

# 小麦盐胁迫相关基因 *TabHLH13* 的克隆与分析

符思路, 刘国祥, 张立超, 夏 川, 赵光耀, 贾继增, 孔秀英

(中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/  
农业部作物基因资源与种质创制重点实验室, 北京 100081)

**摘要:**在对小麦全长 cDNA 克隆进行大规模测序及转录因子功能研究过程中, 筛选到一个与盐胁迫相关的 bHLH 转录因子基因, 将其命名为 *TabHLH13*。*TabHLH13* 的全长 cDNA 序列为 1072 bp, 开放阅读框为 720 bp, 编码一个具有 240 个氨基酸残基的 bHLH 转录因子; 对 *TabHLH13* 的基因组和 cDNA 序列比较分析表明该基因包括 5 个外显子和 4 个内含子; 同源序列分析发现, *TabHLH13* 与来自大麦和短柄草中的 bHLH 蛋白序列相似性最高, 分别为 96.2% 和 90.5%; 电子定位发现 *TabHLH13* 位于小麦第 7 同源群的 7DL 上; 亚细胞定位结果表明, *TabHLH13* 编码一个定位在细胞核中的蛋白; 组织表达特性分析表明该基因在小麦根、茎、叶、颖壳、雌蕊和花药中均有较强的表达; 半定量 RT-PCR 与 qRT-PCR 结果表明 *TabHLH13* 是一个受盐胁迫诱导表达的基因。

**关键词:**小麦; bHLH 转录因子; 耐盐相关基因

## Cloning and Analysis of a Salt Stress Related Gene *TabHLH13* in Wheat

FU Si-lu, LIU Guo-xiang, ZHANG Li-chao, XIA Chuan, ZHAO Guang-yao, JIA Ji-zeng, KONG Xiu-ying

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

**Abstract:** In the large-scale sequencing of the wheat full length cDNAs clones in our laboratory and functional analysis of transcriptional factors, a salt stress related gene was screened out and named *TabHLH13*. *TabHLH13* was 1072 bp in full length with a 720 bp ORF, encoding a bHLH transcriptional factor with 240 amino acids. After comparing the genomic sequence with its cDNA sequence of *TabHLH13*, we found that it contained five exons and four introns. Homologous analysis found that *TabHLH13* had similarity with bHLH proteins from barley and *Brachypodium* as high as 96.2% and 90.5%, respectively. Using electronic mapping strategy, *TabHLH13* was mapped onto wheat chromosome 7DL. The results of subcellular localization indicated that the *TabHLH13* protein was a nuclear-localized protein. Tissue specific analysis indicated that *TabHLH13* expressed in root, stem, leaf, shell, pistil, and anther. RT-PCR and qRT-PCR revealed that the expression of *TabHLH13* was induced by salt stress.

**Key words:** wheat; bHLH transcriptional factor; salt-tolerance related gene

植物在生长发育过程中, 经常受到干旱、高盐、低温等非生物逆境胁迫环境因子的影响, 进而导致植物的生长发育受到严重制约并最终影响作物的产量。根据联合国教科文组织和粮农组织不完全统计 (<http://www.fao.org/>), 全世界盐碱地的面积为 95438 亿  $\text{hm}^2$ , 其中我国为 9913 万  $\text{hm}^2$ , 这些因素严

重限制着我国粮食的种植和生产。因此, 改良农作物品种的抗逆性、选育抗逆品种, 已经成为农作物育种的一个重要任务。发掘和利用植物抗逆相关基因资源是改良和增强植物抗逆性的前提和基础, 对农作物的抗逆育种具有非常重要的现实意义。

植物的逆境应答是一个很复杂的生物学过程,

收稿日期: 2014-04-03 修回日期: 2014-04-30 网络出版日期: 2014-08-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140814.0926.002.html>

基金项目: 转基因专项 (2014ZX0800918B); “863”项目 (2012AA10A309)

第一作者主要从事小麦基因资源研究。E-mail: silu.2009@163.com

通信作者: 孔秀英, 主要从事小麦基因资源研究。E-mail: kongxiuying@caas.cn

当植物受到外界环境胁迫后,会引发体内一系列生理生化改变,大量基因受到诱导表达,以避免或减少逆境对自身的危害<sup>[1-2]</sup>。目前通过基因芯片、转录组测序等分子生物学技术,已筛选出一批受逆境诱导表达的基因<sup>[3]</sup>,按照作用方式的不同可将其分为2类,即在逆境胁迫中起调控作用的调控蛋白和直接发挥作用的功能蛋白<sup>[4]</sup>。转录因子作为一类重要的调控蛋白,目前已经成为植物抗逆基因研究的重点领域。

