

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.03.033

过表达 E3 泛素连接酶 ABRv1 通过泛素化 CPK3 提高拟南芥干旱耐受

邓亚男, 刘志斌, 王健美, 李旭锋, 杨毅

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 拟南芥基因 *ABRv1* 编码了一个 E3 泛素连接酶, 其表达量受到干旱胁迫的诱导. 为了探究 *ABRv1* 功能, 我们构建了 *ABRv1* 的过表达株系并进行干旱处理, 结果显示 *ABRv1* 过表达株系 OE-3 具有 90.4% 的存活率, *ABRv1* 过表达株系 OE-7 有 88.2% 的存活率, 野生型 Col 的存活率则为 53.8%, 而 *abr1* 突变体仅有 7.7% 的存活率, 说明过表达 *ABRv1* 提高了拟南芥对干旱的耐受能力. 我们还测定了干旱处理下的失水率, 也能得出与上述一致的结论. 此外, 我们使用纯化的 GST-*ABRv1*、His-CPK3 蛋白进行了体外 pull-down 实验和体外泛素化实验, 结果证明 *ABRv1* 能够和 CPK3 发生相互作用, *ABRv1* 具有 E3 泛素连接酶活性并且能够把 CPK3 单泛素化. 结果揭示了 *ABRv1* 作为一个正调控因子通过泛素化作用底物 CPK3 参与了拟南芥的干旱胁迫应答过程.

关键词: E3 泛素连接酶; *ABRv1*; 干旱胁迫; CPK3; 泛素化

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)03-0613-06

Over-expressing E3 ligase *ABRv1* enhances drought tolerance via ubiquitinating CPK3 in *Arabidopsis thaliana*

DENG Ya-Nan, LIU Zhi-Bin, WANG Jian-Mei, LI Xu-Feng, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: *Arabidopsis thaliana* gene *ABRv1* encodes an E3 ligase, its expression is induced by drought stress. To investigate the function of *ABRv1*, *ABRv1* over-expressing lines were constructed. Under drought stress, the over-expressing lines OE-3 and OE-7 have 90.4% and 88.2% survival rate respectively, and *ABRv1* wild-type shows a survival rate of 53.8%, but the survival rate of *abr1* mutant is only 7.7%. That is to say, over-expressing *ABRv1* enhances the ability of drought tolerance in *Arabidopsis*. We also detected the water loss rate of *abr1* mutant, *ABRv1* wild-type and *ABRv1* over-expressing lines, which came to an consistent conclusion with mentioned above. Furthermore, we used purified GST-*ABRv1* and His-CPK3 protein to conduct an *in vitro* pull-down assay and an ubiquitination assay. The pull-down assay shows a physical interaction between *ABRv1* and CPK3, and the ubiquitination assay shows that CPK3 protein as a target is ubiquitinated by *ABRv1*. In conclusion, our results demonstrate that *ABRv1* playing as a positive regulator is involved in the response of drought stress via interacting with and ubiquitinating its substrate CPK3.

Keywords: E3 Ligase; *ABRv1*; Drought stress; CPK3; Ubiquitination

收稿日期: 2017-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(31671455); 国家转基因专项(2016ZX08009003-002-001)

