

网络出版时间:2016-09-07 09:03

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.10.023

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160907.0903.046.html>

中国水仙锌指蛋白 *NtPLATZ1* 的克隆与表达分析

林江波, 王伟英, 李海明, 吴水金, 邹 晖, 李跃森, 戴艺民

(福建省农业科学院 甘蔗研究所, 福建 漳州 363005)

[摘 要] **【目的】**克隆中国水仙植物 AT 富集序列锌结合蛋白基因(*NtPLATZ1*), 为研究该基因的生物学功能奠定基础。**【方法】**利用 RACE 技术克隆了 *NtPLATZ1* cDNA 全长, 利用生物信息学方法分析其核苷酸及氨基酸序列, 将 *NtPLATZ1* 与原核表达载体 pGEX-4T-3 连接, 转化 BL21 并进行诱导表达, 通过半定量 PCR 分析用多效唑处理后该基因在中国水仙不同生长期叶片中的表达情况。**【结果】***NtPLATZ1* 的 cDNA 全长 1 024 bp, 包含 1 个 642 bp 的完整阅读框架, 编码 213 个氨基酸; 编码蛋白具有 PLATZ superfamily 蛋白保守区, 与大豆(*Glycine max*, AII19314.1) PLATZ 蛋白序列的同源性最高, 为 81%。原核表达结果表明, *NtPLATZ1* 在大肠杆菌中能有效表达。半定量 RT-PCR 分析表明, 喷雾多效唑后, *NtPLATZ1* 基因在中国水仙不同生长期叶片中的表达量先上升后下降, 抽葶期叶片的表达量最高; 喷雾清水后 *NtPLATZ1* 基因表达量先下降后又有所回升, 抽葶期和始花期的表达量低于长叶期和盛花期。**【结论】**成功克隆了中国水仙 *NtPLATZ1* 基因, 多效唑处理能明显诱导该基因的表达。

[关键词] 中国水仙; PLATZ; 基因表达; 锌指蛋白

[中图分类号] Q78:S682.2⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)10-0165-06

Cloning and expression analysis of *NtPLATZ1* gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*

LIN Jiangbo, WANG Weiyang, LI Haiming, WU Shuijin,
ZOU Hui, LI Yuesen, DAI Yimin

(Sugarcane Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China)

Abstract: **【Objective】**This study aimed to clone plant AT-rich sequence and zinc-binding protein gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* (*NtPLATZ1*) for studying its biological function. **【Method】**RACE and RT-PCR technique were used to clone *NtPLATZ1*, the bioinformatics analysis was conducted to analyze its sequence, and semi-quantitative RT-PCR was used to detect its expression. *NtPLATZ1* was inserted into pGEX-4T-3, the prokaryotic expression vector was transformed into BL21, and protein expression was induced. **【Result】**The full length of *NtPLATZ1* cDNA was 1 024 bp with an 642 bp ORF, which encoded a protein of 213 amino acids with a conservative domain of PLATZ superfamily. *NtPLATZ1* shared 81% identity with PLATZ of *Glycine max* (AII19314.1). *NtPLATZ1* was predicted an unstable protein. Prokaryotic expression showed that recombinant pGEX-*NtPLATZ1* had high expression in *E. coli* BL21. Semi-quantitative RT-PCR revealed that *NtPLATZ1* expression was enhanced at scape stage and decreased hereafter after it was sprayed with paclobutrazol, while it was decreased at scape and early flowering stages without paclobutrazol. **【Conclusion】***NtPLATZ1* was clone and its expression was enhanced significantly by paclobutrazol.

