

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01743

小麦穗发芽抗性相关 *Vp1* 基因启动子的分离及功能验证

孙永伟 聂丽娜 马有志 徐兆师 夏兰琴*

中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘 要: 成熟期穗发芽严重影响小麦产量和品质。*Vp1* 是调节胚发育, 促进胚成熟和休眠的重要转录因子, 对小麦种子休眠和穗发芽抗性具有重要作用。本研究分离了普通小麦 B 基因组 *Vp1* 基因的启动子, 生物信息学预测结果表明, 其含有 9 个脱落酸响应元件 ABRE、2 个 DREB 和 6 个 MYB 干旱响应元件、3 个赤霉素响应元件 GARE、1 个水杨酸响应元件 TCA-E、2 个茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif、4 个 SKn-1 和 1 个 RYREPE 胚乳特异表达元件。采用 5'端缺失的方法, 构建了系列含 *Vp1* 启动子不同区段融合 *GUS* 报告基因的瞬时表达载体和植物表达载体。通过基因枪转化小麦愈伤组织, 瞬时表达结果显示, *Vp1* 启动子在无诱导的情况下不能启动 *GUS* 基因表达, 在低温、ABA、GA、PEG 和 NaCl 诱导后可以启动 *GUS* 基因表达, 表现诱导表达特性, 且其诱导表达强度随启动子缺失片段长度变短而减弱。利用 Gateway 方法成功构建了 6 个启动子各缺失片段类型的植物表达载体, 并通过农杆菌介导转化四倍体小麦 Stewart, 获得转基因植株。该启动子可有效启动 *GUS* 基因在转基因植株的花药、糊粉层、穗轴及根中表达, 其他组织中没有表达。当启动子片段大于 660 bp 时, 外源 ABA 可诱导启动子启动 *GUS* 基因在转基因植株茎节中的表达。

关键词: 穗发芽; *Vp1* 启动子; 功能分析; 转基因小麦

Cloning and Functional Analysis of *Viviparous-1* Promoter in Wheat

SUN Yong-Wei, NIE Li-Na, MA You-Zhi, XU Zhao-Shi, and XIA Lan-Qin *

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: *Viviparous1* (*Vp1*) plays an important role in regulating embryo development, seed dormancy, and germination in higher plants. Although we previously demonstrated a close correlation between *Vp1B* allelic variation and the different levels of tolerance to pre-harvest sprouting (PHS) in common wheat, little is known about the potential *cis*-elements in *Vp1B* promoter region, which may be involved in the control of PHS by *Vp1B*. In this study, a 2 232 bp *Vp1B* upstream sequence was isolated. *In silico* analysis revealed the presence of nine ABRE, two DREB, six MYB, three GARE, one TCA-E, two TGACG-motif, four SKn-1, and one RYREPE *cis*-elements in the isolated sequence. Based on this, we constructed various plasmid vectors with 5'-truncated *Vp1B* promoters fused with the *GUS* (encoding β -glucuronidase) reporter gene. Transient expression assay in wheat callus indicated that *Vp1B* promoter activity was inducible by low-temperature, ABA, or GA treatment. However, the level of induced *GUS* activity declined as promoter length decreased. Subsequently, six truncated promoter reporter fusions were introduced into the genome of durum wheat by *Agrobacterium*-mediated transformation and stable transgenic lines were obtained. Analysis of the transgenic lines indicated that *Vp1B* promoter could drive *GUS* expression in the anther, axis, aleurone and root, but not in the leaves, stems and nodes. However, in the plants with the transgenic *Vp1B* promoter fragment longer than 660 bp, *GUS* expression could be induced in the nodes by ABA treatment.

Keywords: Pre-harvest sprouting; *Vp1* promoter; Functional analysis; Transgenic wheat

小麦穗发芽(pre-harvest sprouting, PHS)是指收获前籽粒在麦穗上发芽的现象, 影响小麦产量和品质, 是世界性的自然灾害^[1]。小麦穗发芽与多种因素有关, 是由多基因控制的复杂性状, 而且不同品种

的穗发芽抗性机制也可能不同^[2]。在影响小麦穗发芽的众多基因中, *Vp1* 是调节胚发育, 促进胚成熟和休眠的主要转录调节因子, 该基因位于小麦第 3 同源群染色体的长臂上^[3]。以成熟期的小麦胚为材料,

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB118305)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 夏兰琴, E-mail: xialq@mail.caas.net.cn, Tel: 010-82105804

第一作者联系方式: E-mail: suenyw@yahoo.cn, Tel: 010-82105921

Received(收稿日期): 2011-05-09; Accepted(接受日期): 2011-06-25; Published online(网络出版日期): 2011-07-28.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110728.1000.004.html>

