

# 水稻*OsTLP12*基因启动子GUS表达载体的构建与转化

杜文\*, 陈秋红#, 雷东阳#

湖南农业大学农学院, 湖南 长沙

收稿日期: 2024年5月20日; 录用日期: 2024年6月19日; 发布日期: 2024年6月27日

## 摘要

植物中类甜蛋白TLPs不仅参与宿主抵御真菌入侵的过程, 还参与植物对非生物胁迫的防御。本试验采用PCR技术从籼稻特青中克隆了*OsTLP12*基因上游2000 bp的启动子片段, 并分析了其中所含的顺式作用元件。随后, 构建了与GUS报告基因融合的表达载体, 并通过农杆菌介导的转化方法将融合表达载体导入水稻中, 随后进行了转化植株的筛选, 并对转基因植株进行了GUS染色分析。本研究得到以下结果: 1) 成功克隆了水稻中*OsTLP12*基因的启动子片段, 并将其与含有GUS报告基因的表达载体融合, 获得了融合表达载体; 2) *OsTLP12*基因启动子区域含有多个生物和非生物逆境反应相关的顺式元件; 3) 成功将融合表达载体转化进入水稻中, 并筛选出阳性转基因幼苗; 4) 对转基因幼苗进行了GUS染色, 以检测*OsTLP12*基因启动子驱动的GUS表达情况。

## 关键词

水稻, *OsTLP12*基因, 启动子, 顺式作用元件分析, 遗传转化, GUS染色

# Construction and Transformation of the GUS Expression Vector Driven by the Rice *OsTLP12* Gene Promoter

Wen Du\*, Qiuhong Cheng#, Dongyang Lei#

College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

Received: May 20<sup>th</sup>, 2024; accepted: Jun. 19<sup>th</sup>, 2024; published: Jun. 27<sup>th</sup>, 2024

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 杜文, 陈秋红, 雷东阳. 水稻 *OsTLP12* 基因启动子 GUS 表达载体的构建与转化[J]. 农业科学, 2024, 14(6): 692-701. DOI: 10.12677/hjas.2024.146086

## Abstract

Plant thaumatin-like proteins (TLPs) are involved not only in host defense against fungal invasion but also in defense against abiotic stresses. In this experiment, the upstream 2000 bp promoter fragment of the *OsTLP12* gene was cloned from *Oryza sativa* 'Nipponbare' using PCR technology, and the cis-acting elements contained therein were analyzed. Subsequently, a fusion expression vector containing the GUS reporter gene was constructed, and the fusion expression vector was introduced into rice via *Agrobacterium*-mediated transformation. The transformed plants were then screened, and GUS staining analysis was performed on the transgenic plants. The following results were obtained: 1) The promoter fragment of the *OsTLP12* gene in rice was successfully cloned, and it was fused with the expression vector containing the GUS reporter gene to obtain the fusion expression vector; 2) The promoter region of the *OsTLP12* gene contains multiple cis-acting elements related to biotic and abiotic stress responses; 3) The fusion expression vector was successfully transformed into rice, and positive transgenic seedlings were screened out; 4) GUS staining was performed on transgenic seedlings to detect the expression driven by the *OsTLP12* gene promoter.

## Keywords

Rice, *OsTLP12*, Promoter, Cis-Acting Element Analysis, Genetic Transformation, GUS Staining

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

Thaumatococcus daniellii 蛋白源自西非植物 *Thaumatococcus daniellii*, 具有甜味, 因此也称为甜蛋白[1]。与 Thaumatococcus daniellii 蛋白同源的 TLPs 因此被命名为 thaumatin-like proteins (TLPs), 即类甜蛋白, 但与 Thaumatococcus daniellii 不同, TLPs 本身不具甜味。这些蛋白通常分子量在 20 至 26 kDa 之间, 并且被广泛描述为致病相关蛋白 (PRs)。植物中的 TLPs 不仅调节植物对疾病的防御反应, 还在应对非生物胁迫和发育过程中发挥重要作用[2] [3]。TLPs 是一个庞大且高度复杂的基因家族, 在真菌、植物和动物中参与宿主防御和多样的发育过程。