作者简介: 邓亚男(1991-), 男, 四川德阳人, 硕士研究生, 研究方向为遗传学与分子进化. E-mail: 765862932@qq.com

通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

1 引言

高等植物在生命周期中遇到了各种胁迫,并建立了相对应的应答机制.在拟南芥中,有许多的基因被证实参与了胁迫应答^[1],但是该基因具体参与胁迫应答机制却并不清楚.干旱胁迫是一种常见的非生物胁迫,干旱胁迫对许多的作物生长有着极大的危害,农作物产量对干旱胁迫尤其敏感^[2],例如,2003年欧洲热浪引起的干旱和高温胁迫造成全欧洲范围内粮食减产大约30%^[3].然而干旱胁迫的调控机制仍未完全清楚,因此研究植物干旱胁迫应答机制对作物增收、基础科学十分的紧急重要.研究发现泛素化过程广泛存在于真核细胞中,并在防御生物与非生物胁迫、胚胎发育、激素应答、蛋白分选、衰老等过程中发挥着重要作用.E3泛素连接酶则是完成泛素化过程中底物识别的重要媒介,在拟南芥基因组中编码的E3泛素连接酶超过1400种,其中有470种具有REALLY INTERESTING NEW GENE(RING)结构域^[4,5].Rma1H1作为一个干旱胁迫应答的正调控因子,通过泛素化降低底物PIP2;1的含量增强了拟南芥的干旱耐受能力^[6];而DRIP1和DRIP2作为负调控因子参与拟南芥干旱胁迫应答,*drip1drip2*的双突变株系增强了拟南芥干旱耐受能力^[7].

我们前期研究表明ABRv1(At5g62460)是一个具有RING-v型结构域的蛋白.通常具有RING型结构域的蛋白会表现出E3泛素连接酶活性^[8].杨东波等人发现ABRv1能够参与ABA介导的气孔关闭,气孔作为调节植物水分含量的器官在植物逆境应答中起着至关重要的作用,这一过程也受到相应的基因调控.这提示了ABRv1的功能很可能会与水的缺失有关系,因此更进一步的研究ABRv1与水缺失的关系对揭示ABRv1生理功能很有帮助.

本研究探究了野生型拟南芥在不同时间干旱胁迫下ABRv1的表达量情况.并以ABRv1过表达株系、*abr1*突变体株系及野生型为材料,通过干旱胁迫处理之后统计了三种株系拟南芥的存活率,并在室温条件下测定了三种株系拟南芥的失水率,来探究ABRv1是否具有增强拟南芥干旱耐受能力的生理功能,结果显示过表达ABRv1增强了拟南芥的干旱耐受能力.此外,为了进一步的阐明ABRv1在分子层面的作用机制,又进行了ABRv1与CPK3的体外泛素化研究,并进一步的用pull-down实验验证了两者在体外具有相互作用关系.

此研究阐明了ABRv1在干旱胁迫应答中的作用,并在分子层面为解释ABRv1的功能提供了依据.

2 材料与方法

2.1 材料

本实验使用的野生型植株是哥伦比亚型(Col)拟南芥.*abr1*突变体(SALK_119330C)购于Arabidopsis Biological Resource Center(ABRC),ABRv1过表达株系由本实验室构建.

Taq DNA聚合酶、SYBGreen、Trizol、反转录试剂盒等购自于Takara公司,限制性内切酶、T4 Ligase等购自与Fermentas.二抗、Western Blot化学发光试剂购自于Millipore;E1和E2购自与Boston Biochem公司,泛素Ub购自Sigma公司.其余化学试剂均为进口或者国产分析纯.

2.2 方法

2.2.1 干旱胁迫处理及失水率测定 对于干旱胁迫处理实验,首先将突变体,野生型,过表达种子分别在4℃冰箱中春化2d,然后将消毒之后的种子播在1/2MS平板上生长1周,培养条件是:70%湿度,温度22℃,光照16h/黑暗8h.将萌发后生长一致的苗移栽在土壤之中,当苗生长到3周大的时候停止浇水,干旱直到出现表型差异,然后复水3d.进行观察,拍照;失水率测定实验,将春化消毒之后的种子播在1/2MS平板上生长1周,同样将萌发后生长一致的苗移栽在土壤之中,培养到3周大,然后称取1g左右的植株在常温下滤纸上进行干旱失水测定,每隔一段时间就进行称量,最后计算失水率.重复3次.