分析 *Vp1* 的转录本结构,发现每个同源基因都会产生一套大小不同的转录本,原因是转录后前体 mRNA 发生了选择性的剪接,导致无法编码全长 *Vp1* 蛋白,从而表现对穗发芽敏感^[4]。根据 *Vp1* 基因序列中跨越 5 个内含子的 B3 区段设计特异性引物,对 2 个 CIMMYT 人工合成六倍体小麦进行 RT-PCR,发现这 2 个合成小麦之间存在不同的剪切模式,进一步证明 *Vp1* 在转录时不同的剪切方式是导致品种间穗发芽抗性差异的重要因素之一^[5]。然而, Nakamura 等^[4]研究了强休眠品种 Minamino 和非休眠品种 Tozan 成熟胚中 *Vp1* 基因的表达,发现在 Minamino 中 *Vp1* 的表达量大于在 Tozan 中。燕麦 *Vp1* 只形成一种转录本,把燕麦 *Vp1* cDNA 转入小麦时,转基因小麦穗发芽程度明显降低^[6]。小麦的 3 个 *Vp1* 同源基因中,位于 3B 染色体上的 *Vp1B* 对穗发芽抗性起关键作用,并且存在广泛的多态性^[7-11]。Yang 等^[7-8]在小麦 3B 染色体上发现了 2 个与穗发芽抗性相关的 *Vp1B* 的新型等位变异 *Vp1Bb* 和 *Vp1Bc*,由 *Vp1B* 编码区第 3 内含子中反转座子的插入和转座子的缺失引起,尽管存在错误剪切现象,但 *Vp1B* 各等位基因正常转录本的表达量与种子的 ABA 敏感性和穗发芽抗性呈正相关。对中国和欧洲小麦品种 *Vp1* 变异类型检测,共发现 5 种基因型,分别是 *Vp1Ba*、*Vp1Bb*、*Vp1Bc*、*Vp1Bd* 和 *Vp1Be*^[9-10]。Utsugi 等^[11]同样发现具有较高休眠性的品种对 ABA 敏感性要高于非休眠性品种,3B 染色体上 *Vp1B* 表达起主导作用,并与种子休眠性呈正相关;ABA 处理后胚中 *TaVp1B* mRNA 含量明显提高,其编码蛋白 *Vp1B* 可以激活 *Em* 基因表达和抑制 α -淀粉酶的活性,从而影响种子休眠性。但小麦 *Vp1* 启动子在穗发芽抗性中的作用和其所介导的 ABA 应答机制目前尚未见报道。

玉米 *Vp1* 启动子和拟南芥的同源基因 *ABI3* 启动子均为组织特异性启动子,主要在胚中表达。但当受到 ABA 和干旱、高盐等逆境诱导时,其表达程度均有提高,并在茎等组织中表现出不同量的表达,呈现出非组织特异性特征^[12-13]。深入研究小麦 *Vp1* 启动子,对了解不同逆境条件下 *Vp1* 的表达调控及其在小麦穗发芽抗性中的作用具有重要的意义,同时也可为进一步利用此启动子进行抗逆基因工程操作提供依据。本研究克隆了小麦 B 基因组 *Vp1* 启动子,并构建了系列缺失载体。通过瞬时表达和在转基因小麦中的稳定表达,明确了启动子及所含元件

的特性和功能,为进一步解析小麦 *Vp1* 基因介导的穗发芽抗性机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采用小麦品种万县白麦进行 *Vp1* 启动子分离,兰考 906 成熟胚诱导愈伤进行瞬时表达研究,四倍体小麦 Stewart 用于农杆菌转化。植物表达载体 pBI121 由本实验室保存。Gateway pENTR Directional TOPO Cloning Kits 和 Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 购自 Invitrogen 公司。农杆菌菌株 AGL1, pAL154 和 pGII-UB 载体由英国 John Innes Centre 的 Mark Smedley 博士提供。

1.2 *Vp1* 启动子的分离及功能预测

以穗发芽抗性品种万县白麦 *Vp1B* 基因序列为模板在 GenBank 中 Blast,获得含有 *Vp1B* 基因及其上游序列的 BAC 序列(GenBank 登录号为 FN564428),并以此序列为模板设计引物 Bi-TF 和 Bi-TR (表 1),分离小麦 *Vp1* 基因上游 2 232 bp 的启动子。

利用启动子顺式作用元件在线分析网站 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.htm>)和 PlantCARE(<http://www.bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>)对 *Vp1* 启动子所含功能元件生物信息学预测。

1.3 小麦 *Vp1* 启动子瞬时表达和植物表达载体构建

1.3.1 瞬时表达载体构建 根据生物信息学预测结果,采用 5'缺失的方法构建瞬时表达载体,5'上游引物分别为 Bi-1822F、Bi-1129F、Bi-852F、Bi-660F 和 Bi-319F,下游引物 Bi-TR (表 1),PCR 扩增长度分别为 1 822、1 129、852、660 和 319 bp 的启动子缺失片段。将分离的缺失片段用 *Hind* III 和 *Bam* HI 酶切后,与相同酶切后的 pBI121 载体片段连接,用于构建 *GUS* 报告基因植物表达载体。以 2 232 bp 的启动子为例,其瞬时表达载体构建方法如图 1。

1.3.2 植物表达载体的构建 采用 Gateway 方法构建农杆菌介导的植物表达载体,其方法如图 2 (以 2 232 bp 的启动子为例)。首先以瞬时表达载体为模板利用 PCR 扩增方法获得启动子融合 *GUS* 基因及终止子的表达盒,上游引物分别为 Ag-TF、Ag-1822F、Ag-1129F、Ag-852F、Ag-660F 和 Ag-319F,下游引物为 Ag-TR (表 1)。参照 Gateway pENTR Directional TOPO Cloning Kits 说明书(Invitrogen),将 PCR 纯化产物分别与 pENTR 载体按照摩尔比 1 : 1 混合,室

表 1 本实验中所用引物序列
Table 1 Primer sets used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
Bi-TF	ACGAAGCTTCCGTGCTATCATTCGTAAAGTCGG	63
Bi-TR	CTAGGATCCGAGAAGGAGATGTGATGTGTGTGTC	62
Bi-1822F	AATAAGCTTGACGCAAATGTAATACTCCCTCTGTTCAC	61
Bi-1129F	ATAAAGCTTGAATTGAGGGAGTACAAGGCGACC	63
Bi-852F	CAACGCCCACACCAGGTACATG	58
Bi-660F	CTAGTTCCGAGACAGCCCCTGG	62
Bi-319F	GTCGAAGCCCTCTCGCTGAAG	58
Ag-TF	CACCCCGTGCTATCATTCGTAAAGTCGG	61
Ag-TR	GGATGTGCTGCAAGGCGATTA	60
Ag-1822F	CACCGACGCAAATGTAATACTCCCTCTGTTCAC	59
Ag-1129F	CACCGAATTGAGGGAGTACAAGGCGACC	61
Ag-852F	CACCCAACGCCCACACCAGGTACATG	56
Ag-660F	CACCTAGTTCCGAGACAGCCCCTGG	60
Ag-319F	CACCGTCGAAGCCCTCTCGCTGAAG	56
GUSF	AGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAAC	60
GUSR	ATCGCCGCTTTGGACATACCATCCGTA	60

