

• 药材与资源 •

黄花蒿 HMGR 启动子活性表达及核心序列分析

龙金花^{1,2}, 向奕^{1,2}, 肖文军^{1,2*}, 刘硕谦^{1,2*}

1. 湖南农业大学 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128

2. 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410128

摘要: **目的** 分析研究黄花蒿 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 启动子的活性表达及其核心序列。**方法** 以 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因作为报告基因, 通过构建包括 HMGR 启动子全长序列在内的 5 个不同长度表达载体, 并采用农杆菌介导法转化烟草以及对转化烟草进行 GUS 染色。**结果** 转 HMGR 启动子烟草的根、茎、叶、花、果荚均发现蓝色; 脱水和高温胁迫会降低该启动子的表达, 低温胁迫对其影响不明显; 启动子片段 AaGPX1、AaGPX2 和 AaGPX3 具有驱动 GUS 报告基因表达的功能, 而 AaGPX4 和 AaGPX5 则未有此功能。**结论** HMGR 启动子在烟草整个生长期均能够稳定表达; 该启动子对低温不敏感, 而对高温和脱水条件敏感; 该启动子的核心序列在 P-HMGR-3 区域, 而 AaGPX2 与 AaGPX3 片段的非重叠区则存在与 HMGR 启动子活性强弱相关的调控元件。

关键词: 黄花蒿; 青蒿素; HMGR 启动子; 活性表达; 核心序列

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)19-3475-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.19.020

Active expression and core sequence analysis of HMGR gene promoter from *Artemisia annua*LONG Jin-hua^{1,2}, XIANG Yi^{1,2}, XIAO Wen-jun^{1,2}, LIU Shuo-qian^{1,2}

1. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

2. Hunan Co-Innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China

Abstract: **Objective** To analyze the expression character, screen the core sequence of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A (HMGR) promoter from *Artemisia annua*, and provide a theoretical basis for the efficient biosynthesis of artemisinin. **Methods** In this study, β -glucoside acid enzyme (GUS) gene was used as the report gene and constructed five different length expression vectors, including the whole length of HMGR promoter, based on the cloned HMGR promoter sequences, and successfully obtained transgenic plants by the method of agrobacterium mediation transform tobacco, then the tobacco was stained by GUS. **Results** The GUS staining showed that the blue color could detect in the roots, stems, leaves, flowers, and fruit pods. And the leaves in the lower part could easily get the blue color than the leaves in the top part, this may due to that the accumulation of HMGR metabolite product is more and the permeability in leaves is better in the mature leaves. The results also showed that the color showed shallow in heat and drought stresses, and with no significant difference in cold stress, the tobacco leaves with paragraph of P-HMGR-1, P-HMGR-2, and P-HMGR-3 showed blue color but did not find blue in leaves with paragraph of P-HMGR-4, P-HMGR-5. **Conclusion** HMGR promoter has a stable expression during the whole growth period of tobacco. HMGR promoter was not sensitive with cold environment, but sensitive with heat and draught resistance. The key area of HMGR promoter was in P-HMGR-3. And there are some regulatory elements but no necessary part of HMGR promoter between the non overlap area of P-HMGR-3 and P-HMGR-2.

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; HMGR promoter; active expression character; core sequence

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 国际科技合作与交流专项“青蒿素低成本生产关键技术合作创新与转化”(2014DFA32160)

作者简介: 龙金花 (1990—), 硕士研究生, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: hnlongjinhua@163.com

