

小麦高亲和性钾转运蛋白基因 *HKT1* 启动子克隆及序列分析

李孟军^{1,2}, 高欣娜^{1,2}, 傅晓艺^{1,2}, 史占良^{1,2}, 郭进考^{1,2}

(1. 石家庄市农林科学研究院 河北 石家庄 050041; 2. 河北省小麦工程技术研究中心 河北 石家庄 050041)

摘要: 根据普通小麦 *HKT1* cDNA 序列 (GenBank 登录号: U16709) 设计基因特异引物, 通过筛选矮败中国春 BAC 文库, 获得含有 *HKT1* 基因组序列单克隆 BAC。根据 *HKT1* 5'-端已知序列设计测序引物, 以单克隆 BAC 质粒为模板进行测序, 序列经 Sequencer 软件拼接, 获得了 *HKT1* 基因起始密码子上游 4 192 bp 序列。用 Neural Network Promoter Prediction (NNPP) 软件分析此序列, 预测存在 9 个转录起始点。PLACE 软件分析表明, 该序列具有启动子的基本元件 TATA-box、CAAT-box, 包含多个胁迫诱导元件, 如盐诱导元件 GAAAAA, 抗冻、缺水、脱落酸、抗寒元件 CANNTG 和 CCGAC 等, 伤害诱导元件 TGACY, 组织特异表达元件 ACTTTA 和 ATATT 等。*HKT1* 启动子克隆表明, 设计基因特异引物筛选 BAC 文库, 通过以单克隆 BAC 质粒为模板直接测序获得基因启动子序列的方法是从普通小麦基因组中克隆基因启动子的一条切实可行的途径。

关键词: 小麦; 高亲和性钾转运蛋白; 启动子

中图分类号: Q78; S512.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0001-05

Cloning and Sequence Analysis of *HKT1* Promoter in Wheat

LI Meng-jun^{1,2}, GAO Xin-na^{1,2}, FU Xiao-yi^{1,2}, SHI Zhan-liang^{1,2}, GUO Jin-kao^{1,2}

(1. Shijiazhuang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050041, China;

2. Wheat Engineering Research Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: Using specific primers based on wheat *HKT1* cDNA sequence (GenBank accession: U16709), single BAC clone containing *HKT1* genomic sequence was identified by screening Aibai Chinese Spring BAC library. 4 192 bp *HKT1* 5'-flanking region was isolated by sequencing BAC plasmid. Nine transcription start sites were predicted by Neural Network Promoter Prediction (NNPP) program analysis. The functional elements were analysed by PLACE program. *HKT1* promoter region contains the basic elements: TATA-box, CAAT-box, and stress-induced elements: salt-response element, cold-, dehydration-, ABA- and frozen-response elements, WUN-response elements and tissue-specific elements. Cloning of *HKT1* promoter showed that it is a feasible method to isolate gene promoter by screening BAC library and sequencing BAC plasmid in wheat.

Key words: *Triticum aestivum* L.; High-affinity potassium uptake transporter (*HKT1*); Promoter

Schachtman 等^[1] 利用酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) trk1 和 trk2 突变菌株 CY162 (MATa, trk1, trk2::pCK64, his3, ura3)^[2] 互补试验从普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 根 cDNA 文库中分离了高等植物中编码高亲和性钾转运蛋白基因 *HKT1* (High-affinity potassium uptake transporter, GenBank 登录号: U16709)。HKT1 是从普通小麦 (*T. aestivum*) 分

离的第一个高等植物中编码高亲和性钾转运蛋白基因^[1,3-4]。目前, 利用比较基因组学方法在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[5]、桉树 (*Eucalyptus camaldulensis*)^[6]、冰叶午时花 (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Su H 和 Bohnert H J, GenBank accession: AF367366)、大麦 (*Hordeum vulgare*)^[7] 和水稻 (*Oryza sativa*)^[8] 等植物中均克隆了 *HKT1*。已有研究表明,

收稿日期: 2012-07-12

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08002-005); 石家庄市科技支撑计划项目 (12149402A)

