

苹果 *MdSBP4* 基因非生物胁迫功能分析

王亚萍¹, 郭江山², 沙 婷¹, 张玉刚¹, 祝 军¹, 侯鸿敏¹

(1. 青岛农业大学园艺学院/青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东青岛 266109; 2. 青岛市果茶花卉工作站, 山东青岛 266701)

摘 要:以苹果砧木‘青砧一号’总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链为模板, 克隆得到 *MdSBP4* 基因的 cDNA 序列。序列分析结果表明 *MdSBP4* 基因的完整开放阅读框序列全长 1473 bp, 编码 491 个氨基酸, 具有明显的 SBP 结构域, 包含 2 个锌指结构 Zn-1、Zn-2 和双向核定位信号区 NLS。实时荧光定量分析结果表明, *MdSBP4* 基因在苹果响应非生物逆境胁迫中具有一定功能。构建过量表达载体 pCAMBIA2300-35S-*MdSBP4*, 将 *MdSBP4* 转化拟南芥后发现, 转基因株系在干旱和盐胁迫培养基上的萌发率高于野生对照, 推测 *MdSBP4* 基因在拟南芥中的过量表达提高了转基因种子的耐胁迫能力。

关键词:苹果; SBP; 胁迫; 基因克隆; 过量表达

中图分类号: S661.1

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1674-148X. 2019. 01. 002

Function Analysis of *MdSBP4* Genes on the Abiotic Stress in Apple

WANG Yaping¹, GUO Jiangshan², SHA Ting¹, ZHANG Yugang¹, ZHU Jun¹, HOU Hongmin¹

(1. College of Horticultural, Qingdao Agricultural University/Qingdao Key Laboratory of

Genetic Development and Breeding in Horticultural Plants, Qingdao 266109, China;

2. Institute of Fruit, Tea and Flower Plant of Qingdao, Qingdao 266701, China)

Abstract: The cDNA sequences of *MdSBP4* were isolated from the leaves of apple rootstock ‘Qingzhen 1’. The *MdSBP4* cDNA sequence included a 1473 bp open reading frame (ORF) which encoded a polypeptide of 491 amino acids including a highly conserved SBP-domain bearing a nuclear localization signal (NLS) and two zinc finger structures (Zn-1, Zn-2). Real-time PCR analysis showed that *MdSBP4* gene played a role in response to drought and salt tolerance in apple rootstock. The over-expression vector pCAMBIA2300-35S-*MdSBP4* was constructed and transformed into *Arabidopsis thaliana* by floral dip methods. The *MdSBP4* transgenic lines showed higher germination rate than the wild type under drought and the salt stress. These results indicate that over-expression of *MdSBP4* in *Arabidopsis* can improve the toleration of seeds to abiotic stress.

Key words: apple; SBP; stress; gene clone; over expression

苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 是我国栽培面积最大的重要果树, 苹果树在整个生长发育过程中, 经常遭遇各种不利环境的影响, 如寒害、干旱、盐害、洪涝、矿物质缺乏等非生物胁迫因素, 致使其减产, 甚至死亡, 从而造成经济损失。已有相关报道表明, 在植物体遭受到低温、干旱、高盐等逆境胁迫时, 转

录因子可以调控相关基因的表达, 在抗逆应答中发挥重要作用^[1]。许多植物中的 *WRKY*, *bZip* 和 *MYB* 等转录因子都能够响应干旱、盐碱、低温等逆境胁迫, 提高植物对非生物胁迫的耐受力^[2-4]。*SBP* 基因 (Squamosa promoter Binding Protein, SBP) 是绿色植物特有的一类转录因子, 最早从金鱼

收稿日期: 2018-10-15

基金项目: 国家自然科学基金(31801841); 青岛农业大学高层次人才科研基金项目(663/1114338, 661/1116009); 国家现代苹果产业技术体系(CARS-28); 青岛市果树产业技术体系项目(QNJC201633)

作者简介: 王亚萍(1994-), 女, 河南周口人, 汉族, 在读研究生, 主要研究方向: 果树分子生物学研究, E-mail: 783674889@qq.com

通讯作者: 侯鸿敏(1985-), 女, 山西榆次人, 汉族, 博士, 副教授, 主要研究方向: 果树遗传改良与育种, E-mail: houthongmin@163.com

