

白桦 *BpSPL2* 基因启动子的克隆及表达分析

王晟宇 张 洪 张正一 胡晓晴 田 晶 张 勇 刘雪梅*

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘 要 SPL(SQUAMOSA promoter-binding protein-like)是植物特有的转录因子,研究表明其在参与发育阶段转变、花和果实发育等方面起着重要作用。利用 PCR 技术从白桦基因组 DNA 中扩增获得 *BpSPL2* 基因上游 1 960 bp 启动子序列,使用 PLACE 和 PlantCARE 在线软件分析序列,发现 *BpSPL2* 基因启动子序列中含有与开花、非生物胁迫及激素响应等相关的顺式作用元件,暗示其在植物的生长发育和胁迫应答中起重要作用。进而构建了 *BpSPL2* 基因启动子驱动 *GUS* 报告基因的植物表达载体,并利用农杆菌介导将其瞬时转化至白桦和拟南芥,通过 *GUS* 组织化学染色检测 *BpSPL2* 基因启动子的组织表达特性,结果表明 *BpSPL2* 基因启动子具有启动子活性,能够驱动 *GUS* 基因在白桦和拟南芥中表达,而其表达活性在白桦的叶片、芽及根部中较强,在拟南芥的花药、雌蕊和叶片较强,为进一步研究白桦 *BpSPL2* 基因的表达调控及其功能分析提供参考。

关键词 白桦 *BpSPL2* 启动子 顺式作用元件 克隆 表达分析

中图分类号: Q786 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2019.01.012

Cloning and Expression Analysis of *BpSPL2* Promoter from *Betula platyphylla*

WANG Sheng-Yu ZHANG Qi ZHANG Zheng-Yi HU Xiao-Qing TIAN Jing ZHANG Yong LIU Xue-Mei*

(Life Science College, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract The SPL(SQUAMOSA promoter-binding protein-like) is a plant specific transcription factor, and the study showed that it plays an important role in the transformation of developmental stage, flower and fruit development. A 1 960 bp promoter sequence of *BpSPL2* gene was cloned from *Betula platyphylla* genomic DNA using the method of PCR. The cis-regulatory elements were analyzed by PLACE and PlantCARE web tools. Multiple flowering elements, abiotic stress response elements and hormone-responsive elements were predicted in the promoter region. It indicated that it played an important role in plant growth and development and stress response. Further, the *BpSPL2* promoter was inserted to pBI121 vector under control of the 35S promoter to generate the pBI121-*BpSPL2* promoter::GUS recombinant construct, which was transiently expressed in *B. platyphylla* and *Arabidopsis thaliana* seedlings by *Agrobacterium tumefaciens* mediated method, then investigated the expression pattern via histochemical *GUS* staining. *BpSPL2* promoter could drive the expression of *GUS* gene in *B. platyphylla* and *A. thaliana*, and expressed in high level in leaves, buds, and roots of *B. platyphylla* while in high level in anthers, pistils, and leaves of *A. thaliana*. This study will provide a reference for further studies on the expression regulation and functional analysis of *BpSPL2* gene in *B. platyphylla*.

Key words *Betula platyphylla* *BpSPL2* promoter cis-elements analysis clone expression analysis

SPL(SQUAMOSA promoter-binding protein-like)是植物特有的一类转录因子,均具有含 76 个

氨基酸的高度保守区段,以此同下游基因 SQUAMOSA 及其同源基因的启动子区域结合并调控表

基金项目:中央高校基本科研业务费专项基金 E 类项目(2572015EA05)

第一作者简介:王晟宇(1997—),男,本科生,主要从事植物发育与基因工程。

* 通信作者 E-mail: 695898040@qq.com

收稿日期:2018-06-19

Foundation item: Special Fund for Basic Scientific research operation Fee of Central University(2572015EA05)

First author introduction: WANG Sheng-Yu(1997—), male, undergraduate, mainly engaged in plant development and genetic engineering.

