707A genes in root, shoot, leaf, flower and fruit of ‘Royal Gala’ apple with fluorescence quantitative PCR  
The same letters were not significantly different,  $P < 0.05$ . The same below.

其中 MdCYP707A1 在花后 60 d 的种子中表达量最高, 在花后 120 d 显著下降; 而 MdCYP707A2、MdCYP707A3、MdCYP707A4 则主要在花后 30 d 表达 (图 4)。因为 MdCYP707A 家族成员主要参与 ABA 的分解代谢, 因此以上结果说明, 苹果 MdCYP707A 家族成员也可能参与种子成熟过程中 ABA 代谢的调控, 进而调控种子休眠。

2.3 MdCYP707A 在苹果种子吸水膨胀和层积过程中的表达

在苹果种子吸水膨胀的各时间段内 (图 5, A), MdCYP707A2 的表达量上调幅度最大, 均为 0 h 的 100 倍以上, 在 12 h 时表达量最高, 达到了 150 倍; MdCYP707A1 和 MdCYP707A3 在种子吸水后 24 h 表达量增加, 分别为 0 h 的 22 倍和 28 倍; 而 MdCYP707A4 的表达量变化不如其他 3 个基因明显 (图 5, A)。而在种子层积解除休眠过程中 (图 5, B), MdCYP707A1、MdCYP707A2 和 MdCYP707A3 的表达都呈现先上升再下降然后再上升的趋势, 在 10 d 表达量最高, 达到 0 d 的 30 倍以上; 而 MdCYP707A4 的表达量在 20 d 下降之后没有上升。说明在解除休眠过程中 MdCYP707A 家族的 4 个基因都可能起作用。

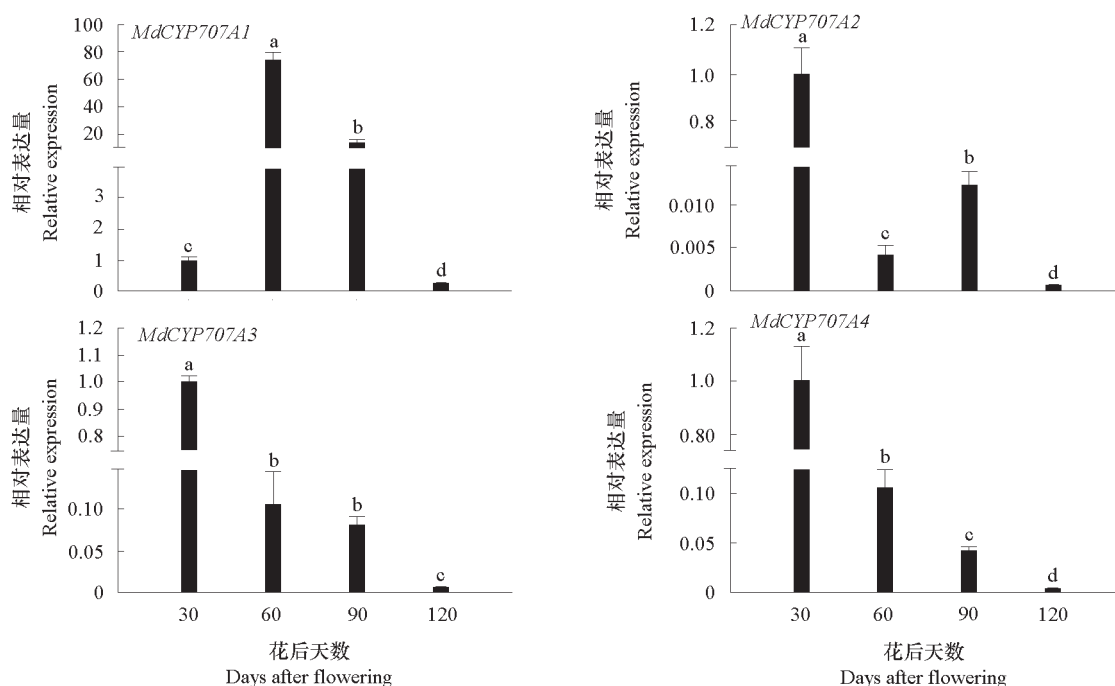


图 4 荧光定量 PCR 检测 ‘皇家嘎拉’ 苹果 *MdCYP707A* 在不同发育时期（花后 30 ~ 120 d）种子中的表达  
 Fig. 4 Expression analysis of *MdCYP707A* genes in different stages (30 – 120 days after flowering) of seed development of ‘Royal Gala’ apple with fluorescence quantitative PCR

