

## 三叶青扩展蛋白家族基因全长 cDNA 的克隆及其生物信息学和表达分析

宋亚玲, 向太和\*, 武盼, 王博, 李姣姣, 张挺

杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036

**摘要:** 目的 克隆三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* 的扩展蛋白家族基因, 对其进行器官表达分析, 并初步探讨其功能。方法 根据 GenBank 中登录的扩展蛋白基因保守区域序列设计 1 对简并引物, 以三叶青球形块根 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 再结合 RACE 技术, 获得三叶青扩展蛋白基因全长 cDNA 序列, 命名为 Th-exp。采用半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 分析 Th-exp 基因在不同器官中的表达情况。结果 克隆获得扩展蛋白家族基因, 共 782 bp, 其中包含 630 bp 开放阅读框, 编码 209 个氨基酸(GenBank 登陆号 KP693606)。Th-exp 编码的蛋白质具有典型的扩展蛋白结构特征, N 端含有 8 个半胱氨酸的结构域, C 端含有 4 个保守的色氨酸结构域, 中间含有组氨酸功能域。Blast 分析显示, Th-exp 与葡萄、醉蝶花中扩展蛋白基因具有相似性。半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 分析表明, Th-exp 在三叶青叶、茎、普通细根和球形块根中均有表达, 但球形块根中表达强于其他器官。结论 克隆得到三叶青扩展蛋白家族基因 Th-exp 全长 cDNA, 初步预测其参与了三叶青块根的发育过程。

**关键词:** 三叶青; 扩展蛋白基因; 克隆; 表达; 块根

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)05-0810-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.021

## Molecular cloning, bioinformatics characterization, and gene expression analysis of full-length expansin gene cDNA from *Tetrastigma hemsleyanum*

SONG Ya-ling, XIANG Tai-he, WU Pan, WANG Bo, LI Jiao-jiao, ZHANG Ting

College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

**Abstract: Objective** To clone the sequence and characterize gene expression of an expansin gene from *Tetrastigma hemsleyanum*, and to predict its probable function. **Methods** According to the conservative region sequences of expansin gene in GenBank database, one pair of degenerate primers were designed for RT-PCR. The conservative region fragment was first amplified by RT-PCR from cDNA template of *T. hemsleyanum*. The full-length sequence of expansin gene cDNA (named as Th-exp) was extended by RACE (rapid-amplification of cDNA ends). Th-exp expression levels in different organs were conducted by semi-quantitative RT-PCR and fluorescence quantitative PCR. **Results** The full-length cDNA sequences of Th-exp gene were obtained in 782 bp. Th-exp gene contained a 630 bp open reading frame, which encoded a protein of 209 amino acids (GenBank accession number KP693606). The protein encoded by Th-exp harbours a typical expansin structure, including eight cysteine domains in N terminal region, four conserved tryptophan domain in C terminal region, and histidine function domain in intermediate region. Blast alignment showed that Th-exp was similar to expansin genes of *Vitis vinifera* and *Tarenaya hassleriana*. Semi-quantitative RT-PCR and fluorescence quantitative PCR indicated that Th-exp could express in the leaves, stems, ordinary fine roots, and calabash-shaped roots, while the expression level in calabash-shaped roots was higher than those in other organs. **Conclusion** The expansin gene (Th-exp) is cloned from *T. hemsleyanum*, and it could be involved in the development of root tubers in *T. hemsleyanum*.

**Key words:** *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; expansin gene; clone; expression; root tubers

三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 又名金线吊葫芦、蛇附子、小扁藤、三叶扁藤、石老鼠等, 为葡萄科 (Vitaceae) 崖爬藤属 *Tetrastigma*

Planch. 植物, 是我国特有的珍稀濒危药用植物, 主要以块根入药, 具有清热解毒、消炎等功能, 近年来发现三叶青还具有抗肿瘤的功效<sup>[1-2]</sup>。三叶青主要

收稿日期: 2015-09-13

基金项目: 浙江省药用植物种质改良与质量控制技术重点实验室开放项目 (201302)

