

玉米 *ZmMYB59* 基因启动子的克隆及功能分析

叶浩田 郑美霞 孙彩霞 赵光武*

(浙江农林大学 农业与食品科学学院/浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室,浙江 临安 311300)

摘要 为研究 *ZmMYB59* 基因启动子的表达模式,以玉米自交系‘B73’幼苗基因组 DNA 为模板,克隆 *ZmMYB59* 基因 2 个启动子片段分别命名为 *MYB59-P-1*、*MYB59-P-2*,构建 GUS 植物表达载体 *pCXGUS-MYB-1K*、*pCXGUS-MYB-2K*,并通过农杆菌介导法转化水稻‘日本晴’获得 GUS 植物表达载体转基因植株。通过 PlantCARE 软件进行生物信息学分析,发现 *ZmMYB59* 基因启动子中具有 ABRE 和 CCGTCC-box 等重要的顺式作用元件。GUS 染色结果显示:1) *pCXGUS-MYB-1K* 的种子没有着色,表明其未驱动 GUS 在种子中表达, *pCXGUS-MYB-2K* 的种子胚乳边缘着色,表明其驱动的 GUS 在种子胚乳边缘表达;2) 种子萌发期 *pCXGUS-MYB-1K* 只有芽尖着色,表明其仅驱动 GUS 在芽尖表达, *pCXGUS-MYB-2K* 芽尖和根均着色,芽尖着色较深,根维管束细胞少量着色,表明其驱动的 GUS 主要在芽尖表达,而在根部维管束组织中表达较弱;3) 苗期 *pCXGUS-MYB-1K*、*pCXGUS-MYB-2K* 植株的根、茎、叶均能着色,但后者着色较深,表明 *ZmMYB59* 基因的启动子可能是组成型启动子,同时也说明 *MYB59-P-1* 是启动子发挥正常调控功能所必须的,但启动能力不强,推测 *MYB59-P-2* 中可能存在增强启动子表达的顺式作用元件。

关键词 玉米; 启动子; GUS 染色; 转化; 元件; 功能分析

中图分类号 S513

文章编号 1007-4333(2019)04-0023-08

文献标志码 A

Cloning and functional analysis for the promoter of *ZmMYB59* gene from maize (*Zea mays* L.)

YE Haotian, ZHENG Meixia, SUN Caixia, ZHAO Guangwu*

(College of Agriculture and Food Science/Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

Abstract To explore the expression pattern of the promoter of *ZmMYB59* gene, two promoter fragments of *ZmMYB59* gene, *MYB59-P-1* and *MYB59-P-2*, were cloned by using genomic DNA of ‘B73’ as template in this study, respectively. *pCXGUS-MYB-1K*, *pCXGUS-MYB-2K* expression vectors were then constructed by using *MYB59-P-1* and *MYB59-P-2* to drive *GUS* gene expression, respectively. Bioinformatics analysis was carried out by using PlantCARE software, and the result showed that the *ZmMYB59* gene promoter contains important cis-acting elements such as ABRE and CCGTCC-box. GUS staining was performed on germinated seeds, and seedling roots, stems and leaves in the T₁ generation plants transformed with *pCXGUS-MYB-1K* or *pCXGUS-MYB-2K*. In seeds, no GUS staining signal was observed in *pCXGUS-MYB-1K* transformed lines, which indicated that it didn't drive GUS expression in seeds. Some signal was observed in the endosperm edge of *pCXGUS-MYB-2K* transformed lines indicating that the promoter drove the expression of GUS in the endosperm of seeds edge. During germination period, the GUS activity could be detected

收稿日期: 2019-06-01

基金项目: 国家重点研发计划“七大农作物育种”重点专项(2018YFD0100900);国家自然科学基金(31371712);浙江省自然科学基金(LY18C130001);浙江省农业(粮食)新品种选育重大科技专项(2016C02050-9-5);浙江农林大学大学生科研训练项目(KX20180015)

第一作者: 叶浩田, 硕士研究生, E-mail:412591167@qq.com

通讯作者: 赵光武, 教授, 主要从事玉米遗传育种研究, E-mail:gwuzhao@126.com

only in shoot tips in pCXGUS-MYB-1K test, which indicated that pCXGUS-MYB-1K only drove GUS expression in shoot tips, while the GUS expression was observed in pCXGUS-MYB-2K test with weak signal in roots and strong signal in shoot tips indicating that it mainly drove the GUS expression in shoot tips. At seedling stage, the GUS activity could be detected in roots, stems, leaves of pCXGUS-MYB-1K and pCXGUS-MYB-2k. And in the pCXGUS-MYB-2k test stronger expression was observed, indicating that the promoter of *ZmMYB59* gene is constitutive promoter, and it also indicates that *MYB59-P-1* is required for the normal regulatory function of the promoter, but the promoter ability is not strong, it is speculated that there may be cis-acting elements in *MYB59-P-2* that enhance the expression of promoter.

