

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.03.035

# 拟南芥 *At5g66070* 基因在 ABA 处理下的初步研究

何晓倩, 王健美, 刘志斌, 李旭锋

(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 610064)

**摘要:** 本研究以拟南芥为实验材料, 探索基因 *At5g66070* 在植物激素 ABA 处理条件下的相关生理功能. 结果表明, 在  $10\mu\text{M}$  ABA 处理下, 该基因的表达量明显升高, 表明该基因受到 ABA 的诱导. 亚细胞定位发现 *AT5G66070* 定位在细胞核. 通过 DNA 及 RNA 水平筛选鉴定 *At5g66070* 基因 T-DNA 插入纯合突变体, 然后经根瘤农杆菌介导法进行遗传转化, 筛选获得过表达转基因株系. 表型分析发现经 ABA 处理后, 突变体相对于野生型而言根长较短, 表明突变体对 ABA 更为敏感. 气孔关闭实验发现  $10\mu\text{M}$  ABA 能诱导突变体气孔关闭, 而野生型和过表达无显著影响. 以上结果表明 *At5g66070* 在拟南芥的 ABA 胁迫响应中起负调控作用.

**关键词:** *At5g66070*; 非生物胁迫; 拟南芥; ABA 信号通路;

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2017)03-0635-06

## Primary analysis of *Arabidopsis thaliana At5g66070* gene in ABA treatment

HE Xiao-Qian, WANG Jian-Mei, LIU Zhi-Bin, LI Xu-Feng

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of MOE, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** With *Arabidopsis thaliana* as experimental material, the work was set up to study the physiological function of gene *At5g66070* under the treatment of hormone ABA. The results showed that the gene expression was significantly increased after  $10\mu\text{M}$  ABA treatment, suggesting that the gene was induced by ABA on the other hand. The cellular localization of *At5g66070* was predominantly found in the nuclear, indicating *At5g66070* was a nuclear protein. No full-length *At5g66070* transcript was detected in the mutant by DNA and RT-PCR analysis, suggesting that *At5g66070* was a loss-of-function mutant. Germinated evenly-grown seedlings were then transferred to MS plates supplemented with or without ABA. *At5g66070* mutant showed shorter primary roots compared with the overexpression lines under ABA treatment. The mutant was more sensitive than wide type and overexpression lines. The  $10\mu\text{M}$  ABA treatment induced stomata closure in mutant, but had no effect on wild type and overexpression lines. Using RT-PCR to analyze the related genes in *Arabidopsis* ABA signaling pathway. Results above indicated that *At5g66070* was a negative regulator of ABA signaling.

**Keywords:** *At5g66070*; abiotic stress; *Arabidopsis thaliana*; ABA signaling

## 1 引言

植物拥有很多内在应急机制面对不适合的生

长环境. 植物激素脱落酸(ABA)在面临许多非生物或生物胁迫中起到重要的作用, 尤其是干旱, 通过调节气孔开闭程度来减少水分的散失. ABA 同

收稿日期: 2016-01-29

基金项目: 转基因专项(2016ZX08009003-002-00)

作者简介: 何晓倩(1990-), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 研究方向分子遗传学与基因工程, E-mail: 156046791@qq.com

通讯作者: 李旭锋, E-mail: xfli@scu.edu.cn

时也参与种子的生长过程,包括种子的萌发以及苗期生长<sup>[1]</sup>.

