

Xác định các yếu tố điều hòa hoạt động (CRE) của gen *RMP1* và *RMP2* liên quan đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn lúa

Nguyễn Tiến Dũng*, Triệu Bích Huệ, Nguyễn Xuân Vũ

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 6/5/2021; ngày chuyển phản biện 11/5/2021; ngày nhận phản biện 15/6/2021; ngày chấp nhận đăng 23/6/2021

Tóm tắt:

Gen chuyên biệt mô, cơ quan thường được kiểm soát bởi các yếu tố điều hòa hoạt động (Cis Regulator Elements - CRE) nằm trên vùng điều hòa gen (promoter). Ở lúa, promoter chuyên biệt hạt phấn đã được chứng minh có sự tham gia của các CRE đặc hiệu như GTGANTG10, POLLEN1LELAT52... và các mô típ đặc thù khác. Hai gen, *RMP1* và *RMP2* biểu hiện chuyên biệt ở giai đoạn đầu hình thành hạt phấn lúa. Vùng promoter được phân tích bằng phần mềm NEW PLACE và PlantCARE đã xác định được 80 và 95 CRE nằm trên promoter *RMP1* và *RMP2*. Trong đó có 6 CRE phổ biến xuất hiện với tần số từ 12 đến 25 lần, gồm ARR1AT, CAATBOX1, CACTFTPPCA1, DOFCOREZM, EBOXBNNAPA, GATABOX. Đặc biệt, hai CRE liên quan trực tiếp đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn GTGANTG10, POLLEN1LELAT52 cũng xuất hiện trên các promoter này. Trong đó, GTGANTG10 xuất hiện với tần số 14 lần trên *RMP1* và 21 lần trên *RMP2*; POLLEN1LELAT52 xuất hiện với tần số 4 và 21 lần trên *RMP1* và *RMP2*.

Từ khóa: lúa, vùng điều hòa gen, yếu tố điều hòa.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Promoter là trình tự nucleotide nằm trước gen phía đầu 5' có vai trò quan trọng trong việc điều khiển hoạt động phiên mã của gen để tổng hợp protein. Promoter được phân làm 3 loại chính gồm: promoter cảm ứng, cơ định và chuyên biệt (specific promoter). Trong đó, promoter cơ định như 35S, actin hay ubiquitin được sử dụng phổ biến nhất [1-3]. Tuy nhiên, những promoter này thường tạo ra các kiểu hình không mong muốn do hoạt động không định hướng của gen gây ra. Vì thế, để khắc phục điều này các nhà khoa học có xu hướng sử dụng các promoter chuyên biệt để điều khiển các gen ở các mô, bộ phận theo chủ đích [4, 5].

Ở thực vật có hoa nói chung, lúa nói riêng năng suất hạt phụ thuộc rất nhiều vào hiệu quả của quá trình thụ phấn và thụ tinh, trong đó hạt phấn đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình này. Bất kỳ một tổn thương nào của hạt phấn cũng sẽ ảnh hưởng đến quá trình tạo hạt [6]. Nguyen và cs (2019) [7] đã chứng minh ở điều kiện nhiệt độ cao 35°C hạt phấn cây Arabidopsis bị chết, cây không hình thành hạt. Ở khía cạnh phân tử, các báo cáo cho thấy rất nhiều gen tham gia vào quá trình phát triển của hạt phấn như: *OsIPK*, *OsIPA*, *OsBHLH*, *OsFbox*, *OsIPP3*, *OsEMSA1*, *OsLSP*, *EPAD1*... [8-13]. Promoter của các gen này đã được phân lập và

chứng minh có khả năng ứng dụng trong điều khiển các gen mục tiêu nhằm tạo dòng bất dục đực ở cây trồng như thuốc lá, lúa đã được báo cáo [14-16].

