

耿彬彬,刘 姣,郭育强,等. 木薯 *MeCWINV4* 启动子的克隆及其活性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):36-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.010

木薯 *MeCWINV4* 启动子的克隆及其活性分析

耿彬彬^{1,2}, 刘 姣², 郭育强^{1,2}, 符少萍², 胡新文¹, 郭建春²

(1. 海南大学农学院, 海南海口 570228;

2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101)

摘要:根据木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINV4* 已知编码区序列与木薯基因组数据库中预测的 *MeCWINV4* 基因序列信息设计引物,从木薯基因组 DNA 中对该基因的潜在启动子区进行 PCR 扩增,经测序比对成功获得 1 639 bp 序列,其中包含 74 bp 编码区序列和 1 565 bp 潜在启动子区序列。用 PlantCARE 和 PLACE 软件分析该序列的顺式作用元件,发现该启动子包含 CAAT box 和 TATA box 保守元件、大量光反应相关元件与应对高低温胁迫和激素响应相关元件。将 *MeCWINV4* 启动子片段取代 pVKH 表达载体中的 CaMV 35S 启动子与 GUS 连接,构建成融合表达载体 pVKH - *CW4* - GUS,通过农杆菌真空渗透法在烟草叶片中进行瞬时表达。结果表明,该启动子驱动了 GUS 基因在烟草叶片中的表达。说明 *MeCWINV4* 启动子具有启动子活性,可以启动目的基因的转录,为进一步研究该基因的调控机制奠定了基础。

关键词:木薯;*MeCWINV4*;启动子;序列分析;瞬时表达

中图分类号: S533.01;Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0036-05

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 属大戟科木薯属,为多年生植物,广泛栽培于热带和部分亚热带地区,块根富含淀粉,可供食用或用于生产乙醇,是全球近 6 亿人的主要粮食来源^[1],也是中国推广的可再生能源作物和重要的工业淀粉原料^[2]。

木薯块根淀粉是由源器官(叶片)通过光合作用制造的光合产物,以蔗糖的形式经韧皮部装载、长距离运输和卸载运送到库器官(块根),然后在块根中由淀粉合成相关酶催化合成淀粉^[3]。但是,木薯块根中积累的淀粉量远远低于理论产量,地下部分储藏的碳水同化物还不足地上部分合成同化物的 1/5,提高同化物从源到库的运输效率对增加木薯块根淀

粉的积累至关重要。而在木薯淀粉合成积累过程中,对光合产物由“源”到“库”的装载、运输和卸载中起主要调控作用的是蔗糖转化酶。蔗糖转化酶参与了叶片光合作用的调节、韧皮部的卸载和库的建立、贮藏器官中碳水化合物的积累和组成以及细胞对胁迫的响应,并在逆境中起一定作用。蔗糖转化酶根据其亚细胞定位,可以分为细胞质转化酶、液泡转化酶以及细胞壁转化酶^[4]。其中,细胞壁转化酶主要参与韧皮部外体卸载时蔗糖的分解,以保持源-库之间蔗糖的浓度梯度,从而促使蔗糖顺利卸载^[5]。笔者所在课题组研究发现木薯中存在 6 个细胞壁转化酶基因,对这些转化酶基因进行克隆并在木薯各器官中的表达模式进行分析,发现其中的细胞壁转化酶 *MeCWINV4* 在叶片中表达微弱,但在块根韧皮部中表达量相对较高^[6]。由此推测,*MeCWINV4* 基因在块根韧皮部的组织差异性高表达可能提示该基因在木薯淀粉合成过程中同化物从源到库运输时的韧皮部卸载起着很重要的作用。

基因的表达调控,在植物的生长发育以及应答环境信号过程中起重要作用^[7]。启动子在调控基因转录的起始及表达程度中起着关键作用。研究启动子的功能序列及其调控元件对解析基因表达调控的机制具有十分重要的意义^[8]。

收稿日期:2015-11-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31371706);中国科学技术协会青年人才托举工程。

作者简介:耿彬彬(1989—),女,山西大同人,硕士研究生,从事生物化学与分子生物学的研究。

通信作者:郭建春,博士,研究员,主要从事植物抗逆育种研究。
E-mail: jianchuanguo@163.com。

[14] Singh A, Hayashi K. Construction of chimeric beta - glucosidases with improved enzymatic properties[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(37): 21928 - 21933.

[15] Arai R, Ueda H, Kitayama A, et al. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein[J]. Protein Engineering, 2001, 14(8): 529 - 532.