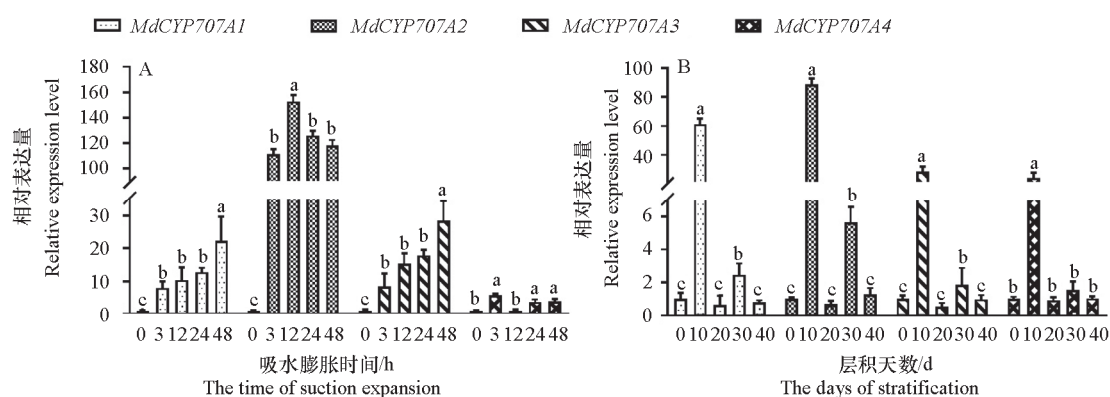


图 5 荧光定量 PCR 检测苹果 *MdCYP707A* 在种子吸水膨胀 (A) 和层积 (B) 过程中的表达  
 Fig. 5 Expression analysis of *MdCYP707A* genes in the process of water absorption expansion (A) and deposition (B) of seed with fluorescence quantitative PCR

## 2.4 *MdCYP707A* 对盐、PEG6000、甘露醇和 ABA 的响应

在盐胁迫处理下，4 个 *MdCYP707A* 基因的表达量均是先下降后上升（图 6，A）；而 PEG6000（模拟干旱）处理后，除 *MdCYP707A3* 没有明显变化外，*MdCYP707A1*、*MdCYP707A2* 和 *MdCYP707A4* 都是在 24 h 表达量最高（图 6，B）；与盐胁迫处理的影响相似，甘露醇胁迫处理后，4 个 *MdCYP707A* 基因的表达量也呈先下降后上升的趋势。其中，*MdCYP707A1* 受干旱、盐、甘露醇的诱导较明显，尤其是对甘露醇胁迫的响应最明显（图 6，C），在 24 h 时达到对照的 2 倍，而干旱胁迫的响应在 24



h 时达到 1.5 倍左右。而对于 ABA 的响应, 各基因均呈现出先下降后上升的趋势, 其中 *MdCYP707A1* 对 ABA 的响应最明显, 在 24 h 时表达量达到最高 (图 6, D)。

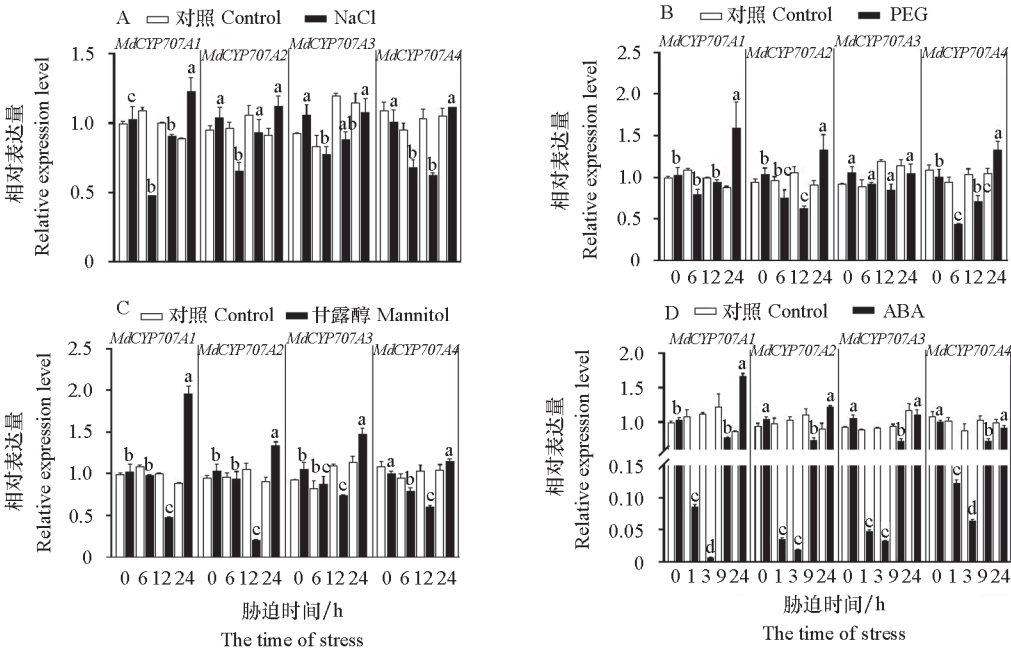


图 6 荧光定量 PCR 检测 *MdCYP707A* 对盐 (A)、PEG6000 (B)、甘露醇 (C) 和 ABA (D) 胁迫的响应  
Fig. 6 Expression analysis of *MdCYP707A* genes in response to NaCl (A), PEG6000 (B), mannitol (C) stress and ABA (D) with fluorescence quantitative PCR

## 2.5 *MdCYP707A1* 过量表达在苹果愈伤组织中的功能鉴定

在模式植物拟南芥中的研究发现, *CYP707A1* 在种子休眠和 ABA 介导的非生物胁迫中发挥关键作用 (Seki et al., 2002; Masanori et al., 2006)。本研究中, *MdCYP707A1* 在种子发育不同时期 (图 4) 以及种子吸水过程中 (图 5) 的表达量均有变化, 同时对 ABA 也有一定的响应 (图 6, D), 推断 *MdCYP707A1* 可能直接或者间接调控 ABA 介导的种子休眠。为了验证该基因的功能, 通过与 *AtCYP707A1* 比对, 从蔷薇科基因组网站 (<https://www.rosaceae.org/>) 上找到苹果的 *MdCYP707A1*

