

青花菜 *BoSCL3* 基因的克隆和渍水胁迫下的表达特征分析

裴徐梨¹, 付双¹, 荆赞革^{1,2*}, 唐征², 林燕¹, 黄丽¹

(1. 昆明学院农学与生命科学学院, 昆明 650214; 2. 温州科技职业学院农业与生物技术学院, 浙江 温州 325006)

摘要: 为了解 *SCL3* (scarecrow-like 3) 基因的功能, 从青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)中克隆得到 1 个 *SCL3* 基因, 命名为 *BoSCL3*, 其 cDNA 全长 1 355 bp, 编码 446 个氨基酸。*BoSCL3* 分子量为 49.96 kD, 为疏水性蛋白, 与油菜(*B. napus*)、芜菁(*B. rapa*)中 *SCL3* 蛋白的亲缘关系最近, 同种植物的 *SCL3* 具有较高的同源性。荧光定量 PCR 分析结果表明, 青花菜 *BoSCL3* 基因表达量随渍水胁迫时间延长先下降后上升, 推测其可能参与渍水胁迫响应。这为探讨青花菜 *BoSCL3* 基因响应渍水胁迫的分子机制提供理论依据。

关键词: 青花菜; *BoSCL3*; 基因克隆; 渍水胁迫

doi: 10.11926/jtsb.4263

Cloning *BoSCL3* Gene from *Brassica oleracea* var. *italica* and Expression Analysis under Waterlogging Stress

PEI Xu-li¹, FU Shuang¹, JING Zan-ge^{1,2*}, TANG Zheng², LIN Yan¹, HUANG Li¹

(1. College of Agriculture and Bioscience, Kunming University, Kunming 650214, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou 325006, Zhejiang, China)

Abstract: In order to understand the function of *SCL3* (scarecrow-like 3) gene, a *SCL3* gene was cloned from *Brassica oleracea* var. *italica*, named *BoSCL3*, which full length of cDNA sequence was 1355 bp and encoding 446 amino acids. The molecular weight of *BoSCL3* was 49.96 KD, predicted to be hydrophobic protein. Phylogenetic analysis showed that the *SCL3* in *B. oleracea* var. *italica* (*BoSCL3*) was closely related to those in *B. rapa* and *B. napus*, and *SCL3* in the same family had high homology. The real-time fluorescence quantitative PCR analysis showed that the expression of *BoSCL3* decreased at first and then increased with waterlogging stress time, indicating that this gene might be involved in response to waterlogging stress. Therefore, these would provide a theoretical basis for studying the molecular mechanism of *BoSCL3* gene in response to waterlogging stress.

Key words: *Brassica oleracea* var. *italica*; *BoSCL3*; Gene clone; Waterlogging stress

GRAS 基因是植物特有的一类转录因子, 由 *GAI*、*RGA* 和 *SCR* 等 3 个基因家族成员的特征字母命名而来^[1-2]。GRAS 家族通常包含 SAW、亮氨酸

重复序列 I (LFRI)、NLS、VHIID 和亮氨酸重复序列 II (LHRII)、PFYRE 和 LXX-LL 等几个典型的结构域, 可分为 SHR、SCL、SCR、RGA、RGL (RGA-

收稿日期: 2020-06-10 接受日期: 2020-08-31

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY18C150006); 云南省地方本科高校(部分)基础研究联合专项(2018FH001-044); 云南省科技厅基础研究专项青年项目(2019-1-C-25318000002236); 浙江省科技厅项目(2016C051-5-3); 温州市科技项目(2019ZX007-2)资助

This work was supported by the Project for Nature Sciences in Zhejiang (Grant No. LY18C150006); the Project for Fundamental Research of Local Undergraduate Universities (Partial) in Yunnan Province (Grant No. 2018FH001-044); the Special Project for Basic Research of Youth in Yunnan Science and Technology Department (Grant No. 2019-1-C-25318000002236); the Project of Department of Science and Technology in Zhejiang (Grant No. 2016C051-5-3); and the Project for Science and Technology in Wenzhou (Grant No. 2019ZX007-2).