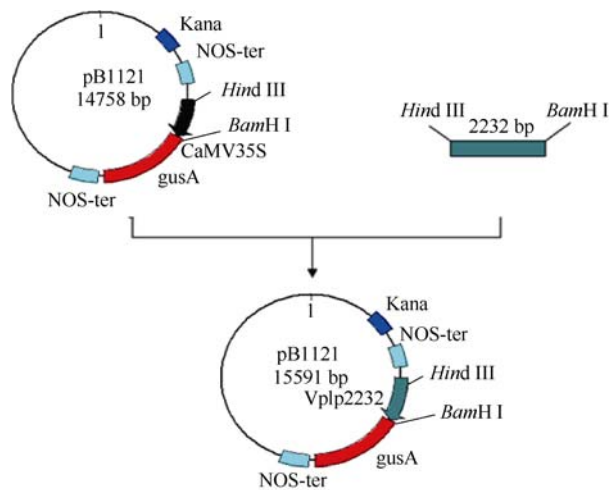


图 1 瞬时表达载体构建过程
Fig. 1 Construction of transient expression vector

温下连接 5 min, 将连接产物热激转化大肠杆菌 DH5 α 后涂布在含有 50 mg L⁻¹ kanamycin 的平板上筛选, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 阳性克隆提取质粒后测序正确的即为构建成功的 Entry 载体。参照 Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 说明书 (Invitrogen), 在 0.5 mL EP 管中加入 Entry clone 质粒 (50~150 ng) 3 μ L, pGII-UB 质粒(150 ng) 1 μ L, TE buffer (pH 8.0) 4 μ L, LR Clonase II Enzyme Mix 2 μ L, 短暂混匀后 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 待反应完全后加入 1 μ L 蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 10 min 终止反应。取 2 μ L 反应液热激转化大肠杆菌 DH5 α 后涂布在含有 50 mg L⁻¹

ampicillin 的平板上筛选, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 阳性克隆提取质粒后测序正确的即为构建成功的表达载体。

1.4 小麦成熟胚愈伤组织的瞬时表达及逆境诱导

将培养 2~3 周的兰考 906 小麦成熟胚愈伤组织转移到高渗培养基(SD2 培养基添加 0.2 mol L⁻¹ 甘露醇和 0.2 mol L⁻¹ 山梨醇)中央区域, 处理 4~8 h 后采用基因枪方法轰击小麦愈伤组织, 将转化后的小麦愈伤组织转移到普通 SD2 培养基上, 或分别含有 100 μ mol L⁻¹ ABA、2% PEG、200 mmol L⁻¹ NaCl、50 μ mol L⁻¹ SA 和 50 μ mol L⁻¹ GA 的 SD2 培养基上。将接种在 SD2 培养基上的转基因愈伤组织置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 其他愈伤组织置 25 $^{\circ}$ C 培养箱内, 处理后恢复培养 4 d。

1.5 农杆菌介导方法转化四倍体小麦

将表达载体分别与辅助载体 pAL154 按 1 : 1 比例均匀混合后, 采用电击法转入农杆菌 AGL1, 参照 He 等^[14]的方法转化四倍体小麦 Stewart。

1.6 转基因小麦的分子检测

采用 CTAB 的方法提取转基因小麦基因组 DNA, 并利用 *GUS* 基因特异性引物 GUSF/GUSR 检测阳性植株(表 1), 预期产物长 1 051 bp, 扩增程序为, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后检测特异条带。

