

曹明明 吴志明 娄群峰 等. 甜瓜属野生种 *Cucumis hystrix* Chakr. 胞质葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的克隆与启动子结构分析[J]. 南京农业大学学报 2013 36(2):25-30

## 甜瓜属野生种 *Cucumis hystrix* Chakr. 胞质葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的克隆与启动子结构分析

曹明明 吴志明 娄群峰 阮氏清云 陈劲枫\*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏南京 210095)

**摘要:** 根据植物葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH, EC1.1.1.49)氨基酸保守区域,设计简并引物,采用 RT-PCR 技术克隆得到甜瓜属野生种 *Cucumis hystrix* Chakr. ( $2n=24$ ) *G6PDH* 基因 cDNA 片段;随后基于该序列设计特异引物,PCR 方法筛选野生种 BAC 文库,获得 2 个 BAC 阳性单克隆。测序后获得了 *G6PDH* 基因全序列及其上游启动子序列,GenBank 登录号: JQ771576。序列分析显示:*G6PDH* 基因全长约 6.5 kb,由 15 个外显子和 14 个内含子组成;内含子序列均符合 5'-gt-ag-3' 结构。外显子拼接后获得了 *G6PDH* 基因的开放阅读框(ORF)序列,序列全长 1 551 bp,编码 516 个氨基酸,与黄瓜基因组网站公布的 *G6PDH* 基因核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别为 98.71% 和 99.03%。野生种 *G6PDH* 氨基酸序列 N 端缺少转运肽序列,确定为野生种胞质 *G6PDH*。氨基酸序列与烟草、马铃薯、荷兰芹、猕猴桃、拟南芥、大豆、小麦、玉米、葡萄、杨树等植物胞质 *G6PDH* 同源性高达 77% 以上。系统发育树分析发现,甜瓜属胞质 *G6PDH* 与茄科植物最先聚类,植物胞质 *G6PDH* 在分子进化水平上与物种进化相符。启动子结构分析表明:序列含有启动子基本元件 TATA-box、CAAT-box,还含有丰富的光响应元件,与环境胁迫响应相关的不同顺式作用元件,促进高水平转录的 5'UTR Py-rich stretch 元件和提高表达的 CAT-box 元件等。

**关键词:** 甜瓜属野生种;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因;启动子;BAC 文库;克隆;序列分析

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2013)02-0025-06

## Cloning of cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene and structure analysis of its promoter in *Cucumis hystrix* Chakr.

CAO Mingming, WU Zhiming, LOU Qunfeng, NGUYEN Thi Thanh Van, CHEN Jinfeng\*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Based on the conserved sequences of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) amino acids of the other plants reported in GenBank, the degenerate primers were designed to isolate intermediate fragment of the *G6PDH* gene from *Cucumis hystrix* Chakr. ( $2n=24$ ), a wild species in *Cucumis*. According to the intermediate fragment of the *G6PDH* gene we designed specific primers for PCR screening of BAC libraries of *Cucumis hystrix* Chakr. One of the two positive BAC clones obtained was sequenced. The sequence contained entire *G6PDH* gene, which was submitted to GenBank, and the accession number was JQ771576. Sequence analysis indicated that the total length of *G6PDH* gene was 6.5 kb and consisted of 15 exons and 14 introns. The introns agreed with the structure 5'-gt-ag-3'. The ORF of *G6PDH* gene after splicing was 1 551 bp and encoded a protein containing 516 amino acid residues. The identities of nucleotides of ORF and amino acids sequence sharing with cucumber reported on the web of cucumber genome database were 98.71% and 99.03%, respectively. We confirmed that the protein G6PDH was cytoplasmic because of the absence of N-end transferring peptide. Compared with *Nicotiana benthamiana*, *Solanum tuberosum*, *Petroselinum crispum*, *Actinidia chinensis*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Vitis vinifera*, *Populus suaveolens*, et al, the cytoplasmic G6PDHs showed higher similarity than 77%. Phylogenetic analysis showed that cytoplasmic G6PDH clustered with *Solanaceae* family firstly and the molecular evolution of cytoplasmic G6PDH was corresponding to the evolution of species. The analysis of the promoter sequence indicated that the basic elements TATA-box and CAAT-box of promoter were found. Moreover, there were abundant light responding elements, different elements involved in abiotic stress responses, two 5'UTR Py-rich repeat elements increasing high transcription and CAT-box activating higher expression.