*通信作者 肖文军 (1969—), 教授, 博士生导师, 主要从事植物功能成分利用研究。E-mail: xiaowenjun88@sina.com

刘硕谦 (1977—), 副教授, 主要从事植物功能成分分子调控研究。E-mail: shqianliu@sina.com

青蒿素 (artemisinin) 是一种含有过氧基团的倍半萜内酯抗疟药物, 主要由我国菊科艾属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中提制而来^[1-4]。青蒿素在黄花蒿中的生物合成可分为 3 个阶段: 首先是从乙酰 CoA 经异戊烯基焦磷酸 (IPP)、二甲烯丙基焦磷酸 (DMAPP)、法呢基焦磷酸到合成紫穗槐-4,11-二烯, 然后是从紫穗槐-4,11-二烯到合成双氢青蒿酸, 最后是从双氢青蒿酸到合成青蒿素^[5-6]。第一阶段 IPP 的形成是萜类化合物生物合成的共有途径, 青蒿素生物合成前体 IPP 的形成主要通过甲羟戊酸 (MVA) 途径^[7], 其过程为: 2 个乙酰 CoA 硫解后再与 1 个乙酰 CoA 在 HMG-CoA 合酶的作用下生成 3-羟基-3-甲基戊二单酰 CoA (HMG CoA), 再经 HMG CoA 还原酶 (HMGR) 催化 HMG-CoA 形成甲羟戊酸, 甲羟戊酸经焦磷酸化及脱羧脱水作用形成 IPP^[8]。由于 MVA 的形成是一个不可逆过程, 因而 HMGR 被认为是青蒿素生物合成中最先起作用的关键酶^[9]。研究证实, HMGR 的活性与青蒿素的生物合成量密切相关^[10], 如 Aaquil 等^[11]过表达 HMGR 基因获得了青蒿素量比野生型高 22.5% 的黄花蒿植株, Nafis 等^[12]通过组成型表达 HMGR 基因获得了青蒿素量高于野生型 38.9% 的植株等, 但目前尚未见有关 HMGR 启动子活性及其核心序列的研究报道。本研究以 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因为报告基因, 通过构建 HMGR 启动子不同长度表达载体, 以及农杆菌介导法转化烟草 GUS 染色等方法, 分析了黄花蒿 HMGR 启动子的活性表达及核心序列, 以期为黄花蒿青蒿素的高效生物合成提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 和野生型烟草 *Nicotiana tabacum* L. 由湖南农业大学朱卫平副教授惠赠并鉴定, 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、根瘤农杆菌 GV3101、不含 35 S 启动子且含 GUS 报告基因的质粒 PCX-GUS-P 由湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心实验室提供; 限制性内切酶、连接酶试剂盒均购自 Thermo Scientific 公司; 培养基购自 Duchefa 公司; 各种抗生素和激素购自上海生工生物工程有限公司; 质粒提取试剂盒、琼脂凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 引物合成与

DNA 测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷酸 (X-gluc) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 其他化学药品均为国产分析纯。

1.2 HMGR 启动子系列缺失片段的获得及重组质粒的构建

根据 HMGR 启动子序列, 采用 5'端系列缺失方法^[13], 设计 5 对特异引物 (引物序列见表 1), 以黄花蒿 DNA 为模版分别进行 PCR, 反应扩增序列, 反应条件如下: 94 °C、5 min, 94 °C、40 s, 55 °C、1 min, 72 °C、1 min, 共 30 个循环; 72 °C、10 min。0.75%琼脂糖凝胶电泳回收纯化目标片段。再根据试剂盒方法将目标片段与经过 Xcm I 酶切的 PCX-GUS-P 质粒在 16 °C 下用 T4 连接酶连接过夜, 构建重组质粒。采用热激法^[14]将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 。固体 LB [100 mg/L 卡那霉素] 37 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落进行 PCR 验证, 扩增引物为 HybF (5'-TGTCCTGCGGGTAAATAGC-3'), HybR (5'-GTCCATCACAGTTTGCCA GT-3')。挑取 PCR 验证的阳性克隆进行测序分析, 测序所用引物为 GUSP-seqF (5'-ACCAGACGTTGCCCGCATAA-3'), GUSP-seqR (5'-GCAAGGCGATTAAGTTGGGT-3')。

表 1 HMGR 启动子不同长度片段引物序列及大小
Table 1 Primer sequence and size of different length fragment of HMGR promoter

引物	序列(5'→3')	启动子片段 长度/bp
P-HMGR-1	AATGCATTGTTTGCCTTGATG	1 357
P-HMGR-2	ACAGGAAAACCTTATTCACGGTGT	922
P-HMGR-3	GTTTTACACATATCTTCTTCGGGA	413
P-HMGR-4	TCAAACACCGTCTCAACCGT	249
P-HMGR-5	ACAAACATAAACAAACACACG	174
P-HMGR-R	CTTATGATATGATATGTTTATAAAA- CTTTTG	

