

水稻组蛋白脱乙酰化酶基因 *HDA705* 启动子的克隆与表达特性分析

张伟^{1,2}, 刘勋成¹, 赵金会¹, 张建霞¹, 段俊^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 501650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为探讨水稻 (*Oryza sativa*) 组蛋白脱乙酰化酶基因 *HDA705* 的功能和表达特性, 根据 NCBI 上登录的水稻 *HDA705* 基因 (GenBank 登录号: AK111861) 的序列, 克隆了 5' 端 2 kb 的启动子片段 *proHDA705*, 并构建了 *proHDA705*:GUS 表达载体。通过农杆菌介导法转化水稻, 并获得了转基因株系。GUS 检测结果表明, *proHDA705* 仅在水稻的根、茎、叶及部分颖壳的表皮毛等器官中表达, 而在花器官中不表达, 这表明 *HDA705* 具有组织表达特异性。

关键词: 水稻; 组蛋白脱乙酰化酶; 启动子; GUS

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.01.012

Cloning and Expression Characterization of Histone Deacetylase Gene *HDA705* Promoter in Rice (*Oryza sativa*)

ZHANG Wei^{1,2}, LIU Xun-cheng¹, ZHAO Jin-hui¹, ZHANG Jian-xia¹, DUAN Jun^{1*}

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 501650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to understand the function and expression character of histone deacetylase gene *HDA705* in rice (*Oryza sativa*), 5' terminal promoter sequence was cloned with length of 2 kb based on rice *HDA705* sequence (GenBank accession No.: AK111861), named *proHDA705*. The expression vector of *proHDA705*:GUS was constructed. The *proHDA705*:GUS vector was transformed to rice by *Agrobacterium*-mediated assays. GUS staining assays of transgenic rice showed that *proHDA705* expressed only in root, stem, leaf and some epidermal hair of seed coat, but did not in flower. It was suggested that *HDA705* had tissue specific expression in rice.

Key words: Rice; Histone deacetylase; Promoter; GUS

组蛋白脱乙酰化酶 (Histone deacetylase, HDAC) 通过去乙酰化作用移除染色质组蛋白上的乙酰基, 从而改变染色质的结构并抑制基因的转录^[1-4]。目前, 已有多种 HDACs 在不同植物中被鉴定出来, 根据它们与酵母 HDACs 序列的相似性, 可划分为 3 大类, 一是与酵母 RPD3 和 HDA1 同源的 RPD3/HDA1 超家族; 二是从玉米 (*Zea mays*) 中首次鉴定出来的一类植物特有的 HD2 家族; 三是与

酵母 SIR2 蛋白同源的 SIR2 家族^[5]。植物 HDACs 广泛参与植物的生长发育及对逆境的响应过程中^[6]。目前在水稻中已鉴定出 18 个 HDACs 成员, *HDA705* 属于 RPD3/HDA1 家族成员^[7]。

启动子是一段位于基因上游, 能与 RNA 聚合酶及转录因子特异结合、决定基因转录起始的 DNA 序列。启动子由核心元件和上游元件构成^[8]。植物基因工程中常用的启动子按功能及作用方式

收稿日期: 2013-04-17 接受日期: 2013-05-22

基金项目: 广东省科技计划项目(2011A020102008)资助

作者简介: 张伟, 女, 博士。E-mail: huangzengwei521@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: duanj@scib.ac.cn

可分为3大类,即组成型、诱导型和组织特异型启动子。目前在植物表达载体中常用的是组成型启动子,如花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)花叶病毒 CaMV 35S 启动子、玉米的 Ubiquitin 启动子和水稻的 ActinI 启动子^[9]。在组成型启动子的控制下,外源基因在转基因植物体内组成性表达,不受时间和空间的限制^[10]。然而,外源基因在受体植物内持续、高效的表达往往会引起植物的形态发生改变,从而影响植物正常的生长发育^[11-12]。组织特异性启动子不仅能使得目的基因的表达产物在一定器官或组织部位积累,增加局部表达量,同时也可以避免植物营养的不必要浪费^[13],因此,对组织特异型启动子的研究极为重要。

本研究中,我们克隆了 *HDA705* 的启动子,并构建了 pro*HDA705*:GUS 表达载体,初步分析了 *HDA705* 启动子的表达模式,为 *HDA705* 基因功能的解析及 *HDA705* 启动子在转基因研究中的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 水稻材料

