

## 甘蓝型油菜*BnGOLS1*基因启动子的克隆、序列分析及瞬时表达

景寅, 李煦, 汪晓峰\*

北京林业大学林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京100083

**摘要:** 以甘蓝型油菜‘德油五号’基因组DNA为模板, 通过反向PCR扩增得到肌醇半乳糖苷合成酶基因(*BnGOLS1*)启动子片段, 长度为827 bp。PLACE和PlantCARE启动子预测工具分析表明: 序列中含有TATA-Box、CAAT-Box等基本转录元件, 以及ABRE、DRE、HSE、w-Box等顺式作用元件。将克隆得到的*BnGOLS1*启动子取代pBI121中的CaMV35S启动子, 构建*BnGOLS1*启动子控制报告基因的GUS表达载体pBI-GS-GUS, 通过农杆菌介导的方法在油菜组织中进行瞬时表达。GUS染色结果表明*BnGOLS1*启动子可以驱动GUS基因在油菜组织中的表达。

**关键词:** 油菜; *BnGOLS1*基因启动子; 序列分析; 瞬时表达

## Cloning, Sequence Analysis and Transient Expression of *BnGOLS1* Gene Promoter from *Brassica napus*

JING Yin, LI Xu, WANG Xiao-Feng\*

Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** The *BnGOLS1* promoter fragment (827 bp) was amplified from the genomic DNA of *Brassica napus* by inverse polymerase chain reaction. Promoter sequence analysis by PLACE and PlantCARE showed that the cloned fragment contained several putative *cis*-elements, such as abscisic acid response element (ABRE), dehydration-responsive element (DRE), heat shock elements (HSE), WRKY transcription factor recognition site w-Box and so on, as well as TATA-Box and CAAT-Box. A recombinant vector designated as pBI-GS-GUS was generated through the replacement of CaMV35S promoter in pBI121 by the cloned *BnGOLS1* promoter fragment, in which the reporter *GUS* is under the control of *BnGOLS1* promoter. Transient expression of pBI-GS-GUS in *Brassica napus* was performed by *Agrobacterium tumefaciens* mediated method. Histochemical staining of GUS revealed that the promoter of *BnGOLS1* could drive the expression of *GUS* gene in *Brassica napus*.

**Key words:** *Brassica napus*; *BnGOLS1* promoter; sequence analysis; transient expression

种子成熟脱水是正常性种子发育成熟过程中的一个必经阶段。正常性种子在发育过程中获得脱水耐性, 可溶性碳水化合物的积累是种子在发育和成熟过程中形成脱水耐性的原因之一(Lepince等1993; Wang等2003)。其中, 包括棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖在内的棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides, RFOs)在种子发育后期累积, 持续到种子脱水阶段, 并存在于干燥后仍能保持活力的组织内, 与种子脱水耐性的获得具有时空一致性(Horbowicz和Obendorf 1994; Brenac等1997; Peterbauer和Richter 2001)。大量实验结果表明, 具有较强脱水耐性的种子在发育过程中大量积累RFOs, 而不耐脱水的种子发育过程中基本不积累RFOs (Blackman等1992; Peterbauer等2001)。肌醇半乳糖苷合成酶(galactinol synthase, GOLS)催

化UDP-Gal上的半乳糖基转移到肌醇分子上, 生成肌醇半乳糖苷, 作为RFOs生物合成过程中半乳糖基的唯一供体。因此GOLS被认为是RFOs合成中的关键酶(Peterbauer等2001)。实验室前期工作表明, GOLS活性与甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)种子的脱水耐性密切相关, 同时油菜*BnGOLS*基因已被克隆, 其编码的GOLS酶学性质也通过重组酶得以阐明(Li等2011)。

基因表达的转录调节在植物生长发育以及对环境信号的应答反应中起着重要的作用, 是植物

收稿 2011-10-14 修定 2011-11-09

资助 国家林业公益性行业科研专项(201104024)和国家林业局引进国际先进农业科学技术计划(“948”项目)(2011-4-54)。

\* 通讯作者(E-mail: wxf801@sina.com; Tel: 010-62336114)。

分子生物学和植物生理学研究的重点(Le等2010)。经过多年的研究,人们已经对植物基因表达的调节因子及其信号传导途径有了一定的认识。在不同环境下(如正常器官发育过程、生物与非生物胁迫等)许多转录因子都可以通过与基因启动子区域内各类顺式作用元件相互作用而起到调节基因表达的作用(Suzuki等2011)。因此对特定基因启动子内所含顺式作用元件的分析就成为了确定基因表达调控情况所不可缺少的步骤。

