

doi:10.7668/hbxb.2014.06.010

桃 *PG* 基因启动子克隆及序列分析

陈迪新,李艳梅,郭国宁,郗 慧,杨瑞娟,杨英军

(河南科技大学 林学院,河南 洛阳 471003)

摘要:为获得桃多聚半乳糖醛酸酶(*PG*)基因启动子并分析调控元件,以桃品种大久保基因组 DNA 为模板,采用染色体步移技术克隆了 *PG* 基因的部分序列及其 5'侧翼区,并分析其调控元件组成。结果表明,克隆产物长 986 bp,3'侧翼序列与 GenBank 中的 *PG* 基因序列的 5'端部分序列同源性为 96%,登录号为 FJ940722。在 789~839 bp 位置存在基础启动子序列,转录起始位点位于 828 bp 的碱基 C,其可能性为 0.98。除含有 CAAT-Box、TATA-Box 等基本启动子元件外,还存在众多参与光响应元件、干旱诱导 MYB 结合位点、水杨酸响应元件等应答激素和胁迫信号元件,表明 *PG* 基因的转录和表达可能受到激素、干旱、光照等外界环境的胁迫以及衰老的调控。

关键词:桃;多聚半乳糖醛酸酶;启动子;序列分析

中图分类号:S667.9;Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)06-0052-06

Cloning and Sequence Analysis of a Novel Promoter of Polygalacturonase Gene in *Pruns persica* (L.)

CHEN Di-xin, LI Yan-mei, GUO Guo-ning, CHI Hui, YANG Rui-juan, YANG Ying-jun

(College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: The objective of the study was to obtain the 5' flanking sequence of polygalacturonase gene from the genomic DNA of *Pruns persica* (L.) Batsch. Chromosome walking techniques and the software of PROMOTER PREDICTION and PLANT CARE online were used. The results showed that a novel promoter of *PG* gene was obtained, the length of it was 986 bp, alignment indicated that the sequence had 96% homology with that of the polygalacturonase gene. The core promoter regions and some upstream regulatory elements in this fragment were analyzed. Transcriptional start site (TSS) was C. The sequence of *PG* gene promoter contained several specific acting elements, They were TATA-box, CAAT-box, light-responsive elements, drought-induced MYB binding sites, salicylic acid response elements, and other cis-elements. The accession number was FJ940722. The studying suggested that the expression of the novel promoter of *PG* gene could be regulated by hormone, drought, light and other factors.

Key words: *Pruns persica*; Polygalacturonase (PG); Promoter; Sequence analysis

桃(*Pruns persica* (L.) Batsch)是我国广泛栽培的水果种类之一,但鲜果不耐贮藏,采后极易软化,给贮藏和运输造成困难。研究表明,果实后熟和贮藏期间涉及诸多 mRNA 和蛋白质的表达,如 β -1,4-葡聚糖酶、多聚半乳糖醛酸酶(*PG*)等,其中 *PG* 是一种重要的水解酶类,导致茄、苹果、梨、猕猴桃、桃、瓜类等果实细胞壁结构解体,引起果实软化^[1-3]。

近 10 年来,有关 *PG* 基因的表达与调控机制研究日益得到重视,已经克隆了多种园艺植物的 *PG*

基因,构建了 *PG* 基因的表达载体^[4-18],这些进展为进一步阐明研究该基因的功能与调控机制创造了条件。

真核基因的表达和调控是植物基因工程研究的中心内容之一,作为转录水平上一种重要的调控元件启动子的研究成为分子生物学的热点^[19-22]。本研究以广泛种植的大久保为试验材料,在比对 *PG* 基因保守序列的基础上设计特异引物,采用染色体步移技术克隆该基因的启动子,为进一步深入认识

收稿日期:2014-10-08

基金项目:河南省教育厅重点项目(13A210873);洛阳市科技发展计划项目(1402011A)

作者简介:陈迪新(1975-),男,河南商城人,副教授,博士,主要从事果树学教学与研究。

通讯作者:杨英军(1968-),男,河南孟津人,教授,博士,主要从事园艺植物种质资源教学与研究。

PG 基因的功能、调控机制等提供线索和手段,并最终为通过基因工程技术选育耐贮运桃新品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