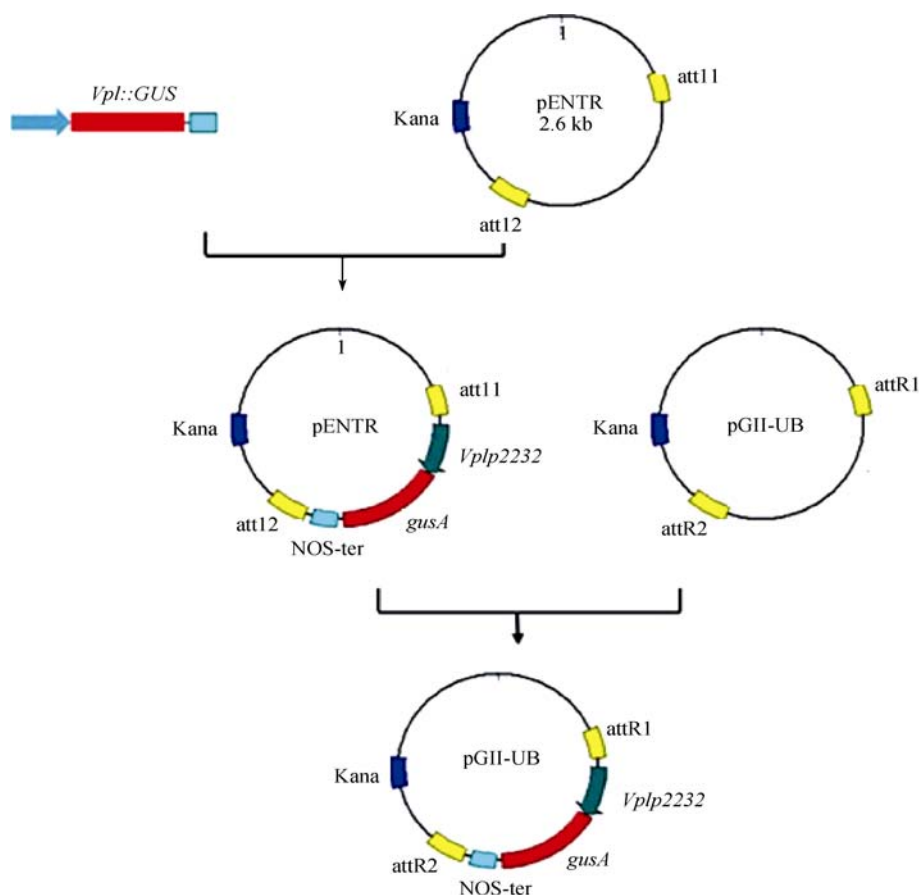


图 2 植物表达载体构建过程

Fig. 2 Flow chart for construction of the wheat expression vector

1.7 转基因小麦组织器官外源 ABA 诱导方法

随机挑选 3 株 T_2 代转基因株系材料, 将各组织分别置于含有 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 的 MS 液体培养基中, 12 h 后进行组织化学染色。

1.8 GUS 组织化学染色方法

X-Gluc 染色反应液成分为 $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{Na}_3\text{PO}_4$ 、0.1% Triton-100、20% 甲醇和 0.5 mg mL^{-1} X-Gluc (pH 7.0)。待测组织与该反应液在 37°C 保温 3~5 h 后, 用 95% 乙醇将叶片等绿色组织脱色, 最后用电镜拍照。

2 结果与分析

2.1 Vp1 启动子的分离及所含功能元件预测

利用生物信息学结合 PCR 的方法从穗发芽抗性品种万县白麦中克隆了 2 232 bp 的 B 基因组 *Vp1* 启动子。该启动子无典型的 TATA-box 和 CAAT-box, 含有 9 个脱落酸响应元件 ABRE、2 个 DREB 和 6 个 MYB 干旱响应元件、3 个赤霉素响应元件 GARE、1 个水杨酸响应元件 TCA-E、2 个茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif、4 个 SKn-1 和 1 个 RYREPE 胚乳特异表达元件以及其他一些与光、热、离子等应答

有关的顺式作用元件(表 2 和图 3)。

2.2 启动子缺失系列驱动 GUS 在小麦愈伤组织中的表达

为了分析 *Vp1* 启动子不同区段的功能, 构建了系列缺失片段类型瞬时表达载体。各种缺失类型所含元件见图 4。*Vp1P2232::GUS* 转化的愈伤组织在不受逆境诱导时, 没有启动 *GUS* 基因的表达。低温、ABA 和 GA 诱导后, 愈伤组织中 *GUS* 表达明显增加。其中, 低温诱导 660 bp 以上启动子片段驱动 *GUS* 表达增强; 在 ABA 处理条件下, 852 bp 以上启动子驱使 *GUS* 表达明显增强; 而 GA 处理则只能促进 *Vp1p2232::GUS*、*Vp1p1822::GUS* 和 *Vp1p1129::GUS* 转化愈伤组织中 *GUS* 的表达。随着缺失片段长度的增加, 不同诱导条件下的愈伤组织颜色逐渐变淡。PEG 和 NaCl 处理未明显诱导 *GUS* 表达(图 5)。

2.3 转基因小麦中的 *Vp1* 启动子表达特性分析

PCR 检测获得 56 个转启动子各缺失片段类型基因阳性株系(图 6), 其中 *Vp1p2232::GUS* 2 株, *Vp1p1822::GUS* 11 株, *Vp1p1129::GUS* 15 株, *Vp1p852::GUS* 15 株, *Vp1p660::GUS* 3 株, *Vp1p319::GUS* 10

表 2 *Vp1B* 启动子所含顺式调控元件
Table 2 *cis*-elements in the isolated *Vp1B* promoter region

元件 Element	功能 Function	数量 Number	核心序列 Core sequence (5'-3')	位置 Site (bp)
ABRE	脱落酸响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	9	GCCACGTGGG	-192 to -201
			CGGCCCC	-402 to -408
			CACGCGCC	-467 to -474
			ACGGGCCACGGG	-489 to -500
			TACGAGGCGG	-553 to -562
			GCCTCGGCG	-717 to -725
			CCGTGTAG	-727 to -734
			TCCAC	-749 to -753
			TCGGCA	-784 to -789
			GTCGGC	-584 to -589
DREB	干旱响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in dehydration responsiveness	2	GTCGGT	-2242 to -2247
GARE	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element	3	AAACAGA	-1012 to -1018
			TAACAAA	-1619 to -1625
			CCTTT	-2137 to -2142
MYB	干旱响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in the dehydration responsiveness	6	TAACTGC	-128 to -134
			TAACTG	-427 to -432
			TAAACCA	-1890 to -1896
			TAACGG	-1944 to -1949
			TAAACCA	-2122 to -2128
			TAACGG	-2176 to -2181
RYREPEATBNN	胚乳特异表达元件 <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression	1	CCATGCAG	-375 to -382
Skn-1_motif	胚乳特异表达元件 <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression	4	GTCATC	-391 to -396
			GTCATC	-774 to -779
			CATGAC	-2036 to -2041
			TGACTG	-2150 to -2155
TCA-E:	水杨酸响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness	1	TCAGTAGAGG	-2004 to -2013
TC-rich repeats	逆境相关响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness	1	ATTTTTTTCA	-1861 to -1870
TGACG-motif	茉莉酸甲酯响应元件 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	2	CACGCGGC	-402 to -409
			CGTCA	-1039 to -1043
TGA-E	激素响应元件 Auxin-responsive element	1	AACGAC	-1760 to -1765