作者简介: 李孟军 (1972-), 男, 河北玉田人, 副研究员, 博士, 主要从事作物分子生物学研究。

通讯作者: 郭进考 (1951-), 男, 河北新乐人, 研究员, 主要从事小麦遗传育种研究。

HKT1 基因家族与植物的 Na^+ 运输有关,对细胞的 K^+ 和 Na^+ 吸收运输有明显影响。在 $\mu\text{mol/L}$ Na^+ 浓度下,小麦 *HKT1* 具有 K^+-Na^+ 协同运输作用,但当 Na^+ 达到 mmol/L 浓度时,*TaHKT1* 仅运输 Na^+ [3]。

原位杂交研究表明,*HKT1* 主要在小麦幼苗根皮层细胞和叶微管组织周围的细胞层表达,*HKT1* 的表达模式与其功能相适应 [1]。在 K^+ 缺乏情况下,*TaHKT1*、*HvHAK1*、*AtKUP3* 和 *Ni-OsHKT1* mRNA 水平升高,但 30 mmol/L Na^+ 使低 K^+ 诱导的高水平的 *Ni-OsHKT1* 和 *Po-OsHKT1* mRNA 下降 [7-10]。上述结果表明,*HKT1* 的表达受到诱导且在特定部位和细胞中表达。

本研究根据小麦 *HKT1* cDNA 序列,通过筛选小麦 BAC 文库和 BAC 质粒直接测序克隆了 *HKT1* 启动子。通过序列分析,找出该启动子的功能元件,并在此基础上构建了 *HKT1* 启动子 3 个 5' 末端缺失表达载体,以期用于研究 *HKT1* 的表达调控机制。

1 材料和方法

1.1 供试材料

矮败中国春 BAC 文库约含 1×10^6 个克隆,覆盖小麦基因组 6.5 倍,BAC 克隆保存于 399 个混合池中,平均插入片段 118 kb,重组率 94%,空载率 2.6%。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦 BAC 质粒提取 文库 PCR 筛选用 BAC 质粒提取,采用 SDS 碱裂解法;BAC 延伸测序用 BAC 质粒提取,采用 Qiagen Large-Construct Kit 提取,操作依照试剂盒说明进行。

1.2.2 BAC 文库筛选引物:上链 5'-ATGGGCCGGGTGAAAAGAT-3',下链 5'-CTTGGCCACTTGTATCATACTTTC-3'。PCR 扩增程序:94℃ 3 min;94℃ 45 s,57℃ 45 s,72℃ 3 min,35 times;72℃ 5 min。

1.2.3 BAC 质粒测序 用 BigDye^R Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)进行测序 PCR 反应,测序使用 ABI 3730 XL DNA Analyzer。测序反应和纯化依照试剂盒说明进行。

1.2.4 序列组装、拼接和比对 采用 Lasergene SeqMan II Module(DNASTar)进行。用 Neural Network promoter Prediction(NNPP)软件预测转录起始点、用 PLACE 软件 [11] 分析启动子序列中各功能元件。

2 结果与分析

2.1 矮败中国春 BAC 文库筛选

以矮败中国春 BAC 文库 399 个混合池质粒为模板,通过 PCR 反应对 BAC 文库进行筛选,经过 3

轮筛选获得 2 个阳性 BAC 混合池:Pool-79 和 Pool-296。PCR 产物测序表明,2 个阳性 BAC 混合池均含有 *HKT1*。

2.2 BAC 单克隆筛选

建库记录表明,Pool-79 和 Pool-296 分别由 2 700 4 000 个克隆组成。将 Pool-79 阳性混合池的保存菌液稀释 10 000 倍,分别取 20~50 μL 涂布在 LB 固体培养基(Chloromycetin /IPTG/X-gal)表面,挑取克隆保存于 30×384 孔板中。以每个 384 孔板为单位建立板混合池,再次进行筛选,其中 3 个 384 孔板上存在阳性单克隆,PCR 产物测序表明,扩增片段序列相同,均为 *HKT1*。通过再次筛选,从编号 30~5 384 孔板上获得阳性单克隆 BAC。PCR 产物测序结果表明,阳性单克隆 BAC 含有 *HKT1*。

