



乙烯诱导的油茶酵母cDNA文库构建及CoFAD7上游调控因子筛选

马晓玲^{1,*}, 陈佳昕¹, 柏芮¹, 欧阳翔^{2,*}

¹中南林业科技大学, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 长沙410004

²湖南杂交水稻研究中心, 杂交水稻全国重点实验室, 长沙410125

*共同通信作者: 马晓玲(fanxiaoling@163.com)、欧阳翔(xiangoy84@aliyun.com)

摘要: 外施乙烯可促进油茶种仁 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)积累, *FAD7*是影响ALA合成的关键基因。为了研究油茶*CoFAD7*表达的分子调控机制, 本研究克隆*CoFAD7*的启动子, 构建乙烯诱导的油茶种仁酵母单杂交cDNA文库, 并通过酵母单杂交技术筛选与*CoFAD7*启动子结合的上游调控因子。结果表明, 1 395 bp的*CoFAD7*启动子序列含有多种激素调节与环境胁迫相关的顺式元件及转录因子结合元件。构建的cDNA文库库容为 9.5×10^6 CFU $\cdot$ mL⁻¹, 平均插入片段长度约1 000 bp。通过酵母单杂交筛选获得4个转录因子AP2-3、NFYC-1、F-box和ZFP1, 可以与*CoFAD7*启动子结合。以上结果为进一步探究*CoFAD7*基因响应乙烯调控ALA含量的分子机理提供参考。

关键词: 油茶; *CoFAD7*启动子; 酵母单杂交; cDNA文库; 转录因子

Construction of yeast cDNA library of *Camellia oleifera* induced by ethylene and screening of *CoFAD7* upstream regulators

MA Xiaoling^{1,*}, CHEN Jiaxin¹, BAI Rui¹, OUYANG Xiang^{2,*}

¹Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest Trees of the Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

²State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, China

*Co-corresponding authors: Ma XL (fanxiaoling@163.com), Ouyang X (xiangoy84@aliyun.com)

Abstract: Exogenous ethylene could promote the accumulation of α -linolenic acid (ALA) in *Camellia oleifera* seeds, *FAD7* is a key gene affecting ALA synthesis. In order to elucidate the molecular regulatory mechanism of *CoFAD7* expression in *C. oleifera*, this study cloned the promoter of *CoFAD7* and constructed yeast one hybrid cDNA library of *C. oleifera* seeds induced by ethylene. The upstream regulatory factors that bind to the *CoFAD7* promoter were screened through yeast one hybrid technology. The results indicate that the 1 395 bp *CoFAD7* promoter sequence contains multiple *cis*-elements and transcription factor binding elements related to hormone regulation and environmental stress. The constructed cDNA library had a capacity of 9.5×10^6 CFU $\cdot$ mL⁻¹ and an average insertion fragment length of approximately 1 000 bp. Four transcription factors AP2-3, NFYC-1, F-box and ZFP1 were obtained through yeast one hybrid screening, which can bind to the *CoFAD7* promoter. The above results lay the foundation for further exploring the mo-

收稿 2024-04-09 修定 2024-06-25

资助 湖南省自然科学基金(2023JJ41036)和长沙市自然科学基金(kq2208412)。

molecular mechanism of *CoFAD7* gene responding to ethylene on regulation of ALA content.

Key words: *Camellia oleifera*; the promoter of *CoFAD7*; yeast one hybrid; cDNA library; transcription factor

油茶(*Camellia oleifera*)是我国重要的木本食用油料树种,其最主要的产品茶油是国际粮农组织重点推荐的健康型食用油之一,被誉为“东方橄榄油”。茶油中的脂肪酸 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)含量相对较低,ALA是人体必需但不能自身合成的 ω -3系列不饱和脂肪酸(Baker等2016),其在茶油中含量的高低直接决定了油茶的品质。