(MDP0000859733), 并克隆了该基因的编码区 (图 7)。该基因全长 1 425 bp, 编码 474 个氨基酸。

如图 8 所示, 将 *MdCYP707A1* 通过农杆菌转化的方法获得 ‘王林’ 苹果转基因的过表达 (OE) 和反义 (Anti) 的愈伤组织, 并通过荧光定量 PCR 检测转基因愈伤组织中 *MdCYP707A1* 的表达量, 证明 *MdCYP707A1* 确实转入愈伤组织中; 同时检测了转基因愈伤组织中 ABA 合成关键基因 *MdABI5* 的表达量, 与野生型 (WT) 相比, 在过表达 (OE) 的愈伤组织中, *MdABI5* 的表达量无明显变化, 在反义 (Anti) 的愈伤组织中, *MdABI5* 的表达量上升。过表达 (OE) 和反义 (Anti) 愈伤组织中

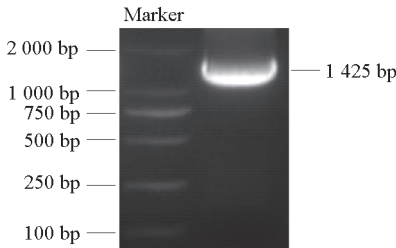


图 7 *MdCYP707A1* RT-PCR 扩增电泳图  
Fig. 7 Electrophoresis of RT-PCR products for cloning of *MdCYP707A1*

ABA 的含量的检测进一步确定了转基因的真实性和过表达 (OE) 愈伤组织中, ABA 的含量下降, 而反义 (Anti) 愈伤组织中 ABA 的含量上升 (图 8)。

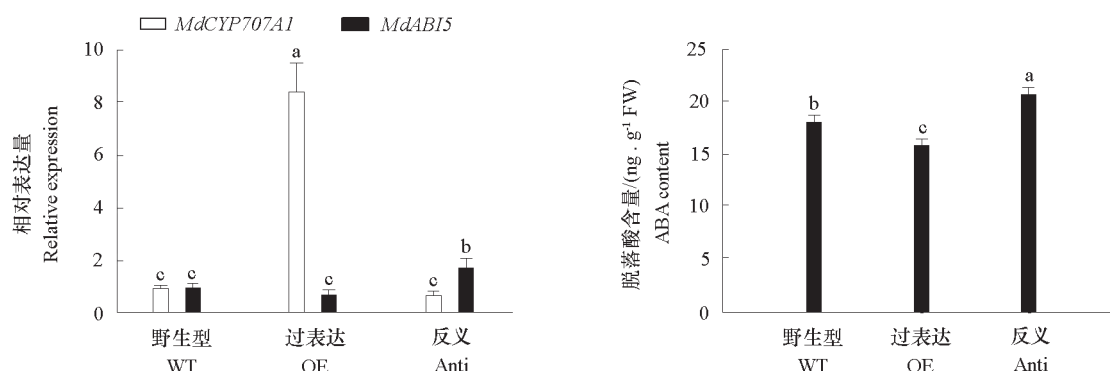


图 8 ‘王林’苹果野生型 (WT)、过表达 (OE)、反义 (Anti) 转基因愈伤组织中 ABA 合成相关基因的表达量和 ABA 含量  
 Fig. 8 The expression analysis of ABA synthesis related genes and the content of ABA in wild type (WT), overexpression (OE) and antisense (Anti) transgenic callus

在 MS 培养基上, 转基因过表达愈伤组织 (OE) 和野生型 (WT) 长势无明显差异, 而在含有 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl、3% PEG6000、100 mmol · L<sup>-1</sup> 甘露醇的培养基上, OE 长势比 WT 弱, 而反义 (Anti) 愈伤组织的长势显著好于 WT (图 9)。

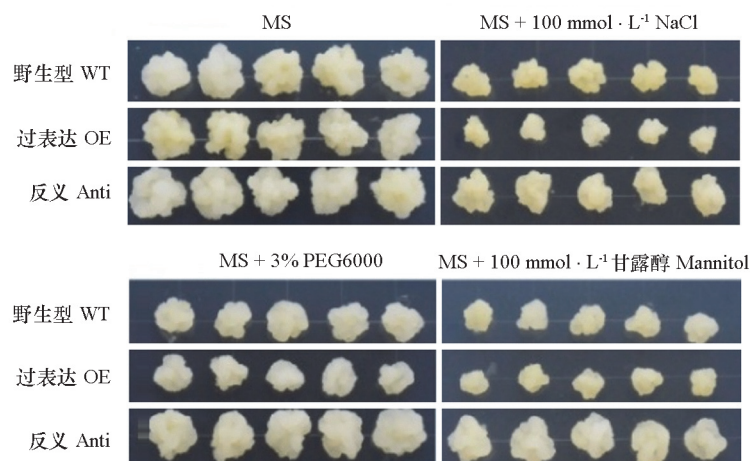


图 9 ‘王林’苹果野生型 (WT)、MdCYP707A1 过表达 (OE) 和反义 (Anti) 愈伤组织经 NaCl、PEG6000 和甘露醇处理 20 d 时的生长状态