1.3 表达载体的构建

根据质粒提取试剂盒提供的方法将测序正确的重组质粒从大肠杆菌 DH5 α 中提取出来, 分别转入农杆菌 GV3101^[15]。于固体 LB 培养基 (50 mg/L 利福平、25 mg/L 庆大霉素、100 mg/L 卡那霉素) 上, 28 °C 黑暗培养 2 d, 直至长出清晰可见的单菌落。挑取单菌落进行 PCR 扩增验证, 扩增引物为 P-HMGR-1~5 与 GUSP-seqF。

1.4 表达载体转化烟草

将 PCR 扩增验证正确的农杆菌采用农杆菌介导法^[16]转化烟草, 转化烟草置于固体 MS 培养基中 25 °C 暗培养 2 d, 转入再生培养基 [1 mg/L 6-BA、0.15 mg/L 吲哚乙酸(NAA)、30 mg/L 潮霉素(Hyg)、400 mg/L 头孢霉素]、25 °C, 16 h 光/8 h 暗进行筛选, 经 4 周左右再生出烟草幼苗, 将幼苗转入生根培养基 (0.15 mg/L NAA、15 mg/L Hyg、200 mg/L Cef) 待其生根后移入土壤中。经 2~3 周去除农杆菌影响后采用 CTAB 法^[15]提取抗性株叶片 DNA, 进行 PCR 扩增, 扩增引物为 HybF (R)。鉴定转化烟草。

1.5 HMGR 启动子在转化烟草中不同部位的活性表达

分别对 PCR 鉴定阳性的 P-HMGR-1-PCX 转化烟草上部叶片、下部叶片、根、茎、花、果荚等不同部位进行 GUS 染色, 考察 HMGR 启动子在烟草中的表达情况。GUS 染色液配方: 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7), 15 mL; 0.5 mol/L EDTA (pH 8), 600 μ L; 20 mmol/L 铁氰化钾, 750 μ L; 20 mmol/L 亚铁氰化钾 750 μ L; 20 mmol/L X-gluc 1.5 mL; Triton X-100 30 μ L; 补充蒸馏水至 30 mL。将烟草浸泡于染色液中 37 °C 水浴过夜, 再经酒精脱色^[17]。

1.6 胁迫条件对 HMGR 启动子的影响

挑选经过 GUS 组化染色鉴定且表达稳定的 P-HMGR-1-PCX 烟草转化苗, 进行继代培养, 待其生根后 (25 °C, 16 h 光/8 h 暗), 取生长状况和大小相近的植株按以下条件进行处理。(1) 脱水处理: 将烟草从培养基中取出, 置于干净滤纸上, 25 °C, 分别光培养 6 h、16 h 光/8 h 暗中培养, 脱水处理后进行 GUS 染色。(2) 热处理: 将烟草置于 35 °C, 16 h 光/8 h 暗中培养, 热处理后进行 GUS 染色。(3) 冷处理: 将烟草置于 4 °C, 16 h 光/8 h 暗中培养, 冷处理后进行 GUS 染色^[18-20]。

1.7 HMGR 启动子核心序列的筛选

分别选取含有 5 个 HMGR 启动子片段的转化烟草的相同部位叶片同时进行 GUS 染色^[21]。观察染色情况, 分析 HMGR 启动子核心序列所在区域。

2 结果与分析

2.1 HMGR 启动子系列缺失片段的获得及重组质粒的构建

图 1 显示, 经 PCR 扩增后, 得到了 5 个大小不同的 HMGR 启动子系列缺失片段, 分别命名为

P-HMGR-1、P-HMGR-2、P-HMGR-3、P-HMGR-4 和 P-HMGR-5, 图中 1 号引物 PCR 得出两条亮带, 根据 HMGR 启动子序列小于 1 500 bp, 切取较小片段与质粒酶切片段 PCX-GUS-P 连接。各片段连接产物转化大肠杆菌后, 菌落 PCR 结果见图 2。挑取阳性单菌落进行测序验证, 测序得到 5 个片段长度分别为 1 357、922、413、249、174 bp, 与 PCR 扩增电泳结果一致, 说明重组质粒已成功构建。

