

水稻胚乳特异表达启动子 DXCP35 的克隆及功能鉴定

颜彦 林拥军

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 根据水稻全生育期基因表达谱芯片数据库找到 1 个在水稻胚乳特异表达的基因, 命名为 DX35, 用 PCR 技术从水稻品种明恢 63 基因组中克隆得到其上游 1 356 bp 长度的启动子 DXCP35。将 DXCP35 与 β -glucuronidase (*GUS*) 报告基因融合后, 经根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导转化获得转基因水稻阳性植株, 通过组织化学染色法证明 DXCP35 是 1 个胚乳特异表达启动子。对其进行 5' 端缺失分析, 构建了 6 个缺失载体, 通过验证缺失载体的表达谱, 证明 308 bp 长度的启动子就足以维持胚乳特异表达模式。

关键词 水稻; 启动子; 胚乳特异表达; *GUS* 报告基因; 缺失分析

中图分类号 S 511; Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0015-06

在被子植物中, 储存营养物质和进行生殖繁衍都主要依靠果实及种子。若将果实或种子特异表达启动子用于调控外源基因的特异性表达, 不仅可以对外源基因表达的时间和空间进行限定, 减少外源蛋白对植物生长的影响, 同时可以专一性地对转基因植物果实和种子的品质及营养价值进行改良, 且有利于对外源蛋白进行分离。因此, 克隆果实及种子特异型启动子有着巨大的应用价值。科研人员对来源于番茄的果实特异启动子 E4、E8、PG 和 2A11 等进行了克隆和进一步的研究^[1-2]。*TdPR61* 基因启动子是来源于小麦的 1 个启动子, Kovalchuk 等^[3]将该启动子连接 *GUS* 报告基因后分别转化至水稻、小麦和大麦中, 通过表达模式验证, 确定该启动子在这 3 个物种中均能维持在种子中特异表达。Kuwan0 等^[4]通过表达谱芯片找到 1 个在水稻的糊粉层特异表达的基因 *AL1*, 对其上游的启动子进行了克隆, 连接 *GUS* 报告基因后验证其表达谱, 确认该启动子为糊粉层特异表达启动子。Xu 等^[5]将来源于椰子的 *LPAAT* 基因的启动子进行分离克隆, 并构建了该启动子的缺失片段, 均连接报告基因后转化水稻, 发现全长启动子及其缺失片段均在胚乳特异表达, 仅在表达强度上存在差异。

胚乳是谷类作物的主要储藏器官, 能为人类提供营养和能量。在水稻中, 种子特异型启动子的研究多集中在胚乳特异型启动子, 比如: 球蛋白基因启动子^[6]、醇溶谷蛋白基因启动子^[7]和谷蛋白基因启动子^[8]等。利用基因工程改善水稻胚乳的质量和营养成分已有初步的进展^[9], 比如曾报道的黄金大米^[10]、芝麻营养米^[11]、高铁米^[12]等, 都是通过将胚乳特异表达启动子驱动目的基因的表达载体转化水稻, 使目的基因在胚乳中特异表达进而提高大米中特定营养物质的含量, 使日常膳食更为均衡。尽管目前已克隆出了一定数目的胚乳特异启动子, 但能满足实际应用需求的仍较少^[13]。本研究根据水稻全生育期表达谱芯片数据库^[14], 从水稻基因组中分离克隆出未经注释的胚乳特异型启动子 DXCP35, 并对其进行缺失分析, 初步鉴定出该启动子的核心功能区域, 旨在为转基因育种提供有益的工具。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌种

籼稻品种明恢 63 (*Oryza sativa* L ssp. *indica*) 以及粳稻品种中花 11 (*Oryza sativa* L ssp. *japonica*)、大肠杆菌菌株 Top10 和农杆菌菌株 EHA105

收稿日期: 2013-05-16

基金项目: 国家重大科技专项 (2011ZX08001-001)

颜彦, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: yoyoyan7758@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 林拥军, 博士, 教授, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

均由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室保存,启动子克隆载体 DX2181 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室叶荣建博士改造。

1.2 研究中用到的试剂

Taq DNA 聚合酶及相应 Buffer、dNTPs、DNA 连接酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司(北京); DNA marker、pEASY-T3 试剂盒、TRIzol-RNA 提取试剂盒购自 Transgene 公司(北京);反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司;组培中用到的潮霉素 B (Hygromycin B)、乙酰丁香酮(Acetosyringone)、谷氨酰胺(Glutamine)、2,4-D 等购自 Sigma 公司(美国);其余试剂为国产或进口分析纯。引物由金斯瑞生物科技有限公司(南京)合成。