作者简介: 宋亚玲, 女, 硕士在读, 研究方向为中药材基因功能研究。E-mail: 15235446760@163.com

\*通信作者 向太和, 男, 博士, 教授, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: xthcn@163.com

分布在浙江、安徽、江西、福建等长江以南地区，对生长环境要求苛刻，它需生长在海拔 700 m 的深山密林和悬崖峭壁的背阴面，上面要有散射光，旁边要有细水渗出，下面要有树叶覆盖，气温保持在 18 ℃ 左右才有利于其生长；而且，在自然条件下其生长缓慢，形成球形块根需要 3~5 年<sup>[3]</sup>。

扩展蛋白 (expansins) 是一个相对保守的基因家族，由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  4 个亚家族组成，是植物细胞壁的重要组成部分，广泛存在于各种植物细胞组织中<sup>[4]</sup>。有研究表明，扩展蛋白的积累量与胚轴<sup>[5]</sup>、胚芽鞘<sup>[6]</sup>、节间<sup>[7]</sup>、叶片<sup>[8]</sup>和根系<sup>[9]</sup>等的生长有关。本研究从三叶青块根中克隆获得了扩展蛋白家族基因 (Th-exp)，并进行了序列及基因表达的分析，为进一步探讨扩展蛋白基因在三叶青块根发育中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 为采自浙江省丽水市庆元县山区野生种，由浙江省丽水市农业科学院鉴定提供，种植于杭州师范大学。

### 1.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

利用生工生物工程 (上海) 股份有限公司的 RNA 抽提试剂盒提取三叶青块根中的 RNA，具体

操作按照试剂盒说明书进行，所得 RNA 溶液用紫外分光光度计定量，保存于 -80 ℃ 冰箱用于后续实验。利用北京全式金生物技术有限公司的 TransScript First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒进行三叶青 cDNA 的合成。参照 Clontech 公司 SMART RACE cDNA Synthesis Kit 的操作步骤合成 RACE 扩增所用的 cDNA。

### 1.3 引物的设计和合成

利用 Primer premier 5.0 软件设计相关引物 (表 1)，引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.4 扩展蛋白基因中间序列的克隆

根据 GenBank 中收录的拟南芥、烟草等模式植物中扩展蛋白家族基因序列并结合 ClustalW 比对分析，设计 1 对简并引物 exp-F 和 exp-R (表 1)。以上述逆转录产物 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增反应体系 35  $\mu$ L 中含有 cDNA (约 100 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L，10 $\times$ Buffer 3.5  $\mu$ L，Taq DNA polymerase (2.5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L，dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu$ L，正反向引物各 2  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 23.5  $\mu$ L。扩增反应程序：94 ℃ 预变性 5 min 后，按照 94 ℃ 变性 45 s、55 ℃ 退火 45 s、72 ℃ 延伸 90 s，进行 30 个循环，最后 72 ℃ 延伸 10 min，反应结束后于 4 ℃ 保存备用。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物名称	序列 (5'→3')	用途
exp-F	GG (AGCT) GG (AGCT) GC (AGT) TGTGG (AGT) TA (CT) GG	RT-PCR 扩增 Th-exp 基因中间保守序列
exp-R	TGCCA (AG) TT (CT) TG (AGCT) CCCCA (AG) (AT)T	
5'GSP-1	GGGAGTTGGGGATGTA	5'-RACE
5'GSP-2	GGCAGAAATTAGTGGCGGTT	
5'GSP-3	GAAACAGGCTCCACACGC	
3'GSP-1	CCGCAGAAGCACTTCGATCTCTCCC	3'-RACE
3'GSP-2	ACGTGAAGGTGAAGGGGTCGAACAC	
Th-exp-F1	TAAACCCAACACACCCTCCG	RT-PCR 扩增 Th-exp 基因全长 cDNA 序列
Th-exp-R1	CGTCAGATGATCTTCAAGGCA	
Th-exp-F2	CCAATTCGGCTGCATCTGAA	半定量 RT-PCR
Th-exp-R2	AGCACAGCACTATTCAACGAC	
Th-exp-F3	CCCTGGTAGATGGCGAACTT	荧光定量 qRT-PCR
Th-exp-R3	AACCGCCACTAATTTCTGCC	
actin-F1	CCTCCAATCCAGACACTGTA	半定量 RT-PCR 内参基因
actin-R1	GGAGAAGATCTGGCACA	
actin-F2	GCCCTTGACTATGAGCAGGA	荧光定量 qRT-PCR 内参基因
actin-R2	GAAAAGGACTTCAGGGCAGC	

PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳 45 min (90 V)、溴化乙锭 (EB) 染色后, 用美国 Bio/Rad 凝胶成像仪进行观察分析和拍照。利用生工生物工程(上海)股份有限公司的琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化目的 DNA 片段, 纯化后的 DNA 连接到 pMD19-T 克隆载体 (Takara 公司), 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选并酶切鉴定的阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.5 扩展蛋白基因 5' 和 3' 端序列的克隆

根据已获得的扩展蛋白基因中间片段序列设计 5' 和 3'-RACE 引物 5'GSP-1、5'GSP-2、5'GSP-3 以及 3'GSP-1 和 3'GSP-2 (表 1), 利用 Invitrogen 公司 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Version 2.0) 试剂盒和 Clontech 公司 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒分别获得该基因的 5' 和 3' 端序列。

### 1.6 扩展蛋白基因全长 cDNA 的获得

利用 ContigExpress 软件对所得的中间保守序列、5' 端序列以及 3' 端序列进行拼接, 得到三叶青扩展蛋白 cDNA 序列全长。同时, 根据拼接的序列设计 1 对引物 Th-exp-F1 和 Th-exp-R1 (表 1) 进行 RT-PCR 扩增验证全长 cDNA 序列。

### 1.7 扩展蛋白基因的生物信息学分析

利用 Blast 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 在线进行核苷酸和氨基酸序列比对和保守结构域分析, 利用 ORFinder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) 在线分析 cDNA 的开放阅读框架, 利用 Compute pI/Mw 软件 ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) 预测编码蛋白质的等电点 (pI) 和相对分子质量 ( $M_w$ ), 利用软件 NRL-3D (<http://swissmodel.expasy.org>) 进行蛋白质三维结构的预测, 利用 Mega 6.0 软件 (<http://www.megasoftware.net>) 构建系统进化树。

### 1.8 扩展蛋白基因的表达分析

分别提取三叶青的叶、茎、普通细根和块根 RNA, 根据获得的三叶青扩展蛋白基因序列, 设计 1 对引物 Th-exp-F2 和 Th-exp-R2; 同时, 以肌动蛋白 (actin) 基因为内参对照<sup>[10]</sup>, 设计 1 对引物 actin-F1 和 actin-R1, 进行 RT-PCR 反应, 用于基因表达的半定量分析。另外, 分别设计 1 对扩展蛋白基因引物 Th-exp-F3 和 Th-exp-R3 以及 1 对肌动蛋白基因引物 actin-F2 和 actin-R2, 参照曹庆丰等<sup>[11]</sup>的方法, 进行荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 扩展蛋白基因中间保守序列的获得

三叶青块根 cDNA 经引物 exp-F 和 exp-R 扩增, 在 250~500 bp 区域出现 2 个条带 (图 1), 经过克隆测序, 条带大小分别为 479 和 276 bp。经 Blast 比对, 较大的片段与 GenBank 核酸数据库中登录的葡萄 *Vitis vinifera* Linn. 和醉蝶花 *Tarenaya hassleriana* (Chodat) Iltis 等扩展蛋白基因具有相似性, 而较小的片段与扩展蛋白基因无相似性。测序结果提示获得的大片段为三叶青的扩展蛋白基因的部分序列, 将该基因命名为 Th-exp。