近年来,植物 ABA 生物代谢及转运、ABA 受体及其信号转导功能组分的筛选与鉴定、ABA 信号通路的构建都有所研究<sup>[2]</sup>. ABA 信号通路的蛋白分布于植物细胞各处<sup>[3]</sup>. 其中定位于细胞质膜上的蛋白质包括磷脂酶 C 和磷脂酶 D(phospholipase C/D)、G 蛋白及其偶联受体(GPCR)以及 PYR/PYL/RACR 家族等<sup>[4]</sup>;分布在细胞内的调节因子包括各种蛋白激酶和蛋白磷酸酶,如 SNF1 相关的蛋白激酶 SnRK、钙调神经磷脂酶-B 样蛋白激酶(CIPK)、钙依赖蛋白激酶(CDPK)、蛋白磷酸酶 2A 和 2C(PP2C/A)以及各种转录因子等<sup>[5]</sup>. 这些研究大大加深了人们对 ABA 信号转导通路的认识. 然而 ABA 信号通路对主要蛋白之间的调控还不太清楚. 泛素化修饰属于一类重要的蛋白翻译后调控机制<sup>[6]</sup>. 泛素化修饰主要由泛素激活酶 E1 (ubiquitin - activating enzyme), 泛素结合酶 E2 (ubiquitin - conjugating enzyme)和泛素连接酶 E3 (ubiquitin - ligating enzyme)先后作用后完成<sup>[7]</sup>. 其中泛素连接酶 E3 决定靶蛋白的特异性识别,在泛素途径中具有重要作用. 目前鉴定的泛素连接酶 E3 主要有 3 大类: HETC 结构域家族、RING 结构域家族和 U-box 家族. RING 结构域家族最典型的特点是具有环指结构域 (ring finger domain), RING 结构域是此家族具有泛素连接酶作用的重要因素,在拟南芥中预测有 500 个以上的 RING 结构蛋白,然而只有极少数 RING 蛋白的生物功能得到了阐明<sup>[8]</sup>.

通过生物信息学分析发现拟南芥 At5g66070 受多种胁迫诱导<sup>[9]</sup>. 本研究通过蛋白结构域分析发现其可能是含有 RING 结构域的 E3 连接酶. 为进一步研究其功能,首先对拟南芥 At5g66070 的突变体进行筛选获得纯合株系,另一方面对野生型进行遗传转化获得过表达转基因株系 OE-4、OE-5、OE-7. 然后在 ABA 处理下对缺失突变体、过量表达株系以及野生型的根长以及气孔关闭进行研究.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Columbia 生态型为本实验保存. At5g66070 突变体种子,编号 SALK-148182C 购于拟南芥生物资源中心 (Arabi-

dopsis Biological Resource Center, ABRC). 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 $\alpha$ 、根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 及 pZH01 载体由本实验室保存.

多种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司. 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司, RNA 提取试剂盒, DNA 胶回收试剂盒购自天根公司, RT-PCR mix-SYBR Green 购于 Bio-Rad 公司. 其余试剂为科龙国产分析纯. 引物合成与测序由华大基因与擎科完成.

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers sequence

序列
At5g66070 突变体 PCR 鉴定
LP: 5'- ATGGATGGTTATTATTCTCTGTCTC-3'
RP: 5'-TCAAAGATGTCTTCTGCACAAGGG-3'
LB : 5'- ATTTTGCCGATTTCCGAAC-3
Pzh01-At5g66070
F:5'- TGCTCTAGAATGGATGGTTATTATTCTCTGTCTC-3'
R:5'- TCCGAGCTCAAGATGTCTTCTGCACAAGGG-3'
At5g66070qRT-PCR
F:5'-ATTGACACACAAGGTTTACGTCG-3'
R:5'-GATTCTTCTTCTTCTCCTTGGCT-3'
Actin2-F: 5'-GCACCACCTGAAAGGAAGTACA-3'
Actin2-R: 5'-CGATTCTGGACCTGCCTCATC-3'
pBI221- At5g66070-GFP
F:5'-TGCTCTAGAATGGATGGTTATTATTCTCTGTCTC-3'
F:5'-TCCCCGGGATCAAAGATGTCTTCTGCACAAGGG-3'

### 2.2 实验方法

2.2.1 At5g66070 生物信息学分析 在 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 上分析 At5g66070 结构域,在 NCBI 网站上利用 Blast 比对其同源的其他物种序列. 运用 MEGA5 构建蛋白系统进化树.

2.2.2 拟南芥的培养 将营养土与蛭石按照 2:1 的比例混匀,高压灭菌 30min 然后分装至已灭菌的花盆中. 将在 MS 平板上生长 7d 左右的野生型及突变体,过量表达株系移至花盆中,于 22 $^{\circ}$ C 光照 16h 黑暗 8h 的组培室中培养.

2.2.3 At5g66070 的亚细胞定位 构建并提取高纯度的 pBI221-At5g66070-GFP 质粒,通过 PEG 介导法转染野生型拟南芥的原生质体,22 $^{\circ}$ C 黑暗培养 16h,然后用激光共聚焦显微镜观察并拍照.