典型的转录因子在结构上通常包括3个功能区:DNA结合结构域、转录调控结构域以及核定位信号<sup>[5-6]</sup>。其中,DNA结合结构域决定了转录因子与顺式作用元件之间结合的特异性,转录调控结构域实现转录因子的调控功能<sup>[7]</sup>。根据DNA结合结构域的特征,转录因子被划分为不同的家族<sup>[8]</sup>,其中,bHLH家族转录因子是植物中一类重要的基因家族,其成员的数量仅次于MYB类转录因子<sup>[9]</sup>。

bHLH转录因子因在结构上包含一个bHLH结构域,该结构域由50~60个氨基酸组成,包括10~15个氨基酸的碱性氨基酸区和40个氨基酸左右的 $\alpha$ -螺旋-环- $\alpha$ -螺旋区(HLH区)。其中,碱性氨基酸区位于bHLH结构域的N-端,具有DNA识别和结合位点<sup>[10]</sup>。植物中bHLH家族成员数量众多,其数量仅次于MYB类转录因子,在拟南芥和水稻中分别有超过140个和160个bHLH转录因子被鉴定出来<sup>[11]</sup>。目前已知bHLH转录因子的功能主要包括参与植物生长发育,参与植物适应缺铁胁迫反应,参与植物适应其他非生物胁迫逆境反应<sup>[12]</sup>。

在拟南芥中,bHLH蛋白rd22BP1参与ABA依赖的脱水胁迫反应<sup>[13]</sup>。ICE1在冷胁迫条件下能调控CBF基因的转录,过表达ICE1基因能够提高转基因植株的耐冷性<sup>[14]</sup>。K. Yi等<sup>[15]</sup>在水稻中发现了一个bHLH基因*OsPTF1*,该基因在磷缺乏的条件下在根部特异性表达,过表达该基因可提高转基因植株的分蘖能力、生物量和植株内磷的含量,最终提高对磷缺乏的抗性。

为了研究小麦中bHLH转录因子在植物抗逆方面的功能,本试验在小麦全长cDNA大规模克隆测序的基础上,对其中的转录因子基因进行了分类,根据每个转录因子基因的cDNA序列设计特异引物,然后利用半定量RT-PCR的方法进行耐盐基因筛选,获得一个受盐胁迫诱导表达的bHLH转录因子基因,将其命名为*TaBLH13*。本研究对该基因在普通小麦中的序列、染色体定位、组织表达特性及其在

盐胁迫下的表达模式进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

用于转录因子筛选的小麦全长cDNA文库由本实验室构建;基因序列克隆所用的小麦材料为六倍体普通小麦(*Triticum aestivum*)。茶淀红(耐盐品种)用于盐胁迫处理。小麦幼苗在培养室中水培4 d后转入Hoagland培养液,10 d后用250 mmol/L NaCl溶液进行处理,分别在0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h和48 h时取根为供试材料。组织特异性表达分析所用的各个组织材料取自大田种植的中国春。

### 1.2 *TabHLH13* 基因全长序列的克隆

以T3和T7引物(T3:ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA,T7:TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG)对筛选到的*bHLH13*全长cDNA克隆进行双向测序,通过DNASTAR软件对序列进行拼接组装,得到一致序列后提交FGENESH(<http://www.softberry.com>)进行ORF的预测。根据*bHLH13*的cDNA序列设计引物(bHLH13FL-F:5'-GTCTCCCACCTTTACGC-3',bHLH13FL-R:5'-TCAGAACAAGAACGAGCAT-3'),在中国春的基因组DNA和cDNA中扩增*bHLH13*基因,对PCR产物进行胶回收并克隆到pEASY-T1载体(TransGen)上,然后转化大肠杆菌TOP10感受态细胞,之后挑取阳性克隆进行测序验证。