* Corresponding author E-mail: 695898040@qq.com

Received date: 2018-06-19

达,被命名为 SBP 结构域,包含 2 个锌指结构和一个核定位信号^[1]。*SPL* 基因在参与发育阶段转变^[2]、花和果实发育^[3-4]、孢子发生^[5-6]、植株形态建成^[7]等方面起着重要作用。近年来,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)等模式植物中探索 *SPL* 功能已成为热点。

开花是高等植物从营养生长到生殖生长的一个重要转折点,受外界环境(光照、温度)和自身内部因素的影响。拟南芥中至少存在 4 条开花诱导途径,即光周期途径、春化途径、赤霉素途径和自主途径。*SPL* 在植物开花调控网络中处于核心枢纽地位,能够整合光周期和赤霉素(GA)两条开花诱导途径。研究表明拟南芥 *SPL* 基因通过直接激活花分生组织特异基因 *LEAFY (LFY)*、*FRUITFUL (FUL)* 和 *APETALA1 (AP1)* 从而促进植物营养生长向生殖生长过渡,它们构成一个内源性开花途径,可在短日照下不需经由光周期途径促进开花^[8-10]。*AtSPL8* 影响花药的发育而且参与调控 GA 的合成^[5],而 *AtSPL14* 作为负调控因子影响营养生长和开花的转换过程^[11]。拟南芥 *AtSPL3* 基因主要在花序中表达,过量表达 *AtSPL3* 不仅会促进开花,而且在长日照和连续光照条件下还会导致花和花序发育异常。番茄 *LeSPL3* 在花序和花柄中大量表达,过量表达 *Le-SPL3* 基因会导致转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)花柄离区离层细胞层数增加,花更易脱落,表明 *LeSPL3* 可能调控花柄离区的发育。在苜蓿(*Medicago sativa*)中,*SPL13* 直接靶向 *R2R3-MYB* 基因影响侧枝发育和开花时间^[12]。此外,拟南芥 *SPL10* 的启动子在根中特异性表达,过表达该基因后,植物侧根发育受到抑制^[13]。Lannenpaa 等从欧洲白桦(*Betula pendula*)中克隆鉴定了 *BpSPL1*,其在花序、芽和叶中均有表达,可特异性结合 *BpMADS5* 启动子^[14]。这些结果表明,*SPL* 基因在植物中有多种表达模式,对植物的营养生长和花发育调控起重要作用。

启动子(promoter)是一段提供 RNA 聚合酶特异识别和结合位点的 DNA 序列,可控制基因转录的起始时间和表达程度,通常位于基因转录起始位点近端的核苷酸序列上游区域内,主要由核心启动区、上游元件和应答元件组成^[15]。组织特异性启动子能够驱动外源基因在植物组织器官中定时、定点表达,这样不仅能使目的基因的表达产物在一定器官或组织部位积累,增加区域表达量,同时也可以避免植物营养的不必要浪费,如毛果杨

(*Populus trichocarpa*) *PTLF* 基因启动子可驱动 *GUS* 基因在杨树叶脉、嫩枝顶端的扩展叶和叶原基中表达^[16]; *GUS* 荧光定量检测表明茶树(*Camellia sinensis*) *Cpcep* 启动子片段在花粉中表达,都说明其具有组织特异表达特性^[17]。因此,近年来,组织特异性启动子逐渐成为研究重点。

白桦(*Betula platyphylla*)属桦木科(Betulaceae)桦木属(*Betula*),为喜光、适应性强、耐贫瘠、耐严寒和喜酸性土壤的落叶乔木^[18]。雌雄同株异花,且花发育存在越冬宿存的现象^[19],是我国北方的主要用材树种,也是天然次生林的先锋树种,在天然林更替方面起到了重要作用^[20]。白桦花发育模式与草本植物相比存在明显的差异,可能由其所特有的花发育基因调控路径所致^[21]。探索影响开花发育的 *SPL* 基因启动子的表达活性将为揭示木本植物成花机理奠定基础。本文研究的 *BpSPL2* 基因(MF429834)与拟南芥 *AtSPL6/SPL13* 有较高的同源性,我们前期对 *BpSPL2* 基因转化拟南芥后出现花败育、侧枝数量增多的表型(暂未发表)暗示其可能参与花器官形态发育。本文通过 PCR 扩增技术从白桦中得到 *BpSPL2* 启动子序列,并进行顺式作用元件分析,构建 pBI121-p*BpSPL2*-*GUS* 表达载体,并用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导瞬时转化白桦和拟南芥,对 *GUS* 活性进行特异性分析。

