

玉米胚胎发生后期丰富蛋白基因的 启动子克隆与功能验证

邹郁陶, 刘 鑫, 牟 巍, 高学焕, 付凤玲, 李晚忱*

(四川农业大学 玉米研究所, 成都 611130)

摘 要: 该研究在生物信息学分析的基础上, 克隆玉米胚胎发生后期丰富蛋白基因 (*MGL3*) 的启动子序列 (*pMGL3*), 进行非生物逆境应答元件分析以及实时定量 PCR 验证其非生物逆境胁迫响应特性, 构建了 *pMGL3* 启动子驱动报告基因 (*GUS*) 表达载体, 基因枪法转化玉米愈伤组织, 通过 GUS 染色验证 *pMGL3* 启动子在非生物逆境胁迫下的驱动活性。再根据启动子序列分析结果, 去除不同的顺式作用元件, 构建不同长度 *pMGL3* 启动子驱动报告基因 *GUS* 表达载体, 农杆菌介导法转化烟草叶盘, 以确定 *pMGL3* 启动子的最短活性序列。结果显示: *pMGL3* 启动子长 1 554 bp, 存在多种与非生物逆境胁迫应答相关的调控元件, 在干旱、高盐、低温胁迫及脱落酸、乙烯诱导下驱动 *MGL3* 基因增量表达, 用以驱动 *GUS* 基因转化玉米愈伤组织, 在高渗、高盐、低温胁迫及脱落酸诱导下具有驱动活性, 且截短至 325 bp 仍可保持驱动活性。研究表明, *pMGL3* 启动子的确有非生物逆境诱导启动活性, 进一步验证其作用机理后可运用于玉米抗逆转基因研究。

关键词: 非生物胁迫; 胚胎发生后期丰富蛋白; 玉米; 启动子

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Cloning and Functional Validation of Late Embryogenesis Abundant Protein Gene Promoter from Maize

ZOU Yutao, LIU Xin, MU Wei, GAO Xuehuan, FU Fengling, LI Wanchen*

(Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: It has important significance for transgenic resistance research to clone and validate endogenous inducible promoters in response to abiotic stresses, and use to construct inducible expression vectors. In this study, the sequence of the late embryogenesis abundant late gene (*MGL3*) promoter (*pMGL3*) was cloned from maize according to bioinformatics analysis. After analysis for abiotic stress-responsive elements and abiotic response by quantitative real-time PCR, we used this sequence to construct expression vector of the reporter gene *GUS*, and used to transform maize calli by biolistic method. The promotion activity of the *pMGL3* promoter under abiotic stress was validated by GUS staining. In addition, the different *cis*-acting elements was removed according to promoter sequence analysis, used to construct expression vectors of the reporter gene *GUS*, and transform tobacco discs by *Agrobacterium* mediation, in order to determine the shortest active sequence of the *pMGL3* promoter. The results showed that the *pMGL3* promoter is 1 554 bp long, containing multiple regulatory elements in response to abiotic stress. The expression of the *MGL3* gene is increased under the stress of drought, high salt and low temperature, and induction of abscisic acid and ethylene. The calli transformed by the *GUS* gene under control of the *pMGL3* promoter showed promotion activity under high osmotic, high salt, low temperature stresses, and abscisic acid induction. However,

收稿日期: 2014-11-26; 修改稿收到日期: 2015-01-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31071433)

作者简介: 邹郁陶 (1990—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事玉米遗传育种与生物技术研究。E-mail: 457510642@qq.com

* 通信作者: 李晚忱, 教授, 主要从事玉米遗传育种与生物技术研究。E-mail: aumdyms@sicau.edu.cn

it kept promotion activity when truncated to as short as 325 bp. These results indicated that the *pMGL3* promoter has promotion activity in response to abiotic stresses, and can be applied to maize transgenic studies for abiotic tolerance after further validation for its mechanism.

Key words: abiotic stress; late embryogenesis abundant protein; maize; promoter

近年来,人类活动和气候变化等引起的非生物胁迫愈加严重,已成为中国及世界许多地区作物生产的主要限制因素^[1]。耐旱、耐盐碱等对非生物逆境的抗性一直是常规玉米育种的重要目标性状。虽然不同玉米种质对非生物逆境的抗性存在明显差异,但其遗传性质较为复杂,多年来遗传改良的进展不大,难以满足玉米生产对品种抗逆性的要求^[2-4]。转基因技术可转化利用外源抗性基因,是改良玉米非生物逆境抗性的有效途径^[5-9]。然而,在以往的转基因研究中,多采用 *ubiquitin*、*CaMV35S* 等组成型强启动子驱动外源基因的表达。虽然抗逆性得以改良提高,但外源抗逆基因的持续表达,过量消耗植物营养和能源,又会阻碍植物的正常生理代谢,致使非胁迫条件下的生长发育受到制约,限制了产量潜力的进一步发挥^[10-13]。转而改用诱导型启动子,只在逆境胁迫时才驱动外源抗性基因表达,渡过逆境后又恢复正常,就可降低外源基因过量表达造成的适应性代价^[14]。而且还有研究表明,用内源诱导型启动子的驱动率往往比外源诱导型启动子要高^[15-17]。