Keywords maize; promoter; GUS staining; transformation; element; function analysis

MYB 转录因子参与植物的生长发育、激素信号转导、代谢产物的合成及逆境胁迫应答反应^[1-4]。前期研究发现,MYB 家族基因在玉米种子顶土萌发过程中受深播和 GA 大量诱导,是表达基因数最多的转录因子家族,其中 *ZmMYB59* 基因表达下调倍数最高^[5]。因此,预测该基因可能抑制玉米种子顶土萌发的能力。

启动子是基因转录的调控中心^[6],不仅拥有 CAAT-box、TATA-box 等基本作用原件,还存在某些响应逆境胁迫的顺式作用元件,所以基因表达调控研究的基础是启动子的功能分析^[7]。研究 *ZmMYB59* 基因启动子的顺式作用元件既可从分子水平探讨与种子顶土萌发性状相关基因表达的机制,又可通过构建该启动子和 GUS 的融合基因,在水稻中研究该启动子在根、茎和叶中的表达^[8]。目前与玉米种子顶土能力相关的关键基因的研究尚未见报道,本研究对玉米 *ZmMYB59* 基因启动子序列进行有目的的缺失,应用 PCR 技术分别克隆 *ZmMYB59* 基因启动子的不同片段,分别连接 GUS 报告基因,通过农杆菌介导法转化到水稻中,检测水稻根、茎和叶中的 GUS 活性来初步确定启动子的功能区域^[9],旨在阐明 *ZmMYB59* 基因启动子的功能及其作用方式,以期对玉米遗传改良提供新的策略和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

ZmMYB59 基因启动子克隆所使用的植物材料为玉米自交系‘B73’,种子由本实验室扩繁后,−4 °C 保存备用,遗传转化使用水稻材料是‘日本晴’。

pMD18-T 克隆载体、ExTaq、T4 连接酶、dNTP 混合物、DL10 000TM DNA marker 均购自 Takara 公司,DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、100%的乙醇、氯仿和异丙醇等其他试剂购自上海生工生物工程股份有限公司,PCR 引物合成和

DNA 序列测定由上海擎科生物科技有限公司完成^[10]。

1.2 *ZmMYB59* 基因启动子的克隆及序列分析

通过 CTAB 法从玉米自交系‘B73’幼苗组织中提取基因组 DNA^[11],利用 primer 5.0 软件设计引物 (*MYB59-P-1-F*: ATACATGGTTTGTGATTCTGAAT; *MYB59-P-1-R*: GTTACTACCACACTAACGTTG; *MYB59-P-2-F*: CACAATGTGGACTGCAGCAC; *MYB59-P-2-R*: GTTACTACCACTAACGTTG)。

以玉米基因组 DNA 为模板 PCR 扩增启动子序列,20 μL PCR 反应体系为:PCR 预混液 10 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、基因组 DNA 1 μL、ddH₂O 7 μL;PCR 反应程序:95 °C 5 min;之后 95 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1.5 min,共 35 个循环;最后 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经检测并回收目的片段,目的片段和 pMD18-T 载体重组并转化大肠杆菌 *DH5α*,经检测为阳性克隆的菌液送上海擎科生物科技有限公司测序。使用 PlantCARE(<http://www.plantcare.co.uk/>)软件对 *ZmMYB59* 基因起始密码子前 2 000 bp 的序列进行分析,把 *ZmMYB59* 基因的 2 个启动子片段分别命名为 *MYB59-P-1*、*MYB59-P-2*。

1.3 pCXGUS-MYB-1K 和 pCXGUS-MYB-2K 植物表达载体的构建

将目的基因与 pCXGUS-P 载体连接,获得重组质粒分别命名为 pCXGUS-MYB-1K, pCXGUS-MYB-2K (图 1)。挑出重组质粒,转化农杆菌 EHA105 感受态细胞。参照苏军等^[12]的方法转化水稻‘日本晴’(图 2)。

1.4 转 pCXGUS-MYB-1K 和 pCXGUS-MYB-2K 基因水稻阳性植株的鉴定

获得转基因苗后进行 PCR 分子鉴定:以转基因水稻叶片 DNA 为模板,利用启动子 pCXGUS-MYB-1K、pCXGUS-MYB-2K 上游引物及 GUS 下