**Key words:** *Cucumis hystrix* Chakr.; *G6PDH* gene; promoter; BAC library; clone; sequence analysis

收稿日期: 2012-04-13

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30830079); 国家自然科学基金项目(30972007, 31071801); 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119001-01, 2012CB113900); 国家 863 计划项目(2010AA10A108, 2012AA100202); 江苏省科技支撑计划项目(BE2009310); 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(11)1002)

作者简介: 曹明明, 硕士研究生,\* 通信作者: 陈劲枫, 教授, 博导, 从事蔬菜遗传育种和生物技术研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn.

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH, EC1.1.1.49)可以催化戊糖磷酸途径(oxidative pentose phosphate pathway, OPPP)的第一步反应并生成NADPH,是OPPP途径的关键酶和限速酶。OPPP调控植物正常生长发育,为核酸合成提供中间物质<sup>[1]</sup>,NADPH为不同生化反应提供还原力并维持细胞内的氧化还原平衡<sup>[2]</sup>。OPPP能够响应不同的环境胁迫,从而提高植物的胁迫耐受性。有研究表明,G6PDH能够响应环境中的不同胁迫,如盐胁迫<sup>[3-4]</sup>、重金属毒害<sup>[5]</sup>、冷胁迫<sup>[6]</sup>和病原菌侵害<sup>[7-8]</sup>。G6PDH由核基因编码,目前,多种植物的G6PDH基因已被克隆<sup>[3,9-10]</sup>。利用基因工程的方法,通过促进G6PDH基因的表达,提高G6PDH活性,可以促进植物生长,并且提高植物对环境不同胁迫的抗性<sup>[11]</sup>。

甜瓜属野生种 *Cucumis hystrix* Chakr. 是迄今唯一能与栽培黄瓜杂交可育的野生种质资源,拥有多种抗病、抗逆的珍贵目标性状<sup>[12-14]</sup>。为了挖掘和利用野生种中的优异基因资源,本研究利用同源克隆的方法并结合野生种基因组BAC文库,克隆获得了野生种G6PDH基因全序列及上游启动子序列,旨在为将来深入探讨甜瓜属植物G6PDH功能,以及利用遗传工程的方法提高黄瓜的抗性奠定重要的研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与简并引物设计

甜瓜属野生种 *C. hystrix* Chakr. 由南京农业大学葫芦科作物种质创新实验室保存,取植株新鲜幼嫩的叶片液氮速冻后保存于-70℃冰箱,用于基因组DNA和总RNA的提取。

根据GenBank上已报道的植物G6PDH蛋白氨基酸序列的保守区段设计简并引物P1(GBGCYT-CYGGDGAYCTHGC)和P2(TSVAGRACCTTVACTTTCTC),预期片段大小800bp,用于G6PDH基因cDNA片段的克隆。引物由Invitrogen公司合成(下同)。

### 1.2 RT-PCR扩增G6PDH基因cDNA片段及产物的回收和克隆

Trizol法提取野生种总RNA(TaKaRa RNAiso Plus)。基因组DNA提取采用CTAB法<sup>[15]</sup>。

RT-PCR体系为25μL,其中5×Buffer 5μL,dNTPs(2.5μmol·L<sup>-1</sup>)4μL,RNA酶抑制剂(TaKaRa)0.5μL,总RNA 3μL,反向引物P2 2μL,反转录酶(Promega M-MLV Reverse Transcriptase)1μL,ddH<sub>2</sub>O(DEPC处理)9.5μL。先将总RNA、引物P2和ddH<sub>2</sub>O混合,于88℃保持10min后迅速置于冰上冷却,然后加入其他试剂,轻弹混匀,42℃反应1h。

以上述RT-PCR产物为模板,PCR扩增G6PDH基因的cDNA片段。使用TaKaRa Ex Taq酶,反应体系25μL,其中RT-PCR产物2μL,10×Ex Taq Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus)2.5μL,dNTP Mixture(各2.5μmol·L<sup>-1</sup>)1μL,引物P1、P2各0.5μL,Ex Taq 0.3μL,ddH<sub>2</sub>O 18.2μL。PCR反应程序为:94℃ 5min;95℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 1min,35个循环;72℃ 10min。