Nhìn chung, các promoter chuyên biệt thường có mặt các yếu tố điều khiển hoạt động chuyên biệt cho mô hay tế bào [17-20]. Khi phân tích trình tự vùng điều hòa chuyên biệt hạt phấn ở cây cà chua, Lat52, nhóm nghiên cứu của Twell đã tìm thấy một số yếu tố có vai trò chính đối với hoạt động của promoter như GTGANTG10, POLLEN1LeLAT52 [21]. Các yếu tố này cũng được tìm thấy ở một số promoter chuyên biệt hạt phấn khác như OsSCP, OSIPA, OsLPS10 và OsLPS11 [22, 23]. Ngoài vai trò của các yếu tố nêu trên, một số nghiên cứu cho thấy các mô típ mới hay trình tự bảo tồn cũng chi phối hoạt động chuyên biệt của promoter. Các mô típ phân bố ở các vị trí khác nhau và kiểm soát các hoạt động chuyên biệt của gen [19, 20, 24, 25]. Li và cs (2020) [26] đã xác định được 15 mô típ liên quan trực tiếp đến biểu hiện chuyên biệt hạt phấn của gen *hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGP)* ở cây Arabidopsis. Nguyen và cs (2016) [27] đã xác định được 9 gen chuyên biệt hạt phấn ở lúa (*Rice microspore pollen* từ 1 đến 9). Các promoter này đã được chứng minh hiệu quả thông qua gen chỉ thị GUS và *Sidecar pollen-2 (scp-2)* ở cây Arabidopsis. Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi tiến hành phân tích vùng promoter

*Tác giả liên hệ: Email: nguyentindung@tuaf.edu.vn

Identification of *Cis*-regulator elements (CREs) of pollen-specific gene *RMP1* and *RMP2* in rice

Tien Dung Nguyen*, Bich Hue Trieu, Xuan Vu Nguyen

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

Received 6 May 2021; accepted 23 June 2021

Abstract:

Tissue and organ-specific expression genes induced by *Cis*-regulator elements (CREs) are distributed in the promoter region of a gene. In rice, pollen-specific genes have been investigated to identify CREs related to specific expression in anther and pollen grain such as GTGANTG10, POLLEN1LELAT52... *RMP1* and *RMP2* genes that specifically express the early stage of pollen development were analysed their promoter region using NEW PLACE and PlantCARE tools. Results showed that 80 CREs were located in the *RMP1* promoter and 95 CREs in the *RMP2*. Among them, 6 CREs are abundant distribution with from 12 to 25 copies, including ARR1AT, CAATBOX1, CACTFTPPCA1, DOFCOREZM, EBOXBNNAPA, and GATABOX. Interestingly, two pollen-specific CREs, GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, were also found in *RMP1* and *RMP2* promoters. In which, GTGANTG10 was counted 14 copies in *RMP1* and 21 copies in *RMP2*, whereas, POLLEN1LELAT52 was found 4 and 21 copies in *RMP1* and *RMP2*, respectively.

Keywords: *Cis*-regulator elements, promoter, rice.

Classification number: 4.6

của hai gen *RMP1* và *RMP2* nhằm tìm ra các CRE liên quan đến biểu hiện chuyên biệt của chúng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Phân tích biểu hiện gen

Biểu hiện của gen *RMP1* và *RMP2* được phân tích dựa trên dữ liệu công bố RiceXPro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>). Biểu hiện gen dựa trên cường độ huỳnh quang Cy3 ở các cơ quan sinh sản như mầm hoa, bao phấn, nhụy... Đồng thời, biểu hiện gen cũng được phân tích thêm dựa trên bản đồ nhiệt (heat map) bằng phần mềm ePlant (http://bar.utoronto.ca/eplant_rice/).

Lựa chọn vùng điều hòa hoạt động của gen và phân tích CRE

Trình tự gen *RMP1* (Os01g0533400) và *RMP2* (Os04g0561900) được lấy trên cơ sở dữ liệu Rice Functional Genomic Express Database (RiceGE, <http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>). Vùng trình tự nucleotide nằm liền kề phía trước mã mở đầu ATG phía đầu 5' được xác định là promoter. Trình tự promoter của gen *RMP1* và *RMP2* lần lượt là 1.343 và 754 bp (bảng 1). Để xác định các yếu tố CRE, trình tự promoter gen *RMP1* và *RMP2* được phân tích bằng phần mềm NEW PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) và PlantCARE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>). Tần số xuất hiện các CRE sẽ được thống kê và xây dựng biểu đồ. Các yếu tố phiên mã sẽ được đánh dấu vị trí trên vùng promoter của gen.