[收稿日期] 2015-03-27

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2014J01098)

[作者简介] 林江波(1976—), 男, 福建永春人, 副研究员, 硕士, 主要从事观赏植物生物技术研究。E-mail: linjiangbo1976@qq.com

[通信作者] 戴艺民(1969—), 男, 福建长泰人, 研究员, 博士, 主要从事观赏植物生物技术研究。E-mail: dymtten@163.com

Key words: *Narcissus tazetta* var. *chinensis*; PLATZ; gene expression; zinc finger protein

锌指蛋白(zinc finger protein)是一类具有“手指状”结构域的转录因子,通过结合 Zn^{2+} 来稳定一种很短的可自我折叠成“手指”的蛋白结构^[1]。根据半胱氨酸(C)和组氨酸(H)残基数目、位置的不同,锌指结构域的转录因子可分为 C_2H_2 、 C_2HC 、 C_2C_2 、 C_3H 、 C_3HC_4 (RING finger)和 C_2HC_5 (LIM finger)等亚类^[2]。根据锌指蛋白的结构特征或功能差异,又可以分为 WRKY 型蛋白、GATA 型蛋白、PHD 型蛋白、DOF 型蛋白和 TFⅢA 型蛋白等^[3-4]。锌指蛋白在转录和翻译水平上对基因表达进行调控,对植物种子发育^[3]、花发育^[5]、侧根和分枝发育^[6]以及环境胁迫的应答反应^[7-8]起重要作用。

PLATZ 是一类新型的锌指蛋白,其具有 2 个锌指结构域:一个是 $C-X_2-H-X_{11}-C-X_2-C-X_{(4\sim5)}-C-X_2-C-X_{(3\sim7)}-H-X_2-H$,其半胱氨酸和组氨酸残基(CHC_4H_2)的数量与 RING finger(C_3HC_4)和 LIM finger(C_2HC_5)相同,但属于不同类型的锌指结构域;另一个是 $C-X_2-C-X_{(10\sim11)}-C-X_3-C$,与 GATA finger(C_2C_2)相似,但不同于 GATA finger($C-X_2-C-X_{(17\sim18)}-C-X_2-C$);PLATZ 结合于 DNA 序列的 AT 富集区域起转录抑制作用,是锌依赖的 DNA 结合蛋白^[9]。有关中国水仙 PLATZ 基因的研究尚未见相关报道。

中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)为中国的十大名花之一,香味独特。因室内光线较弱,中国水仙在室内水养时,容易引起徒长。施用适宜浓度的多效唑能使植株矮化,株形紧凑,提高其观赏价值^[10]。笔者前期通过筛选多效唑诱导中国水仙的 SSH 文库,获得 1 个 cDNA 片段,该片段编码的氨基酸与已知植物的 PLATZ 有较高的同源性。因此,本研究克隆了中国水仙 PLATZ1 基因 cDNA 序列全长,探讨该基因的生物学信息及其在多效唑处理后不同生长阶段水仙植株中的表达情况,以期为进一步研究该基因的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

中国水仙的处理参照林江波等^[11]的方法,水养 16 d 后,每天用 150 mg/L 的多效唑喷雾 1 次,连续喷雾 10 次,另设喷雾清水为对照。取长叶期、抽葶期、始花期和盛花期叶片,置于一 70 ℃ 冰箱中保存备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 BL21(DE3)、HB101 和载体 pGEX-4T-3,由福建省农业科学院甘蔗研究所实验室保存;pMD19-T 连接试剂盒、Ex Taq DNA Polymerase、限制性内切酶、Prime-Script™ Reverse Transcriptase、RNAiso Plus 和 5'-Full RACE Kit,购自宝生物公司;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒,购自上海生工。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的克隆

参照 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取中国水仙叶片总 RNA,按照 PrimeScript™ Reverse Transcriptase 试剂说明书进行逆转录,合成 cDNA 第 1 链。

用于 5'RACE 的引物序列为:5PLATZ1. 5'-CTC-CCCCATCATAGAAGCACAGA-3',5PLATZ2. 5'-GACGGGCTGAAGCTCTGTATCACATTGCTC-TCGG-3';用于 3'RACE 的引物序列为:3PLATZ1. 5'-GCTCTCTTTGCCTGGCTTATC-3',3' adaptor: 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATC-CTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'。