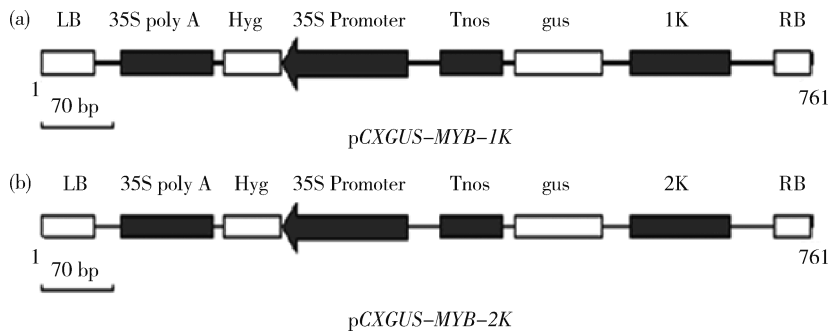
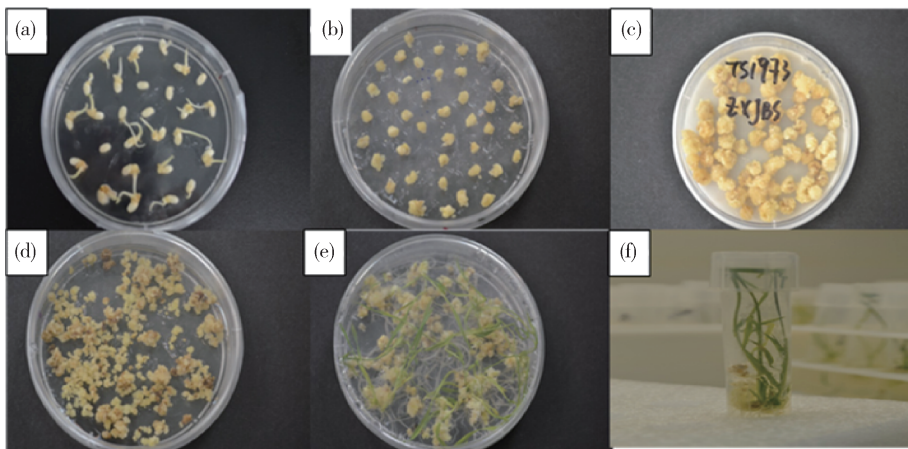


图1 启动子片段 *pCXGUS-MYB-1K* (a) 和 *pCXGUS-MYB-2K* (b) 的载体构建图

Fig. 1 Vector construction maps of the promoter fragments *pCXGUS-MYB-1K* (a) and *pCXGUS-MYB-2K* (b)



(a) 为诱导第7天; (b) 为愈伤继代培养; (c) 为农杆菌 EHA105 与目的基因共培养 2 d; (d) 为筛选第 21 天; (e) 为分化第 25 天; (f) 为 28~30 °C 生根培养。

(a) Induction at 7th day; (b) Subculture of callus; (c) Co-culture with *Agrobacterium* EHA105 containing the target gene for 2 d under dark condition at 28 °C; (d) Screening at 21st day; (e) Differentiation at 25th day; (f) Rooting culture at 28–30 °C.

图2 *pCXGUS-MYB-1K* 和 *pCXGUS-MYB-2K* 水稻的转化

Fig. 2 Rice transformation with *pCXGUS-MYB-1K* and *pCXGUS-MYB-2K*

游引物 5' GTTGCCCGCTTCGAAACCAATG 3' 进行 PCR。反应程序是 95 °C 5 min; 之后 95 °C 30 s, 55 °C 30 s; 72 °C (1 kb/90 s, 2 kb/150 s) 共 30 个循环; 最后 72 °C 10 min^[13]。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物^[14]。

1.5 转基因水稻 GUS 组织化学染色

分别取 T₁ 代转基因阳性水稻的种子, T₁ 代转基因阳性水稻的萌发期水稻幼苗和苗期的根、茎和叶, 参照 Jefferson 等^[15] 的方法进行 GUS 染色, 照相并记录。

2 结果与分析

2.1 *ZmMYB59* 基因启动子片段的克隆

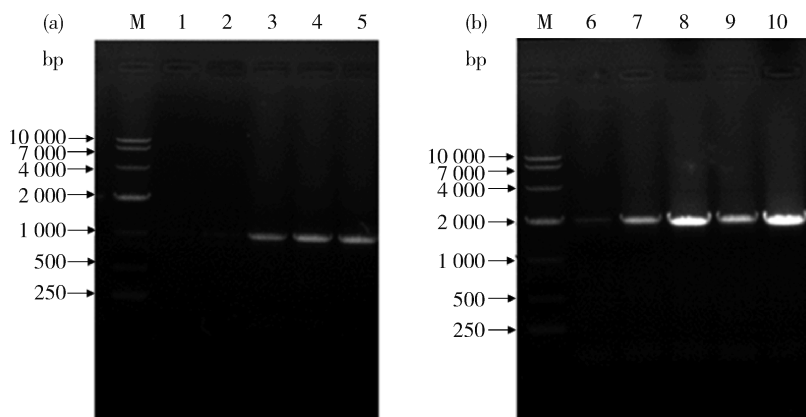
图 3 可知, 3、4、5 号样品获得 1 000 bp 的条带, 为启动子 *MYB59-P-1* 片段, 但 1、2 号样品未扩增