2.2.4 突变体纯合株系的筛选与分子鉴定

DNA 水平鉴定: 生长一个月左右的植株, 用 CTAB 法提取植物叶片总 DNA, 用特异性引物 LP、RP 与 T-DNA 的引物 LB 进行扩增鉴定。

RNA 水平鉴定: 用 Trizol 法提取突变体幼苗 RNA, 并进行反转录, 然后用 RT-PCR 在转录水平上对突变体进行鉴定。

2.2.5 植物过表达株系的构建与筛选 构建 pZH01-At5g66070 载体, 经测序正确后转化农杆菌 EHA105, 然后用花絮浸染法浸染野生型拟南芥。浸染后黑暗条件下 3d, 然后正常条件下生长数周, 收取 T0 代种子。然后通过加有潮霉素的 MS 培养基筛选出 T1 代对阳性苗提取 DNA 进行鉴定并继续用潮霉素的 MS 培养基筛选收取 T2 代及 T3 代, 最终获得纯合过表达株系<sup>[10]</sup>。最后通过 RT-PCR 在转录水平上对过表达株系进行鉴定。

2.2.6 ABA 处理下根长表型实验 将野生型、突变体以及过表达转基因株系的拟南芥种子经次氯酸钠溶液消毒后再用蒸馏水清洗 3 遍, 置于 MS 平板上, 在正常光照和生长条件下生长 7d 的野生型和突变体以及过表达转基因幼苗移至不同浓度的 ABA 的 MS 平板, 生长 7d 重复实验 3 次。

2.2.7 气孔运动实验 取相同条件下生长 4 周的突变体、野生型及过表达株系拟南芥叶片, 置于相同体积的气孔开放液 (10 mM KCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, pH6.1) 中 2h, 然后在气孔开放液中加入 ABA 至终浓度为 10 $\mu$ M, 黑暗条件下处理 2h。然后剥取叶片下表皮在显微镜下观察气孔的开度, 测量气孔的宽和长。每个株系测量超过 60 个气孔保卫细胞<sup>[11]</sup>。

3 结果与分析

3.1 At5g66070 基因进化树与结构域分析

通过在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析其含有三个跨膜结构区域和一个保守的 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> RING Finger 结构域 (图 1A)。通过 Blast 分析发现该基因与山葵 (*Eutrema salsugineum*), 芥菜 (*Capsella rubella*), 亚麻芥 (*Camelina sativa*), 芜菁 (*Brassica rapa*), 欧洲油菜 (*Brassica napus*), 甘蓝 (*Brassica oleracea*) 均有其直系同源基因的存在 (图 1B)。

3.2 At5g66070 蛋白的亚细胞定位

用 10 $\mu$ g pBI221-At5g66070-GFP 质粒转化拟南芥原生质体, 黑暗条件下培养 16h。并用 DAPI

细胞核染料进行染色, 然后在激光共聚焦显微镜观察细胞中 GFP 的信号。图 2A 显示的荧光是叶绿体, 图 2B 的圆点为经 DAPI 染色的细胞核, 图 2C 圆点代表 At5g66070-GFP 融合蛋白的位置<sup>[12]</sup>。图 2D 叶绿体 DAPI 染色以及 At5g66070-GFP 融合蛋白三者融合的图像。从图 2D 中可以看出 DAPI 染色细胞核与 At5g66070-GFP 融合蛋白的位置相重叠, 说明 At5g66070-GFP 融合蛋白定位在细胞核。

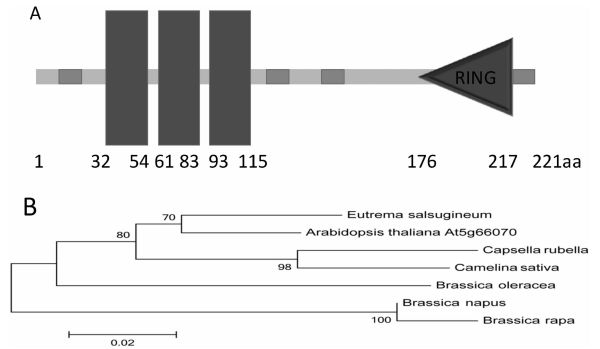


图 1 拟南芥 At5g66070 结构域分析及同源基因比对  
A. At5g66070 蛋白结构域分析, 为跨膜结构, 为氨基酸  
B. 同源基因的系统进化树  
Fig. 1 Comparison of homologous At5g66070 in higher plants and domain analysis

A. Protein domains configuration of the full-length At5g66070. indicate the transmembrane domain, indicate the amino acid. B. Phylogenetic tree of At5g66070 with their homologues in other plants.