1 实验材料与方法

1.1 白桦基因组总 DNA 的分离

以白桦组培幼苗为材料提取白桦基因组总 DNA(DNA 提取试剂盒购于天根公司)。

1.2 引物设计与 PCR 扩增

根据白桦基因组信息(<http://birch.genomics.cn/page/species/index.jsp>)设计引物扩增白桦 *BpSPL2* 基因上游 1 960 bp 的基因序列,并由吉林省库美生物科技有限公司合成。其中上游引物:*BpSPL2*-promoter1F 序列为 TGGAATAGAATCAAAGTCCG;下游引物:*BpSPL2*-promoter1R 序列为 CTCAAGTTTATCGGTCATGT。50 μ L PCR 反应体系包括 2.5 μ L 白桦基因组 DNA、5 μ L 10 \times PCR Buffer(for KOD-Plus-Neo)各 1.25 μ L 上下游引物、3 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ MgSO₄、31 μ L 无菌水、5 μ L 2 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 以及 1 μ L KOD-Plus-Neo(TOYOBO)。PCR 反应条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,变性 98 $^{\circ}$ C 10 s,退火 60 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1.5

min 30 个循环, 72℃再延伸 7 min 后中止反应。

1.3 目的片段克隆及测序分析

PCR 产物利用 1% (g/v) 琼脂糖凝胶电泳检测, 加 A 尾后使用试剂盒(天根公司)回收、纯化目的片段, 克隆目的片段于 pMD18-T 载体上(Invitrogen)转化大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 感受态细胞, 经菌落 PCR 筛选获得阳性克隆, 送由吉林省库美生物科技有限公司测序。

1.4 启动子序列分析

利用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线分析软件, 对克隆得到的 *BpSPL2* 基因启动子序列进行元件分析。

1.5 植物表达载体构建

根据 *BpSPL2* 基因启动子序列设计酶切引物, F: GCGGATCCGGAATAGAAATCAAAGTCGC (下划线标记为 *Bam*H I 酶切位点), R: GCAAGCTTCTCAAGTTTATCGGTCATGT (下划线标记为 *Hind* III 酶切位点)。从 1.3 中获得的阳性克隆菌株中提取质粒, 用酶切引物进行 PCR 胶回收后, 同时将启动子和植物表达载体 pBI121-*GUS* 进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 回收纯化的目的片段通过 T₄ DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 经抗性筛选和菌落 PCR 检测获得阳性克隆, 提取阳性重组质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定, 获得重组植物表达载体, 命名为 pBI121-*BpSPL2* promoter : *GUS*。

1.6 菌液的制备及转化

通过冻融法将 pBI121-*BpSPL2* promoter : *GUS* 表达载体转化到根癌农杆菌 EHA105 中。挑取农杆菌单菌落在 5 mL 的 LB 液体培养基中 28℃ 过夜培养, 次日上午将该菌液用新鲜 LB 稀释至 OD 值 0.1 左右, 然后再进行培养, 待菌液至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.7 时, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体, 用于拟南芥和白桦的瞬时侵染。拟南芥转化方法参照郭勇等^[22], 白桦转化方法参见李萌等^[23]。每个试验取 10 个植株, 重复 3 次。

1.7 GUS 染色

X-GLUC 染色液配制(100 mL) 200 mmol·L⁻¹ 的 pH=7.0 的磷酸缓冲液 50 mL; 100 mmol·L⁻¹ 的 Na₂ EDTA 溶液 10 mL; 5 mmol·L⁻¹ 的 K₃[Fe(CN)₆] 10 mL; 5 mmol·L⁻¹ 的 K₄[Fe(CN)₆] 10 mL; 0.1% Triton-100; X-Gluc 60 mg, 然后加水定容

至 100 mL。

将侵染处理后的拟南芥和白桦幼苗分别放入 50 mL 离心管中, 各加入 GUS 染色液浸没植株, 37℃ 恒温黑暗中过夜染色, 再用 V(乙醇):V(乙酸)=3:1 脱色液脱色约 1 h, 其间适时更换脱色液, 然后取出, 观察染色结果。

2 结果与分析

2.1 白桦 *BpSPL2* 基因上游序列的获得

通过 PCR 得到大小约为 2 000 bp 的条带, 与预期片段大小相近。电泳分离回收后克隆至 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经菌落 PCR 能得到长度一样大小的 DNA 片段, 经过测序对比后, 与在白桦基因组中查找的序列一致, 说明该基因片段已经克隆入 pMD18-T 载体。