出启动子片段 *MYB59-P-1* (图 3(a)); 6~10 号均扩增出 2 000 bp 片段的条带, 为启动子 *MYB59-P-2* 片段 (图 3(b))。

分别选择 5 号和 10 号扩增片段测序后, 采用 DNAMAN 6.0 软件 (<http://xiazai.zol.com.cn/detail/38/374365.shtml>) 进行比对分析, 结果表明, 5 号和 10 号与 *MYB59-P-1* 和 *MYB59-P-2* 的序列完全一致。

2.2 启动子 *MYB59-P-1* 和 *MYB59-P-2* 的生物信息学分析

表 1 可知, 除与启动子 *MYB59-P-1* 和 *MYB59-P-2* 基本活性相关的 TATA Box 和 CAAT Box 以外, 还存在许多与激素响应相关的元件, 如响应 ABA 信号的 ABRE 元件; 响应水杨酸信号的 TCA-



M, DL10 000 分子量标准; 1~5, *MYB59-P-1* 片段; 6~10, *MYB59-P-2* 片段。

M, DL10 000 Marker; 1-5, fragments of *MYB59-P-1*; 6-10, fragments of *MYB59-P-2*.

图 3 *MYB59-P-1* (a) 和 *MYB59-P-2* (b) 电泳结果

Fig. 3 The electrophoresis results of *MYB59-P-1* (a) and *MYB59-P-2* (b)

表 1 启动子 *MYB59-P-1* 和 *MYB59-P-2* 中存在的顺式作用元件

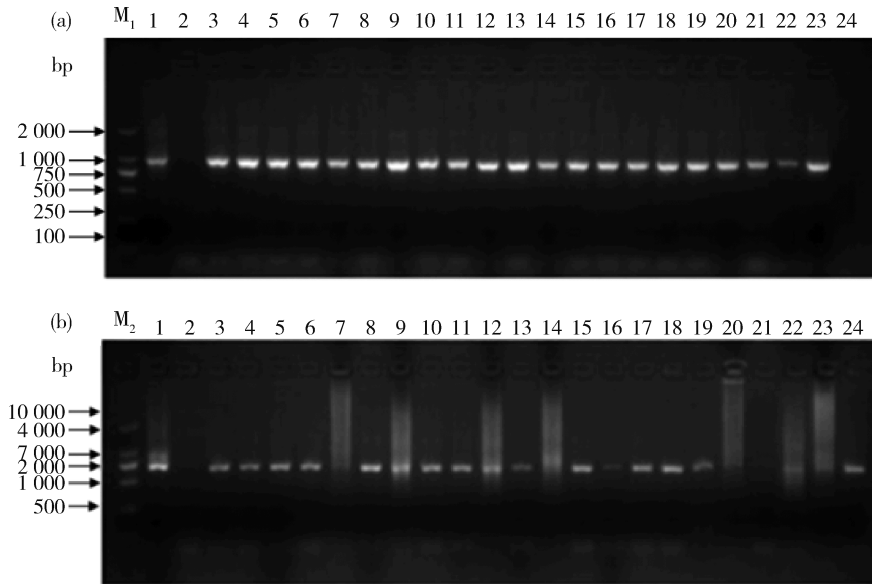
Table 1 The cis-acting elements existed in the promoter of *MYB59-P-1* and *MYB59-P-2*

