

梁志强,孔德真,李辉玲,等.小拟南芥 *HDG12* 基因的克隆、生物信息学分析及植物表达载体的构建[J].江苏农业科学,2015,43(2):33-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.010

小拟南芥 *HDG12* 基因的克隆、生物信息学分析及植物表达载体的构建

梁志强,孔德真,李辉玲,裴娟,祝建波,王爱英

(石河子大学生命科学学院/农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832003)

摘要:以小拟南芥基因组 DNA 为模板,运用同源克隆法获得小拟南芥 *HDG12* 基因,命名为 *ApHDG12*。运用生物信息学方法,对 *ApHDG12* 基因的理化性质、保守序列、二级结构、亚细胞定位等进行了分析,并进行同源建模。经测序和生物信息学软件预测分析,结果显示,*ApHDG12* 基因由 10 个外显子和 9 个内含子组成,mRNA 长度为 2 064 bp,编码 687 个氨基酸,亚细胞定位于细胞核。系统进化树显示 *ApHDG12* 与 *Capsella rubella* 遗传距离最近,CDD 保守序列分析结果显示 *ApHDG12* 有 18~79 位的同源异型域和 206~436 位的 START 结构域,属于 HD-zip IV 类基因家族,同时构建了植物表达载体 pBI121; *HDG12* 转化到农杆菌 GV3101 中,为进一步研究基因功能奠定基础。

关键词:小拟南芥;*HDG12* 基因;克隆;生物信息学

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0033-05

全球正面临着水资源日益短缺的境况,由于旱造成的农作物减产及经济损失逐渐加剧,因此甄别利用具有耐旱性的基因,提高作物的耐旱性,发展生物节水农业,对于缓解水资源危机,保障国家的粮食安全、生态安全和可持续发展具有重要意义。

拟南芥 HD-zip IV 类基因家族有 16 个成员,其中大部分在植物表皮层中表达,控制表皮细胞的分化、色素的合成、表皮毛和根毛的发育^[1-2]。*GL2* 在表皮毛部位表达,控制种皮、根毛以及茎叶表皮毛的发育^[3];*ATML1* 和 *PDF2* 共同调节表皮的发育,若 *PDF2* 过量表达则影响花的形态以及开花时间^[4];*ANTHOCYANINLESS2* (*ANL2*) 控制表皮层花青素的积累^[5];*HDG11* 基因过量表达则会抑制表皮毛的分叉,且 *HDG11* 和 *HDG12* 基因共突变时这种现象更为明显^[1],*HDG11* 基因的过表达能够提高植物的耐旱性^[6]。前人针对 HD-zip 基因家族的研究结果表明,该家族内成员的功能较为复杂,在植物生长发育的过程中均发挥着重要作用,因此更深层次的研究其基因家族内成员的功能并加以合理利用具有十分重要的意义。

近年来,对拟南芥近缘种的研究已成为一个热点,而新疆是拟南芥近缘种的分布中心^[7],小拟南芥 (*Arabidopsis pumila*) 是双子叶模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的近缘种,为十字花科拟南芥属的短命植物,在适应新疆特殊干旱气候方面,小拟南芥表现出更为优异的适应特性^[8-9]。目前从小

拟南芥中克隆得到了一些抗逆基因,与拟南芥有较高的同源性,如黄先忠等利用同源克隆法克隆的 *ApCBF1* 和 *AtCBF1* 编码的氨基酸序列一致^[10];院海英等利用同源克隆法得到的 *ApNHX1* 与 *AtNHX1* 编码的氨基酸序列比对结果为 99%^[9];刘瑞娜等利用同源克隆法以 *AtHRD* 基因序列为模板设计同源引物克隆得到了小拟南芥 *ApHRD*^[11]。本研究以小拟南芥基因组 DNA 为模板,根据 NCBI 上 *HDG12* 基因序列设计同源引物,克隆得到了 *ApHDG12* 基因,并利用生物信息学软件及在线序列分析工具,对其进行结构与功能预测,以期为进一步开展的 *ApHDG12* 基因功能和作用机理研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小拟南芥种子由本实验室保存,种植于“营养土:蛭石=1:2”的培养土中,置于 20℃、16 h 光照、8 h 黑暗条件下培养。大肠杆菌 TOP10、农杆菌 GV3101, *Taq* DNA 聚合酶购自天根公司,PMD18-T simple vector kit、琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小拟南芥基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 优化法^[12]提取小拟南芥基因组 DNA。