因此,要很好地发挥外源基因在非生物逆境抗性转基因玉米种质培育中的作用,除对外源基因本身的功能选择外,还应注重选择适当的内源诱导型启动子,既可在逆境胁迫条件下适当驱动外源抗性基因的表达,提高玉米对非生物逆境的抗性,又可在非胁迫条件下降低外源基因过量表达造成的适应性代价。因为玉米功能基因组研究比拟南芥和水稻等模式植物滞后,除发现胚胎发生后期丰富蛋白基因 *rab17* 和转录因子基因 *Vp1* (*Viviparous 1*) 的启动子响应脱落酸诱导^[18-19],磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶基因 *ZmPEAMT* 的启动子区域存在高盐、高温应答元件^[20],抗病基因 *ZmRXO1* 的启动子区域存在茉莉酸、赤霉素和脱落酸应答元件,可在非生物逆境胁迫条件下驱动下游基因的表达而外^[21],鲜有关于玉米内源非生物逆境诱导启动子克隆及功能验证方面的报道。

胚胎发生后期丰富蛋白(LEA)可在脱水、高渗和低温等非生物逆境胁迫下保护细胞内其他蛋白的活性^[22-30]。其中,尤以第3亚家族的 LEA 蛋白的这种保护作用最为明显^[27-30]。转化利用 LEA 蛋白的

编码基因,可以提高植物对非生物逆境的抗性^[8-9]。而且,LEA 蛋白编码基因的启动子对各种非生物逆境胁迫也有应答,可在植物转基因操作中用以驱动其他抗逆基因的逆境诱导表达^[31-32]。本研究在前人研究的基础上^[22,26],先用实时定量 PCR(qRT-PCR)验证玉米 LEA 蛋白第3亚家族一个成员的编码基因 *MGL3* 在非生物逆境胁迫下的诱导表达,然后对其上游序列作启动子分析,并克隆其启动子 *pMGL3*,用以构建驱动报告基因 *GUS* 的表达载体,基因枪法转化玉米愈伤组织。通过愈伤组织的 *GUS* 荧光值与荧光素酶(LUC)发光值的比值 *GUS/LUC*,评价 *pMGL3* 启动子在非生物逆境胁迫及激素诱导条件下的驱动活性,以期能为抗逆转基因玉米研究提供更多的选择。

1 材料和方法

1.1 实验材料

为验证 *pMGL3* 启动子对非生物逆境胁迫的响应,先在各种不同的非生物胁迫及激素诱导条件下,qRT-PCR 检测 *MGL3* 基因的差异表达。取玉米自交系‘178’种子,10% NaClO 消毒后发芽至二叶期,用改良 Hoagland 营养液培养至四叶期^[33],分别用 16% 聚乙二醇 6000(PEG-6000)模拟干旱^[34]和高盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl)处理 72 h,低温(4℃)和高温(42℃)处理 24 h,以及 100 μmol·L⁻¹ 脱落酸(ABA)和 100 μmol·L⁻¹ 乙烯利诱导 24 h,3 次重复。在模拟干旱、高盐处理的 0、12、24、48、72 h,以及低温、高温处理和 ABA、乙烯利诱导的 0、2、6、12、24 h 取样,用 Trizol 试剂盒(TaKaRa,大连)提取总 RNA,再用 PrimeScript™ 试剂盒(TaKaRa,大连)反转录成 cDNA,稀释 5 倍后作 qRT-PCR 模板。

1.2 非生物胁迫处理与 qRT-PCR 检测

根据玉米 LEA 蛋白第3亚家族成员 *MGL3* (GenBank 登录号 NP_001105298)对应的 mRNA 序列(GenBank 登录号 NM_001111828)^[22,26],用 Primer 6.0 软件(<http://www.premierbiosoft.com>)设计特异 PCR 引物(5'-GACCCTGTTTGCT-TGTTC-3'/5'-ACACTTGATGACGCAGAA-3'),生工生物工程公司(上海)合成。以玉米 18S 基因

作内参,10 μL 反应体系包括:荧光染料 SsoFast EvaGreen supermix(Bio-Rad,美国)5.0 μL 、上下游引物($10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL 和稀释后的 cDNA 模板 1.0 μL 。在 CFX96 定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国)进行反应。反应程序为:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 s,60.2 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,循环 44 次。然后,以每步 0.5 $^{\circ}\text{C}/0.01 \text{ s}$ 速度升高至 95 $^{\circ}\text{C}$,绘制熔解曲线。采用双标准曲线法对 MGL3 基因的表达水平进行相对定量测定,计算不同胁迫或诱导时间 MGL3 基因表达量相对于 0 h 对照的倍数。

1.3 启动子序列分析与克隆

以玉米 LEA 蛋白第 3 亚家族成员 MGL3 对应的 mRNA 序列为探针^[22,26],与玉米自交系‘B73’基因组 RefGen_v3 版本(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>)序列比对,定位 MGL3 基因在基因组中的物理位置。用启动子分析软件 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),查找编码序列上游 1 500 bp 以内的 CAAT 与 TATA 框等重要启动子序列特征,预测 *pMGL3* 启动子序列,并分析其中与非生物胁迫应答相关的顺式作用元件。

根据预测结果,用 Primer 6.0 软件(<http://www.premierbiosoft.com>)设计特异 PCR 引物(5'-AAGCTTGAAGTCTCGACCTCAGGATAACTC-3'/5'-GGATCCGGCAGCAGGGTCTCTCAAG-3'),并引入载体构建所需要的限制性内切酶 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ的识别位点(括号中下划线部分)。以玉米自交系‘B73’的基因组 DNA 为模板,用高保真 DNA 聚合酶 PCR 扩增 *pMGL3* 启动子序列。20 μL 反应体系包括:PCR 缓冲液 SxPrimerSTAR (Mg^{2+})4 μL ,dNTP 1.64 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,玉米自交系‘B73’基因组 DNA 1 μL ,DNA 聚合酶 PrimerSTAR HS 0.2 μL ,ddH₂O 至 20 μL 。PCR 反应程序为:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,回收纯化 1 500 bp 左右的目的片段。