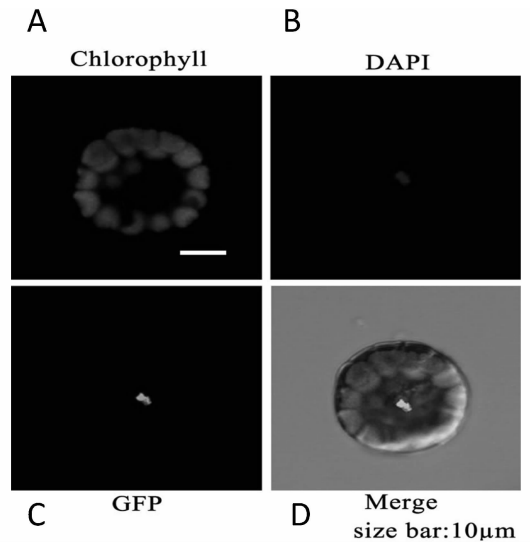


图 2 pBI221-At5g66070-EGFP 融合蛋白的亚细胞定位  
Fig. 2 Subcellular localization of pBI221-At5g66070-GFP fusion protein

3.3 At5g66070 突变体纯合鉴定

At5g66070 突变体纯合鉴定如图三所示。图

3A 为突变体 T-DNA 插入结构示意图,可以看出 T-DNA 位于第四个外显子上. 分别用 LP+RP, LB1+RP 引物(见表 1)对基因组 DNA 进行扩增并进行电泳检测如图 3B 所示,野生型 DNA 用 LP+RP 引物扩增获得目的条带,而用 LB1+RP 扩增无条带;纯合突变体 DNA 用 LP+RP 引物扩增未获得目的条带,而用 LB1+RP 扩增有条带. 为进一步验证基因的纯合,我们提取植物的总 RNA 进行 RT-PCR 实验,图 3C 所示该基因在野生型中正常表达,而在突变体中检测不到,说明 T-DNA 成功插入,突变体材料可以用于后续分析使用.

### 3.4 过表达株系阳性克隆鉴定

将构建好的过表达载体 pZH01-At5g66070 (图 4A),用花序浸染法对野生型植株进行浸染,然后将收获的种子在含有潮霉素的 MS 固体培养基筛选,如图 4B 所示明显看到转基因株系根长较长. 然后将初步筛选得到的阳性苗移栽到花盆中,提取 DNA 进行 PCR 扩增,进一步进行验证,在

660bp 左右发现目的基因(图 4C). 继代筛选得 3 个纯合株系,分别为 OE-4、OE-5、OE-7. 经 qRT-PCR 验证得出过表达转基因株系的基因表达量分别是野生型的 81、63、113 倍(图 4D).

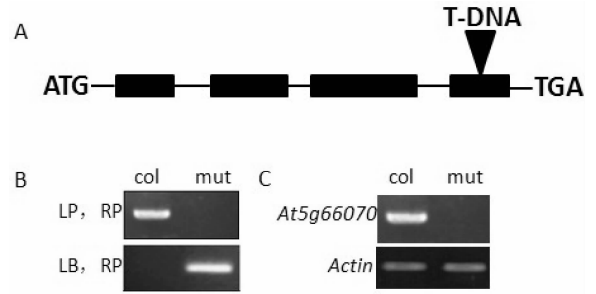


图 3 纯合突变体的鉴定

A. T-DNA 的插入位点位于第四个外显子上 B. DNA 水平上的鉴定 C. RNA 水平上的鉴定

Fig. 3 Identification of homozygous mutant

A. At5g66070 gene is disrupted by the insertion of the T-DNA in the four exon; B. Analysis with agar gel electrophoresis; C. RT-PCR analysis in the picture At5g66070 means col (wild type) and mutant total RNA reverse transcribe into cDNA by OligodT primer pair, Actin means RNA amplified with Actin primer pair.

