

## 植物对水分胁迫响应的分子机制与 抗逆基因工程的研究进展(综述)

陈新建<sup>1,3</sup>, 陈占宽<sup>2</sup>, 刘国顺<sup>1</sup>, 刘鸿先<sup>3</sup>

(1. 河南农业大学农学系, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业科学院重点实验室, 河南 郑州 450002;  
3. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

**摘要:** 对近年来植物对水分胁迫(包括干旱、盐害和低温)响应的分子机制的研究进展以及水分胁迫中诱导的植物基因产物的种类、功能及其相关的基因工程作一简要的综述, 同时对今后的研究方向提出了一些看法。

**关键词:** 水分胁迫; 分子机制; 植物

**中图分类号:** Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2000)01-0081-10

## ADVANCES IN STUDY ON MOLECULAR MECHANISMS OF PLANT RESPONSE TO WATER STRESS AND GENETIC ENGINEERING OF STRESS TOLERANCE

CHEN Xin-jian<sup>1,3</sup>, CHEN Zhan-kuan<sup>2</sup>, LIU Guo-shun<sup>1</sup>, LIU Hong-xian<sup>3</sup>

(1. Dept. Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;  
2. Henan Key Laboratory of crop Improvement, Henan Academy of Agri. Sci., Zhengzhou 450002, China;  
3. South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Progress in the study of molecular mechanisms including water stress responses in plants such as drought, high salt and low temperature is reviewed. The variety and functions of the products of water-stress-induced genes and their genetic engineering are discussed. Areas requiring further research are highlighted.

**Key words:** Water stress; Molecular mechanisms; Plants

水分胁迫(Water stress)是陆生植物经常遇到的、因受到不良环境条件的影响而使水分亏缺(Water deficit)的现象。造成水分胁迫的环境条件有干旱、盐碱、低温(冷害),这三项又是强烈制约作物产量的三大非生物因素。陆生植物为了生存繁衍,在遇到水分胁迫时,不得不在形态上及生理生化代谢上进行一些调整,以适应或忍耐这些环境胁迫条件,即水分胁迫诱导了体内不同的生物化学和生理学上的响应。揭示这些响应的分子机制,是人们长期以来都在不懈探索的重大课题。

众所周知,植物对水分胁迫的响应包含着极其复杂的生理生化变化。近几年来,揭示这些问题已成为植物科学研究的热点之一,已积累了大量的资料<sup>[1-5]</sup>,为最终搞清植物对水分胁迫响应的分子机制,并利用这些知识改良作物,使之适应不良环境奠定了基础。总体来讲,目前研

究集中在两大方面：第一，由于水分胁迫而诱导的植物基因表达系统，包括基因启动子、调节蛋白及其结构基因等；第二，鉴定水分胁迫诱导的基因产物的种类、结构、功能等。在这方面取得了长足的进展，一些重要的基因相继被鉴定、克隆。因此本文拟对这两方面的研究作一简要的概述，最后对一些问题的研究方向，提出笔者的一些管见。

## 1 植物对水分胁迫响应的基因表达系统

植物水分胁迫响应中的基因表达系统，大体可分成两大类型：第一种类型称为增量调控 (Upregulation) 系统，即细胞脱水诱导基因的表达。这些基因产物一般对脱水有一定的保护作用。第二种类型称为减量调控 (Downregulation) 系统，如编码光合作用的蛋白质，在脱水过程中被抑制，以减少光氧化胁迫<sup>[4]</sup>；编码贮藏蛋白基因也可以被细胞脱水而抑制等。目前主要集中于增量调控的研究，而对减量控制的研究资料甚少。因此这里所提的基因表达系统，则主要集中于增量调控系统上。

### 1.1 植物水分胁迫的实验系统

选取适当的植物材料作为水分胁迫中的研究系统是非常重要的。目前所用的植物材料可分为三类：

第一，忍耐系统。忍耐系统主要包括各种植物的种子和被子植物中的更苏植物 (Resurrection plant)。种子在最后成熟时可以脱去 90% 的水，而进入了几乎测不出代谢的休眠状态。这种脱水状态，能够使种子在极端环境下存活，并利于传播。胚在成熟时对脱水的忍耐能力，在萌发过程中又消失了。分离种子脱水过程中的 mRNA 和蛋白质，使人们发现一类与胚脱水忍耐有密切关系的蛋白质<sup>[6-10]</sup>—胚胎发生晚期丰富蛋白 (Late-embryogenesis-abundant protein)，简称 LEA 蛋白，其基因为 *lea*。LEA 蛋白的发现可以说是近年来水分胁迫研究中最令人鼓舞的发现之一 (见后)。更苏植物也是一种植物耐脱水的很好试验材料。它的叶片可以脱水至几乎完全干燥状态 (含水量小于 2%)，一旦通水在很短时间内即可完全恢复，表现对脱水过程的极强的忍耐性<sup>[11,12]</sup>，并且可以用其整体或愈伤组织研究脱水过程中植物忍耐的分子机制。

