

# 花生蔗糖合成酶基因的克隆及序列分析

何美敬 刘立峰 穆国俊 侯名语 陈焕英 崔顺立

(河北省作物种质资源重点实验室 河北农业大学 农学院 河北 保定 071001)

**摘要:**蔗糖合成酶(Sucrose Synthase, SuSy)是蔗糖代谢途径中的关键酶,在植物生长、发育和渗透调节过程中起着重要作用。为揭示蔗糖合成酶基因在花生中的抗逆机理,以花生基因组DNA为模板,利用染色体步移技术(Genome Walking)中的TAIL-PCR技术扩增花生SuSy基因组序列和启动子区域,得到基因组序列6 189 bp,启动子预测分析表明,该序列包含约800 bp的启动子上游调控序列,13个外显子,12个内含子。启动子元件分析显示,该片段含有典型的TATA-box、CAAT-box,并存在低温响应元件LTR、GA响应元件、干旱响应MYB结合位点、厌氧诱导必要的顺式作用元件ARE等调控元件,及G-box、box4等光响应元件,说明花生SuSy基因的表达可能受低温、干旱、缺氧、光照等环境因素以及激素GA的调控。

**关键词:**花生;蔗糖合成酶;基因克隆;启动子;染色体步移

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)04-0023-06

## Gene Cloning and Sequence Analysis of SuSy Gene in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

HE Mei-jing, LIU Li-feng, MU Guo-jun, HOU Ming-yu, CHEN Huan-ying, CUI Shun-li  
(Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei Province, College of Agronomy, Agricultural  
University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** Sucrose Synthase (SuSy) is a key enzyme in sucrose metabolism, plays very role in both plant growth and developmental process. It is reported that SuSy gene is also closely relate to the ability of plant resistance to abiotic stress. In order to reveal the mechanism of SuSy gene in peanut, here, the TAIL-PCR technology of genome walking was used to obtain a genome sequence for the length of 6 189 bp, which included 13 exons, 12 introns and about an 825 bp length partial promoter region. Sequence analysis showed that typical elements as TATA-box, CAAT-box and some other regulate elements were contained in this region, such as cis-acting element involved in low temperature responsive element (LTR), GA responsive element, drought responsive of MYB binding site, anaerobic induction element ARE and light responsive element G-box and box4 were found in the sequence. It was supposed that the expression of SuSy gene was induced by low temperature, drought, anaerobic and hormone GA etc.

**Key words:** Peanut; SuSy gene; Gene cloning; Promoter; Genome walking

高等植物中光合作用产生的可溶性糖不仅可以作为植物体新陈代谢能源、细胞结构成分,还可以作为信号物质调节植物生长、发育、抗逆等相关的多种生理进程<sup>[1-2]</sup>。植物受到低温、干旱、高盐等非生物胁迫时,会产生保护性反馈,增加植物细胞中可溶性糖含量,尤其是蔗糖含量,通过渗透调节维持胞内蛋白质结构和膜的稳定,为适应胁迫、恢复代谢提供能量<sup>[3-4]</sup>。蔗糖在藜麦<sup>[5]</sup>、小麦<sup>[6]</sup>、拟南芥<sup>[7-8]</sup>等植物

抗逆机理中的作用已进行了深入研究。

蔗糖合成酶(SuSy)是蔗糖代谢调节中的关键酶,能够可逆的合成和分解蔗糖,并参与糖聚合物如淀粉、纤维素和ATP等的合成,在植物生长过程中起着重要的调节作用<sup>[9-12]</sup>。SuSy基因已经在玉米<sup>[13]</sup>、豌豆<sup>[14]</sup>、苜蓿<sup>[15]</sup>、拟南芥<sup>[16]</sup>等植物中得到了克隆。蔗糖合成酶在能量代谢中承担着重要角色,它可以调动蔗糖进入各种途径如植物细胞的代谢,

收稿日期:2012-05-05

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项基金(CARS-44);河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(10960120D);河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2010136)