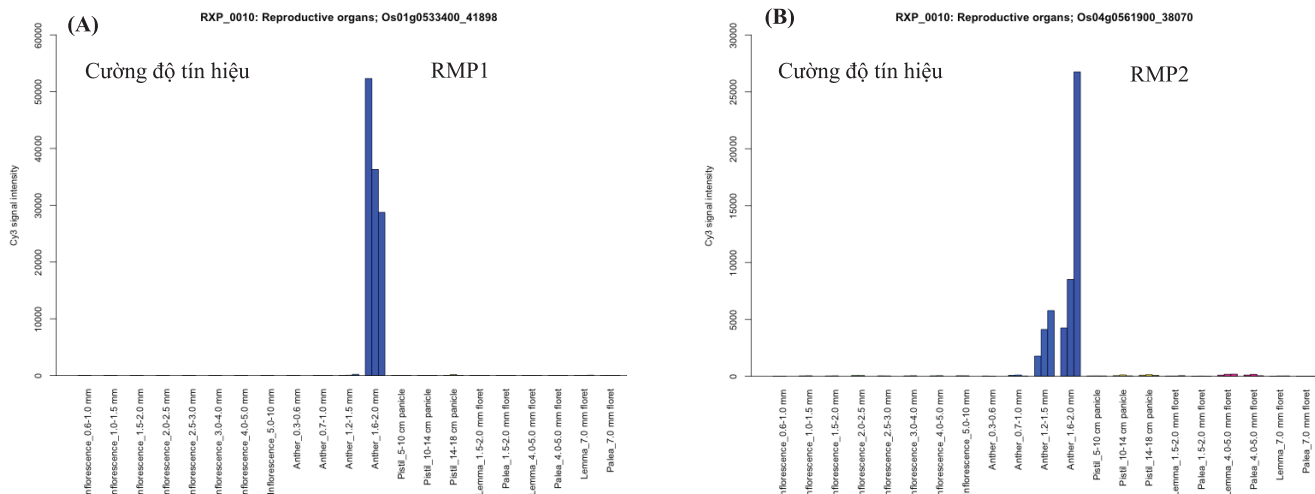
Bảng 1. Gen *RMP1* và *RMP2* sử dụng trong nghiên cứu.

Gen	Mã số trên NCBI	Sản phẩm gen mã hóa	Kích thước vùng điều hòa gen
<i>RMP1</i>	Os01g0533400	Glycoside hydrolase, family 35 protein	1.343 bp (-18 đến -1.360)
<i>RMP2</i>	Os04g0561900	Peptidase S9A, prolyl oligopeptidase family	754 bp (-97 đến -850)

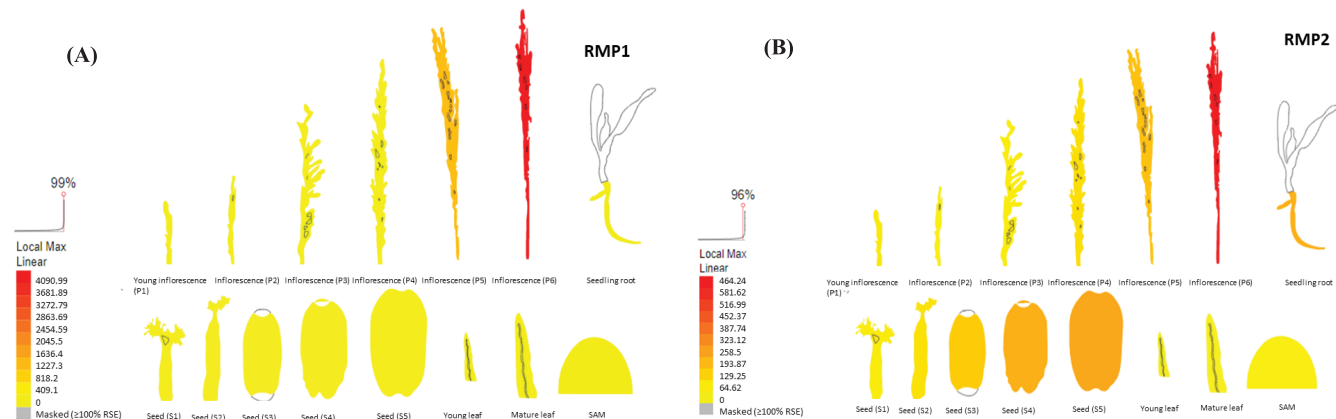
Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Biểu hiện của gen *RMP1* và *RMP2* ở hạt phấn