2.3 *HKT1* 侧翼序列克隆

根据 *HKT1* 已知序列设计引物,以 BAC 质粒为模板,进行 BAC 延伸测序,测序引物如下:5'-TTG GATCCAGAAGGGGTGAAC-3',5'-ACAAGATAGGTC GCATACTGG-3',5'-TTTATTGAACGTTGACGAAGAGCA-3',5'-GTATGGGTTGTTGATTGATTAGG-3',5'-AAAATGTCTGAAAGTGGTTAGGA-3',5'-TGCACCTCAATCAATCAACATC-3',5'-CACGACGTTCCGACTTGAG-3',5'-GTTTTCTTGCAATGATTCTGACTC-3'。用 Sequencer 软件进行序列拼接,获得了 *HKT1* 起始密码子上游 4 192 bp 序列。通过 PCR 产物克隆测序对 ATG 上游 1 831 bp 进行了验证。

2.4 *HKT1* 基因 5'-侧翼序列分析

用 Neural Network Promoter Prediction(NNPP)软件分析此序列,预测存在 9 个转录起始点(表 1),结合普通小麦 *HKT1* cDNA 序列(GenBank accession: U16709)分析,我们预测 *HKT1* 转录起始点为 G,位于起始密码子上游 44 bp 处,虽与常见的转录起始点 A 不同,但符合转录起始点的一般特点。

PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>)是关于植物基因顺式调控元件核苷酸序列的数据库,通过植物启动子中顺式元件的同源对比,为鉴定可能的顺式元件提供了一种快捷的方法。用 PLACE 软件分析此序列(4 192 bp),发现该序列具有启动子的基本转录元件:TATA-box(-401 bp)和 CAAT-box(-417 bp);还发现该序列包含多个胁迫诱导元件:4 个盐诱导元件 GAAAAA,分别位于 -853,-1 148,-1 280,-1 997 bp 处;1 个抗冻、抗寒、缺水、高盐和脱落酸诱导元件 ACCGAC,位于 -535 bp 处;6 个缺水诱导元件 WAACCA 和 CNGT-TR,分别位于 -548,-691,-877,-1 346,-1 743,

-1 832 bp 处; 2 个伤害诱导元件 TGACY , 分别位于 -792 , -1 935 bp 处和 8 个根特异表达元件 ATATT , 分别位于 -442 , -510 , -939 , -1 001 , -1 288 , -1 971 , -2 026 , -2 072 bp 处(元件位置

见图 1 , 图中仅标示 -1 ~ -2 100 bp 范围内预测元件)。同时在此序列中还存在多个抗冻、抗寒、缺水

和脱落酸诱导元件 CANNTG。

表 1 *HKT1* 转录起始位点预测

Tab. 1 Prediction of the transcription start site of *HKT1*

起点 Start	终点 End	评分 Score	启动子序列 Promoter sequence
84	134	0.99	TTGTCATAGTTTAAATAGCGGGATATGCCTCTTAGCAGCAAGATCTTTCT
1 137	1 187	1.00	AATACAGAAATAAAAAAGGGCCCGATTGATACGTTTACGAGACTAGTC
1 905	1 955	0.84	ACCACATGCATATATACGAGGAATATATACACGCTTTAAAGTAAATTTGT
1 946	1 996	0.83	TAAAATTGTACATAAACTGAGCAAGTGGTATTAATACCTTATATACCTT
3 011	3 061	0.83	TTTTGTGGCGCCATAAAACCGAGTGATCCTAATCAAATCAACAACCCAT
3 400	3 450	0.89	GTTGAGGACTGGTATAAGGAGCACTGTGGGTGCAAGTGCACCTTCCAT
3 813	3 863	0.81	TGCATACATTTATATCACCTGTGCCTGTACAGCAAACCTGGCAGCCTAA
4 035	4 085	0.92	TAAGATAGATTTTAAACCCAGACTAGGATCAGAGGATTAATTGATCTG
4 109	4 159	0.96	AGTGTGCGCATATAAGTAGCACCAGTATGCGACCTATCTTGTCACAGACA