[16] Hoedemaeker F J, Signorelli T, Johns K, et al. A single chain Fv fragment of P - glycoprotein - specific monoclonal antibody C219. Design, expression, and crystal structure at 2.4 Å resolution[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(47): 29784 - 29789.

[17] Kavoosi M, Creagh A L, Kilburn D G, et al. Strategy for selecting

and characterizing linker peptides for CBM9 - tagged fusion proteins expressed in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 98(3): 599 - 610.

[18] Robinson C R, Sauer R T. Optimizing the stability of single - chain proteins by linker length and composition mutagenesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(11): 5929 - 5934.

[19] George R A, Heringa J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding [J]. Protein Engineering, 2002, 15(11): 871 - 879.

本研究根据已知木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINV4* 编码区序列与木薯基因组数据库预测信息克隆木薯细胞壁转化酶基因家族中的 *MeCWINV4* 启动子序列,通过生物信息学分析软件对其上的顺式作用元件进行初步分析,构建植物表达载体,利用农杆菌真空渗透法转化烟草叶片进行瞬时表达,初步鉴定该启动子的活性。为后续深入研究木薯细胞壁转化酶基因启动子对该基因在淀粉积累过程中的调控作用提供基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

供试材料华南8号木薯与三生烟(*Nicotiana tabacum* var. *samsun* NN),采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所试验基地;大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、农杆菌菌株 GV3101 和含有 *GUS* 基因的植物表达载体 pVKH-35S-*GUS* 由笔者所在课题组保存。各种工具酶、Marker 购自 TaKaRa 公司;回收纯化试剂盒、生化试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 木薯基因组 DNA 提取 采用 SDS 法^[9]提取华南8号木薯组培苗幼苗基因组 DNA,取适量 DNA 用于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 *MeCWINV4* 启动子的克隆及序列分析 根据已知木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINV4* 编码区序列(GenBank ID: JQ792172)与木薯基因组数据库(<http://www.phytozome.net/cassava>)中预测的 *MeCWINV4* 基因序列信息设计引物。引物序列如下: CW4p-F, GAAAAGGCATCGTCACCAATT; CW4p-R, TCAAGCTCAAACACTCCAT。以木薯 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 充分延伸 10 min。扩增反应结束后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,再用 DNA 回收试剂盒纯化目的片段,然后将回收产物连接到 pMD-19 T-vector simple 载体上,通过转化、筛选、菌液 PCR,获得阳性单克隆命名为 CW4p-19T。CW4p-19T 热激转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性克隆送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。测序结果用 DNAMAN 软件进行比对,比对正确的序列用 PlantCARE 和 PLACE 软件分析该启动子序列,在线预测顺式作用元件。

1.2.3 植物表达载体 pVKH-CW4-GUS 的构建 将测序正确的菌液扩大培养提取质粒,以该质粒为模板,添加酶切位点(正向引物中添加 *Sac* I 酶切位点,反向引物中添加 *Bam*HI 酶切位点)的特异引物(CW4-1F: TAGAGCTCGAAAAGGCATCGTCAC; CW4-1R: TAGGATCCGCTGGTGAGTGCATGT)进行 PCR 扩增(下划线为酶切位点)。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小正确后,将目的片段纯化回收后与表达载体 pVKH 均进行 *Sac* I 和 *Bam*HI 双酶切、纯化回收,采用 T4 DNA 连接酶连接,使 *MeCWINV4* 启动子区段定向替换 pVKH 载体上的 CaMV35S 启动子。将得到的连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性单克隆,菌液 PCR 和双酶切双重鉴定后,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进一步测序验证正确后,获得重组质粒

命名为 pVKH-CW4-GUS。本试验以空载体 pVKH-35S-GUS 作为阳性对照。

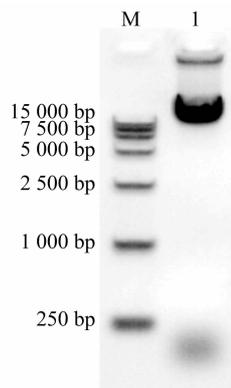
1.2.4 农杆菌介导的烟草瞬时表达 采用反复冻融法^[10]将空载体 pVKH-35S-GUS 和 pVKH-CW4-GUS 重组质粒分别转化农杆菌 GV3101 感受态细胞中,在 YEP(1% Yeast Extract, 1% Tryptone, 0.5% NaCl) + Kana (100 μ g/mL) + Rif (50 μ g/mL) 固体培养基上 28 °C 培养 2 d,挑取单克隆进行菌液 PCR 鉴定,筛选出阳性菌株,在 50 mL YEP 液体培养基中扩大培养。待 $D_{600\text{nm}}$ = 0.8 ~ 1.0 时,5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用含 10 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L AS(乙酰丁香酮)和 10 mmol/L MES(pH 值 = 5.6) 的无菌水重悬至 $D_{600\text{nm}}$ 约为 1.0,室温静置 2 h 后备用。用打孔器将烟草叶片打出大小一致的圆形叶盘,浸泡在菌悬液中,然后在真空泵中抽滤 30 min,压强不超过 0.085 MPa,取出后平铺到含有浸湿滤纸的培养皿中,置于 25 °C 培养箱中培养 3 d。