5'RACE 按照 5'-Full RACE Kit 说明操作,3'RACE 的 PCR 扩增采用常规的反应程序。PCR 产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,目的片段经切胶回收后克隆并测序,测序结果的拼接由软件 DNA-MAN V6.0 完成。

1.3 中国水仙 PLATZ1 蛋白序列分析

中国水仙 PLATZ1 蛋白序列的相似性和氨基酸保守结构域预测采用 NCBI 的 BLAST X 和 BLAST P 搜索引擎完成,用 ProtParam 在线分析蛋白质的理化性质,采用在线工具 SSPro(<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>)预测蛋白质的二级结构,以 NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线软件预测氨基酸的磷酸化位点^[12],采用 MEGA 6.0 软件 NJ 法进行分子进化树^[13]分析。

1.4 原核表达载体的构建及表达

根据中国水仙 PLATZ1 序列的拼接结果设计 1 对引物(PLATZ1:5'-CGC GGATCCAGGGAGG-AGGTGAGGACAAC-3';PLATZ2:5'-CGC CTCG-AGCTCCCCCATCATAGAAGCACA-3'),在引物上、下游下划线处分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点,用于扩增中国水仙 PLATZ1 完整开放阅读框。PCR 产物与载体 pGEX-4T-3 经酶切、回收、连接和转化后,挑取单克隆扩繁,经 PCR 验证后送上

海生工测序。用鉴定为阳性的重组原核表达质粒转化表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 37 ℃ 下以 200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6。加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 于 37 ℃、150 r/min 振荡培养 3 h, 取 1 mL 经诱导的菌液于 Eppendorf 管中, 连同诱导前样品于 13 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入 50 μL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 悬浮沉淀; 加等体积 2×凝胶上样缓冲液混匀, 100 ℃ 水浴变性处理 10 min; 蛋白纯化参照 Clontech 的 glutathione resin use manual 操作进行; 将诱导前、诱导菌样和纯化蛋白各取 30 μL 经 SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝 R-250 染色检测蛋白的表达情况。

1.5 *NtPLATZ1* 基因的表达特性分析

以中国水仙不同生长时期的叶片 cDNA 为模板, *actin* 为内参^[14], PCR 检测 *NtPLATZ1* 的表达特性。*NtPLATZ1* 引物为 PLATZ1 和 PLATZ2, 产物长度 747 bp, PCR 扩增条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 50 s, 20 个循环; *actin* 的 PCR 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 25 个循环。PCR 扩增均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 中国水仙 *PLATZ1* 基因的 5' RACE 和 3' RACE

以随机引物反转录的水仙叶片 cDNA 为模板, 用引物 3PLATZ1 和 3' adaptor 进行 PCR; 参照 5'-

Full RACE Kit 的方法合成 cDNA 第 1 链; 再用引物 5PLATZ1、5PLATZ2 和试剂盒提供的 5' RACE Outer Primer、5' RACE Inner Primer 进行两轮 PCR; 3' RACE 在 850 bp 左右有一条亮带 (图 1-A), 5' RACE 在 630 bp 左右有一条亮带 (图 1-B)。

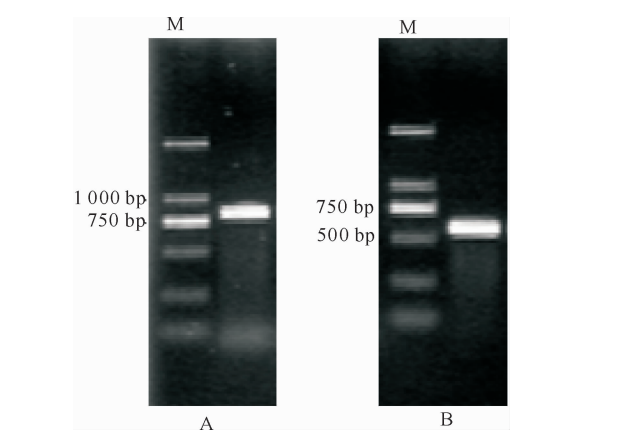


图 1 中国水仙 *PLATZ1* 基因的 PCR 电泳结果
M. 分子质量标记 (100~2 000 bp); A. 3' RACE; B. 5' RACE
Fig. 1 Electrophoresis products for *PLATZ1* from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* by PCR
M. DNA Marker (100—2 000 bp); A. 3' RACE; B. 5' RACE