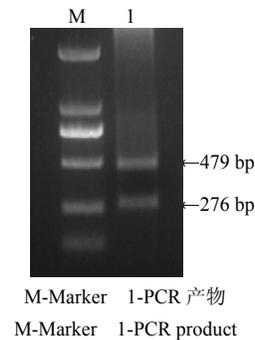


图 1 RT-PCR 扩增 Th-exp 中间片段

Fig. 1 Result of RT-PCR for amplifying intermediate sequence of Th-exp gene

### 2.2 Th-exp 基因全长 cDNA 序列的获得及生物信息学分析

5'-RACE 扩增最终产物为 1 个条带 (图 2), 经克隆测序得到 164 bp 的核苷酸序列。与 cDNA 中间保守片段序列有 82 bp 的重叠区, 且重叠区的碱基完全相同。3'-RACE 扩增最终产物出现 1 个较长的特异性条带和 1 个较短的非特异性条带 (图 3)。较长的特异性条带测序结果为 314 bp, 并带有 35 个 Poly(A), 与 cDNA 中间保守片段有 66 bp 的重叠区, 其中仅有 1 个碱基差异。通过 ContigExpress 软件拼

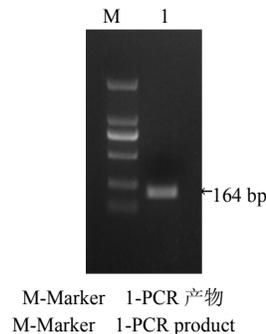


图 2 5'-RACE PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification of 5'-RACE PCR

接, 获得三叶青扩展蛋白基因 cDNA 序列为 782 bp。同时, 根据拼接的 cDNA 序列设计 1 对引物 Th-exp-F1 和 Th-exp-R1 进行 RT-PCR 扩增 (图 4), 扩增结果经过克隆测序表明拼接的 cDNA 序列正确。

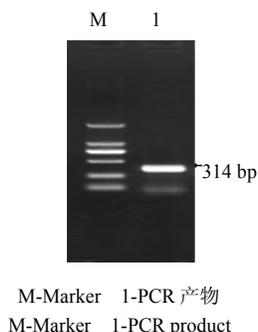


图 3 3'-RACE PCR 扩增结果  
Fig. 3 Amplification of 3'-RACE PCR

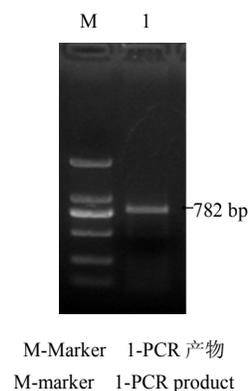


图 4 PCR 扩增全长 cDNA  
Fig. 4 Amplification of PCR for full-length cDNA

该全长 cDNA 序列中含有起始密码子 ATG, 在起始密码子 ATG 上游第 3 个核苷酸为鸟嘌呤 (G), 紧跟在 ATG 后面的核苷酸也为鸟嘌呤 (G); 而且, 第 1 个 ATG 起始密码子前方同一相位出现终止密码子 TAA。AUG 起始密码子前后符合 Kozak 规则: A/GNNAUGG。同时, 在 3' 端非编码区 (untranslated region, UTR) 有 35 个 Poly (A), 在转录终止位点附近有 1 个典型的加尾信号 G/AATAA1-3 (图 5)。表明获得了完整的 Th-exp 基因全长 cDNA 序列。Th-exp 基因含有开放阅读框 630 bp, 编码 209 个氨基酸, 具有典型的植物扩展蛋白结构特征, 即 N 端有 8 个保守的半胱氨酸结构域, C 端 4 个保守的色氨酸结构域, 且有 1 个组氨酸功能域<sup>[4]</sup> (图 5 中阴影部分)。利用 Compute pI/Mw 软件, 预测蛋白质的 pI 为 9.24 和  $M_w$  为 22 961.21。利用软件 NRL-3D 预测的蛋白质三维结构见图 6。