草(*Antirrhinum majus*)中分离得到,因其能够识别并调控花发育基因的 Squamosa 启动子结合蛋白,故命名为 SBP 基因^[5]。该基因有很多重要的生物学功能,已陆续从拟南芥^[6]、白桦树^[7]、衣藻^[8]、苔藓^[9]、番茄^[10]、水稻^[11]中分离。在前期对该基因的研究主要集中在花发育方面,但最近有研究表明,SBP-box 基因可以通过参与防御反应的基因相互作用对各类生物和非生物胁迫做出响应^[12]。

本试验以‘青砧 1 号’和‘M26’为试材,分别将试管苗中培养 20 d 的‘青砧 1 号’和‘M26’的健康植株于含有 400 mmol·L⁻¹甘露醇或 150 mmol·L⁻¹氯化钠的培养基中模拟干旱和盐胁迫处理不同时间后分别取其全株,以处理 0 h 时的样品为对照,通过实时荧光定量 PCR 测定非生物胁迫(高盐和干旱)处理后苹果 *MdSBP4* 基因在不同抗性砧木中的表达模式;并使用花序侵染法将苹果 *MdSBP4* 基因转化拟南芥,进而验证该基因功能。该研究为苹果抗逆基因挖掘与功能研究提供了重要的理论基础,也为今后培育抗逆性强的优良苹果品种提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试材选用的 QZ1 和 M26 组育苗。分别将在 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L GA3(MNG) 中培养 20 d 的 QZ1 和 M26 健康植株转接至 MNG + 400 mm/L 甘露醇、MNG + 150 mm/L NaCl 的培养基中,模拟干旱和盐碱处理。分别于处理 0, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 168 h 时取其全株,对照为处理 0 h 的样品,液氮速冻后置于 -80 °C。

1.2 试验方法

1.2.1 *MdSBP4* 基因克隆

参照苹果全基因组数据库(<http://genomics.research.iasma.it/blast/blast.html>),选用 Primer5.0 设计特异引物 *MdSBP4*-F 和 *MdSBP4*-R (表 1),以‘青砧一号’叶片 RNA 反转录的 cDNA 为模板扩增 *MdSBP4*。反应结束后经 1% 琼脂糖凝胶电泳,并通过紫外凝胶成像系统成像。将目的条带切下,回收纯化后将其克隆至 pGEM-T Easy 载体并转入 DH5 α 感受态细胞中,经菌液 PCR 和质粒酶切检测后在 TaKaRa 公司测序。目的片段的回收及质粒提取的具体步骤分别参照天根 DNA 凝胶回收试剂盒和百泰克质粒小量抽提试剂盒说明书。

表 1 苹果 *MdSBP4* 基因的克隆及表达分析所用的引物

Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of *MdSBP4* in Malus

基因 Gene	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	酶切位点 Restriction sites
<i>MdSBP4</i>	<i>MdSBP4</i> -F	GGCTCTAGAAATGGGTTGGGAAGTCAAG	
	<i>MdSBP4</i> -R	GCGGTACCTTACCTTATTTGCAGATCAC	
	<i>MdSBP4</i> -RT-F	CCCATGTACCTTCATGGAAAGTCAAG	
	<i>MdSBP4</i> -RT-R	GCAAATGTTTGCCACCATTTCT	
	p2300- <i>MdSBP4</i> -F	GGCTCTAGAAATGGGTTGGGAAGTCAAG	<i>Xba</i> I
	p2300- <i>MdSBP4</i> -R	GCGGTACCTTACCTTATTTGCAGATCAC	<i>Kpn</i> I
β -ACTIN	β -Actin-RT-F	ATGCCAGGGAACATGGTAGA	
	β -Actin-RT-R	TGAGCGAGAAATTGTCAGGG	

注:引物中下划线为酶切位点。

1.2.2 实时定量 PCR 反应体系及反应程序

RT-PCR 反应体系(20 μ L):根据实时荧光定量 PCR 引物设计的原则分别设计内参引物 *Actin*-RT-F、*Actin*-RT-R 及特异引物 *MdSBP4*-RT-F/*MdSBP4*-RT-R (表 1)。试验参照 SYBRPremix ExTaqTM II (Perfect Real Time) (TaKaRa)试剂盒的说明书在 Roche LightCycler[®]