油菜作为世界上广为种植的油料作物,其种子具有很强的脱水耐性。因此,在前期工作的基础上,研究油菜*BnGOLS*基因启动子对于深入了解油菜*BnGOLS*基因表达调控情况,以及进一步阐明油菜种子脱水耐性形成的机理都具有十分重要的意义。

## 材料与amp;方法

### 1 实验材料

植物基因组DNA提取所使用的材料为甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.) ‘德油5号’(购自成都德农正成种子公司);实验所需分子生物学工具酶购自TaKaRa公司;pGEM-T载体购自Promega公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10及根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105,植物表达载体pBI121均由本实验室保存。2-吗啉乙磺酸[2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid, MES]、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)、X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -*D*-glucoside, 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷)、卡那霉素(kanamycin, Kan)为INALCO公司产品,其余试剂均为国产分析纯产品。

### 2 方法

#### 2.1 反向PCR模板的制备

将油菜种子置于铺有双层湿润滤纸的培养皿中,于25℃恒温箱中萌发。剪取萌发后5日龄的油菜幼苗子叶,于液氮中研磨成粉末。提取所得

DNA样品进行琼脂糖凝胶电泳和紫外吸光度分析以确定其纯度、浓度及完整性。

使用多种限制性内切酶(*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I、*Sac*I等)分别消化2  $\mu$ g油菜基因组DNA,在内切酶各自合适的反应温度下酶切3 h。酶切产物用酚/氯仿抽提,乙醇沉淀后用适量双蒸水溶解。使用T4 DNA连接酶进行酶切DNA的自环化,连接体系中DNA终浓度为3  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>,16℃连接过夜。连接产物用酚/氯仿抽提,乙醇沉淀后用适量双蒸水溶解,作为反向PCR的模板。

#### 2.2 反向PCR引物的设计

根据本实验室之前所得到的甘蓝型油菜*BnGOLS1*基因ORF序列(GenBank序列号FJ407183),在其ORF内部设计两对嵌套的反向PCR引物,分别命名为SP1/AP1及SP2/AP2。其序列分别为:SP1: 5'-AACTGGGTCTGGTTCTCGGGTGGGTAA-3', AP1: 5'-GGATGTGGTGAATCTGAAGCCGTTAT-3'; SP2: 5'-GTGGACTGGTGGTGACGGTTA-3', AP2: 5'-CGTTTATCTCCGCTCTTACTGAA-3'。引物结合位点相对位置及方向见图1。

#### 2.3 反向PCR

以DNA自连产物为模板,SP1/AP1为引物进行第一轮PCR。为提高反应特异性,采用touch-down PCR方法,热循环条件为94℃预变性5 min;94℃变性30 s,68℃退火1 min(退火温度每循环降低0.8℃),72℃延伸3 min,10个循环;94℃变性30 s,60℃退火1 min,72℃延伸3 min,25个循环;72℃延伸10 min。将第一轮PCR产物稀释10倍后作为模板,SP2/AP2为引物进行巢式PCR,热循环条件为94℃预变性5 min;94℃变性30 s,68℃退火1 min(退火温度每循环降低0.8℃),72℃延伸3 min,12个循环;94℃变性30 s,58℃退火1 min,72℃延伸3 min,25个循环;72℃延伸10 min。巢式PCR产物电泳切胶回收,片段与pGEM-T载体连接,转化大肠杆菌,挑取阳性克隆用于摇菌并提取质



图1 反向PCR引物设计示意

Fig.1 Sketch map of primers for inverse-PCR

两对反向的引物SP1/AP1及SP2/AP2嵌套排列,通过两轮巢式PCR获得结构基因两侧的序列,从中分析得出启动子序列。

粒,待酶切及PCR验证后测序。

## 2.4 序列分析

截取反向PCR扩增所得序列中SP2与相应酶切位点之间的序列,获得其反向互补序列,即为油菜基因组中SP2结合位点上游的序列,包含部分*BnGOLS1*结构基因序列、上游5'-UTR区(untranslated region,非翻译区)以及启动子区域。其中相应酶切位点与转录起始位点之间的部分即认为是*BnGOLS1*基因启动子区,其序列用于进一步的分析。使用植物顺式作用元件数据库PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)及PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)分析启动子区,获得*BnGOLS1*基因启动子中顺式作用元件信息。