TGTCTTGTCTCATAAGTAAAGATAGCATTACATATTGTTTGTAACTTTAACTTTA -2049

Root-specific motif

CCAATAAATCGAATATCCATATTTACAAGTCAGATTATCCAATAAAGGATTA -1989

Root-specific motif

salt-motif

TCCTACGGCTCGTATATTAGTAAATACCATATCCTTTATCGTATCAATTGACTTGGATT -1929

Root-specific motif

WUN-motif

CAGATCAGATTGTGTTCAAATGTAAAAAATAAATCTCTTATTGTATCCTATAAAAAAGG -1869

ATTTGAAACGGTTTCAATTAATAAATTATCTAACCACTTTCAGACATTTTAGAACATGC -1809

Dehydration motif

TTGCTTGCAATACAAAGCAATGGAACGATTGTAAAGCAAAACAGAGGTGCATATGAGCTA -1749

CTGTTATGACATTTAGCTTTGAGTGCAGAGTGCAGTGCAATAATACTCTCTTCATAAACT -1689

Dehydration motif

GCAATACAATAGTAAATCCCTCAATTCACACAATAGAGCAAAATGCTTAATTCAGTTTCT -1629

TGAATAGTCATAAATTTTAAGTATTTCCATGAGAAGTTCTATCATGCAAAATACTTT -1569

AGCATCATTACCCGCAGTGTTCTCTGTTTTCTGTAAGCAGTAGATCTGAACTACACACA -1509

TTTTTGTGCAGGTAGAAGTAATAAACTAGAGTAGTCTTAGTAAATCAACAACCAGTACA -1449

CGTAGCAGTAATTTGTGTACGAAGGCAGCTGTACTTTGTTTTCCAGTCTTTTTGGCGT -1389

CCACAAGCTTGCCGTGATCCATGCTTAGCATCTATCCCAACTGGGAAATATCTCATTTAG -1329

Dehydration motif

TATTCCTTCAAACAAAACACAAAGTAAGTTGCAGTATATTTGAAAAATCATGCCCTGG -1269

Root-specific motif salt-motif

CTTTAATCCATGGTATGTTAGCTAGCTGCATCGTTGGCTTCTAACTATAAACAACATTAG -1209

CAGTATAAAGTGAACACATTGTGTGTGATGAGAAAGATGTGGAGTTGCAATTATGGAAAA -1149

salt-motif

A	TAAATTGATTTTTGTGGCGCCATAAAACCGGAGTGATCCTAATCAAATCAACAACCCAT	-1089
	ACAGTGCAATCTTAGTAGCAGAAATATCTTTCTTTCTCCTTCTAAAGTTTAGTGTCAA	-1029
	CCTAAAAAAGTGTAGAGTTTTAAATATTTCTAGTAGAGAAAACCTGTATATACTTTTTCTT	-969
	Root-specific motif	
	TACAAACATAGACTTATTAATTAATATTTTCTTTACAAAGCATGTCAAACAGTAC	-909
	Root-specific motif	
	ACTCCCTCGTTCCCGCAGCACATCACCCGTTGAAATCTTTCCATTCCATTGAAAAATGC	-849
	Dehydration motif	
	ACTACTCTAGCTACAGAGGAAAAGACACATTGTTCTGACAGGACGATGTAACCTGACCTTC	-789
	WUN-motif	
	CTGAATGTCGCTATGAACAACAGCAAGCAGCAGCATATGGTTGAGGACTGGTATAAGGAG	-729
	CACTGTGGGGTGCAAGTGCAACCTTCCATCCAACACTGCACGCATCAGCCTATACATGAA	-669
	Dehydration motif	
	TCACCCTTACATCATTTGAAGGATGGTCACAAATCCAACTTCGGAACAGTTTCCTGACGA	-609