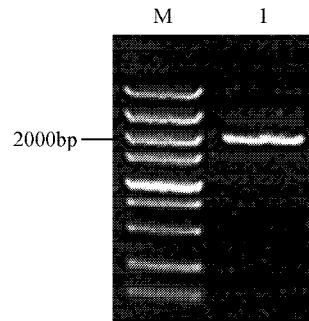


图 1 PCR 产物电泳图谱 M. DL-5000 Marker; 1. PCR 产物
Fig.1 Electrophoretogram of PCR product M. DL-5000 Marker; 1. PCR product

2.2 白桦 *BpSPL2* 基因启动子序列分析

利用 PLACE 和 PlantCARE 在线软件对启动子序列进行分析, 发现该序列中除了含有启动子的基本转录元件 TATA-box、CAAT-box, 同时还含有其它多种作用元件。其中包括 3 种脱水响应元件 (MYCATRD22、MYCCONSENSUSAT、ACGTATERD1), 3 种伤害响应元件 (DOFCOREZM、WBOXNTERF3、WBOXATNPR1), 2 种激素响应元件 (ARR1AT、WRKY71OS), 2 种光调控相关元件 (IBOXCORE、GATA-box), 1 种低温响应元件 (MYCCONSENSUSAT) 等。

值得注意的是, 该启动子同时含有 2 种与花粉特异性表达有关的顺式作用元件 POLLEN1LELAT52 (AGAAA) 和 GTGANTG10 (GTGA), 其中 AGAAA 序列有 4 个, GTGA 序列有 4 个。由此可以推测, 该基因启动子在某个时期可能驱动基因参与白桦的开花调节, 非生物胁迫响

应 激素响应及光响应等生物学过程中。具体的作用元件名称、元件序列、个数及其生物学功能如表 1 所示。

2.3 植物表达载体的构建

将 *BpSPL2* 启动子和 pBI121 载体质粒分别进

行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,回收纯化目的片段,通过 T₄ DNA 连接酶连接。新的重组质粒经菌液 PCR 检测后得到 2 000 bp 左右的单一条带(图 2)。经测序比对后验证连接正确,植物表达载体 pBI121-*BpSPL2* promoter :*GUS* 构建成功(图 3)。