480 II 实时定量 PCR 仪上完成。按照 TaKaRa 生物公司的 SYBR-Green 试剂盒说明书进行操作,配置 20 μ L 反应体系:SYBR premix 10 μ L,cDNA1.0 μ L(取 1 μ g RNA 合成第 1 链 cDNA,然后将 cDNA 模板稀释 5 倍,上下游引物(10.0 μ mol·L⁻¹)各 0.8 μ L,Sterile Water 7.4 μ L。

RT-PCR 反应程序:95 °C 预变性 10 min,95 °C

10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 10 s 延伸, 进行 45 个循环。在此过程中连续检测其荧光值绘制溶解曲线; 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[86] 分析数据; 利用 Excel 进行绘图, 并使用 DPS 进行单因素方差分析及 Duncan 检测; 每个时间点进行三次生物学重复和三次技术重复。

1.2.3 过量表达载体的构建

以包含 *MdSBP4* 基因序列全长菌液为模板), 扩增带有 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点的目的片段, 设计 20 μ L PCR 反应体系: Mixgreen: 10 μ L; *MdSBP4*-F: 0.8 μ L; *MdSBP4*-R: 0.8 μ L; 菌液: 0.5 μ L, 补水至 20 μ L 后稍作离心保证均匀混合; PCR 反应程序: 预变性 95 °C 5 min; 变性 95 °C 30 s, 退火温度 62 °C 30 s, 延伸 72 °C 1 min 30 s, 重复此循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min, 使产物延伸完整, 连接 pGEM-T-Easy 载体并测序后获得 pGEM-T-Easy-*MdSBP4*。

用 *Xba* I 和 *Kpn* I 分别双酶切 pCAMBIA2300 和 pGEM-T-Easy-*MdSBP4* 质粒, 跑电泳检测并回收目的片段后用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜后酶切鉴定并测序正确后命名为 pCAMBIA2300-35s-*MdSBP4*。

1.2.4 转基因拟南芥的获得

将 pCAMBIA2300-35S-*MdSBP4*, 转入农杆菌 EHA105 感受态细胞。利用花絮浸润法转化拟南芥。植株正常生长 3~5 周后, 即可收获 T0 代种子。将 T0 代种子消毒后平铺在含 40 mg · L⁻¹ 卡那霉素的 MS 固体培养基中。将在卡那霉素选择培养基上正常生长的苗子确定为转化阳性苗。分别以野生型和转基因 T1 代拟南芥的 cDNA 为模板, 进行 PCR 检测。

1.2.5 胁迫处理下转基因株系萌发率测定

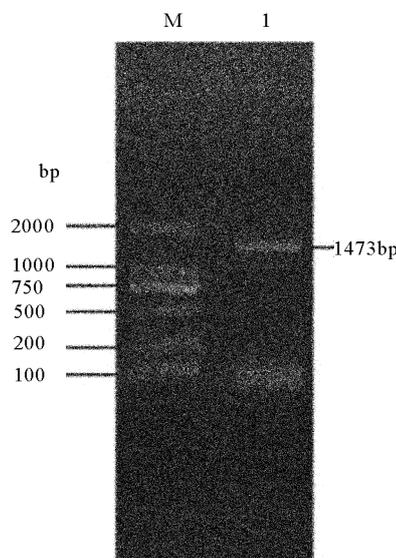
将获得的 T3 代转基因株系和野生对照的种子消毒处理后分别种在 MS 萌发培养基和含有 400 mmol · L⁻¹ 甘露醇、150 mmol · L⁻¹ 氯化钠的渗透培养基上。4 °C 春化 3~4 d 后, 在光照培养箱中正常培养。每隔 2 d 统计一次这两种培养基种植的对照及转基因株系的萌发率, 直到萌发率不再升高。分别进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

2 试验结果

2.1 *MdSBP4* 基因的克隆和生物学信息分析

以‘青砧 1 号’ cDNA 为模板, 选用特异引物 *MdSBP4*-F, *MdSBP4*-R 作为上下游引物分别进行 PCR 扩增, 得到与 *MdSBP4* 目的片段大小一

致的约 1400 bp 片段(图 1)。经切胶回收后与 pGEM-T-easy 载体连接转化 DH5 α 并进行测序。结果表明, 该基因开放阅读框为 1473 bp, 含有一个完整的 SBP-domain 结构域(PF03110)(图 2)。



M: 分子量标准 DL2000; 1: cDNA 的 PCR 结果

图 1 *MdSBP4* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of *MdSBP4* gene fragments

