

# 玫瑰 *GASA4-like* 基因的克隆及其序列分析

张 强, 孟月娥, 李艳敏, 王慧娟, 王利民, 王志勇  
(河南省农业科学院 园艺研究所, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 从大马士革玫瑰 (*Rosa damascena*) 中利用同源克隆结合 RACE 的方法首次获得了一个 *GASA4-like* 基因的 cDNA 和 DNA 序列全长 (GenBank 登陆号 FJ595792, FJ595793), 并利用 TAIL-PCR 的方法克隆了其部分启动子序列。结果表明, 玫瑰 *GASA4-like* 基因包含 4 个外显子, 3 个内含子, 开放阅读框为 327bp, 编码 108 个氨基酸序列。对推导的氨基酸序列分析发现, N 末端 1~26 个氨基酸是一信号肽序列, C 末端含有 12 个保守的半胱氨酸残基, 具有 *GASA* 基因家族共同的一些结构特征。系统进化分析表明, 玫瑰 *GASA4-like* 与分生组织中表达的 *GASA* 蛋白聚为一类。启动子顺式作用调控元件分析表明, *GASA4-like* 基因上游 318bp 的部分启动子含有诱导表达调控元件和一些转录因子的结合位点; 最后, 对 *GASA4-like* 基因可能的生物学功能进行了预测。

**关键词:** 玫瑰; *GASA4-like*; 克隆; 序列分析

中图分类号: S685.12 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)09-0161-06

## Cloning and Sequence Analysis of *GASA4-like* Gene from *Rosa damascena*

ZHANG Qiang, MENG Yue-e, LI Yan-min, WANG Hui-juan,  
WANG Li-min, WANG Zhi-yong

(Institute of Horticulture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Using the method of homology clone combined with rapid amplification of cDNA ends (RACE), the full length DNA and cDNA of a *GASA4-like* gene was isolated from *Rosa damascena* for the first time. Furthermore, its partial promoter sequence was cloned using the method of Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction (TAIL-PCR). The rose *GASA4-like* gene includes 4 exons and 3 introns, and its open reading frame (ORF) was composed of 327 bp, encoding a protein with 108 amino acids and interrupted by 3 introns into 121bp, 95bp and 194bp in length. Sequence analysis revealed that the first 26 amino acids of the predicted *GASA4-like* protein form a N-terminal hydrophobic domain which displays the properties of a signal peptide and 12 cysteine residues in C-terminal domains, which are highly conserved the traits of the *GASA* gene family. Phylogenetic analysis showed that *GASA4-like* protein falls into one category of *GASA* protein family expressed in meristem. The cis-acting regulating elements analysis indicated that the 318bp promoter of *GASA4-like* gene contained some inducer elements and several binding sites of transcription factors, which implied *GASA4-like* gene probably was regulated by some transcription factors during the response to environmental stress. Finally, the biological function of *GASA4-like* gene was predicted.

**Key words:** *Rosa damascena*; *GASA4-like*; Cloning; Sequence analysis

赤霉素能够调控植物发育, 包括胚胎发生、种子萌发、茎干延长、开花、块茎的形成和果实的发育等许多方面<sup>[1,2]</sup>。寻找赤霉素响应基因是理解赤霉素介导的信号途径的一种方法。自从赤霉素诱导的

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究计划项目(082300430100)