1.4 瞬时表达载体构建与玉米愈伤组织转化

用限制性内切 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ分别双酶切上述回收纯化的 PCR 扩增产物和单子叶植物瞬时表达载体 pBI221-*Ubi*-GUS^[35],琼脂糖凝胶电泳分离,回收、纯化 *pMGL3* 启动子序列和去除组成型启动子 *Ubi* 序列的表达载体片段,用 T₄ DNA 连接酶(TaKaRa,大连)连接,构建 *pMGL3* 启动子驱动报

告基因 *GUS* 的瞬时表达载体 pBI221-*pMGL3*-*GUS* (图 1),热激法转化大肠杆菌 DH5 α 菌株的感受态细胞,经氨苄青霉素抗性培养基上筛选后扩大培养,菌液 PCR 和 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ双酶检测后,送生物工程公司(上海)测序验证。

取浓度为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 瞬时表达载体 pBI221-*pMGL3*-*GUS* 质粒 DNA 3 μL ,并以单子叶植物组成型启动子 *Ubi* 驱动荧光素酶基因 *LUC* 的表达载体 *pUbi*-*LUC* 为内参,以消除愈伤组织间基因枪转化率的差异。加入 20 μL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺和 50 μL $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 ,沉淀到 3 mg 直径 60 μm 的金粉(金粉·甘油=60 mg·mL⁻¹)上,用乙醇和无菌蒸馏水反复洗涤,涡旋震荡并用色谱级 140 μL 70%乙醇洗涤后,加入 60 μL 无水乙醇,涡旋震荡 1 min 并用超声波处理 3~5 s 使金粉分散悬浮。在 DuPont PDS1000/He 型基因枪上,以 1 100 psi 系统压力和 70 cm 汞柱真空度,每枪 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ (质粒/金粉),转化在 N6 高渗培养基上预培养 4 h 的玉米胚性愈伤组织各 10 皿^[36],每皿 100 块愈伤组织。

1.5 GUS 染色检测

将转化后的愈伤组织转接到 N6 继代培养基上,27 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 2 d 后,选大小和形态基本一致的愈伤组织各 15 皿,每皿 60 块愈伤组织,分别实施高渗(8%甘露醇)、高盐($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)、低温(4 $^{\circ}\text{C}$)处理和 ABA($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导 24 h。每处理 3 皿,其余 3 皿作空白对照。处理结束后,用 Jefferson 等^[37]的方法染色,解剖显微镜下观察照像。

1.6 5'-端缺失实验

为确定 *pMGL3* 启动子具有启动活性的最短序列,根据启动子序列分析结果设计 6 对 PCR 引物 F1/R1、F1/R2、F2/R1、F3/R1、F4/R1 和 F5/R2,以玉米自交系‘B73’基因组 DNA 为模板,分别扩增

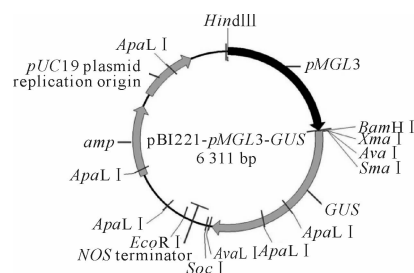


图 1 *pMGL3* 启动子驱动报告基因 *GUS* 表达载体(pBI221-*pMGL3*-*GUS*)

Fig. 1 Expression vector for reporter gene *GUS* under control of *pMGL3* promoter

pMGL3 启动子序列全长的 1 554 bp 片段、增加 5'-端非编码序列 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 的 1 720 bp 片段, 以及去除不同非生物胁迫应答元件的 1 129、690、429 和 325 bp 片段, 通过相应的酶切连接取代包含双子叶植物增强子 *AtADH* 5'-UTR 的表达载体 pRI201-AN-GUS (TaKaRa, 大连) 中的 35S 启动子 (图 2), 并以组成型强启动子 *ubiquitin* 为对照, 构建瞬时表达载体, 农杆菌介导法转化大叶烟草品种 'Wisconsin 38' 叶盘, 经筛选鉴定后分化培养愈伤组织, GUS 染色鉴定上述截短片段是否能够驱动 *GUS* 基因表达。

2 结果与分析

2.1 *MGL3* 基因在非生物逆境胁迫下诱导表达

对 qRT-PCR 结果的方差分析表明, 在模拟干旱胁迫初期 (0~24 h), *MGL3* 基因表达水平与 0 h 空白对照无差异, 但在 48 h 时有一表达高峰, 72 h 后下降 (图 3)。在高盐胁迫下, *MGL3* 基因的表达从 12 h 开始上升, 24 h 达到高峰, 随后下降 (图 3)。在低温胁迫下, *MGL3* 基因表达的高峰出现在 6 h, 其他时间段与 0 h 空白对照无显著差异 (图 4)。在 ABA 和乙烯诱导下, *MGL3* 基因表达的高峰分别出现在 6 h 和 2 h, 其余时间段与 0 h 空白对照的差异不显著 (图 4)。结果表明, *MGL3* 基因的表达响应多种非生物逆境胁迫, 其启动子 *pMGL3* 很可能具有非生物逆境启动活性。

2.2 *pMGL3* 启动子序列

以玉米 LEA 蛋白第 3 亚家族成员 *MGL3* 对应的 mRNA 序列为探针, 与玉米自交系 "B73" 基因组 RefGen_v3 版本序列比对, 将 *MGL3* 基因定位于第 6 染色体 Chr6: 162162323~162163588, 与此段基因组序列的一致性为 100%。用 PlantCARE 软件