1.2.5 GUS 活性的组织化学染色分析 将侵染后的烟草叶片置于 GUS 染液[2 mmol/L X-Gluc, 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆, 100 mmol/L Na₃PO₄ 缓冲液(pH 值 = 7.0), 5 mmol/L K₄Fe(CN)₆, 0.2% Triton X-100, 10 mmol/L EDTA]中,确保浸透叶片,37 °C 避光保温 3 d,用 70% 乙醇进行脱色后拍照。

2 结果与分析

2.1 *MeCWINV4* 启动子的克隆

经琼脂糖电泳检测后提取的 DNA 质量较好,可用于后续 PCR 试验(图 1)。根据设计的引物从 DNA 中扩增得到 1 段长约 1 800 bp 的 DNA 片段,测序分析该片段为 1 639 bp 的序列(图 2)。CW4p-19T 测序后经 Blast 比对发现,该片段含有的 *MeCWINV4* 基因是从 ATG 起始的 74 bp 编码区序列和 ATG 上游 1 565 bp 潜在启动子序列,且该 74 bp 编码区片段与笔者所在的课题组之前克隆的 *MeCWINV4* 基因(Accession NO. JQ792172)相对应的全长编码区序列同源性达 100%,表明所克隆到的序列为 *MeCWINV4* 的启动子序列,序列数据提交给 GenBank,登录号为 KP164867。

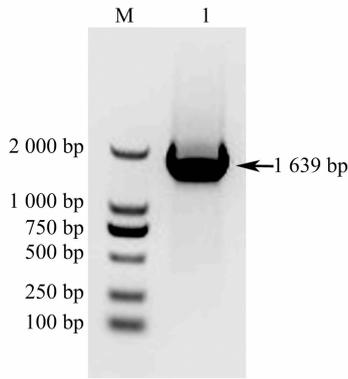


M—DL15 000 marker; 1—基因组DNA

图1 木薯幼苗基因组 DNA

2.2 *MeCWINV4* 启动子序列的生物信息学分析

将克隆到的 *MeCWINV4* 启动子序列用 PlantCARE 和 PLACE 在线软件进行元件预测分析,分析结果见图 3、表 1,结果显示, *MeCWINV4* 启动子不仅含有 CAAT box 和 TATA box 保守元件,还存在多种与光反应和非生物胁迫相关的顺



M—DL2 000 marker; I—*MeCWINV4* 启动子 PCR 扩增产物
图2 *MeCWINV4* 启动子的克隆结果



图3 *MeCWINV4* 启动子的序列分析结果

式作用元件。(1)光响应元件。Box4、Box I、G - Box、GA - motif、GT1 motif、Sp1。(2)胁迫应答元件。高温响应元件 HSE,低温响应元件 LTR,干旱诱导相关元件 MBS,胁迫防御元件 TC - rich repeats。(3)激素应答元件。脱落酸响应元件 ABRE,水杨酸响应元件 SARE,赤霉素响应元件 GARE - motif,生长素响应元件 TGA - element 等。

2.3 *MeCWINV4* 启动子融合表达载体的构建

以 *CW4p* - 19T 质粒 DNA 为模板,用含 *Sac* I / *Bam* H I 酶切位点的特异引物 *CW4* - 1F 和 *CW4* - 1R 进行 PCR 扩增得到的 1 565 bp 潜在启动子片段,经 *Sac* I / *Bam* H I 双酶切后替换掉 PVKH 表达载体中的 CaMV 35S 启动子与 *GUS* 连接,构建成融合表达载体 pVKH - *CW4* - *GUS* (图 4)。重组质粒