## 2.5 *BnGOLS1*启动子分析载体的构建

根据反向PCR所得*BnGOLS1*基因启动子序列(GenBank序列号HM003640)设计引物如下:

GSPro-SP: 5'-CCCAAGCTTAAGTAAACGATAATGGAAGCAGA-3'  
HindIII

GSPro-AP: 5'-CGCGGATCCCGTGAGTTTGAAGATTAGAGTA-3'  
BamHI

以油菜基因组DNA为模板进行PCR,扩增*BnGOLS1*基因启动子部分序列,退火温度为59℃。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收略小于1 kb片段(理论长度877 bp),回收产物经BamHI、HindIII双酶切,并纯化酶切产物。

取pBI121质粒进行BamHI、HindIII双酶切,酶切产物在电泳后,切胶回收约14 kb大片段。使用T4 DNA连接酶连接上述启动子小片段及pBI121

BamHI、HindIII双酶切大片段,连接产物转化大肠杆菌TOP10感受态细胞,涂布LB+Kan平板,37℃倒置培养16 h。挑取阳性菌落,接种于LB+Kan液体培养基中,37℃过夜培养,菌液提取质粒,BamHI、HindIII双酶切验证插入片段大小是否正确。验证正确的质粒命名为pBI-GS-GUS,质粒构建过程见图2。通过液氮冻融法将pBI-GS-GUS载体转化到农杆菌EHA105中。

## 2.6 农杆菌介导*BnGOLS1*启动子载体的瞬时表达

在超净台中切取生长于MS培养基上的油菜无菌实生苗部分叶片及茎段,将切下的组织浸泡于OD<sub>600</sub>≈0.5的农杆菌(转有pBI-GS-GUS)菌液中,抽气侵染3 min,取出组织,用无菌滤纸吸去多余菌液,将侵染后的植物组织放回MS培养基中,于25℃暗培养2 d。GUS染色方法参考Jefferson等(1987)所报道的方法进行并稍有改动,用以分析*BnGOLS1*启动子瞬时表达情况:取出暗培养结束的植物组织,用0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 7.0)冲洗叶片3~5次,将表面附着的农杆菌清洗干净,用滤纸吸去多余液体,放入玻璃小瓶中;加入GUS染液[0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH 7.0磷酸缓冲液,0.5 mg·mL<sup>-1</sup> X-Gluc,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>,10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,0.01% TritonX-100,0.03% NaN<sub>3</sub>]至没过叶片,抽气15 min;取出小瓶震荡均匀,继续抽气30 min;待植物组织表面不再产生气泡,取出小瓶,置于37℃下避光染色过夜;将染色后组织置于70%乙醇中,37℃震荡脱色;更换数次乙醇至叶绿素脱除干净,取出组织,吸干多余液体,拍照。

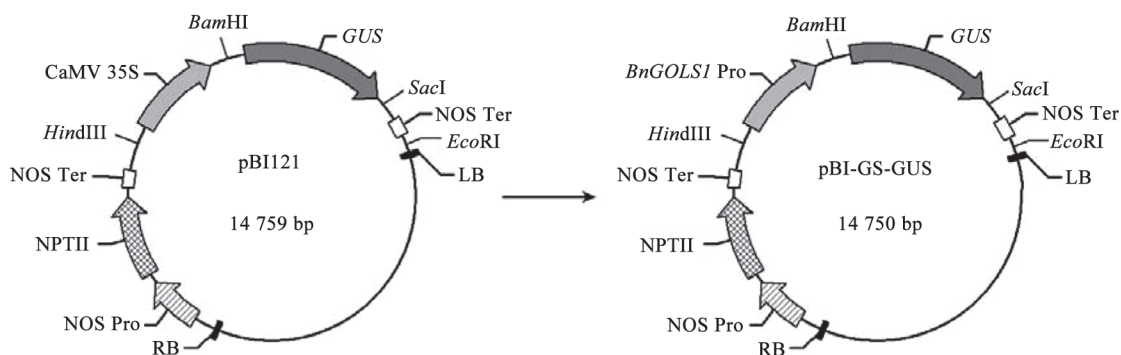


图2 *BnGOLS1*启动子功能分析载体构建

Fig.2 Construction of *BnGOLS1* promoter analysis vector



## 实验结果

### 1 *BnGOLS1*基因启动子的克隆

所提取油菜基因组DNA经琼脂糖电泳、分光光度计检测,结果显示样品基本无降解,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值在1.8~1.9之间,OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>比值在2以上,无明显蛋白、多糖及RNA污染,可用于后续实验的油菜基因组DNA作为模板。