1.2.2 小拟南芥 *ApHDG12* 克隆及测序 根据 NCBI 上已提交的拟南芥 *HDG12* 基因 (NM_101655.2) cDNA 序列,运用 Primer 5.0 设计同源引物 (F: 5'-AGTTGTGTGATGGTC-CAGAGTTAGC-3', R: 5'-GATTCCTTACACTCTTTCAG-GCAT-3'),以小拟南芥基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系参考 *Taq* DNA Polymerase 说明书。

PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,58.0℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 3 min 10 s,30 个循环,72℃ 总延伸 10 min,最后 4℃ 保存。PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂

收稿日期:2014-03-19

基金项目:石河子大学“自然科学与技术创新”团队项目(编号:2011ZRKXTD-0605)。

作者简介:梁志强(1988—),男,甘肃武威人,硕士,主要从事植物基因工程研究。E-mail:514326242@qq.com。

通信作者:王爱英,副研究员,主要从事植物基因工程与转基因生物安全性评价研究。E-mail:way-sh@126.com。

盒回收,与 PMD18 - T simple vector 于 16 ℃ 过夜连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素 (50 μg/mL)、X - gal (20 mg/mL)、IPTG (200 mg/mL) 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,对重组克隆进行 PCR 鉴定。阳性克隆交由北京华大基因公司进行测序。

1.2.3 序列分析 测序结果用 DNAMAN 6.0 进行拼接,用 FGENESH (<http://linux1.sofberry.com/berry.phtml>) 进行分析并预测蛋白的氨基酸序列,蛋白质理化性质预测用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析,蛋白质亲疏水性预测用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析,蛋白亚细胞定位预测分别采用 WolfPsort (<http://wolfsort.org/>)^[13]、BaCelLO (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello>)、Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 3 种工具分析。

通过 NCBI 的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>) 对 *ApHDG12* 蛋白序列的保守结构进行分析。运用 NCBI 的 BlastP 搜索与 *HDG12* 蛋白同源的其他植物序列, DNAMAN 分析其相似性,使用 MEGA5.2 软件 Neighbor - Joining 方法构建系统进化树, Bootstrap 分析次数为 1 000 次^[14]。

利用在线工具 HNN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html) 对 *ApHDG12* 蛋白二级结构预测,螺旋卷曲 (coiled-coil) 预测用 COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) 分析。选择同源建模 SWISS - MODEL CPHMODELS 对 *ApHDG12* 蛋白构建三级结构模型^[15]。

1.2.4 植物表达载体构建 测序正确的 PMD18 - T:: *HDG12* 用 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切得到的目的基因片段,同时用 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切 pBI121 质粒,切除 *GUS* 基因片段,回收表达载体大片段。将载体、片断按 1 : 1 比例,经 *T*₄ 连接

酶 4 ℃ 过夜连接,产物经热激法转化大肠杆菌 Top 10 感受态细胞。挑取菌斑在含有卡那霉素的液体 LB 培养基中,于 37 ℃、220 r/min 振荡培养 5 ~ 6 h,进行 PCR 检测,对阳性克隆提取质粒,进行酶切鉴定。*Bam*H I / *Sac* I 酶切鉴定后得重组的植物表达载体命名为 pBI121:: *HDG12*。

将酶切正确的质粒,电击法转化农杆菌 GV3101,挑取单克隆进行 PCR 鉴定,保存鉴定正确的单克隆菌液。

2 结果与分析

2.1 小拟南芥 *HDG12* 基因的克隆和测序

经 PCR 扩增,电泳检测得到 3 000 bp 左右的条带 (图 1),挑选其中 2 个单克隆进行测序,小拟南芥 *HDG12* 基因 2 条测序序列重复率为 99.67%,与拟南芥 *HDG12* 基因比对,重复率为 94.37%。测序分析 PCR 产物长度为 3 034 bp,与预期结果相一致,命名为 *ApHDG12*。