2.2.2 体外泛素化实验 方法参照以前文献并作略微修改^[9].将250ng的GST-ABRv1蛋白,250ng的His-CPK3蛋白,100ng的E1,250ng的E2,以及2μg的带有His标签的Ub进行混合,加入2μL的反应buffer(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM MgCl₂, 2mM ATP, 和 2mM DTT),并用ddH₂O补至总体积10μL.然后将体系在30℃反应3h.反应结束之后用2×SDS上样buffer终止,并在沸水中煮沸5min,然后用western blot进行分析.

2.2.3 体外相互作用 pull-down 方法参照以前文献并作略微修改^[10].融合GST的ABRv1蛋白和带有His标签的CPK3蛋白是由大肠杆菌BL21(DE3)表达纯化而来.将30μL体外纯化的GST-ABRv1蛋白与50μL的His-CPK3蛋白混合在500μL的孵育buffer(50mM Tris-HCl, pH 7.5; 100mM NaCl; 1mM EDTA; 0.05% β-巯基乙醇; 0.2% Triton X-

100) 中于 4℃ 孵育 2h, 期间不停的混匀. 然后加入 30 μ L 的 GST-resin 填料, 于 4℃ 孵育 1h, 期间不停的混匀. 孵育结束后, 4000r/min 离心去上清, 使用洗脱 buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5; 500mM NaCl; 1mM EDTA; 0.05% β -巯基乙醇; 0.2% Triton X-100) 洗涤填料沉淀 7~10 次. 然后用 western blot 实验进行检测. 对照实验, 将 GST 蛋白与 His-CPK3 混匀之后按照相同的步骤进行.

2.2.4 RNA 提取及 qRT-PCR 分析 收取 0.5g 的新鲜 3 周大的野生型拟南芥, 并立即提取总 RNA. 提取试剂使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen), 并按照使用手册提取总 RNA. qRT-PCR 分析在 CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) 仪器上使用 SYBR Premix Ex Taq (Takara) 完成, 方法参照使用说明进行.

3 结果与分析

3.1 ABRv1 受干旱胁迫诱导及株系鉴定

E3 泛素连接酶广泛的参与了 ABA 信号通路和干旱胁迫应答途径. 在以前的研究中发现

ABRv1 参与了 ABA 信号传导途径. 为了研究 ABRv1 是否参与干旱胁迫应答, 我们探究了拟南芥中 ABRv1 在不同时间干旱处理条件下的 mRNA 相对表达量. 结果发现, 2h 干旱处理的野生型拟南芥幼苗中 ABRv1 的表达量相对 0h 干旱处理的野生型拟南芥 ABRv1 表达量有 1.8 倍的提高, 随着干旱处理时间的延长 ABRv1 的表达量逐渐的升高, 在 6h 干旱处理的时候 ABRv1 表达量相对 0h 的 ABRv1 表达量有 8.8 倍的提高 (图 1A). ABRv1 的表达量受干旱胁迫的快速诱导, 暗示了 ABRv1 可能参与了干旱胁迫应答途径. 另一方面, 我们对 *abrv1* 突变体及过表达株系 OE-3 和 OE-7 进行了鉴定. 从图 1B 的结果看出, 通过 PCR 鉴定能够看到在基因组水平上 *abrv1* 的突变体 1、2、3、4 等株系插入了 T-DNA. 能够使用 LbB1.3 扩增出引物, 而 Col 则不能. 从图 1C 和图 1D 可以看出, *abrv1* 的突变体 1、2、3、4 等株系相对 Col 有不同程度的表达下降, 而 OE-3 和 OE-7 相对 Col 有不同程度的表达量上升.