Kết quả phân tích database bằng phần mềm RiceXPro để kiểm tra biểu hiện gen ở các mẫu bao gồm mầm hoa, bao phấn, nhụy, vỏ trấu dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang Cy3 cho thấy hầu hết các mẫu mầm hoa, nhụy, vỏ trấu không có tín hiệu biểu hiện. Gen *RMP1* và *RMP2* bắt đầu biểu hiện khi bao phấn được hình thành, và biểu hiện mạnh nhất ở giai đoạn bao phấn có kích thước từ 1,5 đến 2,0 mm (hình 1). Đồng thời bằng phần mềm ePlant gen *RMP1* và *RMP2* được phân tích biểu hiện dựa trên bản đồ nhiệt ở các cơ quan sinh sản (mầm hoa, hạt) và cơ quan sinh dưỡng (lá, thân, rễ). Kết quả cho thấy, gen chỉ biểu hiện ở cơ quan sinh sản, đặc biệt là giai đoạn P5 và P6, gen không hoặc biểu hiện rất ít ở các cơ quan sinh dưỡng (hình 2).



Hình 1. Biểu hiện của gen *RMP1* (A) và *RMP2* (B) ở giai đoạn sinh sản hữu tính được phân tích bằng phần mềm RiceXPro thông qua tín hiệu huỳnh quang Cy3 (inflorescence: hoa; anther: bao phấn; pistil: nhụy; lemma: đỉnh vỏ trấu; palea: vỏ trấu dưới).



Hình 2. Mô phỏng biểu hiện của gen *RMP1* (A) và *RMP2* (B) ở cơ quan sinh sản bằng phần mềm eFP dựa trên biểu đồ nhiệt. Biểu đồ nhiệt thể hiện mức độ biểu hiện gen tăng dần từ màu vàng đến màu đỏ tương ứng với các giai đoạn phát triển của hoa (inflorescence P1-P5), hạt (seed S1-S5), lá non (young leaf), lá trưởng thành (mature leaf), rễ cây con (seedling root).

CRE phổ biến trên vùng promoter *RMP1* và *RMP2*

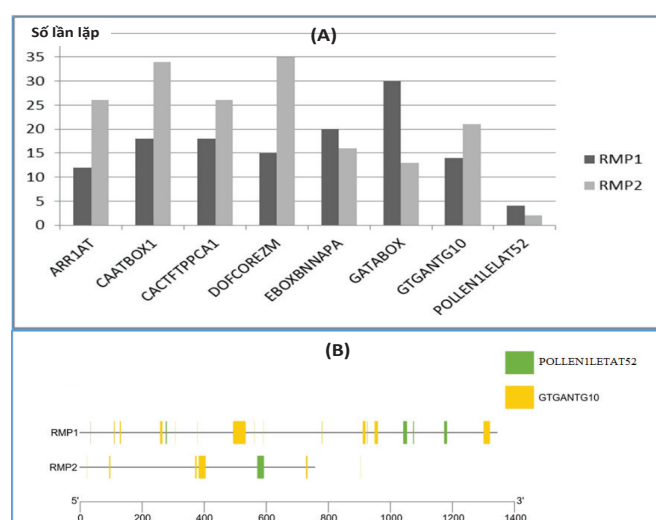
Kết quả phân tích cho thấy, có 80 CRE trên vùng promoter *RMP1* và 95 CRE trên vùng promoter *RMP2*. Các CRE xuất hiện với tần số và vai trò khác nhau trong điều hòa hoạt động của gen. Trong đó, có 6 CRE xuất hiện với tần số lớn từ 12 đến 35 lần (bảng 2, hình 3A). Các CRE tham gia vào các chức năng khác nhau như stress, hormon, biểu hiện gen... Trong đó, *ARR1AT* là yếu tố liên kết được tìm thấy trên các promoter của cây lúa và *Arabidopsis*. Sakai và cs (2000) [28] đã chứng minh *ARR1* và *ARR2* là các yếu tố phiên mã có vai trò điều hòa quá trình tổng hợp cytokinin. Trên trình tự promoter *RMP1* và *RMP2*, *ARR1AT* xuất hiện lần lượt 12 và 26 lần. *CAATBOX* chịu trách nhiệm kiểm soát hoạt động chuyên biệt ở mô của gen *LegA* ở cây đậu ngựa, đồng thời tham gia vào điều khiển quá trình ra hoa ở cây *Arabidopsis* [26, 29]. *DOFCEREZM* liên kết với