以粳稻(*Oryza sativa* subsp. *japonica*)品种‘日本晴’基因组 DNA 为模板克隆 *HDA705* 的启动子片段,构建好的融合载体转化到粳稻品种‘中花 11’中。用于定量 RT-PCR 分析的材料为萌发 14 d 的‘日本晴’幼苗,经 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 处理 6 h 和 12 h 后,分别提取水稻各器官的 RNA。

1.2 菌株、载体以及生化试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 和载体 pCambia1301 是由本实验室保存;pMD18-T 载体连接试剂盒、限制性内切酶、Ex *Taq* DNA Polymerase、*rTaq* DNA Polymerase 购于宝生物公司,2 \times Reaction Mix、DNA Ladder Marker 购于天根生化科技有限公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司,定量 PCR 试剂 iQTM SYBR[®] Green 试剂盒购自 Bio-Rad 公司。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 启动子序列的克隆

根据 NCBI 上登录的水稻 *HDA705* 基因

(GenBank 登录号:AK111861)的序列,从起始密码子前面 2 kb 的区域设计引物,以粳稻品种‘日本晴’的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。水稻基因组 DNA 采用 CTAB 法提取^[14]。PCR 扩增的引物有上游引物 F: 5'-CGAAGCTTGAGGAGGTTGGG-GAAAACGA-3' 和下游引物 R: 5'-CGCCATGGT-TCGGAGGATTTCTTCTTCT-3'。PCR 反应体系为 50 μL : 包含 2 \times Reaction Mix 25 μL , *rTaq* DNA 聚合酶 1 μL , 上下游引物各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , H₂O 21 μL , 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58.9 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收纯化,克隆到 pMD18-T 载体中,然后采用热激法转化大肠杆菌感受态细胞 JM109,对单克隆菌落进行 PCR 鉴定,选取阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 RNA 的提取、逆转录及定量 RT-PCR 分析

参考 Trizol 试剂盒说明书的操作方法提取水稻 RNA。采用 M-MLV 逆转录酶和 2 μg RNA 并参照试剂说明书进行逆转录反应。定量 RT-PCR 采用 iQTM SYBR[®] Green 试剂盒进行,在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行反应。用于 *HDA705* 表达分析的引物分别为 *HDA705*-F: 5'-GAGTGAGATTGCAGAGCC-3' 和 *HDA705*-R: 5'-GAGTGAGATTGCAGAGCC-3'。以组成性表达的水稻 *Actin* (GenBank 登录号: X15863) 为内参基因。扩增 *Actin* 的引物分别为 *ACTIN*-F: 5'-CGTGACCTTACCGACAACCT-3' 和 *ACTIN*-R: 5'-GCACCTGAACCTTTCTGCTC-3'。

1.5 pro*HDA705*:GUS 融合表达载体的构建

利用测序正确的单克隆大量提取质粒,将提取得到的质粒和载体 pCambia1301 同时用 *Hind* III 和 *Nco* I 进行酶切,回收目的片段、连接,即可得到带有 pro*HDA705*:GUS 的表达载体 pCambia1301:*HDA705P*。采用冻融法将载体转入农杆菌 EHA105,并挑取菌落进行 PCR 鉴定,阳性克隆用于水稻的转化。

1.6 农杆菌转化水稻成熟胚愈伤组织

以粳稻品种‘中花 11’的成熟胚诱导的愈伤组织为受体,采用农杆菌介导的方法,并参照刘巧泉

等^[15]的方法将表达载体 *proHDA705*:GUS 转化到水稻中。

1.7 转基因水稻植株的PCR检测

按照 CTAB 法^[14]从水稻新鲜叶片中提取总 DNA。根据表达载体上 *GUS* 序列设计引物,引物序列为 *GUS*-F:5'-GAGAACTGCATCAGCCGAT-3'; *NOS*-R:5'-GACCGGCAACAGGATTCAAT-3'。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 60 s,共 30 次循环;最后 72℃延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。预期 PCR 产物片段长度为 443 bp。

1.8 GUS活性的分析

GUS 活性的组织化学染色分析参照 Jefferson^[16]的方法。将待测水稻样品浸入 *GUS* 染液中,37℃保温过夜,叶片等绿色组织用 90% 乙醇脱色后观察。