顺势作用元件 Cis-acting element	DNA 序列 DNA sequence	出现次数 Frequency	位置 Position	生物学功能 Function
CAAT box	CAAT	29	-1 987, -1 489, -1 645, -1 138, -1 721, -1 238, -1 629, -1 087, -1 914, -1 393, -1 644, -1 110, -1 672, -1 146, -1 617, -1 086, -961, -407, -766, -107, -784, -240, -598, -377, -925, -188, -765, -777, -483	调控下游基因的转录起始及频率、增强 转录效率
ABRE	TACGTG	3	-1 183, -1 186, -1 182	响应 ABA 信号转导
GARE-motif	TCTGTTG	1	-1 132	与赤霉素响应有关
MBS	CAACTG	4	-1 345, -79, -731, -723	干旱诱导的 MYB 结合位点的元件
P-box	CCTTTTG	2	-1 201, -585	与赤霉素响应有关
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	2	-1 380, -307	参与抗病和胁迫调节
TCA-element	CAGAAAAGGA	1	-805	与水杨酸响应有关
TGACG-motif	TGACG	1	-284	可能参与到茉莉酸甲酯信号转导途径
CCGTCC-box	CCGTCC	1	-1 999	与分生组织特异性激活相关的顺式调控 元件
GCN4-motif	TGTGTCA	1	-1 726	与胚乳表达相关的顺式调控元件
O2-site	GATGACATGA	1	-1 083	参与玉米醇溶蛋白代谢调控的顺式调控 元件
CAT-box	GCCACT	2	-203, -163	与分生组织表达相关的顺式调控元件
HSE	AAAAAATTTT	1	-1 811	参与热应激反应的顺式作用元件

element 元件;响应赤霉素的作用元件 GARE-motif 和 P-box 元件;与茉莉酸甲酯信号途径相关的 TGACG-motif 元件;参与抗病和胁迫调节的 TC-rich repeats 元件;与分生组织特异性激活相关的 GCN4-motif 元件;参与玉米醇溶蛋白代谢调控的 O2-site 元件;与分生组织表达相关的 CAT-box 元件;参与热应激反应的 HSE 元件。此外,还发现 1 个受干旱诱导的 MYB 结合位点的 MBS 元件。

2.3 转 *pCXGUS-MYB-1K*、*pCXGUS-MYB-2K* 基因水稻的阳性鉴定结果

图 4 可知,转基因水稻幼苗和表达载体 *pCXGUS-MYB-1K*、*pCXGUS-MYB-2K* 质粒均能扩增到目标条带 *MYB59-P-1* 和 *MYB59-P-2*,而野生型水稻幼苗没有扩增到目标条带。结果表明,*ZmMYB59* 基因起始密码子上游 1 000 和 2 000 bp 已整合到转基因水稻基因组中。



M_1 , DL2 000 分子量标准; M_2 , DL10 000 分子量标准; 1, 阳性对照; 2, 阴性对照; 3-24, 转基因水稻阳性植株。

M_1 , DL2 000 Marker; M_2 , DL10 000 Marker; 1, positive control; 2, negative control; 3-24, transgenic rice positive plants.

图 4 *pCXGUS-MYB-1K*(a)和 *pCXGUS-MYB-2K*(b)转基因水稻 PCR 检测

Fig. 4 PCR testing of *pCXGUS-MYB-1K* (a) and *pCXGUS-MYB-2K* (b) transgenic rice

2.4 *pCXGUS-MYB-1K*、*pCXGUS-MYB-2K* 转基因水稻萌发期和苗期 GUS 染色分析

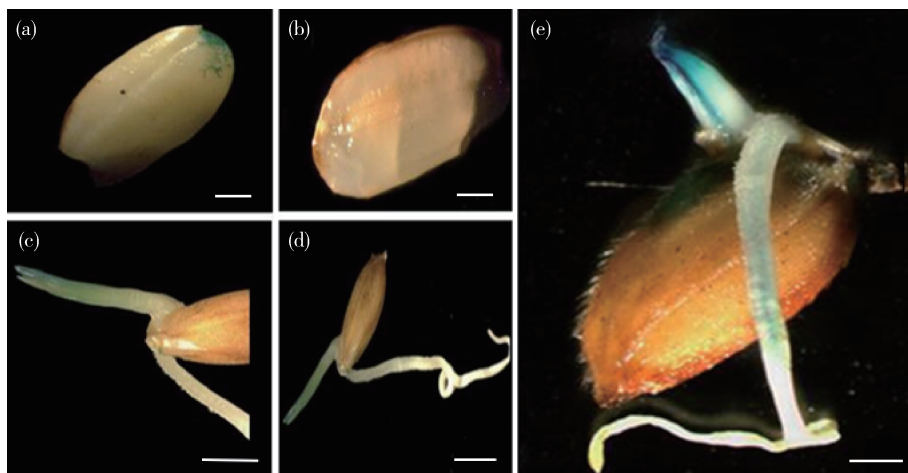
图 5 所示,*pCXGUS-MYB-1K* 转基因水稻的种子未着色,*pCXGUS-MYB-2K* 转化植株的种子胚乳边缘着色,表明 *pCXGUS-MYB-1K* 未驱动 GUS 在种子中表达,而 *pCXGUS-MYB-2K* 驱动的 GUS 在种子胚乳边缘表达;*pCXGUS-MYB-1K* 的转化植株种子萌发后仅有芽尖着色,表明其仅驱动 GUS 在芽尖部位表达,而 *pCXGUS-MYB-2K* 的转化植株的根与芽尖均有着色,根中维管束细胞着色较少,芽尖着色较深,表明 *pCXGUS-MYB-2K* 驱动的 GUS 主要在芽尖表达,而在根部维管束组织中表达较弱。