第二，遗传模式系统。遗传模式系统是研究忍耐脱水性的又一重要方法。该系统一般有已知详细的遗传信息，存在大范围的突变性，以及方便的位置基因克隆<sup>[6,7,13]</sup>。现在最常用的是拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)，土豆，玉米等<sup>[10,13-19]</sup>。如这些系统的建立为阐明 ABA 在水分胁迫中的作用提供了很好的试材。目前研究较多的转基因植物实

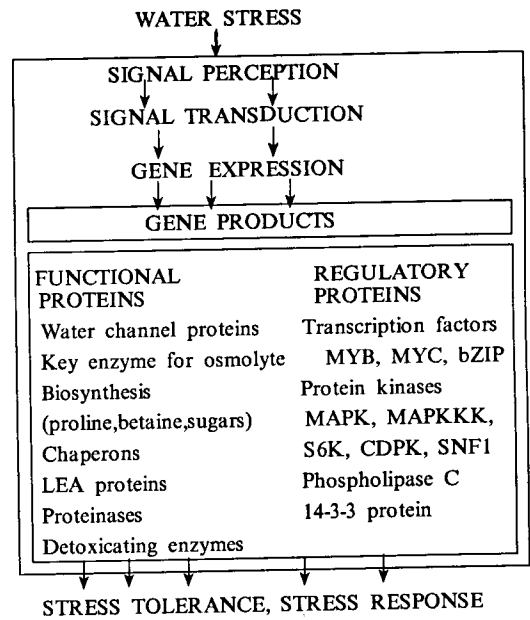


Fig. 1 Function of water-stress-inducible gene products in stress tolerance and stress response. The gene products are roughly classified into two groups: functional proteins that are involved in water-stress tolerance and cellular adaptation, and regulatory proteins that may function in gene expression and signal transduction in stress response<sup>[26]</sup>.

际上也可作一种模式系统来研究<sup>[20-22]</sup>。

第三, 栽培植物。比较不同作物之间以及同一作物不同品种之间的抗旱(或盐、冷)性, 可以找出与抗旱有关的基因, 以及它们的表达及其作用。

## 1.2 植物水分胁迫响应中所表达的基因

利用以上所提到的研究系统, 人们已报道了许多与耐水分胁迫有关的一系列基因。这些基因有些已知道其功能, 也有一些是未知功能的。在这些基因产物中可分为功能性蛋白质和调节性蛋白<sup>[23-28]</sup>, 如图1所示。功能性蛋白包括: 水通道蛋白, 与水通过膜运输有关, 不同的渗透性保护剂(如糖、脯氨酸、甜菜碱等)生物合成的关键酶类, 保护大分子和膜的蛋白质(LEA蛋白, 抗冻蛋白, 伴侣蛋白, mRNA结合蛋白等), 解毒酶类(谷胱甘肽S-转移酶, 超氧化物歧化酶, 过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化氢酶等), 蛋白质转换的蛋白酶类(巯基蛋白酶, 泛醌蛋白质)等。这些内容在第二部分中详述。调节性蛋白包括: 蛋白激酶(MAPK: 活化分裂素的蛋白激酶, MAPKK: 磷酸化的MAPK激酶, MAPKKK: 磷酸化的MAPKK激酶, S6K: 核糖体S6蛋白激酶, CDPK: 依赖Ca<sup>2+</sup>的蛋白激酶), 转录因子(bZIP: 带有基本区域和Leu-拉链的模块(motif), MYB: 带有色氨酸串基元的转录因子家族, MYC: 带有基本螺旋串的螺旋转录因子家族), 14-3-3蛋白: 一个被激酶调节的与蛋白质和蛋白质间互作有关的信号蛋白。现在看来对进一步理解植物对水分亏缺响应来说, 这些调节蛋白显得更为重要。