2 结果和分析

2.1 启动子的克隆及表达载体的构建

根据 GenBank 中搜索 *HDA705* 基因的启动子序列设计特异引物,对水稻基因组 DNA 进行 PCR 扩增得到全长的启动子片段,命名为 *proHDA705*(图 1: A)。经双酶切(*Hind* III 和 *Nco* I)后将启动子片段连接到 pCAMBIA1301 载体中。对构建的 pCAMBIA1301-*proHDA705* 载体再用 *Hind* III 和 *Nco* I 进行酶切,得到约 2 kb 大小的片段,经 *Hind* III 和 *Spe* I 双酶切后,获得约 600 bp 大小的片段,由于在 pCAMBIA1301 载体上没有 *Spe* I 酶切位点,而在 *proHDA705* 片段的 600 bp 处有 1 个 *Spe* I 酶切位点,因此可以判断 *HDA705* 启动子已经成功连接到目的载体中(图 1: B)。同时,测序结果也表明该片段与 NCBI 网站上登录的 *HDA705* 基因启动子序列一致,表明 *proHDA705*:GUS 载体构建成功。

2.2 启动子序列分析

经 PlantCARE 在线生物信息学软件分析,在 *HDA705* 启动子区域内含有 TATA-box 和 CAAT-box 等启动子特有的作用元件和多个水杨酸和茉莉

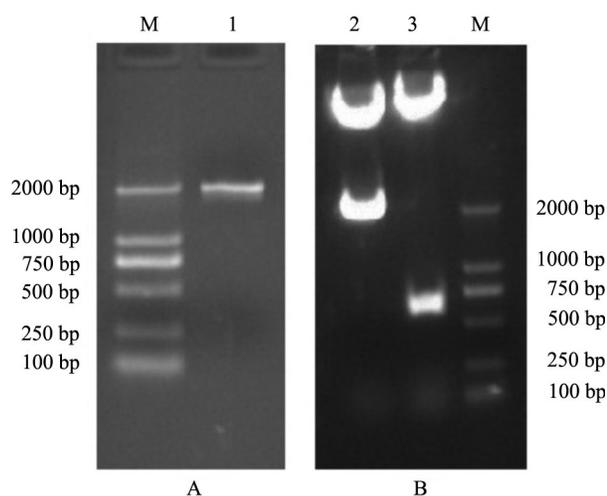


图 1 *HDA705* 启动子的 PCR 扩增(A)和 *proHDA705*:GUS 表达载体的双酶切检测(B)。M: 2 kb DNA marker; 1: *HDA705* 启动子; 2: *Hind* III 和 *Nco* I 双酶切; 3: *Hind* III 和 *Spe* I 双酶切。

Fig. 1 PCR of *HDA705* promoter (A) and *proHDA705*:GUS digested by two enzymes. M: 2 kb DNA marker; 1: *HDA705* promoter; 2: Digestion with *Hind* III and *Nco* I; 3: Digestion with *Hind* III and *Spe* I.

酸等的调控元件(图 2),表明 *HDA705* 可能参与水杨酸和茉莉酸诱导表达的代谢途径。此外,在启动子区域中还含有受干旱及 ABA 诱导的元件,表明 *HDA705* 还可能参与水稻对逆境的响应过程。

2.3 ABA对水稻HDA705基因表达的影响

在 *HDA705* 的启动子中含有 ABA 和 JA 等植物激素响应的顺式作用元件,表明 *HDA705* 的表达可能被这些植物激素调控。萌发 14 d 的水稻幼苗经 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 处理 6 h 和 12 h 后 *HDA705* 的表达水平均被抑制(图 3)。

2.4 proHDA705:GUS的水稻转化及PCR检测

采用农杆菌介导法将 *proHDA705*:GUS 导入水稻愈伤组织,并通过侵染、共培养、筛选、分化以及生根等步骤获得转基因植株。用 CTAB 法提取转基因植株的基因组 DNA,设计特异引物进行 PCR 扩增,获得了目的条带,表明 *proHDA705*:GUS 成功转入水稻植株中(图 4)。