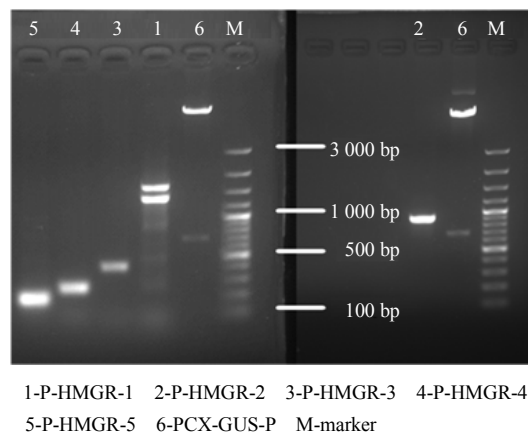


图 1 HMGR 启动子系列缺失片段的 PCR 扩增结果及 PCX-GUS-P 的 XcmI 酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification of different HMGR promoter deletion fragments and verification of PCX-GUS-P by XcmI enzyme digestion

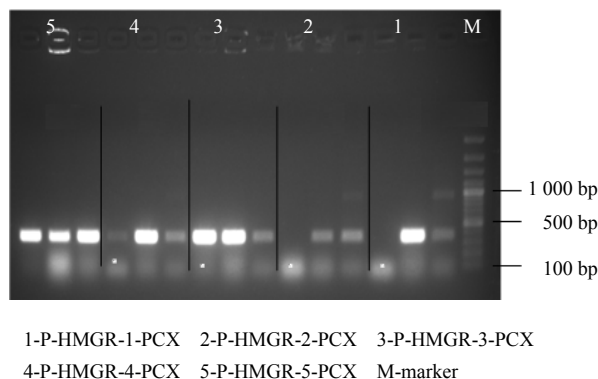
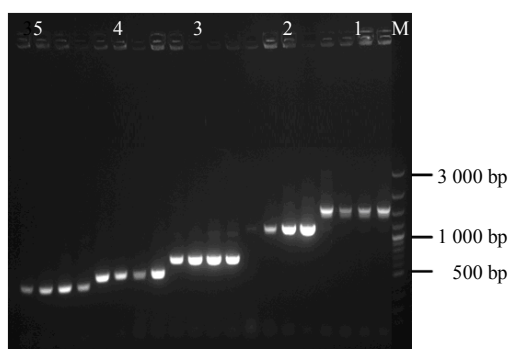


图 2 携带 HMGR 启动子系列重组质粒的大肠杆菌克隆子 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of *E. coli* with recombinant coli carrying HMGR promoter deletion fragments

2.2 重组质粒转化农杆菌 GV3101 的菌落 PCR 检测

将测序正确的克隆子提取质粒, 转化农杆菌 GV3101 感受态, 分别命名为 P-HMGR-1-PCXG、P-HMGR-2-PCXG、P-HMGR-3-PCXG、P-HMGR-4-PCXG 和 P-HMGR-5-PCXG, 挑取单菌落进行菌落 PCR 检测, 电泳结果如图 3 所示, 因 PCR 所用引



1-P-HMGR-1-PCXG 2-P-HMGR-2-PCXG 3-P-HMGR-3-PCXG
4-P-HMGR-4-PCXG 5-P-HMGR-5-PCXG M-marker

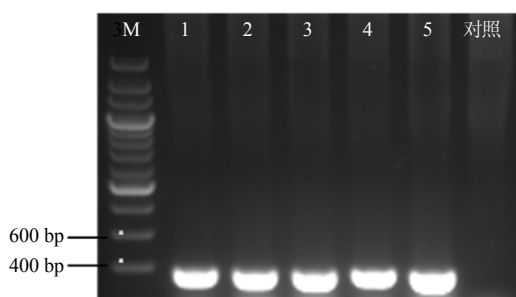
图 3 携带 HMGR 启动子系列片段表达载体的农杆菌克隆子 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of *A. tumefaciens* transformants with expression vectors carrying HMGR promoter deletion fragments

物为 P-HMGR-1~5 与 GUSP-seqF, 所得电泳结果比各片段原本长度大 200 bp 左右, 与各片段 PCR 电泳结果一致, 表明携带 5 个片段的重组质粒已分别成功转化到农杆菌 GV3101 中。