作者简介:何美敬(1985-),女,河北河间人,硕士,主要从事花生遗传育种研究。

通讯作者:刘立峰(1966-),男,河北宁晋人,教授,博士,主要从事花生基因组学与分子育种研究。

结构组成和贮藏等<sup>[17-18]</sup>。*SuSy* 基因在植物非生物胁迫下的表达研究也越来越广泛。低温处理<sup>[6,19-20]</sup>和渗透胁迫<sup>[21-24]</sup>会诱导 *SuSy* 基因的表达。多数研究表明,豆科作物共生固氮能力与根节中 *SuSy* 活性有关<sup>[25-26]</sup>。缺氧,伤害能够增强蔗糖合成酶的表达<sup>[7,27-29]</sup>,*SuSy* 基因的表达也受外源糖分调节<sup>[27-29]</sup>。因此,研究 *SuSy* 基因在植物抵抗非生物胁迫中具有重要作用。

目前,对 *SuSy* 基因的研究主要集中在编码该基因的分子克隆和翻译后的调节机制<sup>[30-31]</sup>,基于 *SuSy* 基因的组织特异性及功能特异性的翻译后调节机制<sup>[8,32-33]</sup>,*SuSy* 基因启动子序列的分析能够为 *SuSy* 基因家族各成员的不同表达机制提供参考资源。

花生是我国重要的油料作物和经济作物<sup>[34]</sup>,其经济效益显著,种植面积逐渐扩大。但极端天气的出现、沿海土地盐碱化等问题限制了花生产量的大幅提高,亟需加强花生抗逆机理的研究,为花生育种奠定理论基础,促进花生生产。为了更好地研究 *SuSy* 基因的功能,本研究以花生品种窄叶花生为材料,利用 Genome walking 中的 TAIL-PCR 技术克隆了花生 *SuSy* 基因序列,并对启动子序列结构进行了分析,为 *SuSy* 基因在花生中抗逆机制的研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及试剂

花生品种窄叶花生为本实验室留种。挑选籽粒饱满的花生种子播种,以高温灭菌的蛭石为培养基质,于培养箱中培养,保持温度 24 ~ 28℃,湿度为 60% ~ 80%,幼苗长至第一片三出复叶时,剪取叶片,液氮速冻后于 -80℃ 保存备用。

克隆载体 pMD19-T Vector、Premix Ex Taq PCR 酶、LA 酶、dNTP mixture、Genome Walking Kit、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司;引物合成、序列测序工作由生工生物(上海)工程技术公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 花生 DNA 的提取 花生基因组 DNA(gDNA)采用改良 CTAB 法从幼嫩叶片中提取<sup>[35]</sup>。

1.2.2 花生 *SuSy* 基因组序列的获得

1.2.2.1 内含子的扩增 利用克隆得到的花生 *SuSy* 基因的 cDNA 序列,与甘蔗同源序列 AY118266<sup>[36]</sup>进行基因结构比对,在 cDNA 的保守区域设计 2 对基因特异引物 SF1R1 和 SF2R2,分段扩增花生 *SuSy* 基因的内含子区。以花生 gDNA 为模

板,将得到的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶分离纯化回收,克隆到 pMD19-T 载体上,然后转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。经菌落培养和蓝白斑筛选各随机挑取 10 个克隆进行 PCR 阳性验证,PCR 反应程序为:94℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,55℃ 50 s,72℃ 2 min 30 s,共 35 个循环;72℃,15 min;结束反应。2 段序列分别将阳性单克隆送上海生工公司测序。

1.2.2.2 3'端和 5'端侧翼序列的扩增 根据染色体步移试剂盒说明书提供的流程图及引物设计原则,以 1.2.2.1 测序拼接的序列为模板设计 5'端特异性扩增引物,3'端特异性扩增引物,各端共设计 9 条引物,结合染色体步移试剂盒中的随机引物逐步扩增花生 *SuSy* 基因两端侧翼序列。扩增体系 50  $\mu$ L 中,DNA 模板的量控制在 500 ~ 1 000 ng。扩增过程参照说明书。回收第 3 次扩增得到的特异性条带,连接、转化和测序同上。

1.2.3 基因组序列分析 利用 BioEdit 比对花生 *SuSy* 基因组序列和 cDNA 序列,分析外显子和内含子的结构剪接位点供点、受位与识别序列等信息。通过 Neural Network PromoPrediction 软件以及植物顺式调控元件数据库 PlantCARE 对花生 *SuSy* 基因启动子序列进行转录元件分析,寻找转录因子结合位点(TFBS)。