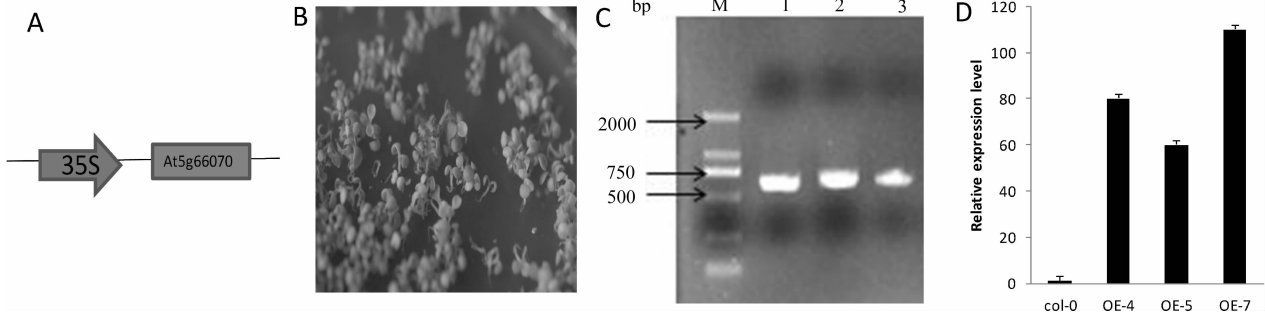


图 4 过表达株系的构建与筛选

A. 构建过表达载体 pZH01-At5g66070 结构示意图 B. 过表达株系 T0 代阳性苗筛选 C. DNA 水平上验证 pZH01-At5g66070 重组子 D. 过表达转基因株系的 RNA 水平鉴定

Fig. 4 Positive overexpression lines seedlings by screening

A. Schematic structure of the overexpression vector, At5g66070 was drove by 35S promoter; B. The positive expression of strain T0 generation seedling screening; C. pZH01-At5g66070 restructuring validated in DNA level; D. Overexpression of genetically modified strains of RNA level appraisal

### 3.5 ABA 处理下的根长差异表型

将野生型、突变体和过表达株系的种子进行消毒,播置于 MS 培养基上培养 7d 后将幼苗移至含有浓度分别为  $0\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $7\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$  ABA 的 MS 固体培养基上生长 2w 如图 5 所示. 可以看出在  $0\mu\text{M}$  ABA 条件下野生型、突变体以及过表达株系均正常生长且根长没有明显差异. 在  $3\mu\text{M}$ 、 $7\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$  ABA 条件野生型、突变体以及过表达株系根长均受到抑制. 然而突变体相对于野生型根长较短,在  $10\mu\text{M}$  ABA 处理下过表达株系和野生型的根长比突变体长 2.5cm 左右. 过表达和野生型在 ABA 浓度依次增加时两者变化差异不大. 由此可见,At5g66070 的缺失突变体对 ABA 更为敏感,具

体变为其根的生长在 ABA 处理下受到抑制,根长较短. 表明 AT5g66070 负调控 ABA 信号应答. 图 5B 是对各株系的根长统计.

### 3.6 ABA 诱导的气孔运动

ABA 能被保卫细胞所感知而后保卫细胞迅速整合和传递信号,最终调节气孔膨压的变化,使得气孔处于最为适宜的开闭状态,从而调节拟南芥的水分散失. 将野生型、突变体、过表达三种株系的拟南芥正常叶片用气孔开放溶液处理后气孔完全开放. 之后分别浸置终浓度为  $10\mu\text{M}$  ABA 气孔开放溶液中浸泡 2h,观察加入 ABA 前后叶片气孔的运动情况如图六所示,发现在  $0\mu\text{M}$  ABA 处理条件下三种株系气孔开度没有明显差异(图 A、B). 而在

10 $\mu$ M ABA 处理条件下, 突变体的气孔明显变小且气孔宽长比约为 0.1, 而过表达的气孔孔径约为 0.26、野生型的气孔孔径约为 0.2(图 B). 由此可

以明显看出突变体的气孔开度明显小于野生型和过表达株系, 表现为对 ABA 敏感.