>promoter SPL2

```

CTCAAGTTTATCGGTTCATGTAATAAAATTGTTAGCCCTTATGTTGGGTGTCGGATTCGAATTGTGTCGAGACATGAA[TATA]A
                                                                 TATA-box
GGT[TATA]TAAG[CAAT]CATAAAACGACTCATTTAATTAATGGATCAAATCTTTCAACCTTAATCCATTAATTTTATGTTAG
TATA-box  CAAT-box
GTTTTTGTAATAAAAAATTTAGCCTCTAAAATCTAATTGCCATCCTTTAAAATGC[TATA]AAATATTTAATGAGCAAGAATG
                                                                 TATA-box
ACAAATGGCATGAAAATGGCTTCCCCAGCTGG[AGAAA]GACCTTGCAAAGAGGGTGCATATGCATAGTTGAATGGGTCACT
POLLENILELAT52
GATGATTGGAATTTGGCTTAAGTGT[TATA]AAAAGAGTTACAGATGATGTAGTTTTTTAAGAGTTTAGGTTTAGTTTCACTTT
TATA-box
TTCATTGAACACTTGAAATTAATATGAAC[CAAT]AAAAAAAT[TATA]ACATAGGTGTTATTTTTACGTTGTCTGAATTTTAC
CAAT-box  TATA-box
AAAATTTTAAATCATCTAATAAAGATGT[TATA]AAACCCAACTACTCC[CAAT]AAATAAATCCCA[CAAT]CTATTAATGATTCA
TATA-box  CAAT-box  CAAT-box
T[TATA]ATTTATTTAAAAG[TATA]AATTTTTAAATTAT[GTGA]ATTTAAGATATTTTT[TATA]TTGAACATTGTAAACAAA[CTA]
TATA-box  TATA-box  GTGANTG10  TATA-box  TATA-box
[TAT]ATTTAAAATACGGCATGTATTTCAAGCAGTCAAAAAAGGCTTTCCTTTCAAATGTTTTTTCTTTATTTTTCAAGAGACA
CTTCTTTCT[CAAT]GAAGTAAAAAAA[CAAT]TTTTAGCTCAAACATTATCTACGAGAATCAGACAAAA[TATA]CTTAATTTTT
CAAT-box  CAAT-box  TATA-box
TATTTAATAACATATCACAAAAAAAAT[TATA]AGAATCGTTATCCCGTTCTAAGCTAATCG[AGAAA]ACTCCCCTCTCTTA
TATA-box  POLLENILELAT52
AGTTAAAATTGGAACAACCTACTAATGATAAGATGGTCCGAGGTTTCACATGCCAACATGCGGTAACCTTTGATTAGGAGG
CTAATTAAGTATTTAAAACAAGGGCATGGGAGCAACATGAGGCACAGCTAAGTT[CAAT]TGTTCTTCAACGACACGATACCT
CAAT-box
TTTCCATTTGTCCCTGTAAATAGAAAGGAAAGATGGGTCCTAAACAGGAATTTACGCTCTCTCAAAGCTACAAAAGAC
CTCGACATGCTTTTGTACAGAGTAGTGAAATCATGTTGACTCGCAGTGATCTCCTTCGACCTCACC[CAAT]CTTGAAAG
CAAT-box
C[AGAAA]GACCATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTTATTCAAAGAACAGCACTTACCCGTTCCATTGTCTTTTCTGCTATCT
POLLENILELAT52
TTTTTCATTTG[TATA]TTCCGTTTGGTCCCG[AGAAA]CTGTATCAAAGAGAAGTAAAGCATGTTAATCTTTAGCTACCAGT
TATA-box  POLLENILELAT52
TCGIATCTGAACATTTTTTCAITTACTGTACGTTTGATTGTCCTTTTTATTTTTCTTTTCTCTGATTTCTTCGCAGCCAAA
TGGAGCATGATTTGCA[TATA]TACTCCTTTTTATCTCAT[GTGA]TATGTTAGGACTCTGAGTGCTCTTTCTAGTTTTGGCA
TATA-box  GTGANTG10
ACCTGGAAGTGAATTTTTGCTTTGTCTTTGGATTGAGATGGCATATGAT[CAAT]GTTGTTTCAGTGCTTTAGTTTTAGTTCT
CAAT-box
GGGTCAGTTT[CAAT]TCTATGATTGTTAAAGCTAATGCTTTTATTTGTTTCTG[CAAT]GCTAATTCATATGATATGTGTTTG
CAAT-box  CAAT-box
[TATA]TATGTGCTTATGTCTCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTAATTACATTAATGATTTATGTATGCATTAATGTTTCTTACC
TATA-box
CATATCACTTTTAAATAATAGAATTTGG[CAAT]TCTGGGTTGAATTGAAGACCG[GTGA]TTTTCTTTTGGTAAGTTGCAGAA
CAAT-box  GTGANTG10
GG[GTGA]TGTGTGTTCTCTTTTGTGAATTTTGCAGG[CAAT]TTGCATCATTGCATAATTTCTGCGACTTTGATTCTATTCCAT
GTGANTG10  CAAT-box
G

```

图 2 白桦 *BpSPL2* 基因启动子序列

Fig. 2 Promoter sequence of *BpSPL2* gene for *B. platyphylla*

表 1 启动子顺式作用元件分析

Table 1 Analysis of promoter elements

元件名称 Element names	基序序列 Motif sequences	个数 Numbers	生物学功能 Function
TATA-box	TATA	15	核心启动元件 Core actuating element
CAAT-box	CAAT	13	启动子增强区保守元件 Conservative element of promoter enhance region
POLLEN1LELAT52	AGAAA	4	花粉特异表达的顺式作用元件 Cis-acting element for pollen specific expression
GTGANTG10	GTGA	4	花粉特异表达的顺式作用元件 Cis-acting element for pollen specific expression
CURECORECR	GTAC	2	铜离子响应元件 Copper ion responsive element
IBOXCORE	GATAA	1	光调控相关元件 Optical control related element
GATA-box	GATA	5	光调控相关元件 Optical control related element
MYCATRD22	CACATG	1	脱水及 ABA 响应元件 Dehydration and ABA response element
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	14	脱水及寒冷响应元件 Dehydration and cold response element
TATABOX5	TTATTT	6	启动子保守序列 The promoter conservative sequence
circadian	CAANNNNATC	1	生理周期调控元件 Physiological cycle control element
ARR1AT	NGATT	12	细胞分裂素响应元件 Cytokinin response element
WRKY710S	TGAC	2	赤霉素响应元件 Gibberellin response element
DOFCOREZM	AAAG	14	伤害响应元件 Damage response element
WBOXNTERF3	TGACY	1	伤害响应元件 Damage response element
WBOXATNPR1	TTGAC	1	伤害响应元件 Damage response element
CCAAT-box	CCAAT	2	热激信号响应元件 Heat shock signal response element
Skn-1-motif	GTCAT	1	胚乳表达调节元件 Endosperm expression regulatory element
ACGTATERDI	ACGT	2	与脱水有关的基因作用元件 Gene action element related to dehydration