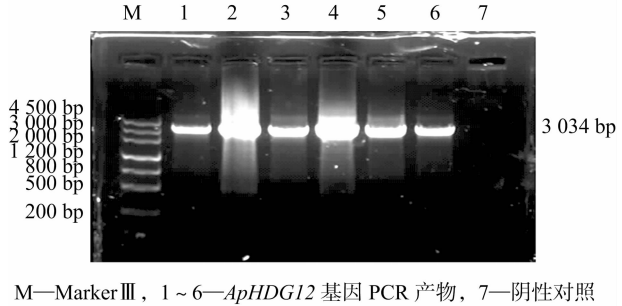


图1 小拟南芥 *HDG12* 基因 PCR 结果

使用在线工具 FGENESH 对克隆到的 *ApHDG12* 基因序列进行分析,得出 *ApHDG12* 基因包含 10 个外显子、9 个内含子 (图 2),并预测 *ApHDG12* 基因 mRNA 的长度为 2 064 bp,编码 687 个氨基酸。

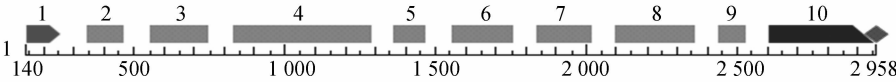


图2 小拟南芥 *ApHDG12* 基因组序列分析

氨基酸序列比对结果 (图 3) 显示, *ApHDG12* 与 *AtHDG12* 氨基酸序列相似性为 93.18%。共计 45 位氨基酸发生了变异。这些发生变异的氨基酸位点是否是小拟南芥特有,有待于进一步验证。在几个拟南芥近缘物种中的 Homeodomain 结

构域中, *ApHDG12* 第 5 位氨基酸突变为精氨酸 R,在拟南芥及其近缘物种中 *HDG12* 第 5 位为赖氨酸 K,表明该结构域第 5 位的 R 是小拟南芥特有位点,预示着这一位的氨基酸在同源异型域中起着重要的作用。

<i>ApHDG12</i>	N..KKKKRHHHTPHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDS	68
<i>AtHDG12</i>	N..KKKKRHHHTPHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	68
<i>Capsella rubella</i>	N..KKKKRHHHTPHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	68
<i>Eutrema salsugineum</i>	...KKKKRHHHTPHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	67
<i>Gossypium hirsutum</i>	DLRKKKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDS	70
<i>Populus trichocarpa</i>	DPQRRKKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDS	70
<i>Prunus persica</i>	DPRPKKKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	70
<i>Ricinus communis</i>	DLQRRKKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	70
<i>Sorghum bicolor</i>	...RQRRKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	67
<i>Theobroma cacao</i>	DPRPKKKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	70
<i>Vitis vinifera</i>	D..SRKKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	69
<i>Zea mays</i>	...RRKKRYHRTAHCIQLRLESTNECHPDEKQKRNLSRELGLAPQIKWFQNRRTQKKACHERAINDC	67
Consensus	hhrt q e fec hpd qr l rel l q kfwfn rtq k qher n	

图3 *ApHDG12* 序列同源异型域比对分析

2.2 *HDG12* 蛋白保守序列预测

使用 NCBI 的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库

对 FGENESH 预测的 *ApHDG12* 氨基酸序列保守结构域进行分析,结果显示,该序列具有典型的 HD - zip 转录因子结构特点

(图 4), 氨基酸序列 18 ~ 79 位是同源异型域 (Homeodomain); 206 ~ 436 位是 START 结构域 (START domain)。

2.3 蛋白质理化性质分析和亚细胞定位预测

使用 Portparam 分析小拟南芥 *ApHDG12* 基因编码的氨基酸序列的理化性质, 结果显示, 该序列的分子量为 76 426.8 u, 理论等电点为 6.43, 总负电荷残基数目为 74, 总正电荷残基数目为 69, 分子式为 $C_{3330}H_{5304}N_{950}O_{1033}S_{39}$, 不稳定指数为 52.52, 属于不稳定蛋白, 脂肪指数为 81.32。

3 种在线工具对 *ApHDG12* 亚细胞定位进行预测。WolfP-

sort 预测结果显示该蛋白定位于细胞核, Cello 结果预测该蛋白定位于细胞核, 可靠指数为 2.694, BaCelLO 预测结果该蛋白定位于细胞核, 定位顺序为: 细胞内 > 细胞核或细胞质 > 细胞核。

2.4 *ApHDG12* 蛋白疏水性分析

用在线工具 PortScale 对小拟南芥 *ApHDG12* 基因编码的氨基酸序列进行疏水性分析, 窗口大小选择 9 (图 5), 结果表明, 20 位赖氨酸疏水性最弱, 疏水指数为 -3.944; 341/342 位半胱氨酸 C/谷氨酸 E 疏水性最强, 疏水指数为 1.956, 多肽链整体表现为亲水性, 平均疏水性为 -0.330。