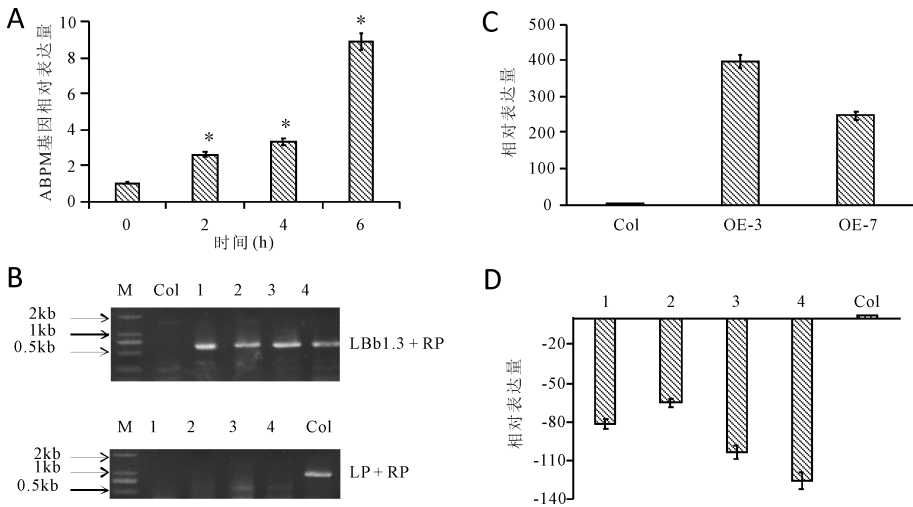


图 1 ABRv1 基因在干旱胁迫下不同时间的表达量及株系鉴定

A. 干旱胁迫下的 ABRv1 相对表达量. * 代表相对 0h 时表达量的显著差异性 ($P < 0.05$). B. 在基因组水平对 1,2,3,4 等 *abrv1* 突变体及 Col 的 ABRv1 基因进行 PCR 鉴定. C. 使用 OE-3, OE-7 与 Col 的 mRNA 进行 ABRv1 的表达量 qRT-PCR 检测. D. 使用 1,2,3,4 等 *abrv1* 突变体及 Col 的 mRNA 进行 ABRv1 的表达量 qRT-PCR 检测.

Fig. 1 Expression of ABRv1 gene at different time under drought stress

A. Relative expression of ABRv1 under drought stress. * indicates the significance compared to 0h ($P < 0.05$). B. PCR identification of ABRv1 in *abrv1* mutant of 1,2,3,4 and wild-type Col at genome level. C. qRT-PCR detection of ABRv1 expression using mRNA of OE-3, OE-7 and Col. D. qRT-PCR detection of ABRv1 expression using mRNA of *abrv1* mutant of 1,2,3,4 and Col.

3.2 过量表达 ABRv1 提高拟南芥干旱耐受能力

在我们以往的研究中发现, ABRv1 参与 ABA 信号通路, 并在 ABA 介导的气孔关闭中起到了正调控因子的作用. ABRv1 在 ABA 介导的气孔关闭

中的作用启发了我们去猜测 ABRv1 在干旱胁迫中是否也具有相同的功能作用. 为了验证 ABRv1 在干旱胁迫应答中的生理功能, 使用了 *abrv1* 突变体株系, 野生型株系, 以及 ABRv1 过表达株系 OE-

3 和 OE-7 来检测 ABRv1 在长期干旱胁迫应答中的作用. 将正常条件下生长到 3 周大的拟南芥开始停止浇水, 让其暴露在干旱的条件下 12d, *abr v1* 突变体相对, ABRv1 过表达株系表现出更严重的失水(图 2A), 在复水 3d 之后统计存活率. 在经过干旱复水之后, ABRv1 过表达株系 OE-7 和 OE-3 相对 Col 及 *abr v1* 突变体表现出更高的存活率(图 2B). 在 3d 的复水之后, OE-7 有 88.2% 的存活率, OE-3 的存活率为 90.4%, 而表现出最不耐干旱的 *abr v1* 突变体株系仅有 7.7% 的存活率, 野生型 Col 的存活则介于两者之间为 53.8%. 为了更进一步

探究 ABRv1 在保持叶片水分中的作用. 将 *abr v1* 突变体、Col、OE-3、OE-7 等株系的离体叶片进行了失水率测量. 结果显示室温下的失水率实验与干旱实验具有一致性的结论, ABRv1 过表达株系 OE-3、OE-7 相比野生型有更低的失水率, 相反 *abr v1* 突变体株系的失水率相比野生型的更高(图 2C). 以上结果显示 ABRv1 在干旱胁迫应答中起着正调控的作用, 过表达 ABRv1 能够提高植物拟南芥的干旱耐受能力, 而 ABRv1 的缺失会导致拟南芥对干旱的敏感性增加.