## 2 结果与分析

### 2.1 花生基因组 DNA 检测

利用改良 CTAB 法提取的花生 gDNA,经电泳检测(图 1),DNA 主带清晰,无蛋白,无 RNA 污染,紫外分光光度计检测 OD<sub>260/280</sub>在 1.9 ~ 2.1 之间,说明提取的 DNA 质量较高,可以用于后续的基因组扩增。

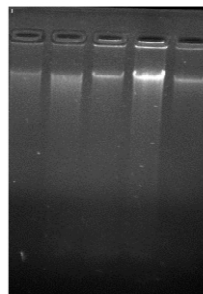


图 1 花生基因组 DNA 的检测

Fig. 1 Agarose gel(1.0%) electrophoresis of gDNA from peanut

### 2.2 花生 *SuSy* 基因全长序列的获得

2.2.1 *SuSy* 基因内含子的扩增结果 利用 cDNA 的高度保守区域设计 2 对基因特异引物 SF1R1 和 SF2R2,扩增花生 gDNA,如图 2 分别得到 1 500 bp

和 1 700 bp 左右的条带,将测序结果进行拼接,有 50 bp 左右的重叠区,与 cDNA 进行比对编码序列相同,有多个间断区,说明扩增到的为花生 *SuSy* 基因的内含子序列。

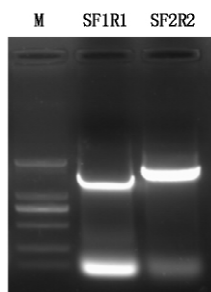


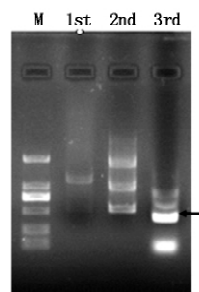
图 2 花生 *SuSy* 基因内含子的扩增

Fig. 2 Amplification of introns of *SuSy* gene

2.2.2 TAIL-PCR 扩增 *SuSy* 基因 3'端和 5'端侧翼序列的结果 利用测序拼接的上述花生 gDNA 序列分别设计的 3'端和 5'端特异性引物扩增,如图 3 所示,以 3'端为例,第三轮产物与第二轮产物的长度相差在 50 ~ 100 bp 之间,测序结果显示得到的序列与 3'端有 100 bp 的重叠,且序列完全相同,说明得到了 3'端部分花生 *SuSy* 基因序列。5'端与 3'端的扩增原理相同。从花生 gDNA 中分段扩增、克隆、测序和拼接后最终得到起始密码子 ATG 至终止密码子 TAA 长 3 253 bp; 5'端侧翼 2 424 bp,能够包含启动子区域; 3'端侧翼序列 512 bp。

## 2.3 基因组序列分析

利用 BioEdit 比对花生 *SuSy* 基因序列和 cDNA 序列,证明扩增得到花生 *SuSy* 基因的序列全长。NNPP 在线预测基因的转录起始位点并结合真核生物启动子的特点,预测转录起始位点(图 4)。花生 *SuSy* 基因结构包含 13 个外显子,12 个内含子,起始密码子 ATG 可能位于第 2 个外显子区。其内含子 5'剪接位点(受体)具有 A(T/C/G)G//GT 的保守序列,3'剪接位点(供体)含有 C(T)AG//G(A/T)的保守序列,即花生 *SuSy* 基因外显子和内含子剪接位点剪接方式符合经典的 GT-AG 规律<sup>[37]</sup>。



M. DNA Marker 2 kb; 1st ~ 3rd. 利用特异引物与随机引物进行的巢式扩增。M. DNA Marker 2 kb; 1st ~ 3rd. PCR products from each primer combination with marker DNA were loaded into each land.