## 1.3 植物水分胁迫响应中基因表达的调节

**启动子** 大部分水分胁迫诱导的基因可由外源ABA处理而表达, 但少数基因的表达却不受ABA的诱导<sup>[14,29-34]</sup>。前者称为ABA-依赖型基因, 后者称为ABA-独立型基因, 这两类启动子的研究都是目前研究基因表达调节的重要内容<sup>[35-38]</sup>。启动子又可分为顺式和反式活动元件(Cis- or trans-acting element)。在水分胁迫响应中已鉴定出的最具特点的顺式元件为ABA响应元件(ABA-responsive element, ABRE), 它含有带回文结构的CACGTG, 其中的ACGT为其核心, 称为G-盒(G-box)<sup>[38,39]</sup>。ACGT元件存在于许多环境和生理诱导的多种植物基因中, 与基因的表达有密切的关系。研究DNA-结合蛋白表明, 不同的基因其ACGT核心侧翼的核苷酸序列有很大差异, 说明核心序列决定了基因能否表达, 而侧翼序列则决定了基因的特异性<sup>[39,40]</sup>。与G-box有关的ABREs已在很多ABA-Ca<sup>2+</sup>依赖基因中发现。

**蛋白质磷酸化** 在真核生物中蛋白质的磷酸化和脱磷酸化是重要的信号传递系统, 蛋白质通过激酶进行磷酸化, 通过磷酸酶而脱磷酸化。植物在干旱胁迫响应中也发现了这种传递信号。拟南芥中的两个编码Ca<sup>2+</sup>-依赖激酶的基因受到了水分胁迫的诱导<sup>[41-44]</sup>。在玉米中RAB17蛋白在水分胁迫中也被高度磷酸化, 其磷酸化的程度不同, 它在细胞中的位置也不一样, 磷酸化程度高时存在于核中, 低时存在于细胞质, 在核中可与一种信号肽结合, 调节了与DNA结合的调控蛋白的运输<sup>[10]</sup>。细胞中的Ca<sup>2+</sup>在很多生理生化过程中起着第二信使的作用, 它也出现在与干旱基因表达有关的过程中。气孔关闭是植物对干旱响应的早期反应。ABA在使气孔膨度降低之前, 保卫细胞中的Ca<sup>2+</sup>浓度首先增加。拟南芥中的AB11基因产物是由钙激活的磷酸蛋白磷酸酶<sup>[27,46]</sup>, 另一个受钙激活的酶是磷脂酶C, 这个酶催化肌醇1,4,5-三磷酸(IP<sub>3</sub>)的合成。由于在干旱中人们发现了IP<sub>3</sub>, 由此推测钙可能作为干旱的第二信使参与了耐干

早基因表达的调节。

由上述可见,水分胁迫响应中的基因表达的调节是非常复杂的,很多问题还未深入了解。相比较而言,对已鉴定到的功能性基因的作用及其应用,则研究得更多,取得了令人鼓舞的进展。

## 2 植物水分胁迫响应中所表达的功能性蛋白

从图1可以看出,水分胁迫响应中所表达的蛋白产物,有参与基因转录的调节蛋白,也有与胁迫忍耐有直接关系的功能性蛋白。以下对后一种蛋白的功能及其基因工程作一概述。

### 2.1 胚胎发生晚期丰富蛋白(LEA)

LEA是目前最受关注的胁迫响应基因产物,最早是从种子脱水过程中分离出的,后来发现它也存在于多种植物的营养器官,已鉴定出含有LEA的植物超过65种之多<sup>[7,9,11,20,47,48]</sup>。LEA的分类来源于对棉花中的LEA的研究结果<sup>[10,49-51]</sup>。LEAD19为类型1,LEAD11为类型2(也称脱水质,Dehydrins),LEAD7为类型3,D113为类型4,D95为类型5。LEA主要定位于细胞质中<sup>[30]</sup>,其浓度很高,如在成熟的棉花胚细胞中D7占非器官性细胞质蛋白的4%(约0.34 mmol/L)。

LEA的氨基酸组成有着共同的特征,一般亲水的氨基酸含量高,如棉花的D19蛋白含有13%的甘氨酸和11%的谷氨酸残基,缺乏半胱氨酸和色氨酸残基<sup>[32]</sup>,这些特点与它们的功能是密切相关的。高浓度和高亲水性表明它们不是作为酶而起作用的。D19蛋白在正常的生理条件下有70%以上的氨基酸残基呈无规线圈形式存在。无规线圈结构利于和水分子结合。细胞完全脱水可能是致命的。因此这些蛋白质的存在有助于维持生命所需的最小量的水。此外无规线圈的存在还有结构上的功能。严重的脱水会导致细胞组分因脱水而结晶,晶体间的互作会使重要的细胞组分损伤。LEA的存在可以减轻这种伤害。Baker指出<sup>[50]</sup>无规线圈在脱水过程中,可以方便地调节自身的形状,夹在细胞组分之间,提供一层稳定的粘质层,象一个优质的垫子一样,减少晶体间的相与伤害。