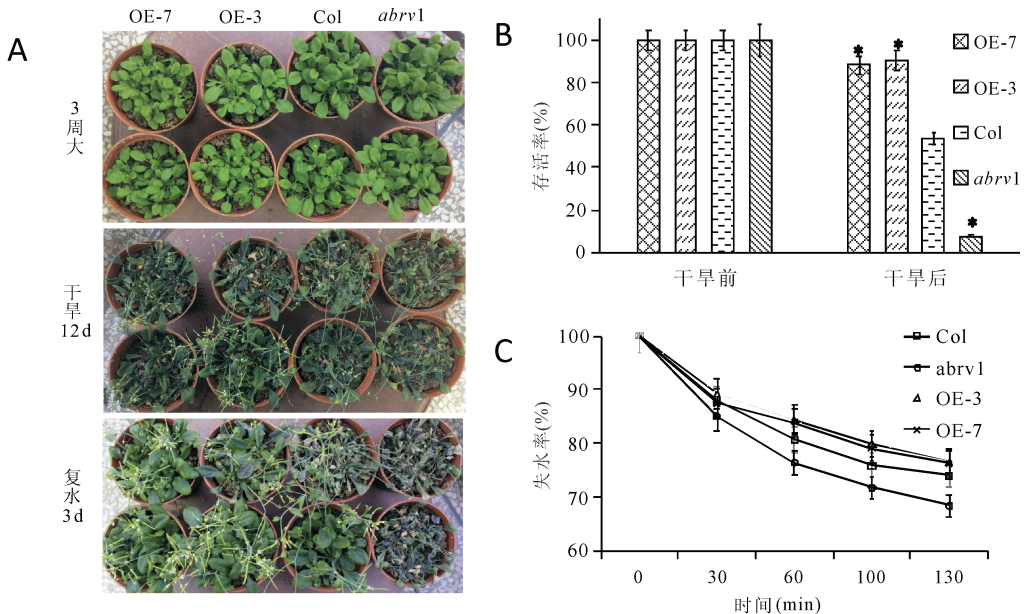


图 2 野生型, *abr v1* 突变体, 及 ABRv1 过表达株系在干旱胁迫下的表型分析和失水率分析

A. 过表达 ABRv1 提高拟南芥干旱耐受性. B. 存活率统计. 每种植物材料使用了 20 棵拟南芥, 并且实验重复了 3 次. * 代表对于 Col 的显著差异性 ($P < 0.05$). C. OE-3, OE-7, *abr v1*, Col 四种植株的失水率实验. 实验重复三次.

Fig. 2 Analysis of phenotype and water loss rate in wild-type, *abr v1* mutant, and ABRv1 over-expressing lines under drought stress

A. Over-expressing ABRv1 enhanced the tolerance of drought in Arabidopsis. B. Statistics of survival rate. 20 seedlings were used each line, replicated three times. * indicates significance compared to Col ($P < 0.05$). C. Water lose rate for OE-3, OE-7, *abr v1* mutant and Col, replicated three times.