表 1 *MeCWINV4* 启动子部分光、胁迫、激素相关的顺式作用元件

元件	序列	功能	数量	位置
CAAT - box	CAAT	基本转录因子	4	1076(+), 1291(+), 1297(+), 1407(+)
TATA - box	TAATA	基本转录因子	2	1349(+), 1447(+)
Box 4	ATTAAT	光响应	1	355(+)
Box I	TTTCAAA	光响应	1	844(-)
G - Box	CACGTT	光响应	2	401(-), 153(+)
GA - motif	ATAGATAA	光响应	1	519(-)
GT1 - motif	GGTTAAT	光响应	1	711(-)
Sp1	CC(G/A)CCC	光响应	1	469(-)
ABRE	CACGTG	脱落酸响应	1	105(+)
GARE - motif	AAACAGA	赤霉素响应	2	759(+), 1198(+)
TGA - element	AACGAC	生长素响应	1	543(+)
HSE	AAAAAATTTTC	高温响应	1	435(-)
LTR	CCGAAA	低温响应	1	506(-)
MBS	CAACTG	干旱诱导	1	61(-)
TC - rich repeats	ATTTTCTCCA	胁迫防御	1	831(+)
GCN4_motif	TGTGTCA	胚乳表达	1	176(-)

经 PCR 检测、双酶切和测序鉴定确认 *MeCWINV4* 启动子已成功插入到植物表达载体 pVKH 中 (图 5)。

2.4 *MeCWINV4* 启动子活性分析

重组载体 pVKH - *CW4* - *GUS* 和空载体 pVKH - 35S - *GUS* 分别转化农杆菌后,进行瞬时表达分析。结果显示, pVKH - *CW4* - *GUS* 和 pVKH - 35S - *GUS* 在烟草叶片中都能驱动 *GUS* 基因的表达,烟草叶片被染成蓝色,而阴性对照不能被染色 (图 6)。

3 结论与讨论

高等植物中,蔗糖是光合同化物运输的主要形式^[11],木薯韧皮部筛管内的糖类 80% 为蔗糖,木薯源器官 (叶片) 光合作用合成的同化物经过韧皮部装载 - 运输 - 卸载到库器官 (块根) 形成淀粉。蔗糖转化酶中细胞壁转化酶是植物源库器官蔗糖代谢的关键酶,不可逆地将蔗糖分解成葡萄糖和果糖,参与韧皮部质外体卸载时蔗糖的分解,保持源-库之间蔗

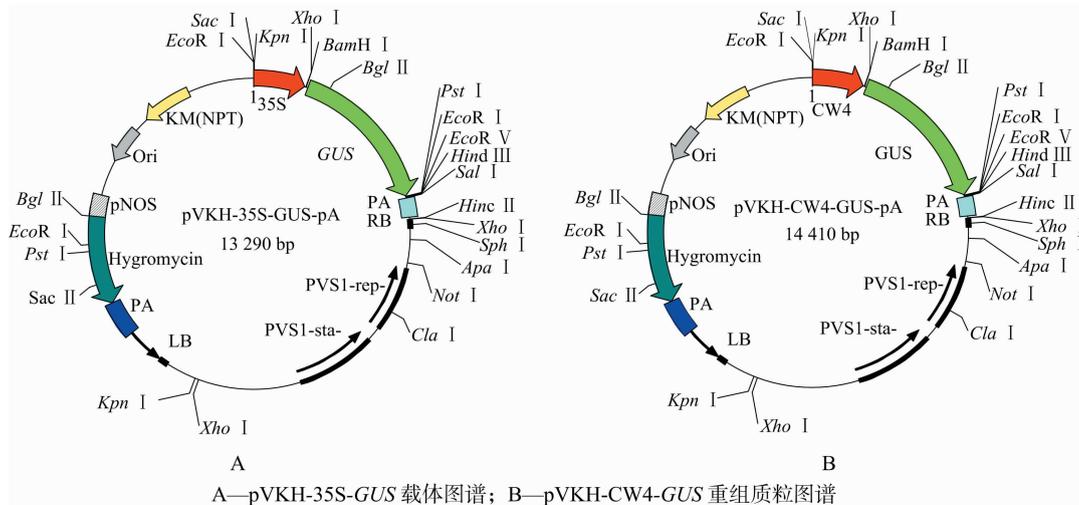
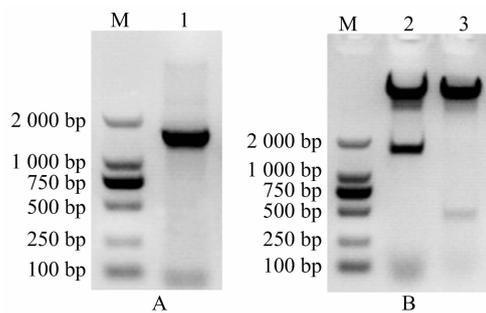
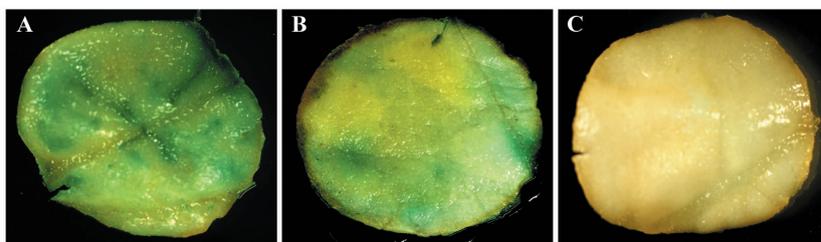