### 1.3 *TabHLH13* 基因的染色体定位

通过搜索GrainGenes(<http://wheat.pw.usda.gov>)中已经定位的EST序列,对*TabHLH13*进行电子定位及拷贝数分析。

### 1.4 *TabHLH13* 基因的序列分析

利用DNASTAR软件比对分析基因组与cDNA序列;保守结构域分析及同源性分析是将*TabHLH13*的氨基酸序列提交Sanger Institute(<http://pfam.sanger.ac.uk>)进行pfam预测,以确定该蛋白所具有的功能结构域。以*TabHLH13*作为母序列,在GenBank中搜索其他物种中与该基因同源的序列,并通过MEGA软件进行进化分析。

### 1.5 亚细胞定位

亚细胞定位所用载体为瞬时表达载体pJIT163-GFP,该载体由CaMV 35S启动子驱动下游GFP基因表达。本试验通过双酶切将目的基因插入pJIT163-GFP的多克隆位点区与下游,与GFP基因融合表达,最终可以通过检测绿色荧光分布,确定外源基因在洋葱表皮细胞中的表达部位。pJIT163-

GFP 多克隆位点含有 3 个酶切位点,由前到后依次为 *Hind* III、*Sal* I 和 *Bam*H I,通过 PCR 扩增得到 *TabHLH13* 的编码区序列,经双酶切后定向连入 pJIT163-GFP 载体。

### 1.6 半定量和 qRT-PCR 分析

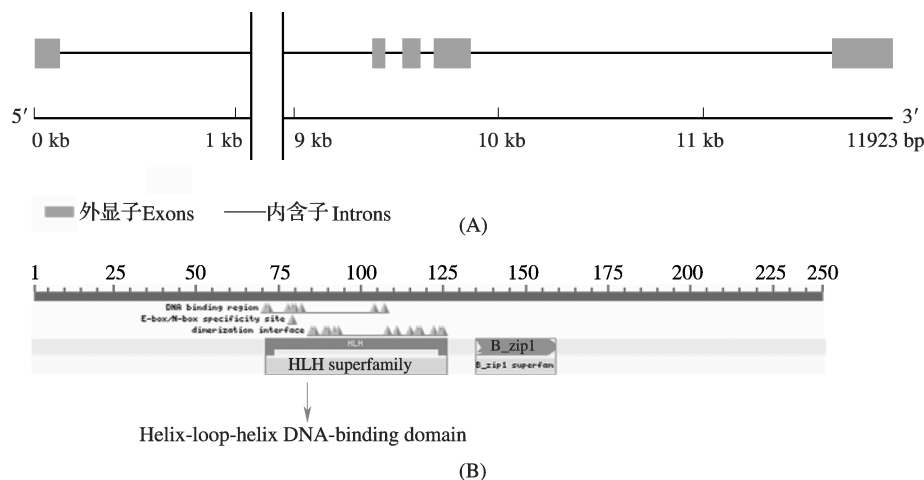
利用 TRIzol 法分别提取中国春的根、茎、叶、颖壳、雌蕊、花药组织及盐胁迫处理的茶淀红根的总 RNA。采用 SuperScript II 反转录酶 (Invitrogen) 合成 cDNA 第一条链。采用 20  $\mu$ L 半定量 PCR 体系,取 1  $\mu$ L cDNA 做模板,所用引物为 bHLH13RT-F: 5'-GACATCTAAGGCTTGAGGG-3', bHLH13R-T: 5'-CTGCCTTCAACTCTTTAATCTTG-3', 扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s, 28 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。半定量 RT-PCR 试验以小麦 *Tubulin* 基因作为内参,设置 3 次重复。qRT-PCR 采用 TaKaRa 的荧光定量试剂盒 SYBR  $^{\circledR}$  Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time)。采用 25  $\mu$ L 反应体系,反应条件为 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, 40 个

循环,然后 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s。反应在 ABI PRISM 7300 荧光定量 PCR 仪上运行,以小麦 *Tubulin* 基因作为内参分析,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行定量分析,每个反应设置 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 *TabHLH13* 基因序列克隆与结构分析

在本实验室构建的小麦全长 cDNA 文库中筛选到的 *TabHLH13* cDNA 系列长为 1072 bp, 开放阅读框为 720 bp, 编码一个包含 240 个氨基酸残基的 bHLH 转录因子, bHLH 结构域位于其 N 末端第 71 ~ 121 位氨基酸。根据 *bHLH13* 的全长 cDNA 序列设计引物, 在中国春 (*T. aestivum*) 中扩增 *TabHLH13* 的基因组序列, 其全长 11925 bp, 通过对比 *TabHLH13* 的基因组序列与 cDNA 序列, 发现 *TabHLH13* 包含 4 个内含子和 5 个外显子, 其中第 1 个内含子的长度为 9263 bp (图 1)。