脂肪酸去饱和酶基因家族(*fatty acid desaturases*, *FADs*)成员是植物ALA合成的关键基因,对于改变不饱和脂肪酸的成分含量具有重要作用。在植物中,亚油酸去饱和酶(ω -3 *FAD*)是催化亚油酸(linoleic acid, LA)生成ALA的关键酶, ω -3 *FAD*由*FAD3*、*FAD7*和*FAD8*组成(Peng等2020)。目前通过基因组和转录组的研究技术和方法已极大丰富了 ω -3 *FAD*基因家族的鉴定及研究(吴端等2020)。其中,*FAD7*是ALA合成的关键酶。在烟草中过表达拟南芥*AtFAD7*基因可以显著增加叶片中的三烯酸脂肪酸(如ALA C18:3)含量(徐华祥等2023)。在拟南芥中过表达甜高粱*FAD7*后,促进了LA向ALA的转化(宋玉双和隋娜2019)。然而,目前针对油茶*FAD7*基因的研究还较少,尤其是缺乏关于*FAD7*网络调控机制的研究。

酵母单杂交技术能够用来分析和鉴定靶基因启动子与转录因子的结合。近年来,通过建立酵母单杂交库以及利用诱饵载体筛选出与其互作的蛋白质的相关研究日益增多。例如,通过构建关于油棕果皮的酵母单杂交文库,并利用酵母单杂交技术筛选获得与*PpABI5*启动子结合的两个转录因子*PpDAM3*和*PpDAM5*(郇蕾等2017);利用酵母单杂交文库筛选获得了巨峰葡萄*VvFT*基因的上游调控因子*VvDnaJ10*(黄桂媛等2020);通过酵母单杂交筛选获得2个转录因子*IbMYB11*和*IbTGA2.2*,可以与甘薯*IbHQT1*启动子结合(徐靖等2023);利用酵母单杂交文库技术筛选获得水稻*LAZY1*的上游调控因子*OsMBF1*(黄小龙等2023)。

我们前期研究发现,乙烯在促进油茶种仁LA和ALA的积累中起着重要作用(Li等2023)。前人关

于*FAD7*基因的研究主要集中在基因的克隆和表达分析上,但对于调控*FAD7*基因的上游转录因子知之甚少。本研究以油茶良种‘华硕’为研究材料,克隆获得*CoFAD7*基因的启动子序列,明确其顺式作用元件组成和转录因子结合位点,并构建酵母单杂交诱饵载体和cDNA文库,通过酵母单杂交技术筛选与*CoFAD7*启动子结合的上游转录因子,为进一步揭示*CoFAD7*在油茶ALA合成中的作用和转录调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为国审油茶(*Camellia oleifera* Abel.)良种‘华硕’,种植于中南林业科技大学油茶试验基地长沙市望城区东城镇(28°05'N/113°21'E)。选取长势基本一致,且无明显病虫害,树龄为11年的‘华硕’油茶树20株,在授粉后285 d进行乙烯利(1.00 g·L⁻¹)和清水(对照)喷施实验,每组10株,喷施时间为上午9时,采用手工喷雾器喷施整株油茶树,一直持续到油茶的叶片上开始滴水结束,采集处理后30 d的油茶种仁样品,每种处理的采样方式为从树的4个方向(高度一致、树冠中部)随机采集果实10个,剥取的种仁样品用液氮速冻后储存于-80°C冰箱,备用。

1.2 方法

1.2.1 *CoFAD7*启动子的克隆与分析

参考狭叶油茶基因组数据(BioProject PRJNA-780224)中的*CoFAD7*基因上游约1 400 bp序列设计特异引物*CoFAD7-F1* (5'-GGGAGGAGGTTTGG-GTTAT-3')和*CoFAD7-R1* (5'-GGGGGGTACTGAC-CTTGA-3'),采用油茶‘华硕’的基因组DNA作为模板,PCR扩增后,将扩增产物与pCE2 TA/Blunt-Zero载体(Vazyme)连接,转化大肠杆菌的DH5 α 感受态细胞,并选择单克隆进行菌落PCR检测,最后,将阳性的单克隆菌株送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。利用在线软件PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

对*CoFAD7*启动子区顺式作用元件进行预测。

1.2.2 乙烯诱导油茶种仁酵母单杂交cDNA文库构建

采用Trizol法提取乙烯利和对照处理后30 d的油茶种仁总RNA, 通过核酸蛋白分析仪NanoDrop 2000C (Thermo)来对RNA的纯度和完整性进行检测。使用FastTrack[®] MAG mRNA Isolation Kits (Invitrogen)分离纯化样本的mRNA。参照CloneMiner II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen)说明书, 构建酵母单杂交cDNA文库(冯志娟等2023)。首先将10 μ L细菌原始稀释1 000倍后, 从中取50 μ L涂布LB平板(氨苄青霉素抗性), 37°C条件下培养1 d后进行计数。文库滴度(CFU $\cdot$ mL⁻¹)=平板上的克隆数/50 μ L $\times$ 1 000倍 $\times$ 1 $\times$ 10³ μ L, 文库库容(CFU)=滴度(CFU $\cdot$ mL⁻¹) $\times$ 文库菌液总体积(mL)。最后通过鉴定菌落PCR产物大小来确定插入片段的长度。