除了无规线圈外,LEA中还有一个引人注目的特点,如D7中还有一个由11个氨基酸残基组成的模块(motif)(TAQAAKEKAGA),此模块以 $\alpha$ -螺旋结构存在,重复了13次。它的存在可以中和由于细胞质脱水,离子强度提高而引起的伤害。因为这些带电荷的氨基酸残基可以和溶液中的离子形成盐桥。这个重复单位是以两性螺旋体存在,即在螺旋的不同部位存在着酸性和碱性氨基酸残基,这种螺旋形成了分子内束状体,扩大了与离子结合的表面积<sup>[51]</sup>。进一步分析发现在二聚体的螺旋区域相接的内表面的边缘存在着周期性的荷电离子空间结合位点,说明脱水时荷电离子结合于这些位点,从而缓冲了因脱水使溶液中离子强度提高造成的伤害。因此由于LEA的特殊结构赋予它在协调脱水过程中细胞内各溶质之间矛盾的特殊功能。

既然LEA是植物脱水耐受性的重要物质,它的基因转化也受到了人们的关注<sup>[9]</sup>。将三个从更苏植物分离到的*lea*基因转化烟草,转基因烟草的抗性并没发生多大变化,与野生型的差不多。Kermode认为对胁迫忍耐表现型的获得,可能需要多个基因的同时表达,也可能需要高拷贝的表达,使LEA蛋白在细胞中达到一定的浓度,才能表现出耐旱性。但是也有相反的报道。Xu等<sup>[53]</sup>从大麦中获得的*lea*基因-HVA1,转化到水稻中去,转化植株明显地提高了对水分

胁迫的抗性。因此他们认为, 利用 *lea* 基因的转化提高转基因植物的抗旱性有着广阔的应用前景。

## 2.2 渗透调节基因的产物

人们很早就发现了植物在适应胁迫的过程中会产生一些具有保水作用的小分子物质, 这些小分子物质被称为渗透调节物质 (Osmolytes), 也称为相容溶质 (Compatible solutes)。诸如脯氨酸 (Pro)、甜菜碱 (Betaine)、甘露醇 (Mannitol)、山梨醇 (Sorbitol)、肌六醇 (Inositol) 等。合成这些物质的基因均已被克隆出来<sup>[54-59]</sup>。

**甜菜碱** 甜菜碱最早是在旱生植物枸杞 (*Lycium barbarum*) 中发现的<sup>[60,61]</sup>。已知有 12 种, 研究最多的也是最简单的是甘氨酸甜菜碱 (Glycinebetaine), 简称甜菜碱 (Betaine)。它广泛存在于开花植物的各器官。它可能是最重要的渗透调节物质。植物体内合成甘氨酸甜菜碱是通过两步氧化: 胆碱  $\rightarrow$  甜菜碱醛  $\rightarrow$  甜菜碱, 分别在胆碱单氧化酶 (CMO) 和甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 的作用下进行的<sup>[62,63]</sup>。细菌的合成途径与之相同。将细菌中的这两个酶的基因转移到缺乏甜菜碱的烟草体内, 少量的甜菜碱在转基因植物中出现, 便出现了明显的忍耐盐胁迫的能力<sup>[64-67]</sup>。1997 年, Hayashi 等<sup>[68]</sup> 从土壤细菌 (*Arthrobacter globiformis*) 中克隆出了胆碱氧化酶的基因 (*codA*), 此酶可使胆碱转化为甜菜碱, 即可代替上述的两个酶。将此酶的基因连同编码 Rubisco  $\alpha$  亚基转运肽序列转入拟南芥。免疫胶体金定位证明在叶绿体中产生了 *codA* 的成熟蛋白, 转基因植物叶中甜菜碱的浓度可达  $1.0 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ , 野生型则测不出。转基因植物不论在萌发、生长及成熟各时期均表现出对盐和低温有较强的忍耐性。在低温和盐胁迫下野生型光系统 II 几乎测不出, 而转基因植物仍保持 50% 的活性。1998 年<sup>[3]</sup> Holmstrom 将大肠杆菌 (*E. coli*) 中这两个基因 (*betA* and *betB*) 转移到烟草中, 使转基因植物明显地增加了忍耐胁迫 (盐和冷) 的能力以及胁迫后光系统 II 的恢复能力。同样在烟草上喷洒甜菜碱, 其耐干旱能力明显增加, 在其它植物中也取得了类似的结果<sup>[1,2,69,70]</sup>。