2.3 转基因烟草 PCR 检测

经生根培养, 每个启动子片段分别得到 4~6 株转基因烟草, 各片段烟草分别命名为 P-HMGR-1-PCXDG、P-HMGR-2-PCXDG、P-HMGR-3-PCXDG、P-HMGR-4-PCXDG、P-HMGR-5-PCXDG 将从抗性株叶片中提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 从图 4 可以看出, 各片段株系均有一条特异扩增条带而野生型烟草作为对照的泳道没有扩增条带, 表明从筛选培养基上筛选出的阳性株系的确为转基因株系。5 个启动子



1-P-HMGR-1-PCXDG 2-P-HMGR-2-PCXDG 3-P-HMGR-3-PCXDG
4-P-HMGR-4-PCXDG 5-P-HMGR-5-PCXDG M-marker

图 4 转基因烟草 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of transgenic tobacco

片段各获得 3~5 个阳性株系。

2.4 HMGR 启动子在转化烟草中不同部位的活性表达

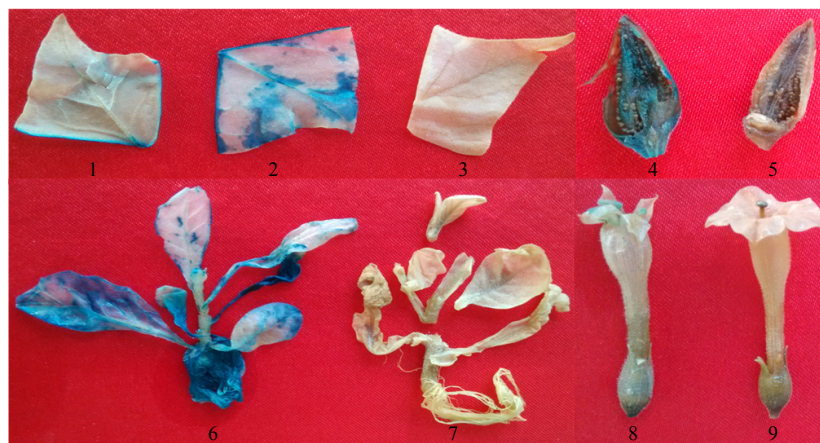
选取 P-HMGR-1-PCXDG 片段转烟草稳定表达阳性株 3 号进行继代培养, 图 5 显示, P-HMGR-1-PCXDG 在转化烟草的根、茎、花、果荚中都观察到蓝色, 说明 HMGR 启动子序列基因已通过农杆菌整合至烟草 DNA 中, 且能在根、茎、叶、花、果荚中稳定表达, 并参与烟草整个生长周期的代谢活动。同时, 下部叶片比上部叶片更容易染色, 这可能与成熟叶片的代谢积累较多及通透性较好有关。此外, 在花中的染色主要表现在花药和柱头上。

2.5 胁迫条件对 HMGR 启动子活性的影响

图 6 显示, P-HMGR-1-PCXDG 在 6 h 和 24 h 脱水条件的染色均明显变浅, 且经 24 h 脱水处理的颜色变浅程度大于经 6 h 脱水处理的颜色; 在高温处理中, 染色也变浅, 而在低温处理中染色未见明显变化。由此可见, 脱水能降低 HMGR 启动子活性且脱水时间越长对启动子活性影响越大; 高温也能使启动子活性降低, 但低温处理对启动子活性的影响不明显, 说明该启动子对低温处理不敏感, 对高温和脱水条件的影响较敏感。

2.6 HMGR 启动子核心序列分析

对含有 HMGR 不同启动子片段的烟草叶片染色结果 (图 7) 可以看出, P-HMGR-1-PCXDG、P-HMGR-2-PCXDG 和 P-HMGR-3-PCXDG 的烟草叶片呈现蓝色, 而 P-HMGR-4-PCXDG、P-HMGR-5-PCXDG 和对照的烟草叶片中没有观察到蓝色, 说明启动子片段 AaGPX1、AaGPX2 和 AaGPX3 具有驱动 GUS 报告基因表达的功能, 而 AaGPX4 和 AaGPX5 不能驱动 GUS 报告基因表达。由此推断 HMGR 启动子的核心序列在 P-HMGR-3 区域。根据叶片切口的颜色还可以看出, P-HMGR-2-PCXDG 与 P-HMGR-1-PCXDG 颜色深浅相近, P-HMGR-3-PCXDG 颜色较 P-HMGR-1-PCXDG 浅, 说明 AaGPX2 片段的启动子活性与 AaGPX1 启动子活性相当, 而 AaGPX3 片段具有部分启动子活性, 推测 AaGPX2 片段与 AaGPX3 片段的非重叠区存在与 HMGR 启动子活性强弱相关的调控元件, 但不是该启动子表达的必需元件。