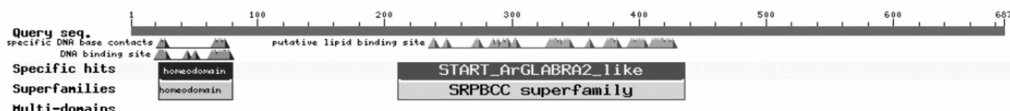


图4 *ApHDG12* 氨基酸序列保守结构域预测结果

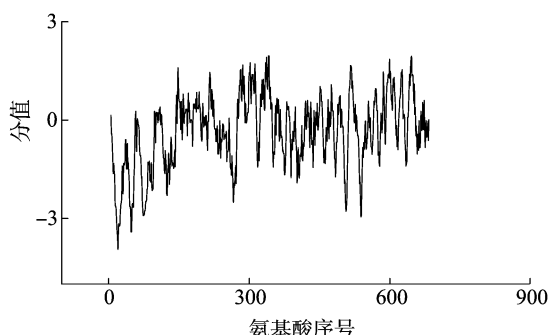


图5 *ApHDG12* 氨基酸序列亲水性/疏水性分析

2.5 同源性和进化树分析

在 GenBank 中输入 *ApHDG12* 氨基酸序列, 运行 BlastP, 结果显示, 该氨基酸序列已在蓖麻、毛果杨、*Capsella rubella* (与拟南芥近缘的芥菜属一个自交物种)、*Eutrema salsugineum*、拟南芥、陆地棉、葡萄、玉米、可可、高粱、山羊草、碧桃等物种里报道过。运行 DNAMAN 对氨基酸序列进行比对, 结果显示, *AtHDG12* 基因编码的氨基酸序列与高粱 (*Sorghum bi-*

color; XP_002438026.1) 的同源性是 50.48%; 与碧桃 (*Prunus persica*; EMJ18783.1) 的同源性是 43.34%; 与山羊草 (*Aegilops tauschii*; EMT05677.1) 的同源性是 45.60%; 与 *Eutrema salsugineum* (ESQ35009.1) 的同源性是 85.71%; 与无油樟 (*Amborella trichopoda*; ERN11049.1) 的同源性是 56.88%; 与玉米 (*Zea mays*; AFW73676.1) 的同源性是 49.93%; 与可可 (*Theobroma cacao*; EOY01444.1) 的同源性是 44.43%; 与葡萄 (*Vitis vinifera*; CAN83483.1) 的同源性是 63.64%; 与毛果杨 (*Populus trichocarpa*; ERP52009.1) 的同源性是 62.92%; 与陆地棉 (*Gossypium hirsutum*; AAU12247.1) 的同源性是 65.33%; 与蓖麻 (*Ricinus communis*; XP_002527933.1) 的同源性是 62.15%; 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*; NP_564041.2) 的同源性是 93.18%; 与 *Capsella rubella* (EOA39819.1) 的同源性是 93.03%。

应用 MEGA5.2 软件对 13 个物种的 *HDG12* 氨基酸序列进行系统进化分析, 结果显示, 小拟南芥与 *Capsella rubella*、*Eutrema salsugineum*、拟南芥遗传关系最近, 与 *Capsella rubella* 聚为一类 (图 6)。

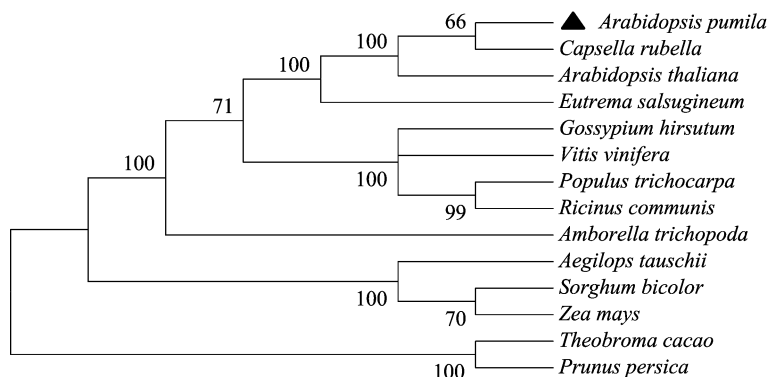


图6 植物HDG12 氨基酸序列进化树分析

2.6 *ApHDG12* 蛋白二级结构预测

利用在线工具 HNN 对 *ApHDG12* 蛋白二级结构进行预测, 结果显示, *ApHDG12* 多肽链有 α 螺旋残基 206 个, 占二级结构 29.99%; β 折叠残基 133 个, 占 19.36%; 无规则卷曲残基 348 个, 占 50.66%。利用 PSIPRED 分析显示该蛋白拥有