反向PCR结果如图3。第一次PCR中产生目的片段较少,不能在凝胶染色结果中观察到,产生的暗条带多为非特异性扩增所致,因此有必要进行巢式PCR。第二次PCR产物中,以*Hind*III酶切自连产物为模板得到了特异的亮条带,大小约为2 kb(图3泳道4)。

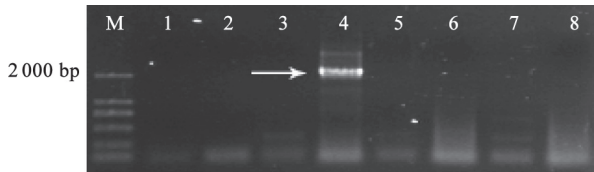


图3 反向PCR产物电泳结果

Fig.3 PCR products of inverse-PCR

M: DL2000 DNA Marker; 1, 3, 5, 7: 第一轮PCR结果,分别以*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I、*Sac*I酶切自连产物为模板; 2, 4, 6, 8: 第二轮PCR结果,分别以*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I、*Sac*I酶切自连产物为模板。

回收上述2 kb特异条带构建克隆,质粒经PCR和酶切验证后进行测序,获得插入片段的序列。

将测序结果中SP2结合位点与相应酶切位点之间的序列截取出来,得到其反向互补序列。比对表明此序列3'端可与*BnGOLS1* ORF序列5'端部分匹配,因此确认所得序列为*BnGOLS1*基因上游序列,其中包含*BnGOLS1*基因启动子区。将此序列提交GenBank,序列号为HM003640。

### 2 *BnGOLS1*基因启动子序列的分析

将*BnGOLS1*基因启动子序列分别提交到PlantCARE及PLACE数据库进行分析。结合二者分析结果,以明确*BnGOLS1*基因启动子中顺式作用元件的分布情况。分析结果表明,*BnGOLS1*基因启动子中含有TATA-Box、CAAT-Box等基本转录元件,以及ABRE (G-Box)、DRE、HSE、MYCR、w-Box等顺式作用元件(图4)。

通过与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)肌醇半乳糖苷合成酶基因家族成员的启动子相比较,可以发现*BnGOLS1*与*AtGOLS1*启动子中顺式作用元件的分布较为一致,而与其他成员不同(图5)。拟南芥*AtGOLS*基因启动子顺式作用元件信息来自Taji等(2002)的报道。

### 3 *BnGOLS1*启动子分析载体的构建

将启动子片段与pBI121载体均进行*Bam*HI、*Hind*III双酶切后连接,构建由*BnGOLS1*启动子驱动报告基因*GUS*表达的启动子分析载体。重组质粒PCR验证(877 bp)、*Hind*III单酶切(14 776 bp)以及*Hind*III、*Eco*RI双酶切(11 726 bp+3 050 bp)验证均显示插入片段大小符合预期(图6),成功将pBI121质粒中驱动报告基因表达的CaMV 35S启动子替换为*BnGOLS1*启动子,重组质粒命名为pBI-GS-GUS。

### 4 *BnGOLS1*启动子瞬时表达结果

将验证正确的pBI-GS-GUS重组质粒转入农杆菌EHA105,侵染油菜组织。同时以转化切去CaMV 35S启动子后自连的pBI121的农杆菌为负对照(CK),以转有pBI121质粒的农杆菌为正对照。侵染后的组织经*GUS*染色,结果如图7。实验结果显示,负对照由于*GUS*基因上游缺乏启动子序列,侵入植物细胞后不能表达,不能产生*GUS*活性,因此不能分解X-Gluc而显无色。正对照中CaMV 35S启动子可驱动*GUS*基因在植物营养组织细胞内高水平表达,因此叶片、茎段切口处显示较深的蓝色。而转化pBI-GS-GUS的实验组中,植物组织可被染成较浅的蓝色,显示反向PCR克隆得到的*BnGOLS1*上游序列可以在一定程度上驱动下游基因表达,具有启动子的功能。