1.3 候选基因表达模式的鉴定

从华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 CREP 数据库中查找到 1 个胚乳特异表达的基因命名为 DX35,用 Trizol 法抽提籼稻明恢 63 各组织的总 RNA,并进行反转录。以反转录产物为模板进行 RT-PCR。DX35 的 RT-PCR 引物序列 RT35R: GGAAATGTCAGTCTGCTTGG; RT35F: CG-CAGCTGGACATGATTAGG。内参基因 GAPDH 的 RT-PCR 引物序列 GAPDHR: CCTGTTGT-CACCCTGGAAGTC; GAPDHF: CTGCAACT-CAGAAGACCGTTG。RT-PCR 反应体系(20 μ L): ddH₂O 12.9 μ L, 10 $\times$ Buffer 2 μ L, MgCl₂ 2 μ L, dNTPs 2 μ L, GAPDHF 0.2 μ L, GAPDHR 0.2 μ L, cDNA 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L。RT-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖胶电泳检测,鉴定 DX35 的表达模式。

1.4 启动子 DXCP35 的克隆及植物表达载体的构建

以明恢 63 基因组 DNA 作为扩增模板,设计引物 35F:CCCAAGCTTCTAACGCTATTCAACCG

TGA 和 35R:CGGGATCCATCGATCCCAAAC TAC-GAGA,扩增 DX35 上游长度为1 356 bp 的启动子序列,命名为 DXCP35。PCR 反应体系(20 μ L): ddH₂O 12.4 μ L, 10 $\times$ Buffer 2 μ L, MgCl₂ 2 μ L, dNTPs 2 μ L, 35F 0.2 μ L, 35R 0.2 μ L, 基因组 DNA 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。将 PCR 产物构建到载体 pEASY-T3 上并测序验证。

1.5 启动子 DXCP35 及其缺失片段表达载体的构建与遗传转化

设计引物通过 PCR 的方法来构建 DXCP35 系列 5' 端缺失启动子(图 1)。引物序列如下:

左引物
35F-1165:CCCAAGCTTGCCACTAGGATAGTGAGAT;
35F-926:CCCAAGCTT TCTTTCTGGGACAAACGAC;
35F-713:CCCAAGCTTGTCTCACAATTCGTGCAC;
35F-509:CCCAAGCTTGGAGAGAATGTCACACACAC;
35F-308:CCCAAGCTTGCCTTCCACGTACGCACTT;
35F-112:CCCAAGCTTTCTCCTCGCTACAGCTACAC;

右引物均为 35R。将 DXCP35 及其缺失片段通过酶切连接构建到启动子克隆载体 DX2181(图 2)。通过电转化法将构建好的表达载体转入农杆菌 EHA105 中,利用农杆菌转化法将这些载体分别导入水稻品种中花 11。

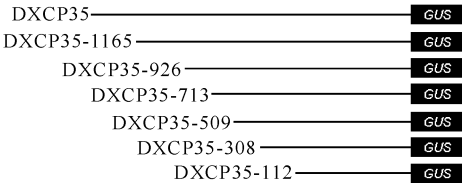


图 1 启动子 DXCP35 及其缺失片段融合 GUS 简图
Fig.1 Schematic representations of constructs carrying native and deletion DXCP35 promoters fused with GUS coding sequence

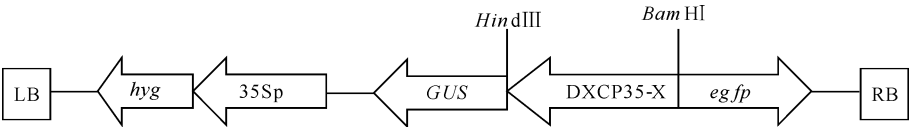


图 2 植物表达载体 DX2181 的 T-DNA 区域简图

Fig.2 Schematic diagram of the T-DNA region of binary vector DX2181 with DXCP35 or DXCP35 deletions

1.6 转基因植株的阳性检测

待获得转基因植株后,取其幼嫩叶片进行基因组 DNA 的小量抽提,以其作为 PCR 模板检测阳性

植株,设计引物 GUS-F:GGGCGAACAGTTTCCT-GATT 和 GUS-R: AACGTATCCACGCCGTAT-TC,扩增 GUS 基因内部一段大小为 699 bp 的片