**脯氨酸** 脯氨酸为另一种重要的有机渗透调节物质, 它的许多特性与甜菜碱相似, 在干旱胁迫下体内会大量积累脯氨酸, 但和甜菜碱不同的是积累的脯氨酸随着胁迫的解除而迅速被分解。在植物体中, 脯氨酸的合成是由谷氨酸 (Glu) 通过  $\delta^1$ -吡啉-5-羧酸 (P5C) 而形成的<sup>[72]</sup>, 由谷氨酸到脯氨酸受两个酶的催化: P5C 合成酶 (P5CS) 和 P5C 还原酶 (P5CR)。在胁迫解除后脯氨酸又经过 P5C 变成谷氨酸, 这种转变也是通过两个酶的催化: 脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 和 P5C 脱氢酶 (P5CDH), 当脱水时脯氨酸积累, 脯氨酸向谷氨酸的转变受到了抑制, 复水后它又受到了激活 (图 2)。在拟南芥中, 脱水时 P5CS 被强烈地诱导, 而 ProDH 的基因表达被抑制, 相反, 复水后 ProDH 的基因被强烈地诱导, 而 P5CS 的基因被抑制<sup>[73]</sup>。因此 P5CS 和 ProDH 在水分胁迫与水分恢复中是体内脯氨酸水平的限速因子 (Rate-limiting factors)。转 P5CS 基因<sup>[52]</sup> 的烟草在干旱的情况下脯氨酸含量高

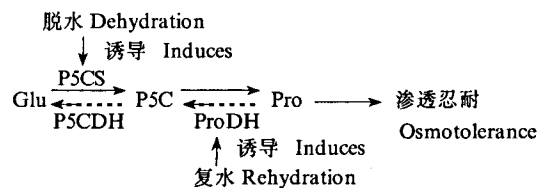


图 2 脱水和复水时脯氨酸的代谢

Fig. 2 Metabolism of proline during dehydration and rehydration<sup>[72]</sup>

对照植物 10-18 倍, 耐旱性增强, 根的生物产量增加。

**其它渗透调节物质** 其它的渗透调节物质诸如: 甘露醇, Ononitol, 果聚糖, 岩藻糖, 山

梨醇等的合成酶的基因也均在烟草中表达<sup>[55,74-77]</sup>，在水分亏缺的情况下，所有这些转基因的烟草忍耐性均有不同程度的提高。甘露醇在转基因烟草的叶绿体中含量在1-81  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ，其表现型与光合速率和野生型相似，但是随着甘露醇含量的提高生长减缓<sup>[38,74]</sup>。但是 Ononitol 积累达10  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$  植物仍表现正常。

### 2.3 活性氧清除的酶类

在水分胁迫忍耐中植物体内会产生一系列的解毒剂，其中最明显的是合成与清除活性氧有关的酶类，如谷胱甘肽还原酶 (Glutathion reductase)，超氧化物歧化酶 (SOD)，过氧化氢酶 (CAT) 等<sup>[78-80]</sup>。这是因为植物在干旱情况下，由于气孔的关闭，光下光合作用产生的电子会传递给氧，生成超氧化物自由基，对细胞有强烈的伤害。因此干旱中体内清除活性氧的酶增加，对细胞具有很好的保护作用。但是对转基因烟草的研究发现 SOD、CAT 等单独转入烟草效果不尽理想，看来活性氧代谢是非常复杂的，单一基因难以有明显的效果<sup>[29,80,87]</sup>。

## 3 植物水分胁迫响应的研究展望

尽管几年来对植物水分胁迫响应分子机制的研究取得了不少进展，但与彻底搞清这一重大问题还有相当长的距离。今后几年以下的问题可能会受到关注。

### 3.1 胁迫信号的感知与传导

1997年 Shinozaki 等<sup>[25,26,83,84]</sup> 借鉴了大肠杆菌和酵母的信号感知与传输系统，提出了信号感知的基本框架 (图3)。在大肠杆菌中，水分胁迫，细胞膨压改变，有一个双成分系统首先感知，此双成分系统为 Env2，它作为一种渗透检测计 (Osmosensor) 或称检测激酶 (Sensorykinase)。另一个跨膜的检测计称为 Sholp，它含有4个疏水的肽段，插在细胞质膜上，其C-端含有一个SH3结构域，靠此进行信号的感知传递。传递信号的办法是靠磷酸化，由激酶 MAPK 实施。这些研究对植物感知胁迫信号的方式提供了有意义的启示。