protein Dof tham gia điều hòa hoạt động của gen liên quan đến stress, tổng hợp hormon và biểu hiện đặc hiệu mô ở cây 1 và 2 lá mầm [30]. *DOFCEREZM* xuất hiện 15 và 35 lần trên promoter *RMP1* và *RMP2*. *GATABOX* tham gia điều hòa hoạt động đặc hiệu mô, kiểm soát mức độ biểu hiện gen [23]. *CACTFTPPCA1* là thành viên chính tham gia điều hòa hoạt động tổng hợp carbon ở tế bào trung bì (mesophyll). Sharma (2014) [31] đã phân tích promoter của 40 gen và nhận thấy *CACTFTPPCA1* là yếu tố phổ biến có mặt ở tất cả các promoter. Kết quả phân tích cho thấy, *CACTFTPPCA1* xuất hiện lần lượt 18 và 26 lần trên vùng promoter *RMP1* và *RMP2*. *EBOXBNNAPA* là yếu tố tham gia biểu hiện gen đặc hiệu ở mô của gen tổng hợp phenylpropanoid được chứng minh bởi Hartmann và cs (2005) [32]. Yếu tố này được phát hiện trên promoter của *RMP1* và *RMP2* với tần số lần lượt là 20 và 16. Đặc biệt, kết quả phân tích cho thấy hai yếu tố *GTGANTG10* và *POLLENILELAT52* kiểm soát

biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn và bao phấn đều có mặt trên promoter RMP1 và RMP2. Trong đó, GTGANTG10 xuất hiện với tần số 14 lần trên RMP1 và 21 lần trên RMP2, POLLEN1LELAT52 với tần số 4 lần trên RMP1 và 2 lần trên RMP2 (bảng 2, hình 3A). Đây là 2 motif quan trọng điều hòa hoạt động chuyên biệt hạt phấn được tìm thấy trên gen *g10* ở cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), *Lat56*, *Lat52* ở cây cà chua (*Lycopersicum esculentum*) [33, 34]. Vị trí phân bố của các motif này được thể hiện ở hình 3B.

Bảng 2. Danh sách các CRE phổ biến trên promoter RMP1 và RMP2.

TT	CREs	Trình tự (5'-3')	Tần số xuất hiện		Chức năng
			RMP1	RMP2	
1	ARR1AT	NGATT (N=G/A/C/T)	12	26	Yếu tố phiên mã điều hòa cytokinin [28]
2	CAATBOX1	CAAT	18	34	Điều hòa hoạt động ở mô, cơ quan [29]
3	CACTFTPPCA1	YACT (Y=T/C)	18	26	Yếu tố điều hòa đặc hiệu meiocytes [35]
4	DOFCOREZM	AAAG	15	35	Yếu tố phiên mã Dof1 và Dof2 tham gia biểu hiện gen tổng hợp carbon [31]
5	EBOXBNNAPA	CANNTG (N=A/G/C/T)	20	16	Biểu hiện đặc hiệu mô tổng hợp phenylpropanoids [35]
6	GATABOX	GATA	30	13	Hộp GATA, điều hòa biểu hiện đặc hiệu mô [36]
7	GTGANTG10	GTGA	14	21	Điều hòa hoạt động đặc hiệu ở hạt phấn cây thuốc lá [37]
8	POLLEN1LELAT52	AGAAA	4	2	Điều hòa hoạt động đặc hiệu ở hạt phấn cây cà chua [34, 38]



Hình 3. Tần số xuất hiện các CRE phổ biến (A) và vị trí phân bố của POLLEN1LELAT52 và GTGANTG10 (B) trên promoter RMP1 và RMP2.

Promoter chuyên biệt hạt phấn là công cụ hữu hiệu có thể sử dụng để điều khiển các gen liên quan đến quá trình phát triển của hạt phấn, như điều khiển quá trình tổng hợp môn tạo cây lúa bất dục đực hoặc nâng cao hiệu quả thụ phấn thụ tinh của cây [16]. Gần đây, biến đổi khí hậu đã gây ra các hiện tượng cực đoan đối với cây trồng, đặc biệt là nhiệt độ thấp và nắng nóng tác động lớn đến quá trình thụ phấn thụ tinh, từ đó làm giảm năng suất và sản lượng của cây. Nhiều nhà khoa học đã tìm cách nâng cao tính chống chịu của hạt phấn thông qua điều khiển các gen liên quan bằng các promoter chuyên biệt [27, 31, 32]. Từ các nghiên cứu trên cho thấy, promoter RMP1 và RMP2 có thể là một trong những công cụ hữu ích được sử dụng để điều khiển các gen liên quan đến hạt phấn trong công tác chọn tạo giống ở Việt Nam.