大量的转基因过表达、体外抗真菌活性测试以及相关蛋白活性分析提供了越来越多的证据, 支持 TLPs 在宿主防御和其他生理过程中的作用。例如, 一种名为 PR-NP24 的 TLP 在番茄外果皮中表达具有特异性, 在受 NaCl 处理诱导时其积累增加, 从而增强植物对入侵真菌病原体的抗性[4]。真菌来源的效应蛋白 Pt\_21 通过直接靶向小麦 *TaTLP1* 蛋白并抑制其抗真菌活性, 从而对宿主防御系统产生了抑制作用[5]。早期的研究主要阐明了 TLPs 在植物抗病中的作用, 但近年来的研究越来越多地发现, TLPs 在植物抗非生物胁迫和发育过程中也具有功能性作用。举例来说, *CsTLP* 是一种源自茶叶的膜定位 thaumatin 样蛋白。在拟南芥中, *CsTLP* 的过表达已被证明能够提高植物在干旱胁迫条件下的存活率和产量[6]。在一项针对水稻中 TLP (*RTLPI*) 的研究中发现, *RTLPI* 的启动子区域包含(转录因子 WRKY 蛋白结合位点)中的 W-box 元件, 这些元件是 *RTLPI* 对非生物胁迫做出反应所必需的。此外, *RTLPI* 还可被水杨酸(SA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、机械伤害或稻瘟病真菌的诱导子所诱导[7]。在拟南芥中过度表达西兰花(*Brassica oleracea* L. var. *Italica*)中的 *bolTLP1*, 可以增强拟南芥对高盐和干旱条件的耐受性。转录组数据分析显示,

*bolTLP1* 可能通过调节植物激素(ABA、乙烯和生长素)介导的信号通路、水解酶和氧化还原酶活性、硫化物合成以及组蛋白变体的差异表达来发挥作用[8]。

尽管对 TLP 蛋白功能的研究日益增多,但其作用机制仍知之甚少。为了进一步探究和解析特青籼稻中 *OsTLP12* 的功能和作用机制,本研究成功克隆了 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 的起始密码子上游 1985 bp 的启动子区域,并对其顺式作用元件进行了分析。同时,构建了启动子与 GUS 标记基因的融合表达载体,将融合载体转化进入水稻中,为研究 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 的表达模式奠定了基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

#### 2.1.1. 试验材料

籼稻品种特青(*Oryza sativa subsp. Indica* cv. TQ), 含有 GUS 标记基因的表达载体 DX2181-eGFP (由湖南农业大学作物基因工程湖南省重点实验室提供), 大肠杆菌菌株: DH5 $\alpha$  (购自北京擎科生物科技有限公司)。EHA105 农杆菌感受态细胞(武汉伯远生物科技有限公司)。

#### 2.1.2. 试剂与药品

高保真酶 TransStartFastPfu DNA Polymerase、质粒提取试剂盒 Plasmid MiniPrep Kit 购自北京全式金生物技术股份有限公司。限制性内切酶 FastDigest 购自赛默飞世尔科技(中国)公司。同源重组酶(SoSoo Cloning Kit)、DNA 凝胶回收试剂盒购自北京擎科生物科技有限公司。引物合成由北京擎科生物科技有限公司完成,测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

### 2.2. 试验方法

#### 2.2.1. *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子克隆

为克隆 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 基因的启动子片段,在 NCBI 数据库中根据日本晴(以下简称为 NPB)中 *Os12g0630100* 起始密码子上游 2000 bp 序列分别设计正向克隆引物 pTLP12-GUS-F 和反向克隆引物 pTLP12-GUS-R,在引物前端加上含有 BamHI 酶切位点的 DX2181-eGFP 载体的同源臂序列,引物序列: pTLP12-GUS-F, `tggctgcaggtcgacgatccCCGGTCTGACCGGCCAC`; pTLP12-GUS-R, `ggactgaccaccgggatccTGTTGCTTGCTTTCTTCTAATCTTTG` (小写字母为同源臂序列)。以籼稻品种 TQ 基因组 DNA 为模板,使用 TransStartFastPfu DNA 聚合酶配制 PCR 扩增体系(20  $\mu$ l): 5  $\times$  TransStart FastPfu Buffer 4  $\mu$ l, dNTPs (2.5 Mm/L) 1.6  $\mu$ l, DNA Polymerase 0.4  $\mu$ l, pTLP12-GUS-F 和 pTLP12-GUS-R (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ l, 模板 DNA 2  $\mu$ l, 无菌去离子水补充至 20  $\mu$ l。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 31 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。反应结束后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 20 min)。选择大小为 2000 bp 的单一片段使用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化。