Fig. 9 Wild type (WT), MdCYP707A1 overexpression (OE) and antisense (Anti) were treated with NaCl, PEG6000 and mannitol for 20 days

NaCl、PEG6000、甘露醇处理后, OE 愈伤组织中的丙二醛含量以及相对电导率比 WT 高, 而鲜质量比 WT 低, 说明过表达 *MdCYP707A1* 苹果愈伤组织对非生物胁迫的抗性降低 (图 10)。

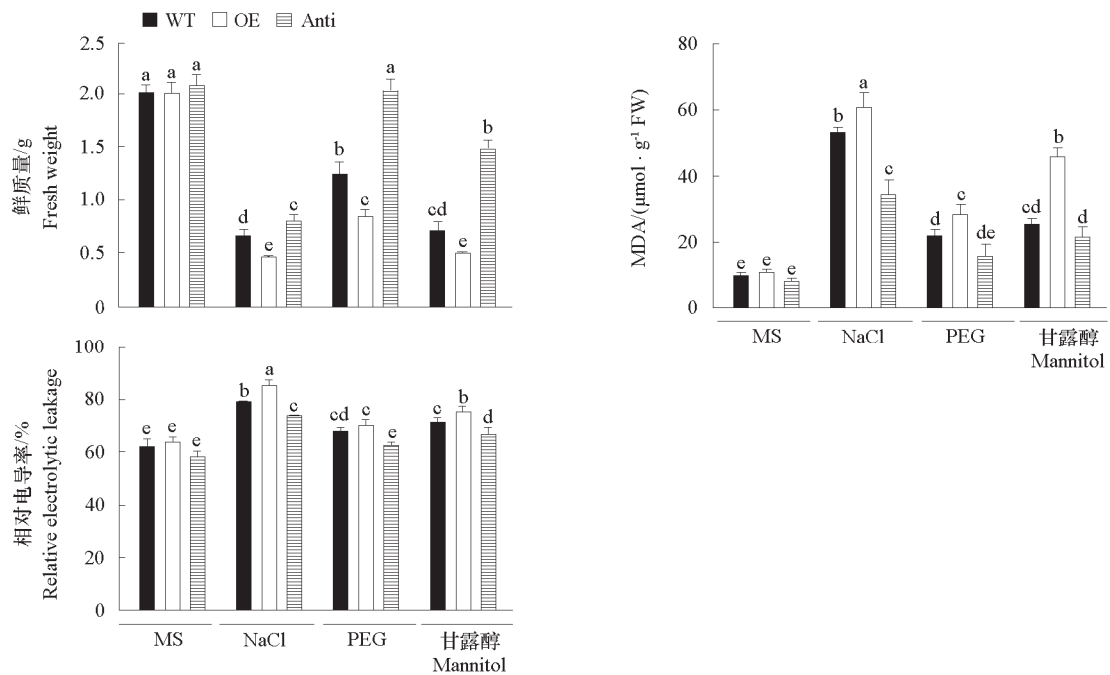


图 10 ‘王林’ 苹果野生型 (WT)、*MdCYP707A1* 过表达 (OE) 和反义 (Anti) 愈伤组织经 NaCl、PEG6000 和甘露醇处理 20 d 时的鲜质量、丙二醛含量和相对电导率

Fig. 10 Wild type (WT), *MdCYP707A1* overexpression (OE) and antisense (Anti) were treated with NaCl, PEG6000, and mannitol for 20 days and determination of fresh weight, malondialdehyde and relative conductivity

与胁迫处理相似, 在  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 的培养基上, *MdCYP707A1* 过表达 (OE) 愈伤组织长势比野生型 (WT) 差, 而反义 (Anti) 愈伤组织表型则相反 (图 11), ABA 处理后, OE 愈伤组织中丙二醛和相对电导率比 WT 高, 而鲜质量比 WT 低, 说明过表达 *MdCYP707A1* 与 ABA 处理的效果相似 (图 12)。

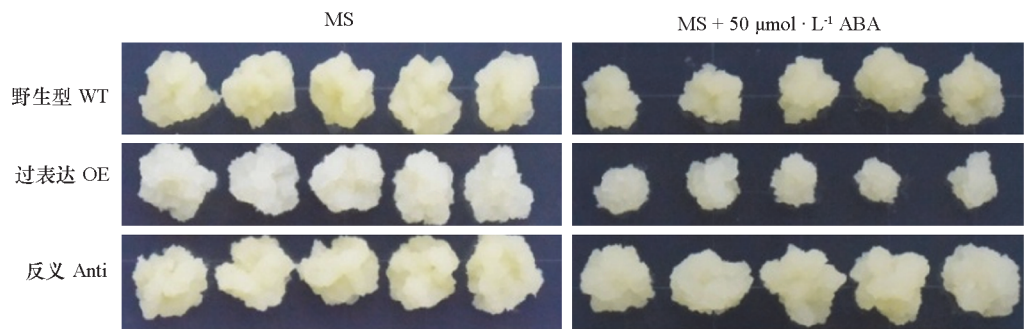


图 11 ‘王林’ 苹果野生型 (WT)、*MdCYP707A1* 过表达 (OE) 和反义 (Anti) 愈伤组织经 ABA 处理 20 d 时的生长状态

Fig. 11 Wild type (WT), *MdCYP707A1* overexpression (OE) and antisense (Anti) were treated with ABA for 20 days