用 DNAMAN V6.0 对 *NtPLATZ1* 基因 3' RACE 和 5' RACE 的测序结果进行序列拼接, 并进行开放阅读框分析, 结果 (图 2) 表明, 所获得的 cDNA 全长为 1 024 bp, 包含 1 个 642 bp 的完整开放阅读框, 编码 213 个氨基酸, 5' 末端非翻译区 48 bp, 3' 末端非翻译区 334 bp。

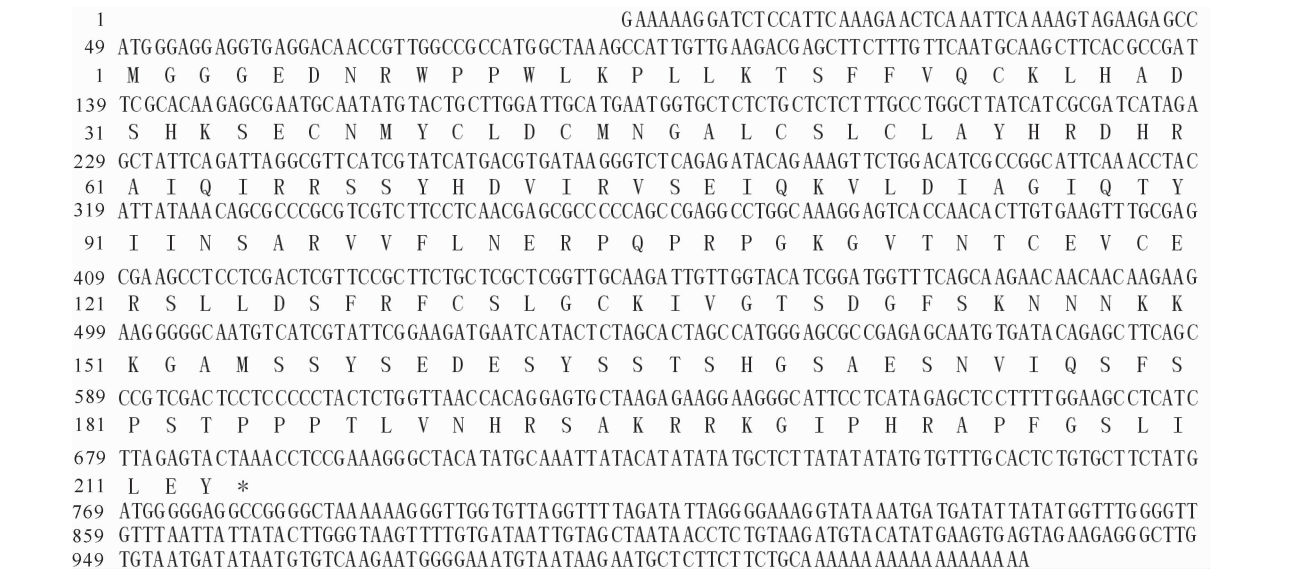


图 2 中国水仙 *PLATZ1* 基因及其推导的氨基酸序列
Fig. 2 Complete cDNA sequence of *PLATZ1* from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*

2.2 中国水仙 *PLATZ1* 基因开放阅读框的克隆

以随机引物反转录的中国水仙 *PLATZ1* 基因 cDNA 为模板,用引物 *PLATZ1* 和 *PLATZ2* 进行 PCR 扩增,产物经测序后用 DNAMAN V6.0 比对,结果与拼接得到的中国水仙 *PLATZ1* 开放阅读框完全一致,获得了带 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的中国水仙 *PLATZ1* 基因。