A: *TabHLH13* 的基因结构; B: *TabHLH13* 的蛋白结构

A: Gene structure of *TabHLH13*; B: Protein structure of *TabHLH13*

图 1 *TabHLH13* 基因及其编码的蛋白结构

Fig. 1 Gene and protein structures of *TabHLH13*

### 2.2 *TabHLH13* 的染色体定位

对 GrainGenes 上已经定位的 7104 条 EST 序列进行检索, 得到一条与 *TabHLH13* 基因序列完全相同的 EST 序列 (BF483115), 该 EST 被定位在小麦的第 7 同源群的 7DL 染色体上, 表明 *TabHLH13* 基因定位于小麦的 7DL 染色体上。

### 2.3 *TabHLH13* 与其他物种中同源蛋白的比较

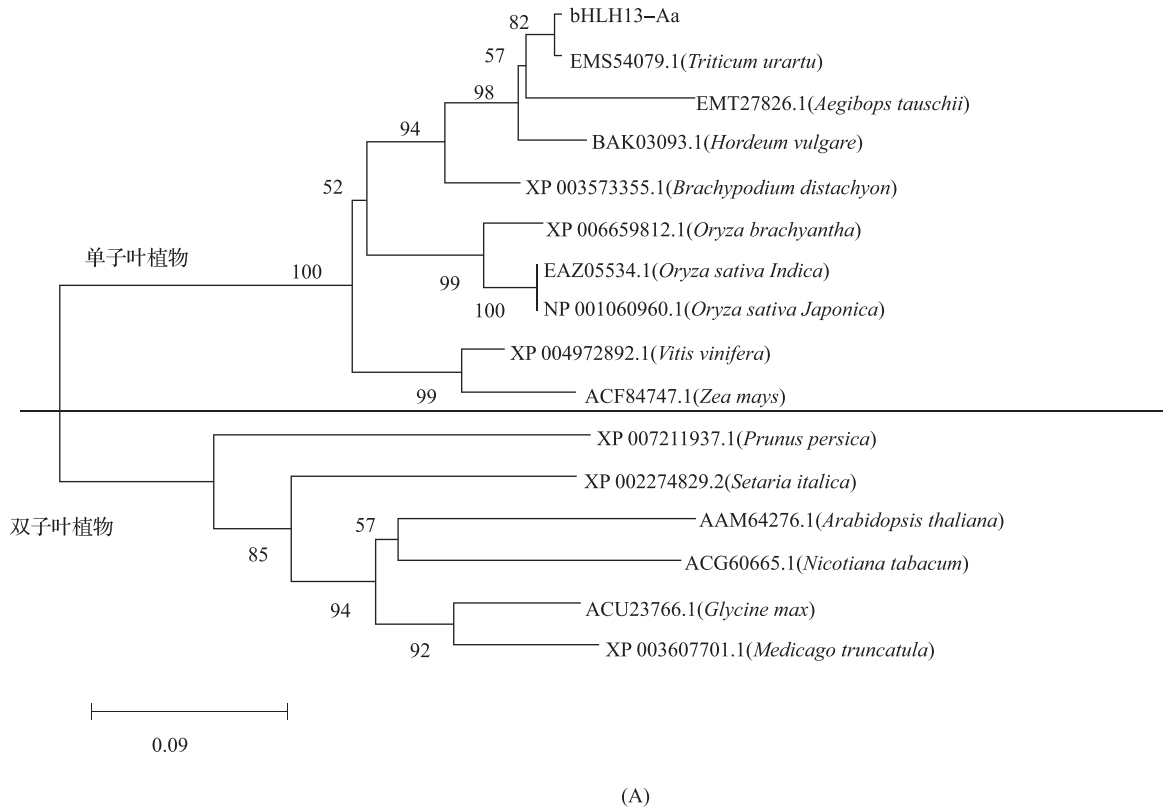
利用 Blastp 程序从六倍体小麦 A 基因组祖先种乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*) 和 D 基因组祖先种粗山羊草 (*Aegilops tauschii*) 中比对得到了