2.2 苹果 *MdSBP4* 基因与其他物种 SBP 的多重序列比对

以 *MdSBP4* 基因序列为基序, 通过 NCBI blast 获得与其序列相似度较高的其它物种 SBP 基因序列。对搜索获得的所有 SBP 基因结构域序列多重比较分析发现, *MdSBP4* 与其它已知基因序列类似, 都含有一个完整的 SBP-domain 结构域(PF03110), 其中包含两个锌指蛋白结构 Zn-1、Zn-2 和一个双向核定位信号区 NLS(Nuclear Location Signal); 第二个锌指结构与核定位信号是部分重叠的, 第一个锌指结构的类型 CysCysHisCys, 第二个锌指结构的类型是 CysCysCysHis(图 2), 表明 *MdSBP4* 是苹果 SBP 家族基因中的成员且 SBP 结构域在植物进化过程中保守程度较高。

2.3 模拟干旱胁迫后 *MdSBP4* 基因的表达分析

本试验分析了‘青砧 1 号’和‘M26’的耐旱性及 *MdSBP4* 基因在这两种砧木中对干旱胁迫的响应。‘青砧 1 号’和‘M26’组育苗在含有 400 mmol · L⁻¹

甘露醇的培养基上生长 30 d 后,表型性状出现明显的差异,‘青砧 1 号’叶片依然嫩绿,而‘M26’则叶片变黄,表明‘青砧 1 号’抗旱性明显强于‘M26’(图 3)。

MdSBP4 基因在‘青砧 1 号’干旱胁迫 12 h 时表达量迅速上升,且在‘青砧 1 号’中 24 h 时表达量

达到最高,是对照 0 h 的 3.5 倍,之后表达量稍有下降,但一直保持在较高水平;在‘M26’中,*MdSBP4* 在 12 h 时表达量迅速被激活且达到最大表达量,是对照 0 h 的 2.4 倍。推测 *MdSBP4* 基因参与了苹果砧木中的抗旱反应。

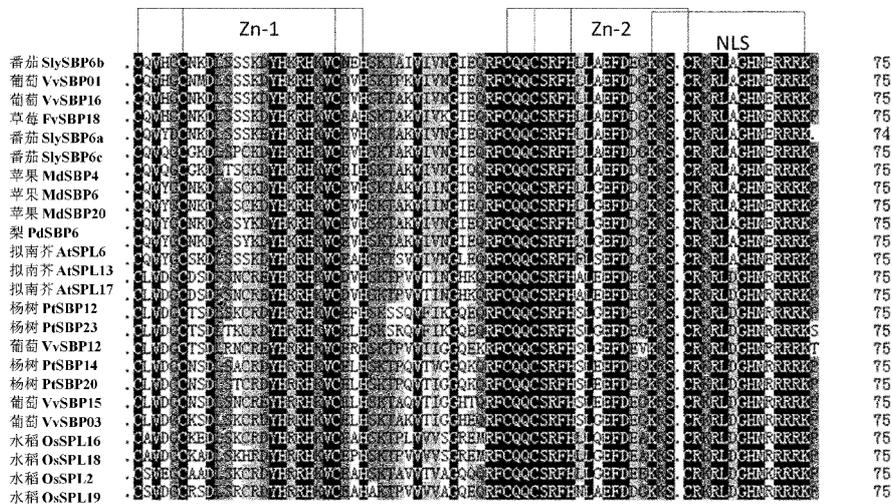
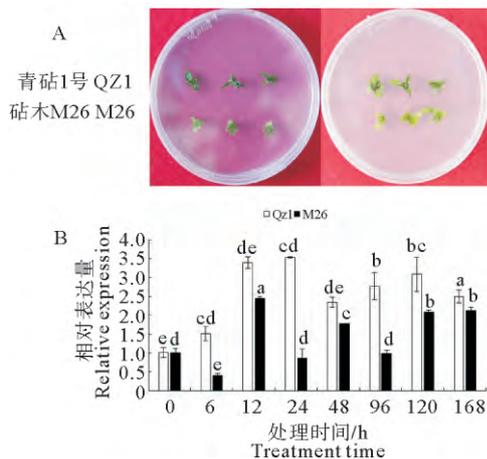


图 2 苹果 *MdSBP4* 基因和所选物种中 *SBP* 基因保守结构域分析

Fig. 2 Analysis of the *SBP* domain in *MdSBP4* and the selected *SBP* gene from plant species