图 3 TAIL-PCR 扩增花生 *SuSy* 基因序列

Fig. 3 A garose gel analysis of TAIL-PCR products of *SuSy* gene sequence using a modifide procedure

```

GCCCTTTGAGTAATGACATGCCC TTAAGTGCATGCATCCACCAC TCCC TC TAGCT
P-box MBS
TTCAATTGGAATTTGAATTCACATT TACAACCATTCG TAGTAAGTAGTATTATT
CAAT-box
ATCATCATAACTCATATTGCATTAAATACATACAGATAAAAAGGGATGTCAACATT
Box 4
TATCGCTTTCTTCAACTTCACATTTTCTCATCTCCCAACTTGCA TATACA TCAACA
TATA-box
CACTCTTTTACCTTTTACCGCTAC TACTATCTATAGTACTTATTACTACTAAG
TATA-box TATA-box
ACTAAATTCATAACAGTTGGCACCATGCACAAAATT CACGTGAAGTGGCA
G-box
CTTCAA TGTTTGACTTTTCATTGAAAATGGTTC TCTGTCC TAACACCA CAATCG
CAAT-box CAAT-box
TCCAAAAGGCATGTTTCTAAGTTTGAAGTTTATTTCTTAAATTACAAAGACAACA
ACCAAAGGAAATCTA CAATGTTTGAAGAATTATGTGACCTTCA CAATGAA
CAAT-box CAAT-box
ATTAATC TATGTAAAGAAATGGGACTTAAATTTGTTTCTCCCCCCTTCCACAC
Box 4 Sp1
CTTATGTTGTTTGTTCATGGTACAGCAAGAAATCTATG CCGAAATAC TATATTC
CAAT-box LTR TAAT-box
AGATCTAACAACTCATTACACTTTTCTTGGTTTGTCTTTCTTTCTTTCTTAATT
ARE 5' UTR Py-rich stretches
TTTAAACCCCTCAATTCTCTTGATCCTTCCACCA CCAATGTTCTACTTTAACAAA
TATA-box CAAT-box
ATCAAGATTCCA CAATGTAAATTTGTTCCCTCCCCCCTCCCCCAAGAAAAA
CAAT-box Sp1 +1

```

+1. 转录起始位点; 方框. 基本元件; 其余阴影. 转录结合位点。

+1 is the transcript start site(TSS); Potential basic elements of promoter are boxed; Other TFBS are in shadow.

图 4 花生 *SuSy* 基因启动子的部分序列

Fig. 4 Partial sequences of *SuSy* gene promoter

通过植物顺式调控元件数据库 PlantCARE 在线软件对花生 *SuSy* 基因启动子序列的转录因子结合位点预测(图 4),转录起始位点上游(+1 处 A 位)含有真核生物启动子的基本元件 TATA-box,CAAT-box(方框所示)。此序列中还含有一些重要的调控元件(阴影所示),如高水平转录调控因子 5'UTR 嘧啶富集区(GTTTCTTTTCT);厌氧诱导必要的顺式作用元件 ARE(TGGTTT);干旱响应 MYB 结合位点 MBS(CAACTG);低温响应元件 LTR(CCGAAA);赤霉素反应元件 P-box(GCCTTTTGACT)及一些光响应元件如 G-box(CACGTG),Box4,SP1 等。

### 3 讨论

真核生物的启动子是一段能与 RNA 聚合酶及其转录因子特异结合、确保转录精确而有效地起始的 DNA 序列。启动子的调控在转录环节中占有十分重要的地位,它控制着基因在特定组织、特定发育阶段以及一定环境条件下的表达。因此,启动子功能序列的分析对于基因表达调控机制的研究至关重要。

染色体步移法(Genome Walking)中 TAIL-PCR(Thermal Asymmetric Interlaced PCR)技术由于高特异性、效率高、精确灵敏的特点已成为分子生物学研究中的一种强大工具,现已广泛用于扩增已知基因上游未知的启动子区域<sup>[38]</sup>。本试验利用此方法进行花生 *SuSy* 基因全长序列扩增过程中发现,稀释每轮的扩增产物可以提高扩增产物的特异性,尽量不使用产物直接进行扩增,这有利于保证扩增特异性的而不降低扩增效率。