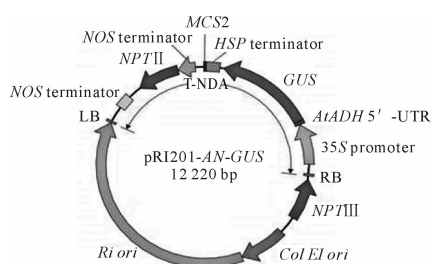


图 2 包含双子叶植物增强子 *AtADH* 5'-UTR 的表达载体 (pRI201-AN-GUS)

Fig. 2 Expression vector containing dicotyledonous enhancer *AtADH* 5'-UTR

对其编码序列上游 1 500 bp (Chr6: 162160979~162162478) 启动子序列分析表明, 除 TATA 框等启动子序列的基本元件外, 还包括 MYB 结合位点 MBS、脱水应答元件 ABRE 及 ARE 等多种响应非生物逆境胁迫的顺式作用元件 (图 5、表 1)。

2.3 逆境胁迫下 *pMGL3* 驱动 *GUS* 基因瞬时表达

根据启动子序列分析设计的特异 PCR 引物, 以玉米自交系 'B73' 基因组 DNA 为模板, 扩增得到的片段约长 1 500 bp (图 6), 实际测序结果为 1 554 bp, 与预测结果相符合。

扩增片段经 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切后插入单子叶植物表达载体 pBI221-*Ubi*-*GUS*, 构建成 *MGL3* 基因启动子驱动 *GUS* 基因的表达载体 pBI221-*pMGL3*-*GUS*, 转化大肠杆菌感受态细胞, 经菌液 PCR 检测挑阳性克隆扩大培养, 再经 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切鉴定 (图 7) 和测序验证, 与预期相符。

用表达载体 pBI221-*pMGL3*-*GUS* 基因枪法转化玉米胚性愈伤组织, 在 8% 甘露醇高渗、200 mmol·L⁻¹ NaCl 高盐和 4 °C 低温胁迫及 100 mol·L⁻¹ ABA 诱导条件下, GUS 染色均可显现靛蓝色斑点,

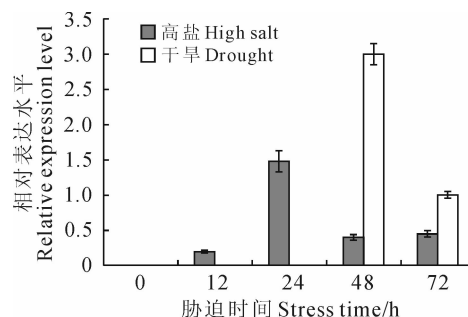


图 3 *MGL3* 基因在干旱和高盐胁迫下的差异表达

Fig. 3 Differential expression of *MGL3* gene under drought and high salt stresses

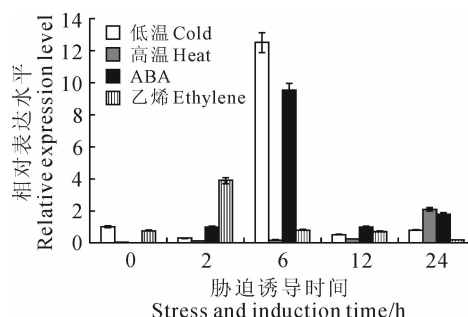


图 4 *MGL3* 基因在低温、高温胁迫和 ABA、乙烯诱导下的差异表达

Fig. 4 Differential expression of *MGL3* gene under cold and heat stresses, and ABA and ethylene induction