	CAAGTGTGTTTGTAGTACCTGCAGGATTCCAGCCAAGCAAGCAGAAACAAAAATCAGTT	-549
	Dehydration motif	
	GCACATGGACCGACTCTCTGAGATGCTACAATGGATATTGCTCTTCGTCACGTTCAATA	-489
	Drought, high-salt, ABA and cold-responsive motif	
	Root-specific motif	
	AACATTGGTGCATTATTGCGATTATTGTGAATGAAGGCACGCATATTCAAGTGTATGATT	-429
	Root-specific motif	
	GTGTGTGACAATGTGGATGGAAATTATTTCTTCTCACTCACACATGTTCCCACTTGATAA	-369
	CAAT-box	TATA-box
	GAAATTTGTGCTGCAATCACTGCACCTTATACTGCATACATTTATATCACCTGTGCCTG	-309
	TACAGCAAACCTGGCAGCCTAACCATTAGCTGGTGTTCGCACCTCATGTGGCCTGCTAAC	-249
	CAGGATGACAAAAGTGAGTTTAATACTGCTAACTTAGTGCTAAGACTCACCTACCAAAT	-189
	GTTTTTCTTGAAAAGAAATCATATGCCGTTGATTGATTGAGAGTACAGCATGATTGTAT	-129
	TTGACTTGCTCTCCTAAGATAGATTTTAAAACCCAGACTAGGATCAGAGGATTAAATTGA	-69
	TCTGCTCATGGTGTCAAGCCAGTGATGCAGTGTGCGCATATAAGTAGCACCAGTATGCGA	-9
	CCTATCTTGTCACAGACATATGCATTTGTTTCTCACACTCATACATAGCACCATG	47
	Transcription start site	Start codon

图 1 *HKT1* 启动子序列Fig. 1 Promoter sequence of *HKT1*

在序列分析的基础上,构建了 *TaHKT1* 启动子 3 个 5'端缺失表达载体(启动子检测载体 pCAM-BIA1391Z, GenBank accession: AF234312),并获得了拟南芥转化植株。采用 GUS 染色方法对 *TaHKT1* 启动子初步分析表明: *TaHKT1* 启动子 3 个 5'端缺失表达载体的表达谱相同,但随着片段的延长,表达强度呈降低趋势。这表明,最小启动子片段(-3 ~ -576 bp)已经包含了决定 *TaHKT1* 特异表达的元件,而其上游(-577 ~ -1 831 bp)可能存在一些负

调控元件,减弱了 *TaHKT1* 表达强度^[12]。

3 讨论

启动子是 RNA 聚合酶识别并与其结合、从而起始基因转录的一段 DNA 序列。启动子作为基因表达调控的重要顺式元件,其克隆对于研究植物基因表达调控、构建基因工程载体和高效表达目的蛋白具有重要意义。植物基因启动子的克隆方法主要包括反向 PCR、锚定 PCR、染色体步行、接头 PCR 和

TAIL-PCR 等^[13-14]。普通小麦是部分同源的异源六倍体,具有超大基因组(1.7×10^{10} bp),因此,小麦基因启动子克隆具有很大的难度。小麦启动子克隆主要采用反向 PCR^[15-16]、染色体步行^[17]和 TAIL-PCR^[18-19],但这些克隆方法成功率低,不具有通用性。我们曾采用反向 PCR、接头 PCR 和 TAIL-PCR 方法克隆 *TaHKT1* 启动子,但仅通过接头 PCR 法获得 0.6 kb 长度的 5'侧翼序列(未发表)。本研究根据 *TaHKT1* 序列设计特异引物筛选矮败中国春 BAC 文库,获得了携带 *TaHKT1* 的 BAC 单克隆,进而通过 BAC 延伸测序克隆了其启动子。同时,我们利用同一引物还克隆了小麦 *HKT* 基因家族的另外 1 个成员,其 A、B、D 3 个亚基因组中 3 个拷贝编码序列高度同源,但启动子序列差别很大^[12],该结果提示,在普通小麦基因组中通过反向 PCR、接头 PCR 和 TAIL-PCR 等技术有可能克隆目的基因的同源基因的启动子,而非目的基因本身启动子。利用小麦基因组 BAC 文库克隆小麦启动子的方法不仅具有通用性,而且能够克服 A、B、D 3 个亚基因组对启动子克隆的相互干扰。