1.2.3 诱饵载体转化酵母菌株及自激活检测

以含有*CoFAD7*启动子正确序列的pCE2 TA/Blunt-Zero重组载体为模板, 利用引物CoFAD7-F2 (5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC-GAATTCGGGAGGAGGTTTTGGGTTATTTTA-ACCACAAAAG-3')和CoFAD7-R2 (5'-ACCGCGGATCGATTCGCGAACGCGTGAGCTCTAGAGAC-CCAGAGAGAGAGAGAAAGACGATTCAAG-AAATTTGGATTTC-3')进行PCR扩增。利用同源重组的方法, 将*CoFAD7*启动子序列连接到pHIS2载体(南京佰壹科生物技术有限公司)中, 获得pHIS2-*CoFAD7*pro诱饵载体。为确定合适的3-氨基-1,2,4-三氮唑(3-amino-1,2,4-triazole, 3-AT)浓度, 将pHIS2-*CoFAD7*+pGAD53m和pHIS2-p53+pGAD53m质粒通过LiAC的方法分别转入酵母Y187菌株中。从每个平板上随机的挑取6个单菌落, 用pHIS2-F (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')/pHIS2-R (5'-GCCAGGAATTTCTAGACCGC-3')引物进行PCR验证, 全部为正确克隆, 6个克隆用灭菌水悬浮, 调节OD₆₀₀=0.6, 分别点至添加不同3-AT浓度(0、10、20、30、40、50、75和100 mmol $\cdot$ L⁻¹)的SD/-TLH平板上, 30°C培养3~5 d, 根据菌落的生长情况, 来确定3-AT的最低浓度。其中pHIS2-p53+pGAD53m为阳性对照。

1.2.4 酵母单杂交文库的筛选

在明确合适的3-AT浓度后, 通过共转化的方法进行酵母单杂交筛选。用含有正确pHIS2-*CoFAD7*诱饵质粒的Y187酵母转化子作为受体菌制备感受态, 然后把文库质粒pGADT7-油茶核文库质粒DNA转入其中, 涂SD/-TLH+适宜浓度3-AT平板, 30°C培养3~5 d。将筛库平板上长出的初始阳性转化子划线于SD/-TLH+适宜浓度3-AT选择平板, 同样在30°C恒温条件培养3~5 d, 能够正常生长的可视为互作蛋白。

1.2.5 酵母阳性克隆鉴定与测序比对

随机挑选48个克隆转移到SD/-TLH+适宜浓度3-AT平板上, 30°C恒温培养3~7 d, 观察菌落生长, 挑取四缺平板上生长的菌落, 采样快速扩增酵母阳性克隆试剂盒(南京佰壹科生物技术有限公司), 用T7-F (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3')/AD-R (5'-GGCAAAACGATGTATAAATGA-3')引物进行菌落PCR扩增, 并送至北京擎科生物科技股份有限公司测序; 去除空载体和重复序列, 并对最终获得的序列进行生物信息学分析。

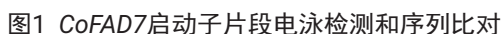
1.2.6 酵母阳性克隆回转验证

根据比对的结果, 将得到的序列的阳性克隆分别用无菌水稀释至OD₆₀₀=0.6, 分别点至SD/-TL、SD/-TLH、SD/-TLH+适宜浓度3-AT平板上; 30°C培养3~5 d, 对酵母阳性克隆菌落生长情况进行拍照观察。

2 实验结果

2.1 *CoFAD7*启动子的克隆与顺式作用元件分析

以‘华硕’基因组DNA为模板, 在*CoFAD7*基因起始密码子ATG上游和编码区内分别设计上、下游引物进行PCR扩增, PCR产物条带约为1 600 bp, 与预期片段大小基本一致(图1-A), PCR产物经胶回收、连接载体和转化后, 选择阳性克隆进行测序, 将测序结果与公开的二倍体狭叶油茶基因组(Gong等2022)比对发现, 克隆的‘华硕’*CoFAD7*启动子序列长度为1 395 bp, 该序列与狭叶油茶基因组序列比对存在部分序列差异, 这些差异包括单个碱基的突变以及多个碱基的增加或缺失等(图