2.3 中国水仙 *PLATZ1* 基因序列的同源性和系统进化分析

使用 BLAST X 对中国水仙 *PLATZ1* 基因推

导的氨基酸序列进行同源性检索,结果表明,其所编码的氨基酸序列与大豆 (*Glycine max*, AII19314.1)、可可 (*Theobroma cacao*, XP_007039480.1)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*, AFH57272.1) 的 *PLATZ* 氨基酸序列的相似度分别为 81%,75%和 75%;通过 NCBI 的 BLAST P 在线搜索蛋白保守区,相匹配的有 1 个(图 3),为 *PLATZ* superfamily, *E* 值为 1.77×10^{-45} 。因此,推断该基因为中国水仙的 *PLATZ* 基因,命名为 *NtPLATZ1*。

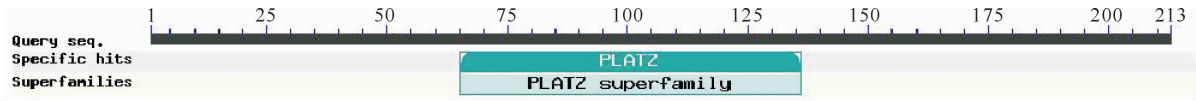


图 3 中国水仙 *PLATZ1* 蛋白的保守结构域

Fig. 3 Putative conserve domains for *PLATZ1* protein from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*

采用 MEGA 6.0 软件将 *NtPLATZ1* 推导的氨基酸序列与其他 12 个具有 *PLATZ* 结构域的物种进行 NJ 聚类分析,结果(图 4)表明,单子叶植物和

双子叶植物的 *PLATZ* 分别处于两个独立进化的分支中,单子叶植物又分为两类,其中禾本科的玉米与日本稻聚为一类,中国水仙单独聚为一类。

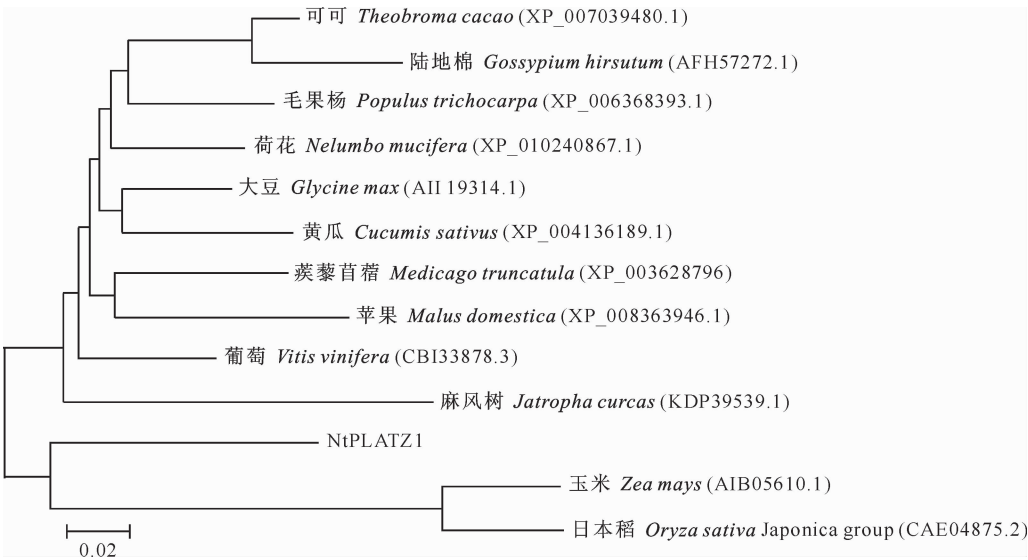


图 4 中国水仙和其他植物 *PLATZ* 的分子进化树

Fig. 4 Molecular phylogenetic tree of *NtPLATZ1* and *PLATZ* from other plants

2.4 *NtPLATZ1* 序列的生物信息学分析

ProtParam 在线分析结果表明,*NtPLATZ1* 蛋白的分子质量为 23.817 ku,理论等电点为 9.12,具有 19 个带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu),28 个带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)。不稳定系数 54.11,属于不稳定蛋白;脂肪系数 70.94,总平均疏水性为-0.463。