作者简介: 张 强 (1976-), 男, 河南方城人, 副研究员, 博士, 主要从事植物基因工程研究。

*GASA* (gibberellic acid-stimulated in *Arabidopsis*) 基因家族由 Herzog 等<sup>[3]</sup> 于 1995 年首先在拟南芥中报道以来, 在许多种类的作物中都发现了与拟南芥 *GASA* 相似的蛋白, 如番茄 (*Lycopersicon esculentum*) *GAST1* 和 *RSII*<sup>[4,5]</sup>, 矮牵牛 (*Petunia hybrida*) *GIP*<sup>[6,7]</sup>, 非洲菊 (*Gerbera hybrida*) *CEG*<sup>[8]</sup>, 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) *StSN1* 和 *StSN2*<sup>[9,10]</sup>, 水稻 (*Oryza sativa*) *OsGASR1* 和 *OsGASR2*<sup>[11]</sup>, 草莓 (*Fragaria ananassa*) *GAST1-like*<sup>[12]</sup> 等。这些蛋白都是一些由 88~112 个氨基酸组成的小的多肽, 并具有共同的结构特征, 包括 N 端 18~23 个氨基酸的信号肽序列, 信号肽后面长度、高度不同的中间区, 一个包含 12 个半胱氨酸残基, 大约 60 个氨基酸组成的 C 端保守结构域。生物信息学分析结果表明, 大部分 *GASA* 蛋白属于分泌蛋白, 它们各自的信号肽将引导其成熟产物定位于细胞壁。虽然这些蛋白的结构特征相似, 但其功能各不相同。矮牵牛 *GIP* 表达模式与花冠、干细胞的延长同步<sup>[6]</sup>, *CEG* 却在细胞延长停止时才表达<sup>[8]</sup>。而马铃薯 *StSN2* 则是一抗菌肽, 参与了植物的抗性, 伤口和病原侵染能诱导其表达<sup>[10]</sup>。这表明这些结构相似的蛋白参与了不同的发育过程。

为了进一步了解 *GASA* 基因家族的功能, 需要从不同的植物中获得更多的 *GASA* 基因。在本研究中, 根据月季 Old Blush 与拟南芥 *GASA4* 相似的 EST 序列 (GenBank 登录号 BI977238), 利用同源克隆结合 RACE 的方法从大马士革玫瑰中获得了一个 *GASA4-like* 基因的 cDNA 和 DNA 序列全长 (GenBank 登陆号 FJ595792, FJ595793), 并利用 TAIL-PCR 的方法克隆了其部分启动子序列。在序列分析的基础上, 对 *GASA4-like* 基因可能的生物学功能进行了预测。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

叙利亚大马士革玫瑰, 由郑州宝丽玫瑰基地提供。

### 1.2 总 RNA 和 DNA 的提取及 cDNA 第 1 链和第 2 链的合成

开花期取其未开放的花蕾。采用 CTAB 法少量提取玫瑰基因组 DNA。

RNA 的分离按照北京天根生化科技有限公司 RNAPlant 植物总 RNA 提取试剂的说明书进行。RNA 沉淀室温干燥 5~10min, 用 DEPC 水溶解, -75℃保存

备用。cDNA 第 1 链和第 2 链的合成参照 SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit User Manual 方法进行。根据双链 cDNA 合成试剂盒的特征设计了 3'RACE 和 5'RACE 锚定引物, 其序列为: 3'RACE: 5'-GTGGTA-ACAACGCAGAGTACTTTT-3', 5'RACE: 5'-ACACTCAGAGTACGCGGG-3'。

### 1.3 玫瑰 *GASA4-like* 基因 cDNA 和 DNA 序列全长的扩增

根据月季 Old Blush 与拟南芥 *GASA4* 相似的 EST 序列 (GenBank 登录号 BI977238) 设计基因设计引物 P1: 5'-TGGAGGTCACCACAAAGGCA A-3' 和 P2: 5'-AAGCTTCAAGGCGCATTTTG-GTCC-3'。以玫瑰花蕾 cDNA 为模板进行扩增, 获得玫瑰 *GASA4-like* 基因片段。以引物 P1 与 3'RACE 引物进行 3'RACE 扩增得到 *GASA4-like* 基因的 3'端序列。以引物 P2 与 5'RACE 引物进行 5'RACE 扩增得到 *GASA4-like* 基因的 5'端序列。根据 *GASA4-like* 基因的拼接序列设计引物 *GASA* UP: 5'-CCCCT-TCCACTCTCAGTTTCCATC-3', *GASADP*: 5'-CGAGTAAAGGCCTGAAATTGCATC-3', 分别以玫瑰 cDNA 和 DNA 为模板获得 *GASA4-like* 基因 cDNA 和 DNA 序列全长。PCR 反应体系: cDNA 模板 0.5μL, 10× PCR 缓冲溶液 5μL, 25mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup> 4μL, 特异引物 (20μmol/L) 1μL, 锚定引物 (20μmol/L) 1μL, 10mmol/L dNTPs 1μL, *Taq* 酶 (5U/μL) 0.5μL, 加水到总体积 50μL。PCR 程序: 94℃预变性 2min; 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 2min, 30 个循环; 72℃延伸 7min, 4℃保存。PCR 产物用 VITAGENE 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 回收的产物插入 pGEM-T easy 载体, 转化大肠杆菌, 蓝白斑筛选阳性克隆。碱裂解法抽提质粒, 用 *EcoR* I 进行单酶切鉴定和 PCR 鉴定后, 重组质粒送上海博尚生物公司测序。