大久保桃叶片取自中国农业科学院郑州果树研究所。Genome Walking Kit、PCR 反应、片段克隆所需试剂和各种限制性内切酶均购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 仪器

SIGMA 台式冷冻离心机、Thermo-Forma 培养箱、Bio-Rad 水平电泳仪、BTS-20M 型凝胶成像分析系统、德国 Biometra 公司 Gradient Thermoblock 型 PCR 仪。

1.3 启动子克隆

1.3.1 总 DNA 提取、PCR 引物设计与启动子克隆

以桃幼嫩叶片为试材,改良 CTAB 法提取总 DNA。利用 DNAMAN、Primer Premier 5.0 等软件分析桃 *PG* 基因 cDNA 保守区序列,据此设计特异性引物 SP1、SP2、SP3。引物序列为:SP1:5'-GGTAATCCGACGGGGCCACAAG-3'; SP2:5'-TGGCTCCTAAAC TGGCCACATTG-3'; SP3:5'-TGTGACTGGAGTGGCT ATGGCTGAG-3'。Genome Walking 试剂盒提供上游接头引物。

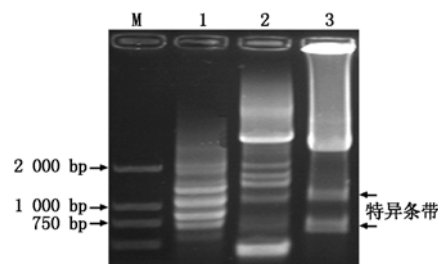
用 Tail-PCR 法获得目的条带。分子操作参照 Genome Walking、pGEM-T-easy 和 Wizard DNA clean up 试剂盒说明进行。重组质粒酶切鉴定纯化后,由大连宝生物公司测序。

1.3.2 序列的同源性搜索和顺式作用元件查找
序列同源性分析采用 BLASTn 软件完成,用 BANKIT 程序申请登录号,在 PlantCARE (<http://bioinformatics.Psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 和 PLACE (<http://www.Dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html>) 数据库进行转录起始位点、顺式作用元件查找和信息学分析。

2 结果与分析

2.1 启动子片段的克隆

经过第 1 次 PCR 扩增,结果发现在 250 ~ 2 000 bp 出现了较多的条带,扩增特异性较差;经过第 2、3 次 PCR 扩增,条带特异性逐渐增强,在第 3 次 PCR 扩增中得到 2 条特异性较强的条带,分子大小在 1 000,700 bp 左右(图 1)。



M. 分子量标记;1. 第 1 次 PCR;2. 第 2 次 PCR;3. 第 3 次 PCR。
M. Marker DL2000;1. The first PCR;2. The second PCR;3. The third PCR.

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 The electrophoresis profile of PCR amplification products

1 000 bp 片段经回收、连接、鉴定和测序,实际为 986 bp,经过比对分析序列中存在设计的引物序列,长度与扩增结果吻合。

为判断该产物是否与 *PG* 基因相关,将 986 bp 序列登陆 NCBI,并进行 BLASTn 分析,结果发现序列的 3' 端与已报道的桃 *PG* 基因序列的 5' 端部分同源率达 96%,而长 906 bp 的 5' 端序列在 GenBank 数据库中没有同源片段(图 2),表明该片段是桃 *PG* 基因 5' 端侧翼序列,递交 GenBank 数据库,登录号为 FJ940722,序列的碱基组成见图 3。

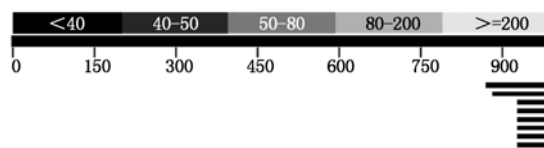


图 2 克隆的片段与 GenBank 数据库同源片段比对结果

Fig. 2 The alignment result of clonal fragment and the homologous fragment in GenBank