作者简介: 裴徐梨(1990~), 女, 博士, 讲师, 主要从事蔬菜分子生物学研究。E-mail: xuliP@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: jingzange@aliyun.com

like)、GAI 和 PAT1 等 8 个分支^[3]。目前, GRAS 转录因子已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、白菜(*Brassica pekinensis*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、玉米(*Zea mays*)和番茄(*Lycopersicon esculentum*)等植物中克隆出来^[4-9]。

GRAS 家族成员数量众多, 在植物逆境胁迫应答中发挥着重要作用。Torres-Galea 等的研究表明干旱、盐、低温等非生物胁迫可促进拟南芥 *AtSCL13* 的表达^[1]。李雪燕等报道怪柳(*Tamarix hispida*)的 GRAS 转录因子启动子含有多个逆境相关元件, 推测其可参与植物的逆境胁迫响应^[10]。过表达水稻中的 *OsGRAS23* 基因和甘蓝型油菜中的 GRAS 基因, 可提高植株对于干旱胁迫的耐受性^[11]。

青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)为十字花科(Brassicaceae)芸薹属一二年生草本植物。水分是青花菜生长发育过程中重要的调控因子, 水分过多会严重影响生长, 甚至造成整株死亡。因此对青花菜渍水胁迫的响应机理进行研究, 对于青花菜生产具有重要的现实意义。

本试验从青花菜中克隆得到 1 个 *BoSCL3* 基因, 对其编码的 *BoSCL3* 蛋白进行生物信息学分析, 并采用荧光定量 PCR 技术检测 *BoSCL3* 基因在渍水胁迫下的表达特性, 为揭示青花菜 *BoSCL3* 基因响应渍水胁迫的分子机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica* ‘WN12-95’)。种子催芽后, 播种到营养钵中, 放置于光照培养箱内进行培养。昼夜温度为 25℃/18℃, 光照周期为 16 h/8 h。待植株长至五叶期时开始渍水胁迫处理, 每处理 3 次重复。分别在处理后 0、2 和 6 d 采集叶片, 液氮冷冻后置于超低温冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

参照 TaKaRa Mini BEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)的操作说明提取青花菜叶片的总 RNA。总 RNA 质量检测合格后, 使用 Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司)反转录合成 cDNA 第一条链。

1.3 基因的克隆

根据转录组 unigene 库中青花菜 *BoSCL3* 基因设计全长克隆引物, F: 5'-TCGCTTTGATATGGTGGTT-ATGT-3'; R: 5'-TCATTCACTTCTTGTCATCTCCA-3'。PCR 反应体系包括 1 μ L cDNA, 上、下游引物各 1 μ L、10 μ L Taq mixture, 7 μ L ddH₂O。扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 60℃复性 50 s, 72℃延伸 1 min, 36 个循环; 72℃延伸 10 min。PCR 产物回收后进行 TA 克隆, 选取阳性克隆测序。

1.4 生物信息学分析

采用 InterPro 软件(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)进行结构域分析; 采用在线软件 ProtParamtool (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测氨基酸多肽链的氨基酸组成、等电量、相对分子量、分子式等^[12-14]; 使用 DNAMAN 软件预测多肽链的亲/疏水性; 采用 GOR4 工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)对编码蛋白的二级结构进行预测。蛋白序列同源性比对和进化树的构建采用 Mega 6.0 软件^[15]。

1.5 *BoSCL3* 基因的表达分析

根据获得青花菜 *BoSCL3* 基因的 cDNA 序列, 设计定量引物, F: 5'-CTTAACGCAACTCAGACAA-3' 和 R: 5'-CCATCTTCTCACCTTCCA-3'。以 *actin* 基因(引物分别为 5'-GACAACTTACAACCTCCATCAT-3'和 5'-CTCATACGGTCAGCGATA-3')为内参基因。使用 SYBR Premix Ex Taq (大连 TaKaRa 公司)试剂盒在 ABI Prism 7500 定量扩增仪上进行实时荧光定量分析。反应体系为: cDNA 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, SYBR 10 μ L, ddH₂O 12 μ L。反应程序为 94℃预变性 2 min; 94℃变性 20 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 40 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。每个反应设 3 次重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量。

2 结果和分析

2.1 *BoSCL3* 基因的克隆及序列特征分析

采用特异引物, 经 PCR 扩增后, 从青花菜叶片中克隆了 *BoSCL3* 基因(图 1)。序列分析表明该基因 cDNA 全长 1 355 bp, 推导编码 446 个氨基酸(图 2)。InterPro 分析表明, 该基因具有保守的 GRAS 结构域, 属于 GRAS 基因家族。