段。PCR 反应体系(20 μ L):ddH₂O 12.4 μ L,10 $\times$ Buffer 2 μ L,MgCl₂ 2 μ L,dNTPs 2 μ L,GUS-F 0.2 μ L,GUS-R 0.2 μ L,基因组 DNA 1 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,60 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.7 GUS 组织化学染色

参照 Wu 等^[15-16]的方法对转基因植株进行组织化学染色。取 PCR 检测为阳性植株的叶片、叶鞘、茎秆、颖壳、种子和根组织切成合适的大小,加入适量 GUS 染液(1 mg/mL X-Gluc、50 mmol/L pH 7.0 的磷酸钾缓冲液、10 mmol/L Na₂-EDTA、100 μ g/mL 氯霉素、20% 的甲醇、0.1% Triton X-100、1 mmol/L 的铁氰化钾和 1 mmol/L 的亚铁氰化钾)浸没样品,置于 37 $^{\circ}$ C 反应 10 h 左右,再依次用 95% 乙醇和 75% 乙醇各进行 1 次脱色。在 Leica 体式显微镜下对染色材料进行拍照、保存。每个构建至少染 10 个独立的转化植株。

2 结果与分析

2.1 候选基因 DX35 的表达模式鉴定

将 明恢 63 各组织的 RNA 进行反转录得到

cDNA,以此作为 PCR 反应模板,进行 RT-PCR 分析候选基因 DX35 的表达模式,结果显示 DX35 在胚乳中特异表达(图 3),与芯片数据吻合。

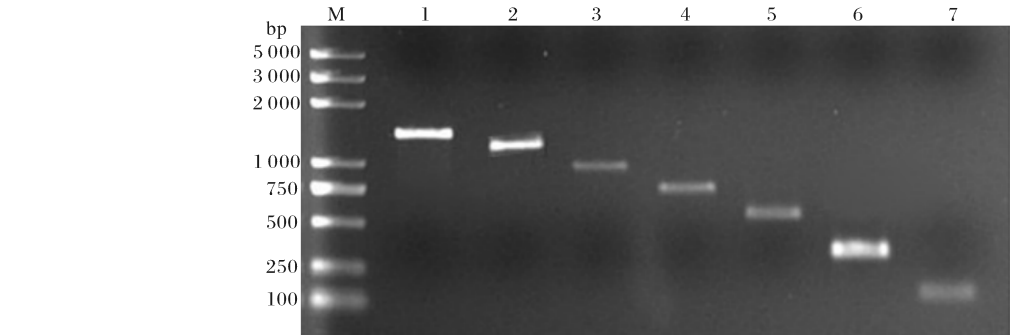


被检测的组织从左往右依次是胚乳(开花后 14 d)、叶片、叶鞘、茎秆、穗和根。The DX35 is detected in different tissues (from left to right):endosperm(14 days after flower),leaf,sheath,stem, panicle and root.

图 3 RT-PCR 检测 DX35 在明恢 63 各组织中的表达情况
Fig.3 Expression model of DX35 by RT-PCR analysis

2.2 启动子 DXCP35 及其缺失片段的分离克隆

以水稻品种明恢 63 的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 法克隆出一段全长 1 356 bp 的启动子片段,将其命名为 DXCP35。以测序正确的 TA-DXCP35 质粒为模板,利用缺失引物通过 PCR 法克隆出 DX-CP35 各个缺失片段(图 4)。挑选测序正确的片段,利用酶切连接的方法连接到终载体后转化水稻中花 11 的愈伤。通过 PCR 的方法鉴定出 DXCP35 及其 6 个缺失片段的阳性转化植株,种植于大田中。



M:DL 5 000 marker; 1:DXCP35; 2:DXCP35-1165; 3:DXCP35-926; 4:DXCP35-713; 5:DXCP35-509; 6:DXCP35-308; 7:DXCP35-112.