另外干旱胁迫是否首先形成活性氧自由基，这个自由基是否可为胁迫信号 (称为氧化爆破, Oxidative burst)? 图3中的问号将会是今后研究的内容。

### 3.2 胁迫响应基因转录的调节

尽管现在已鉴定出了部分基因的启动子以及调节蛋白，但总体来讲仍处于起步阶段。这些问题仍然是今后研究的热点。除了转录水平，转录后基因的表达也存在着许多控制点，诸

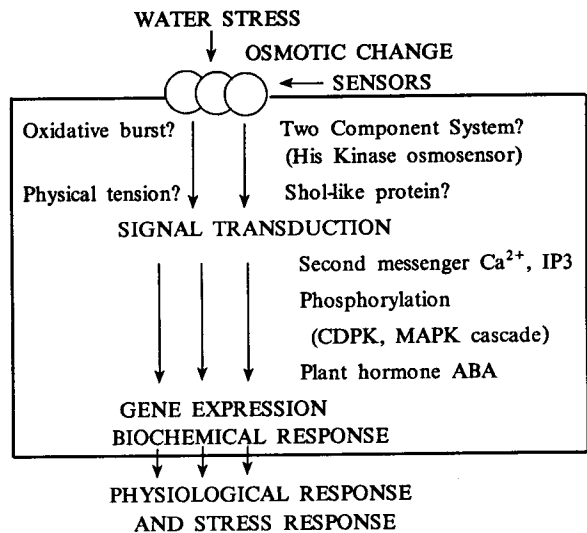


Fig. 3 Second messengers and factors involved in the signal perception and the signal transduction in water stress response. Two-component His Kinase is thought to function as an osmosensor in plants. Ca<sup>2+</sup> and IP3 are the most probable second messengers of the dehydration signal. The phosphorylation process functions in water stress and ABA signal transduction pathways. ABA plays important role in the regulation of gene expression as well as physiological responses during water stress<sup>[26]</sup>.

如 mMA 的加工与处理, 转录物的稳定性, 翻译的有效性以及翻译后蛋白质的修饰与加工这些都影响到了基因的表达。此外胁迫响应中的负调控, 即水分胁迫时被抑制的基因的表达机制也将受到重视。

### 3.3 胁迫响应中所出现的蛋白质的功能

胁迫响应中所出现的蛋白质一部分的功能已经知道, 但大部分的基因产物的功能还不清楚, 即使已知其功能的蛋白质, 其作用方式、作用机理、稳定性以及与其它基因的关系还远不清楚。

### 3.4 基因转化

在今后相当长的一段时间内, 转基因的实验仍将是研究热点, 对水分胁迫响应中的蛋白质的基因的转移, 一方面为研究被转移基因的功能提供了极有用的方法, 同时也为人类最终改良作物抗逆性, 提高作物的产量和品质开辟了新途径。

### 参考文献:

- [1] Bray E A. Plant responses to water deficit [J]. Trends Plant Sci, 1997, 2:48-54.
- [2] Bray E A. Alterations in gene expression in response to water deficit [A]. In: Basra A S. Stress and Gene Expression in Plants [M]. Harwood Academic Publishers, Ludluana, India, 1994, 1-23.
- [3] Holmstrom K O. Engineering plant adaption to water stress [J]. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Agraria, 1998, 84:49-62.
- [4] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47:377-403
- [5] Turner N C. Crop water deficits: a decade of progress [J]. Adv Agron, 1986, 39:1-51.
- [6] Close T J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins [J]. Physiol Plant, 1996, 97:795-803.
- [7] Close T J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature [J]. Physiol Plant, 1997, 100:291-296.
- [8] Close T J, Fenton R D, Yang A et al. Dehydrin: the protein [A]. In: Close T J, Bray E A. Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress [C]. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1993, 104-118.
- [9] Kermode A R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds [J]. Seed Science Research, 1997, 7:75-95.
- [10] McCue K F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application [J]. Trends Biotechnol, 1990, 8:358-362.
- [11] Bartels D, Hanke C, Schneider A D et al. A desiccation-related Elip like gene from the reaction plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA [J]. EMBO J, 1992, 11:2771-2778.
- [12] Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptations to environmental stresses [J]. Plant Cell, 1995, 7:1099.
- [13] John K. The Genetic Basis of Plant Physiological Processes [M]. Oxford University Press, 1991, 19-33.
- [14] Giraudat J, Parcy F, Bertauche N et al. Current advances in abscisic acid action and signalling [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26:1557-1577.
- [15] Marin E, Nussaume L, Quesada A et al. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana glauca*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana* [J]. EMBO J, 1996, 15:2331-2342.
- [16] McCarty D R. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46:71-93.
- [17] Gray J, Close P S, Briggs S P et al. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *L1s1* gene of maize [J]. Cell, 1997, 89:25-31.
- [18] Tardieu F, Zhan J, Katerji N et al. Xylem ABA controls the stomatal conductance of field grown maize subject to