#### 2.2.2. *pTLP12::GUS* 融合载体的构建

将 DX2181-eGFP 质粒进行单酶切,选用 BamHI 作为酶切位点,并配置酶切反应体系(总体积 10  $\mu$ l): DX2181-eGFP 质粒 DNA 5  $\mu$ l, 10  $\times$  CutSmart 缓冲液 1  $\mu$ l, BamH I 内切酶 1  $\mu$ l, 无菌去离子水补至 10  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时。反应结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳(120V, 20 分钟),使用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化线性载体。接着使用同源重组酶连接线性质粒和目的片段,连接反应体系为:线性化载体 DX2181-eGFP 3  $\mu$ l, 启动子片段 7  $\mu$ l, 50 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟。将连接产物转化至大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ , 使用含有 Kanamycin 的 LB 培养基过夜培养。挑取阳性单克隆菌落,进行 PCR 鉴定(参考步骤 2.2.1),摇菌,提取质粒。进行酶切验证,并将样品送至生工生物公司进行测序验证。验证结果为正确的重组质粒命名为 *pTLP12::GUS*。

### 2.2.3. *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子顺式作用元件分析

对测序后的 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子序列与 NCBI 数据库中的 *OsTLP12<sup>NPB</sup>* 序列比对, 并利用 PlantCARE 数据库分析其顺式作用元件。

### 2.2.4. *pTLP12::GUS* 融合载体的遗传转化

通过电转法将 *pTLP12::GUS* 质粒转入到 EHA105 农杆菌感受态细胞中, 将转化液置于含卡那霉素的培养基中培养(50 mg/L), 利用 PCR 反应来检测质粒转入情况。挑取阳性农杆菌于侵染液中, 制备重悬液, 挑取诱导的愈伤于农杆菌重悬液, 侵染 10~15 min。筛选单克隆愈伤组织, 将阳性愈伤接种至分化培养基。待分化出 2~5cm 的芽后接种至生根培养基, 30℃光照培养 7~10 天。

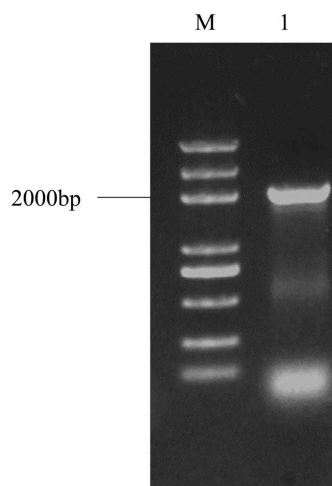
### 2.2.5. GUS 染色

收获 T0 代种子, 种植于含潮霉素(50 mg/L)的 1/2MS 培养基上, 取培养至一心期幼苗置于 GUS 染液(50 mM pH7.0 的磷酸钾缓冲液、10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA、0.1% Triton X-100、1mg/mlX-Gluc、100 μg/ml 氯霉素、1 mM 的铁氰化钾、1mM 的亚铁氰化钾及 20%的甲醇)中, 37℃避光过夜。用 95%乙醇脱色, 然后拍照记录。

## 3. 结果与分析

### 3.1. *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子克隆

根据日本晴基因组序列设计扩增 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子的特异性引物, 以籼稻特青基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 最终获得一条长为 2000 bp 的片段(图 1)。

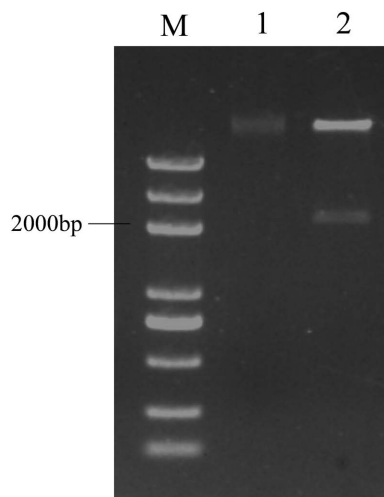


M. DL5000 DNA Marker; 1. *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子片段。

**Figure 1.** The electrophoresis results of the *OsTLP12<sup>TQ</sup>* promoter amplification  
**图 1.** *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子扩增电泳结果