图 6 可知,*pCXGUS-MYB-1K*、*pCXGUS-MYB-2K* 植株的根、茎、叶均能着色,其中根部仅维管束细胞着色,后者的根、茎、叶着色均比前者深。推测

ZmMYB59 基因的启动子没有组织特异性,同时也说明起始密码子前 1 000 bp 序列是启动子发挥正常调控功能所必须的,且 2 000 bp 中可能存在增强启动子表达的顺式作用元件。

3 讨论与结论

启动子作为转录水平重要的调节方式备受关注,通过对启动子的研究可以预测基因启动子中重要的元件,还能由此对基因的表达模式进行研究。根据启动子中相关顺式作用元件的分布,将启动子划分为包含不同长度的缺失片段,并将缺失片段与带有 GUS 报告基因的植物表达载体融合,通过比较不同缺失片段启动报告基因表达的强弱及其在组织中的定位来鉴定启动子缺失片段的时空表达特性与启动子中相关顺式作用元件的作用^[16]。

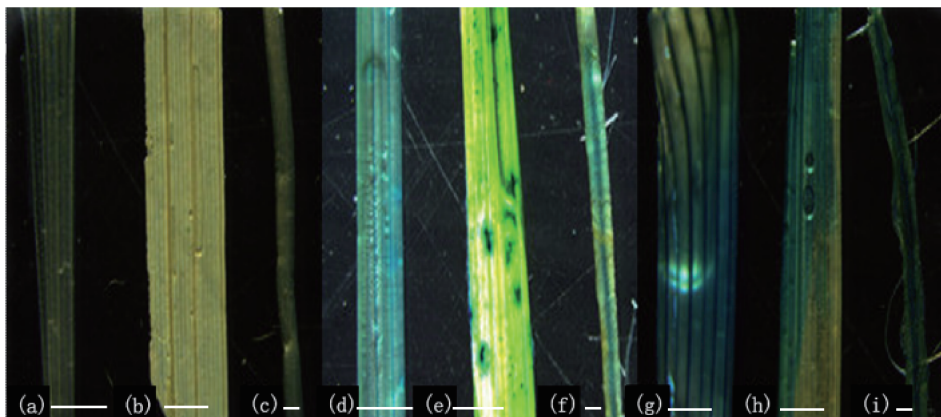


(a)和(e)分别为转 *pCXGUS-MYB-2K* 的 T_1 代种子,萌发期 GUS 组织化学染色结果;(b)~(d)为转 *pCXGUS-MYB-1K* 的 T_1 代种子,萌发期 GUS 组织化学染色结果。(a),(b),(e)的比例尺为 1 mm;(c)和(d)的比例尺为 2 mm。

(a) and (e) were T_1 generation seeds of *pCXGUS-MYB-2K*, GUS histochemical staining results at germination stage; (b)~(d), T_1 seeds of *pCXGUS-MYB-1K*, and GUS histochemical staining results at germination stage. The short white scale in (a), (b) and (e) represents 1 mm, and that in (c) and (d) represents 2 mm.

图 5 T_1 代转基因水稻的种子和萌发期各组织的 GUS 组织化学染色

Fig. 5 GUS staining for the different tissues and seeds of T_1 transgenic rice at germination stage



(a)~(c)依次为‘日本晴’野生型植株的茎、叶和根;(d)~(f)分别为 *pCXGUS-MYB-1K* 转化植株的茎、叶、根;(g)~(i)分别为 *pCXGUS-MYB-2K* 转化植株的水稻茎、叶、根。

(a),(b),(d),(e),(g),(h)的比例尺为 1 cm;(c),(f),(i)的比例尺为 1 mm。

(a)~(c) are the stems, leaves and roots of wild type plants; (d)~(f) and (g)~(i) are the stems, leaves and roots of *pCXGUS-MYB-1K* and *pCXGUS-MYB-2K* transformation plants, respectively.

The short white scale in (a), (b), (d), (e), (g) and (h) represents 1 cm, and that in (c), (f) and (i) represents 1 mm.