- soil compaction or soil drying [J]. *Plant Cell Environ*, 1992, 15:193–197.
- [19] Yamaguchi-Shinozaki 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.
- [20] Bartels D, Nelson D. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics [J]. *Plant Cell Environ*, 1994, 17:659–667.
- [21] Blatt A M, Thiel G, Trentham D R. Reversible inactivation of  $K^+$  channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate [J]. *Nature*, 1990, 346:766–768.
- [22] Bohnert H J, Jensen R G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants [J]. *Trends Biotechnol*, 1996, 14: 89–97.
- [23] Jonak C, Kiegerl M, Ligterink W et al. Stress signalling in plants: a MAP kinase pathway is activated by cold and drought [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:11274–11279.
- [24] Kusano T, Berberich T, Harada M et al. A maize DNA-binding factor with a bZIP motif is induced by low temperature [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 248:507–517.
- [25] Maeda T, Takekawa M, Saito H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor [J]. *Science*, 1995, 269:554–558.
- [26] Shinozaki K, Kazuko Y S I. Gene expression signal transduction in water-stress response [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115:327–334.
- [27] Meyer Leube M P, Grill E. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science*, 1994, 264:1452–1455.
- [28] Mioguchi T, Irie K, Hirayama T et al. A gene encoding a MAP kinase is induced simultaneously with genes for a MAP kinase and an S6 kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:765–769.
- [29] Chandler P K, Robertson M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45:113–141.
- [30] Culter S, Bonetta D, Cooney S et al. A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1996, 273:1239–1241.
- [31] Griffiths A, Bray E A. Shoot induction of ABA-requiring genes in response to soil drying [J]. *J Exp Bot*, 1996, 47: 1525–1531.
- [32] Lu G, Paul A L, McCarty D et al. Transcription factor veracity: is GBF3 responsible for ABA-regulated expression of *Arabidopsis* *Adh*? [J] *Plant Cell*, 1996, 8:947–957.
- [33] Leung J, Bouvier-Durand M, Moris P C et al. *Arabidopsis* ABA response gene *Abil*: features of a calcium-modulated protein phosphatase [J]. *Science*, 1994, 264:1448–1452.
- [34] Ouvrard O, Cellier F, Ferrare K et al. Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31:819–829.
- [35] Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 247:391–398.
- [36] Lee T K, Lur R S, Chu C. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels [J]. *Plant Cell Environ*, 1993, 16:481–490.
- [37] Moons A, Bauw G, Prinsen E et al. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant indica rice varieties [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:177–186.
- [38] Shen Q, Ho T M. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complex each containing a G-box and a novel cis-acting element [J]. *Plant Cell*, 1995, 7:295–307.
- [39] Menkes A E, Schindler U, Cashmore A R. The G-box: a ubiquitous regulation DNA element in plants bound by GBF family of bZIP proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20:506–510.
- [40] Stockinger E J, Glinour S J, Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an Ap2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:1035–1040.
- [41] Leung J, Merlot S, Girsudet J. The *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive2 (ABI2) and Abl1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction [J]. *Plant Cell*, 1997, 9:759–771.
- [42] Urao T, Katagiri T, Mioguchi T et al. Two genes that encode Ca-dependent protein kinases are induced by drought