A: *CoFAD7*启动子片段电泳检测, M: D2000 plus DNA Ladder; 1: *CoFAD7*启动子片段; B: *CoFAD7*启动子序列比对, C. lanceole和Huashuo.se分别代表二倍体狭叶油茶和六倍体油茶‘华硕’。

时,检测组中的酵母细胞生长会完全受到抑制,而阳性对照组则生长正常。结果表明,当3-AT浓度在75 mmol·L⁻¹时,pHIS2-CoFAD7在酵母Y187中不会发生自激活(图2),因此,75 mmol·L⁻¹ 3-AT可作为最低抑菌浓度进行酵母单杂交文库筛选。

2.2 pHIS2-CoFAD7诱饵质粒3-AT浓度筛选

为了筛选*CoFAD7*基因的上游调控因子,我们构建了油茶种仁的酵母文库。分别提取对照和乙烯利处理后30 d的油茶种仁样品的总RNA,电泳检测能够清晰地看到28S和18S两条带(图3-A),表明RNA的完整性良好;测定的OD₂₆₀/OD₂₈₀值分别为1.97和2.05,浓度分别为1 952.6和1 736.3 ng·μL⁻¹,说明RNA的纯度和浓度质量高,可用于cDNA文库的构建。分离纯化的mRNA经检测合格后用于cDNA文库的构建。

将纯化后的双链cDNA与线性化的pGADT7-Rec载体共转化酵母菌株Y187, 获得酵母单杂交文库菌, 构建的cDNA文库库容为 9.5×10^6 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$, 总克隆数为 1.9×10^7 CFU, 大于 10^7 (图3-B)。单克隆菌落PCR扩增和检测结果表明, 平均插入片段长度约1 000 bp, 文库阳性率100% (图3-C), 表明该文库

表1 *CoFAD7*启动子中顺式作用元件分布
Table 1 Distribution of *cis*-acting elements in *CoFAD7* promoter

元件名称	位置	序列(5'→3')	出现次数	功能
ABRE	+937	ACGTG	1	脱落酸响应元件
ARE	+134, -381	AAACCA	2	厌氧诱导必需元件
AT~TATA-box	+553, -1 079, -1 285, -1 287, -1 289, -1 291, -1 293	TATATA	7	—
Box4	+354, +544, -869, -880	ATTAAT	4	部分光响应模块
CAAT-Box	-229, +258, -280, -367, -414, -522, +776, +998, -1 027, +1 110, -1 140, -1 152, -1 298, -1 302, -1 306, +1 321, +1 353	CAAT/CAAAT	17	启动子和增强子区域
ERE	-451, +1 010	ATTTTAAA	2	乙烯响应元件
G-Box	-936	CACGTC	1	光响应元件
GARE-motif	-1 064	TCTGTTG	1	赤霉素反应元件
GT1-motif	-21, -146, +154	GGTTAA	3	光响应元件
HD-Zip3	+83	GTAAT(G/C)ATTAC	1	蛋白结合位点
MYB	+22, +257, +1 064, +1 168	TAACCA/CAACCA/CAACAG	4	MYB识别和结合元件
MYB-like sequence	+22	TAACCA	1	MYB识别和结合元件
MYC	+366, -834, +1 026	CATTG/CATGTG	3	MYC识别和结合元件
MYB-binding site	+1 064	CAACAG	1	MYB识别和结合元件
O2-site	+283	GATGATGTGG	1	参与玉米蛋白代谢调节的顺式调控元件
TATA	-783	TATAAAAT	1	—
TATA-box	+302, +303, +336, -439, +534, +552, +553, +554, +555, +562, +563, -593, -594, -595, +596, -657, +658, +778, -779, -784, -785, -786, -787, +819, -820, -821, +842, -843, -959, -967, -969, -1 078, -1 079, -1 081, -1 196, -1 285, -1 286, -1 287, -1 288, -1 289, -1 290, -1 291, -1 292, -1 293, -1 294, -1 295	ATATAT/TATA/TACATAAA/ TACAAAA/TATTTAAA/ TATATA/TATAAAA/TATAAA/ TATAA/ATATAA/ATTATA/ TATA/TATACA	46	核心启动子元件
Unnamed__4	-1, -4, -1 214, -1 217, +1 238	CTCC	5	—
WUN-motif	+1 354	AAATTTCTT	1	—