2.5 proHDA705:GUS融合基因的表达

对 PCR 检测结果为阳性的转基因植株的叶、茎、根和花进行 *GUS* 染色检测。结果表明, *proHDA705*:GUS 在转基因水稻的叶、茎、颖壳的部分表皮毛和根等器官中有表达(图 5: A,B,D,E),而

```

1  AGGAGGTTGG GAAAAACGAT CTATGGGCT TTGACACAT GGATATGGGC CTCTCCTGGA TGGCTCATGG CTCTATCGTT TCGCTTCGGG
91  TCGCTTCAGC GTTGGTACGA TAGGCAACAT GGGTGACCAT CCAGATCTGA TCAAAACGGCT GTAGATCAAG TAGATGACGT GGCTTAACCA
181  CAACTCAGAA AATTGTAATAA CTACACTA AGTAGGGATC ACTTGTATGG TATTATAGGA TGCATAGCCT CCACGAAGCT ACGATGGCAA
271  ACATTAATAC AAGAGGAAAC AATCGCTTT AGATATATT GATCATCTTC ACCCACTGTT ACAACACATA TTATACAAGT AACTAAAAGT
361  CAAAAGATA ATTTAAATAT GAGTAATGCT TACATTTAAT CCATGTCAIT TGTGAAGTAT GTATCAITTA CGAGAGAAAC AAATTGTTGT
451  TTCATTAAG TAGAATACCT TCAATATTTT CCAAGCACTT TTATAAAAT ATATGCTCCT CTTACAITTA TAATTTCTGG TTGACCTTA
541  CAITTCACAA GTACACCATA GTTCAAGCAA TGGTTGTTAT GCATTAATTC TCTACTAGTA CTATAACIT AITGTTGTA AAAAAAGATA
631  ATATGTGATG CAAGTAGGAC GACATGCATA TTTGTATACT CCTCCGTTA CATAAAAAAC GAATCTAAAA CCATATGTGA CATATTCTAA
721  TACTATAAAT CTGGATATAT GTAATGCCAG AITTTGATGC CTACGATGTG TTACATCCGG TACTAGGTTG GITTCTTTGG ATGAAGGGAG
811  TAATGTGATG TTTTTCATAA CAAATTTATA AATATCAITT TTTACATACT AAATATTAAT GTTTTATTCT TTTCAITGAT TAATGATGCA
901  TGCCAITTGT TTGCGGAAGG AAATGGTATT ATACTTGATG GTTTGCAACT TCATATGTTT CCTCACCAG ACAACTCTTT GCATACATAT
991  ATAGTATACC ATAAGGAACA TTTATGTTTA TTTTACCAAC ATGTCAAGTA AAGTAGGTGA TAATACTTC GAGCTGTTTT CTAACATCTC
1081  TTTTCTTACC TATTTATTCA CTGTCTAITT CTACTGATTA TGTTTTAGTT TCTATAATGG GAACIAATGG CCAAATCTCT TCATCACCCTC
1171  CTACATTTTT TTCTTCTGTT GCCTTATTTC ACTAAACAAC TGCAAAATTT CTTTCTAGT TAGCCTCCAA CAAACTGCAA TGGCAAACAC
1261  TACCACGAGA AAAAAACAT TGCTCGAGGA CATATTGGTC ATCCTCGACC AACGGTAACA TCACATATTA TATTACTAAA AGTCAAAGA
1351  TTATATGCA AACATCTCTA CAAATACCGC TTGCATTAAT TTGTATGGGT TTAAGCAAT GCTTCCTTTG CAAGAGAAAC ATATGGCTAT
1441  TTCGGCATAA AAAAGAATTT CATCATCTAT TTTCCAAACA AGTAAGAAAA TAAATTTTGG GTCCTCCTAA CTATTGCGAT TAGTTTTAGT
1531  CCAACCCAGG ATTATTTTAC TACCACIATT CACCATTGTA AAAATCCTAT CATATACTCA TCCGTTCCGA AATATAAGT GTTTCCTGTA
1621  AAAAAATATA AGTATTTCTA GATAGATTCT CTACCCGACA TCTATTAGCT TTGAATCAT TAAATGATG AAAACTATGA AACCCAAAAA
1711  TCCTTATATT TTGAATAAAA AGGTAAAAAT TACAAATAATA TGCCATTTTT TCAAAAAAAA AGTTAATGCA AAATGTGAA AAATAACCAA
1801  TGCAGAAAC CTATAAAATC TATGACGTGT AGGGTAAAA GGAAAAAAG AAGGGAAAAA CTGAATCCT CTGTCCCTCC CGTCTCCTTG
1891  CCTTGGCTAT AAACCCCGG AAACCACAAG GCAGAGAGA GGTCTTCCC TCCCACAAG GGGAAAAAAG GGGAAAAAAA AAAGAAAAAG
1981  GAAGAGAAA TCCTCCGAA
#####