图 4 启动子 DXCP35 及其缺失片段 PCR 扩增

Fig.4 PCR amplification of promoter DXCP35 and DXCP35 deletions

2.3 启动子 DXCP35 序列的生物信息学分析

通过 <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html> 中的顺式元件数据库,对 DXCP35 启动子进行分析,发现 DXCP35 中含有许多与胚乳特异表达相关的顺式作用元件(表 2)。

2.4 DXCP35 及其缺失片段转基因植株的 GUS 组织化学染色

取转基因阳性植株的叶片、叶鞘、茎秆、颖壳、种子和根组织进行 GUS 染色验证启动子的表达谱。

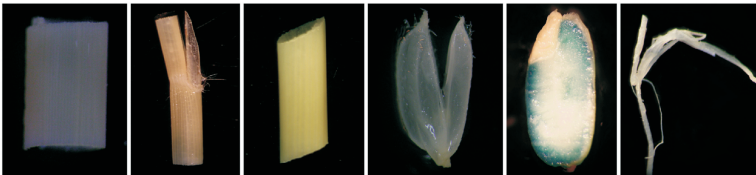
根据染色结果,发现只在转化植株的胚乳中检测到 GUS 蛋白的表达,在其余组织染色结果呈阴性(图 5),证实 DXCP35 是胚乳特异型的启动子。

根据 DXCP35 系列缺失片段的表达模式(图 6)可以发现:启动子 DXCP35-1165、DXCP35-926、DX-CP35-713、DXCP35-509、DXCP35-308 均能驱动 GUS 基因在胚乳中特异表达,与全长启动子的表达模式一致,但表达强度差异明显。当缺失到 DXCP35-112 时,在各组织中均检测不到 GUS 基因的表达。

表 2 启动子 DXCP35 序列中与胚乳特异表达相关的顺式作用元件

Table 2 Cis-elements related to endosperm specific expression in the promoter DXCP35

元件名称 Cis-elements	出现次数 Frequencies	生物学功能 Biological functions
ARR1-binding element	14	与水稻非共生血红蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of rice non-symbiotic haemoglobin gene
E-box	10	与油菜 napA 贮藏蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of <i>Brassica napus napA</i> storage-protein gene
DPBFCOREDCDC3	4	与胡萝卜胚胎特异表达基因启动子有关 Related with the promoter of carrot embryo-specific expression gene
CGACG element	2	与水稻中 α -淀粉酶基因启动子有关 Related with the promoters of rice alpha-amylase gene
Pyrimidine box	2	与水稻、大麦中 α -淀粉酶基因启动子有关 Related with the promoters of rice and barley alpha-amylase genes
SEF4 binding site	2	与大豆 7S globulin 基因启动子有关 Related with the promoters of soybean 7S globulin gene
AMYBOX	2	与水稻、小麦、大麦中 α -淀粉酶基因有关 Related with the promoters of rice, barley and wheat alpha-amylase genes
TGTAAAG core motif	1	与玉米胚乳醇溶谷蛋白有关 Related with the endosperm prolamin in maize
ACGT motif	1	与水稻谷蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of rice glutelin gene
CANBNNAPA	1	与油菜籽蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of rapeseed protein gene



从左至右分别是叶片、叶鞘、茎秆、颖壳、成熟种子以及根 From left to right: leaf, sheath, stem, panicle, mature seed and root.

图 5 组织化学染色分析启动子 DXCP35 的表达模式

Fig. 5 Histochemical analyses of transgenic rice plants containing DXCP35

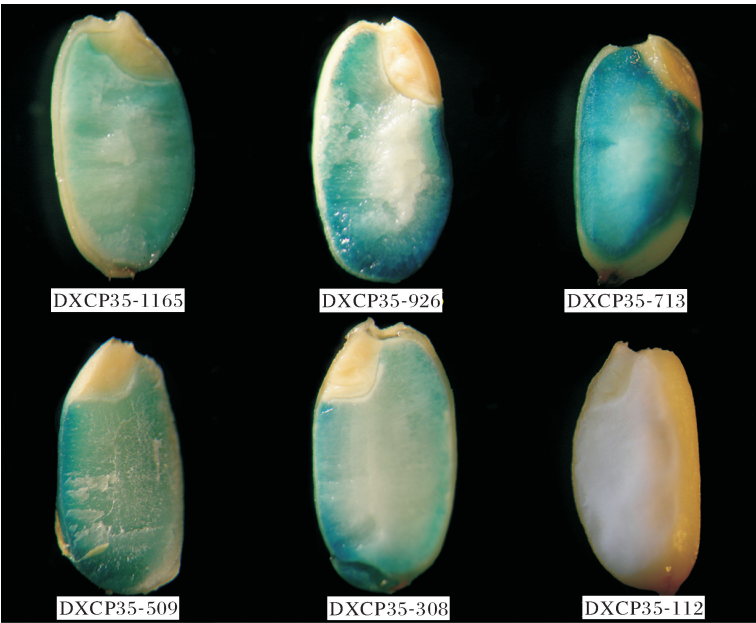


图 6 组织化学染色分析启动子 DXCP35 缺失片段在种子中的表达情况

Fig. 6 Histochemical analyses of transgenic rice plants containing various DXCP35 promoter fragment/GUS fusions