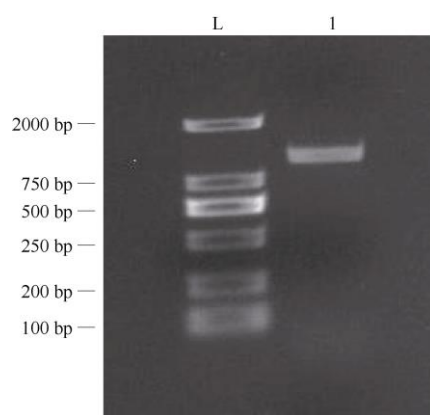


图1 青花菜 *BoSCL3* 基因的 PCR 扩增。L: DL 2000 Marker; 1: *BoSCL3*。

Fig. 1 PCR amplification of *BoSCL3* gene in *Brassica oleracea* var. *italica*.

L: DL 2000 Marker; 1: *BoSCL3*.

2.2 *BoSCL3* 蛋白的生物信息学分析

青花菜 *BoSCL3* 蛋白的分子量为 49.96 kDa, 理论等电点为 6.14; 带负电残基总数为 51, 带正电残基总数为 45; 疏水性最大值为 3.04, 亲水性最大值为 2.38, 同时疏水性氨基酸多于亲水性氨基酸, 说明该蛋白为疏水性蛋白。

通过 GOR4 工具对蛋白氨基酸序列的二级结构进行分析, 结果表明, 青花菜 *BoSCL3* 蛋白的二级

结构包括无规则卷曲(Cc)(44.62%)、延伸链(Ee)(12.33%)和 α -螺旋(Hh)(43.05%)。

2.3 系统进化树

利用 BLAST 对 *BoSCL3* 蛋白的氨基酸序列同源性进行分析, 结果表明, *BoSCL3* 基因编码的氨基酸序列与甘蓝(*Brassica oleracea*)、油菜(*B. napus*)、芜菁(*B. rapa*)、白菜、萝卜(*Raphanus sativus*)、拟南芥中的 *SCL3* 氨基酸序列的同源性分别是 100%、98%、98%、98%、91%和 90%, 与烟草、长叶马先蒿、可可、毛果杨的相似性也都在 60%以上。