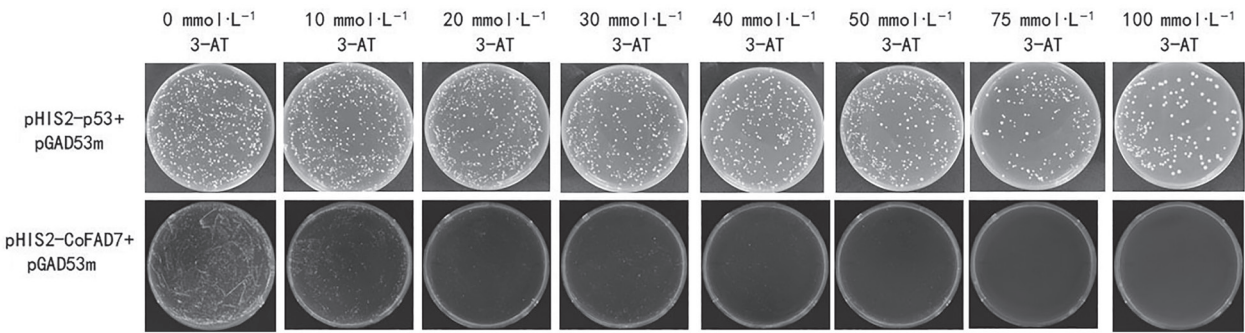


图2 pHIS2-CoFAD7诱饵载体自激活检测
Fig. 2 Self-activation of pHIS2-CoFAD7 bait vector

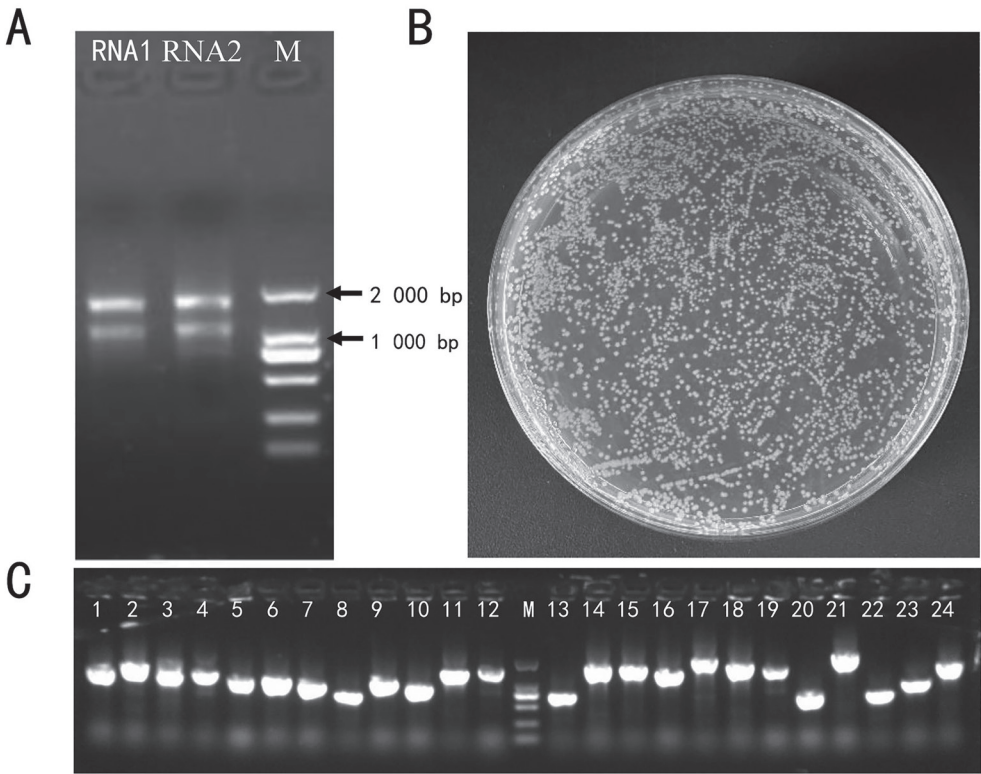


图3 酵母单杂交文库的构建
Fig. 3 Construction of yeast one hybrid library

A: 油茶‘华硕’种仁总RNA的电泳检测; B: 酵母文库菌的生长; C: 菌液PCR检测酵母文库cDNA插入片段大小。

符合酵母单杂交试验的要求。

2.4 CoFAD7启动子片段与油茶cDNA文库的酵母单杂交筛选

酵母单杂交筛选结果发现, 48个单克隆菌落可以在SD/-TLH+75 mmol·L⁻¹ 3-AT平板上正常生

长, 将48个阳性酵母克隆经菌落PCR扩增和测序后, 去掉空载和重复序列, 共获得41个可能与CoFAD7启动子结合的蛋白, 包括LOC114270465、LOC114300909、LOC114278505、LOC114285887、LOC114287626、LOC114286844、LOC114322647

和LOC114294009共8个功能未知的蛋白, 以及注释为50S核糖体蛋白L29 (50S ribosomal protein L29)、GID复杂亚基4同系物(glucose-induced degradation protein 4 homolog)、24-亚甲基甾醇C-甲基转移酶2 (24-methylenesterol C-methyltransferase 2-like)、无色花青素还原酶(leucoanthocyanidin reductase-like)、70 kDa热休克蛋白2 (heat shock cognate 70 kDa protein 2)等29个蛋白。另外, 还筛选到了4个转录因子, 分别为AP2-3 (AP2/ERF类转录因子, g2312034530S494196-11)、NFYC-1 (核转录因子Y亚基, g2312034543S494196-24)、F-box (F-box转录因子, g2312034544S494196-25)和ZFP1 (锌指蛋白转录因子, g2312034567S494196-48) (表2), 这4个转录因子可能与*CoFAD7*启动子存在潜在的互作关系。