A: 在 400 mm/L 甘露醇培养基中継代培养 20 d 的‘青砧 1 号’和‘M26’试管苗;
B: *MdSBP4* 基因在‘青砧 1 号’和‘M26’干旱胁迫处理不同时间点的表达 ($p < 0.05$)

图 3 苹果苗干旱胁迫后 *MdSBP4* 基因的表达
Fig. 3 Expression of *MdSBP4* gene in apple after treatment of drought stress

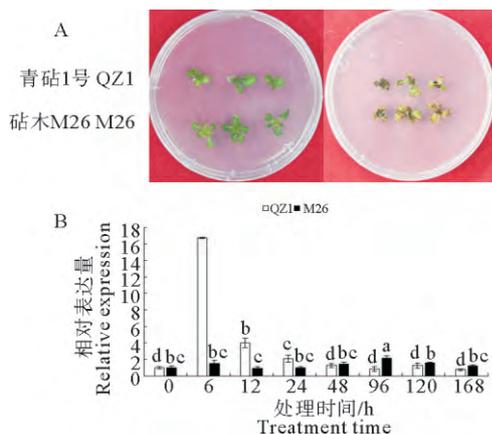
2.4 模拟盐胁迫后 *MdSBP4* 基因的表达分析

本试验分析了‘青砧 1 号’、‘M26’中盐胁迫耐性及 *MdSBP4* 基因在这两种砧木中的表达量变化。

将长势一致的‘青砧 1 号’和‘M26’组培苗 继代于 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 培养基中培养,结果表明 *MdSBP4* 基因在‘青砧 1 号’中 6 h 的表达量最高,是对照 0 h 的 16.5 倍,在 12 h 表达量急剧下降,随后表达量同对照表达水平保持一致;在‘M26’中, *MdSBP4* 基因表达量增减幅度不大,96 h 表达量最高,仅是对照的 2.1 倍。在盐胁迫培养基中培养 30 d 后,‘青砧 1 号’组培苗叶片边缘开始萎焉,‘M26’叶片全部萎焉且枯萎,由图可看出‘青砧 1 号’抗盐性明显强于‘M26’。因此,我们推测 *MdSBP4* 基因参与盐胁迫响应,且在不同抗性的苹果砧木‘青砧 1 号’和‘M26’的表达模式不同。

2.5 *MdSBP4* 转基因拟南芥的获得及其在非生物胁迫培养基上的萌发情况

设计带有酶切位点的特异引物 p2300 — *MdSBP4*—F/R(表 1),构建 pCambia2300—35s —*MdSBP4* 过量表达载体,用 *Xba* I 和 *Kpn* I 进行双酶切验证获得了与 *MdSBP4* 相同大小的基因片段(图 5A),测序后证明该载体构建成功。花絮侵染法转化拟南芥后,将 T0 代种子种到含有卡那霉素抗性的 MS 培养基上,2 周后观察结果发现具有卡



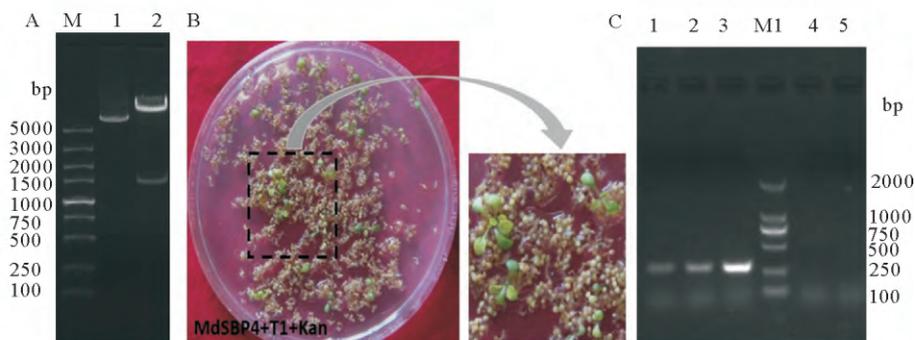
A: 在 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠培养基中継代培养 20 d 的‘青砧 1 号’和‘M26’试管苗;
B: *MdSBP4* 基因在‘青砧 1 号’和‘M26’盐胁迫处理不同时间点的表达 ($p < 0.05$)