将青花菜 *BoSCL3* 蛋白的氨基酸序列与甘蓝、油菜、芜菁、白菜、萝卜、拟南芥(*Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*)、榴莲(*Durio zibethinus*)、长蒴黄麻(*Corchorus olitorius*)、黄花蒿(*Artemisia annua*)、除虫菊(*Tanacetum cinerariifolium*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、绒毛烟草(*Nicotiana tomentosiformis*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)等 14 种植物的 *SCL3* 氨基酸序列进行多重比对并构建进化树(图 3), 可见, 青花菜的 *BoSCL3* 与甘蓝、油菜的 *SCL3* 亲缘关系较近。同属于十字花科

```

1  TCGCTTTGATATGGTGGTTATGTTCCAAGAAGACAATGGAACATCCTCTGTAGCTTCGTACCGCTCCAAGTCTTCTCAACCATGTCACTCACAAGACC
   M V V M F Q E D N G T S S V A S S P L Q V F S T M S L T R P
100 AACTCTCTCCCTTCTCCCTCCTCATCACCGTTTCACTCCCTCAAAGACCTCAAACAGAGGAGCGTGGTCTCTACCTGATCCACCTCCTGCTAACCTG
   T L L P S P S S S P F H S L K D L K P E E R G L Y L I H L L L T C
200 CGCCAACCAAGTGGCTCAGGCAGCTCCAGAACGCAACGCGGCTCTCGAGCAGCTCTCTCTCTCTTCCCTGGCGGAGACACCATGACGCGTGT
   A N H V A S G S L Q N A N A A L E Q L S L L S S P G G D T M Q R V
300 AGCAGCTTACTTCACCGAAGCGCTCGCTAACAGAATCCTCAAGTCTTGGCTGGTCTCTACAAGGCCCTTAACGCAACTCAGACAAGGACCAAGCAATGT
   A A Y F T E A L A N R I L K S W P G L Y K A L N A T Q T R T S N V
400 CTCTGAGGAGTTATGTCAGGAGGTGTTCTTTGATATGTTCCCTATACTAAAAGTGTCTTACTTGTCTACTAACCAGCTATCTCGAGGCTATGGA
   S E E V H V R R L F F D M F P I L K V S Y L L T N R A I L E A M E
500 AGGTGAGAAGATGGTTTCATGTGATGATCTCGACGCTTCGGAGCGGCTCAATGGCTTGCTTTGATTCAAGCTTTTAACTCTAGGCTGAAGTCCACC
   G E K M V H V I D L D A S E P A Q W L A L I Q A F N S R P E G P P
600 GCATCTGAGAATCACCGTGTTCACCAACAGGAAGTCTTGATCAATGGCTCATAGACTCATCGAGGAGGAGAGAACTCGATATCCCGTTTCA
   H L R I T G V H H Q K E V L D Q M A H R L I E E A E K L D I P F Q
700 GTTTAATCCCGTTGTGAGTAGCTTAGAGTGCTTAAACGTGGAGCAGCTGCGTGTAAAGACAGGAGAGGCTTAGCTGTAAGCTCGGTTCTCAGTTGCA
   F N P V V S S L E C L N V E Q L R V K T G E A L A V S S V L Q L H
800 TAACTTCTGGCCTCTGATGTGACCAACAACATGGACACAGCTGAGCGGCGACTCGGCCTCTTCTTTGGCTCTTCTAATCAAGAAAGATCATCGA
   N F L A S D V T N N N G H S L S G D S A S S L P L S N S R K I I D
900 TAGTTTCTCAATGAATATGGGTTTGTCTCCCAAGATCATGGTGGTCACTGAGCAAGACTCAGACCACAACGGCTCCAGGTGATGGAGAGACTATT
   S F L N A I W G L S P K I M V V T E Q D S D H N G S T V M E R L L
1000 GGAATCACTCTACACTACGCAGCTTTGTTGATTGCTTGGAGACGAAAGTTCCAAGAAGTCTCAAGACAGATGAAAGTGGAAGATGCTTTTCGG
   E S L Y T Y A A L F D C L E T K V P R T S Q D R M K V E K M L F G
1100 AGAGGAGATCAAGAATCATAGCGTGTGAGGATCTGAGAGAAGAGAAACATGAGAAGCTCGAGAAATGGAGCCAGAGGATGATTGCTGCTGTTT
   E E I K N I I A C E G S E R R E R H E K L E K W S Q R I D L A G F
1200 TGGGAATGTTCTCTTAGCTATTATGCCATGTTCAGGCTAGGAGGTGCTTCAAGGGTATGGTTTGTATGGGTATAGGATCAAGAAGAGAGTGGGTG
   G N V P L S Y Y A M L Q A R R L L Q G Y G F D G Y R I K E E S G C
1200 TGCAGTGATTGCTGGCAAGATAGACCACTATACGCTTTCAGCTTGGAGATGCAAGAAGTGAATGA
   A V I C W Q D R P L Y S V S A W R C K K *

```

图2 *BoSCL3* 基因的全长序列和推测的氨基酸序列。下划线为引物序列。

Fig. 2 Full-length sequence of *BoSCL3* gene and deduced amino acid sequence. Primer sequence is marked with underline.