采用 SSPro 在线工具进行预测发现,在 *NtPLATZ1* 蛋白质的二级结构(图 5)中,含有 146 个

形成无规则卷曲的氨基酸残基,占 68.55%;24 个形成 α 螺旋的氨基酸残基,占 11.27%;43 个形成 β 折叠的氨基酸残基,占 20.18%。

以 NetPhos 2.0 Server 在线软件预测 *NtPLATZ1* 氨基酸的磷酸化位点,结果表明该蛋白中有 19 个丝氨酸(serine, S)残基参与磷酸化,酪氨酸(Tyrosine, Y)和苏氨酸(Threonine, T)各有 2 个参与磷酸化。

```
MGGGEDNRWPPWLKPLLKTSFFVQCKLHADSHKSECNMYCLDCMNGALCSLCLAYHRDHRAIQIRSSY
ccccccccchhhhhhhhhhhccccccccccccccccccccccccccccchhhhhhhcccccccccccccccccc
HDVIRVSEIQKVLDIAGIQTYIINSARVVFLNERPQPRPGKVTNTCEVCERSLLDSFRFCSLGCKIVG
cccccehhhhhhhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
TSDGFSKNNKKKGAMSSYSSEDSYSSTSHGSAESNVIQSFSPSTPPPTLVNHRSAKRRKGIPHRAPFG
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
SLILEY
cccccc
```

图 5 *NtPLATZ1* 蛋白的二级结构预测
大写字母为氨基酸序列;小写字母为二级结构组成:c. 无规则卷曲,h. α 螺旋,e. β 折叠

Fig. 5 Predicted secondary structure of *NtPLATZ1*
Capital letters show amino acid sequence;small letters show structure of amino acid chain,c. Random coil,h. α -helix,e. β -extended

2.5 *NtPLATZ1* 蛋白的原核表达

将重组原核表达质粒 pGEX-*NtPLATZ1* 转化入大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3), 用 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后, 经 SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色发现,*NtPLATZ1* 蛋白的分子质量为 23.817 ku, 融合蛋白分子质量为 49.817 ku。试验结果(图 6)表明, 与携带质粒 pGEX-4T-3 的菌体相比, 携带重组质粒 pGEX-*NtPLATZ1* 的 *E. coil* 菌株中出现 1 条约 49.817 ku 的条带, 蛋白经纯化后同样获得 1 条约 49.817 ku 的条带, 说明 *NtPLATZ1* 能在大肠杆菌中有效表达。

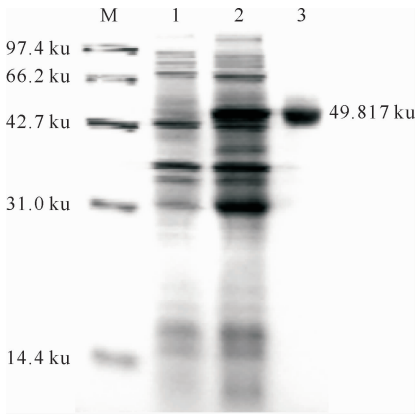


图 6 *NtPLATZ1* 蛋白在大肠肝菌中表达的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 分子质量标记;1. 诱导前;2. 诱导后;3. 纯化
Fig. 6 SDS-PAGE of *NtPLATZ1* expressed in *Esherichia coli*

M. Protein Marker;1. Before induction;
2. After induction;3. Purification

2.6 *NtPLATZ1* 基因的表达特性

用半定量 RT-PCR 法, 分析经多效唑处理后, 中国水仙不同生长时期叶片中 *NtPLATZ1* 基因的表达情况, 结果(图 7)显示, *NtPLATZ1* 在中国水