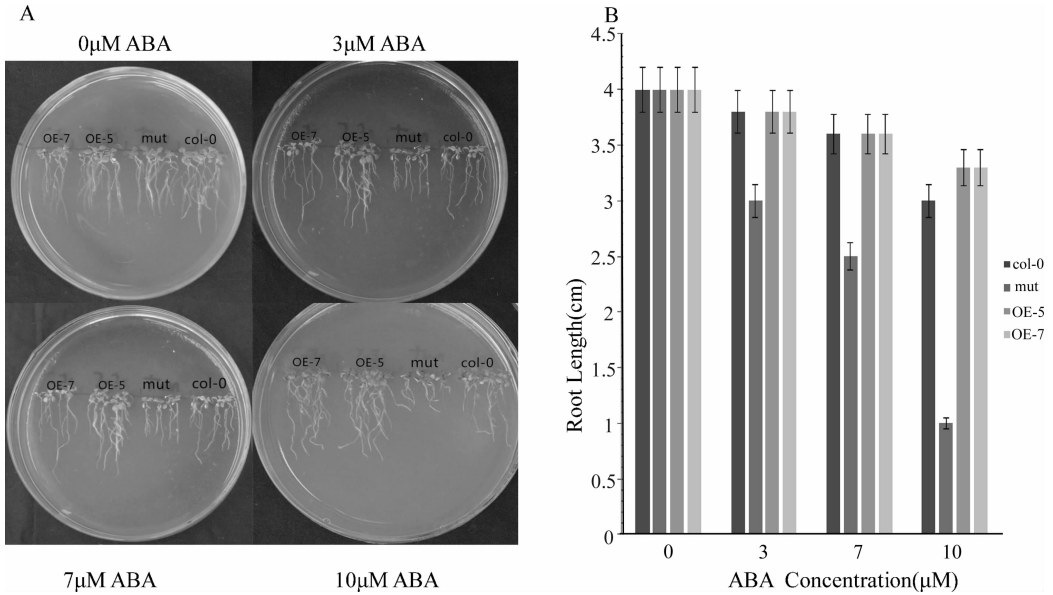


图 5 突变体和过表达在不同浓度 ABA 下的根长表型

A. 野生型突变体及过表达株系对不同浓度 ABA 的敏感表型 B. 各株系种子的根长统计

Fig. 5 Primary Root Length Phenotypes of wild type, mutant and overexpression lines in response to ABA

A. Wild type, mutant and over expression is sensitive to different concentrations of ABA phenotype; B. The strain seed root length statistics

### 4 讨论

本文通过生物信息学分析 At5g66070 是一种含有 RING 结构的 E3 连接酶. 根据不同物种氨基酸序列比对暗示其在植物进化过程中是比较保守的(图 1). 然而在众多类型的 E3 中, 具有 RING 结构的 E3 数量最多, 在植物应答非生物胁迫中起着关键的作用. SDR1 (salt-and-drought-induced RING finger1) 正调控 ABA 应答<sup>[13]</sup>; AtAIRP1 (Arabidopsis thaliana ABA insensitive RING protein 1) 和 AtAIRP2 协同 (Arabidopsis thaliana ABA insensitive RING protein 2) 正调控 ABA 介导的干旱反应<sup>[14]</sup>; AtAIRP3 和 AtAIRP4 也正调控 ABA 介导的干旱反应<sup>[15]</sup>; Rma1H1 (human RING membrane-anchor 1) 和 Rma1 (Arabidopsis homolog of Rma1H1) 正调控植物冷胁迫; 一组同源 RING 结构域蛋白 RGLG1, RGLG2 负调控干旱抗性<sup>[16]</sup>.

亚细胞定位分析发现 At5g66070 定位在细胞核中(图 2). 对突变体进行筛选获得纯合株系(图 3). 构建过表达株系, 继代筛选获得 3 个纯合株系

OE-4, OE-5, OE-7(图 4). 在不同浓度的 ABA 处理条件下发现根长表型分析 At5g66070 基因突变增加植物对 ABA 敏感性, 根生长受到 ABA 的抑制, 而 ABA 对过表达株系没有明显影响(图 5). 气孔关闭实验证明该基因的突变体在 ABA 处理后孔径明显小于野生型和过表达(图 6). 说明 At5g66070 的突变体对 ABA 敏感, 初步实验表明 At5g66070 基因在 ABA 信号通路中起负调控作用<sup>[17]</sup>.

ABA 参与了多个植物生长发育过程如种子的萌发、休眠、抑制生长、促进叶片衰老和其他一些蛋白的合成. 然而, 在生物和非生物的胁迫条件下, ABA 的含量会随之改变. ABA 调节大量的基因, 在拟南芥中超过 10% 的蛋白编码基因又 ABA 所调控. ABA 信号通路中的重要蛋白 ABI1、ABI3、ABI5 等在信号通路由多个基因所调控, 而本文的研究对象 At5g66070 亚细胞定位在细胞核内, 推测参与这些关键蛋白的降解<sup>[18]</sup>. 为进一步研究该基因的功能, 将通过酵母双杂交、双分子荧光分析等试验来验证.