产物经1.0%琼脂糖(TaKaRa)凝胶电泳分析后,按琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TaKaRa)说明回收目的片段,回收片段以pMD19-T Vector(TaKaRa)为载体,16℃过夜连接后,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。在含有氨苄青霉素的LB固体平板上选择培养,挑取白色单菌落培养后进行菌落PCR鉴定。选取阳性克隆送交南京金斯瑞生物科技公司测序(下同)。将测序得到的片段序列登陆NCBI进行BLAST验证和GenBank检索进行同源性比对。

### 1.3 BAC文库的筛选与测序

甜瓜属野生种 *C. hystrix* 基因组BAC文库由本实验室构建(尚未正式发表)。根据反转录获得的基因cDNA片段序列,设计特异引物用于野生种BAC文库的PCR筛选。推测G6PDH基因中可能存在内含子,设计引物时上下游引物序列不可跨越内含子和外显子。引物以野生种基因组DNA为模板进行预扩增,最终确定上下游引物分别为P3(ATGTGAGTGGGTCCTATGATTCTGC)和P4(TATTCATCAAAGTATCCACCA-CGCC),预期扩增大小为800bp,产物回收克隆测序。测序结果为后续BAC阳性克隆测序提供引物设计的参照。

为便于PCR筛选,采用池化(pooling)的方法建立了野生种BAC文库的PCR筛选体系。文库使用96孔细胞培养板(Corning/Costar)保存,每孔1个BAC单克隆。以96孔板为单位,单板96个克隆混合作为1个超级池。筛选过程先进行超级池的筛选,获得阳性超级池后,针对单板进行行池、列池的筛选,进而获得BAC阳性克隆。

采用碱裂解法提取超级池BAC混合质粒DNA。单板行池、列池筛选以混合菌液为模板进行扩增。

PCR 扩增条件为:94 °C 4 min;94 °C 30 s 62 °C 30 s 72 °C 1 min 36 个循环;72 °C 10 min。筛选获得 BAC 阳性克隆送交测序公司进行测序。

#### 1.4 序列分析

利用 DNAMAN 软件进行核苷酸序列的拼接及氨基酸序列的比对;MEGA 5 软件最大似然法构建植物 G6PDH 分子系统发育树,同时进行 Bootstrap 验证(重复 1 000 次)。NCBI BLAST 在线分析等工具进行分析。利用 PLACE<sup>[16]</sup>和 PlantCARE<sup>[17]</sup>软件对起始密码子上游 1 300 bp 序列进行启动子结构元件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 扩增、克隆与序列分析

采用 RT-PCR 在 750 ~ 1 000 bp 之间扩增出 1 条清晰条带,片段大小与预计相符,将该条带回收克隆测序。测序结果显示,该片段长 807 bp,BLAST 检索该片段与其他植物 G6PDH 基因 cDNA 相应的片段具有较高的同源性,与葡萄同源性高达 81.91%,表明所扩增的片段为野生种 G6PDH 基因 cDNA 片段。

### 2.2 BAC 文库的筛选结果

以基因组 DNA 为模板,P3、P4 为引物扩增出约 800 bp 的目的条带,条带与预期相符,初步确定为目标条带。以基因组 DNA 作为阳性对照,PCR 筛选野生种 BAC 文库超级池,共获得 2 个阳性超级池。验证结果如图 1 所示。

在此基础上,分别针对阳性超级池对应的 173 号单板和 237 号单板进行行池和列池 PCR 筛选。结果如图 2、图 3 所示,173 板出现阳性条带的是第 8 列 F 行,237 板为第 1 列 F 行。因此,确定含有 G6PDH 基因的 BAC 阳性克隆为 173-8F 和 237-1F。

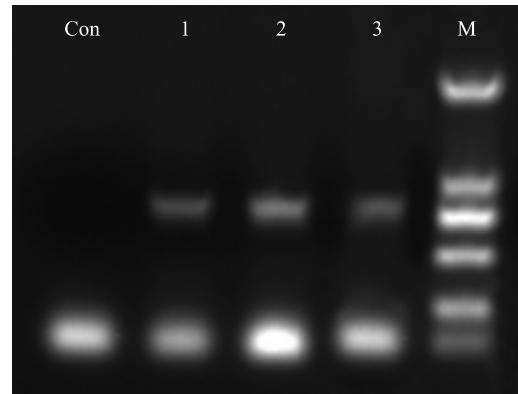


图 1 BAC 文库超级池 PCR 筛选结果验证

Fig. 1 Confirmation of the results of the BAC library superpools amplified by PCR with primers P3 P4