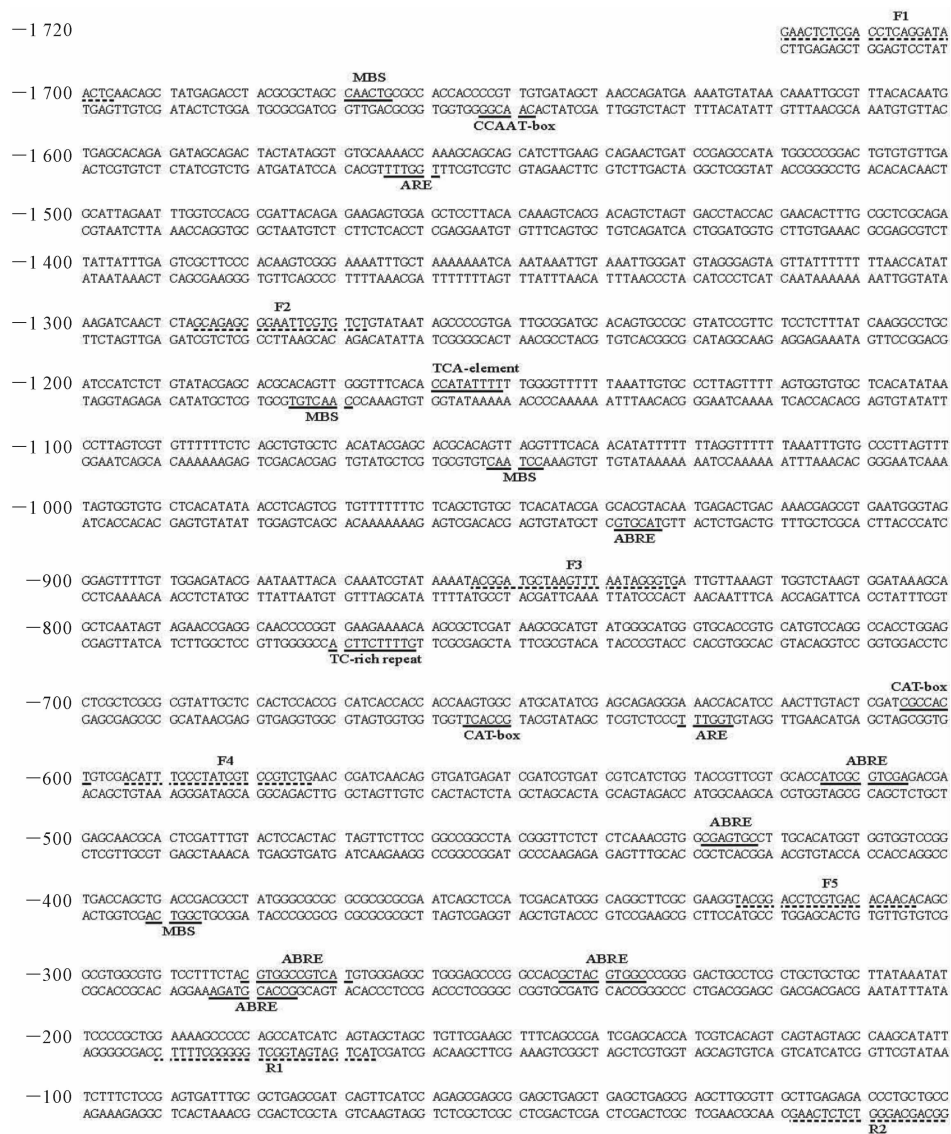


图 5 玉米 *MGL3* 基因启动子序列及其非生物逆境胁迫应答元件

下划实线表示非生物逆境胁迫应答元件,下划虚线表示截短引物

Fig. 5 Promoter sequence of maize *MGL3* gene and abiotic stress-responsive elements

The abiotic stress-responsive elements are underlined by solid lines,and the truncation primers are underlined by dotted lines

表 1 玉米 *MGL3* 基因启动子的非生物逆境胁迫应答元件

Table 1 Abiotic stress-responsive elements in promoter of maize *MGL3* gene

元件 Element	参考物种 Reference species	核心序列 Core sequence	定位 Location	功能 Function
ABRE	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	TACGTG ACGTGGC	−939、−285、−281、−245 bp	ABA 应答 ABA response
ABRE	大麦 Barley	GCCACGTACA CGTACGTGCA CCTACGTGGC	−515、−429 bp	ABA 应答 ABA response
ARE	玉米 Maize	TGGTTT	−1565、−631 bp	增强厌氧诱导 Enhanced anaerobic induction
CAT-box	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	GCCACT	−656、−606 bp	分生组织表达 Meristem expression
CCAAT-box	大麦 Barley	CAACGG	−1654 bp	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
MBS	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	CAACTG/TAAC TG	−1670、−1 176、−1 053 bp	MYB 结合位点 MYB binding site
MBS	玉米 Maize	CGGTCA	−392 bp	MYB 结合位点 MYB binding site
TC-rich repeat	烟草 Tobacco	ATTTTCTTCA	−771 bp	防卫和胁迫响应 Defense and stress response
TCA-element	烟草 Tobacco	CCATCTTTTT	−1 160 bp	水杨酸反应 Salicylic acid reaction

而空白对照没有显现(图 8),说明 *pMGL3* 启动子的确有非生物逆境诱导启动功能。

2.4 保持启动活性的截短片段

瞬时表达载体转化烟草愈伤组织的 GUS 染色结果表明,5'端截短不同长度的 *pMGL3* 启动子片段,均能驱动 GUS 的表达,愈伤组织呈现靛蓝色斑点(图 9)。一直截短至 325 bp 仍可保持 *pMGL3* 启

动子的驱动活性。由此说明,这 325 bp 上游的非生物逆境胁迫应答元件,虽然可能响应胁迫诱导而增强 *pMGL3* 启动子的活性,但并不是保持驱动活性所必需的。