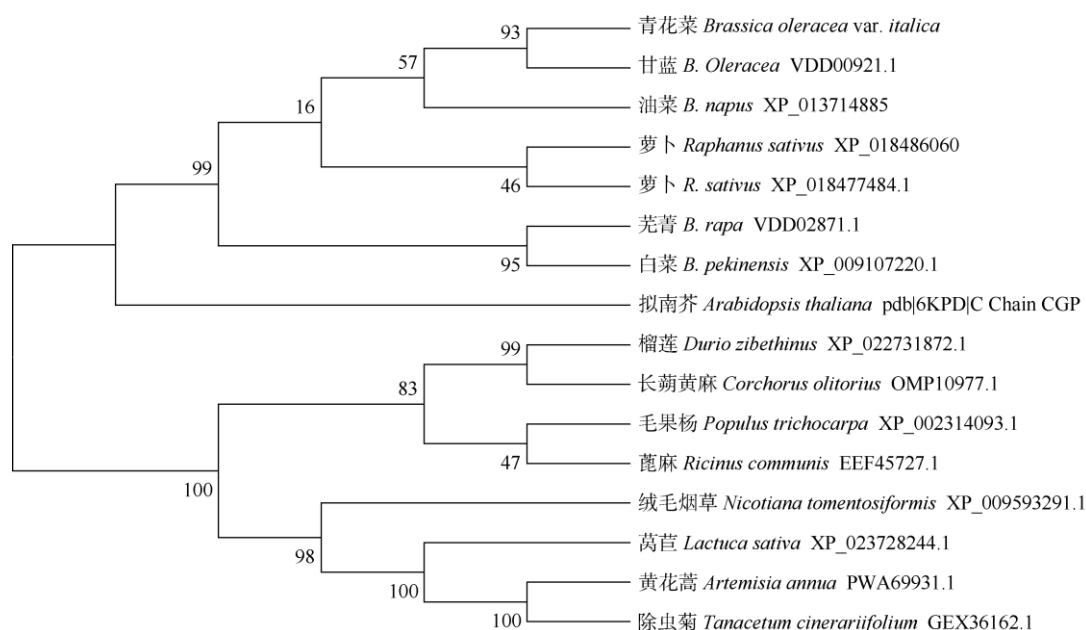


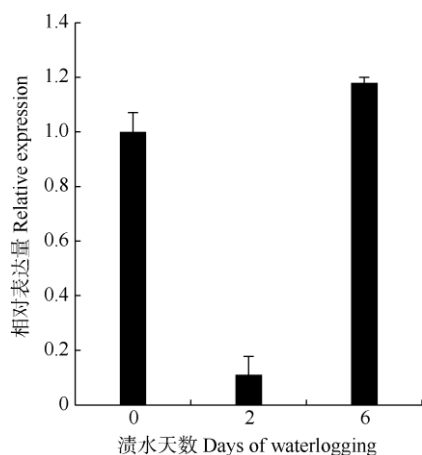
图 3 基于 SCL3 蛋白氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees based on amino acid sequence of SCL3 protein

的甘蓝、油菜、芜菁、萝卜、白菜和拟南芥聚在同一分支上,表明同科植物的 SCL3 蛋白具有较高的同源性。

2.4 渍水胁迫下 *BoSCL3* 基因的表达

利用实时荧光定量 PCR 技术检测青花菜 *BoSCL3* 渍水处理不同时间的表达特征。结果表明(图 4),青花菜 *BoSCL3* 基因在渍水胁迫处理 2 d 时的表达受到抑制,相对表达量仅为 0.11。其后随着渍水胁迫时间的延长,表达量呈现上升的趋势,处理 6 d 的相对表达量为 1.18。

图 4 渍水胁迫下 *BoSCL3* 基因的表达Fig. 4 Expression of *BoSCL3* gene under waterlogging stress

3 结论和讨论

本研究从青花菜中成功克隆到 *BoSCL3* 基因,对其编码蛋白的亲/疏水性、结构域、二级结构和同源性进行了预测分析并构建了系统进化树。对渍水胁迫下青花菜 *BoSCL3* 基因的表达进行了分析,为进一步揭示青花菜 *BoSCL3* 基因响应渍水胁迫的应答机制提供了一定的理论依据。

转录因子对于增强植物对逆境的抵抗力和适应能力具有重要作用^[16-17]。本试验克隆得到 1 个青花菜 *BoSCL3* 基因,其编码的蛋白具有 GRAS 家族的保守结构域,为疏水性蛋白。石瑞等^[18]报道的佛手(*Citrus medica* var. *sarcodactylis*)的 GRAS 和陈裕坤等^[19]报道的龙眼(*Dimocarpus longan*)胚性愈伤组织 DIGRAS4 与 DIGRAS54 的结构、性质相似。将 *BoSCL3* 蛋白的氨基酸序列与芥蓝、油菜、萝卜、白菜、拟南芥等植物中 GRAS 家族的 SCL3 的氨基酸序列进行比对,表明约有 80% 以上的同源性,推测 SCL3 在功能上存在一定的保守性。

逆境胁迫是限制作物生长的重要因子,严重时可导致植株形态发生变化。*GRAS* 基因可在植物受到逆境胁迫时,产生应答机制来提高植物的抗逆性,直接表现为表达量的变化。本研究中,渍水胁迫处理可对 *BoSCL3* 基因的表达量产生影响,说明 *BoSCL3* 基因可能参与了青花菜的渍水胁迫响应。