3.3 ABRv1 泛素化底物 CPK3 及体外相互作用

很多具有 RING 结构域的蛋白具有 E3 泛素连接酶活性. CPK3 是钙依赖磷酸激酶家族成员之一, 有文献报道 CPK3 在气孔关闭的调节中起着正调控因子的作用^[11]. 为了探究 ABRv1 是否具有 E3 泛素连接酶功能, 并且是否将 CPK3 作为其泛素化的底物, 于是进行了 ABRv1 与 CPK3 的体外泛素化实验. 将用于泛素化实验的 ABRv1 蛋白与 GST 蛋白融合, CPK3 蛋白带上 6×His 标签与 T7 的标签, 并在体外大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达. 结果显示, 在 Ub、E1、E2、及 ABRv1 存在的条件下,

使用 Anti-Ub 抗体进行 western blot 检测能够见到 Ub 的弥散高分子量状态, 而在任何一种缺失的条件下则不能检测到这样的结果(图 3A). 由此可见 ABRv1 在体外具有连接 Ub 的活性. 为了检测带有 T7 标签的 CPK3 底物的泛素化情况, 于是使用了 Anti-T7 的抗体, 可以看到在 Ub、E1、E2、ABRv1、及 CPK3 存在的情况下 CPK3 能够被 ABRv1 泛素化形成被 Ub 修饰过的 CPK3(图 3B). 从以上结果能够得出 ABRv1 具有 E3 泛素连接酶活性, 并且 CPK3 蛋白是它泛素化的底物.

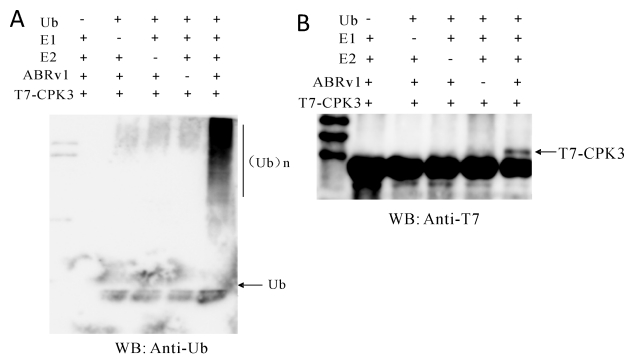


图3 CPK3是ABRv1泛素化的底物

A. ABRv1 蛋白具有泛素连接酶活性. Ub 的检测使用 Anti-Ub 抗体. B. ABRv1 能够将 CPK3 泛素化. His-CPK3 蛋白具有 T7 标签, 因而 CPK3 的检测使用了 Anti-T7 抗体.

Fig. 3 CPK3 is the substrate of ABRv1 ubiquitination. A. ABRv1 shows activity of E3 ligase. Ub detection with Anti-Ub antibody. B. ABRv1 ubiquitinates CPK3. Having T7 flag, CPK3 was detected with Anti-T7 antibody.

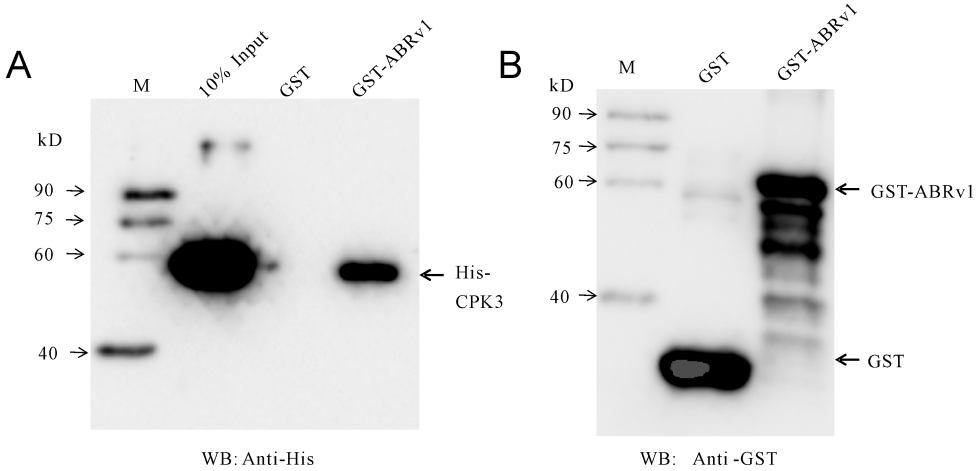


图4 pull-down 实验分析 ABRv1 与 CPK3 的体外相互作用

A. Pull-down 实验. 检测了 ABRv1 与 CPK3 的体外相互作用. His-CPK3 的检测使用带 HRP (horseradish peroxidase) 抗 His 的抗体来进行. B. 使用了抗 GST 的抗体来检测对照 GST 蛋白及 GST-ABRv1 蛋白