Con. 无模板对照 Control; 1. 基因组 Genome DNA; 2. 173 池 Superpool 173; 3. 237 池 Superpool 237; M. DL2000 marker

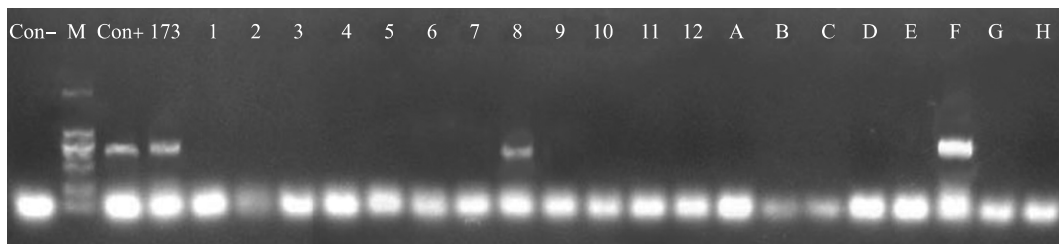


图 2 173 板阳性克隆的筛选结果

Fig. 2 Results of the PCR screening for positive BAC clone from 173 plate

Con -. 无模板对照 Control; M. DL2000 marker; Con + . 基因组 Genome DNA; 173. 173 超级池 Superpool 173; 1 ~ 12. 单列混合 Column 1 - 12; A ~ H. 单行混合 Row A - H

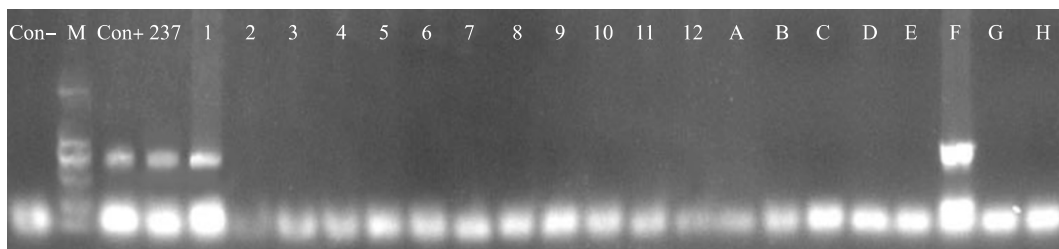


图 3 237 板阳性单克隆的筛选结果

Fig. 3 Results of the PCR screening for positive BAC clone from 237 plate

Con -. 无模板对照 Control; M. DL2000 marker; Con + . 基因组 Genome DNA; 237. 237 混合池 Superpool 237; 1 ~ 12. 单列混合 Column 1 - 12; A ~ H. 单行混合 Row A - H

### 2.3 克隆测序与序列分析

选择阳性克隆 173-8F 送交测序公司进行测序,利用 DNAMAN 软件拼接后最终获得了约 10 kb 序列,提交 GenBank,登录号为 JQ771576。该序列包含有 *G6PDH* 基因编码区全序列、上游调控区序列及下游非编码区序列。

**2.3.1 基因序列分析** 通过与黄瓜基因组网站公布的 *G6PDH* 基因 mRNA 序列([http://cucumber.genomics.org.cn/page/cucumber/index.jsp\\_Csa022482](http://cucumber.genomics.org.cn/page/cucumber/index.jsp_Csa022482)) 比对分析,推测出野生种 *G6PDH* 基因结构(图 4),基因由 15 个外显子和 14 个内含子组成,长约 6.5 kb(不包括上游调控区)。内含子序列均符合 White 等<sup>[18]</sup>报道的 5'-gt-ag-3'结构。将外显子拼接后获得了野生种 *G6PDH* 基因开放阅读框(ORF)序列。基因 ORF 全长 1 551 bp,推测编码 516 个氨基酸。与黄瓜 *G6PDH* 核苷酸序列同源率为 98.71%,氨基酸序列同源率为 99.03%。