用 TAIL-PCR 的方法从花生基因组中克隆到长 825 bp 的 *SuSy* 基因启动子序列,在线分析表明,其中除含有 TATA-motif、CAAT-motif 等典型的真核生物顺式调控元件外,还含有一些重要的调控元件序列,如低温应答元件 LTR(CCGAAA),在低温胁迫的大麦 *blt4.9* 基因的表达调控中发挥重要的作用<sup>[39]</sup>;干旱响应 MYB 结合位点 MBS,多数研究表明,抗旱基因的启动子上都有 MYB 元件<sup>[40]</sup>;厌氧诱导必要的顺式作用元件 ARE<sup>[41]</sup>;赤霉素响应顺式作用元件 P-box<sup>[42]</sup>。此外,该序列中还发现一些光响应元件如 G-box(CACGTG)、B-box4 等,它们对光的诱导激活是必需的<sup>[43]</sup>,有研究发现,*OsABI5* 和 G-box 元件结合提高植物对高盐的抗性<sup>[44]</sup>。这些调控序列的存在说明低温、干旱、厌氧等环境因子可能通过调节花生 *SuSy* 基因的表达,来调控花生中蔗糖合成酶的合成。此外,5'UTR 高水平转录调控因子<sup>[45]</sup>的存在为花生 *SuSy* 基因的高效表达提供了可能,我们将对

花生 *SuSy* 基因的启动子活性做进一步研究。

参照 Baud 等<sup>[8]</sup>对拟南芥 *SuSy* 基因家族的 6 个成员(*AtSuS1-AtSuS6*)、Hirose 等<sup>[46]</sup>对水稻 6 个 *SuSy* 基因成员(*SUS1-SUS6*)及 Cristina 等<sup>[22]</sup>对大麦 4 个 *SuSy* 基因成员(*HvSs1-HvSs4*)的基因结构分析发现,各成员之间的外显子和内含子数量、长度上均存在差异,但是所有序列的剪接方式都符合经典的 GT-AG 规律,本实验克隆到的花生 *SuSy* 基因组序列外显子和内含子的剪接方式符合经典的 GT-AG 规律,说明 *SuSy* 基因在 mRNA 剪接方式上具有高保守性。

Baud 等<sup>[8]</sup>证实,拟南芥中编码 *SuSy* 基因家族中各个基因应对各种反应时的表达不同。如在厌氧条件下只有 *AtSuS1* 和 *AtSuS4* mRNA 水增加;*AtSuS2* 仅在开花后 12 d 特异性高度表达;*AtSuS3* 在叶片失水、渗透胁迫及后熟的种子等脱水条件下各个器官均有表达;而 *AtSuS5* 和 *AtSuS6* 在所有组织中的表达是组成性的,不受胁迫条件的影响,Hirose 等<sup>[46]</sup>研究也显示水稻 *SUS1* 在根、展叶和节间等延伸组织中显著表达,也可能参与纤维素的合成;*SUS2* 在多种组织中表达,可能是组成性表达,另外,在幼苗生长、水下缺氧生长时显著增加;*SUS3* 和 *SUS4* 在颖果中显著表达,可能参与籽粒灌浆的碳分配;*SUS5* 和 *SUS6* 在所有组织中表达,但是表达水平低,淹没的分枝中表达受到抑制。Cristina 等<sup>[22]</sup>及 Zhang 等<sup>[47]</sup>也分析得出,*SuSy* 基因家族的各成员间的表达和响应胁迫反应存在差异。

这些研究均说明,*SuSy* 基因家族各成员的表达具有组织特异性、时空特异性。*SuSy* 基因表达调控的复杂性说明 *SuSy* 基因可能受多种信号途径调控。*SuSy* 基因参与渗透胁迫、低温刺激、缺氧等非生物胁迫响应过程中,对于植物适应环境变化起着一定的作用。因此,研究 *SuSy* 基因在植物抵抗非生物胁迫中具有重要作用。本实验启动子的分析和研究为转录水平上花生 *SuSy* 基因的调控机制提供了理论依据。花生 *SuSy* 基因的表达调控及功能需进一步研究,为花生抗逆研究及育种奠定理论基础。

### 参考文献:

- [1] Jang J C, Leon P, Zhou L, et al. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants [J]. Plant Cell, 1997, 9(1): 5-19.
- [2] Loreti E, Bellis L D, Alpi A, et al. Why and how do plant cells sense sugars [J]. Ann Bot, 2001, 88: 803-812.
- [3] Hanson H D, Hitz W D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits [J]. Annu Rev PlantPhysiol, 1982, 33: 163-203.