植物的耐盐性与维持体内 K^+ 、 Na^+ 平衡的能力密切相关,具有高 K^+ / Na^+ 的植物耐盐性较强^[20]。*HKT* 家族在植物维持体内 K^+ / Na^+ 的过程中起重要作用。本研究通过 BAC 延伸测序克隆了 *TaHKT1* 启动子,并通过转基因拟南芥 GUS 染色初步验证了其启动子活性。*TaHKT1* 启动子中包含多个胁迫诱导元件,如盐诱导元件、抗冻、缺水、脱落酸、抗寒元件等,这表明 *TaHKT1* 基因的表达可能受非生物逆境胁迫诱导。

参考文献:

- [1] Schachtman D P, Schroeder J I. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants [J]. *Nature*, 1994, 370: 655 - 658.
- [2] Anderson J A, Huprikar S S, Kochian L V *et al.* Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3736 - 3740.
- [3] Rubio F, Gassmann W, Schroeder J I. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance [J]. *Science*, 1995, 270: 1660 - 1663.
- [4] Gassman W, Rubio F, Schroeder J I. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1 [J]. *Plant J*, 1996, 10: 869 - 882.
- [5] Uozumi N, Kim E J, Rubio F *et al.* The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na^+ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1249 - 1259.
- [6] Fairbairn D J, Liu W, Schachtman D P *et al.* Characterization of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 515 - 525.
- [7] Santa-Maria G E, Rubio F, Dubcovsky J *et al.* The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter [J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 2281 - 2289.
- [8] Horie T, Yoshida K, Nakayama H *et al.* Two types of HKT transporters with different properties of Na^+ and K^+ transport in *Oryza sativa* [J]. *Plant J*, 2001, 27(2): 129 - 138.
- [9] Kim E J, Kwak J M, Uozumi N *et al.* AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 51 - 62.
- [10] Wang T B, Gassmann W, Rubio F *et al.* Rapid up-regulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 651 - 659.
- [11] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M *et al.* Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297 - 300.
- [12] 李孟军. 小麦耐盐相关基因 *HKT* 克隆及多样性与功能研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [13] 尹辉, 李丹, 张毅, 等. 植物基因启动子的克隆方法及其应用 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(3S): 85 - 91.
- [14] 郝迪颖, 赵琳, 陈李森, 等. 克隆启动子方法的比较及应用 [J]. 2010, 41(3): 154 - 160.
- [15] 陈冷, 丁丽萍, 严颖君, 等. 小麦 TaPSG719 基因启动子的分离及序列分析 [J]. *武汉植物学研究*, 2009, 27(4): 361 - 364.
- [16] 李凤艳, 徐兆师, 李雅轩, 等. 小麦转录因子 TaDREB6 基因启动子的克隆及活性分析 [J]. *麦类作物学报*, 2011, 31(5): 793 - 798.
- [17] 翟朝增, 徐兆师, 陈耀锋, 等. 小麦蛋白激酶 TaNPK 启动子的克隆及活性分析 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(19): 3930 - 3936.
- [18] 仇艳光, 田景汉, 葛荣朝, 等. TAIL-PCR 的改良及其在分离小麦基因启动子中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2008, 25(4): 695 - 699.
- [19] 陈军营, 沈向磊, 辛玉茹, 等. 改良 TAIL-PCR 技术在小麦 PM H^+ -ATPase 基因启动子克隆中的应用 [J]. *河南农业大学学报*, 2008, 42(1): 1 - 5.
- [20] Ramón S, Rodríguez-Navarro A. Ion homeostasis during salt in plants [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 399 - 404.