### 1.4 *GASA4-like* 基因启动子序列扩增

根据 *GASA4-like* 基因的 DNA 序列设计了 3 个反向特异引物 DP1: 5'-AGGGCTTGTGGTATT-GGGTCTGG-3', DP2: 5'-GATCTTACATTGCCTTT-GTGGTGAC-3', DP3: 5'-CTTGACCGTCGCCATT-GCTACAG-3', 使用的 3 个简并引物分别是 AD1: 5'-NGTCGASWGANAWGAA-3', AD2: 5'-TG-WGNAGSANCASAGA-3', AD3: 5'-AGWGNAG-WANCAWAGG-3'。TAIL-PCR 程序参照 Liu<sup>[13]</sup>。在 <http://www.softberry.com/> 用 TSSP 程序对克隆的 *BcMF5* 基因的 5'-UTR 序列进行启动子区域

及转录起始位点分析; 在 <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html> 上对 *GASA4-like* 基因启动子序列进行顺式作用调控元件分析。

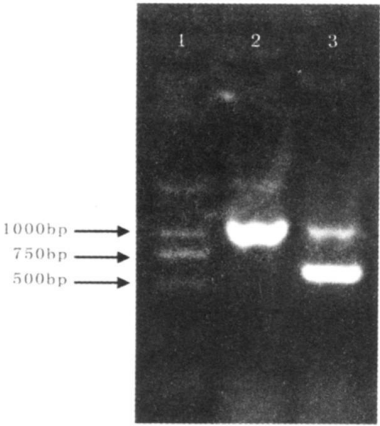
1.5 *GASA4-like* 基因核苷酸序列分析, 同源比对, 构建系统树

利用 DNASTar 软件分析 *GASA4-like* 基因最大开放阅读框, 推导其氨基酸序列; 并通过 <http://smart.EMBL-Heidelberg.de> 对其编码蛋白序列进行结构特征分析; 利用 ClustalX 软件将 *GASA4-like* 基因与数据库中的其他 GASA 序列进行同源序列比对, NJ 法构建系统树。

2 结果与分析

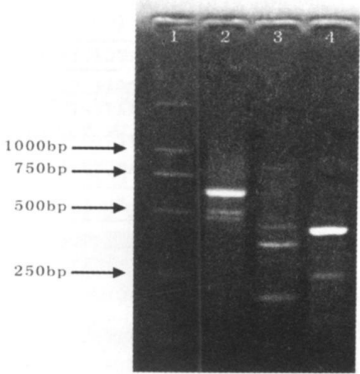
2.1 玫瑰 *GASA4-like* 基因 cDNA 和 DNA 序列全长的获得