```

图2 *HDA705* 启动子序列。黑色方框:TATA box;阴影:CAAT box;#: 水杨酸应答元件;*: 茉莉酸应答元件;▲: 干旱诱导元件;◇: 脱落酸应答元件。

Fig. 2 Sequence of *HDA705* promoter. TATA box were framed by black box, and shadows showing CAAT box; #: Salicylic acid responsive element; *: Jasmonic acid responsive element; ▲: Drought inducible element; ◇: ABA responsive element.

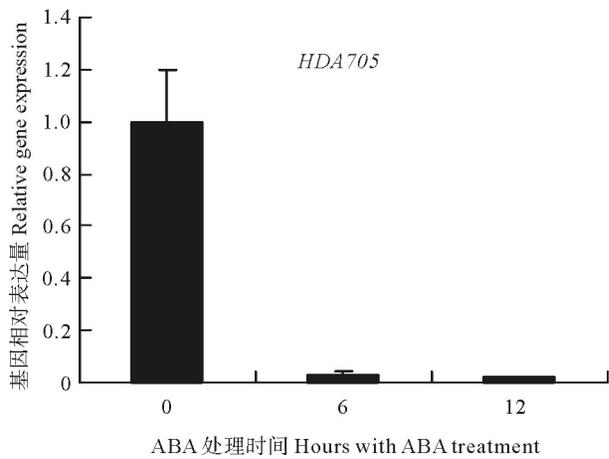


图3 RT-PCR 分析 ABA 处理对水稻 *HDA705* 基因表达的影响。*Actin* 为内参基因。

Fig. 3 Effect of ABA on expression of *HDA705* in rice by quantitative RT-PCR. *Actin* was used as an internal control.

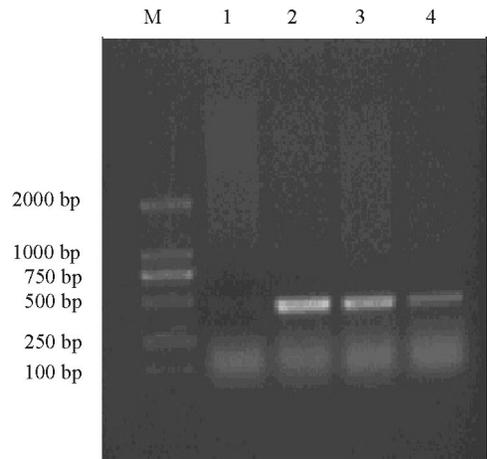


图4 转基因水稻植株的 PCR 检测。M: 2 kb DNA marker; 1: 非转基因植株;2,3,4: 转基因植株。

Fig. 4 PCR detection of transgenic plants. M: 2 kb DNA marker; 1: Non-transgenic plant; 2,3,4: Transgenic plants.