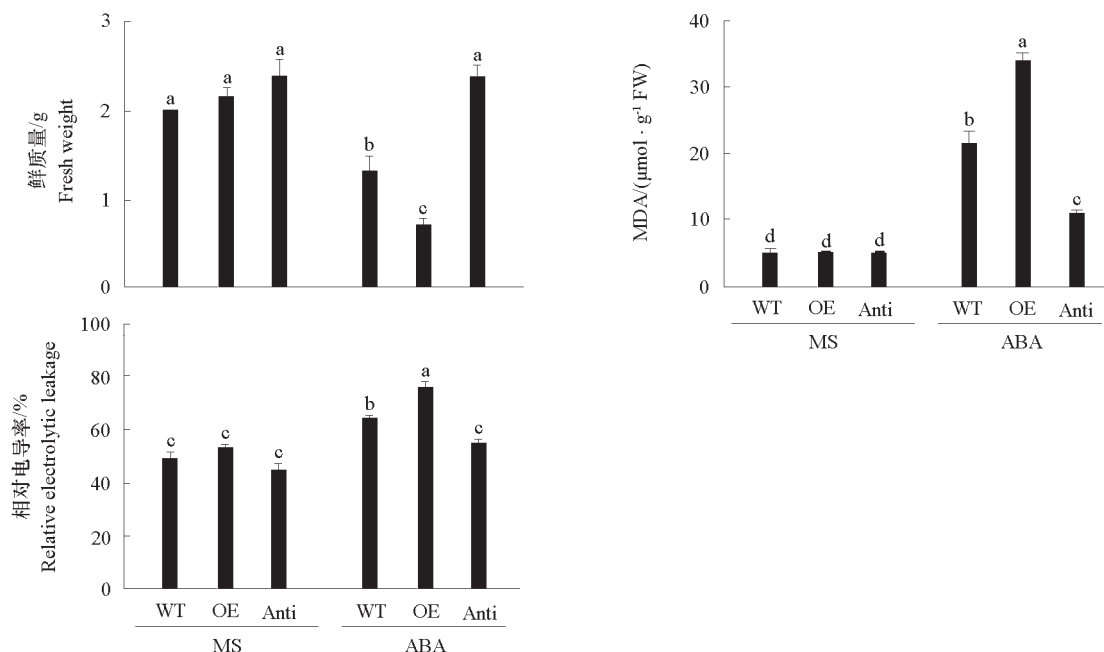


图 12 ‘王林’ 苹果野生型 (WT)、MdCYP707A1 过表达 (OE) 和反义 (Anti) 愈伤组织经 ABA 处理 20 d 时的鲜质量、丙二醛含量和相对电导率

Fig. 12 Wild type (WT), MdCYP707A1 overexpression (OE) and antisense (Anti) were treated with ABA for 20 days and determination of fresh weight, malondialdehyde and relative conductivity

## 2.6 MdCYP707A1 异源表达拟南芥提高其萌发率

半定量 (提取 DNA) 结果 (图 13) 表明, MdCYP707A1 转基因株系 (过表达 3 个株系分别命名为 OX-2、OX-4、OX-6) 可以扩增出 MdCYP707A1 基因片段, 而野生型 Col-0 不能扩增出目的片段, 表明 MdCYP707A1 确实转入拟南芥中。

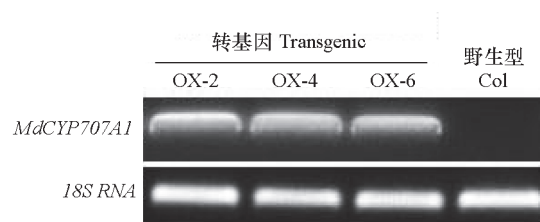


图 13 转基因拟南芥的半定量鉴定

Fig. 13 Identification of transgenic *Arabidopsis thaliana* by semi-quantitative PCR

将拟南芥野生型 (Col-0)、MdCYP707A1 转基因株系 (OX-2、OX-4、OX-6) 种子分别点播在 MS 和不同浓度 ABA 的培养基上, 统计萌发率, 结果显示, 转基因植株的萌发速度和萌发率都高于野生型, 尤其是在 MS + 2 μmol·L⁻¹ ABA 的培养基上 (图 12), 处理 3 d 时转基因植株的萌发率达到 75% 以上, 而野生型植株的萌发率不足 40%。