注:基序序列 :Y = C/T ,N = A/T/G/C

Note : Motif sequences :Y = C/T ,N = A/T/G/C

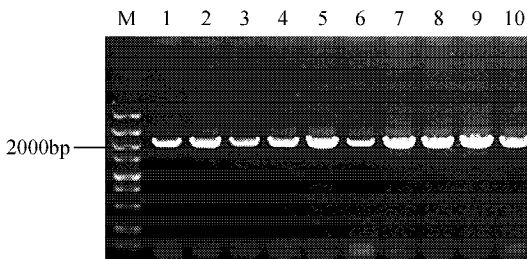


图 3 农杆菌重组质粒的 PCR 检测 M. DL-5000 Marker ; 1 ~ 10. 阳性鉴定产物

Fig. 3 PCR result of positive *Agrobacterium tumefaciens* clone M. DL-5 000 Marker ; 1 - 10. Positive identification product

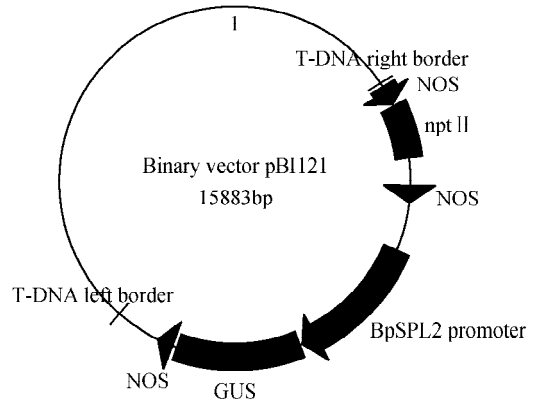


图 4 白桦 pBI121-*BpSPL2* promoter :*GUS* 植物表达载体的构建

Fig. 4 Construction of pBI121-*BpSPL2* promoter :*GUS* plant expression vector of *B. platyphylla*

2.4 白桦 *BpSPL2* 基因启动子在白桦中的表达活性

为了研究 *BpSPL2* 启动子的表达特征,我们将构建好的 pBI121-*BpSPL2* promoter :*GUS* 表达载体分别瞬时转化至白桦和拟南芥,然后进行 GUS 染色分析。

以白桦组培养为受体,采用农杆菌介导的瞬时表达法对启动子活性进行分析,结果表明,经过 *BpSPL2-GUS* 侵染的白桦幼苗的根、茎、叶及芽经 GUS 染色后均呈蓝色(图 5A),其中以幼叶、芽及根部的 GUS 染色较深,说明 *GUS* 基因在上述组织中的表达量较高,未转化材料即阴性对照无任何 *GUS* 表达活性。

2.5 白桦 *BpSPL2* 基因启动子在拟南芥中的表达活性

对含有 pBI121-*BpSPL2* promoter :*GUS* 报告载体的拟南芥植株进行染色,观察启动子启动活性及组织表达特异性。经 GUS 染色后的对照组未显蓝色。经含有目的启动子的表达载体工程菌液侵染后,植株的花、叶片、根部呈现蓝色(图 6),其中以花中的表达活性最为显著。解剖 GUS 染色后的花器官发现,*BpSPL2* 基因启动子在花瓣、花药、雌蕊中强烈表达,在萼片中微量表达(图 7)。表明克隆获得的白桦 *BpSPL2* 基因 1 960 bp 启动子区具有驱动 *GUS* 表达活性的能力,在根、叶片和花中均具有表达活性。