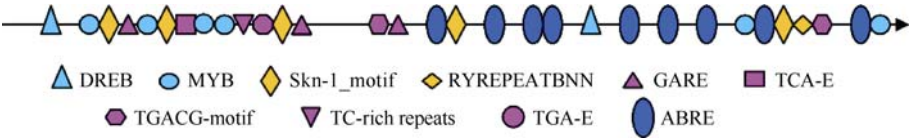


图 3 *Vp1B* 启动子所含顺式作用元件结构图

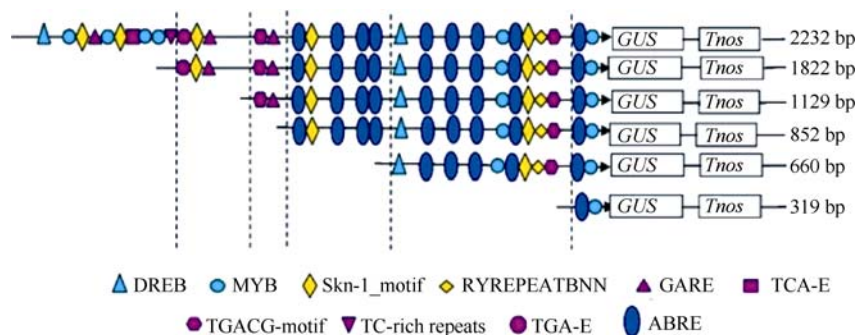
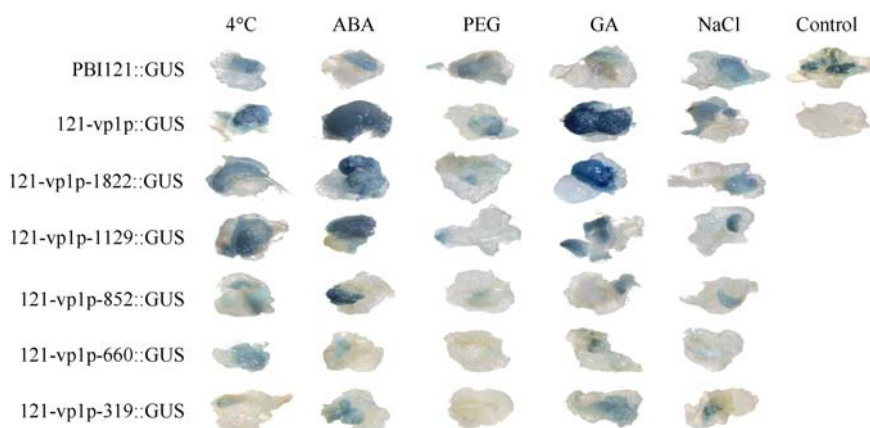
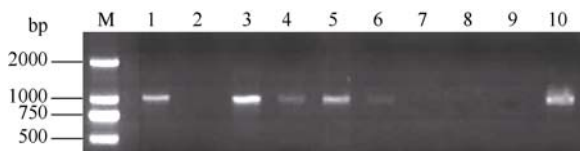
Fig. 3 Synopsis of regulatory elements in *Vp1B* promoter

DREB: 干旱响应元件; MYB: 干旱响应元件; Skn-1: 胚乳特异表达元件; RYREPEATBNN: 胚乳特异表达元件; GARE: 赤霉素响应元件; TCA-E: 水杨酸响应元件; TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应元件; TC-rich: 逆境相关响应元件; TGA-E: 激素响应元件; ABRE: 脱落酸响应元件。

DREB: *cis*-acting element involved in dehydration responsiveness; MYB: *cis*-acting element involved in dehydration responsiveness; Skn-1_motif: *cis*-acting regulatory element required for endosperm expression; RYREPEATBNN: *cis*-acting regulatory element required for endosperm expression; GARE: gibberellin-responsive element; TCA-E: *cis*-acting element involved in salicylic acid responsiveness; TGACG-motif: *cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness; TC-rich: *cis*-acting element involved in defense and stress responsiveness; TGA-E: auxin-responsive element; ABRE: *cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness.

株。选取 T₂ 代不同生长时期的各组织器官进行小麦 *Vp1B* 基因启动子组织特异性表达分析(表 3 和图 7), 结果表明, 6 种 *Vp1B* 基因启动子缺失片段类型均可

以启动 *GUS* 基因在花药、穗轴、根中表达, 同时表现出元件特异性。例如在糊粉层中, 只有 319 bp 的启动子片段不能驱动 *GUS* 基因表达, 当启动子大

图 4 *Vp1* 启动子缺失系列融合载体示意图Fig. 4 Schematic show of 5'-truncated *Vp1* promoter-reporter fusion vector series图 5 不同处理条件下小麦成熟胚愈伤组织转化 *Vp1* 启动子 5'端连续片段表达载体的 *GUS* 组织染色结果Fig. 5 Histochemical *GUS* staining of wheat mature embryo induced calli transformed by various *Vp1* promoter reporter fusion constructs under different treatmentsABA、PEG、GA 和 NaCl 的处理浓度分别为 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2%, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。Concentrations were $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ for ABA; 2% for PEG, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ for GA, and $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ for NaCl.图 6 T_0 代转基因小麦的 PCR 检测Fig. 6 PCR analysis of T_0 generation transgenic wheat linesM: DL2000; 1: CK^+ ; 2: CK^- ; 3~6 和 10: 阳性植株;

7~9: 非转基因植株。

M: DL2000; 1: CK^+ ; 2: CK^- ; 3~6 and 10: transgenic lines;

7~9: non-transgenic lines.