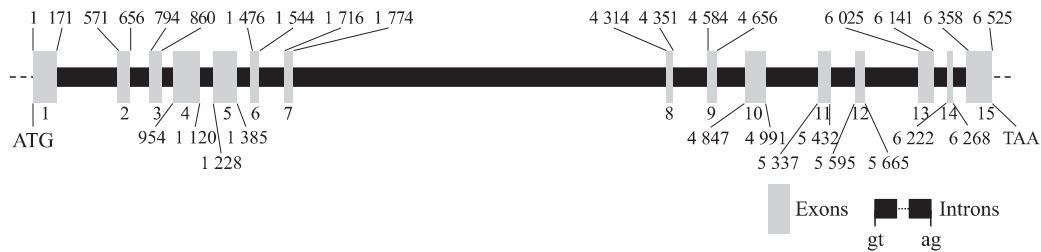


图 4 甜瓜属野生种胞质 *G6PDH* 基因结构示意图

Fig. 4 Structure organization of wild species cytoplasmic *G6PDH* gene

灰色框表示外显子;灰色框之间的黑粗线表示内含子,内含子均符合 5'-gt-ag-3'结构;灰色框下数字表示外显子编号,ATG 为起始密码子,数字标注外显子 5'端和 3'端碱基编号(起始密码子开始编号)。

Exons are represented by gray solid boxes. Black thick lines between boxes are introns, introns agree with the structure 5'-gt-ag-3'. The gray solid boxes are numbered by the numbers under them. ATG is initiation codon, 5' end and the 3' end bases numbers are shown (numbered from the first base of initiation codon).

根据野生种 *G6PDH* 基因 CDS 序列推导出的野生种 *G6PDH* 氨基酸序列,在 NCBI 网站 BLASTP 在线检索到黄瓜 (*Cucumis sativus*)、烟草 (*Nicotiana benthamiana*, BAK22407)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*, ABB55386)、荷兰芹 (*Petroselinum crispum*, AAB69318)、猕猴桃 (*Actinidia chinensis*, ABR45722)、水稻 (*Oryza sativa*, AAL79959)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, CAB52674)、大豆 (*Glycine max*, NP\_001241264)、小麦 (*Triticum aestivum*, BAA97662)、玉米 (*Zea mays*, NP\_001150684)、葡萄 (*Vitis vinifera*, XP\_002266527)、杨树 (*Populus suaveolens*, AAR26303) 等植物的 *G6PDH* 氨基酸序列。比对烟草和水稻中胞质和质体 *G6PDH* 氨基酸序列与本研究获得的野生种 *G6PDH* 氨基酸序列,发现野生种 *G6PDH* 氨基酸序列 N 端缺少约 50 个氨基酸残基多肽,推测该 *G6PDH* 基因编码的蛋白质为胞质 *G6PDH*。利用 MEGA 5 软件构建了不同物种间的 *G6PDH* 氨基酸序列系统发育树(图 5)。从图中可以看出,*G6PDH* 在同属同科中较先聚类,如甜瓜属中的

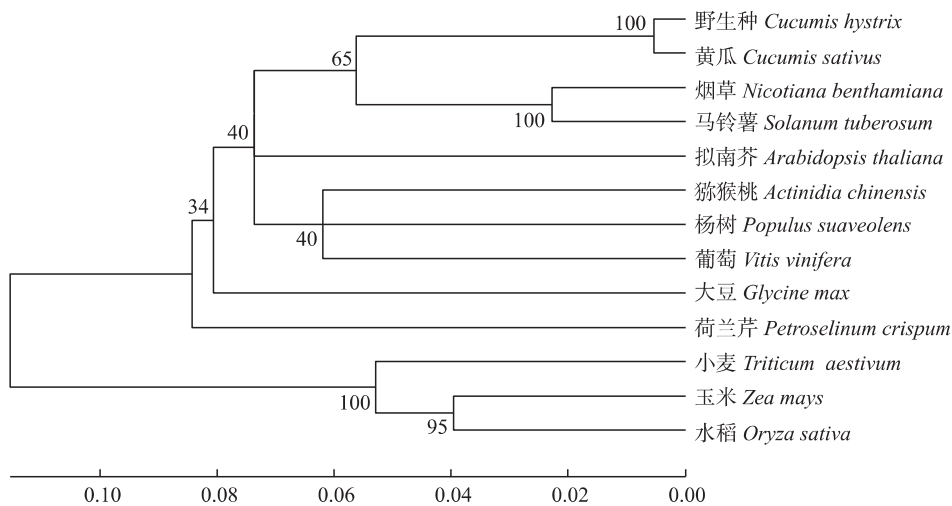


图 5 *G6PDH* 氨基酸序列系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of *G6PDH* in different species