图4 载体构建图谱



M—DL2 000 marker; 1—pVKH-CW4-GUS的PCR扩增产物; 2—pVKH-CW4-GUS的酶切结果; 3—pVKH空载体的酶切结果
图5 pVKH-CW4-GUS重组表达载体PCR鉴定(A)和酶切鉴定(B)



A—pVKH-CW4-GUS瞬时表达; B—pVKH-35S-GUS瞬时表达; C—阴性对照

图6 烟草GUS活性瞬时表达检测

件与反式作用因子或环境中光、热、胁迫等因素的互作来实现的。其中,启动子的作用尤为关键^[22]。转化酶基因能够被多种胁迫信号诱导表达,可能是由于这些基因的启动子序列中存在与逆境诱导相关、参与基因转录调控的顺式作用元件^[23]。牛俊奇等发现,甘蔗酸性转化酶基因 *SoSAII* 上游417 bp 启动子中含有参与干旱诱导的 MYB 结合位点,15% PEG 胁迫能诱导甘蔗苗期根和叶片中 *SoSAI I* 的表达^[23];成善汉等研究发现,通过低温处理,诱导了马铃薯启动子 CIP 调控转化酶抑制子 *St-VIF* 基因表达的上调,从而抑制转化酶的活性^[24]。在烟草^[25]、拟南芥^[26]、大豆^[27]等植物中也得到了同样的验证。

本试验克隆获得的木薯细胞壁转化酶 *MeCWINV4* 基因的1 639 bp 启动子除含有 CAAT box 和 TATA box 等真核生物启

糖的浓度梯度,调节蔗糖从叶中运出的速率来进行源库关系的建立及调控^[12-14]。同时有研究发现,当植物受到生物和非生物胁迫时,细胞壁转化酶基因被激活或增强表达,参与一系列防御反应。拟南芥根部被病原菌侵染后,根内细胞壁转化酶基因表达量升高,更多的蔗糖运输到侵染部位,为根细胞抵御病原菌侵染提供碳水化合物^[15]。Sonnewald 等研究发现,当病原菌侵染胡椒叶片后,细胞壁转化酶基因表达及活性提高,己糖信号形成,诱导病程相关蛋白 (PR) 基因表达,增强叶片对病原菌的防御力^[16]。同时发现,伤害胁迫^[17]、诱导子^[18]、病原菌侵染^[19]和己糖^[20]诱导细胞壁转化酶基因的表达,乙烯则抑制其表达^[21]。

基因在生物生长发育过程中根据生物自身和环境定时、定位、定量地特意表达,很大程度上是通过DNA顺式作用元

因子基本元件外,还存在大量光反应元件如 Box4、Box I、G-Box、GA-motif、GT1 motif、Sp1,说明 *MeCWINV4* 基因的表达受到光的调控,能更高效地在木薯淀粉积累过程中发挥作用。同时该启动子上也存在多个胁迫应答元件(高温响应元件 HSE、低温响应元件 LTR、干旱诱导相关元件 MBS、胁迫防御元件 TC-rich repeats)和激素应答元件(脱落酸响应元件 ABRE、水杨酸响应元件 SARE、赤霉素响应元件 GARE-motif、生长素响应元件 TGA-element),暗示该基因的表达可能受到多种逆境胁迫和激素的调控。*MeCWINV4* 启动子上这些顺式作用元件的预测结果可以为后续的酵母单杂交试验提供理论依据,也为了解该基因的调控模式、信号传递途径、生物适应环境机制提供理论基础。