1-上部叶片 2-下部叶片 4-果荚 6-根、茎、叶 8-花 3、5、7、9-对照
1-leaves near top 2-leaves near root 4-friut pods 6-roots, stems, and leaves 8-flowers 3, 5, 7, 9-controls

图5 GUS在转基因烟草中不同部位的表达

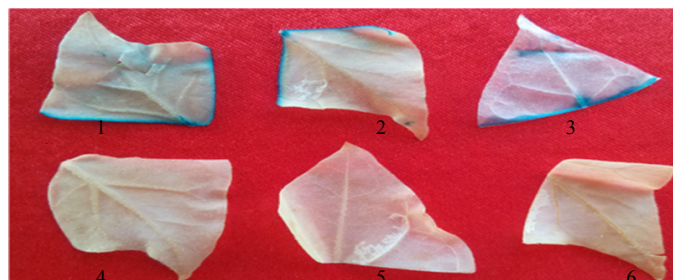
Fig. 5 Expression of GUS in different parts of transgenic tobacco leaves



1、4、7、10-P-HMGR-1-PCXDG 正常组 2-P-HMGR-1-PCXDG 脱水处理 6 h 5-P-HMGR-1-PCXDG 脱水处理 24 h 8-P-HMGR-1-PCXDG 高温处理 24 h 11-P-HMGR-1-PCXDG 低温处理 24 h 3、6、9、12-对照
1,4,7,10-normal group of P-HMGR-1-PCXDG 2-P-HMGR-1-PCXDG dewater treatment for 6 h 5-P-HMGR-1-PCXDG dewater treatment for 24 h 8-P-HMGR-1-PCXDG high temperature treatment for 24 h 11-P-HMGR-1-PCXDG low temperature treatment for 24 h 3, 6, 9, 12-controls

图6 胁迫条件对 HMGR 启动子活性的影响

Fig. 6 Effect of stress on activity of HMGR promoter



1-P-HMGR-1-PCXDG 2-P-HMGR-2-PCXDG 3-P-HMGR-3-PCXDG 4-P-HMGR-4-PCXDG 5-P-HMGR-5-PCXDG 6-对照
1-P-HMGR-1-PCXDG 2-P-HMGR-2-PCXDG 3-P-HMGR-3-PCXDG 4-P-HMGR-4-PCXDG 5-P-HMGR-5-PCXDG 6-control

图7 GUS在转基因烟草中的表达

Fig. 7 Expression of GUS in transgenic tobacco leaves

3 讨论

世界上大部分具有提取价值的野生黄花蒿来自我国南方地区,因此,我国青蒿素产业有着重要的国际影响力。除品种差异外,外界环境对青蒿素生物合成的影响也极其显著^[22],相关探索也有很多,在花蕾期采收^[23]、种植期间喷施水杨酸和脱落酸^[24]、控制光照时间^[23]等栽培措施都有利于促进青蒿素的生物积累,但其在黄花蒿中的水平仍然较低的事实严重影响了青蒿素的低成本生产。本研究在对 HMGR 启动子的活性分析中发现该启动子对低温不敏感,可能有较好的抗寒性,这与低温能诱导青蒿素生物合成的研究结果相符^[25],还发现该启动子在脱水条件下活性明显降低的现象也与黄花蒿喜潮湿环境的研究结果相近^[22],这些活性与有利于青蒿素生物产量积累的外界条件相似。该启动子在光照等更多条件下的表达特性和具体的变化水平及其与青蒿素生物合成的相关性还有待于进一步的探索。

同时,经 GUS 染色分析,推断 HMGR 启动子的核心序列在 P-HMGR-3 区域内,而该启动子还有相关调控元件在 P-HMGR-2 与 AaGPX3 片段的非重叠区内,该部分相关调控元件的具体作用还需要进一步的研究证明。HMGR 启动子核心序列的分析也有助于后续对该启动子相关调控元件的进一步研究。