19 个 α 螺旋, 15 个 β 折叠, 无规则卷曲 34 个 (图 7)。运用 COILS 对 *ApHDG12* 编码的氨基酸序列进行卷曲螺旋 (coiled-coil) 预测 (图 8), 结果显示, 第一个 coiled-coil 模式序列位于 31 ~ 45 区域; 第二个 coiled-coil 模式序列位于 47 ~ 61 区域; 第三个 coiled-coil 模式序列位于 69 ~ 111 区域。

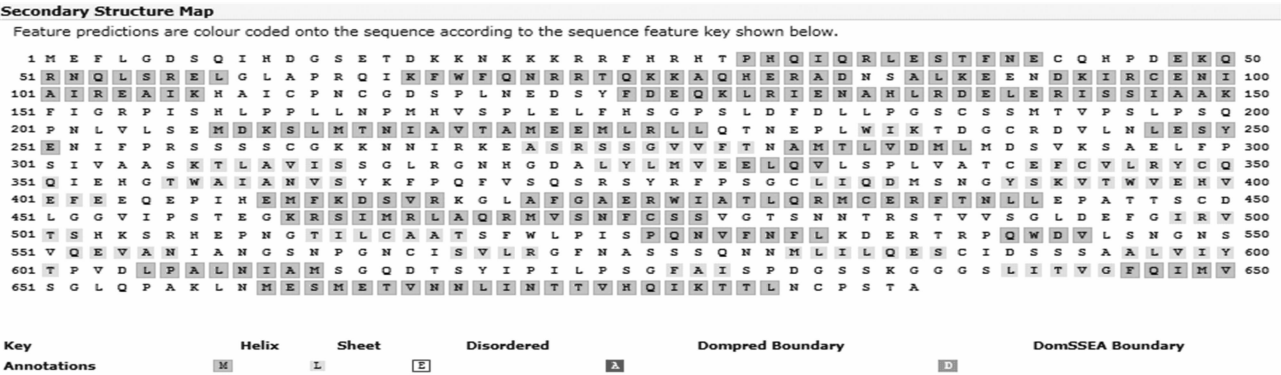


图7 PSIPred 预测 ApHDG12 氨基酸序列的二级结构

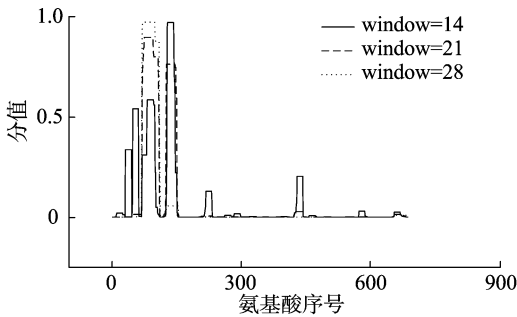


图8 COILS预测 ApHDG12 蛋白卷曲螺旋结果

2.7 ApHDG12 蛋白三级结构同源建模

选择同源建模 SWISS - MODEL CPHMODELS 对 ApHDG12 蛋白建模,用 DeepView 观察其结果,发现该蛋白由两部分结构域组成(图 9),第一部分由 18 ~ 79 位氨基酸组成的同源异型结构域(homeodomain)(图 10 - A),以鸡 engrailed 2 homeodomain 蛋白同源异型结构域为模板;第二部分由 206 ~ 436 位氨基酸组成的 START 结构域,以人类类固醇合成急性调节蛋白(human phosphatidylcho line transfer protein) START 结构域为模板(图 10 - B)。