2.2 序列分析

对获得的 *PG* 基因启动子进行转录起始位点预测,发现在 789 ~ 839 bp 位置存在基础启动子区,其序列组成为:5'-TTCAAAGCTATAAATAACCCCTCAAACCATTCACCTTTCCCACCACCACT-3';转录起始位点为位于 828 bp 处的碱基 C,其可能性为 0.98。

对序列进行在线 PLACE 软件分析。结果显示,该序列具有真核生物典型启动子结构特征,将转录起始密码子位点 C 定义为 +1,在上游正链、负链不同位置上分别存在着 6 个 TATA-box,9 个 CAAT-box 等基本启动子元件,其中正链上,TATA-box 位于 -33, -724, -773 处;CAAT-box 位于 -268, -400, -480, -847 处;GATA-box 位于 -150, -741 处,TATA-box 为 RNA 聚合酶 II 识别位点,与 CAAT-box 同样是真核基因启动子的上游调控元件,能够提高启动子的转录活性,这与典型的基因启动子作用调控元件完全一致,因此确定该序列为基因的启动子(图 3)。

-827 TGGAGACCGC CGGAGAGTAC A**CAAT**GGCTA AGTTTTATTG TTTCTTCCTT ATGTTTTTGT TTATGTCAAA TTCTATGATT
CAATBOX1

-747 ATGTGTAACT AATT**TTATT** GCTAGGGGCA TGATGTATGC CTAGTAT**GAT A**ATCTAGTTT TCC**TTATT** ACCTATCTAT
TATABOX5 GATABOX TATABOX5

-667 TGATTGCAGT TTGAITTAG AITCTTAATC ACTGTGCTTA GTACCTIAGT TGATTIACCT TGATGCTTGA TCACCAITCTA

-587 GACTTTTAAC TGAGTTAATC GGATGCGAAT TAGAGTAAAT ACCATACTTA ATTTGAGGTT TGCITCTTGT GATTAGAATT

-507 TGTAATTGT CTAAAGTAA TACCATACTC CTAGAATTA CATGCTTGT GGAGGTTTC ACTGATT**CA AT**ATTITCCC
CAATBOX1

-427 GACATGTGAT GCCAACAACG TAGATGTTTC AATGTTTCAC TATGGAAG**CA AT**CACGTAAG GATTAACATG GCAGGGCATC
CAATBOX1

-347 AGACATGAGAACTAAGAAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG ACTTGCCATT CAAGCAAGAG AAGGCCATAA CACTATATAG

-267 **CAAT**AGCACC GTAAATAAG ATGCAAAGAA TGAGGGGGTC ATGTTTTCAA GTACCAAAAC ACGCAAGGC ATTTTGTTAA
CAATBOX1

-187 AGTACATCTG AAAATAAATC AAGGCAAGCA AAGCCGTA**GA TA**TCCTCTTC CTGCTACACA TAGTATTAGC CTACGTAAGG
GATABOX

-107 TCACTACGGC GCCGTTTCCC TTTTAATTG GCGTAGTCA ACTCATCATC CACCCAAGTT CAITTC**GTTT AAAGCTATAA**
TATABOX2

-27 **ATAACCCCTC AAACCATTCA ACTTCC****CAC CACCACT**CCT CACTCCTCA ACTCATTAAC CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT

54 CTCTCTCTCT CTCTCTCATC CGCAA**ATG**GC GAACCGTAGA AGCCTCTTTT CTCTCTCACT TATCTTTGTG TTCATGATCA

134 **ACTCAGCCAT AGCCACTCCA GTCACA**

下划线为预测的基础启动子序列;较大的黑体字母为预测的转录起始位点;方框内为 TATA-BOX、CAAT-BOX 等元件和翻译起始密码子 ATG;阴影部分为 *PG* 基因部分序列。

Base promoter sequence is signed by the double underline;The black and large letter is transcriptional start site;TATA-BOX,CAAT-BOX and start code ATG are signed by frames;The shadow area is a part sequence of *PG* gene.