于 660 bp 时能有效驱动 *GUS* 基因表达; 但是在颖壳中大于 1 129 bp 的启动子不能启动 *GUS* 基因表达, 而小于 852 bp 的启动子片段可以启动 *GUS* 基因表达。另外, 在茎和叶中, 6 种表达载体均不能启动 *GUS* 表达, 然而当有外源 ABA 存在时, 在茎节中表现出诱导表达特性, 当启动子片段大于 660 bp 时, 诱导表达结果很明显。但在叶中, 在有或无外源 ABA 处理条件下均无 *GUS* 基因表达。

3 讨论

Vp1 基因在种子的成熟、休眠及发芽过程中起关键作用^[3,15-16]。目前, 已经相继分离了拟南芥 *ABI3* 及玉米、豌豆的 *Vp1* 启动子, 并进行了功能分析^[12-13,17], 其中对玉米 *Vp1* 和拟南芥 *ABI3* 的启动子的研究最为深入, 它们均属于组织特异性启动子并具有诱导表达特性^[12-13]。我们在前期研究中发现, 位于小麦 3B 染色体上的 *Vp1B* 直接影响穗发芽抗性, 不同 *Vp1B* 等位基因的表达量与穗发芽抗性直接相关, 而且所介导的 ABA 敏感性不同^[7-8]。Utsugi 等^[11]也指出, *Vp1B* 是种子休眠过程中起主导作用的重要转录调节因子之一, 参与调控种子成熟过程中休眠相关基因的表达。然而, 抗、感穗发芽品种中是否存在调控序列的差异以及小麦 *Vp1* 如何实现自我调控, 目前尚不清楚。

为了解 *Vp1* 介导的小麦穗发芽抗性机制, 我们从抗、感穗发芽品种分离了 B 基因组 *Vp1* 启动子, 发

表 3 不同启动子缺失系列驱动 GUS 在转基因小麦不同组织中的表达模式

Table 3 Tissue specific expression manner of GUS in transgenic wheat lines harboring different 5' truncated *Vp1* promoter-reporter fusion vectors

载体 Vector	根 Root	茎节 Node		叶 Leaf	花药 Anther	穗轴 Axis	颖壳 Glume	胚 Embryo	糊粉层 Aleurone layer
		ABA ⁻	ABA ⁺						
<i>Vp1p319::GUS</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Vp1p660::GUS</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Vp1p852::GUS</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Vp1p1129::GUS</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Vp1p1822::GUS</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Vp1p2232::GUS</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	+

ABA⁻: 无外源 ABA; ABA⁺: 添加 100 μmol L⁻¹ 外源 ABA; +: GUS 表达; -: GUS 未表达。
ABA⁻: without exogenous ABA; ABA⁺: with 100 μmol L⁻¹ exogenous ABA; +: GUS expression; -: no expression of GUS.

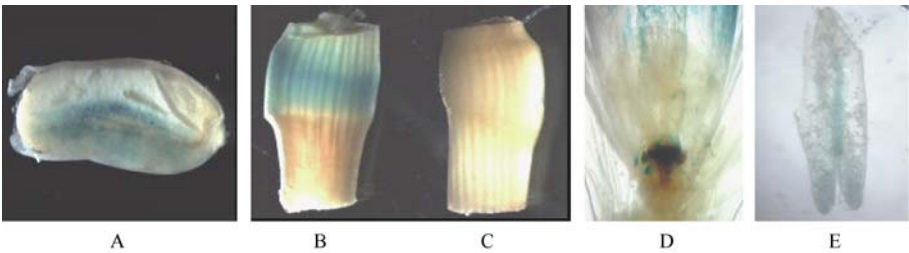


图 7 GUS 在转基因小麦中的表达
Fig. 7 GUS expression in transgenic wheat lines

A: 种子中 GUS 染色; B: 茎节中 ABA 诱导后 GUS 染色; C: 未处理茎节 GUS 染色; D: 穗轴和颖壳中 GUS 染色; E: 花药中 GUS 染色。
A: GUS expression in seed; B and C: GUS expression in node treated with exogenous ABA (B) and without ABA treatment (C); D: GUS expression in axis and glumes; E: GUS expression in anther.

现抗、感穗发芽小麦的 *Vp1* 调控区序列一致。抗、感穗发芽小麦品种中的 B 基因组 *Vp1* 编码区序列分析表明, 在第 3 内含子中反转座子的插入和转座子的缺失, 导致了不同 *Vp1B* 等位基因的表达差异, 从而最终表现为穗发芽抗性不同^[7-8]。为进一步了解 *Vp1* 调控及其对 ABA 的应答机制, 我们利用万县白麦中分离出的 B 基因组 *Vp1* 启动子, 通过瞬时表达和在转基因小麦中的稳定表达进行了缺失功能分析。瞬时表达结果表明, 该启动子在没有逆境诱导的情况下, 不能启动下游基因的表达; 在低温、ABA 和 GA 等条件诱导下, 可以启动下游基因表达。因此, 可以推断 *Vp1B* 启动子为诱导型启动子。但 *Vp1* 启动子的 3 个缺失表达载体 *Vp1p2232::GUS*、*Vp1p1822::GUS* 和 *Vp1p1129::GUS* 转化的愈伤组织在低温、ABA 和 GA 诱导后 *GUS* 表达明显增强(图 5), 与 pBI121 相比, PEG 和 NaCl 的诱导效果并不明显, 说明该启动子只对低温、ABA 和 GA 作出应答, 以 ABA 处理后的效果最为明显, 推测可能与该启动子片段含有 9 个 ABRE 元件有关。