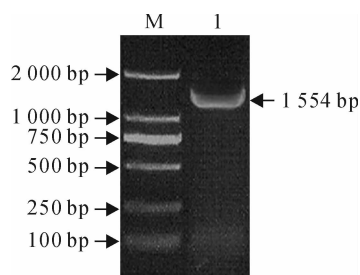


图 6 *MGL3* 基因启动子扩增片段

M. DL2000; 1. *pMGL3* 启动子

Fig. 6 Amplified fragment of maize *MGL3* gene promoter

M. DL2000; 1. *pMGL3* promoter

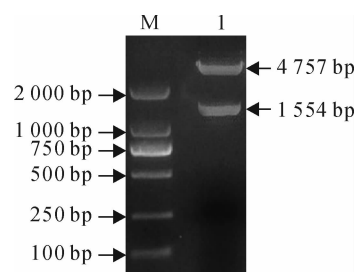


图 7 表达载体 *pBI221-pMGL3-GUS* 酶切鉴定

M. DL2000; 1. 表达载体 *pBI221-pMGL3-GUS* 经 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*H I 双酶切片段

Fig. 7 Enzyme digestion of expression vector

pBI221-pMGL3-GUS

M. DL2000; 1. Expression vector *pBI221-pMGL3-GUS* digested by *Hind*Ⅲ and *Bam*H I

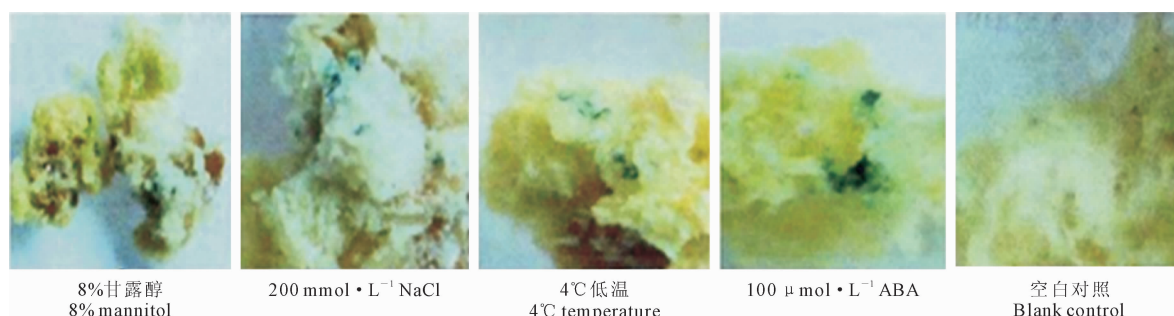


图 8 *pBI221-pMGL3-GUS* 转化玉米愈伤组织 GUS 染色

Fig. 8 GUS staining of maize calli transformed by *pBI221-pMGL3-GUS*

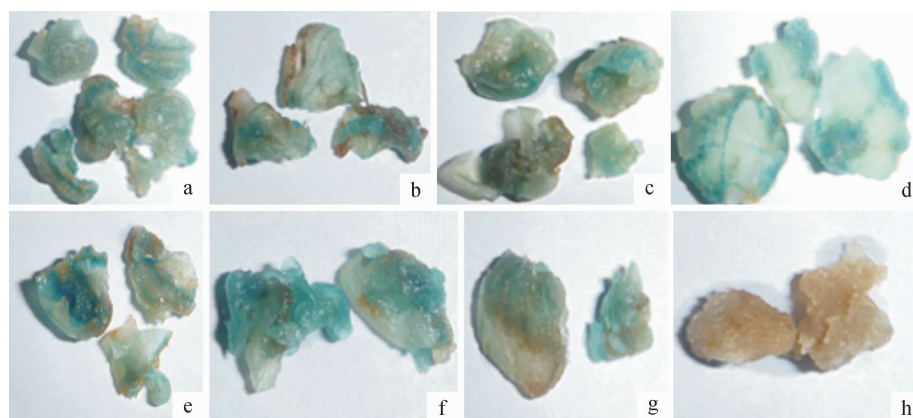


图 9 *pMGL3* 启动子不同长度截短片段驱动 *GUS* 基因转化烟草愈伤组织 GUS 染色

a~f. 分别为 1720、1554、1129、690、429 和 325 bp 片段;g. *Ubiquitin*;h. 空白对照

Fig. 9 GUS staining of tobacco calli transformed by *GUS* gene under control of promoter *pMGL3* with different length deletion

a~f. 1720, 1554, 1129, 690, 429 and 325 bp fragments, respectively;g. *Ubiquitin*;h. Blank control

3 讨 论

PlantCARE 分析结果表明, *pMGL3* 启动子含有 ABRE、ARE、MBS、TC-rich repeat 等顺式作用元件。这些元件的非生物逆境应答特性在以往的研究中已有较多的报道。譬如, ABRE 元件与高盐胁迫^[22-23]、干旱胁迫和 ABA 诱导相关^[38], ARE 与厌氧应答相关^[39], MBS 元件与干旱等多种非生物逆境胁迫相关^[38,40], TC-rich repeat 与防卫和胁迫有关^[41-42], TCA-element 参与水杨酸反应^[42-43] 等等。

在本研究中,根据序列中非生物逆境顺式作用元件分析结果,将 *pMGL3* 启动子截短至 325 bp 仍可保持其驱动活性,还不能说明是否为 *pMGL3* 启动子保持驱动活性的最短片段,而只说明那些与非生物逆境胁迫应答相关的顺式作用元件只起基因表达强度的调控作用,而不起开关的决定性作用。棉花胚胎发生后期丰富蛋白基因 *D113* 启动子 5' 端截短实验的结果也表明,保持非生物逆境响应及驱动活性的最短序列在 158 至 574 bp 之间^[44]。有研究表明,不同来源的胚胎发生后期丰富蛋白基因启动子,对非生物逆境的响应及驱动活性不尽相同。譬

如,大麦胚胎发生后期丰富蛋白基因启动子 *Dhn4s* 的驱动活性是来自大麦和水稻同源启动子 *HVA1s* 和 *wsil8j* 的 2 倍,是来自水稻同源启动子 *rab16Bj* 的 17 倍^[45]。要明确这些非生物逆境胁迫应答相关顺式作用元件对基因表达强度的具体调控作用,更需要对其驱动基因表达做定量分析。本研究的定量 PCR 分析结果能够从整体上说明这一问题,但截短去除不同顺式作用元件后的 *pMGL3* 启动子片段驱动 *GUS* 基因转化烟草愈伤的 GUS 染色,只能定性地说明各种不同长度的截短片段仍保持其驱动活性,不能说明驱动活性的定量变化。

在模式植物上的研究表明,胚胎发生后期丰富蛋白基因的启动子可响应多种非生物逆境胁迫的诱导,驱动抗逆相关基因的表达^[46-47]。本研究克隆的玉米胚胎发生后期丰富蛋白基因 *MGL3* 的启动子 *pMGL3*,存在多种与非生物逆境胁迫应答相关的调控元件,可响应干旱、高盐、低温等多种非生物逆境胁迫和激素诱导,驱动下游基因的表达。进一步研究验证其作用机理后,可为抗逆转基因玉米研究提供更多的选择。