前人的研究表明, 水稻 *OsGRAS1* 的表达量在受到盐、干旱和外源 ABA 的胁迫时表达上调^[20]。郭华军等的研究也表明拟南芥 13 个 *GRAS* 基因在干旱和渗透胁迫处理下的表达均比对照显著上升^[21]。本试验中青花菜 *BoSCL3* 基因的表达量随着渍水胁迫时间的延长, 呈先急剧下降后快速上升的变化趋势, 表明 *BoSCL3* 基因可能在青花菜渍水胁迫调控过程中具有重要作用。

参考文献

- [1] TORRES-GALEA P, HIRTREITER B, BOLLE C. Two GRAS proteins, SCARE-CROW-LIKE21 and PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION1, function cooperatively in phytochrome a signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 2013, 161(1): 291–304. doi: 10.1104/pp.112.206607.
- [2] ZHOU L J, YANG Z M, ZHANG F C, et al. Expression analysis and cloning of GRAS transcription factor gene from *Halostachys caspica* [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2013, 33(6): 1091–1097. doi: 10.3969/j.issn.1000-4025.2013.06.004.
周莲洁, 杨中敏, 张富春, 等. 新疆盐穗木 GRAS 转录因子基因克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2013, 33(6): 1091–1097. doi: 10.3969/j.issn.1000-4025.2013.06.004.
- [3] PYSH L D, WYSOCKA-DILLER J W, CAMILLERI C, et al. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes [J]. *Plant J*, 1999, 18(1): 111–119. doi: 10.1046/j.1365-3113.1999.00431.x.
- [4] HOU M Y. Cloning, transformation and functional analysis of GRAS transcription factor family genes in rice [D]. Jilin: Jilin University, 2013: 9.
侯梦筠. 水稻 GRAS 转录因子家族基因克隆、遗传转化与功能分析 [D]. 吉林: 吉林大学, 2013: 9.
- [5] TIAN C G, WAN P, SUN S H, et al. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(4): 519–532. doi: 10.1023/b:plan.0000038256.89809.57.
- [6] SONG X M, LIU T K, DUAN W K, et al. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. *Genomics*, 2014, 103(1): 135–146. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.12.004.
- [7] HAN W Y, LI G R, FENG L, et al. Genome-wide analysis of GRAS transcription factors in *Ricinus communis* and response to abiotic stresses [J]. *J Plant Genet Resour*, 2020, 21(1): 252–259. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.12.004.
韩雯毓, 李国瑞, 风兰, 等. 蓖麻 GRAS 转录因子家族的全基因组分析及逆境胁迫响应 [J]. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(1): 252–259. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.20190521002.
- [8] YIN L F, WANG Z Y, WU Z Y, et al. Cloning and functional analysis of *ZmGRAS31* gene in maize [J]. *Acta Agron Sin*, 2019, 45(7): 1029–1037. doi: 10.3724/SPJ.1006.2019.83070.
殷龙飞, 王朝阳, 吴忠义, 等. 玉米 *ZmGRAS31* 基因的克隆及功能研究 [J]. *作物学报*, 2019, 45(7): 1029–1037. doi: 10.3724/SPJ.1006.2019.83070.
- [9] REN L J. Cloning and functional analysis of tomato GRAS family gene *SIFSR* [D]. Chongqing: Chongqing University, 2014: 12.
任丽军. 番茄 GRAS 转录因子家族基因 *SIFSR* 的克隆及其功能研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2014: 12.
- [10] LI X Y, JIN J J, ZHAO Y L, et al. Cloning and expression analysis of promoter of GRAS transcription factor from *Tamarix hispida* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2016, 32(2): 28–32.
李雪燕, 金胶胶, 赵玉琳, 等. 柽柳 GRAS 转录因子基因启动子克隆和表达分析 [J]. *中国农学通报*, 2016, 32(2): 28–32.
- [11] XU K, CHEN S J, LI T F, et al. *OsGRAS23*, a rice GRAS transcription factor gene, is involved in drought stress response through regulating expression of stress-responsive genes [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15(1): 141. doi: 10.1186/s12870-015-0532-3.
- [12] PEI X L, JING Z G, TANG Z, et al. Cloning and expression analysis of a pollen development gene *MF21* in broccoli [J]. *Biotechnol Bull*, 2015, 31(3): 102–107. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.04.014.
裴徐梨, 荆赞革, 唐征, 等. 青花菜花粉发育基因 *MF21* 的克隆及表达特征分析 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31(3): 102–107. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.04.014.
- [13] LI X N, XIAO H Z, WAN S L, et al. Cloning and expression analysis of *HbP450* gene in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. [J]. *Chin J Trop Crops*, 2017, 38(11): 2100–2105. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.11.017.
李晓娜, 肖厚贞, 万三连, 等. 巴西橡胶树 *HbCYP450* 基因克隆与表达分析 [J]. *热带作物学报*, 2017, 38(11): 2100–2105. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.11.017.
- [14] CAO X S, WANG J, ZHANG Y Y, et al. Cloning and bioinformatic analysis of *MK* gene from *Cinnamomum camphora* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2017, 38(12): 2302–2309. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.12.017.
曹先爽, 王进, 张瑶瑶, 等. 香樟 *MK* 基因的克隆与生物信息学分析 [J]. *热带作物学报*, 2017, 38(12): 2302–2309. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.12.017.
- [15] GUO Y Y. Gene cloning and functional analysis of the GRAS transcription factor family from Maize (*Zea mays* L.) [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015: 21.