2.5 酵母阳性克隆回转验证

将得到的序列的阳性克隆分别用无菌水稀释至 $OD_{600}=0.6$, 点至SD/-TL、SD/-TLH、SD/-TLH+

75 mmol·L⁻¹ 3-AT缺陷平板上, 30℃培养3~5 d。结果表明, 筛选得到的41个阳性克隆均能在上述三种缺陷平板上生长(图4)。

3 讨论

油茶中ALA含量的高低决定了茶油的品质, *CoFAD7*是LA向ALA转化的关键酶基因。我们前期研究发现外源乙烯可诱导油茶种仁中ALA的积累, 同时外源乙烯还能显著促进*CoFAD7*基因的表达(Li等2023), 暗示乙烯可能通过促进*CoFAD7*基因的表达促进油茶种仁ALA的积累。在本次研究中, 参考了二倍体狭叶油茶基因组中的*CoFAD7*基因启动子序列, 并成功克隆了油茶‘华硕’的*CoFAD7*启动子序列, 然后经过分析和预测, 发现该序列中不仅包含15种已知功能的顺式作用调控元件, 还有4种未知功能的顺式作用元件。其中, 主要包括乙烯响应元件、脱落酸响应元件和光响应元件, 以及多个转录因子MYB和MYC等结合位点。并

表2 酵母单杂筛库得到的与*CoFAD7*启动子作用的转录因子蛋白

Table 2 Transcription factor proteins interacted with *CoFAD7* promoter by yeast one hybrid screening

基因ID	长度/bp	茶树同源序列	功能注释
g2312034530S494196-11	850	LOC114296982	AP2/ERF类转录因子
g2312034543S494196-24	850	LOC114302393	核转录因子Y亚基
g2312034544S494196-25	850	LOC114261753	F-box转录因子
g2312034567S494196-48	901	LOC114320872	锌指蛋白转录因子