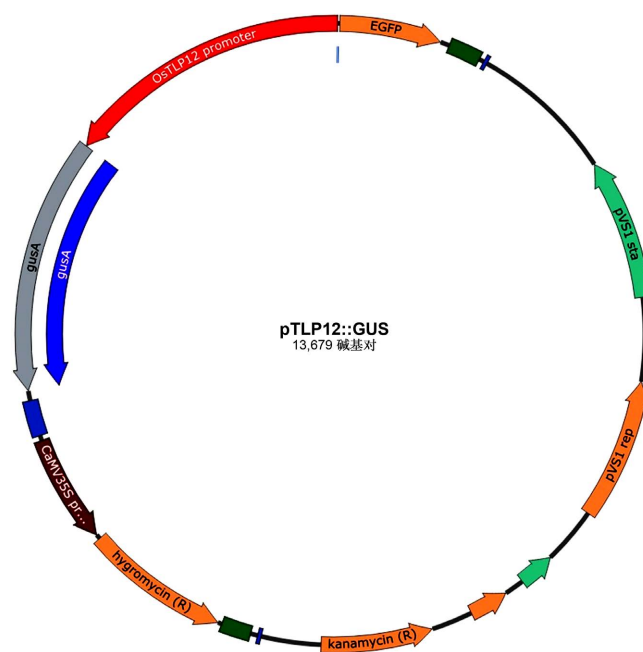
### 3.2. *pTLP12::GUS* 融合载体的构建

将扩增到的启动子片段胶回收纯化, 连接到 BamHI酶切的线性载体 DX2181-eGFP 中, 转化大肠杆菌。为验证目的片段是否成功连接到表达载体上, 选用 BamHI酶切重组质粒, 酶切产物中出现条带大小为 2000 bp 的目的片段(图 2), 这个结果充分说明 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 成功连接至 DX2181 载体上。然后将重组质粒送至生工生物公司测序验证, 成功获得了 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子驱动 GUS 标记基因表达的重组质粒 *pTLP12::GUS* (图 3)。



M. DL5000 DNA Marker; 1. *pTLP12::GUS* 重组质粒; 2. 酶切后生成的片段。

**Figure 2.** Validation results of *pTLP12::GUS* recombinant plasmid enzyme digestion  
**图 2.** *pTLP12::GUS* 重组质粒酶切验证结果



**Figure 3.** Map of the *pTLP12::GUS* expression vector  
**图 3.** *pTLP12::GUS* 表达载体图谱

### 3.3. *OsTLP12* 启动子顺式作用元件分析

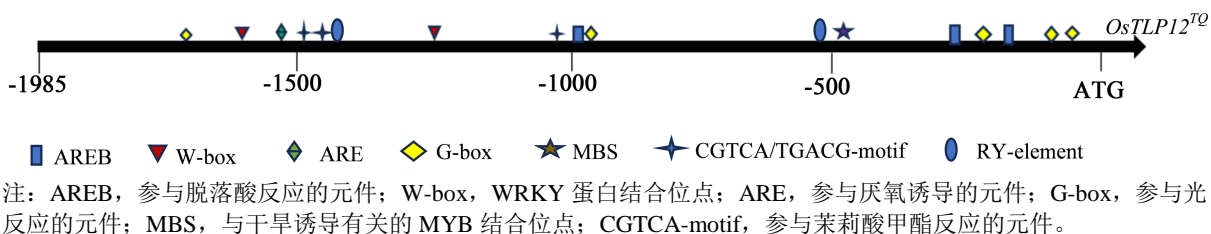
利用 PlantCARE 数据库分析 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子上的顺式作用元件, 结果如表 1 所示, *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子区域除启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件(CAAT-box)外, 还具有多个生物和非生物逆境反应相关顺式元件, 包括 WRKY 转录结合位点(W-box)、响应脱落酸反应的 ABRE 元件、响应茉莉酸反应的 CGTCA/TGACG motifs、响应干旱反应的 MBS 元件和参与厌氧诱导的 ARE 元件(图 4)。这说明了 *OsTLP12* 可能在响应逆境胁迫方面具有重要功能。将 *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子序列测序结果与 NPB 中的 *OsTLP12* 基因启动子进行序列比对, 结果显示二者相似, 两者之间的序列存在一个片段的缺失和 3 个单