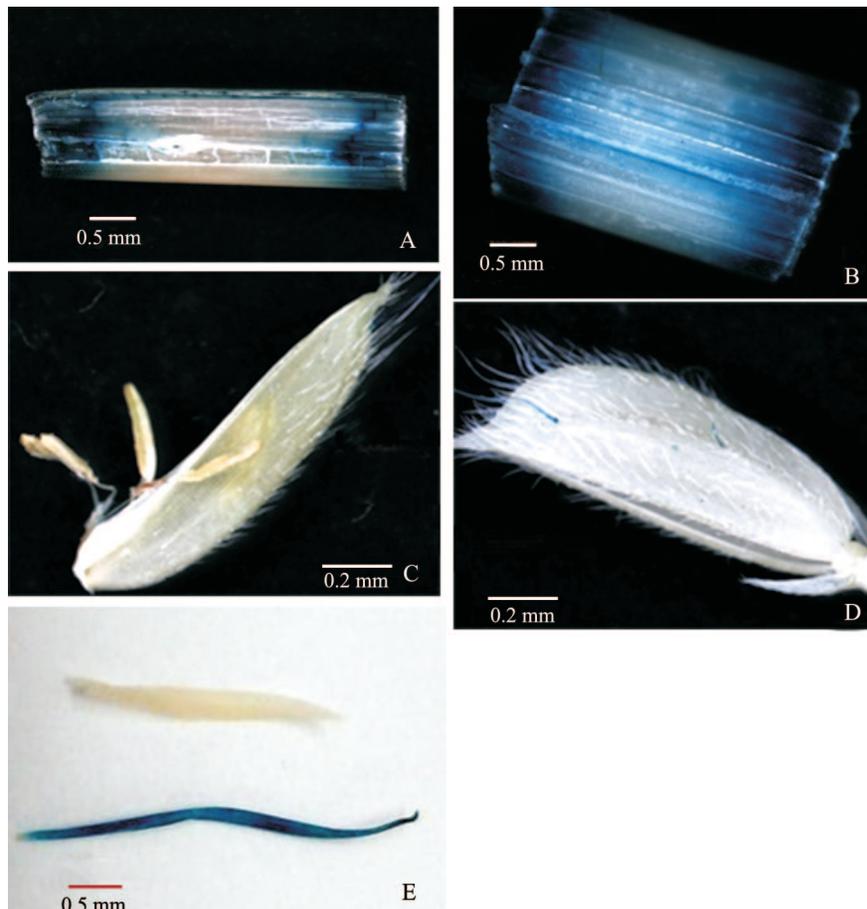


图 5 *proHDA705:GUS* 融合基因在水稻中的表达。A: 叶片; B: 茎; C: 花; D: 颖壳; E: 非转基因(上)和转基因植株(下)的幼叶。

Fig. 5 Expression of *proHDA705:GUS* in rice. A: Leaf; B: Stem; C: Flower; D: Glume; E: Young leaf of non-transgenic plant (up) and transgenic plant (down).

在花中不表达(图 5: C),表明 *HDA705* 的表达具有组织特异性。

3 讨论

HDAC 通过调节染色质组蛋白的乙酰化状态而调控基因的转录,广泛参与植物的生长发育与对逆境响应过程^[6]。研究 HDAC 的表达模式对于解析 HDAC 的功能具有重要的指导意义。在水稻 HDAC 基因家族启动子的研究方面,目前仅报道 *HDA702* 启动子在叶片中有表达^[17],还未见有关其它 HDAC 基因启动子的研究报道。在本研究中,我们克隆了水稻 *HDA705* 的启动子片段,该启动子区域具有系列的水杨酸,茉莉酸,脱落酸及干旱等生物及非生物胁迫相关的应答元件(图 2)。Chen 等^[18]的研究表明,拟南芥中与水稻 *HDA705* 同源的基因 *HDA6* 参与了对 ABA 及盐胁迫的响应。我们的研究表明,ABA 处理能抑制 *HDA705* 的

表达(图 3),同时,茉莉酸处理能诱导水稻 *HDA705* 的表达^[7];这些结果表明 *HDA705* 可能参与到水稻对多种植物生长调节剂及非生物逆境的响应途径。对 *proHDA705* 转基因水稻阳性植株的 GUS 染色检测结果表明, *HDA705* 在根、茎、叶及部分颖壳的表皮毛等器官中表达,而在花器官中不表达(图 5),这与拟南芥中与之同源的基因 *HDA6* 的启动子的表达特性相似,拟南芥 *proHDA6* 也只在拟南芥的下胚轴、子叶及成熟叶片和茎中表达,在雄蕊中不表达^[19]。拟南芥 *HDA6* 参与叶片的形态发育过程^[20],表明水稻的 *HDA705* 可能也特异性参与抗逆响应及营养器官发育等途径。

目前,组成型、诱导型和组织特异型启动子是植物基因工程中 3 种常用的启动子^[9]。组织特异性启动子也称为器官特异性启动子,该类启动子所调控的下游基因往往只在某些特定的器官或组织部位表达。植物基因工程研究表明,组织特异型启动子由于其表达具有空间特异性而能有效地提高转