本研究分离的 *Vp1* 启动子含有 9 个 ABA 响应元件 ABRE 和 3 个 GA 响应元件 GARE (表 2), 说明在

小麦种子发育、成熟和萌发过程中, 内源激素 ABA 和 GA 对 *Vp1* 的表达起重要的调控作用。在种子发育过程中, ABA 的主要作用是促进胚发育, 阻止水解酶(主要是 α -淀粉酶)的产生, 抑制萌发; 在未成熟种子中则启动休眠相关基因表达, 导致并保持成熟种子的休眠^[18]。研究发现, 小麦种子的休眠性与种子中 ABA 水平无关, 而与胚对 ABA 的敏感性相关^[19]。相反, GA 能够促进胚乳中储藏物代谢, 可以解除种子休眠, 从而诱发种子萌发^[20]。GA 和 ABA 在种子萌发过程中存在互作, ABA 可以直接干预 GA 的合成而抑制萌发。可以推测, 9 个 ABA 响应元件 ABRE 的存在, 可以在种子成熟过程中, 对内源激素 ABA 作出应答, 启动 *Vp1* 基因的高效表达, 从而激活下游 *ABI5* 等基因的表达, 并对启动子区域含有 ABRE 元件和 Sph 元件的相关基因, 如 *Em* 基因、 α -淀粉酶和迟熟 α -淀粉酶等起重要调控作用, 进而促进种子成熟和对 ABA 等的应答, 同时, 抑制 *ABI1* 和 *ABI2* 等对 ABA 信号传导起负调控基因的表达^[21-22]。有趣的是, *Vp1* 启动子中还含有 3 个 GA 响应元件 GARE, GA 处理后, 含有 GARE 的启动子片段导致 *GUS* 表达明显增强。这表明在种子萌发过程中, 随

着种子内源 GA 含量的增加, GA 和 ABA 可通过互作和调控相关基因的表达, 控制种子休眠、萌发和对逆境的适应性。

对转基因小麦研究结果表明, 本研究分离的 2 232 bp *Vp1* 启动子的活性表现为组织特异性, 在种子糊粉层、花药、穗轴和营养器官根中均不同程度地表达, 在其他组织没有表达。值得指出的是, 本研究结果与 Ng 等^[12]对拟南芥 *ABI3* 启动子研究结果一致, 在转基因小麦叶片中, 在有或无外源 ABA 诱导条件下, 均未观察到 *GUS* 基因的表达。但是所有启动子片段均能驱动 *GUS* 基因在根中表达(表 3), 推测与 *Vp1* 基因的 5' UTR 有关。在 5' UTR 不存在情况下, 拟南芥 *ABI3* 启动子也表现根部表达特异性^[12]。另外, 本研究还发现全长 2 232 bp 的 *Vp1* 启动子只能驱动 *GUS* 在糊粉层中表达, 并没有像预期那样在胚中表达。推测原因可能是该启动子长度不够, 2 232 bp 区段的启动子中并不包含胚特异性元件, 或者由于 5' UTR 的原因导致 *Vp1* 启动子表达组织特异性发生改变。Rouster 等^[23]发现将胚特异表达启动子的 5' UTR 置换糊粉层特异表达基因的 5' UTR, 可导致下游基因在胚和糊粉层中同时表达。另外, 与种子萌发相关的 α -淀粉酶和迟熟 α -淀粉酶基因大多数在糊粉层表达, *Vp1* 启动子在糊粉层的特异表达, 在一定程度上解释了 *Vp1* 作为转录因子, 可通过对 α -淀粉酶和迟熟 α -淀粉酶基因的调控, 抑制种子萌发, 促进休眠, 最终表现穗发芽抗性。

本研究还发现, 不同调控元件的存在的确导致 *Vp1* 启动子的组织特异性。例如, 在种子中 *GUS* 基因主要在糊粉层中表达, 然而 319 bp 的启动子却不能启动 *GUS* 基因表达, 当启动子片段大于 660 bp 时, 则能启动 *GUS* 基因在糊粉层中表达(表 3), 因此, 可以确定在 319~660 bp 之间有糊粉层特异性元件或种子特异性元件存在, 生物信息学预测结果表明在 319~660 bp 之间有 2 个胚乳特异表达元件, 分别是 SKn-1 和 RYREPE, 推测在糊粉层中的表达可能与这 2 个元件相关; 在颖壳中, *Vp1p852::GUS*、*Vp1p660::GUS* 和 *Vp1p319::GUS* 载体有表达, 而当启动子片段大于 1 129 bp 时, *GUS* 基因并没有表达(表 3), 生物信息学预测发现, 在 852 bp 至 1 129 bp 区间, 只存在对 GA 应答元件 GARE 和甲基茉莉酸应答元件 TCACG motif, 是否有负调节因子或者其他组织特异性元件导致该情况的发生, 尚需进一步研究。

在转基因小麦中 *Vp1* 启动子也表现出诱导特性,

当有外源 ABA 存在的情况下, 除 319 bp 的启动子外, 其他启动子片段均可诱导 *GUS* 基因在转基因小麦茎节中表达。根据启动子功能元件预测结果, 319 bp 启动子只存在 1 个 ABRE 应答元件(图 4), Shen 等^[24-25]研究表明, 一个 ABRE 并不能有效对 ABA 的诱导作出应答, 必须存在另外一个 ABRE 或 CE 核心序列才能发挥作用。