核苷酸的替换,并未造成顺势作用元件的变化(图 5)。这说明籼稻 TQ 与粳稻 NPB 中 *OsTLP12* 的启动子在结构上相对保守。

**Table 1.** The cis-acting elements in the promoter region of *OsTLP12<sup>TQ</sup>*

**表 1.** *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子区域的顺势作用元件

顺式元件	基序(5'-3')	位置	数量	功能
ABRE	ACGTG	874+、1735+、1638+	3	参与脱落酸反应
ARE	AAACCA	273+	1	参与厌氧诱导
AT-rich element	ATAGAAATCAA	1479-	1	DNA 结合蛋白(ATBP-1)的结合位点
CAAT-box	CCAATT	1036+、1375+、1661-、1698+	4	启动子和增强子区域
	CAAAT	318-、965+、.....	9	
CGTCA-motif	CGTCA	321-、324+、783+、389-	4	参与茉莉酸甲酯反应
	TACGTG	1734+、1673+、873+	3	
G-box	CACGAC	1087-	1	参与光反应
	TAACACGTAG	94-	1	
HD-Zip 1	CAAT (A/T) ATTG	1153-	1	参与叶肉栅栏组织分化的元件
GT1-motif	GGTTAA	1518-、803+	2	光响应元件
	GGTTAAT	668+	1	
MBS	CAACTG	1459+	1	与干旱诱导有关的 MYB 结合位点
O2-site	GATGATGTGG	257-	1	参与玉米醇溶蛋白代谢调节
	GATGA(C/T)(A/G)TG(A/G)	1623+	1	
	GTTGACGTGA	321-	1	
RY-element	CATGCATG	661+、1430-	2	参与种子特异性调节
TATA-box	TATATA	1899+、181+、1901-、1945-、279+、507+	6	转录开始的-30 bp 左右的核心启动子元件
	ATATAA	181+、508+、438+、751+、437+、656-	6	
	ATATAT	903+、.....	9	
	TACAAAA	954+、955+、957+、1141+	4	
	TATA	1142-、1167-、.....	19	
	TATACA	1559-、182+	2	
	TATAA	1276-	1	
	TCTATAAATAGG	1899+	1	
W-box	TTGACC	204-、562+	2	WRKY 蛋白结合位点



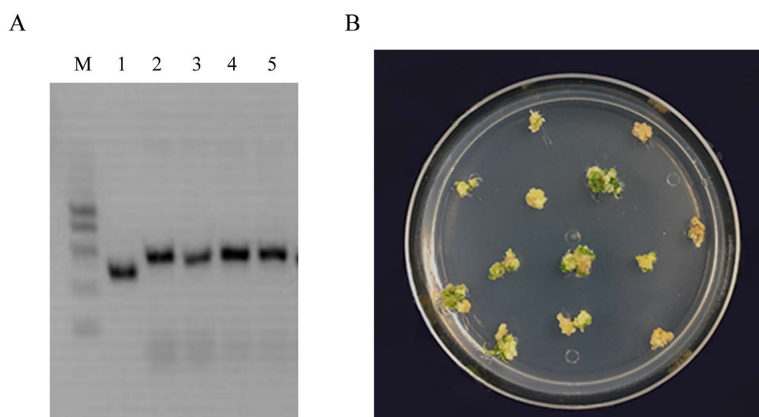
**Figure 4.** The cis-acting elements in the promoter region of *OsTLP12<sup>TQ</sup>*  
**图 4.** *OsTLP12<sup>TQ</sup>* 启动子区域的部分顺式作用元件



**Figure 5.** Alignment results of the promoter sequences of the *OsTLP12* Gene between TQ and NPB  
**图 5.** TQ 与 NPB 中 *OsTLP12* 基因的启动子序列比对结果

### 3.4. *pTLP12::GUS* 表达载体的遗传转化

通过电转法将重组质粒转入农杆菌细胞中，利用 PCR 来检测转入情况，结果如图 6 所示，阳性对照及样品的电泳条带清晰、大小正确，且阴性对照均无条带，挑选阳性农杆菌进行扩大培养，制备重悬液，侵染籼稻特青野生型愈伤组织中。在含 50 mg/L 潮霉素 1/2 MS 固体培养基上筛选单克隆愈伤组织，将阳性愈伤接种至分化培养基(图 6)。待分化出芽后接种至生根培养基，30℃ 光照培养 7~10 天，获得 *pTLP12::GUS* 表达载体 T0 代转基因植株。