图 4 苹果苗盐胁迫后 *MdSBP4* 基因的表达

Fig. 4 Expression of *MdSBP4* gene after treatment of salt stress

那霉素抗性的转基因植株叶片嫩绿,生长健壮,非转基因植株则枯萎变黄直至死亡(图 5B)。将筛选出的具有卡那霉素抗性的植株提取 RNA 并反转录,利用 *npt II* - 引物 *np tII* - F: 5'-AGATGTT-GCTGTCTCCAGGTCGCC-3'和 *npt II* - R: 5'

-CGTCCTTTGCTCGGAAGAGTATGAA-3';进行 PCR 检测初步获得转基因阳性苗(图 5C)。选择两个表现型良好的转基因株系 *MdSBP4*-92、*MdSBP4*-94 以及野生对照(WT)、阳性对照(pCambia2300)同时播种在 MS 培养基、含有 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇和 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的渗透培养基上(图 6A),发现转基因种子 *MdSBP4*-92、*MdSBP4*-94、野生对照种子及空载体对照种子在 MS 培养基上生长 2 d 即开始萌发,4 d 萌发率全部达到 100%;在干旱和盐胁迫培养基上 *MdSBP4*-92、*MdSBP4*-94 种子生长到 2 d 开始萌发,野生对照种子及空载体对照种子生长到 4 d 开始萌发,相比较 MS 培养基上种子萌发情况而言,干旱、盐碱处理的胁迫培养基上的种子萌发受到抑制,萌发时间推迟,萌发率降低。在干旱胁迫和盐胁迫培养基上生长至 14 d 即不再萌发。干旱胁迫转基因种子 *MdSBP4*-92、*MdSBP4*-94 萌发率分别为 95%、85%;野生对照种子和空载体对照种子萌发率分别为 40%、35%;盐胁迫培养基上转基因种子 *MdSBP4*-92、*MdSBP4*-94、萌发率分别为 90%、85%;野生对照种子和空载体对照种子萌发率分别为 35%和 35%明显低于转基因植株。



A: Pcam2300-*MdSBP4* 载体双酶切鉴定图;M:DNA 分子质量标准 DL5000 DNA marker;

1: Pcam2300-*MdSBP4* 质粒电泳图;2: *Xba* I, *Kpn* I 双酶切

Pcam2300-*MdSBP4* 质粒电泳图;B: 卡那霉素筛选 Pcam2300-*MdSBP4* 转基因拟南芥株系;

C: PCR 检测转基因拟南芥株系和野生对照植株中 *Kan*;1~3:转基因株系;M1:DL2000 DNA marker;4,5:野生对照

图 5 *MdSBP4* 转基因拟南芥株系的获得

Fig. 5 The acquisition of *MdSBP4* transgenic lines

3 讨论

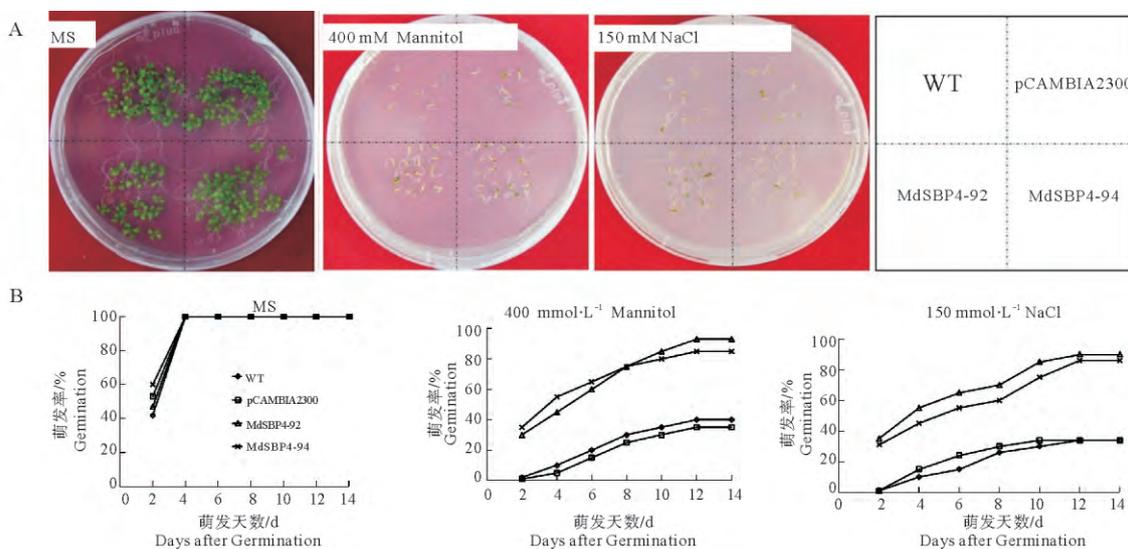
环境胁迫严重影响植物生长发育,为了更好地生存,植物在长期进化过程中形成了一系列响应机制来抵抗各种非生物胁迫。当胁迫发生时,植物细胞通过感受器接收外界胁迫信号,将其在细胞内转