在获得 *GASA4-like* 基因的拼接序列的基础上, 用引物对 GASAUP 和 GASADP 分别以玫瑰 cDNA 和 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增得到的玫瑰 *GASA4-like* 基因 cDNA 全长为 650bp 左右, 其 DNA 序列全长为 1000bp 左右(图 1)。把特异条带切胶回收、连接到 T-easy 载体, 转化大肠杆菌, 经质粒酶切和 PCR 验证正确后, 送上海博尚公司测序, 得到玫瑰 *GASA4-like* 基因 cDNA 和 DNA 序列。利用 3 个简并引物 AD1、AD2、AD3 与玫瑰 *GASA4-like* 基因的 3 个特异引物 DP1、DP2、DP3 分别进行 TAIL-PCR 扩增。其中, 简并引物 AD1 第 3 轮 TAIL-PCR 扩增出一条 450bp 左右的特异条带(图 2)。胶回收后, 连接、转化大肠杆菌, 送上海博尚公司测序, 得到玫瑰 *GASA4-like* 基因转录起始位点上游 318bp 的启动子序列。



1. DL2000 Marker; 2. 玫瑰 *GASA4-like* 基因的 DNA 序列扩增; 3. 玫瑰 *GASA4-like* 基因的 cDNA 序列扩增

图 1 玫瑰 *GASA4-like* 基因的 DNA 和 cDNA 序列扩增

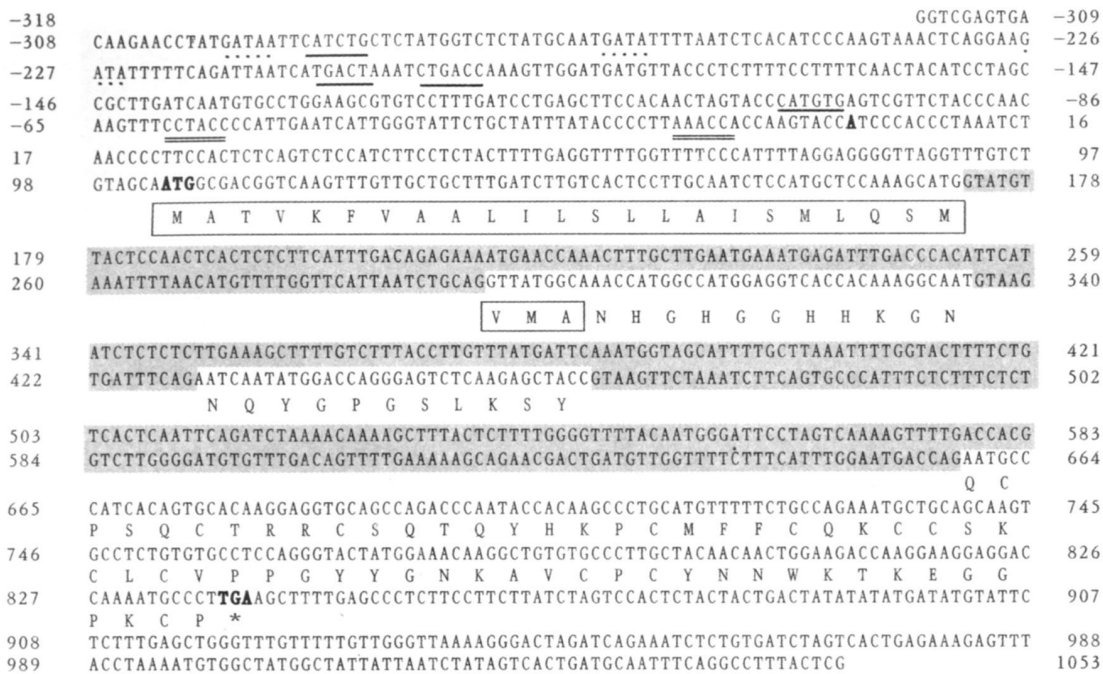


1. DL2000 Marker; 2. TAIL-PCR 的第 1 轮扩增; 3. TAIL-PCR 的第 2 轮扩增; 4. TAIL-PCR 的第 3 轮扩增

图 2 玫瑰 *GASA4-like* 基因启动子的 TAIL-PCR 扩增

2.2 玫瑰 *GASA4-like* 基因的序列分析

玫瑰 *GASA4-like* 基因的 DNA 和 cDNA 全长序列比较分析结果表明(图 3), 该基因的 DNA 序列包含 3 个内含子和 4 个外显子。内含子的长度依次为 121bp、95bp 和 194bp。其外显子—内含子剪切点处序列都遵守 GT-AG 规律, 是典型的剪接体识别序列。