- and high-salt stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 224:331–340.
- [43] Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S et al. An *Arabidopsis myb* homologue is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence [J]. *Plant Cell*, 1993, 5:1529–1539.
- [44] Vernon D M, Tarcynski M C, Jensen R G et al. Cyclitol production in transgenic tobacco [J]. *Plant J*, 1993, 4: 199–205.
- [45] Sheen J. Ca-dependent protein kinase and signal transduction in plants [J]. *Science*, 1996, 274:1900–1902.
- [46] Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T et al. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:3903–3907.
- [47] Danyluk T, Houde M, Rassart E et al. Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant Gramineae species [J]. *FEBS Lett*, 1994, 344:20–24.
- [48] Labbili K, Joudrier P, Gautier N I F. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance [J]. *Plant Sci*, 1995, 112:219–230.
- [49] Artlip T S, Callahan A M, Bassett C L et al. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch.) [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 33:61–70.
- [50] Baker J, Steele C, Dure L M. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and genes from cotton [J]. *Plant Mol Biol*, 1988, 11:277–291.
- [51] Dure L M, Crouch M, Harsda J et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 12:475–486.
- [52] Kavi Kishor P B, Miao G-H, Hu C A A et al. Overexpression of pyrroline 5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:1387–1394.
- [53] Xu D P, Duan X L. Expression of a late embryogenesis abundant protein, HVA1, from barley confers tolerance to deficit water [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110:249–257.
- [54] Pelah D, Wang W, Altman A et al. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response [J]. *Physiol Plant*, 1997, 99:153–159.
- [55] Pilon-Smits E A H, Ebskamp M J M, Paul M J et al. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:125–130.
- [56] Russell B L, Bala R. Osmotic stress induces expression of choline monoxygenase in sugar beet and amaranth [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116:856–865.
- [57] Shen B, Jensen R G, Bohert H J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113:1177–1183.
- [58] Sheveleva E. Sorbitolphosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:831–839.
- [59] Sheveleva E, Chmara W, Bohnert H J et al. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115:1211–1219.
- [60] Grumet R, Hanson A D. Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1986, 13:353–364.
- [61] Hanson A D, Wyse R. Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity [J]. *Plant Physiol*, 1982, 70:1191–1198.
- [62] Rathinasabapathi B, Burnet K, Russell B L et al. Choline monoxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:3454–3458.
- [63] Rathinasabapathi B, McCue K F, Gage D A et al. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance [J]. *Planta*, 1994, 193:155–162.
- [64] Ishitani M, Nakamura T, Han S Y et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27:307–315.
- [65] LeRudulier D, Bouillard L. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteraceae [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 46:152–159.
- [66] McCue K F, Hanson A D. Effects of soil salinity on the expression of betaine aldehyde dehydrogenase in leaves: investigation of hydraulic, ionic and biochemical signals [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1992, 19:555–564.
- [67] McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beets: cDNA cloning and expression [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18:1–11.

- [68] Hayashi H A, Mustardy L, Deshmittm P et al. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress [J]. *Plant J*, 1997, 12:133-142.
- [69] Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycine betaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes [J]. *Plant J*, 1997, 11:1115-1120.
- [70] Nomura M, Ishitani K, Takabe T et al. *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli* bet genes produces glycine betain from choline and acquires resistance to salt stress [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:703-708.
- [71] Bumet K, Lafontaine P J, Hanson A D. Assay, purification, and partial characterization of choline monoxygenase from spinach [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:581-588.
- [72] Yoshiba Y E. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38:1095-1102.
- [73] Lilius G, Holmberg N, Bulow L. Enhanced NaCl stress tolerance in tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase [J]. *Bio/Technology*, 1996, 14:177-180.
- [74] Shen B, Jenson R G, Bohert H J. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115:527-532.
- [75] Tao R, Uratsu S L, Dandekar A M. Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36:525-532.
- [76] Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J. Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:2600-2604.
- [77] Tardieu F, Lafarge T, Simonneau T. Stomatal control by fed or endogenous xylem ABA in sunflower: interpretation of correlations between leaf water potential arid stomatal conductance in anisohydric species [J]. *Plant Cell Environ*, 1996, 19:75-94.
- [78] Smimoff N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation [J]. *New Phytol*, 1993, 125:27-58.
- [79] Smimoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28:1057-1060.
- [80] Tsang E W T, Bowler C, Herouart D et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress [J]. *Plant Cell*, 1991, 3:783-792.
- [81] Allen R D. Dissection of oxidation stress tolerance using transgenic plants [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:1049-1054.
- [82] Schultes N P, Zelitch L, McGonigle B et al. The primary leaf catalase from *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca* [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106:399-400.
- [83] Poses F, Wurgler-Murphy S M, Maeda T et al. Yeast HOG1MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in SLN1-YPD1-SSK1 'two component' osmosensor [J]. *Cell*, 1996, 86:865-875.
- [84] Wurgler-Murphy S M, Saito H. Two-component signal transducer and MAPK cascade [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 2:172-176.