换并经不同的信号途径进行传导,引导植物体内产生一系列胁迫响应转录级联反应,调节相关基因表达。而这些基因的表达离不开植物体内各类转录因子的转录调控。如 *WRKY*, *bZip*, *AP2/ERF* 和 *MYB* 等转录因子都可以通过激活一系列下游基因(如 *RD29A*, *COR15* 以及 *KIN1* 等)的转录,提高植

物体对逆境胁迫的耐受力^[13-15]。

SBP-box 基因是一类新的编码 DNA 结合蛋白的转录因子。他们只存在于绿色植物中,迄今为止,无论是单细胞藻类还是更高等的植物中都已经发现了 SBP 基因。这些基因均含有一个由 74 个氨基酸编码的 SBP 保守结构域,其中包括一个 C 端的双向核定位信号和两个结合 DNA 的锌指结构。在

大部分情况下,SBP 结构域都是非常类似的,他在特定位置的氨基酸是高度保守的。其中最保守的氨基酸残基是组成锌指结构模体的半胱氨酸和组氨酸^[16,17],而我们的实验结果分析也表明 *MdSBP4* 的氨基酸序列包括 SBP-box 家族基因的典型特征,包括一个 SBP 保守结构域和一个双向核定位信号。



A: 转基因拟南芥种子在 MS 萌发培养基和含有 400 mmol · L⁻¹甘露醇、150 mmol · L⁻¹氯化钠的渗透培养基上的萌发情况;

B: 转基因拟南芥种子在 MS 萌发培养基和 400 mmol · L⁻¹甘露醇、含有 150 mmol · L⁻¹氯化钠的渗透培养基上的萌发率

图 6 甘露醇及氯化钠引起的渗透胁迫对野生对照 (WT)、空载体对照和转基因株系萌发的影响

Fig. 6 The effect of osmotic stress caused by Mannitol and NaCl on germination of the wild type (WT), control(pCAMBIA2300)and *MdSBP4*-92/94

最近几年,miR156/SBP 基因在不同植物发育过程中多元化的重要功能已得到了较好阐述,但是关于其在胁迫中发挥作用的研究还较少,机理也不清晰。有研究表明,在拟南芥中,SBP-box 基因可以通过与防御反应途径中的基因相互作用对各类生物和非生物胁迫作出响应^[12]。2014 年,Stief 等发现 miR156 可以通过调控 SPL2、SPL9 和 SPL11 参与拟南芥热胁迫响应^[18];Cui 等发现,miR156 可以通过下调 SPL9 参与拟南芥盐和干旱胁迫的调控^[19];Lei 等发现,miR156 参与了低磷胁迫条件下的根际酸化过程^[20];2015 年 Tan 等和 2016 年 Song 等的研究也分别表明 SBP 基因在白菜和菊花中同样具有响应激素处理及非生物胁迫的功能^[21,22];2017 年 Arshad 等发现 miR156 通过降低 SBP 基因的表达量改善了转基因苜蓿的抗旱性和盐胁迫耐性^[23]。2018 年 Hou 等也发现 *VpSBP16* 基因的过

量表达提高了转基因拟南芥的抗旱性和盐胁迫耐性^[24]。而本研究中 *MdSBP4* 基因在干旱和盐胁迫处理的苹果砧木‘青砧 1 号’中表达量表现为显著上调,与前人研究结果类似。在模拟干旱和盐胁迫处理 20 d 后,‘青砧 1 号’耐盐性和耐旱性都高于‘M26’。根据以上试验结果可以推测 *MdSBP4* 基因在响应干旱和盐胁迫中发挥一定作用,且 *MdSBP4* 基因的表达量可能与砧木品种本身对胁迫的耐性相关。