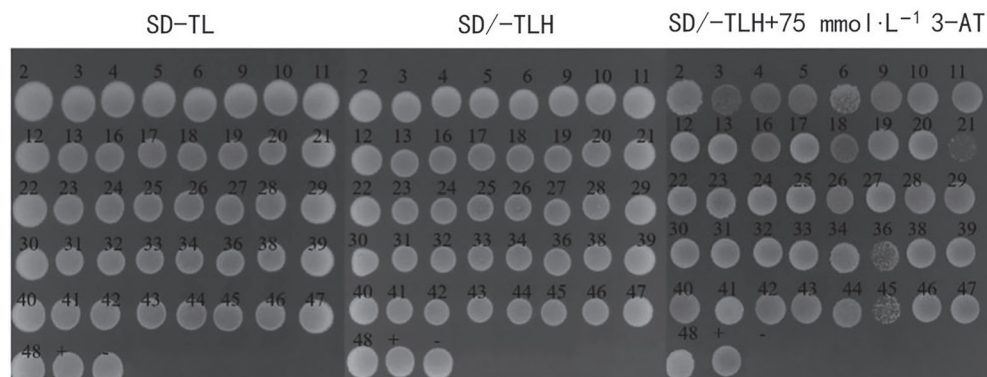


图4 酵母阳性克隆回转验证

Fig. 4 Rotation and confirmation of yeast positive colonies

+: 阳性对照pHIS2-p53+pGAD53m; -: 阴性对照pHIS2-CoFAD7+pGAD53m。

由此推断*CoFAD7*的转录表达可能与乙烯和环境胁迫存在一定关系,其转录表达可能受到这些转录因子的调控。

靶基因的表达在植物的生长发育、次生物质代谢和抗逆反应中具有重要的作用,主要通过转录因子与下游靶基因启动子区的相关顺式作用元件的特异性结合来实现调控(徐靖等2023)。酵母单杂交技术一般是在筛选与靶基因启动子区结合的上游转录因子中发挥作用。通常情况下,评价文库的质量好坏主要取决于cDNA文库的代表性和重组序列的完整性这两个指标,cDNA文库的代表性可用文库的库容量来反映,当文库库容大于等于 1×10^6 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 时,此文库满足低丰度mRNA的筛选要求,文库总克隆数大于等于 1.7×10^5 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 时,此文库被称为有效文库(韩浩章等2023)。本研究以油茶‘华硕’种仁为材料,成功构建了乙烯诱导的酵母单杂交cDNA文库,文库库容为 9.5×10^6 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$,总克隆数为 1.9×10^7 CFU,文库插入片段平均长度约1 000 bp,均满足了酵母单杂交文库完整性、高质量的要求,可用于后续的酵母杂交试验。

本研究通过酵母单杂交技术,以*CoFAD7*启动子序列为诱饵,筛选出4个与*CoFAD7*启动子区结合的转录因子AP2-3、NFYC-1、F-box和ZFP1。植物中ALA的积累与脂肪酸合成的碳流量相关,WRI1就是影响碳流量的关键转录因子之一,WRI1属于AP2/ERF类转录因子,其通过特异性正向调控AC-Case、FAS、CoA等糖酵解和脂肪酸合成过程相关酶基因的表达从而调控ALA的积累(吴端等2020)。F-box蛋白不仅是SCF复合体中泛素连接酶E3的关键组分,还在激素信号传导和植物生长发育等过程中发挥着调节作用。近年来,越来越多的研究表明F-box蛋白介导的泛素降解途径也参与了植物应对非生物及生物胁迫的响应过程(许媛等2015)。NFYC-1和ZFP1转录因子在油脂积累中发挥作用的研究相对较少。这些结果暗示AP2/ERF和F-box家族转录因子均有可能通过调控ALA的合成,从而提高油茶的品质。我们之后将着手于研究油茶中AP2/ERF和F-box家族转录因子对*CoFAD7*转录的调控作用,并对筛选获得的其他功能蛋白

进行功能鉴定,以期完善乙烯信号与油脂合成的调控网络,也为通过基因工程手段改良油茶品质提供理论依据。

参考文献(References)