黄瓜与野生种 茄科中的烟草与马铃薯,禾本科的水稻、玉米与小麦,说明植物亲缘关系越近,G6PDH 氨基酸序列同源性越高。甜瓜属植物与茄科植物较先聚类,其次与拟南芥、猕猴桃、杨树、葡萄、大豆等双子叶植物聚类,与小麦、玉米等单子叶植物明显分为两类,这与植物的自然进化相一致。

**2.3.2 基因启动子分析** 对胞质 *G6PDH* 基因起始密码子上游 1 300 bp 序列进行分析,利用 TSSP-TCM 软件预测转录起始位点为 A,位于起始密码子上游 43 bp 处。应用 PlantCARE、PLACE 软件分析,发现该序列具有启动子的基本转录元件:包括位于 -34 bp 的 TATA-box 和分别位于 -58、-723、-977、-1 015、-1 108 和 -1 202 bp 处的 CAAT-box(以转录起始位点进行碱基编号,下同)。该区域含有丰富的与光响应相关的 AE-box(-106 bp)、GT1-motif(-245 bp)、Sp1(-349 bp)、as-2-box(-361 bp)、ACE(-371 bp)、G-Box(-438 bp)、Box 4(-776 bp、-1 134 bp)、GA-motif(-811 bp)、MRE(-852 bp)。具有 2 个与高转录水平相关的 5UTR Py-rich stretch 元件(-103 和 -380 bp),促进代谢表达的 CAT-box(-577 bp) 2 个与热胁迫响应的 HSE(-182、-967),与环境胁迫响应相关的 TC-rich repeat(-277 bp)、MYB(-571 bp) 元件,以及位于 -265 bp 的与组织特异激活相关的 dOCT 元件(图 6)。



图 6 甜瓜属野生种胞质 *G6PDH* 基因启动子预期功能元件

Fig. 6 The putative cis-acting elements of wild species cytoplasmic *G6PDH* gene promoter

### 3 讨论

G6PDH 是戊糖磷酸途径中的关键限速酶。鉴于戊糖磷酸途径在植物生长发育与对环境胁迫的重要作用,通过遗传工程的方法调节 G6PDH 的活性,可望达到提高植物对环境各胁迫因子的抗性<sup>[11]</sup>。黄瓜是世界性蔬菜作物, *C. hystrix* 是同属珍稀的野生种质资源。为了发掘利用这些野生种质基因资源,我们克隆了野生种胞质 *G6PDH* 基因及启动子序列,为随后利用该基因进行黄瓜的遗传改良奠定基础。

植物中的 G6PDH 共存在两种形式,一种存在于胞质中,一种存在于质体的基质中<sup>[19]</sup>;已有研究发现质体 G6PDH 氨基酸序列比胞质 G6PDH 序列在 N 端多出 50~80 个氨基酸残基<sup>[10, 20-21]</sup>。通过比较烟草和水稻中胞质和质体 G6PDH 与本研究获得的野生种 G6PDH 序列,可以确定野生种 G6PDH 为胞质 G6PDH。在氨基酸序列水平上,不同植物的胞质 G6PDH 和质体 G6PDH 同源性分别达到 85% 和 75% 以上,说明 G6PDH 在物种间具有很高的保守性。通过构建物种间的系统发育树发现,物种间亲缘关系越近的 G6PDH 越早聚类,说明 G6PDH 的进化与物种进化是相符的。基因的高效转录和表达与基因的上游调控元件直接相关,本研究也获得了野生种 *G6PDH* 基因上游启动子区序列。在启动子区内,除基本启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box 外,还含有多种与环境胁迫响应的顺式作用元件:如丰富的光响应元件、热胁迫响应元件、低温胁迫响应元件及促进高转录与表达的元件。这些元件的存在符合胁迫应答的基因应该具备的相应不同的顺式作用元件<sup>[22]</sup>,同时可以利用启动子的特点对 *G6PDH* 基因的表达进行调控。