cDNA 序列的开放阅读框(ORF)为 327bp, 编码 108 个氨基酸序列。在 <http://smart.EMBL-Heidelberg.de> 网站上, 对玫瑰 *GASA4-like* 推导的蛋白质氨基酸序列进行结构功能域在线分析, 发现从 1 到 26 个氨基酸 MATVKFVAA-LILSLLAISMLQSMVMA 是一信号肽序列。蛋白质序列中含有信号肽序列将有助于它们向细胞内特定区域的移动, 这表明与蛋白质的定位有关; 利用 TAIL-PCR 克隆了玫瑰 *GASA4-like* 基因起始密码子 ATG 上游 421bp 的 5'-UTR 序列, 其转录起始位点 A 位于 319bp 处。在 <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html> 网站上进行启动子的顺式调控元件分析, 发现 *GASA4-like* 基因 318bp 的部分启动子序列含有光诱导调控表达有关的元件, 如 GT-1 元件的结合位点 GATAAT 序列, 3 个顺序排列的 GATAbbox; 还含有 2 个 MYB 转录因子识别位点 AAACCA 和 CCTACC, 2 个 MYC 转录因子识别位点 CATCTG 和 CATGTG; 2 个诱导抗性响应基因转录的 Wbox(TGACT 和 CTGACC), 这表明玫瑰 *GASA4-like* 基因可能受到转录因子的调控, 参与了植物对环境胁迫的响应过程。同时, 还含有花粉特异性表达元件 GTGA、根部表达元件 ATATT 序列、结合 *FLC* 基因的 CA<sub>1</sub>G 保守序列 CCATTTTAGG 等, 这可能与 *GASA4-like* 基因的时空表达有关。



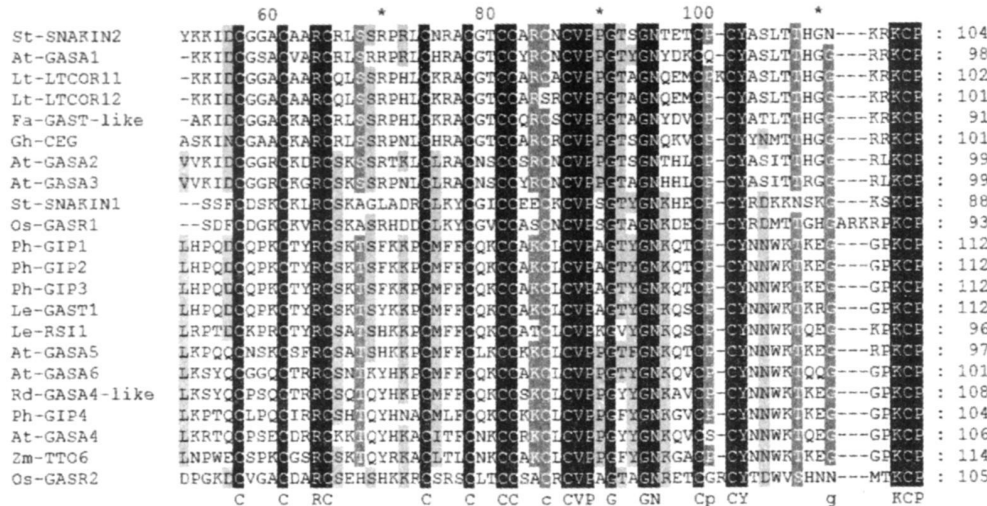
加黑的碱基 ATG 和 TGA 分别表示起始密码子和终止密码子，阴影部分表示 3 个内含子序列，加框氨基酸为信号肽序列。加粗增大的碱基 A 表示转录起始位点；虚线部分表示光诱导调控元件；单下划线序列表示 MYC 转录因子识别位点；双下划线序列表示 MYB 转录因子的识别位点；粗下划线序列表示 Wbox