烟草瞬时表达试验证明了所克隆的 *MeCWINV4* 启动子能

够启动 *GUS* 报告基因的表达,具有启动子活性。瞬时表达虽然不受基因沉默和基因位置效应的影响且转化率高,但为了进一步研究 *MeCWINV4* 启动子的组织表达特性和调控基因表达模式,还须通过进一步稳定表达试验进行元件缺失分析和不同诱导条件下该基因及其该启动子活性变化,更深入地分析该基因启动子活性,目前相关工作正在进行中。

参考文献:

- [1] Cruz J L, Mosquim P R, Pelacani C R, et al. Carbon partitioning and assimilation as affected by nitrogen deficiency in cassava[J]. *Photosynthetica*, 2003, 41(2): 201 – 207.
- [2] Gu B, Yao Q Q, Li K M, et al. Change in physicochemical traits of cassava roots and starches associated with genotypes and environmental factors[J]. *Starch – Starke*, 2013, 65(3/4): 253 – 263.
- [3] 刘皎, 胡艳平, 周扬, 等. 木薯细胞壁酸性转化酶基因 *MeCWINV1* 启动子的克隆及其在烟草中的瞬时表达分析[J]. *分子植物育种*, 2014, 12(6): 1169 – 1174.
- [4] 俞 鏗, 李志逸, 万红建, 等. 高等植物蔗糖转化酶功能的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(33): 12815 – 12818, 12822.
- [5] Sturm A, Chrispeels M J. cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection[J]. *Plant Cell*, 1990, 2(11): 1107 – 1119.
- [6] Yao Y, Geng M T, Wu X H, et al. Genome-wide identification, 3D modeling, expression and enzymatic activity analysis of cell wall invertase gene family from cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(5): 7313 – 7331.
- [7] Le B H, Cheng C, Bui A Q, et al. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(18): 8063 – 8070.
- [8] 郝迪获, 赵琳, 陈李森, 等. 克隆启动子方法的比较及应用[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(3): 154 – 160.
- [9] 李静, 尹俊梅, 任羽, 等. SDS法提取石斛基因组DNA的研究[J]. *热带农业科学*, 2009, 29(12): 22 – 26.
- [10] Hofgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for agro-bacterium transformation[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 9877.
- [11] Wind J, Smeekens S, Hanson J. Sucrose; metabolite and signaling molecule[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(14/15): 1610 – 1614.
- [12] Kocal N, Sonnewald U, Sonnewald S. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1523 – 1536.
- [13] Klann E M, Hall B, Bennett A B. Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 1321 – 1330.
- [14] Sturm A, Tang G Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning[J]. *Trends in Plant Science*, 1999, 4(10): 401 – 407.
- [15] Siemens J, González M C, Wolf S, et al. Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(3): 247 – 262.
- [16] Sonnewald S, Priller J P, Schuster J, et al. Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type three effectors[J]. *PLoS one*, 2012, 7(12): e51763.
- [17] Zhang L, Cohn N S, Mitchell J P. Induction of a pea cell-wall invertase gene by wounding and its localized expression in phloem[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 1111 – 1117.
- [18] Zhang Y L, Zhang A H, Jiang J. Gene expression patterns of invertase gene families and modulation of the inhibitor gene in tomato sucrose metabolism[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(3): 3412 – 3420.
- [19] Hothorn M, van den Ende W, Lammens W, et al. Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17427 – 17432.
- [20] Roitsch T. Source-sink regulation by sugar and stress[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2(3): 198 – 206.
- [21] Godt D E, Roitsch T. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism[J]. *Plant physiology*, 1997, 115(1): 273 – 282.
- [22] 况守龙, 胡廷章. 启动子的克隆和研究方法[J]. *重庆工学院学报: 自然科学版*, 2007, 21(1): 136 – 139.
- [23] 牛俊奇, 王爱勤, 黄静丽, 等. 甘蔗可溶性酸性转化酶(SoSAII)基因的克隆及表达分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(24): 5248 – 5260.
- [24] 成善汉, 谢从华, 柳俊, 等. 马铃薯低温启动子 CIP 的克隆及其功能鉴定[J]. *贵州科学*, 2008, 26(1): 19 – 23.
- [25] Fujimoto S Y, Ohta M, Usui A, et al. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(3): 393 – 404.
- [26] 刘文奇, 陈旭君, 徐晓晖, 等. ERF类转录因子 *OPBPI* 基因的超表达提高烟草的耐盐能力[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2002, 28(6): 473 – 478.
- [27] Zhang G Y, Chen M, Li L C, et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(13): 3781 – 3796.