*TabHLH13* 的氨基酸序列 EMS54079.1 (*T. urartu*) 和 EMT27826.1 (*Ae. tauschii*), 二者与 *TabHLH13* 的相似性分别为 99.3% 和 98.5%; 同时, 从其他物种中得到了 13 个与 *TabHLH13* 有同源关系的 bHLH 蛋白, 对这些序列进行聚类结果显示, *TabHLH13* 及其祖先种序列与大麦和短柄草中的一个 bHLH 转录因子有较高的相似性, 分别为 96.2% 和 90.5%, 目前还没有关于这些蛋白功能的报道。系统进化树分析结果显示, *TabHLH13* 及其同源蛋白在单子叶和双子叶之间形成了一个明显的分支, 表明这个基因在

进化过程中,伴随着单子叶与双子叶植物的分化,基因序列也发生了明显的分化(图 2-A)。

对这些基因的氨基酸序列进一步分析发现,在 bHLH 结构域序列上非常保守,其中有 22 个

氨基酸在 16 个不同的 bHLH 蛋白中是完全相同的,占氨基酸总数的 43.1%。这表明该基因的 bHLH 结构域在进化过程中是非常保守的(图 2-B)。



A: *TabHLH13* 及其同源蛋白的系统进化树;B: *TabHLH13* 及其同源蛋白 bHLH 结构域序列标识图。每一个位点的序列标识是由标志(氨基酸残基)的叠加组成,叠加的高度反应了该位点序列的保守程度,而每一个标志的高度则反应该氨基酸残基在这个位置出现的频率

A: Phylogenetic tree of *TabHLH13* and their homologous proteins, B: The sequence logos for bHLH domain of *TabHLH13* and their homologues.

Each logo consists of stacks of symbols, one stack for each position in the sequence. The overall height of the stack indicates the sequence conservation at that position, while the height of symbols within the stack indicates the relative frequency of each amino or nucleic acid at that position

图 2 *TabHLH13* 与其他物种 bHLH 蛋白的同源性分析

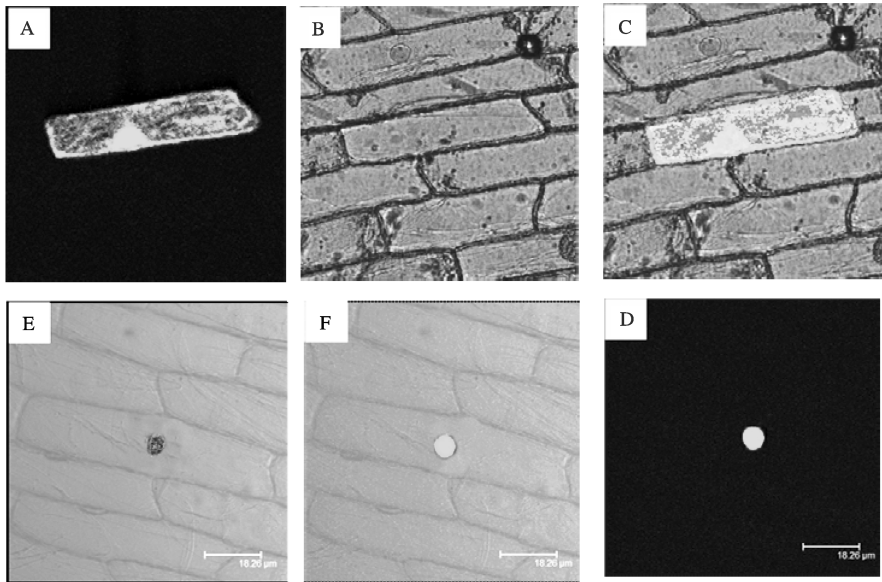
Fig. 2 Homology analysis of *TabHLH13* with the bHLH proteins from other species

## 2.4 *TabHLH13* 的亚细胞定位

为确定 *TabHLH13* 在细胞内的定位情况,将 *TabHLH13* 的 ORF 序列(不包含终止密码子)连

接到 pJIT163-GFP 表达载体中,构成目标基因与 *GFP* 融合表达的瞬时表达载体。通过基因枪轰击,在洋葱表皮中瞬时表达融合 *GFP* 基因的

*TabHLH13*。结果显示,*TabHLH13* 与 GFP 的融合蛋白定位于细胞核中,而空载体 GFP 则分布于整个细胞(图 3),表明 *TabHLH13* 是一个定位在细胞核中的蛋白。