另外, Blast 分析显示, Th-exp 基因及其编码的蛋白质序列在进化上具有保守性 (表 2 和图 7)。

### 2.3 Th-exp 基因的表达分析

半定量 RT-PCR 分析显示, 三叶青的叶、茎、普通细根和球形块根 4 种器官中均扩增出大小约 500 bp 条带, 说明 Th-exp 基因在三叶青叶、茎、普通细根和球形块根中均有表达, 但块根中表达稍强于其他组织器官 (图 8)。进一步荧光定量 PCR 结果显示, 块根中的表达量最强, 而茎、叶和普通根中的表达未见明显差异 (图 9)。

```

1  gattfaattaaacccaacacaccctccgtgzzcgzgtatgacgagcggctgctgctgcgc
                                     M A S G A C A L
61  tcgagcagcggcgctgggggagattcgaacaaggctacggcctggagacagcggcgctaa
   E Q R A W G R F E Q G Y G L E T A A L S
121  gcacagcactattcaacgacggcgcgctgtggagcctgtttccagctcatctgcgtcc
   T A L F N D G A A C G A C F Q L I C V H
181  actccaaatggtgcagaccggccggagcaatccgaataaccgccactaattctgcc
   S K W C R P A A G A I R I T A T N F C P
241  cggcagctctacatccccaactccctgggtgcaatccggcgcagaaagcacttcgatctct
   P S S T S P T P W C N P P Q K H F D L S
301  cccaatacatgtttctgaagtcccatctaccagggcgcgctgttccggtgaagtcc
   Q Y M F L K F A I Y Q G G V V P V K F R
361  ggcgggtgctgcccacaagcagggcgatgaagtccagatgaacgaaatccgtact
   R V R C H K Q G C M K F Q M N G N P Y W
421  ggattcttgtgttggtataatgtggcgcccggggagtttcgaacgtgaaggtga
   I L V L V Y N V G G A G E V S N V K V K
481  aggggtcgaacactgggtgattcagatgcagcggaaattggggcagaattgctgacgg
   G S N T G W I Q M Q R N W G Q N W L T G
541  ggcctggattggtggacagaggtgtcgtttcaggtgacggccagtgatgtaggacgg
   P G L V G Q R L S F Q V T A S D G R T V
601  tggagtcggataatctgctccgccacttggcatttggcctaaacatttgaggccata
   E S D N I V P P T W A F G Q T F E G H N
661  attttggaaactgatgtatttgggtgcttgaagatcatctgacgaataattatga
   F *
721  atgaattttaaataattattttccactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
781  aa
    
```

起始密码子和终止密码子用方框表示, 阴影处是功能结构域  
Translation start codon and stop codon are boxed, and functional domains are shadowed

图 5 Th-exp 基因全长 cDNA 序列及其预测的氨基酸序列  
Fig. 5 Full-length cDNA sequence of Th-exp and its predicted amino acid sequence

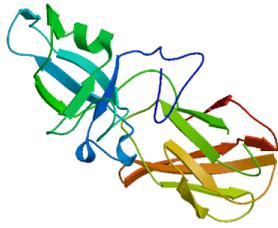


图 6 预测的 Th-exp 基因编码蛋白质三维结构图  
Fig. 6 3D Protein structure prediction of Th-exp gene

3 讨论

有研究表明, 扩展蛋白基因的表达与根的形成(包括根的形成及生长过程)紧密相关。Cho 等<sup>[12]</sup> 以拟南芥的各种突变体为材料, 分析在根毛区特异表达的扩展蛋白基因 AtEXP7 和 AtEXP18 的表达情况, 结果表明, 乙烯能显著诱导根毛区扩展蛋白基因的特异性表达, 进而促进根毛的生长。Lee 等<sup>[13]</sup> 鉴定了根特异性表达的大豆扩展蛋白基因 GmEXP1, 结果显示, 初生根和次生根的生长速度与 GmEXP1 基因的表达量呈正相关。Colmer 等<sup>[14]</sup>

表 2 Th-exp 基因及其编码蛋白的 Blast 分析结果

Table 2 Blast analysis results of Th-exp gene and its encoding protein

类型	来源	基因或蛋白质名称及 GenBank 登录号	相似性/%
基因	葡萄	expansin-A25-like 基因 (XM_002267068.2)	81
	葡萄	expansin-A23-like 基因 (XM_002276604.2)	69
	醉蝶花	expansin-A25-like 基因 (XM_010530101.1)	71
	甜菜	expansin-A25-like 基因 (XM_010682423.1)	69
蛋白质	葡萄	expansin-A25-like 编码蛋白质 (XP_002267104.1)	84
	甜橙	expansin-A23-like 编码蛋白质 (XP_006484347.1)	68
	甜菜	expansin-A25-like 编码蛋白质 (XP_010680725.1)	67