## 讨 论

序列分析结果表明,*BnGOLS1*基因启动子中含有多个顺式作用元件,其中包含多个与环境信号响应相关的元件,它们可作为转录因子可能的调控位点。

ABRE (abscisic acid response element)与DRE (dehydration-responsive element)是两个主要的脱水信号响应元件,其核心序列分别为ACGT (Shen等1993)及A/GCCGACNT (Yamaguchi-Shinozaki和

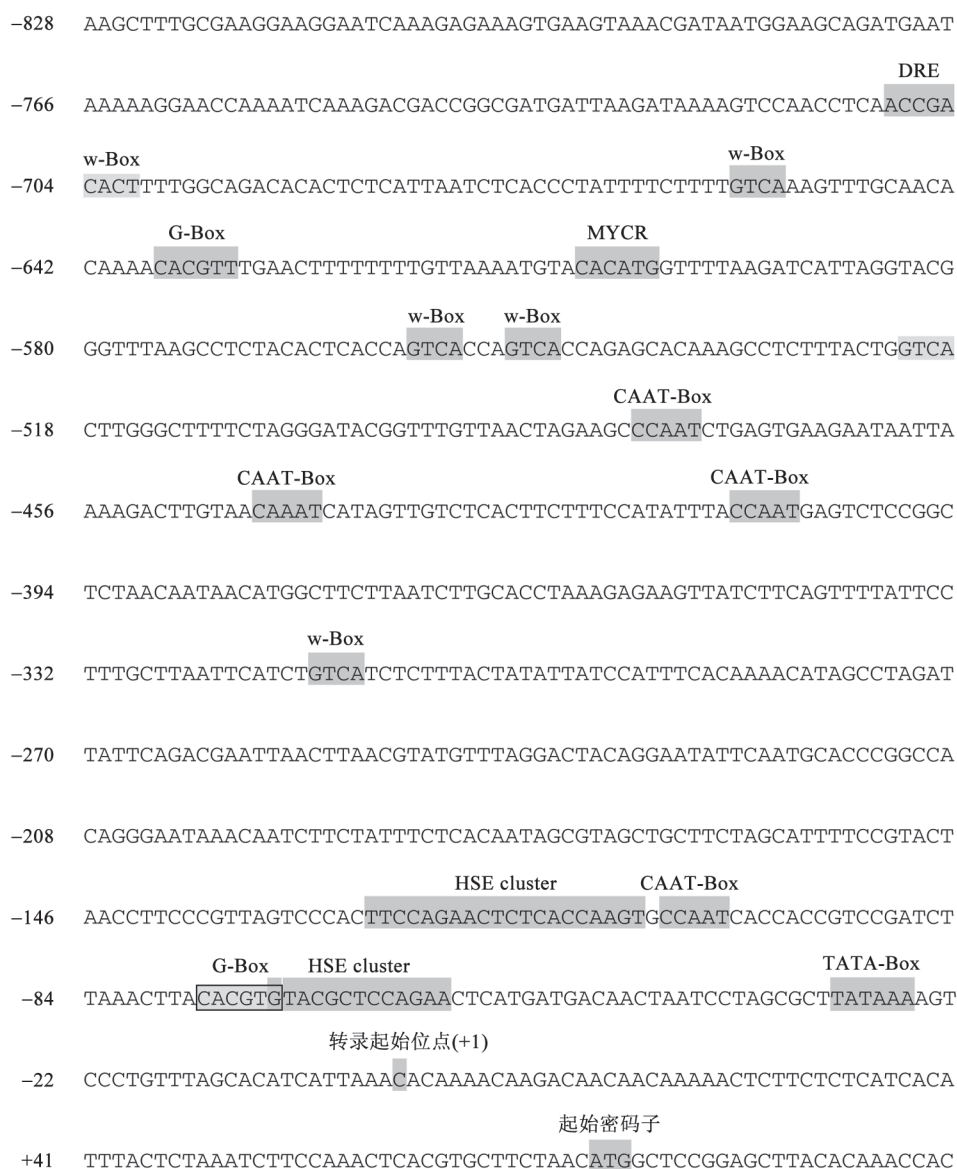


图4 *BnGOLS1*启动子序列及顺式作用元件  
Fig.4 *cis*-acting elements in *BnGOLS1* promoter

Shinozaki 1994), 二者分别在ABA (abscisic acid, 脱落酸)依赖与非ABA依赖的基因诱导表达中发挥作用。近年来, 也有报道DRE/DREB (DER/DRE binding protein)系统通过与ABRE/AREB (ABRE/ABRE binding protein)系统共用信号通路中的元件而参与对内生ABA响应的慢速基因表达中(Narusaka等2003)。