图 3 玫瑰 GAS4-like 基因核苷酸序列、推导的氨基酸序列及其部分启动子序列

2.3 GAS4-like 基因的同源比对与系统树构建

用多序列比对软件 ClustalX 将 GAS4-like 基因推断的氨基酸序列与 GenBank 上其他物种 GAS4 同源序列进行多重序列比较。玫瑰 GAS4-like 基因含有 12 个保守的半胱氨酸残基 C (图 4); NJ 法构建的

系统进化树表明 (图 5), 玫瑰 GAS4-like 蛋白与拟南芥 GAS4、GASA5、GASA6 以及矮牵牛的 GIP4、玉米的 TTO 6 蛋白同源关系最近而聚为一类。其中, 与拟南芥 GAS4 蛋白的相似性为 73%, GASA5 为 65%, GASA6 为 76%, 与矮牵牛的 GIP4 蛋白相似



所用物种及其 GAS4 蛋白的 GenBank 登录号如下: 矮牵牛 *Petunia hybrida* (Ph); GIP1, S54832; GIP2, AJ417389; GIP3, AJ417390; GIP4, AJ417391; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (At); GASA1, At1g75750; GASA2, At4g09610; GASA3, At4g09600; GASA4, At5g15230; GASA5, At3g02885; 番茄 *Lycopersicon esculentum* (Le); GAST1, P27057; RS11, P47926; 马铃薯 *Solanum tuberosum* (St); SNAKIN1, AJ320185; SNAKIN2, AJ312904; 非洲菊 *Gerbera hybrida* (Gh); GEG, AJ005206; 欧亚花葵 *Lavatera thuringiaca* (L); LTCOR11, AF007784; LTCOR12, AF060569; 草莓 *Fragaria ananassa* (Fa); Gast1-like, AF039183; 水稻 *Oryza sativa* (Os); Os-GASR1, BAD67542; OsGASR2, BAD67543; 玉米 *Zea mays* (Zm); TTO6, AY103785; 大马士革玫瑰 *Rosa damascene* (Rd); GASA4-like, FJ595792。图 5 同

图 4 玫瑰 GAS4-like 与其他物种同源蛋白 C 端保守结构域的多重比较

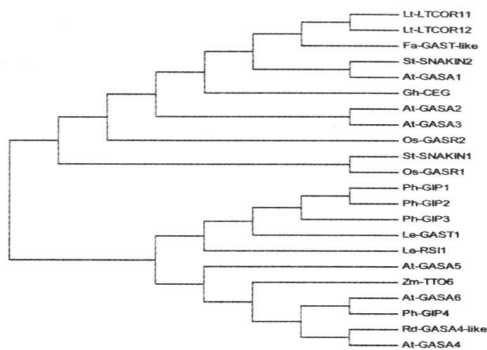


图5 根据 GAS4-like 氨基酸编码序列构建的系统进化树

性 70%，与玉米的 TTO6 蛋白相似性为 58%。

### 3 讨论

在本研究中，根据月季大马士革与拟南芥 *GASA4* 相似的 EST 序列 (GenBank 登录号 BI977238)，利用同源克隆结合 RACE 的方法首次获得了大马士革玫瑰 *GASA4-like* 基因序列，序列分析表明，其含有 3 个内含子、4 个外显子，这与已知的 *GASA* 基因家族的成员序列结构相一致。系统进化分析表明，*GASA4-like* 与拟南芥 *GASA4* 亲缘关系最近，氨基酸的相似性达到了 73%。已知拟南芥 *GASA4* 在花蕾和根中表达<sup>[3]</sup>，*GASA4* 启动子在包括芽、花蕾、主根和侧根在内的所有的分生组织区都有表达，这表明 *GASA4* 主要在细胞分裂过程中发挥作用，并受到赤霉素的诱导<sup>[14]</sup>。Roxrud 等<sup>[15]</sup> 对 *GASA4* 基因的启动子的研究也表明，其在顶端分生组织，正在发育的花蕾和胚中都有活性。而且，与大马士革玫瑰 *GASA4-like* 相似的矮牵牛 *GIP4*、拟南芥 *GASA5* 和 *GASA6* 也都受赤霉素诱导，在细胞分裂过程中表达<sup>[7, 16]</sup>。因此，推测大马士革玫瑰 *GASA4-like* 基因可能也受到赤霉素的调控，在植物分生组织区表达，在细胞分裂过程中起作用。