- [4] Kramer P J ,Boyer J S. Water Relations of Plants and Soils [M]. San Diego: Academic Press ,1995: 377 – 404.
- [5] Prado F E ,Boero C ,Gallardo M *et al.* Effect of NaCl on germination ,growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* wild seeds [J]. Bot Bull Acad Sin ,2000 , 41: 27 – 34.
- [6] Calderon P ,Pontis H G. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock [J]. Plant Sci ,1985 ,42: 173 – 176.
- [7] D jardin A ,Sokolov L N ,Kleczkowski L A. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis* [J]. Biochem ,1999 ,344: 503 – 509.
- [8] Baud S ,Vaultier M N ,Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot ,2004 ,55: 397 – 409.
- [9] Fujii S ,Hayashi T ,Mizuno K. Sucrose synthase is an integral component of the cellulose synthesis machinery [J]. Plant Cell Physiol ,2010 ,51( 2) : 294 – 301.
- [10] Coleman H D ,Yan J ,Mansfield S D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,2009 ,4( 31) : 13118 – 13123.
- [11] Brill E ,Thournout M ,White R G *et al.* A novel isoform of sucrose synthase is targeted to the cell wall during secondary cell wall synthesis in cotton fiber [J]. Plant Physiol ,2011 ,157( 1) : 40 – 54.
- [12] Fernandez E B ,Muñoz F J ,Li J *et al.* Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4 Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,2012 ,109( 1) : 321 – 326.
- [13] Geiser M ,Döring H P ,Wöstemeyer J *et al.* A cDNA clone from *Zea mays* endosperm sucrose synthetase Mrna [J]. Nucleic Acids Res ,1980 ,8( 24) : 6175 – 6188.
- [14] Buchner P ,Poret M ,Rochat C. Cloning and characterization of a cDNA encoding a second sucrose synthase gene in pea ( *Pisum sativum* L.) [J]. Plant Physiol ,1998 , 117: 719.
- [15] Wienkoop S ,Larrainzar E ,Glinski M *et al.* Absolute quantification of Medicago truncatulasucrose synthase isoforms and N-metabolism enzymes in symbiotic root nodules and the detection of novel nodule phosphoproteins by mass spectrometry [J]. J Exp Bot ,2008 ,59 ( 12) : 3307 – 3315.
- [16] Chopra S ,Del-favero J ,Dolferus R *et al.* Sucrose synthase of *Arabidopsis*: Genomic cloning and sequence characterization [J]. Plant Mol Biol ,1992 ,18: 131 – 134.
- [17] Sturm A ,Tang G Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development ,growth and carbon partitioning [J]. Trends Plant Sci ,1999 ,4: 401 – 407.
- [18] Komatsu A ,Moriguchi T ,Koyama K *et al.* Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships [J]. J Exp Bot ,2002 ,53 ( 366) : 61 – 71.
- [19] Crespi M D ,Zabaleta E J ,Pontis H G *et al.* Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat [J]. Plant Physiol ,1991 ,96: 887 – 891.
- [20] Rosa M ,Hilal M ,Gonzalez J A *et al.* Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose-starch partitioning in salt-stressed and salt-acclimated cotyledons of quinoa ( *Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings [J]. Plant Physiol Bioch ,2009 ,47( 4) : 300 – 307.
- [21] Kleines M ,Elster R C ,Rodrigo M J *et al.* Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* ( Hochst.) [J]. Planta ,1999 ,209: 13 – 24.
- [22] Sicilia C B ,Amado S H ,Melendi G P *et al.* Structure , expression profile and subcellular localisation of four different sucrose synthase genes from barley [J]. Planta , 2011 ,234( 2) : 391 – 403.
- [23] Niedzwiedz-Siegienia ,Bogatek-Leszczynska R ,C mead D *et al.* Effects of drying rate on dehydration sensitivity of excised wheat seedling shoots as related to sucrose metabolism and antioxidant enzyme activities [J]. Plant Sci ,2004 ,167( 4) : 879 – 888.
- [24] Lu S W ,Li T L ,Jiang J. Effects of salinity on sucrose metabolism during tomato fruit development [J]. J Afr Biotechnol ,2010 ,9( 6) : 842 – 849.
- [25] Arrese-Igor C ,Gonzalez E M ,Gordon A J *et al.* Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses [J]. Plant Physiol ,1999 , 27: 189 – 212.
- [26] Silvente S ,Camas A ,Lara M. Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean ( *Phaseolus vulgaris* L.) : evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene [J]. J Exp Bot ,2003 ,54 ( 383) : 749 – 755.
- [27] Salanoubat M ,Belliard G. The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding , anaerobiosis and sucrose concentration [J]. Gene ,1989 , 84( 1) : 181 – 185.
- [28] Zeng Y ,Wu Y ,Avigne W T *et al.* Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses [J]. Plant Physiol ,1998 ,116: 1573 – 1583.
- [29] Loreti E ,Poggi A ,Novi G *et al.* A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidop-*