参考文献:

- [1] Li X, Yin X, Wang H, et al. Genome-wide identification and analysis of the apple (*Malus × domestica* Borkh.) TIFY gene family[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2015, 11(1): 1 - 13
- [2] Jiang Y J, Liang G, Yu D Q. Activated Expression of WRKY57 Confers Drought Tolerance in Arabidopsis[J]. *Molecular Plant*, 2012, 5(6): 1375 - 1388

- [3] Sun X, Li Y, Cai H, et al. The Arabidopsis *AtbZIP1* transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses[J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(3): 429 - 438
- [4] Dongjin S, Seokjun M, Seyoun H, et al. Expression of *StMYB1R-1*, a novel potato single MYB-like domain transcription factor, increases drought tolerance[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(155): 421-432
- [5] Klein J, Saedler H, Huijser P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*[J]. *MGG - Molecular and General Genetics*, 1995, 250(1): 7 - 16
- [6] Cardon G, Hohmann S, Klein J, et al. Molecular characterization of the Arabidopsis SBP-box genes[J]. *Gene*, 1999, 237(1): 91 - 104
- [7] Mika L, Isto J, Maarit H, et al. A new SBP-box gene *Bp-SPL1* in silver birch (*Betula pendula*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 2004, 120(3): 491 - 500
- [8] Kropat J, Tottey S, Birkenbihl R P, et al. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 102(51): 18730 - 18735
- [9] Riese M, Hohmann S H, Munster T, et al. Comparative analysis of the SBP-box gene families in *P. patens* and seed plants [J]. *Gene*, 2007, 401(s 1 - 2): 28 - 37
- [10] Salinas M, Xing S H, hmman S, et al. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato [J]. *Planta*, 2012, 235(6): 1171-1184
- [11] Xie K, Wu C, Xiong L. Genomic organization, differential expression, and interaction of *squamosa promoter-binding-like* transcription factors and *microRNA156* in rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(1): 280-293
- [12] Wang Y, Hu Z L, Yang Y X, et al. Function annotation of an SBP-box gene in arabidopsis based on analysis of co-expression networks and promoters [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(1): 116-132
- [13] Shin D, Moon S J, Han S, et al. Expression of *StMYB1R-1*, a novel potato single MYB-like domain transcription factor, increases drought tolerance [J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(1): 421-432
- [14] Jiang Y J, Liang G, Yu D Q. Activated expression of *wrky57* confers drought tolerance in *arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2012, 5(6): 1375-1388
- [15] Sun X L, Li Y, Cai H, et al. The Arabidopsis *AtbZIP1* transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses [J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(3): 429-438
- [16] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, et al. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of arabidopsis SBP-family transcription factors [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2004, 337(1): 49-63
- [17] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, et al. An arabidopsis SBP-domain fragment with a disrupted C-terminal zinc-binding site retains its tertiary structure [J]. *Febs Letters*, 2006, 580(8): 2109 - 2116
- [18] Stief A, Altmann S, Hoffmann K, et al. Arabidopsis *miR156* regulates tolerance to recurring environmental stress through *SPL* transcription factors [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(4): 1792 - 1807
- [19] Cui L G, Shan J X, Shi M, et al. The *miR156-SPL9-DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Journal*, 2014, 80(6): 1108-1117
- [20] Lei K J, Lin Y M, Jing R, et al. Modulation of the phosphate-deficient responses by *MicroRNA156* and its targeted *squamosa promoter binding protein-like 3* in arabidopsis [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2015, 57(1): 192-202
- [21] Tan H W, Song X M, Duan W K, et al. Genome-wide analysis of the SBP-box gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa subsp. pekinensis*) [J]. *Genome*, 2015, 58(11): 463-477
- [22] Song A P, Wu D, Fan Q Q, et al. Transcriptome-wide identification and expression profiling analysis of chrysanthemum trihelix transcription factors [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 102(2): 10-16
- [23] Muhammad A, Biruk A F, Lisa A, et al. *MicroRNA156* improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing *SPL13* [J]. *Plant Science*, 2017, 258: 122 - 136
- [24] Hou, H M, Jia H, Yan Q, et al. Overexpression of a SBP-Box gene (*VpSBP16*) from Chinese wild *vitis* species in arabidopsis improves salinity and drought stress tolerance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 940