- 郭玉玉. 玉米 GRAS 转录因子家族基因克隆与功能验证 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015: 21.
- [16] LI A Y, LIU H, LI X Y, et al. Cloning and subcellular localization analysis of two GRAS genes from *Poncirus trifoliata* [J]. *Genom Appl Biol*, 2012, 31(3): 240–248. doi: 10.3969/gab.031.000240.
- 李阿英, 刘洪, 李晓颖, 等. 枳两个 GRAS 基因 cDNA 全长的克隆及其亚细胞定位分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(3): 240–248. doi: 10.3969/gab.031.000240.
- [17] NIU Y L. Bioinformatic analysis and identification of some resistance-associated genes of GRAS gene family in tomato [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017: 1.
- 牛义岭. 番茄 GRAS 基因家族生物信息学分析及部分抗性相关基因鉴定分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017: 1.
- [18] SHI R, CAO Y B, CHEN W R, et al. On cDNA cloning and expression analysis of GRAS gene in fingered citron [J]. *J Zhejiang Norm Univ (Nat Sci)*, 2011, 34(4): 446–451. doi: 10.3969/j.issn.1001-5051.2011.04.016.
- 石瑞, 曹诣斌, 陈文荣, 等. 佛手 GRAS 基因的克隆及表达分析 [J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 34(4): 446–451. doi: 10.3969/j.issn.1001-5051.2011.04.016.
- [19] CHEN Y K, LIN Y L, TIAN Q L, et al. Cloning and expression analysis of DIGRAS4 and DIGRAS54 from embryogenic callus of *Dimocarpus longan* Lour. [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2014, 34(2): 215–224. doi: 10.7606/j.issn.1000-4025.2014.02.0215.
- 陈裕坤, 林玉玲, 田奇琳, 等. 龙眼胚性愈伤组织 DIGRAS4 与 DIGRAS54 基因的克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2014, 34(2): 215–224. doi: 10.7606/j.issn.1000-4025.2014.02.0215.
- [20] DING X E, LIU H Y, LUO L J. Cloning and diversity analysis of the OsGRAS1 promoter in rice [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2010, 26(4): 8–14. doi: 10.3969/j.issn.1000-3924.2010.04.003.
- 丁雪峰, 刘鸿艳, 罗利军. 水稻 OsGRAS1 启动子的克隆及多样性分析 [J]. *上海农业学报*, 2010, 26(4): 8–14. doi: 10.3969/j.issn.1000-3924.2010.04.003.
- [21] GUO H J, JIAO Y N, DI C, et al. Discovery of *Arabidopsis* GRAS family genes in response to osmotic and drought stresses [J]. *Chin Bull Bot*, 2009, 44(3): 290–299. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2009.03.005.
- 郭华军, 焦远年, 邸超, 等. 拟南芥转录因子 GRAS 家族基因群响应渗透和干旱胁迫的初步探索 [J]. *植物学报*, 2009, 44(3): 290–299. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2009.03.005.