Kết luận

Kết quả phân tích cho thấy, gen *RMP1* và *RMP2* biểu hiện mạnh ở giai đoạn hình thành bao phấn kích thước từ 1,5 đến 2,0 mm. Vùng promoter gen *RMP1* và *RMP2* có chứa nhiều yếu tố điều hòa hoạt động CRE, RMP1 có chứa 80 CRE, RMP2 có 95 CRE. Trong đó, có 6 CRE phổ biến xuất hiện với tần số từ 12 đến 25 lần gồm ARR1AT, CAATBOX1, CACTFTPPCA1, DOFCOREZM, EBOXBNNAPA, GATABOX. Hai yếu tố phiên mã liên quan trực tiếp đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn GTGANTG10, POLLEN1LELAT52 xuất hiện với tần số 14, 4 và 21, 2 trên promoter RMP1 và RMP2. Để đánh giá vai trò của các CRE này cần tiến hành kết hợp phân tích vai trò của chúng thông qua các chỉ thị khác như GUS, GFP.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106.03-2017.19. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.T. Odell, et al. (1985), "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter", *Nature*, **6**, DOI: 10.1038/313810a0.
- [2] D. McElroy, et al. (1990), "Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation", *Plant Cell*, **2**, pp.163-171.
- [3] C.A. Christensen, et al. (1997), "Mega gametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the *Gf* mutant", *Sex Plant Reprod.*, **10**, pp.49-64.
- [4] T. Umezawa, et al. (2006), "Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, pp.113-122.
- [5] R. Satoh, et al. (2002), "ACTCAT, a novel *Cis*-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, **130**, pp.709-719.