BAC文库作为一个重要工具,现在已经广泛应用于基因组物理作图(physical mapping)、遗传图谱(genetic mapping)构建、图位克隆(map-based cloning)、基因组测序(genomic sequencing)及目的基因克隆等研究<sup>[23]</sup>。一般同源克隆的方法获取基因的部分序列后可以利用BAC文库或者cDNA末端快速扩增技术(rapid-amplification of cDNA ends,RACE)等方法进一步获取基因的全长序列。但是RACE的方法只能获取该基因mRNA的基本序列信息。BAC文库则可以获得基因的全序列信息及基因的上游调控序列信息,所以利用BAC文库也不失为获取目的基因和基因调控序列信息的好方法。本实验室已完成甜瓜属野生种BAC文库的构建,野生种胞质G6PDH基因的克隆与分析也为有效利用野生种BAC文库和挖掘野生种基因资源提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Neuhaus H E,Emes M J. Nonphotosynthetic metabolism in plastids[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 2000 51: 111 - 140
- [2] Kletzien R,Harris P,Foellmi L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones,nutrients, and oxidant stress[J]. FASEB J,1994 8: 174 - 181
- [3] Nemoto Y,Sasakuma T. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) gene by salt stress in wheat(*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Science 2000 158: 53 - 60
- [4] Li J S,Chen G C,Wang X M,et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-dependent hydrogen peroxide production is involved in the regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter protein in salt-stressed callus from *Carex moorcroftii* [J]. Physiologia Plantarum 2011, 141: 239 - 250
- [5] Esposito S,Carillo E,Carfagna S. Ammonium metabolism stimulation of glucose-6P dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase in young barley roots[J]. J Plant Physiol,1998 153: 61 - 66
- [6] Honjoh K,Machida T,Hagisako T,et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA for low temperature inducible cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from *Chlorella vulgaris* and expression of the gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Plant Science 2007 172: 649 - 658
- [7] Batz O,Logemann E,Reinold S,et al. Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells[J]. Biol Chem,1998 379: 1127 - 1135
- [8] Sindelar L,Sindelarova M. Correlation of viral RNA biosynthesis with glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and host resistance[J]. Planta 2002 215: 862 - 869
- [9] Graeve K,Schaewen A,Scheibe R. Purification,characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato(*Solanum tuberosum* L.) [J]. The Plant Journal,1994 5(3): 353 - 361
- [10] Knight J S,Emes M J,Debnam P M. Isolation and characterization of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum* [J]. Planta 2001 212: 499 - 507
- [11] Scharte J,Schon H,Tjaden Z,et al. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA 2009 106(19): 8061 - 8066
- [12] Chen J F,Kirkbride J H. A new synthetic species of *Cucumis*(cucurbitaceae) from interspecific hybridization and chromosome doubling[J]. Brittonia 2000 52(4): 315 - 319
- [13] 庄飞云,陈劲枫,钱春桃,等. 甜瓜属种间杂交新种及其后代对低温的适应性反应[J]. 南京农业大学学报 2002 25(2): 27 - 30
- [14] 陈劲枫,林茂松,钱春桃,等. 甜瓜属野生种及其与黄瓜种间杂交后代抗根结线虫初步研究[J]. 南京农业大学学报 2001 24(1): 21 - 24
- [15] Murray M G,Thompson W F. Rapid isolation of high weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research,1980 8(19): 4321 - 4325
- [16] Higo K,Ugawa Y,Iwamoto M,et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements(PLACE) database: 1999[J]. Nucleic Acids Research,1999 27(1): 297 - 300
- [17] Lescot M,Dehais P,Thijs G,et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research 2002 30(1): 325 - 327
- [18] White O,Soderlund C,Shanmugan P,et al. Information contents and dinucleotide compositions of plant intron sequences vary with evolutionary origin[J]. Plant Mol Biol,1992 19: 1057 - 1064
- [19] Schnarrenberger C,Oceser A,Tolbert N E. Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves[J]. Arch Biochem Biophys,1973 154: 438 - 448
- [20] Schaewen A V,Langenkamper G,Graeve K,et al. Molecular characterization of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato in comparison to its cytosolic counterpart[J]. Plant Physiol,1995 109: 1327 - 1335
- [21] Wakao S,Benning C. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis[J]. The Plant Journal 2005 41: 243 - 256
- [22] Yamaguchi-Shinozaki K,Shinozaki K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters[J]. Trends in Plant Sci 2005 10(2): 88 - 94
- [23] Peterson D G,Tomkins J P,Frisch D A,et al. Construction of plant bacterial artificial chromosome(BAC) libraries: an illustrated guide[J]. Journal of Agricultural Genomic 2000 5: 1 - 100

责任编辑: 范雪梅