A. 农杆菌菌落 PCR。M. DL5000 DNA Marker；条带 1~5 为阳性克隆；B. 阳性愈伤组织分化。

**Figure 6.** *pTLP12::GUS* recombinant plasmid *Agrobacterium*-mediated transformation of rice  
**图 6.** *pTLP12::GUS* 重组质粒农杆菌转化水稻

### 3.5. 转基因植株 GUS 染色

转 *pTLP12::GUS* 的 T0 代种子种植于含 50 mg/L 潮霉素 1/2 MS 固体培养基上, 成功发芽的种子浸入 GUS 染色液中。结果如图 7 所示, *OsTLP12* 基因启动子 GUS 表达载体的转基因植株中, 根和胚芽鞘被染成深蓝色, 表明 GUS 基因在根和胚芽鞘中有较强的表达。而嫩芽上有少量表达。



Figure 7. Transgenic plant GUS staining phenotyp  
图 7. 转基因植株 GUS 染色表型

## 4. 讨论

构建启动子-GUS 表达载体是研究基因启动子功能和调控机制的重要工具, 有助于深入理解基因的调控网络和生物学功能。通过将目标基因启动子与 GUS 基因结合, 可以在植物细胞中表达 GUS 报告基因, 从而研究基因启动子的活性和调控机制[9]。利用 GUS 染色或荧光素酶报告基因分析转基因植物中 GUS 活性的分布情况, 评估基因启动子在不同组织或发育阶段的特异性表达, 通过转化植物材料并诱导不同的胁迫条件, 可以评估基因启动子在应激条件下的表达模式, 从而研究启动子在抗逆反应中的作用[10] [11] [12]。各种环境胁迫诱导 thaumatin-like proteins (TLPs) 表达, 使 TLPs 在植物体内积累。在蔷薇(*Rosa chinensis*) 中鉴定了 27 个 *RcTLPs*, 所有 *RcTLPs* 的启动子中都发现了包括与生长、发育和激素反应以及非生物和生物反应相关的调控元件 (Cis-regulatory elements, CEs), 表明它们在玫瑰中发挥着不同的作用。转录组学分析发现, 一些根特异表达的 *RcTLPs* 对干旱和盐分胁迫有反应, 并且敲除 *RcTLP 6* 导致玫瑰对盐胁迫的耐受性降低[13]。启动子顺式作用元件是基因调控中的重要组成部分, 参与控制各种生物过程(包括非生物应激反应, 激素反应和发育过程)的基因活动的动态网络的转录调控, 在转录调控中起着关键的作用[14]。WRKY 超家族, 其中的 WRKY 蛋白通常结合到 W-box 上, 并参与调控植物的防御反应[15] [16]。ABRE (ABA responsive element) 元件是植物中响应脱落酸(ABA)信号的重要顺式作用元件, 调控着植物渗透胁迫和低温胁迫[14]。ARE (Antioxidant Response Element) 元件是一种与植物响应氧化逆境相关的顺式作用元件, 在植物抗氧化应激和逆境响应中的重要作用[17]。

## 5. 结论

本研究成功克隆了水稻中类甜蛋白 *OsTLP12* 基因的启动子并构建了相应的 GUS 表达载体, 通过酶切验证和序列分析, 确保了构建的表达载体的准确性和稳定性, 这为进一步的转基因植物研究奠定了基础。对 *OsTLP12* 基因启动子的结构和功能进行了初步分析, 发现其中具有多个生物和非生物逆境反应相关顺式元件。并为进一步研究该基因在水稻生长发育过程中的调控机制提供了基础。通过序列比对和分析, 确认了所克隆启动子的一致性和完整性。这为后续的功能研究提供了可靠的实验材料。GUS 染色结



果显示,本研究成功构建了 *OsTLP12* 基因启动子 GUS 表达载体及转基因材料,在转基因材料中,根及胚芽鞘有较强的表达,说明 *OsTLP12* 可能在水稻种子发芽时具有重要作用,但对其在水稻生长发育中的具体调控机制仍需进一步深入的研究。总的来说,本研究为进一步探究水稻中类甜蛋白 *OsTLP12* 基因的功能和调控机制提供了重要的实验基础,也为水稻品种改良和生产提供了潜在的应用价值。