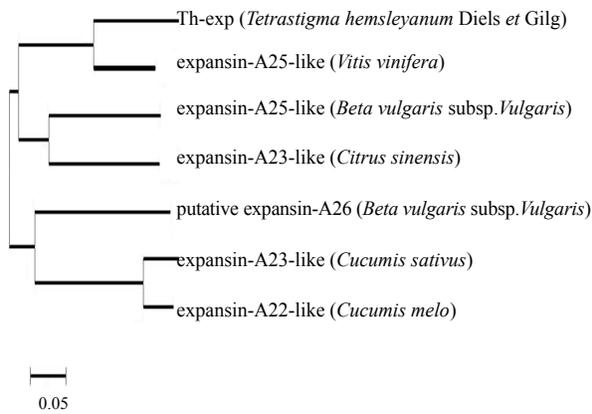
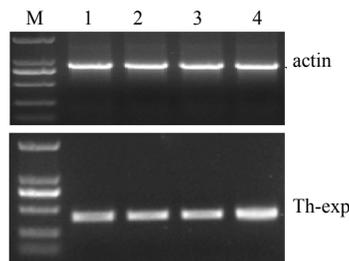


图 7 由 Th-exp 编码蛋白质构建的进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of Th-exp encoded on protein sequences



M-Marker 1-叶 2-茎 3-普通细根 4-球形块根  
M-Marker 1-leaf 2-stem 3-ordinary fine root 4-calabash-shaped root

图 8 Th-exp 基因在不同器官中半定量 RT-PCR 分析  
Fig. 8 Semi-quantitative RT-PCR analysis of Th-exp in different organs

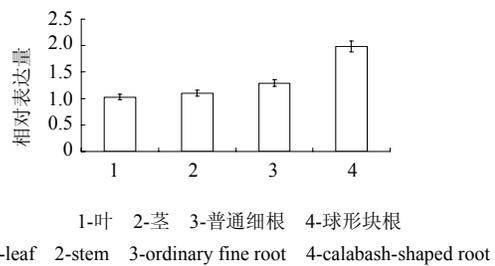


图 9 Th-exp 基因在不同器官中的 RT-PCR 分析

Fig. 9 Quantitative RT-PCR analysis in Th-exp gene in different organs

报道从蓼科的沼生酸模 *Rumex palustris* Raill. 中克隆了 13 个  $\alpha$  亚家族的扩展蛋白基因, 其中一些基因与次生根的生长有关。Kwasniewski 等<sup>[15]</sup>报道, 从大麦中克隆了  $\beta$  亚家族的扩展蛋白基因 HvEXPB1, 该基因与根毛的生长有关; 另外, Kim 等<sup>[16]</sup>研究发现不同根毛类型的被子植物(如拟南芥和水稻等), 其扩展蛋白基因对根毛形态的调节具有类似的正向调控机制。孙旭东等<sup>[17]</sup>报道从平邑甜茶中克隆了 1 个全长的扩展蛋白基因 MhEXP1, 该基因在叶片中表达量很低, 但在新形成的根中大量表达, 并参与 IBA 调节的平邑甜茶根系生长发育。Won 等<sup>[18]</sup>报道水稻和大麦中根毛特异表达的扩展蛋白基因 OsEXPB5 和 HvEXPB1 在根毛形态建成过程中调控细胞壁的生