A、B 和 C 为 35s 驱动 *GFP* 在洋葱中瞬时表达;D、E 和 F 为 35 s 驱动 *TabHLH13:GFP* 在洋葱中瞬时表达  
Images A,B,and C were onion epidermal cells that were transformed with *GFP* driven by 35s promoter,Images D,E,  
and F were onion epidermal cells that were transformed with *GFP;TabHLH13* driven by 35 s promoter

图 3 *TabHLH13* 的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of the *TabHLH13* protein in onion epidermal cells

### 2.5 *TabHLH13* 的组织表达特性分析

基因的组织表达特异性对其功能的行使具有重要的意义,本研究中通过 RT-PCR 对 *TabHLH13* 在根、茎、叶、颖壳、雌蕊和花药组织中的表达情况进行了检测,分析结果表明,*TabHLH13* 在所有检测的组织中均呈现较强的表达,且表达量没有明显差别(图 4),推测这个基因可能是一个组成型表达的基因,参与了植物发育的多个过程。

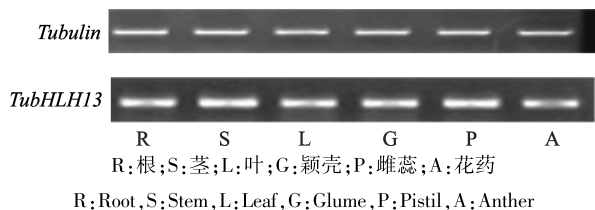


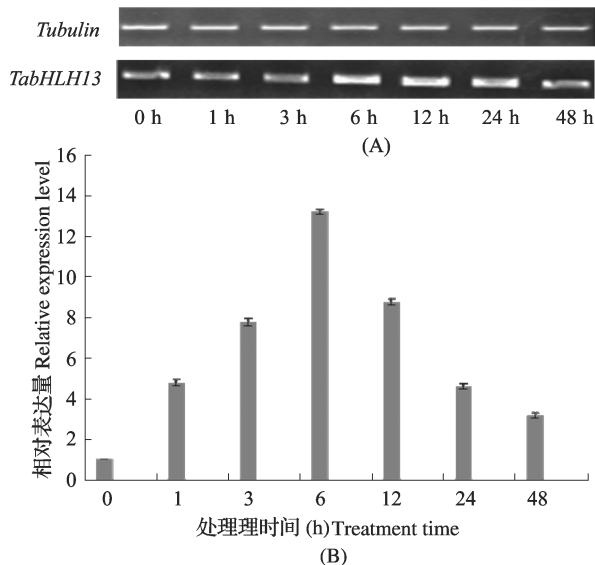
图 4 *TabHLH13* 在中国春不同组织中的 RT-PCR 分析

Fig. 4 Tissue-specific expression analysis pattern of *TabHLH13* by RT-PCR in Chinese spring

### 2.5 *TabHLH13* 在盐胁迫条件下的表达模式分析

通过 RT-PCR 和 qRT-PCR 对 *TabHLH13* 在盐胁迫条件下的表达模式进行分析,结果表明,在盐胁迫下,*TabHLH13* 基因的表达在很短的时间内就受到诱导,在 6 h 时,表达量达到最高,为处理前的 13 倍以上,之后开始下降,到 48 h 表达量降低到处理前

表达量的 3 倍以上(图 5),该结果表明 *TabHLH13* 是一个受盐胁迫诱导表达的基因。



A:*TabHLH13* 在盐胁迫下的 RT-PCR 分析;

B:*TabHLH13* 在盐胁迫下 qRT-PCR 分析

A:Expression analysis of *TabHLH13* by RT-PCR under salt stress,

B:Expression analysis of *TabHLH13* by qRT-PCR under salt stress

图 5 *TabHLH13* 在盐胁迫下的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *TabHLH13* under salt stress