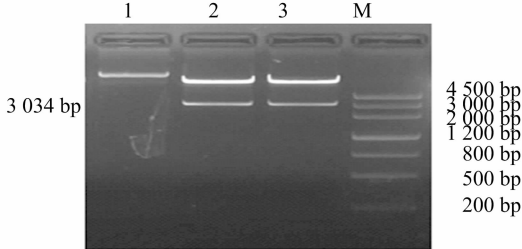
图9 SWISS-MODEL CPHMODELS对ApHDG12 蛋白建模综观



A. 同源异型域模型

B. START结构域

图10 ApHDG12 蛋白三级结构预测



1 为 pBI121::HDG12 未经酶切质粒; 2、3 为 pBI121::HDG12 酶切结果; M 为 Marker III

图11 pBI121::HDG12 酶切鉴定

2.8 植物表达载体的构建

为构建植物表达载体 pBI121::HDG12,重新合成了两端分别带有 BamH I、Sac I 的引物(eF:5' - GGATCCAGTTGT-GTGATGCTCCAGAGTTA - 3'和 eR:5' - GAGCTCGATTCT-TACTACTCTTTGCA - 3'),以测序正确的 PMD18 - T::HDG12 为模板,克隆得到两端带有酶切位点的基因片段,克隆方法同上。将该质粒用 BamH I/Sac I 双酶切回收基因片段,同时 BamH I/Sac I 双酶切 pBI121 质粒,回收载体大片段,经 T4 连接酶连接的产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态,PCR 鉴定后,质粒用 BamH I/Sac I 双酶切进行鉴定,酶切产物在 3kb 处,即为插入的目的基因片段(图 11),表明植物过表达载体已构建成功。该植物表达载体包括完整的 NPT II 筛选标记, CaMV 35S 启动子,NOS 终止子(图 12)。

2.9 pBI121::HDG12 转化农杆菌

将酶切验证正确的 pBI121::HDG12 质粒,电击法转化农

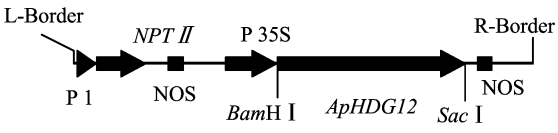
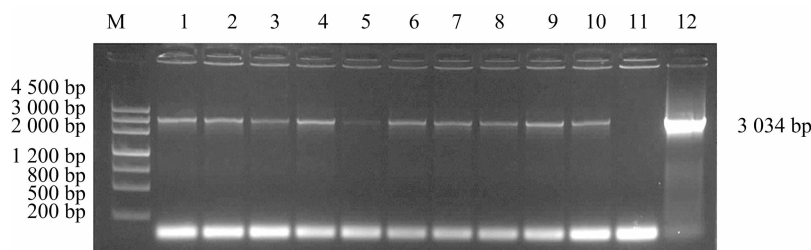


图12 pBI121::HDG12 载体模式图

杆菌 GV3101 细胞,涂布于含有利福平(100 mg/L)、庆大霉素(50 mg/L)和卡那霉素(50 mg/L)的固体 LB 培养基上,28 ℃ 培养 36 h 后,挑取单克隆,PCR 鉴定,扩增片段与 PMD18 - T::HDG12 扩增条带一致(图 13),证明 pBI121::HDG12 植物表达载体已经转入了农杆菌 GV3101 中。

3 结论与讨论

干旱是影响全世界农业可持续发展的一个重要问题。利



M为Marker III；1~10为转化农杆菌单菌落；11为阴性对照（水）；
12为阳性对照（以PMD18-T::HDG12质粒为模板）

图13 HDG12基因的农杆菌转化鉴定

用转基因方法培育耐旱作物品种是实施农业节水的的重要途径,具有周期短、资源丰富的优势。近年来,越来越多的同源异型域——亮氨酸拉链基因被克隆,并证实具有特殊的功能。

棉花 *GbML1* 属于 HD - zip IV 基因家族, NM 端的同源异型域 (HD) 和不完整的亮氨酸拉链结构 (LZL) 专一的 L1 盒, 控制 L1 层相关基因的表达。START 结构域和 SAD 结构域共同完成与 GbMYB25 蛋白的结合, 经采用片段缺失法, 通过酵母双杂交手段验证, 只有完整的 START 结构域和 SAD 结构域存在时, GbML1 蛋白和 GbMYB25 蛋白才能相互作用^[16], 说明 HD - zip IV 蛋白的 HD - LZL 结构专一结合 DNA 结合位点, START - SAD 结构与相关蛋白结合, 行使特定功能。