4 结论

从穗发芽抗性品种万县白麦中首次克隆了长度为 2 232 bp 的 B 基因组 *Vp1* 启动子, 该启动子含有 ABRE、GARE 及 DREB 等顺式作用元件, 为诱导型启动子, 在低温、ABA、GA 诱导下可有效启动下游基因表达, 但随着启动子片段长度变短, 其启动下游基因表达的效率逐渐降低。该启动子在转基因小麦中表现组织特异性, 在没有诱导的情况下, 可以启动 *GUS* 基因在糊粉层、花药、穗轴和根中表达, 外源 ABA 诱导后可在茎节中表达。因此 *Vp1B* 启动子为组织特异性启动子, 但在低温、ABA、GA 诱导下可有效启动下游基因表达。

References

- [1] Xiao S-H(肖世和), Yan C-S(闫长生), Zhang H-P(张海萍), Sun G-Z(孙果忠). Studies for Preharvest Sprouting of Wheat (小麦穗发芽研究). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2002. pp 266–292 (in Chinese)
- [2] He Z-T(何震天), Chen X-L(陈秀兰), Han Y-P(韩月澎). General situation of study on ear sprouting resistance of white-seed-coat wheat. *Seed* (种子), 2000, (2): 36–38 (in Chinese with English abstract)
- [3] Bailey P C, McKibbin R S, Lenton J R, Holdsworth M J, Flinham J E, Gale M D. Genetic map location for orthologous *VPI* genes in wheat and rice. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 281–284
- [4] Nakamura S, Toyama T. Isolation of a *VPI* homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. *J Exp Bot*, 2001, 52: 875–876
- [5] Wilkinson M D, McKibbin R S. Use of comparative molecular genetics to study pre-harvest sprouting in wheat. *Euphytica*, 2002, 126: 27–33
- [6] Jones H D, Peters N C B. Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. *Plant J*, 1997, 12: 911–920
- [7] Yang Y, Ma Y Z, Xu Z S, Chen X M, He Z H, Yu Z, Wilkinson M, Jones D H, Shewry R P, Xia L Q. Isolation and characterization of *Vp-I* genes in wheat varieties with distinct pre-harvest sprouting tolerance and ABA sensitivity. *J Exp Bot*, 2007, 58: 2863–

- 2871
- [8] Yang Y, Zhao X L, Xia L Q, Chen X M, Xia X C, Yu Z, He Z H. Development and validation of a *Vp-1* STS marker for pre-harvest sprouting in Chinese wheats. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 971–980
- [9] Xia L Q, Ganai M W, Shewry P R, He Z H, Yang Y, Roder M. Evaluation of the *Viviparous-1* gene alleles in the European wheat varieties. *Euphytica*, 2008, 159: 411–417
- [10] Yang Y, Chen X M, He Z H, Roder M, Xia L Q. Distribution of *Vp-1* alleles in Chinese white-grained landraces, historical and current wheat cultivars. *Cereal Res Commun*, 2009, 37: 169–177
- [11] Utsugi S, Nakamura S, Noda K, Maekawa M. Structural and functional prop-erties of *Viviparous1* genes in dormant wheat. *Genes Genet Syst*, 2008, 83: 153–166
- [12] Ng D W, Chandrasekharan M B, Hall T C. The 5'-UTR negatively regulates quantitative and spatial expression from the ABI3 promoter. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 25–38
- [13] Cao X, Costa L M, Biderre-Petit C, Kbhaya B, Dey N, Perez P, McCarty D R, Gutierrez-Marcos J F, Becraft P W. Absciscic acid and stress signals induce *Viviparous-1* (*Vp1*) expression in seed and vegetative tissues of maize. *Plant Physiol*, 2007, 143: 720–731
- [14] He Y, Jones H D, Chen S, Chen X M, Wang D W, Li K X, Wang D S, Xia L Q. Agrobacterium-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv. Stewart) with improved efficiency. *J Exp Bot*, 2010, 61: 1567–1581
- [15] McCarty D R, Hattori T, Carson C B, Vasil V, Lazar M, Vasil I K. The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell*, 1991, 66: 895–905
- [16] Giraudat J, Hauge B M, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman H M. Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell*, 1992, 4: 1251–1261
- [17] Bobb A J, Eiben H G, Bustos M M. PvAlf, an embryospecific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters. *Plant J*, 1995, 8:331–343
- [18] Li C D, Ni P X. Genes controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting in rice-wheat-barley comparison. *Funct Integr Genomics*, 2004, 4: 84–93
- [19] Derera N F, Sci D A, Dip P B. Pre-harvest Field Sprouting in Cereals. Florida: CRC Press, 1989. pp 27–61
- [20] Maarten J, Chrispeels, Varner J E. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of amylase and ribonuclease by isolated barley and aleurone layers. *Plant Physiol*, 1967, 42: 398–406
- [21] Suzuki M, Ketterling M G. *Viviparous1* alters global gene expression patterns through regulation of absciscic acid signaling. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1664–1677
- [22] Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 51–68
- [23] Rouster J, Leah R, Mundy J, Cameron-Mills V. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxxygenase 1 gene expressed in barley grain. *Plant J*, 1997, 11: 513–523
- [24] Shen Q, Ho T H. Functional dissection of an absciscic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell*, 1995, 7: 295–307
- [25] Shen Q, Zhang P, Ho T H. Modular nature of absciscic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, 1996, 8: 1107–1119

信息索引

- 1800 欢迎订阅 2012 年《河南农业科学》
- 1818 欢迎订阅 2012 年《作物学报》
- 1836 欢迎订阅 2012 年《中国油料作物学报》
- 1867 欢迎订阅 2012 年《花生学报》
- 1887 新书推介——《英文科技论文撰写与投稿(第二版)》
- 1909 欢迎订阅 2012 年《杂交水稻》