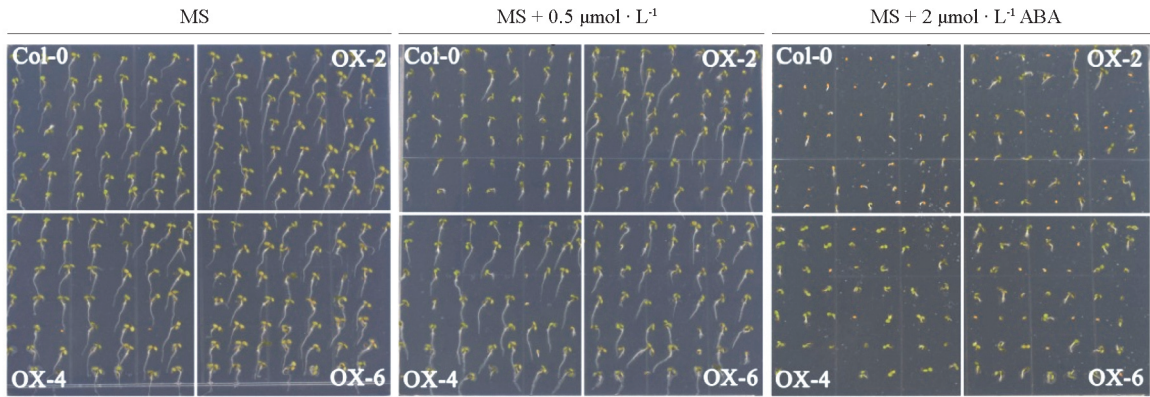


图 14 拟南芥野生型 (Col-0)、MdCYP707A1 转基因株系 (OX-2、OX-4、OX-6) 种子在 ABA 处理下 4 d 时的萌发情况  
Fig. 14 Germination status of seeds of the wild type (Col-0) and MdCYP707A1 transgenic lines (OX-2, OX-4, OX-6) of Arabidopsis thaliana under ABA treatment for 4 days

### 3 讨论

拟南芥 CYP707A 基因家族的 4 个成员 (CYP707A1 ~ CYP707A4) 被报道均参与编码 8'-羟化酶, 并且它们在种子成熟的不同阶段表达, AtCYP707A1 和 AtCYP707A2 在种子中熟和后熟阶段起主要作用, 而在早期种子吸水过程中, AtCYP707A2 在快速降低 ABA 水平方面发挥主要作用, AtCYP707A1 和 AtCYP707A3 则参与早期幼苗生长发育; 种子吸水后 6 h 时, AtCYP707A2 被诱导, 而 AtCYP707A1 和 AtCYP707A3 转录本在种子吸水后 24 h 增加 (Masanori et al., 2006)。本研究中分别检测了苹果种子成熟过程以及种子吸水和层积过程中 MdCYP707A 基因的表达情况, 结果显示, MdCYP707A1 主要在种子的成熟中期 (花后 60 ~ 90 d) 表达, 在成熟晚期 (花后 120 d) 下调, 这与拟南芥的研究一致, 暗示 CYP707A1 在物种进化过程中基因功能的保守性; 而 MdCYP707A2、MdCYP707A3、MdCYP707A4 则在种子成熟早期 (花后 30 d) 表达量较高, 与拟南芥中 CYP707A2 的表达情况有一定差异, 暗示 CYP707A2 在物种进化过程中功能发生变化。在苹果种子吸水膨胀过程中, MdCYP707A2 起主要作用, 在种子吸水后的 12 h 表达量最高, 而在吸水的后期阶段, CYP707A1 和 CYP707A3 的表达量也有所升高。本研究结果表明, CYP707A 家族基因主要在种子层积过程中的 10 d 发挥功能。大豆 GmCYP707A1 (Zheng et al., 2012) 和桃 PpeCYP707A1 (高真真 等, 2018) 的过量表达的植株都对 ABA 不敏感, 且种子的萌发率提高, 本研究结果与之相似, 0.5 和 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 处理后的过表达拟南芥种子, 其萌发率显著高于野生型, 并且萌发速率快。

ABA 不仅调控种子萌发、植物生长发育等, 还参与到植物对干旱、盐、渗透等非生物胁迫的响应中 (Gosti et al., 1999; Cutler et al., 2010), 因此, 植物对逆境的响应与体内 ABA 的含量密切相关 (杨果果 等, 2016)。有研究表明, 干旱、冷胁迫和盐胁迫能启动植物体内 ABA 信号途径以抵御逆境 (Seki et al., 2002); 低温可以诱导植物体内 ABA 含量的增加 (Chen & Gusta, 1983), 反之, 外源 ABA 可以作为诱导因子, 诱导植物抗性提高 (Mohapatra et al., 1988; 武晓亮 等, 2017)。本研究中发现, 在经过干旱、盐、甘露醇处理过的苹果组培苗中, CYP707A 基因家族成员的表达量在早期 (0 ~ 12 h) 都有一定程度的下降, 说明逆境条件 (处理早期) 下植物可以通过抑制 ABA 的分解代谢途径, 进而促进植物体内 ABA 的积累, 从而增强逆境胁迫的抗性。但是通过遗传转化获得的稳定遗传的苹果愈伤组织, 经过同样的干旱、盐、甘露醇的处理, 在 20 d 时反而表现出生长减