长。2011 年, Zhi 等<sup>[19]</sup>报道水稻中的扩展蛋白基因 OsEXPA17 调节水稻根毛细胞的伸长; Guo 等<sup>[20]</sup>报道大豆中的  $\beta$  亚族的 GmEXPB 基因在非生物胁迫环境下, 与根系统的形态建成密切相关。上述诸多研究表明扩展蛋白基因参与了植物细胞生命活动的许多过程; 随着越来越多来源于不同物种的扩展蛋白基因的鉴定、克隆和功能分析, 扩展蛋白在植物生命活动过程中的重要性将得以进一步解析。本研究中, 通过设计简并引物, 利用 RT-PCR 并结合 RACE 技术, 成功克隆了 Th-exp 的 cDNA 全长序列, Th-exp 基因与葡萄、醉蝶花和甜菜等相关扩展蛋白基因具有一定的同源性, 说明扩展蛋白基因是一个相对保守的基因家族。半定量和荧光定量 PCR 表达分析显示, Th-exp 基因在块根中的表达高于其他器官, 提示 Th-exp 基因可能参与了三叶青球形块根的发育过程。三叶青作为我国特有的珍稀药用植物, 以其球形的块根作为主要的药材; 而在自然条件下三叶青形成球形的块根缓慢, 无法满足市场需求<sup>[3]</sup>, 因此, 研究其块根发育的机制在生产实践中具有应用价值。本研究克隆获得三叶青扩展蛋白基因全长 cDNA, 为进一步探讨扩展蛋白在三叶青球形块根发育中的功能奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 李瑛琦, 陆文超, 于治国. 三叶青的化学成分研究 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 982-983.
- [2] 陈丽芸, 郭素华. 三叶青的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(12): 1368-1370.
- [3] 刘崑艳, 周以飞, 李 清, 等. 三叶青的蒸腾作用与气孔结构研究 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2610-2617.
- [4] 徐 筱, 徐 倩, 张 磬, 等. 植物扩展蛋白基因的研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(5): 154-162.
- [5] McQueen-Mason S, Durachko D M, Cosgrove D J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(11): 1425-1433.
- [6] Li Z C, Durachko D M, Cosgrove D J. An oat coleoptile wall protein that induces wall extension *in vitro* and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls [J]. *Planta*, 1993, 191(3): 349-356.
- [7] Cho H T, Kende H. Expansins in deepwater rice internodes [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113(4): 1137-1143.
- [8] Link B M, Cosgrove D J. Acid-growth response and  $\alpha$ -expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118(3): 907-916.
- [9] Wu Y, Thome E T, Sharp R E, *et al.* Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 1471-1479.
- [10] 黄连香, 宋亚玲, 向太和, 等. 三叶青两个肌动蛋白基因片段的克隆及其分析 [J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版, 2015, 14(2): 16-19.
- [11] 曹庆丰, 向太和, 孟莎莎, 等. 长期培养的黄瓜毛状根中外源基因遗传稳定性分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1583-1588.
- [12] Cho H T, Cosgrove D J. Regulation of root hair initiation and expansin gene [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(12): 3237-3253.
- [13] Lee D K, Ahn J H, Song S K, *et al.* Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 985-997.
- [14] Colmer T D, Peeters A J, Wagemaker C A, *et al.* Expression of alpha-expansin genes during root acclimations to O<sub>2</sub> deficiency in *Rumex palustris* [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(3): 423-437.
- [15] Kwasniewski M, Szarejko I. Molecular cloning and characterization of beta-expansin gene related to root hair formation in barley [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(3): 1149-1158.
- [16] Kim D W, Lee S H, Choi S B, *et al.* Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 2958-2970.
- [17] 孙旭东, 杨洪强, 魏绍冲, 等. 平邑甜茶新根扩展蛋白基因 *MhEXPI* 的 cDNA 全序列克隆及表达 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(5): 1548-1553.
- [18] Won S K, Choi S B, Kumari S, *et al.* Root hair-specific EXPANSIN B genes have been selected for Gramineae root hairs [J]. *Mol Cells*, 2010, 30(4): 369-376.
- [19] Zhi M Y, Bo K, Xiao W H, *et al.* Root hair-specific expansins modulate root hair elongation in rice [J]. *Plant J*, 2011, 66(5): 725-734.
- [20] Guo W, Zhao J, Li X, *et al.* A soybean  $\beta$ -expansin gene *GmEXPB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses [J]. *Plant J*, 2011, 66(3): 541-552.