参考文献:

- [1] TAMBO J A, ABDOULAYE T. Climate change and agricultural technology adoption; the case of drought tolerant maize in rural Nigeria [J]. *Mitigation and Adaption Strategies for Global Change*, 2012, **17**(3): 277—292.
- [2] FU F L, FENG Z L, GAO S B, *et al.* Evaluation and quantitative inheritance of several drought-relative traits in maize [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2008, **7**(3): 280—290.
- [3] LU Y, HAO Z, XIE C, *et al.* Large-scale screening for maize drought resistance using multiple selection criteria evaluated under water-stressed and well-watered environments [J]. *Field Crop Research*, 2011, **124**(1): 37—45.
- [4] NEUMANN P M. Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments [J]. *Annals of Botany*, 2008, **101**(7): 901—907.
- [5] GILMOUR S J, SEBOLT A M, SALAZAR M P, *et al.* Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation [J]. *Plant Physiology*, 2000, **124**(4): 1 854—1 865.
- [6] KARIM S, ARONSSON H, ERICSON H, *et al.* Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, **64**(4): 371—386.
- [7] TAO D, MU Y, FU F L, *et al.* Transformation of maize with trehalose synthase gene cloned from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology*, 2008, **7**(2): 258—265.
- [8] GANGULY M, DATTA K, ROYCHOUDHURY A, *et al.* Overexpression of *Rab16A* gene in *Indica* rice variety for generating enhanced salt tolerance [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, **7**(4): 502—509.
- [9] AMARA I, CAPELLADES M, LUDEVID M D, *et al.* Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing *LEA Rab28* gene [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, **170**(9): 864—873.
- [10] VAUCHERET H, BECLIN C, ELMAYAN T, *et al.* Transgene-induced gene silencing in plants [J]. *Plant Journal*, 1998, **16**(6): 651—659.
- [11] MALNOY M, REYNOIRD J P, BOREJSZA-WYSOCKA E E, *et al.* Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus × domestica*) [J]. *Transgenic Research*, 2006, **15**(1): 83—93.
- [12] KARIM S, ARONSSON H, ERICSON H, *et al.* Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing

- trehalose[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, **64**(4):371—386.
- [13] KARABA A, DIXIT S, GRECO R, *et al.* Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene[J]. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(39): 15 270—15 275.
- [14] KASUGA M, LIU Q, MIURA S, *et al.* Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**(3):287—291.
- [15] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, MINO M, MUNDY J, *et al.* Analysis of an ABA-responsive rice gene promoter in transgenic tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, **15**(6):905—912.
- [16] ONO A, IZAWA T, CHUA NH, *et al.* The *rab16B* promoter of rice contains two distinct abscisic acid-responsive elements[J]. *Plant Physiology*, 1996, **112**(2):483—491.
- [17] RAI M, HE C, WU R. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice[J]. *Transgenic Research*, 2009, **18**(5):787—799.
- [18] BUCHANAN CD, KLEIN PE, MULLET JE. Phylogenetic analysis of 5'-noncoding regions from the ABA-responsive *rab16/17* gene family of sorghum, maize and rice provides insight into the composition, organization and function of *cis*-regulatory modules[J]. *Genetics*, 2004, **168**(3):1 639—1 654.
- [19] CAO X, COSTA LM, BIDERRE-PETIT C, *et al.* Abscisic acid and stress signals induce *Viviparous 1* expression in seed and vegetative tissues of maize[J]. *Plant Physiology*, 2007, **143**(2):720—731.
- [20] WU S, YU Z, WANG F, *et al.* Cloning, characterization, and transformation of the phosphoethanolamine N-methyltransferase gene (*Zm-PEAMT1*) in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Molecular Biotechnology*, 2007, **36**(2):102—112.
- [21] TAO Y, WANG F, JIA D, *et al.* Cloning and functional analysis of the promoter of a stress-inducible gene (*ZmRXO1*) in maize[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, **33**(2):200—208.
- [22] WHITE CN, RIVIN CJ. Sequence and regulation of a late embryogenesis abundant group 3 protein of maize[J]. *Plant Physiology*, 1995, **108**(3):1 337—1 338.
- [23] HUNDERTMARK M, HINCHA D K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Genomics*, 2008, **9**:118.
- [24] DALAL M, TAYAL D, CHINNUSAMY V, *et al.* Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, **139**(2):137—145.
- [25] REDDY P S, REDDY G M, PANDEY P, *et al.* Cloning and molecular characterization of a gene encoding late embryogenesis abundant protein from *Pennisetum glaucum*: protection against abiotic stresses[J]. *Molecular Biology Reporter*, 2012, **39**(6):7 163—7 174.
- [26] AMARA I, ODENA A, OLIVEIRA E, *et al.* Insights into maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2012, **53**(6):312—329.
- [27] LIU Y, WANG L, XING X, *et al.* ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses[J]. *Plant Cell Physiology*, 2013, **54**(6):944—959.
- [28] THOMANN E B, SOLLINGER J, WHITE C, *et al.* Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos [J]. *Plant Physiology*, 1992, **99**(2):607—614.
- [29] YU J N, ZHANG J S, SHAN L, *et al.* Two new group 3 LEA genes of wheat and their functional analysis in yeast[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, **47**(11):1 372—1 381.
- [30] BATTAGLIA M, OLVERA-CARRILLO Y, GARCIAARRUBIO A, *et al.* The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins[J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(1):6—24.
- [31] LUO K M, GUO Y L, XIAO Y H, *et al.* Cloning and characterization of *D-113* gene promoter from cotton[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2002, **29**(2):161—165.
- [32] LIU F(刘 峰), WANG X D(汪小东), ZHAO Y P(赵彦鹏), *et al.* Isolation and functional characterization of the seed-specific promoter of LEA gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Cotton Science*(棉花学报), 2014, **26**(4):310—317(in Chinese)
- [33] SMITH G S, JOHNSTON C M, CORNFORTH I S. Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture[J]. *New Phytologist*, 1983, **94**(4):537—548.
- [34] MICHEL B E, KAUFMANN M R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000[J]. *Plant Physiology*, 1973, **51**(5):914—916.
- [35] CHEN P Y, WANG C K, SOONG S C, *et al.* Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants[J]. *Molecular Breeding*, 2003, **11**(4):287—293.
- [36] FU F L, HE J, ZHANG Z Y, *et al.* Further improvement of N6 medium for callus induction and plant regeneration from maize immature embryos[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, **10**(14):2 618—2 624.
- [37] JEFFERSON R A, BURGESS S M, HIRSEH D. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker[J]. *The Proceedings of National Academy of Sciences in the United States of America*, 1986, **83**(22):8 447—8 451.