图3 桃 *PG* 基因启动子测序结果及分析

Fig.3 The sequence and its analysis of *PG* gene promoter from peach

分析还发现,序列还含有众多应答激素、胁迫和光响应的元件(表1)。在应答激素元件中,如响应水杨酸的调控元件 GTICONSENSUS(GRWAAW)8个拷贝,应答 ABA 的元件 ABRELATERD1(ACGTG)1个拷贝,响应赤霉素调节元件 CAREOSREP1(CAACTC)2个拷贝,响应细胞分裂素元件 ARRIAT(NGATT)拷贝12个,响应赤霉素元件 WRKY71OS(TGAC)拷贝3个。应答胁迫信号的元件中,有应答黄化、脱水、衰老的 ACGTATERDL(ACGT)元件和 MYBIAT、MYB2AT、MYB2CONSENSUSAT、MYBCORE、MYCCO-

NSENSUSAT等14个元件以及1个拷贝的响应低温诱导表达结合位点 MYB2CONSENSUSAT。应答光响应的元件中,有 EBOXBNNAPA(CANNTG)4个拷贝,GTICONSENSUS(GRWAAW)8个拷贝,GTICORE(GT1-motif)、IBOXCORE各1个拷贝。这些多拷贝的顺式作用元件可能与核蛋白等反式因子相互作用而表现其特异性,序列中具有各种响应元件说明桃 *PG* 基因的表达可能受到多种逆境胁迫、激素的诱导。

表1 PLACE 软件分析启动子区域序列

Tab.1 Sequence analysis of the promoter region of polygalacturonase by PLACE

调控元件 Cis-elements	拷贝数 Copy number	核心序列 Core sequence	功能注释 Function
ABRELATERD1	1	ACGTG	拟南芥中 ABA 响应元件
ACGTABOX	2	TACGTA	
ACGTATERDL	6	ACGT	拟南芥中黄化、脱水、衰老的诱导元件
ANAERO1 CONSENSUS	1	AAACAAA	
ARRIAT	12	NGATT	拟南芥和水稻中细胞分裂素响应元件
BIHD1OS	1	TGTCA	
BOXIINTPATPB	1	ATAGAA	
C1MOTIFZMBZ2	2	TAACTSAAGTTA	
CAATBOX1	9	CAAT	控制基因转录起始频率和与增强子关联的重要启动子元件
CACTFTPPCAL	17	YACT	调控 C4 植物的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因在叶肉特异性表达的启动子顺式调控元件

续表 1:

调控元件 Cis-elements	拷贝数 Copy number	核心序列 Core sequence	功能注释 Function
CAREOSREP1	2	CAACTC	赤霉素调节相关元件
CCAATBOX1	1	CCAAT	热激响应;控制基因转录起始频率的重要元件
CPBCSPOR	2	TATTAG	
CTRMCA MV35S	22	TCTCTCTCT	
CURECORECR	8	GTAC	铜响应元件
DOFCOREZM	8	AAAG	碳代谢,玉米中 Dof 蛋白结合位点
EBOXBNNAPA	4	CANNTG	<i>NapA</i> 种子贮藏蛋白基因,光响应元件和组织特异性表达的元件
EECCRAHI	2	GANTTNC	
GAGA8HVBKN3	15	GAGAGAGAG AGAGAGA	
GAGAGMGSA1	13	GAGAGAGAG AGAGAGAGA	
GATABOX	4	GATA	组织特异性启动子和增强子元件
GTICONSENSUS	8	GRWAAW	光调节元件、SA 诱导元件
GT1CORE(GT1-motif)	1	GGTTAA	光应答相关元件
GTGANTG10	9	GTGA	烟草花粉基因 <i>G10</i> 的上游调控元件
IBOXCORE	1	GATAA	单子叶植物和双子叶植物光调控基因上游保守元件
INRNTPSADB	3	YTCANTYY	烟草 <i>PsadB</i> 基因光响应元件
LTRECOREATCOR15	1	CCGAC	
MYB1AT	1	WAACCA	脱水、涝害、ABA 胁迫响应元件
MYB2AT	1	TAACTG	拟南芥脱水胁迫响应元件
MYB2CONSENSUSAT	1	YAACKG	低温诱导拟南芥 <i>CBF</i> 基因表达结合位点;脱水、涝害、ABA 响应元件
MYBCORE	1	CNGTTR	脱水、涝害、ABA、黄酮类化合物响应元件
MYBCOREATCYCB1	1	AACGG	
MYBST1	1	GGATA	
MYCATERD1	1	CATGTG	
MYCATRD22	1	CACATG	
MYCCONSENSUSAT	4	CANNTG	MYC 识别位点或 ICE1 结合位点;脱水、寒冷、盐诱导、ABA 响应元件
NAPINMOTIFBN	2	TACACAT	可能参与种子贮藏蛋白特异性转录激活
NODCON2GM	3	CTCTT	大豆 <i>Ibc3</i> 基因和 <i>N23</i> 基因启动子顺式调控元件
NTBBF1ARROLB	2	ACTTTA	
OSE2ROOTNODULE	3	CTCTT	蚕豆中调控血红蛋白基因 <i>Vjlb29</i> 在被感染的根瘤细胞中特异表达的启动子元件
POLASIG1	3	AATAAA	
POLASIG2	1	AATTA AA	
POLLEN1LELAT52	2	AGAAA	激活番茄花粉特异性 <i>LAT52</i> 基因启动子元件
PREATPRODH	2	ACTCAT	
PRECONSCRHSP70A	1	SCGAYNRNNNNN NNNNNNNNNHD	
PROLAMINBOXOS- GLUB1	1	TGCAAAG	
PYRIMIDINEBOXOS- RAMY1A	1	CCTTTT	
QELEMENTZMZM13	1	AGGTCA	
RAV1AAT	2	CAACA	
RHERPATEXPA7	1	KCACGW	
ROOTMOTIFTAPOX1	2	ATATT	<i>rolD</i> 基因启动子元件、根特异性元件
S1FBOXSORPS1L21	2	ATGCTA	
S1FSORPL21	2	ATGCTATT	
SEF4MOTIFGM7S	1	RTTTTTR	
SORLIP5AT	1	GAGTGAG	
SURECOREATSULTR11	2	GAGAC	硫响应元件
TAAAGSTKST1	2	TAAAG	
TATABOX2	1	T ATAAAT	-30 处基因启动转录核心元件, RNA 聚合酶 II 识别位点
TATABOX5	5	TTATTT	
WBOXATNPR1	1	TTGAC	
WBOXNTERF3	2	TGACY	ERF3, 伤诱导元件
WRKY71OS	3	TGAC	GA 响应元件、抑制子元件

3 讨论

真核生物基因结构特点之一是基因的 5'-UTR 常含有一些重要的调控元件,这对基因表达有非常重要的调节作用。启动子含有重要的顺式作用元件在基因转录调控方面占有重要的地位,一些反式作用因子通过与特定顺式作用元件相结合来调控下游基因的表达,从而使植物能够对各种刺激信号产生响应,应对各种生物和非生物因素的影响。

PG 的表达促使果肉细胞的解体而导致果实软化,目前多种 PG 基因及调控序列已被研究^[6-18]。本研究采用热不对称交错 PCR 原理的染色体步移技术,获得桃 PG 基因上游 906 bp 调控序列,分析该序列具有典型的启动子结构,并有激素调节相关元件、胁迫调节相关元件和光响应相关的调控元件。

据报道,EBOXBNNAPA 既是光响应元件又是种子特异性序列元件,可调节异源启动子的种子特异性激活^[23-24]。ACGTATERDL 元件是在脱水胁迫和黑暗的诱导下调控拟南芥 *erd1* 基因表达导致衰老的研究中发现的脱水胁迫和黑暗应答元件^[25]。在 PG 基因启动子序列中发现 4 个拷贝的 EBOXBNNAPA 元件和 6 个拷贝的 ACGTATERDL 元件表明该启动子可能在脱水胁迫和黑暗刺激下,调控 PG 基因表达将叶片接受的衰老信号传导到种子或果实中,从而启动了果肉细胞纤维素的分解。