目前，拟南芥 *GASA* 基因家族中有 15 个成员，但只有 *GASA4* 基因的功能已经得到阐明。功能缺失和功能获得的转基因研究表明，*GASA4* 除了在花分生组织和花器官分化的调控中发挥作用外，还能使种子的大小和重量增加，从而影响总的种子产量<sup>[15]</sup>。这表明拟南芥 *GASA4* 除了参与植物结构的创建外，还可能和其他的家族成员一起参与了赤霉素介导的信号传导途径。Ko 等<sup>[17]</sup> 研究表明，热能诱导拟南芥 *GASA4* 基因的表达。它与从玉米 cDNA 文库中鉴定了的耐热基因 *TTO6* (Thermo-tolerance 6) 在 C 末端存在 69% 的相似性。在 35S 启动子驱动下过量表达

*GASA4* 时，转基因拟南芥植株的抗热性显著增强。已经知道热击因子 HSE (heat shock element) 对 BiP (binding protein) 蛋白的表达是必须的<sup>[18]</sup>。*GASA4* 与植株的抗热性有关，可能是由于 *GASA4* 蛋白或者作为胞外热击信号分子间接地使 BiP 蛋白的表达上调，或者作为分子伴侣通过稳定内质网上的 BiP 蛋白，从而提高了转基因植株的耐热性。在本研究中，玫瑰 *GASA4-like* 除了与拟南芥 *GASA4* 氨基酸具有较高的相似性外，与玉米耐热基因 *TTO6* 氨基酸的相似性也达到了 58%。对 GenBank 的 EST 数据库的 blast 分析也表明，玫瑰 *GASA4-like* 基因与高温和盐胁迫下诱导表达的基因高度同源，表明该基因可能参与了作物的耐热性和耐盐性。在大马士革玫瑰 *GASA4-like* 基因的部分启动子序列中发现了多个 MYB、MYC 转录因子识别位点和诱导抗性响应基因转录的 W box，也表明了 *GASA4-like* 蛋白可能也参与了植物的抗性调节过程。在未来的研究中，需要获得更长大马士革玫瑰 *GASA4-like* 启动子序列，通过转基因稳定表达的方法了解其启动子详细的时空表达模式，并通过 *GASA4-like* 过量表达和通过 RNA 干涉或反义 RNA 抑制其表达的方法来确定其具体的功能。

### 参考文献:

- [1] Hooley R. Gibberellins: perception, transduction and responses[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 1529—1555.
- [2] Fleet C M, Sun T P. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis[J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8(1): 77—85.
- [3] Herzog M, Dorne A, Grellet F. GASA, a gibberellin-regulated gene family from *Arabidopsis thaliana* related to the tomato GAST1 gene[J]. Plant Mol Biol, 1995, 27(4): 743—752.
- [4] Shi L, Gast R T, Gopalraj M, et al. Characterization of a shoot-specific, GA<sub>3</sub>- and ABA-regulated gene from tomato[J]. Plant J, 1992, 2(2): 153—159.
- [5] Taylor B H, Scheuening C F A. Molecular marker for lateral root initiation: the RSF-1 gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia[J]. Mol Gen Genet, 1994, 243(2): 148—157.
- [6] Ben-Nissan G, Lee J-Y, Borohov A, et al. GIP, a Petunia hybrida GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering[J]. Plant J, 2004, 37(2): 229—238.
- [7] Ben-Nissan G, Weiss D. The petunia homologue of tomato *gast1*: transcript accumulation coincides with gibberellin-in-

duced corolla cell elongation[ J ]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32 (6): 1067—1074.