- [38] SEKI M, NARUSAKA M, ISHIDA J, *et al.* Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. *Plant Journal*, 2002, 31: 279–292.
- [39] GALLO-EBERT C, DONIGAN M, LIU H Y, *et al.* The yeast anaerobic response element *AR1b* regulates aerobic antifungal drug-dependent sterol gene expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(49): 35 466–35 477.
- [40] LI PC, YU SW, SHEN J, *et al.* The transcriptional response of apple alcohol acyltransferase (*MdAAT2*) to salicylic acid and ethylene is mediated through two apple MYB TFs in transgenic tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 85(6): 627–638.
- [41] GERMAIN H, LACHANCE D, PELLETIER G, *et al.* The expression pattern of the *Picea glauca* *Defensin 1* promoter is maintained in *Arabidopsis thaliana*, indicating the conservation of signaling pathways between angiosperms and gymnosperms[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(2): 785–795.
- [42] JIANG Y, XIA B, LIANG L, *et al.* Molecular and analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*LrPAL2*) from *Lycoris radiata*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(3): 2 293–2 300.
- [43] MOU S, LIU Z, GUAN D, *et al.* Functional analysis and expressional characterization of rice ankyrin repeat-containing protein, *OsPI-ANK1*, in basal defense against *Magnaporthe oryzae* attack[J]. *Public Library of Science One*, 2013, 8(3): e59699.
- [44] LUO K, ZHANG G, DENG W, *et al.* Functional characterization of a cotton late embryogenesis-abundant *D113* gene promoter in transgenic tobacco[J]. *See Comment in PubMed Commons below Plant Cell Reports*, 2008, 27(4): 707–717.
- [45] XIAO F H, XUE G P. Analysis of the promoter activity of late embryogenesis abundant protein genes in barley seedlings under conditions of water deficit[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(7): 667–673.
- [46] BATTAGLIA M, OLVERA-CARRILLO Y, GARCIAARRUBIO A, *et al.* The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(1): 6–24.
- [47] ZHAO P, LIU F, ZHENG G, *et al.* Group 3 late embryogenesis abundant protein in *Arabidopsis*: structure, regulation, and function[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(4): 1 063–1 073.

(编辑:宋亚珍)

封面植物介绍——秦岭石蝴蝶

秦岭石蝴蝶(*Petrocosmea qinlingensis* W. T. Wang), 隶属于苦苣苔科, 石蝴蝶属, 是本属分布最北缘的种, 为多年生宿根草本。叶 7~12 枚, 具长或短柄; 叶片草质, 宽卵形、菱状卵形或近圆形, 长 0.7~3 cm, 宽 0.7~2.8 cm, 顶端圆形或钝, 基部宽楔形, 边缘浅波状或有不明显圆齿, 两面疏被贴服短柔毛。花序 2~6, 顶生 1 花。花萼 5 裂达基部, 外面疏被短柔毛; 花冠淡紫色, 外面疏被贴服短柔毛, 内面在上唇被白色柔毛; 花冠筒长约 2.8 mm, 上唇长约 4.8 mm, 2 深裂, 下唇与上唇近等长, 3 深裂, 所有裂片近长圆形, 顶端圆形。可育雄蕊 2, 着生于近花冠基部。雌蕊长约 5 mm, 子房与花柱被开展的白色柔毛, 柱头小, 球形。花期 8~9 月。秦岭石蝴蝶花冠筒内面被毛, 与其近缘种中华石蝴蝶(*P. sinensis* Oliv.) 的区别是后者花冠筒内面无毛。

秦岭石蝴蝶是由我国著名分类学家王文采教授在 20 世纪 80 年代描述并命名的新物种。模式标本产地为陕西省勉县茶店, 之后近 30 年间的调查中, 均未发现其野生居群。直到近年, 在陕西省第二次野生植物资源调查和汉中市极小种群野生植物秦岭石蝴蝶、庙台槭资源调查中被重新发现。

秦岭石蝴蝶是秦岭地区特有的珍稀濒危野生植物, 一般生长于阴湿山谷岩石上, 群落上层为落叶阔叶林, 郁闭度比较高。由于其野生居群地理分布极为狭窄, 个体数量稀少, 已经被列入第一批国家二级重点保护野生植物, 具有较高的科研价值。

(图文分别由陕西理工学院 王勇、杨培君, 略阳县野生动植物保护管理站 李长波和勉县野生动植物保护管理站 樊荣 提供)