- Baker EJ, Miles EA, Burdge GC, et al (2016). Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. *Prog Lipid Res*, 64: 30–56
- Feng ZJ, Liu N, Zhang GW, et al (2023). Construction of vegetable pea yeast one-hybrid cDNA library and sugar transporter PsSWEET15 bait vector. *Mol Plant Breed*, 21 (19): 6390–6397 (in Chinese with English abstract) [冯志娟, 刘娜, 张古文等(2023). 菜用豌豆酵母单杂交cDNA文库及糖转运蛋白PsSWEET15诱饵载体构建. 分子植物育种, 21 (19): 6390–6397]
- Gong WF, Xiao SX, Wang LK, et al (2022). Chromosome-level genome of *Camellia lanceoleosa* provides a valuable resource for understanding genome evolution and self-incompatibility. *Plant J*, 110: 881–898
- Han HZ, Zhang LH, Li SH, et al (2023). Construction of cDNA library of *Cinnamomum bodinieri* induced by saline-alkali stress and screening of *CbP5CS* upstream regulators. *Biotechnol Bull*, 39 (9): 236–245 (in Chinese with English abstract) [韩浩章, 张丽华, 李素华等(2023). 盐碱胁迫诱导的猴樟酵母cDNA文库构建及*CbP5CS*上游调控因子筛选. 生物技术通报, 39 (9): 236–245]
- Huan L, Wang XX, Chen XM, et al (2017). Constructing yeast one-hybrid library and screening the potential regulator of *PpABI5* in peach (*Prunus persica*). *Plant Physiol J*, 53 (7): 1259–1266 (in Chinese with English abstract) [郇蕾, 王旭旭, 陈修淼等(2017). 桃ABA信号关键基因*PpABI5*酵母单杂交文库构建及其上游转录因子的筛选. 植物生理学报, 53 (7): 1259–1266]
- Huang GY, Zhang Y, Lin L, et al (2020). Yeast one-hybrid library construction and screening of upstream regulators of *VvFT* promoter in kyoho grape. *J Southern Agric*, 51 (12): 2875–2883 (in Chinese with English abstract) [黄桂媛, 张瑛, 林玲等(2020). 酵母单杂交文库构建及巨峰葡萄*VvFT*基因启动子上游调控因子筛选. 南方农业学报, 51 (12): 2875–2883]
- Huang XL, Sun GL, Ma DD, et al (2023). Construction of yeast one-hybrid library and screening of factors regulating *LAZY1* expression in rice. *Biotechnol Bull*, 39 (10): 1–6 (in Chinese with English abstract) [黄小龙, 孙贵连, 马丹丹等(2023). 水稻幼苗酵母单杂交文库构建及*LAZY1*上游调控因子筛选. 生物技术通报, 39 (10): 1–6]
- Li HB, Ma XL, Wang WQ, et al (2023). Enhancing the accumulation of linoleic acid and α -linolenic acid through the pre-harvest ethylene treatment in *Camellia oleifera*. *Front*

- Plant Sci, 14: 1080946
- Peng ZY, Ruan J, Tian HY, et al (2020). The family of peanut fatty acid desaturase genes and a functional analysis of four ω -3 *AhFAD3* members. *Plant Mol Biol*, 38: 209–221
- Song YS, Sui N (2019). Functional analysis of *FAD7* gene in sweet sorghum. *Biotechnol Bull*, 35 (5): 35–41 (in Chinese with English abstract) [宋玉双, 隋娜(2019). 甜高粱 *FAD7*基因的功能分析. *生物技术通报*, 35 (5): 35–41]
- Wu D, Wang LJ, Yang SM, et al (2020). Advances on formation and regulation mechanism of α -linolenic acid in seeds. *J Plant Genet Resour*, 21 (1): 49–62 (in Chinese with English abstract) [吴端, 王力军, 杨仕梅等(2020). 植物种子 α -亚麻酸形成及调控机理研究进展. *植物遗传资源学报*, 21 (1): 49–62]
- Xu HX, Feng XY, Guo X, et al (2020). Cloning and function analysis of ω -3-fatty acid desaturase 8 gene from *Perilla frutescens*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 39 (8): 1143–1152 (in Chinese with English abstract) [徐华祥, 冯小燕, 郭曦等(2020). 紫苏 ω -3-脂肪酸去饱和酶8基因的克隆与功能研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 39 (8): 1143–1152]
- Xu J, Zhu HL, Lin YH, et al (2023). Cloning of *IbHQT1* promoter and identification of upstream regulatory factors in sweet potato. *Biotechnol Bull*, 39 (8): 213–219 (in Chinese with English abstract) [徐靖, 朱红林, 林延慧等(2023). 甘薯*IbHQT1*启动子的克隆及上游调控因子的鉴定. *生物技术通报*, 39 (8): 213–219]
- Xu Y, Li LX, Yu XM, et al (2015). The functions of F-box protein in plant resistance to stress. *Plant Physiol J*, 51 (7): 1003–1008 (in Chinese with English abstract) [许媛, 李铃仙, 于秀梅等(2015). F-box蛋白在植物抗逆境胁迫中的功能. *植物生理学报*, 51 (7): 1003–1008]