图 6 T_1 代转基因水稻苗期各组织的 GUS 组织化学染色

Fig. 6 GUS staining for the different tissues of T_1 transgenic rice at seedling stage

孙永伟等^[17]利用启动子缺失的方法发现响应外源激素 ABA 的应答元件在启动子序列 660~2 000 bp。大豆 *rbcS*^[18]基因启动活性最高的是长度为 712 bp 的启动子,长度为 1 089 bp 的 *rbcS* 基因启动子含有光诱导元件并且还有组织特异表达特性。PGHNBS^[19]启动子的调控元件中,-1 071~

-959 bp 区域存在韧皮部特异表达元件,增强子元件位于-1 559~-1 420 bp。

本研究发现 *pCXGUS-MYB-1K* 转化的 T_1 代种子未着色,*pCXGUS-MYB-2K* 转化的种子的胚乳边缘有着色。通过对 *MYB59-P-1* 和 *MYB59-P-2* 的生物信息学分析发现可能含有与胚乳表达相关的顺

式调控元件 GCN4-motif 有关,而调控模式需要进一步探究。叶荣建^[20]通过突变体研究发现顺式作用元件(GCN4-like motif)以负向调控元件身份来对 EnP3-292 胚乳特异表达模式进行调控。

pCXGUS-MYB-1K 转化材料的种子萌发期只有芽尖着色,pCXGUS-MYB-2K 转化材料的芽尖和根均着色,芽尖着色较深,根少量着色,并且 GUS 在 MYB59-P-2 的调控下表达量较高。苗期 pCXGUS-MYB-1K, pCXGUS-MYB-2K 植株的根、茎、叶均能染色,推测 *ZmMYB59* 基因的启动子没有组织特异性,同时也说明起始密码子前 1 000 bp 是启动子发挥正常调控功能所必须的;而后的根、茎、叶染色均比前者深,说明起始密码子前 1 000 bp 启动能力不强,推测前 2 000 bp 中可能存在增强启动子表达的顺式作用元件。

综上所述,MYB59-P-1 在种子中没有启动功能,在萌发期和苗期启动功能不强,在萌发期仅芽尖处发挥功能,而在苗期根、茎和叶中均有调控功能;表明 MYB59-P-1 在调控种子萌发时存在时空差异表达。启动子的高效表达需要多个顺式作用元件的协同及相互作用。通过对 MYB59-P-1 和 MYB59-P-2 的生物信息学分析,发现 MYB59-P-2 中存在大量的脱落酸应答元件(ABRE)、与赤霉素响应有关的顺式作用元件(GARE-motif)、与分生组织特异性激活相关的顺式调控元件(CCGTCC-box)、与胚乳表达相关的顺式调控元件(GCN4-motif)、参与热应激反应的顺式作用元件(HSE)、参与玉米醇溶蛋白代谢调控的顺式调控元件(O2-site),本研究推测 *ZmMYB59* 基因的启动子是组成型启动子。组成型启动子的调控不受外界条件的影响,所启动基因的表达具有持续性,可显著地提高外源基因在植物组织中的表达量,特别是在叶片和茎中,但不具备时空特异性。明确 *ZmMYB59* 基因的启动子类型,有利于后期更好地研究该基因的时空表达模式。

参考文献 References

[1] Guo H Y, Wang L Q, Yang C P, Zhang Y M, Zhang C R, Wang C. Identification of novel cis-elements bound by *BpMYB46* involved in abiotic stress responses and secondary wall deposition[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(10): 1000-1014

[2] Li W B, Ding Z H, Ruan M B, Yu X L, Peng M, Liu Y F.

Kiwifruit R2R3-MYB transcription factors and contribution of the novel *AcMYB75* to red kiwifruit anthocyanin biosynthesis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16861

[3] Sun M, Feng X X, Gao J J, Peng R H, Yao Q H, Wang L J. *VvMYBA6* in the promotion of anthocyanin biosynthesis and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2017, 11(5): 299-314

[4] Huang W, Lv H Y, Wang Y. Functional characterization of a novel R2R3-MYB transcription factor modulating the flavonoid biosynthetic pathway from *Epimedium sagittatum*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017(8): 1274

[5] 赵光武. 玉米耐深播特性的生理机理及其基因定位[D]. 北京: 中国农业大学, 2007

Zhao G W. Physiological mechanism and gene mapping of the trait with deep seeding tolerance in maize (*Zea mays* L)[D]. Beijing: China Agricultural University, 2007

[6] 雒雅婧, 李杰, 张爽, 杜克久. 植物启动子研究进展[J]. 北方园艺, 2015(22): 186-189

Luo Y J, Li J, Zhang S, Du K J. Research progress on plant promoter[J]. *Northern Horticulture*, 2015(22): 186-189 (in Chinese)

[7] 李田, 孙景宽, 刘京涛. 植物启动子研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 18-25

Li T, Sun J K, Liu J T. Research progress on plant promoter[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(2): 18-25 (in Chinese)