弱的表型,降低了对胁迫的抗性,这可能是由于 *MdCYP707A1* 基因在愈伤组织中的持续表达阻碍了 ABA 的合成,使植物体内的 ABA 水平处于较低状态。

番茄 *SICYP707A1* 的过量表达表现出叶片萎蔫,叶面积变小以及茎生不定根较小的表型 (Nitsch et al., 2009);高真真等 (2018) 研究发现,拟南芥中异源表达桃 *PpeCYP707A1*,经  $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 处理后,表现为植株矮小,叶表面积小,晚花。本研究中对在苹果愈伤组织中过表达 *MdCYP707A1*,经  $50\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 处理后,过表达 (OE) 长势较野生型 (WT) 弱,而反义 (Anti) 长势比野生型 (WT) 好,说明 *MdCYP707A1* 在苹果愈伤组织中的过量表达发挥了 ABA 8'-羟化酶的功能。这些研究为在本植物中研究 ABA 分解代谢途径奠定了理论基础。

苹果作为一种重要的果树,在栽培生产中面临着土壤干旱、盐碱化,以及早春寒等逆境胁迫,严重制约了产业发展。本试验通过对 CYP707A 家族成员功能的鉴定,完善并补充了 ABA 信号途径,部分解析了其在休眠解除这一生理现象的分子机制,并首次鉴定了苹果中的 *MdCYP707A1* 在非生物胁迫以及种子萌发中的功能,为苹果优良种质资源的筛选以及抗逆基因的鉴定提供了一定的理论依据。

## References

- Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, Nonogaki H. 2013. Seed physiology of development, germination and dormancy. 3rd. London: Springer: 247 - 295.
- Chen Jing, Jiang Ling, Wang Chun-ming, Hu Xiao-hui, Zhai Hu-qu, Wan Jian-min. 2015. Expression analysis of related genes in the process of dormancy release of peanut seeds. Journal of Crops, 41 (6): 845 - 860. (in Chinese)
- 陈 静, 江 玲, 王春明, 胡晓辉, 翟虎渠, 万建民. 2015. 花生种子休眠解除过程中相关基因的表达分析. 作物学报, 41 (6): 845 - 860.
- Chen T H H, Gusta L V. 1983. Absciscic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. Plant Physiology, 173 (1): 71 - 75.
- Clough S J, Bent A F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 16 (6): 735 - 743.
- Cutler A J, Krochko J E. 1999. Formation and breakdown of ABA. Trends in Plant Science, (4): 472 - 478.
- Culter S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, Abrams S R. 2010. Absciscic acid: emergence of a core signaling network. Annual Review of Plant Biology, 61: 651 - 679.
- Finch-Savage W E, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist, 171: 501 - 523.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Sreber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. Annual Review of Plant Biology, 59: 387 - 415.
- Fu Ting-ting, Cheng Hong-yan, Song Song-quan. 2009. Research progress of seed dormancy. Journal of Plant Science, 44 (5): 629 - 641. (in Chinese)
- 付婷婷, 程红焱, 宋松泉. 2009. 种子休眠的研究进展. 植物学报, 44 (5): 629 - 641.
- Gao Zhen-zhen, Xu Gong-xun, Wang Dong-ling, Liu Li, Chen Xiu-de, Li Ling, Fu Xi-ling, Gao Dong-sheng. 2018. Functional analysis of overexpression of peach ABA 8'-hydroxylase gene *PpeCYP707As* in *Arabidopsis thaliana*. Acta Horticulturae Sinica, 45 (2): 239 - 249. (in Chinese)
- 高真真, 徐功勋, 王东岭, 刘 利, 陈修德, 李 玲, 付喜玲, 高东升. 2018. 桃 ABA 8'-羟化酶基因 *PpeCYP707As* 在拟南芥中过表达的功能分析. 园艺学报, 45 (2): 239 - 249.
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb A A, Vartanian N, Giraudat J. 1999. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of absciscic acid signaling. Plant Cell, 11: 1897 - 1910.
- Gubler F, Hughes T, Waterhouse P, Jacobsen J. 2008. Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on absciscic acid and gibberellin metabolism. Plant Physiology, 147: 886 - 896.