- sis seedlings under anoxia [J]. *Plant Physiol* 2005 ,137: 1130 – 1138.
- [30] Hardin S C ,Huber S C. Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves [J]. *Plant Physiol Bioch* 2004 ,42: 197 – 208.
- [31] Sch fer W E ,Rohwer J M ,Botha F C. Partial purification and characterisation of sucrose synthase in sugarcane [J]. *Plant Physiol* 2005 ,162( 1) : 11 – 20.
- [32] Sturm A ,Lienhard S ,Schatt S *et al.* Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) [J]. *Plant Mol Biol* ,1999 ,39: 349 – 360.
- [33] Bieniawska Z ,Paul Barratt D H ,Garlick A P *et al.* Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis* [J]. *J Plant* 2007 ,49 810 – 828.
- [34] 张吉民 ,苗华荣 ,李正超 ,等. 花生加工利用、贸易现状与展望[J]. *武汉工业学院学报* ,2002( 2) : 104 – 106.
- [35] 王传堂 ,黄 粤 ,杨新道 ,等. 改良 CTAB 法和高盐低 pH 值法提取花生 DNA 的效果 [J]. *花生学报* 2002 , 31( 3) : 20 – 23.
- [36] Lingle S E ,Dyer J M. Polymorphism in the promoter region of the sucrose synthase – 2 gene of saccharum genotypes [J]. *American Society Sugar Cane Technologists* , 2004 ,24: 241 – 249.
- [37] Breathnach R ,Chambon P. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins [J]. *Ann Rev Biochem* ,1981 ,50: 349 – 383.
- [38] Liu Y G ,Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics* ,1995 ,25( 3) : 674 – 681.
- [39] Dunn M A ,White I A J ,Vural S *et al.* Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*bht4. 9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Plant Mol Biol* ,1998 ,38: 551 – 564.
- [40] Yamaguchi-Shinozaki K ,Shinozaki K. A novel cis-acting element in all *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought ,low-temperature ,or high-salt stress [J]. *Plant Cell* ,1994 ,6: 251 – 264.
- [41] Riou C ,Herv C ,Pacquit V ,Dabos P *et al.* Expression of an *Arabidopsis* lectin kinase receptor gene ,*JecRK-a1* ,is induced during senescence ,wounding and in response to oligogalacturonic acids [J]. *Plant Physiol Biochem* , 2002 ,40: 431.
- [42] Mena M ,Cejudo F J ,Isabel-Lamoneda I *et al.* A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone [J]. *Plant Physiol* 2002 ,130 ( 1) : 111 – 119.
- [43] Zou M ,Guan Y ,Ren H ,Zhang F ,*et al.* A bZIP transcription factor ,*OsABI5* ,is involved in rice fertility and stress tolerance [J]. *Plant Mol Biol* ,2008 ,66( 6) : 675 – 683.
- [44] Millar A J ,Kay S A. Integration of circadian and photo transduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis* [J]. *Proc Nat Acad.* 1996 ,93: 15491 – 15496.
- [45] Daraselia N D ,Tarchevskaya S ,Narita J O. The promoter for tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase gene 2 has unusual regulatory elements that direct high-level expression [J]. *Plant Physiol* ,1996 ,112( 2) : 727 – 733.
- [46] Hirose T ,Schofield G N ,Terao T. An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice [J]. *Plant Sci* 2008 ,174( 5) : 534 – 543.
- [47] Zhang D Q ,Xu B H ,Yang X H *et al.* The sucrose synthase gene family in *Populus*: structure ,expression ,and evolution [J]. *Tree Genet Genom* ,2011 ,7( 3) : 443 – 456.