- [ 8 ] Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, *et al.* GEG participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *Gerbera hybrida*[ J ]. *Plant Cell*, 1999, 11(6): 1093—1104.
- [ 9 ] Segura A, Moreno M, Madueno F, *et al.* Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens[ J ]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1999, 12(1): 16—23.
- [ 10 ] Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, *et al.* Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection [ J ]. *Plant Physiol*, 2002, 128(3): 951—961.
- [ 11 ] Furukawa T, Sakaguchi N, Shimada H. Two OsGASR genes, rice GAST homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different expression patterns in developing panicles[ J ]. *Genes Genet Syst*, 2006, 81 (3): 171—180.
- [ 12 ] Fuente J L, Amaya I, Castillejo C, *et al.* The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation[ J ]. *J Exp Bot*, 2006, 57(10): 2401—2411.
- [ 13 ] Liu Y G, Robert F W. Thermal Asymmetric Interlaced

PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from PI and YAC clones for chromosome walking[ J ]. *Genomics*, 1995, 25(3): 674—681.

- [ 14 ] Aubert D, Chevillard M, Dorne A-M, *et al.* Expression patterns of GASA genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions[ J ]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36(6): 871—883.
- [ 15 ] Roxrud L, Lid S E, Fletcher J C, *et al.* *GASA4*, one of the 14-member *Arabidopsis* GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development[ J ]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 471—483.
- [ 16 ] Zhang S C, Wang X J. Expression pattern of *GASA4* downstream genes of DELLA, in *Arabidopsis*[ J ]. *Chin Sci Bull*, 2008, 53(24): 3839—3846.
- [ 17 ] Ko C B, Woo Y M, Lee D J, *et al.* Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the *GASA4* gene[ J ]. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45(9): 722—728.
- [ 18 ] Oka M, Kimata Y, Mori K, *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* KAR2(BiP) gene expression is induced by loss of cytosolic HSP70/ Ssalp through a heat shock element-mediated pathway[ J ]. *J Biochem*, 1997, 121 (3): 578—584.

(上接第 146 页)

- [ 7 ] 毛家伟, 张翔, 范艺宽, 等. 豫中烟区主要植烟土壤养分状况分析[ J ]. *河南农业科学*, 2008(10): 72—75.
- [ 8 ] 彭冠云, 周清明, 易克, 等. 中国烤烟大田施肥研究进展[ J ]. *湖南农业科学*, 2006(3): 70—72.
- [ 9 ] 赵兴, 刘卫群, 张维理, 等. 中国烟草平衡施肥技术研究现状与展望[ J ]. *中国烟草学报*, 2003, 8(增刊): 30—35.
- [ 10 ] 刘国顺. 国内外烟叶质量差异分析和提高烟叶质量技术途径探讨[ J ]. *中国烟草学报*, 2003, 8(增刊): 21—28.
- [ 11 ] 刘国顺. 优化施肥技术完善烟叶质量[ J ]. *河南烟草研究*, 1997(2): 22—26.
- [ 12 ] 刘吉振, 张天平, 徐卫红. 国内优质烤烟施肥研究进展

[ J ]. *广西农业科学*, 2005, 36(6): 539—543.

- [ 13 ] 叶协锋, 杨超, 刘国顺, 等. 烟草钾素研究进展[ J ]. *河南农业科学*, 2004(11): 14—18.
- [ 14 ] 杨铁钊, 舒海燕, 赵现章. 我国钾素营养研究研究现状与展望[ J ]. *烟草科技*, 2002(7): 38—42.
- [ 15 ] 张翔, 范艺宽, 毛家伟, 等. 不同种植制度和施肥措施对烟田土壤养分及微生物的影响[ J ]. *华北农学报*, 2008, 23(4): 208—213.
- [ 16 ] 周冀衡, 张永安, 杨虹琦. 提高上部烟叶可用性和调控烟碱含量的烟碱进展[ C ]. *中国烟叶学术论文集*, 2001: 169—175.
- [ 17 ] 朱贵明, 何命军. 对我国烟草肥料研究与开发工作的思考[ J ]. *中国烟草科学*, 2002(1): 19—20.