通常情况下, 启动子中仅存在一个ABRE元件还不足以使基因的表达明显受ABA的诱导(Shen和Ho 1995; Shen等1996), 但一个DRE元件就足以使基因的表达受DREB的调控。Taji等

(2002)报道, 拟南芥中*AtGOLS1*的表达受ABA影响较小, 其表达方式与转录因子DREB2的表达方式相似。*BnGOLS1*的情况与拟南芥相似, 显示其可能是通过DRE/DREB系统来对干旱信号进行响应的, 进而促进种子耐脱水性的形成, 但ABA也可能在一定程度上诱导其表达。

HSE (heat shock elements)通过与HSF的相互作用来调节基因表达, 以实现植物对高温的响应。如在热诱导条件下, 拟南芥*AtGOLS1*基因的表达发生大幅度上调(Panikulangara等2004; Nishiza-

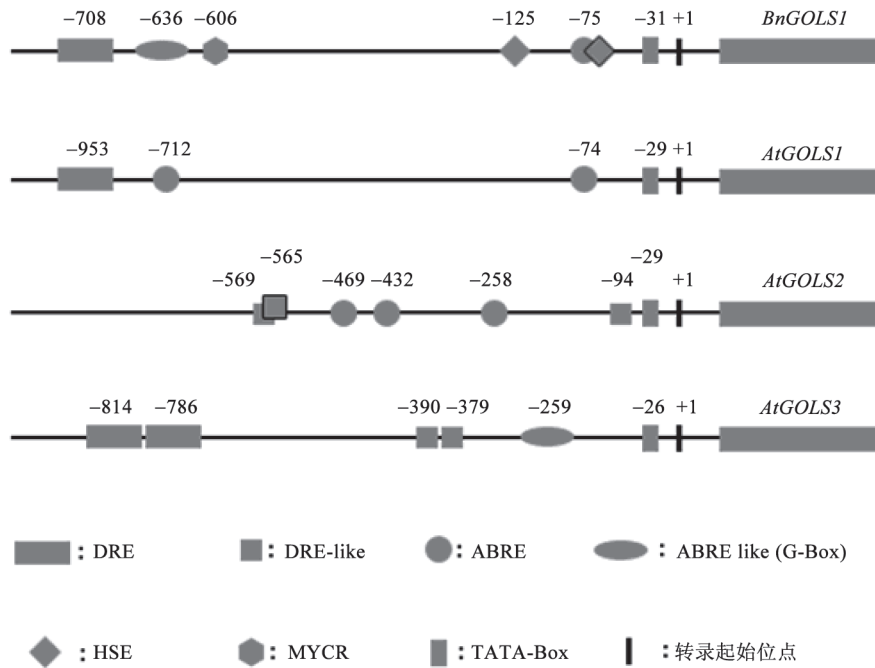


图5 *BnGOLS1*、*AtGOLS1*、*AtGOLS2*及*AtGOLS3*启动子中顺式作用元件排布

Fig.5 Arrangement of *cis*-acting elements in the promoters of *BnGOLS1*, *AtGOLS1*, *AtGOLS2* and *AtGOLS3*