仙抽葶期和始花期叶片中的表达量较喷雾清水(对照)高, 长叶期与盛花期表达量基本一致; 从整个生长期来看, 喷雾多效唑后, *NtPLATZ1* 的表达量先上升后下降, 抽葶期的表达量达到最高, 后开始下降; 喷雾清水后 *NtPLATZ1* 的表达量先下降后又有所回升, 抽葶期和始花期的表达量低于长叶期和盛花期。 *actin* 基因在各个时期的表达量基本一致。

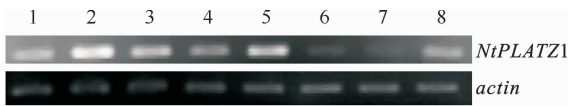


图 7 经多效唑处理后中国水仙不同生长时期叶片中 *NtPLATZ1* 基因的表达分析

1~4. 喷雾多效唑, 5~8. 喷雾清水;1, 5. 长叶期;
2, 6. 抽葶期;3, 7. 始花期;4, 8. 盛花期

Fig. 7 Expression analysis of *NtPLATZ1* gene at different growth stages in response to paclobutrazol

1~4. Sprayed with paclobutrazol, 5~8. Sprayed with water;
1, 5. Leaf stage;2, 6. Scape stage;3, 7. Early flowering stage;4, 8. Full-bloom stage

3 讨 论

本研究从多效唑处理的中国水仙叶片中克隆到了 *NtPLATZ1* 基因, 其推导的氨基酸序列具有一个 PLATZ superfamily, *E* 值为 1.77×10^{-45} 。所编码的氨基酸与大豆、可可、陆地棉 PLATZ 氨基酸序列的相似度分别为 81%, 75% 和 75%, 推断该基因为中国水仙的 PLATZ 基因。

光敏色素参与了植物种子的萌发、叶的扩展、光周期和开花的诱导等生理功能, 并调控相关基因的表达。豌豆的 GTPase 基因 *pra2* 主要在上胚轴表达, 但光照会抑制其表达^[15]。 PLATZ1 能与 *pra2* 基因中 12 bp 的顺式作用元件 DE1 上游的 A/T-rich DNA 序列结合, 下调 *pra2* 基因的表达;

PLATZ1 基因在豌豆的根尖及顶芽中的表达量较高,而在幼叶、成熟叶及茎中的表达量都很低,推测其可能与组织的细胞分化有关^[9]。抽葶期和始花期是中国水仙室内水养叶片徒长最快的阶段,喷雾多效唑后,能克服弱光引起的叶片徒长。半定量 RT-PCR 分析结果表明,从长叶期到盛花期的中国水仙叶片中都能检测到 *NtPLATZ1* 的表达,在抽葶期和始花期,喷雾清水时 *NtPLATZ1* 表达量较低,喷雾多效唑则能明显上调 *NtPLATZ1* 的表达。因此,*PLATZ* 可能参与了光信号转导过程中基因表达的调控。

PLATZ1 与 A/T-rich DNA 序列的结合是非特异的。豌豆 *petE* 基因的增强子含有 A/T-rich DNA 序列^[16],蛋白 HMG-1 和 HMG-I/Y 与增强子结合可提升 *petE* 基因的表达^[17],*PLATZ1* 能与 *petE* 基因增强子的 A/T rich DNA 序列结合,减弱该增强子的功能,下调 *petE* 基因的表达^[9]。而对于中国水仙 *NtPLATZ1* 能调控哪些基因的表达及其机制,均有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Benjamin L. Gene(X) [M]. Boston,Toronto,London,Singapore: Jones and Bartlett Publishers,2007;654-656.

[2] 黄 骥,王建飞,张红生. 植物 C2H2 型锌指蛋白的结构与功能 [J]. 遗传,2004,26(3):414-418.
Huang J,Wang J F,Zhang H S. Structure and function of plant C2H2 zinc finger protein [J]. Hereditas,2004,26(3):414-418.