AtHDG12 基因在突变时, 拟南芥表现出与野生型相同的表型, 表明了 *AtHDG12* 为冗余基因; 与 *AtHDG11* 基因双突变时表现出了比野生型和 *AtHDG11* 单突变时更为显著的表型——表皮毛分支数明显增加, 多于野生型和 *HDG11* 基因单突变时的表皮毛分支数^[2], 有可能暗示着 *HDG12* 基因与 *HDG11* 基因在植物中表达调控时具有相互作用。*AtHDG11* 过表达使得拟南芥和烟草都表现出气孔密度降低、主根增长和侧根数量增加的表型, 提高了拟南芥和烟草的耐旱性^[6]。*AtHDG12* 和 *AtHDG11* 为一对等位基因, 是否 *AtHDG12* 也具有类似于 *AtHDG11* 一样的功能尚不明确, 有待于实验验证。

我们从小拟南芥中克隆得到了 *ApHDG12*, 对其进行生物信息学分析, 发现 *ApHDG12* 具有 HD - zip 基因家族的特征, 在氨基酸的理化性质方面二者存在明显的差异, 在 homeodomain 域中的第 5 位氨基酸发生了变异, 是否是这一位的氨基酸突变会改变蛋白功能, 还需要进一步的实验证明, 同源性分析其与拟南芥近缘种 *Capsella rubella* 亲缘关系最近, 次之为拟南芥。卷曲螺旋预测, 在 homeodomain 结构域中存在 3 个卷曲螺旋结构, 与 homeodomain 结构域功能相符合, *ApHDG12* 氨基酸序列不论从保守序列预测还是三级结构建模预测, 只预测到了同源异型域和 START 结构域, 不完整亮氨酸拉链结构 (LZL) 和 SAD 结构域没有预测到, 也许是因为生物信息学在线分析工具存在一定局限性, 不能完整预测蛋白结构。同时我们构建了 pBI121::HDG12 植物表达载体, 转化了农杆菌 GV3101, 为我们后续将该基因转化模式植物拟南芥和烟草分析其功能提供了依据。

参考文献:

[1] Ariel F D, Manavella P A, Dezar C A, et al. The true story of the HD -

Zip family[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(9): 419 - 426.

[2] Nakamura M, Katsumata H, Abe M, et al. Characterization of the class IV homeodomain - Leucine Zipper gene family in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2006, 141(4): 1363 - 1375.

[3] Ishida T, Kurata T, Okada K, et al. A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 365 - 386.

[4] Abe M, Katsumata H, Komeda Y, et al. Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in Arabidopsis[J]. Development, 2003, 130(4): 635 - 643.

[5] Kubo H, Peeters A J, Aarts M G, et al. ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 1999, 11(7): 1217 - 1226.

[6] Yu H, Chen X, Hong Y Y, et al. Activated expression of an Arabidopsis HD - START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density[J]. The Plant Cell, 2008, 20(4): 1134 - 1151.

[7] 刘 彤, 赵新俊, 崔运河, 等. 天山北麓中段拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 与相邻物种的分布格局及相互关系[J]. 生态学报, 2008, 28(4): 1842 - 1849.

[8] 张海波, 刘 彭, 刘立鸿, 等. 新疆短命植物小拟南芥耐盐性的初步研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 286 - 290.

[9] 院海英, 顾 超, 徐 芳, 等. 小拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆及生物信息学分析[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2011, 29(4): 401 - 407.

[10] 黄先忠, 张 鹏, 吕新华, 等. 新疆小拟南芥 *ApCBFI* 基因的克隆及其过量表达转基因的研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2009, 27(3): 265 - 268.

[11] 刘瑞娜, 焦天奇, 王爱英, 等. 十字花科植物 *HRD* 基因的克隆及分析[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(3): 437 - 444.

[12] 黄 莹, 高丽美, 张永彦, 等. 一种优化的植物总 DNA 提取方法[J]. 西北植物学报, 2004, 24(6): 1103 - 1106.

[13] 冯媛媛, 侯 佩, 李颖楠, 等. 番茄 ARF2 蛋白的生物信息学分析与亚细胞定位[J]. 生物化学与生物物理学进展, 2012, 39(1): 51 - 58.

[14] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist - centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in Bioinformatics, 2008, 9(4): 299 - 306.

[15] Peitsch M C. ProMod and Swiss - Model: internet - based tools for automated comparative protein modelling[J]. Biochemical Society Transactions, 1996, 24(1): 274 - 279.

[16] 张 飞. 棉纤维发育早期的转录调控机制研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2010.