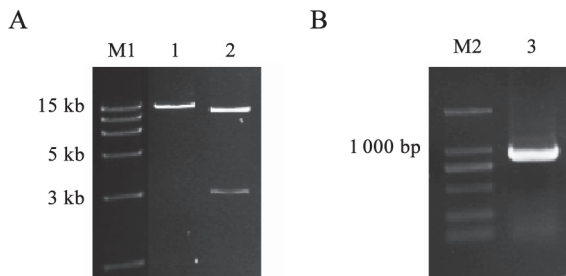


图6 pBI-GS-GUS重组质粒验证

Fig.6 Verification of recombinant pBI-GS-GUS

A: 酶切验证。M1: DL15000 DNA Marker; 1: *Hind*III单酶切 pBI-GS-GUS; 2: *Hind*III、*Eco*RI双酶切 pBI-GS-GUS。B: PCR扩增验证。M2: DL2000 DNA Marker; 3: 以 pBI-GS-GUS 模板扩增插入的 *BnGOLS1* 启动子片段。

wa等2008)。真核生物HSE元件的功能区序列为其核心元件5'-nGAAn-3' (或其互补序列5'-nCTTn-3') 的串联重复(Barros等1992)。*BnGOLS1*基因启动子中有多个HSE元件,主要集中在-75区与-125区。近年来人们发现,除了热诱导外,高光照、氧化剂处理等均会引起HSF表达量的上调,进而通过与HSE的相互作用影响许多基因的表达,显示HSE/HSF (heat shock elements/heat shock factor)系统在

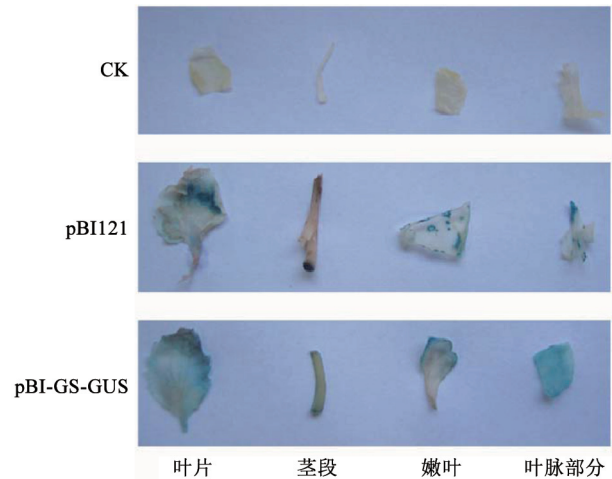


图7 *BnGOLS1*启动子瞬时表达分析

Fig.7 Transient expression assay of *BnGOLS1* promoter

植物对高温、强光照及氧化胁迫的响应中均发挥了重要作用。抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)作为一个重要的抗氧化系统成员,被认为在植物抵抗氧化胁迫中发挥着重要作用(Storozhenko等1998)。实验表明,拟南芥APX基因的启动子中存在着丰富的HSE元件,其表达也受到高

温、强光照及氧化剂处理的诱导(Panchuk等2002; Nishizawa等2006)。已有众多证据表明, 高温、强光照、氧化剂处理以及水分亏缺均会使植物组织内活性氧水平的增高。而氧化胁迫也会诱导*GOLS*基因的表达(Nishizawa等2008; Ishibashi等2011)。因此猜测*BnGOLS1*通过HSE/HSF系统的调控参与到体内活性氧的清除, 降低脱水对植物组织的氧化损伤, 提高种子对脱水的忍耐力。

w-Box是近年来发现的一类顺式作用元件, 与其相结合的是WRKY蛋白转录因子家族。这一类转录因子因其N端含有由WRKYGQK组成的高度保守的氨基酸序列而得名(Rushton等2010)。以往所发现的WRKY调控靶基因多是与植物抗病和抗逆相关的基因。近年来, 许多植物物质代谢和发育相关基因的表达也发现受到WRKY转录因子的调控。Wang等(2009)发现复苏植物牛耳草(*Boea hygrometrica*)的肌醇半乳糖苷合成酶基因启动子区域也存在WRKY转录因子调控的靶序列(w-Box, 核心序列为5'-TGAC-3'或其互补序列5'-GTCA-3'), 显示WRKY信号通路在*GOLS*基因表达的调控过程中起着重要的作用。从克隆得到的油菜*BnGOLS1*基因启动子的分析结果来看, 其TATA-Box上游序列中存在着多个w-Box, 作为可能的WRKY转录因子识别的靶序列。因此WRKY信号转导通路可能也参与了油菜*GOLS*基因在种子脱水耐性获得过程中的差异表达。