值得注意的是,组织特异性元件 POLLENILELAT52 和 GTGANTG10 是花粉特性的转录顺式元件,与其他元件相比显得更为重要,果实的成熟是一特定的生理过程,需要很多酶参加其反应,这就更需要一些诸如花粉特异性激活的调控元件,保证其果实发育正常有效进行^[26-27]。

同时该序列与香蕉、银杏、花生、甘蔗、黄瓜、棉花^[28-35]等基因启动子序列有许多相似的调控元件,如光响应元件、干旱诱导 MYB 结合位点等,说明植物启动子序列均有一些共同的调控元件,但这些调控元件中哪个是桃 PG 基因关键受体调控顺式元件,其又如何调控受体基因的表达,目前尚未见相关报道。

在本研究中发现启动子中含有多个光、胁迫、激素应答元件,加之植物基因表达调控方式的复杂性,植物通过感知多种环境信号如光、温度和水分等来调节其自身的正常生长和发育,只有许多顺式元件协同作用才能使一个基因在特定的时空中表达,这些作用元件是否都发挥作用目前还不能完全确定,因此,后续研究将是构建含有启动子不同顺式元件

的植物表达载体,为下一步通过转基因鉴定启动子活性及各种调控元件的作用奠定基础。

综上所述,桃 PG 基因启动子的转录调控活性可能受到光信号及植物激素、脱落酸、干旱、水杨酸等多种信号途径的协同作用。该启动子的获得,为利用其介导转基因研究、提高外源基因表达量奠定了基础。

参考文献:

- [1] 薛炳烨,束怀瑞. 多聚半乳糖醛酸酶(PG)与果实成熟软化研究进展[J]. 山东农业大学学报:自然科学版, 2002,33(2):252-256.
- [2] 张 嵩,张光伦,曾秀丽. 纤维素酶和多聚半乳糖醛酸酶与果实成熟[J]. 果树学报,2005,22(5):532-536.
- [3] 阚 娟,金昌海,汪志君,等. β -半乳糖苷酶及多聚半乳糖醛酸酶对桃果实成熟软化的影响[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2006,27(3):76-80.
- [4] 刘 乐,饶景萍,常晓晓. 柿果实多聚半乳糖醛酸酶基因克隆与序列分析[J]. 西北植物学报,2009,29(4):656-661.
- [5] 陈 鑫,李 唯,王旺田,等. 桃多聚半乳糖醛酸酶基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 生物技术通报,2009(6):96-99.
- [6] 寇晓虹. 番茄多聚半乳糖醛酸酶(PG)反义基因表达及相关功能研究[D]. 北京:中国农业大学,2003.
- [7] 梅 眉,陆 璐,赵长增,等. 甜瓜多聚半乳糖醛酸酶反义基因植物表达载体的构建[J]. 甘肃农业大学学报,2006,41(5):55-59.
- [8] 李红双,崔德才. 利用多聚半乳糖醛酸酶反义基因转化选育耐贮中国樱桃[J]. 生物技术通讯,2006,17(6):885-887.
- [9] 郝青南,马 超,马兵钢. 草莓多聚半乳糖醛酸酶基因 RNAi 植物表达载体的构建及表达鉴定[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2009,27(4):423-427.
- [10] 寇晓虹,罗云波,田慧琴,等. 多聚半乳糖醛酸酶(PG)反义基因转化加工番茄[J]. 食品科学,2007,28(3):187-191.
- [11] 许小勇,张丽华,吴正景,等. 加工番茄 PG 基因片段的 cDNA 克隆及表达载体构建[J]. 西北农业学报,2006,15(5):158-162.
- [12] 黄 鹂,曹家树,叶意群,等. 甘蓝花粉特异表达的多聚半乳糖醛酸酶基因 *BoMF9* 的克隆与特征分析[J]. 农业生物技术学报,2007,15(2):268-273.
- [13] 张 强,黄 鹂,曹家树. 白菜多聚半乳糖醛酸酶基因 *BcMF6* 的克隆、序列分析及其表达[J]. 园艺学报,2007,34(1):117-124.
- [14] 麻国升,王力荣,曹 珂,等. 桃 2 个 *endo*-PG 基因序列 SNPs 的遗传多样性及其与果实黏离核性状的关联分析[J]. 果树学报,2014,31(3):345-352.