青蒿素的生物合成是黄花蒿体内众多代谢活动中的一条分支,在相同条件下,充足的 IPP 底物将有利于青蒿素的生物合成。因此 HMGR 启动子的研究可对 IPP 的生物合成提供合适的外界条件,通过调节关键酶的活性来增加 IPP 的供给量,有助于促进青蒿素的积累,进而显著提高黄花蒿中青蒿素的量,为青蒿素的工业化生产提供优异原料。

参考文献

- [1] 吴毓林. 青蒿素——中药奇葩疟疾克星 [J]. 大学化学报, 2010, 25(4): 12-15.
- [2] 杨桂霞, 郑欣, 孙桂霞, 等. 青蒿素及其衍生物研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2013, 13(10): 26-28.
- [3] 尹纪业, 王和枚, 丁日高. 青蒿素及其衍生物毒理学研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014(2): 309-314.
- [4] 谭涛, 秦宗会, 谭蓉. 青蒿素类药物的药理作用研究进展 [J]. 中国药业, 2009, 18(3): 63-64.
- [5] 曾庆平, 鲍飞. 青蒿素合成生物学及代谢工程研究进展 [J]. 科学通报, 2011, 56(27): 2289-2297.
- [6] 孔建强, 王伟, 程克棣, 等. 青蒿素的合成生物学研究进展 [J]. 药学报, 2013, 48(2): 193-205.
- [7] Ram M, Khan M A, Jha P, et al. HMG-CoA reductase limits artemisinin biosynthesis and accumulation in

- Artemisia annua* L. plants [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(5): 859-866.
- [8] 刘硕谦, 田娜, 李娟, 等. 青蒿素组合生物合成的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1425-1431.
- [9] 刘涤, 胡之壁. 植物类异戊二烯生物合成途径的调节 [J]. 植物生理学通讯, 1998(1): 1-9.
- [10] 刘万宏, 黄玺, 张巧卓. 青蒿素生物合成与基因工程研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 101-107.
- [11] Aquil S, Husaini A M, Abidin M Z, et al. Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Planta Med*, 2009, 75(13): 1453-1458.
- [12] Nafis T, Akmal M, Ram M, et al. Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of the HMG-CoA reductase gene in high-yielding strain of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2011, 5(1): 53-60.
- [13] 赵金凤, 李杰, 张爽, 等. 杨树木质部特异启动子 5'端侧翼序列缺失表达载体构建及转化烟草的研究 [J]. 蚕业科学, 2013(5): 858-861.
- [14] 邓婷婷. 不同温度下安吉白茶差异表达基因的分离、鉴定及 CsPDS3 基因的功能研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [15] Wang Y Y, Yang K, Jing F Y, et al. Cloning and characterization of trichome-specific promoter of cpr71av1 gene involved in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Mol Biol*, 2011, 45(5): 751-758.
- [16] 吴扬. 保靖黄金茶资源多样性分析及 CsICE1 基因转化烟草研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [17] 周小琼, 丁一琼, 左丽, 等. 大豆硫转运蛋白基因 GmSULTR1;2b 启动子的克隆及活性分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(8): 1650-1659.
- [18] 杨瑞仪, 杨雪芹, 冯丽玲, 等. 黄花蒿 cyp71av1 启动子的分离及表达特性分析 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 765-769.
- [19] 杨瑞仪, 杨雪芹, 冯丽玲, 等. 黄花蒿 ADS 启动子的分离及表达特性分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2052-2055.
- [20] 刘晓敏. 玉米低温和干旱诱导型启动子的克隆及功能分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [21] 孙清华. 盐芥 TsVP 启动子核心区域的鉴定及其上游调控蛋白的功能分析 [D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [22] 范正涛, 马小军, 张明庆. 青蒿素产量影响因素的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 313-316.
- [23] 钟凤林, 陈和荣, 陈敏. 青蒿最佳采收时期、采收部位和干燥方式的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(7): 21-22.
- [24] 何军. SA 与 ABA 调节青蒿素的生物合成及青蒿副产物的综合利用 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2004.
- [25] 杨瑞仪, 卢元媛, 杨雪芹, 等. 低温诱导黄花蒿中青蒿素的生物合成及其机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 350-354.