[8] 孙双燕, 徐小龙, 李建粤. 水稻种子蜡质基因表达分析[J]. 种子, 2018, 37(11): 35-40

Sun S Y, Xu X L, Li J E. Analysis of waxy gene expression in rice seeds[J]. *Seed*, 2018, 37(11): 35-40 (in Chinese)

[9] 韩法营. 水稻开花基因 *OsMADS-BOX59* 与 *OsTFL2* 初步研究[D]. 南宁: 广西大学, 2015

Han F Y. The preliminary study on rice flowering association genes *OsMADS-BOX59* and *OsTFL2*[D]. Nanning: Guangxi University, 2015 (in Chinese)

[10] 武莹, 李威, 祝传书, 王永宏, 张兴. 雷公藤 *hmgr* 基因克隆、序列分析及诱导表达[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(11): 103-111

Wu Y, Li W, Zhu C S, Wang Y H, Zhang X. Characterization and expression of gene encoding *HMGR* from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Journal of Northwest A&F university: Natural Sciences Edition*, 2012, 40(11): 103-111 (in Chinese)

[11] 王超, 李昕荷, 张瑞芝, 韩悦, 齐波, 王玉成. 刚毛柽柳水道蛋白 *ThPIP* 基因启动子的克隆及其活性分析[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(24): 8095-8098

Wang C, Li X H, Zhang R Z, Han Y, Qi B, Wang Y C. Cloning and gus activity analysis of the promoter of *ThPIP* gene from *Tamarix hispida*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(24): 8095-8098 (in Chinese)

[12] 苏军, 胡昌泉, 翟红利, 颜静宛, 陈在杰, 王锋. 农杆菌介导水稻明恢 86 高效稳定转化体系的建立[J]. 福建农业学报,

- 2003(4): 209-213
- Su J, Hu C Q, Zhai H L, Yan J W, Chen Z J, Wang F. Establishment of a highly efficient and stable transforming system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in *indica* rice [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2003(4): 209-213 (in Chinese)
- [13] 萨如拉, 高聚林, 于晓芳, 胡树平. 玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19): 4082-4090
- Sa R L, Gao J L, Yu X F, Hu S P. Screening of low temperature maize stalk decomposition microorganism[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(19): 4082-4090 (in Chinese)
- [14] 杨浩萌, 薛哲勇, 赵乐, 漆小泉, 黄芳. 集胞藻 *sbtA* 基因具有提高水稻旗叶绿素含量及株高的功能[J]. 植物生理学报, 2013, 49(4): 351-356
- Yang H M, Xue Z Y, Zhao L, Qi X Q, Huang F. Increased chlorophyll content and plant height of transgenic rice expressing *sbtA* of *Synechocystis* sp PCC 6803[J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(4): 351-356 (in Chinese)
- [15] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(13): 3901-3907
- [16] 房孝良. 水稻种胚特异基因 *OsESG1* 及其启动子的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2012
- Fang X L. Studies on embryo-specific gene *OsESG1* and its promoter in rice[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2012 (in Chinese)
- [17] 孙永伟, 聂丽娜, 马有志, 徐兆师, 夏兰琴. 小麦穗发芽抗性相关 Vp1 基因启动子的分离及功能验证[J]. 作物学报, 2011, 37(10): 1743-1751
- Sun Y W, Nie L N, Ma Y Z, Xu Z S, Xia L Q. Cloning and functional analysis of Viviparous-1 promoter in wheat[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(10): 1743-1751 (in Chinese)
- [18] 崔喜艳, 陈众峰, 范贝, 韩琳, 刘晓庆, 董雅致, 张治安. 大豆 *rbcs* 基因启动子的克隆及在转基因烟草中的功能缺失分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2015, 43(5): 114-121, 128
- Cui X Y, Chen Z F, Fan B, Han L, Liu X Q, Dong Y Z, Zhang Z A. Cloning of *rbcs* gene promoter from glycine max and dysfunctional analysis in transgenic tobacco[J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2015, 43(5): 114-121, 128 (in Chinese)
- [19] 杨郁文, 张保龙, 陈天子, 高媛媛. 棉花 *PGHNBS* 启动子维管束特异表达元件的分离及功能研究[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6): 1223-1228
- Yang Y W, Zhang B L, Chen T Z, Gao Y Y. Isolation and functional analysis of the vascular bundle specific element of promoter *PGHNBS* in cotton[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 28(6): 1223-1228 (in Chinese)
- [20] 叶荣建. 水稻组织特异表达启动子的分离克隆、功能分析及应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012
- Ye R J. Isolation, functional characterization and application of the tissue specific expression promoter from rice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese)

责任编辑: 吕晓梅