## 基金项目

本研究获得了国家自然科学基金的资助(32172088)。

## 参考文献

- [1] Mackenzie, A., Pridham, J.B. and Saunders, N.A. (1985) Changes in the Sweet Proteins (thaumatin) in *thaumatococcus danielli* Fruits during Development. *Phytochemistry*, **24**, 2503-2506. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)80655-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)80655-x)
- [2] Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T. and Sano, H. (2000) Secreted Proteins of Tobacco Cultured BY2 Cells: Identification of a New Member of Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Molecular Biology*, **42**, 479-488. <https://doi.org/10.1023/a:1006393326985>
- [3] Vigers, A.J., Wiedemann, S., Roberts, W.K., Legrand, M., Selitrennikoff, C.P. and Fritig, B. (1992) Thaumatin-Like Pathogenesis-Related Proteins Are Antifungal. *Plant Science*, **83**, 155-161. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90074-y](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90074-y)
- [4] An, M., Tong, Z., Ding, C., Wang, Z., Sun, H., Xia, Z., et al. (2019) Molecular Characterization of the Thaumatin-Like Protein PR-NP24 in Tomato Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **67**, 13001-13009. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05256>
- [5] Wang, F., Shen, S., Cui, Z., Yuan, S., Qu, P., Jia, H., et al. (2023) *Puccinia triticina* Effector Protein Pt\_21 Interacts with Wheat Thaumatin-Like Protein TaTLP1 to Inhibit Its Antifungal Activity and Suppress Wheat Apoplast Immunity. *The Crop Journal*, **11**, 1431-1440. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2023.04.006>
- [6] Muoki, R.C., Paul, A., Kaachra, A. and Kumar, S. (2021) Membrane Localized *thaumatin*-Like Protein from Tea (*CsTLP*) Enhanced Seed Yield and the Plant Survival under Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **163**, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.012>
- [7] Hiroyuki, K. and Terauchi, R. (2008) Regulation of Expression of Rice Thaumatin-Like Protein: Inducibility by Elicitor Requires Promoter W-Box Elements. *Plant Cell Reports*, **27**, 1521-1528. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0536-7>
- [8] He, L., Li, L., Zhu, Y., Pan, Y., Zhang, X., Han, X., et al. (2021) *BOLTLP1*, a Thaumatin-Like Protein Gene, Confers Tolerance to Salt and Drought Stresses in Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*). *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 11132. <https://doi.org/10.3390/ijms222011132>
- [9] Jefferson, R.A. (1987) Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter*, **5**, 387-405. <https://doi.org/10.1007/bf02667740>
- [10] Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M. (1990) Construction of an Intron-Containing Marker Gene: Splicing of the Intron in Transgenic Plants and Its Use in Monitoring Early Events in *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, **220**, 245-250. <https://doi.org/10.1007/bf00260489>
- [11] Stangeland, B., Salehian, Z., Aalen, R., Mandal, A. and Olsen, O.-A. (2003) Isolation of GUS Marker Lines for Genes Expressed in Arabidopsis Endosperm, Embryo and Maternal Tissues. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 279-290. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg031>
- [12] Tao, J., Sun, H., Gu, P., Liang, Z., Chen, X., Lou, J., et al. (2017) A Sensitive Synthetic Reporter for Visualizing Cytokinin Signaling Output in Rice. *Plant Methods*, **13**, Article No. 89. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0232-0>
- [13] Su, L., Zhao, X., Geng, L., Fu, L., Lu, Y., Liu, Q., et al. (2021) Analysis of the Thaumatin-Like Genes of *Rosa chinensis* and Functional Analysis of the Role of *RcTLP6* in Salt Stress Tolerance. *Planta*, **254**, Article No. 118. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03778-y>
- [14] Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005) Organization of *cis*-Acting Regulatory Elements in Osmotic- and Cold-Stress-Responsive Promoters. *Trends in Plant Science*, **10**, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.012>
- [15] Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2000) The WRKY Superfamily of Plant Transcription Factors. *Trends in Plant Science*, **5**, 199-206. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01600-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01600-9)

- 
- [16] 缪刘杨, 周亮, 杨烁, 等. 水稻转录因子 WRKY42 的转录、表达及其与 W-box 的结合特征分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(7): 682-692.
- [17] 廖霞, 郑少杰, 卢可可, 等. 植物多酚通过 Nrf2/ARE 信号通路抗氧化作用研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 227-232.