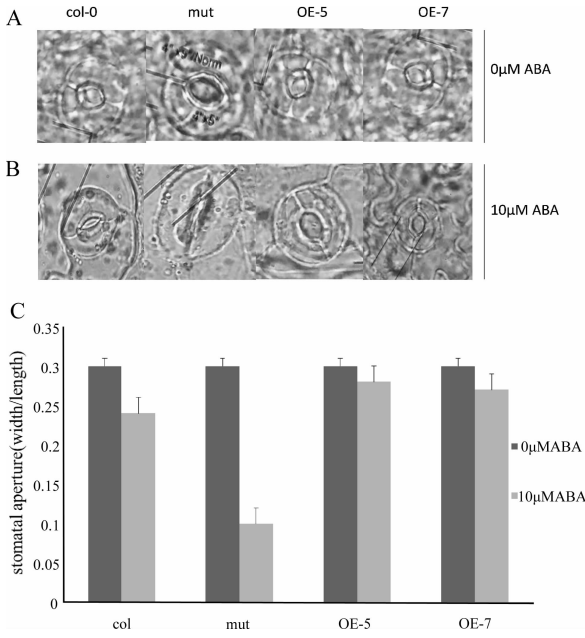


图 6 ABA 诱导气孔运动分析

A. 拟南芥叶片在气孔开放液中处理后气孔完全张开 B. 10  $\mu\text{M}$  ABA 处理下气孔关闭 C. ABA 处理前后气孔宽长比统计

Fig6 ABA induced stomatal movement

A. Obvious opening status was observed in all the stoma samples of *Arabidopsis* leaves with stomatal opening solution treatment ; B. Stomatal closure of the WT, mutant and overexpression plants in response of 10  $\mu\text{M}$  ABA; C. Stomatal aperture was calculated by ratios of width to length with or without ABA

## 参考文献:

- Pickart C M, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(6): 610.
- Cho S K, Ryu M Y, Seo D H, *et al.* The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP2 plays combinatory roles with AtAIRP1 in abscisic acid-mediated drought stress responses [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 2240.
- Raghavendra A S, Gonugunta V K, Christmann A, *et al.* ABA perception and signalling [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(7): 395.
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio G A, Antoni R, *et al.* *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2483.
- Brock A K, Willmann R, Kolb D, *et al.* The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1098.
- 宋素胜, 谢道昕. 泛素蛋白酶体途径及其对植物生长发育的调控[J]. *植物学通报*, 2006, 23(5): 564.
- Hong J K, Choi H W, Hwang I S, *et al.* Role of a novel pathogen-induced pepper C3-H-C4 type RING-finger protein gene, CaRFP1, in disease susceptibility and osmotic stress tolerance [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63(4): 571.
- Zhang X, Garretton V, Chua N H. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation [J]. *Genes Development*, 2005, 19(13): 1532.
- Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, *et al.* CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(1): 97.
- Stone S L, Callis J. Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(6): 624.
- Liu H, Stone S L. Abscisic acid increases *Arabidopsis* ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(8): 2630.
- Liu Y, Koornneef M, Soppe W J J. The absence of histone H2B monoubiquitination in the *Arabidopsis* hub1 (*rdo4*) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(2): 433.
- 杨皓, 刘志斌, 李旭锋, 等. 拟南芥 AtHHR2 基因的功能初步研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53(4): 945.
- Sawahel W A, Hassan A H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline [J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(9): 721.
- To A, Valon C, Savino G, *et al.* A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(7): 1642.
- Park J, Lee N, Kim W, *et al.* ABI3 and PII5 collaboratively activate the expression of SOMNUS by directly binding to its promoter in imbibed *Arabidopsis* seeds [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1404.
- Zhang Y, Yang C, Li Y, *et al.* SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(6): 1912.
- Yang L, Liu Q, Liu Z, *et al.* *Arabidopsis* C3HC4-RING finger E3 ubiquitin ligase AtAIRP4 positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling [J]. *J Integra Plant Biol*, 2016, 58(1): 67.
- Zhang X, Wu Q, An C. RGLG3 and RGLG4, novel ubiquitin ligases modulating jasmonate signaling [J]. *Plant signal Behav*, 2012, 7(12): 1709.