- [15] 张亚林. 桃再生体系的优化与反义 *PG* 基因遗传转化的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [16] 李 慧, 丛 郁, 常有宏, 等. 翠冠梨 *PG* 基因家族两成员的克隆及其表达与货架期果实软化的关系[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 23 – 29.
- [17] 姜妮娜, 饶景萍, 付润山, 等. 柿果实采后软化中 *PG* 酶活性及其基因 *DkPG1* 的表达[J]. 园艺学报, 2010, 37(9): 1507 – 1512.
- [18] 王玉霞. 果实特异性启动子 *E8* 和桃反义 *PG* 基因的克隆及序列分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
- [19] 姜娜娜, 赵传志, 赵光敬, 等. 番茄果实特异性启动子的克隆与遗传转化研究[J]. 生物技术通报, 2012(1): 74 – 78.
- [20] 黄静丽, 牛俊奇, 朱 惠, 等. 甘蔗乙烯受体 *Sc-ERS* 启动子的克隆与序列分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(5): 722 – 729.
- [21] 李秋莉, 尹 辉, 李 丹, 等. 辽宁碱蓬胆碱单加氧酶 (*CMO*) 基因启动子分离及功能元件分析[J]. 遗传学报, 2007, 34(4): 355 – 361.
- [22] 郑洁红, 邱栋梁. 龙眼叶片中 *CHI* 和 *CHS* 基因启动子序列的克隆与分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(4): 167 – 171.
- [23] Kawagoe Y, Murai N. Four distinct nuclear proteins recognize in vitro the proximal promoter of the bean seed storage protein P-phaseolin gene conferring spatial and temporal control[J]. Plant J, 1992, 2: 927 – 936.
- [24] 财音青格乐, 李明春, 蔡 易, 等. 大豆种子特异性启动子的克隆及序列分析[J]. 作物学报, 2005, 31(1): 11 – 17.
- [25] Simpson S D, Nakashima K, Narusaka Y, et al. Two different novel cis-acting elements of *erdl*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence [J]. The Plant Journal, 2003, 33(2): 259 – 270.
- [26] Rogers H J, Bate N, Combe J, et al. Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *G10* [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 45(5): 577 – 585.
- [27] Filichkin S A, Leonard J M, Monteros A, et al. A novel endo-beta-mannanase gene in tomato *LEMAN5* is associated with anther and pollen development [J]. Plant Physiol, 2004, 134: 1080 – 1087.
- [28] 刘德兵, 魏军亚, 李 飞, 等. 香蕉 *rbcS* 基因启动子的克隆及序列分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(2): 237 – 242.
- [29] 李琳玲, 程 华, 程水源, 等. 银杏查尔酮合成酶基因启动子 (*GbcHsP*) 调控元件及功能分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(12): 1919 – 1928.
- [30] 温世杰, 谢纯政, 李 玲, 等. 花生 *ARAb-PR10* 基因启动子序列的克隆及分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(1): 57 – 62.
- [31] 吴自明, 江安庆, 张积森, 等. 甘蔗 *ShSUT4* 基因及其 5'侧翼序列的克隆与序列分析[J]. 亚热带农业研究, 2012, 8(2): 126 – 130.
- [32] 王奎山. 黄瓜 α -半乳糖苷酶基因启动子的克隆及序列分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
- [33] 廖文彬, 崔百明, 温 玮, 等. 赤霉素负调控因子 *GhRGL* (*RGL-LIKE*) 基因序列与功能预测分析[J]. 热带作物学报, 2009, 30(2): 170 – 175.
- [34] 于晓玲, 崔百明, 温 玮, 等. 棉花 *Gbl2* 启动子克隆及表达分析[J]. 热带作物学报, 2010, 31(8): 1272 – 1279.
- [35] 温 玮, 崔百明, 于晓玲, 等. 棉花 *DELLA* 蛋白基因 *GhGAL3* 和 *GhGAL4* 启动子的克隆及序列分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(6): 1055 – 1063.