Fig. 4 pull-down assays for analyzing interaction between ABRv1 and CPK3 in vitro

A. Pull-down assay. The interaction between ABRv1 and CPK3 was detected in vitro. His-CPK3 was detected using Anti-His antibody with HRP. B. GST and GST-ABRv1 were detected with Anti-GST antibody

4 讨论

E3 泛素连接酶作为泛素化过程中起着特异性识别底物作用的重要成员, 参与了干旱胁迫应答、ABA 信号转导等过程^[12]. 研究 E3 泛素连接酶对于理解植物应答干旱胁迫过程的机制具有重要意义, 然而在植物中发现的参与干旱胁迫的 E3 泛素连接酶仍然十分有限, 不足以完全阐述 E3 泛素连接酶参与干旱胁迫的调控网络^[13]. 本研究通过分子生物学与基因工程等方法, 探究了 E3 泛素连接酶 ABRv1 在拟南芥干旱胁迫应答中的生理功能及作用机制.

既然 CPK3 作为 ABRv1 的底物, 在体外条件下能够被 ABRv1 修饰, 那么两者之间应该存在相互作用的关系. 为了证实这个猜测, 于是在体外条件下使用 pull-down 实验来检测 ABRv1 与 CPK3 的相互作用关系. GST-ABRv1 被用作诱饵来调取 His-CPK3 蛋白, 对照实验则是使用空的 GST 蛋白来调取 His-CPK3 蛋白. 经过 western blot 检测, 发现 His-CPK3 能够被 GST-ABRv1 蛋白拉下来, 而对照 GST 蛋白则不能拉下来 His-CPK3 蛋白(图 4 A). 同时我们使用抗 GST 抗体检测了 GST 蛋白与 GST-ABRv1 蛋白, 发现两者都能被检测到(图 4B). 可以推断出与 CPK3 发生相互作用的部分为 ABRv1 蛋白, 与之融合的 GST 并不会对该实验造成干扰. 通过该实验, 更明确的证明了 ABRv1 与 CPK3 在体外条件下具有相互作用的关系.

通过对干旱胁迫下的野生型拟南芥 ABRv1 基因表达量的检测, 发现 ABRv1 的表达量随着干旱胁迫时间的延长而逐渐增长(图 1A). 可见, 在发生干旱胁迫时, ABRv1 通过提高自身表达量来应对植物面临的逆境, 说明 ABRv1 可能参与了干旱胁迫的调控网络. 尽管如此, 我们仍然不清楚 ABRv1 在拟南芥中的具体功能, 提高 ABRv1 的表达量到底是增强拟南芥的干旱耐受或者是增加拟南芥对干旱的敏感性. 于是以 ABRv1 过表达株系、*abr1* 突变体株系、及对照野生型株系为材料, 进行了植物体在干旱胁迫下的实验, 通过停止给生长的拟南芥浇水造成干旱环境来观察不同 ABRv1

表达量的株系对干旱的应答情况,经过存活率统计最后发现 ABRv1 过表达株系 OE-3 与 OE-7 株系明显比 *abr v1* 突变体株系具有更高的存活率(图 2B)。结果表明,ABRv1 在干旱胁迫应答中起着正调控的作用。