3 讨论

白桦(*Betula platyphylla*)为雌雄同株,单性花,

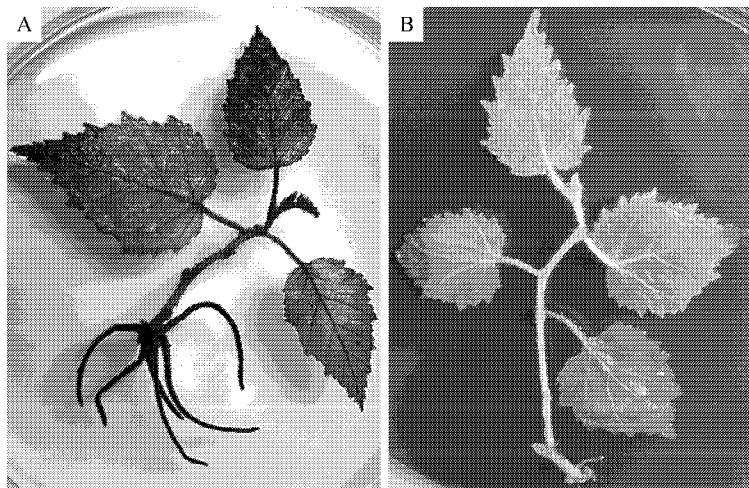


图 5 白桦 GUS 组织特异性染色植株 A. pBpSPL2 :GUS 农杆菌侵染后白桦的 GUS 染色 ;B. 未经侵染的野生型白桦 GUS 染色

Fig. 5 Tissue-specific staining of GUS in *B. platyphylla* A. GUS staining of infected *B. platyphylla* ;B. GUS staining of control group

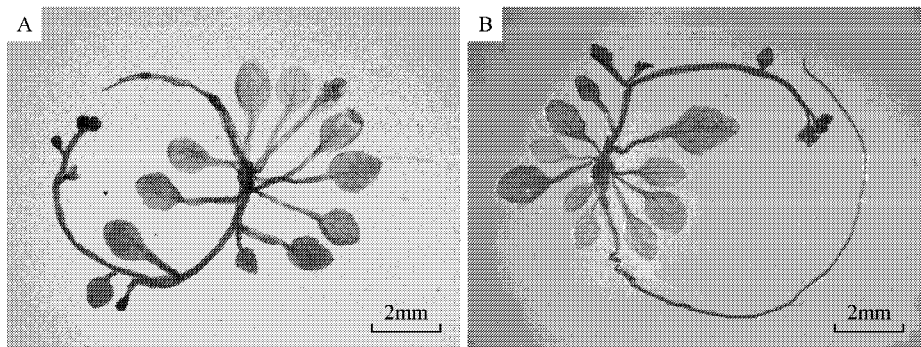


图 6 拟南芥 GUS 组织特异性染色植株 A. pBpSPL2 :GUS 农杆菌侵染后的拟南芥 GUS 染色 ;B. 未经侵染的野生型拟南芥 GUS 染色

Fig. 6 Tissue-specific staining of GUS in *A. thaliana* A. GUS staining of infected *A. thaliana* ;B. GUS staining of control group

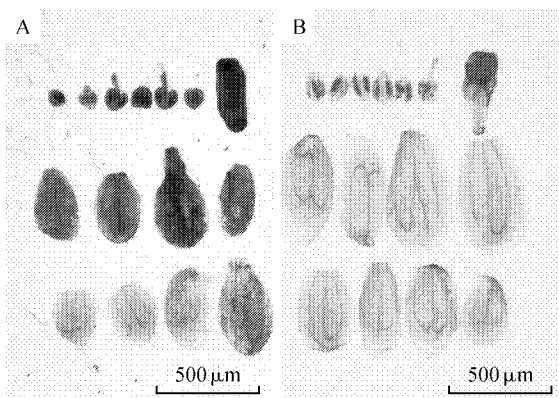


图 7 拟南芥花器官 GUS 染色结果 A. pBpSPL2 :GUS 农杆菌侵染后的拟南芥花器官 GUS 染色 ;B. 未经侵染的野生型拟南芥花器官 GUS 染色

Fig. 7 GUS expression in floral organs of *A. thaliana*

A. GUS expression in floral organs of infected *A. thaliana* ;b. GUS expression in floral organs of control group

雄花发育非常特殊,发育周期长达近一年,并以单核小孢子越冬,是一种研究单性花发育的理想试材。对白桦花发育的研究可以为今后进行白桦花发育的分子调控、定向培育及遗传改良提供理论依据,也可为具有较长生殖周期的林木花发育机制提供参考信息。*BpSPL2* 是白桦 *SPL* 基因家族的一员,*SPL* 基因家族在植物花发育中起重要作用^[6]。相较于其他拟南芥 *SPL* 基因,*BpSPL2* 与 *AtSPL6*、*AtSPL13* 基因具有较高的同源性。*AtSPL6* 在先天免疫中起重要作用,它能够与核定位的免疫受体结合激活防御基因的转录^[24]。过表达 *AtSPL13* 能部分恢复 *sp18* 花药败育的表型,原位杂交实验表明 *AtSPL13* 在花药发育的第五阶段的绒毡层细胞中表达^[25]。