### 3 讨论

在植物中,多个家族的转录因子受非生物逆境胁迫诱导表达,例如 bHLH、AP2/EREBP、NAC、WRKY 和 MYB 转录因子蛋白。这些转录因子通过调控信号转导过程,诱导抗逆基因的表达,从而提高植物的抗逆性。bHLH 家族转录因子是植物中最大的基因家族之一,目前关于 bHLH 家族转录因子的功能已在拟南芥和水稻中展开了比较广泛的研究,已鉴定出一批具有重要功能的 bHLH 转录因子基因<sup>[13]</sup>,但是小麦中相关的研究还非常有限。本研究在实验室前期构建的全长 cDNA 文库的基础上,鉴定出了 1 个受盐胁迫诱导表达的基因 *TabHLH13*,这个基因编码 bHLH 家族转录因子。对 *TabHLH13* 基因的结构进行分析发现,该基因包含 4 个内含子和 5 个外显子,其中第 1 个内含子长度为 9263 bp,对于一个 ORF 只有 720 bp 的基因包含这么大的一个内含子,是否具有重要的功能还有待进一步的研究。

通过序列比对分析,从其他物种中得到了 *TabHLH13* 的同源序列,这些蛋白都是一些功能未知的蛋白,因此,对 *TabHLH13* 进行研究将有助于进一步了解其同源蛋白在植物中的功能。对 *TabHLH13* 及其同源蛋白进行系统进化分析显示,这些蛋白在单子叶和双子叶植物之间形成了 2 个明显的分支,表明 *TabHLH13* 及其同源蛋白伴随着单子叶和双子叶植物的分化,也发生了一次明显的分化。同时,对 HLH 结构域进行分析发现,这些序列在整体上虽然发生了不同程度的分化,但是在 HLH 结构域却呈现出很高的保守型,其中有 22 个位点的氨基酸残基在所有的 *TabHLH13* 及其同源序列中是一致的,推测这种序列整体上的多态性和结构域的保守型对于维持转录因子在功能上的保守型和特异性具有重要意义。

植物在受到非生物逆境胁迫后,会引发体内一系列基因诱导表达,对这些基因的研究将有助于发掘抗逆基因及研究植物抗逆机理。本研究筛选到一个盐胁迫诱导表达的基因 *TabHLH13*,该基因在受到胁迫后被迅速诱导表达,在 6 h 时达到表达高峰,暗示该基因可能参与了植物的抗逆反应。植物中存在多条抗逆信号传导途径,各个信号传导途径并非完全孤立,可通过一些调控因子形成信号交叉,从而构成一个复杂的逆境信号传导网络,调控植物响应各种形式的逆境胁迫<sup>[16-18]</sup>。因此,今后需要在小麦中

通过超表达和基因沉默对该基因功能进行验证,同时筛选与目标基因相互作用的上下游基因或者蛋白,才能进一步探讨该基因的作用机制和所参与的调控网络。

### 参考文献

- [1] Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses[J]. *Plant Physiol*, 2009, 149: 88-95
- [2] Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. *J Exp Bot*, 2007, 58: 221-227
- [3] Kreps J A, Wu Y, Chang H S, et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 2129-2141
- [4] Seki M, Narusaka M, Ishida J. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. *Plant J*, 2002, 31: 279-292
- [5] Pabo C O, Sauer R T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition[J]. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61: 1053-1095
- [6] Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. *Science*, 2000, 290: 2105-2110
- [7] Matys V, Kel-Margoulis O V, Fricke E, et al. TRANSFAC and its module TRANSCOMP: transcriptional gene regulation in eukaryotes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 108-110
- [8] Heim M A, Jakoby M, Werber M. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity[J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 735-747
- [9] Pires N, Dolan L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants[J]. *Mol Biol Evol*, 2010, 27: 862-874
- [10] Carretero-Paulet L, Galst'yan A, Roig-Villanova I. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153: 1398-1412
- [11] Robinson K A, Lopes J M. Survey and summary: *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 1499-1505
- [12] Li X, Duan X, Jiang H. Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2006, 141: 1167-1184
- [13] Abe H, Urao T, Ito T, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 63-78
- [14] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 1043-1054
- [15] Yi K, Wu Z C, Zhou J, et al. OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice[J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 2087-2096
- [16] Urano K, Kurihara Y, Seki M, et al. 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 132-138
- [17] Hirayama T, Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future[J]. *Plant J*, 2010, 61: 1041-1052
- [18] Ma Y, Qin F, Tran L S. Contribution of genomics to gene discovery in plant abiotic stress responses[J]. *Mol Plant*, 2012, 5: 1176-1178