3 讨论

利用不同的组织器官特异型启动子驱动目的基因进行表达,可以使其表达产物仅存在于特定的组织或器官,不但可以提升外源基因的表达效率,还可以减少异源蛋白在不需要的组织过量积累,减少对植物发育造成的不良影响^[17]。但是目前来源于作物本身的组织器官特异型启动子仍较缺乏。作为重要的粮食作物之一,对水稻农艺性状进行改良具有重大的经济效益,高效的组织器官特异型启动子则能在这个过程中发挥重要的作用^[18]。种子是水稻的食用部位,在胚乳中驱动功能基因的特异表达不但可以改善大米的营养品质,也有助于研究植物来源的生物反应器。科研人员利用水稻 *Ole18* 基因的启动子驱动 *RINO1* 基因在种子中特异表达,成功降低了水稻种子中植酸含量^[19]。Chen 等^[20]采用染色体步移法分离到了绿豆 8SG α 基因的 5'上游 472 bp 的启动子,通过生物信息学分析发现其中存在大量的种子特异表达元件。将该启动子连接 *GUS* 报告基因,并转化拟南芥,发现 *GUS* 基因只在种子中特异表达,且表达量是 35S 启动子的 2~4 倍。Gt13a 是 1 个已报道的胚乳特异表达启动子。He 等^[21]利用该启动子驱动人血清白蛋白基因 *rHSA* 在水稻胚乳中特异表达,得到了较高产量和质量的重组人血清白蛋白,此研究结果有巨大的应用价值。果实及种子特异表达启动子在生产转基因植物口服疫苗中也有着重要的作用。从番茄品种金丰 1 号中分离出的 2.2 kb 和 1.1 kb 的 E8 启动子被应用于驱动乙肝病毒表面抗原 M 蛋白基因 (*HBsAg M*) 并分别转化番茄和烟草,进而检测不同长度 E8 启动子驱动目的基因的表达模式和效率,发现 1.1 kb 的 E8 启动子可以在番茄果实中特异地驱动外源基因表达,同时该启动子还具有物种特异型^[22]。Furtado 等^[23]发现利用种子特异型启动子在非本植物中表达时其表达模式易发生改变,如利用来源大麦和小麦的种子特异型启动子分别驱动报告基因 *GFP* 在水稻中表达,发现在根和叶中也检测到 GFP 蛋白的表达。因此,克隆来源于水稻本身的胚乳特异型启动子对于利用基因工程来改良水稻性状方面有着良好的应用价值。

本研究成功从水稻中克隆出 1 个新的胚乳特异表达启动子 DXCP35,对 DXCP35 进行 5'端缺失分析,通过 GUS 染色发现随着该启动子的不断截短,

表达模式未发生改变,但其活性呈现出升高-降低-无的模式。推测在 1 165~713 bp 之间存在着负向调控启动子活性的顺式作用元件;713~308 bp 之间存在着正向调控启动子活性的顺式作用元件;308~112 bp 之间存在着控制胚乳特异表达的顺式作用元件,当缺失掉这一部分序列后,该启动子完全丧失活性。同时,GUS 染色结果证实 713 bp 长度的启动子即可实现在胚乳高丰度特异表达,有望在转基因育种中应用。在后续的研究中还需要进行凝胶阻滞试验,期望借此鉴定出控制 DXCP35 在胚乳特异表达的顺式作用元件,找到与其互作的转录因子,进而对其发挥调控功能的机制进行解析,使该启动子能更好地运用于农业生产中。