[3] 黄 骥,张红生. TFIIIA 型锌指蛋白及在提高植物耐逆性中的作用 [J]. 遗传,2007,29(8):915-922.
Huang J,Zhang H S. The plant TFIIIA-type zinc finger proteins and their roles in abiotic stress tolerance [J]. Hereditas, 2007,29(8):915-922.

[4] 宋 冰,洪 洋,王丕武,等. 植物 C2H2 型锌指蛋白的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(5):1133-1141.
Song B,Hong Y,Wang P W,et al. Advances on plant C2H2-type zinc finger protein [J]. Genom Appl Biol,2010,29(5): 1133-1141.

[5] Nakagawa H,Jiang C J,Sakakibara H,et al. Over expression of a petunia Zinc-finger gene alters cytokinin metabolism and plant forms [J]. Plant J,2005,41(4):512-523.

[6] Dathan N,Zaccaro L,Esposito S,et al. The *Arabidopsis* SU-PERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys₂-His₂ zinc-finger motif [J]. Nucleic Acids Res, 2002,30(22):4945-4951.

[7] 陈 晨,彭 辉,高文瑞,等. 鹰嘴豆锌指蛋白基因 *ZF1* 的克隆及表达分析 [J]. 作物学报,2009,35(12):2180-2186.

Chen C,Peng H,Gao W R,et al. Cloning and expression of zinc finger protein gene *ZF1* in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Acta Agron Sin,2009,35(12):2180-2186.

[8] 郭丽香,高世庆,唐益苗,等. 小麦 *TaCRF2* 基因的克隆及其在烟草中的初步功能验证 [J]. 作物学报,2011,37(8):1389-1397.
Guo L X,Gao S Q,Tang Y M,et al. *TaCRF2* gene isolation from *Triticum aestivum* and primary function validation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Acta Agron Sin,2011,37 (8):1389-1397.

[9] Yukio N,Hirofumi F,Takehito I,et al. A novel class of plant-specific zinc-dependent DNA-binding protein that binds to A/T-rich DNA sequece [J]. Nucleic Acids Res, 2001,29(20): 4097-4105.

[10] 王伟英,邹 晖,戴艺民,等. 多效唑喷雾对中国水仙的矮化效应 [J]. 热带作物学报,2011,32(9):1661-1664.
Wang W Y,Zou H,Dai Y M,et al. The dwarfing effect on *Narcissus tazetta* var. *chinensis* by spraying with paclobutrazol [J]. Chin J Trop Crops,2011,32(9):1661-1664.

[11] 林江波,王伟英,邹 晖,等. 中国水仙叶绿素 ab 结合蛋白基因 *Ntcab1* 的克隆与序列分析 [J]. 福建农业学报,2013,28 (5):463-467.
Lin J B,Wang W Y,Zou H,et al. Cloning and sequence analysis on gene of chlorophyll a/b-binding protein from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. Fujian J Agric Sci,2013,28(5): 463-467.

[12] Blom N,Gammeltoft S,Brunak S. Sequence-and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. J Mol Bio,1999,294(5):1351-1362.

[13] Tamura K,Stecher G,Peterson D,et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6. 0 [J]. Mol Biol Evol,2013,30:2725-2729.

[14] 林江波,王伟英,邹 晖,等. 中国水仙肌动蛋白基因的克隆与表达分析 [J]. 福建农业学报,2012,27(9):931-935.
Lin J B,Wang W Y,Zou H,et al. Cloning and expression analysis of *actin* gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. Fujian J Agric Sci,2012,27(9):931-935.

[15] Nagano Y,Okada Y,Narita H,et al. Location of light-repressible,small GTP-binding protein of the YPT/rab family in the growing zone of etiolated pea stems [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92:6314-6318.

[16] Sandhu J S,Wdbster C I,Gray J C. A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plant [J]. Plant Mol Biol,1998,37(5):885-896.

[17] Webster C I,Packman L C,Pwee K H,et al. High mobility group proteins HMG-1 and HMG-I/Y bind to a positive regulatory region of the pea plastocyanin gene promoter [J]. Plant J,1997,11(4):703-715.