- Hauser F, Waadt R, Schroeder J I. 2011. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. NIH Public Access Author Manuscript, 21 (9): 346 - 355.
- Holdsworth M J, Bentsink L, Soppe W J J. 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination. New Phytologist, 179, 33 - 54.
- Hu D G, Li M, Luo H, Dong Q L. 2012. Molecular cloning and functional characterization of MdSOS2 reveals its involvement in salt tolerance in apple callus and *Arabidopsis*. Plant Cell Reports, 31: 713 - 722.
- Huang Yun, Sun Mi-mi, Ye Qing, Wu Xiao-qing, Wu Wei-hua, Chen Yi-fang. 2017. Absciscic acid modulates seed germination via ABINSENSITIVE5-mediated PHOSPHATE1. Plant Physiology, 175 (4): 1661 - 1668.
- Krochko J E, Abrams G D, Loewen M K, Abrams S R, Cutler A J. 1998. (+) -abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. Plant Physiology, 118: 849 - 860.
- Leida C, Terol J, Martí G, Agustí M, Llàcer G, Badenes M L, Ríos G. 2010. Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. Tree Physiology, 30 (5): 655 - 666.
- Leng P, Yuan B, Guo Y, Chen P. 2014. The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. Journal of Experimental Botany, 65 (16): 4577 - 4588.
- Li Qian-qian, Wang Xiao-feng. 2009. Absciscic acid catabolism and 8'-hydroxylases, a key enzyme in the oxidative catabolism. Guihaia, 29: 353 - 359. (in Chinese)
- 李茜茜, 汪晓峰. 2009. ABA 分解代谢及其代谢关键酶——8'-羟化酶. 广西植物, 29: 353 - 359.
- Masanori O, Ayuko K, Mistunori S, Tetsuo K, Tadao A, Nobuhiro H, Yuji, Tomokazu K, Eiji N. 2006. CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 141: 97 - 107.
- Millar A A, Jacobsen J V, Ross J J, Helliwell C A, Poole A T, Scofield G, Reid J B, Gubler F. 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. Plant Journal, 45 (6): 942 - 954.
- Mohapatra S S, Poole R J, Dhiodsa R S. 1988. Absciscic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. Plant Physiology, 87 (2): 468 - 473.
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. Annual Review of Plant Biology, 56: 165 - 185.
- Nitsch L M C, Oplaat C, Feron R, Qian M, Woltersarts M, Hedden P. 2009. Absciscic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*. Planta, 229 (6): 1335.
- Ren H B, Gao Z H, Chen L, Wei K, Liu J, Fan Y, Davies W J, Jia W, Zhang J. 2007. Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. Journal of Experimental Botany, 58: 211 - 219.
- Rushton D L, Tripathi P, Rabara R C, Lin J, Ringler P, Boken A K, Langum T J, Smidt L, Boomsma D D, Emme N J, Chen X, Finer J J, Shen Q J, Rushton P J. 2012. WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. Plant Biotechnology Journal, 10: 2 - 11.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohgashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M. 2004. *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. Plant Physiology, 134 (4): 1439 - 1449.
- 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, 2 (6): 282 - 291.
- She Ping, Ma Jie, Yu Zhi-jia, Li Yu-lian, Sa Jin-dong. 2017. Effects of ABA, PP<sub>333</sub> and GA on the growth of seedlings of American red leaf cherry. Jiangsu Agricultural Science, 45 (15): 128 - 130. (in Chinese)
- 余 萍, 马 杰, 余治家, 李玉莲, 撒金东. 2017. ABA、PP<sub>333</sub> 和 GA 对美国红叶樱花苗木生长的影响. 江苏农业科学, 45 (15): 128 - 130.
- Shu K, Liu X D, Xie Q, He Z H. 2016. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. Molecular Plant, (9): 34 - 45.



- Tuan P A, Kumar R, Rehal P K, Toora P K, Ayele B T. 2018. Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Frontiers in Plant Science*, 9: 668.
- Verslues P E, Zhu J K. 2007. New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Current Opinion Plant Biology*, 10 (5): 447 - 452.
- Wang Dong-ling, Du Pei-yong, Xun Lei, Xiao Wei, Chen Xiu-de, Li Ling, Gao Dong-sheng. 2016. Cloning and expression analysis of peach CYP707A family genes. *Journal of Plant Physiology*, 52 (5): 659 - 668. (in Chinese)
- 王东岭, 杜培勇, 郇 蕾, 肖 伟, 陈修德, 李 玲, 高东升. 2016. 桃 CYP707A 家族基因的克隆以及表达分析. *植物生理学报*, 52 (5): 659 - 668.
- Wu Xiao-liang. 2017. Cloning and stress response analysis of an ABA pathway gene *AhLOS5* in *Arachis hypogaea* L [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 武晓亮. 2017. 花生 ABA 途径抗逆基因 *AhLOS5* 克隆与抗逆性研究 [博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Yang Guo-guo, Miao Cai-yun, Yang Xi-tian. 2016. Status of research on the effect of abiotic stress on ABA. *Henan Agriculture*, (31): 63. (in Chinese)
- 杨果果, 苗彩云, 杨喜田. 2016. 非生物逆境胁迫对 ABA 影响的研究现状. *河南农业*, (31): 63.
- Yu Hai-xia, Luo Cong, Xu Chen, He Xin-hua. 2016. A simple and efficient method to extract the DNA of high quality transgenic *Arabidopsis thaliana* and tobacco. *Molecular Plant Breeding*, 14 (6): 1436 - 1440. (in Chinese)
- 余海霞, 罗 聪, 徐 趁, 何新华. 2016. 一种简单高效提取高质量转基因拟南芥和烟草 DNA 的方法. *分子植物育种*, 14 (6): 1436 - 1440.
- Zeevaert J A D. 1999. Absciscic acid metabolism and its regulation. *New Comprehensive Biochemistry*, (33): 189 - 207.
- Zhao Shi-jie, Xu Chang-cheng, Zou Qi, Meng Qing-wei. 1994. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. *Plant Physiology Communications*, 30 (3): 207 - 210. (in Chinese)
- 赵世杰, 许长成, 邹 琦, 孟庆伟. 1994. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. *植物生理学通讯*, 30 (3): 207 - 210.
- Zheng Y, Huang Y, Xian W, Wang J, Liao H. 2012. Identification and expression analysis of the glycine max *cyp707a* gene family in response to drought and salt stresses. *Annals of Botany*, 110 (3): 743 - 756.
- Zhou R, Cultler A J, Ambrose S J, Galka M M, Nelson K M, Squires T M, Loewen M K, Jadhav A S, Ross A R, Taylor D C, Abrams S R. 2004. A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiology*, 134: 361 - 369.