基因的效果,较组成型和诱导型启动子具有明显的优越性^[21]。如豌豆(*Pisum sativum*)的豆清蛋白基因启动子 *LeB4* 专一性地在植物种子中表达^[22],而马铃薯(*Solanum tuberosum*)块茎储藏蛋白基因启动子 *B33* 在块茎中优势表达^[23]。在本研究中, *HDA705* 启动子在水稻的根、茎、叶等营养器官中表达,而在生殖器官花中不表达,表明 *HDA705* 启动子具有明显的组织特异性,属于组织特异型启动子,在水稻基因工程研究和转基因工程中可能具有较好的应用前景,例如,在水稻的抗逆育种中,可以将 *HDA705* 启动子驱动的抗除草剂目的基因导入到水稻中,不但可以在提高水稻对除草剂的抗性,同时还可避免抗除草剂这一性状因花粉扩散而发生漂移的问题,从而使得水稻的抗除草剂育种更加安全。

综上所述,本研究鉴定的 *HDA705* 启动子的表达特征对 *HDAC* 基因功能的分析及植物转基因研究均具有重要的科学和实践意义。

参考文献

- [1] Eberharter A, Becker P B. Histone acetylation: A switch between repressive and permissive chromatin (second in review series on chromatin dynamics) [J]. *EMBO Rep*, 2002, 3(3): 224–229.
- [2] Kuo M H, Allis C D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation [J]. *Bioessays*, 1998, 20(8): 615–626.
- [3] Sterner D E, Berger S L. Acetylation of histones and transcription-related factors [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(2): 435–459.
- [4] Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(5): 599–606.
- [5] Pandey R, Muller A, Napoli C A, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes [J]. *Nucl Acid Res*, 2002, 30(23): 5036–5055.
- [6] Luo M, Liu X C, Singh P, et al. Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(2): 129–136.
- [7] Fu W Q, Wu K Q, Duan J. Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(4): 843–850.
- [8] Nie L N, Xia L Q, Xu Z S, et al. Progress on cloning and functional study of plant gene promoters [J]. *J Plant Genet Res*, 2008, 9(3): 385–391.
聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 等. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展 [J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(3): 385–391.
- [9] Pogue G P, Lindbo J A, Dawson W O, et al. Tobamovirus transient expression vectors: Tools for plant biology and high-level expression of foreign proteins in plants [M]// Gelvin S B, Schilperoort R A. *Plant Molecular Biology Manual*. 2nd ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998: 1–27.
- [10] Dessens J T, Lomonossoff G P. Cauliflower mosaic virus 35S promoter-controlled DNA copies of cowpea mosaic virus RNAs are infectious on plants [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74(5): 889–892.
- [11] Chen H, Nelson R S, Sherwood J L. Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection [J]. *BioTechniques*, 1994, 16(4): 664–668, 670.
- [12] Carrington J C, Freed D D. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region [J]. *J Virol*, 1990, 64(4): 1590–1597.
- [13] Song Y, Zhou J H, Zhang Y Q. Research on plant tissue-specific promoters [J]. *Biotechn Bull*, 2007(6): 21–24.
宋扬, 周军会, 张永强. 植物组织特异性启动子研究 [J]. *生物技术通报*, 2007(6): 21–24.
- [14] Liu Q Q, Zhang J L, Wang Z Y, et al. A highly efficient transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Phytophy Sin*, 1998, 24(3): 259–271.
刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. *植物生理学报*, 1998, 24(3): 259–271.
- [15] Yan M M, Wei G C, Pan X H, et al. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant: Modified CTAB method [J]. *Agri Sci Techn*, 2008, 9(2): 39–41.
- [16] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5(4): 387–405.
- [17] Hu Y F, Qin F J, Huang L M, et al. Rice histone deacetylase genes display specific expression patterns and developmental functions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(2): 266–271.
- [18] Chen L T, Luo M, Wang Y Y, et al. Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(12): 3345–3353.
- [19] Wu K Q, Zhang L, Zhou C H, et al. HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(2): 225–234.
- [20] Luo M, Yu C W, Chen F F, et al. Histone deacetylase HDA6 is functionally associated with AS1 in repression of *KNOX* genes in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(12): e1003114.
- [21] Fluhr R, Kuhlemeier C, Nagy F, et al. Organ-specific and light-induced expression of plant genes [J]. *Science*, 1986, 232(4754): 1106–1112.
- [22] Zakharov A, Giersberg M, Hosein F, et al. Seed-specific promoters direct gene expression in non-seed tissue [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(402): 1463–1471.
- [23] Naumkina E M, Bolyakina Y P, Romanov G A. Organ-specificity and inducibility of patatin class I promoter from potato in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Russ J Plant Physl*, 2007, 54(3): 350–359.