参 考 文 献

- [1] COUPE S A, DEIKMAN J. Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes[J]. *Plant J*, 1997, 11: 1207-1218.
- [2] DEIKMAN J, FISCHER R L. Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato[J]. *EMBO J*, 1988, 7: 3315-3320.
- [3] KOVALCHUK N, SMITH J, BAZANOVA N, et al. Characterization of the wheat gene encoding a grain-specific lipid transfer protein *TdPR61*, and promoter activity in wheat, barley and rice[J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 2025-2040.
- [4] KUWANO M, MASUMURA T, YOSHIDA K T. A novel endosperm transfer cell-containing region-specific gene and its promoter in rice[J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 76: 47-56.
- [5] XU L, YE R J, ZHENG Y S, et al. Isolation of the endosperm-specific *LPAAT* gene promoter from coconut (*Cocos nucifera* L.) and its functional analysis in transgenic rice plants[J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 1061-1068.
- [6] NG D W, HALL T C. PvALF and FUS3 activate expression from the phaseolin promoter by different mechanisms[J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 233-244.
- [7] QU L Q, TAKAIWA F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice[J]. *Plant Biotechnol J*, 2004, 2: 113-125.
- [8] 张宪银, 薛庆中. 水稻胚乳特异性启动子 Gt1 的克隆及其功能验证[J]. *作物学报*, 2002, 28(1): 110-114.
- [9] BAJAJ S, MOHANTY A. Recent advances in rice biotechnology towards genetically superior transgenic rice[J]. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3: 275-307.
- [10] YE X, AL-BABILI S, KLOTI A, et al. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm[J]. *Science*, 2000, 287: 303-305.
- [11] LEE T T, CHUNG M C, KAO Y W, et al. Specific expression

of a sesame storage protein in transgenic rice bran[J]. J Cereal Sci, 2005, 41: 23-29.

[12] LEE S, JEON U S, LEE S J, et al. Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene[J]. Proc Natl Acad Sci, 2009, 106: 22014-22019.

[13] QU L Q, XING Y P, LIU W X, et al. Expression pattern and activity of six glutelin gene promoters in transgenic rice[J]. J Exp Bot, 2008, 59: 2417-2424.

[14] WANG L, XIE W B, CHEN Y, et al. A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice[J]. Plant J, 2010, 61: 752-766.

[15] WU C, LI X, YUAN W, et al. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome[J]. Plant J, 2003, 35: 418-427.

[16] 魏晶, 毛伟华, 林拥军, 等. 1 个新水稻组成型启动子的克隆与功能鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(2): 139-146.

[17] SHRAWAT A K, CARROLL R T, DEPAUW M, et al. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase[J]. Plant Biotechnol J, 2008, 6: 722-732.

[18] 叶荣建. 水稻组织特异表达启动子的分离克隆、功能分析及应用[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2012.

[19] KUWANO M, MIMURA T, TAKAIWA F, et al. Generation of stable ‘low phytic acid’ transgenic rice through antisense repression of the 1 D-myo-inositol 3-phosphate synthase gene (*RINO1*) using the 18-kDa oleosin promoter[J]. Plant Biotechnol J, 2009, 7: 96-105.

[20] CHEN M X, ZHENG S X, YANG Y N, et al. Strong seed-specific protein expression from the *Vigna radiata* storage protein 8S α promoter in transgenic *Arabidopsis* seeds[J]. J Biotechnol, 2014, 174: 49-56.

[21] HE Y, NING T, XIE T, et al. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds[J]. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108: 19078-19083.

[22] HE Z M, JIANG X L, QI Y, et al. Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression[J]. Genetica, 2007, 133: 207-214.

[23] FURTADO A, HENRY R J, TAKAIWA F. Comparison of promoters in transgenic rice[J]. Plant Biotechnol J, 2008, 6: 679-693.

Cloning and functional indentification of an endosperm-specific promoter DXCP35 from rice

YAN Yan LIN Yong-jun

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Utilizing endosperm-specific promoter can effectively improve the quality of rice in genetic engineering, and has good application value in rice seed bioreactor. Based on microarray data, a rice endosperm-specific expression gene *DX35* was identified. A promoter named as *DXCP35* with 1 356 bp in length of the gene was cloned from the genomic DNA of Minghui 63 by PCR. Promoter *DXCP35* was fused with β -glucuronidas (*GUS*) reporter gene and transformed into rice callus through *Agrobacterium*-mediated transformation. *DXCP35* was identified as an endosperm-specific promoter in transgenic rice plants by histochemical staining. Results of analyzing its 5' end deletion showed that promoter fragment with 308 bp length was sufficient to maintain the endosperm-specific expression model. The core function areas of *DXCP35* were preliminarily identified.

Key words rice; promoter; endosperm-specific expression; *GUS* reporter gene; deletion analysis

(责任编辑: 张志钰)