除了上述元件以外, *BnGOLS1*基因启动子区域中还存在与冷诱导表达相关的MYCR (CA-CATG), 与胚乳定位表达相关的Skn-1 (GTCAT或其反向互补序列ATGAC)等一系列顺式作用元件。以上对*BnGOLS1*启动子中多种元件的分析结果表明, *BnGOLS1*基因可能受多种环境信号的调控作用, 其启动子活性在本研究中已通过瞬时表达得以初步证明。为进一步研究*BnGOLS1*基因启动子功能, 还需将构建的pBI-GS-GUS植物表达载体转入拟南芥或油菜中, 获得稳定表达的转基因植株, 从而深入探究*BnGOLS1*基因的表达调控情况、组织定位, 以及其在种子脱水耐性获得过程中的生物学功能, 相关研究工作正在进行中。

综合以上分析结果, 结合RFOs的生物学功能, 我们认为*BnGOLS1*可能通过多种途径参与油菜种

子强脱水耐性的形成。一方面, *BnGOLS1*在ABRE、DRE等元件的作用下受脱水信号的诱导, 直接对种子脱水形成的水分亏缺作出响应; 另一方面, 在HSE等元件的作用下, 对于种子发育过程中生成的活性氧信号以及脱水引起的氧化胁迫做出响应。*BnGOLS1*基因表达水平上调导致细胞内肌醇半乳糖苷合成酶活性升高, 合成大量RFOs维持膜脂等生物大分子的结构, 保持细胞结构和功能的稳定, 抵抗脱水对细胞造成的伤害, 使种子获得对脱水的耐性。

### 参考文献

- Barros MD, Czarnecka E, Gurley WB (1992). Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Mol Biol*, 19 (4): 665-675
- Blackman SA, Obendorf RL, Leopold AC (1992). Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiol*, 100 (1): 225-230
- Brenac P, Horbowicz M, Downer SM, Dickerman AM, Smith ME, Obendorf RL (1997). Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *J Plant Physiol*, 150 (4): 481-488
- Horbowicz M, Obendorf RL (1994). Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. *Seed Sci Res*, 4 (4): 385-405
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6: 3901-3907
- Ishibashi Y, Yamaguchi H, Yuasa T, Iwaya-Inoue M, Arima S, Zheng SH (2011). Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *J Plant Physiol*, 168 (13): 1562-1567
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S et al (2010). Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (18): 8063-8070
- Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD (1993). The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci Res*, 3 (4): 231-246
- Li X, Zhuo JJ, Jing Y, Liu X, Wang XF (2011). Expression of a *GA-LACTINOL SYNTHASE* gene is positively associated with desiccation tolerance of *Brassica napus* seeds during development. *J Plant Physiol*, 168 (15): 1761-1770
- Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J*, 34 (2): 137-148
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol*, 147 (3): 1251-1263



- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S (2006). *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J*, 48 (4): 535~547
- Panchuk II, Volkov RA, Schoffl F (2002). Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129 (2): 838~853
- Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schoffl F (2004). *Galactinol synthase1*. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 136 (2): 3148~3158
- Peterbauer T, Lahuta LB, Blochl A, Mucha J, Jones DA, Hedley CL, Gorecki RJ, Richter A (2001). Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition. *Plant Physiol*, 127 (4): 1764~1772
- Peterbauer T, Richter A (2001). Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci Res*, 11 (3): 185~197
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 15 (5): 247~258
- Shen Q, Ho T (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-Box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell*, 7 (3): 295~307
- Shen Q, Uknes SJ, Ho TH (1993). Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. *J Biol Chem*, 268 (31): 23652~23660
- Shen Q, Zhang P, Ho T (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, 8 (7): 1107~1119
- Storozhenko S, De Pauw P, Van Montagu M, Inze D, Kushnir S (1998). The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis APX1* gene promoter. *Plant Physiol*, 118 (3): 1005~1014
- Suzuki N, Sejima H, Tam R, Schlauch K, Mittler R (2011). Identification of the MBF1 heat-response regulon of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 66 (5): 844~851
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 29 (4): 417~426
- Wang XF, Jing XM, Zheng GH (2003). Studies on membrane function and sugar components of ultradried seeds. *Acta Bot Sin*, 45 (1): 23~31
- Wang Z, Zhu Y, Wang L, Liu X, Liu Y, Phillips J, Deng X (2009). A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the galactinol synthase (*BhGolS1*) promoter. *Planta*, 230 (6): 1155~1166
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6 (2): 251~264