因为 ABRv1 具有 RING-v 结构域,我们猜测 ABRv1 可能具有 E3 泛素连接酶活性,为了证实这个假设,于是进行了体外泛素化实验。结果显示 ABRv1 具有 E3 泛素连接酶活性,但是 ABRv1 的泛素化底物并不清楚。经过分析发现,ABRv1 与 CPK3 具有相似的生理功能,暗示着 ABRv1 可能与 CPK3 有相互作用。为了验证 CPK3 是否是 ABRv1 的底物,我们用体外纯化的 ABRv1 与 CPK3 蛋白进行了泛素化实验。结果显示,ABRv1 能够将 CPK3 在体外条件下泛素化(图 3B),并且进一步的 pull-down 实验证实了两者能在体外发生相互作用(图 4A)。E3 泛素连接酶泛素化修饰作用底物,来调节植物的干旱耐受能力是植物中常见的一种应答方式,如在辣椒中分出来的一个 E3 泛素连接酶 CaPUB1,酵母双杂交和 pull-down 分析表明,CaPUB1 能够与 RPN6 存在相互作用,且 CaPUB1 可在体外泛素化 RPN6,结合 RPN6 在 CaPUB1 过表达株系中表达量下降的证据,可以推测 CaPUB1 通过泛素化修饰 RPN6 来调控植物的干旱胁迫应答过程^[14]。我们猜测,ABRv1 具有相似的作用机制,在干旱胁迫条件下 ABRv1 提高了自身的表达量,并将 CPK3 作为其泛素化底物,通过调节 CPK3 来调节植物的耐干旱能力。但是 ABRv1 与 CPK3 之间的调节关系需要进一步的研究。

综上所述,本研究阐明了 ABRv1 在干旱胁迫应答中的生理功能,并找到了 ABRv1 的泛素化作用底物,为理解拟南芥应答干旱胁迫提供了理论依据,为利用 ABRv1 提高植物在干旱环境下的生存打下了基础。

参考文献:

- [1] Zhu J K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants[J]. *Annal Rev Plant Biol*, 2002, 53:247.
- [2] Jakab G, Ton J, Flors V, *et al.* Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid response[J]. *Plant Physiol*, 2005, 139:267.
- [3] Ciaia P, Reichstein M, Viovy N, *et al.* Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003[J]. *Nature*, 2005, 437:529.
- [4] Stone S L, Hauksdóttir H, Troy A, *et al.* Functional analysis of the RING-Type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137:13.
- [5] Vierstra R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10:385.
- [6] Hyunkyung L, Seokkeun C, Ora S, *et al.* Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Plant Cell*, 2009, 21:622.
- [7] Qin F, Sakuma Y, Tran L S P, *et al.* *Arabidopsis* DREB2A-Interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression[J]. *Plant Cell*, 2008, 20:1693.
- [8] Lee J H, Kim W T. Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in *Arabidopsis*[J]. *Mol Cells*, 2011, 31:201.
- [9] Zhao Q, Tian M, Li Q, *et al.* A plant-specific in vitro ubiquitination analysis system[J]. *Plant J*, 2013, 74:524.
- [10] 袁德志, 李德款, 赵哲, 等. 拟南芥 ATDWD 与 ABI2 相互作用的初步研究[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52: 865.
- [11] Mori I C, Murata Y, Yang Y, *et al.* CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure[J]. *Plos Biology*, 2006, 4:e327.
- [12] Li H, Jiang H, Bu Q, *et al.* The *Arabidopsis* RING finger E3 ligase RHA2b acts additively with RHA2a in regulating abscisic acid signaling and drought response [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156: 550.
- [13] 宁约瑟, 王国梁, 谢旗. 泛素连接酶 E3 介导的植物干旱胁迫反应[J]. *植物学报*, 2011, 46:606.
- [14] Cho S K, Chung H S, Ryu M Y, *et al.* Heterologous expression and molecular and cellular characterization of CaPUB1 encoding a hot pepper U-Box E3 ubiquitin ligase homolog [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142:1664.