- [6] R. Tayade, et al. (2018), "Effective strategies for enhancing tolerance to high-temperature stress in rice during the reproductive and ripening stages", *Plant Breed. Biotech.*, **6**, pp.1-18.
- [7] T.D. Nguyen, et al. (2019), "High daytime temperature induces male sterility with developmental defects in male reproductive organs of Arabidopsis", *Plant Biotechnol. Rep.*, **13**, pp.635-643.
- [8] M.J. Han, et al. (2006), "Rice immature pollen 1 (RIP1) is a regulator of late pollen development", *Plant Cell Physiol.*, **47**, pp.1457-1472.
- [9] R. Khurana, et al. (2013), "Spatial and temporal activity of upstream regulatory regions of rice anther-specific genes in transgenic rice and Arabidopsis", *Transgenic Res.*, **22**, pp.31-46.
- [10] R. Khurana, et al. (2013), "286 bp upstream regulatory region of a rice antherspecific gene, OSIPP3, confers pollen-specific expression in Arabidopsis", *Biotechnol. Lett.*, **35**, pp.455-462.
- [11] Q. Zhu, et al. (2017), "A lysM domain-containing gene OsEMSA1 involved in embryo sac development in rice (*Oryza sativa* L.)", *Front Plant Sci.*, **8**, DOI: 10.3389/fpls.2017.01596.
- [12] M. Wang, et al. (2020), "Identification of late-stage pollen-specific promoters for construction of pollen-inactivation system in rice", *Plant Rep. Biol.* DOI: 10.1111/jipb.12912.
- [13] H.J. Li, et al. (2020), "Grass-specific *EPAD1* is essential for pollen exine patterning in rice", *The Plant Cell*, **32**, pp.3961-3977.
- [14] S. Moritoh, et al. (2005), "RNAi-mediated silencing of OsGEN-L (OsGEN-like), a new member of the RAD2/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice", *Plant Cell Physiol.*, **46**, pp.699-715.
- [15] G. Nematzadeh, G. Kiani (2010), "Genetic analysis of fertility restoration genes for WA type cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18", *African J. Biotechnology*, **9**, pp.6273-6277.
- [16] H.K. Bae, et al. (2010), "Transgenic rice plants carrying RNA interference constructs of AOS (allene oxide synthase) genes show severe male sterility", *Plant Breeding*, **129**, pp.647-651.
- [17] S. Ijaz, et al. (2020), "Plant *Cis*-regulatory elements: methods of identification and applications", *Asian J. Agric. & Biol.*, **8**, pp.207-222.
- [18] K. Arnav, et al. (2019), "Interspersed 5' *Cis*-regulatory elements ascertain the spatio-temporal transcription of cytoskeletal profilin gene family in Arabidopsis", *Com. Biol. and Chem.*, **80**, pp.177-186.
- [19] G. Wang, et al. (2020), "Molecular dissection of *TaLTP1* promoter reveals functional *Cis*-elements regulating epidermis-specific expression", *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, DOI: 10.3390/ijms21072261.
- [20] R.Z. Naqvi, et al. (2016), "Role of plant promoters and their *cis* regulatory elements in gene expression regulation", *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, **1**, pp.347-352.
- [21] D. Twell, et al. (1998), "Asymmetric division and cell fate determination in developing pollen", *Trends Plant Science*, **3**, pp.305-310.
- [22] L. Swapna, et al. (2011), "Pollen specific expression of *Oryza sativa* indica pollen allergen gene (*OSIPA*) promoter in rice and Arabidopsis transgenic systems", *Mol. Biotechnol.*, **48**, pp.49-59.
- [23] Y.Z. Yue, et al. (2014), "Characterization of a novel anther-specific gene encoding a leucine-rich repeat protein in petunia", *Gen. Mol. Res.*, **13**, pp.9889-9898.
- [24] A. Kaur, et al. (2017), "In-silico analysis of *Cis*-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*", *PLOS ONE*, **12**, DOI: 10.1371/journal.pone.0184523.
- [25] H. Sharma, et al. (2018), "In-silico identification of *Cis*-acting regulatory elements in 5' regulatory region of Betaine aldehyde dehydrogenase isoenzymes of selected monocot and dicot", *Annals of Plant Sciences*, **7**, pp.2026-2036.
- [26] Y. Li, et al. (2020), "Identification of *Cis*-regulatory sequences controlling pollen-specific expression of hydroxyproline-rich glycoprotein genes in *Arabidopsis thaliana*", *Plants*, **9**, DOI: 10.3390/plants9121751.
- [27] T.D. Nguyen, et al. (2016), "Application of rice microspore-preferred promoters to manipulate early pollen development in Arabidopsis: a heterologous system", *Plant Reproduction*, **29**, pp.291-300.
- [28] H. Sakai, et al. (2000), "*Arabidopsis* *ARR1* and *ARR2* response regulators operate as transcriptional activators", *Plant J.*, **24**, pp.703-711.
- [29] S. Wenkel, et al. (2006), "CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*", *Plant Cell*, **18**, pp.2971-2984.
- [30] S. Yanagisawa (2000), "*Dof1* and *Dof2* transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize", *Plant J.*, **21**, pp.281-288.
- [31] K.D. Sharma (2014), "Pollen development under cold stress: a molecular perspective", *Austin J. Genet. Genomic. Res.*, **1**, p.4.
- [32] U. Hartmann, et al. (2005), "Differential combinatorial interactions of *Cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light responsive and tissue-specific activation of phenyl propanoid biosynthesis genes", *Plant Mol. Biol.*, **57**, pp.155-171.
- [33] N. Bate, D. Twell (1998), "Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage specific and co-dependent activator elements", *Plant Mol. Biol.*, **37**, pp.859-866.
- [34] S.A. Filichkin, et al. (2004), "A novel *endo-beta-mannanase* gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development", *Plant Physiol.*, **134**, pp.1080-1088.
- [35] U. Gowik, et al. (2004), "*Cis*-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene", *Plant Cell*, **16**, pp.1077-1090.
- [36] J.C. Reyes, et al. (2004), "The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice", *Plant Physiol.*, **134**, pp.1718-1732.
- [37] H.J. Rogers, et al. (2001), "Functional analysis of *Cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*", *Plant Mol. Biol.*, **45**, pp.577-585.
- [38] X. Liu, et al. (2013), "The rice *OsLTP6* gene promoter directs anther-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements", *Planta*, **238**, pp.845-857.