pBpSPL2-GUS 在拟南芥花药中具有较高的表达活性(图 7),这暗示 *BpSPL2* 基因可能具有与

AtSPL13 相似的参与花药发育的功能。同样,与 *BpSPL2* 同源性较高的亮叶桦 *BISPL11* 在雄花序发育的中间阶段也具有较高的表达量^[26]。

顺式作用元件是同一 DNA 分子中具有特殊功能的转录因子 DNA 结合位点和其它调控基序,在基因转录起始调控中起重要作用。*BpSPL2* 基因启动子区域除了含有启动子的基本转录元件 TATA-box、CAAT-box,同时还含有其它多种作用元件。其中包括激素响应元件 (ARR1AT、WRKY71OS),光调控相关元件 (IBOXCORE、GATA-box),胚乳表达必须的顺式调控 *skn-1* 元件及花粉特异表达相关的顺式元件 POLLEN1LELAT52 和 GTGANTG10 元件。对生殖生长阶段各组织器官的生长发育起调控作用的 *BpMADS12*^[27] 和 *BpCUC2*^[28] 基因启动子中存在多个 POLLEN1LELAT52 和 GTGANTG10 元件。另外, *BpSPL2* 基因启动子还包含多个脱水及寒冷响应元件、伤害响应元件,与 *BpSPL2* 基因同源的苜蓿 *SPL13* 被报道参与干旱胁迫^[29],因此推测 *BpSPL2* 基因有可能参与非生物胁迫应答反应。

启动子顺式作用元件分析为揭示白桦 *BpSPL2* 基因的功能提供了方向,而该基因的生物学功能还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

1. Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, et al. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors [J]. *Journal of Molecular Biology* 2004, 337(1): 49 - 63.
2. Usami T, Horiguchi G, Yano S, et al. The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* genes in the control of heteroblasty [J]. *Development* (Cambridge, England) 2009, 136(6): 955 - 964.
3. Manning K, Tör M, Poole M, et al. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening [J]. *Nature Genetics* 2006, 38(8): 948 - 952.
4. Jiao Y Q, Wang Y H, Xue D W, et al. Regulation of *OxS-PL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice [J]. *Nature Genetics* 2010, 42(6): 541 - 544.
5. Unte U S, Sorensen A M, Pesaresi P, et al. *SPL8*, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell* 2003, 15(4): 1009 - 1019.
6. Zhang Y, Schwarz S, Saedler H, et al. *SPL8*, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental

- processes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(3): 429 - 439.
7. Becraft P W, Bongard-Pierce D K, Sylvester A W, et al. The *liguleless-1* gene acts tissue specifically in maize leaf development [J]. *Developmental Biology*, 1990, 141(1): 220 - 232.
8. Wang Y, Hu Z L, Yang Y X, et al. Function annotation of an SBP-box gene in *Arabidopsis* based on analysis of co-expression networks and promoters [J]. *International Journal of Molecular Sciences* 2009, 10(1): 116 - 132.
9. Wu G, Poethig R S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *mir156* and its target *SPL3* [J]. *Development* (Cambridge, England) 2006, 133(18): 3539 - 3547.
10. Yamaguchi A, Wu M F, Yang L, et al. The Micro RNA-regulated SBP-Box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL* and *APETALA1* [J]. *Developmental Cell* 2009, 17(2): 268 - 278.
11. Stone J M, Liang X W, Neel E R, et al. *Arabidopsis AtSPL14*, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1 [J]. *The Plant Journal* 2005, 41(5): 744 - 754.
12. Gao R M, Gruber M Y, Amyot L, et al. *SPL13* regulates shoot branching and flowering time in *Medicago sativa* [J]. *Plant Molecular Biology* 2018, 96(1 - 2): 119 - 133.
13. Yu N, Niu Q W, Ng K H, et al. The role of *miR156/SPLs* modules in *Arabidopsis* lateral root development [J]. *The Plant Journal* 2015, 83(4): 673 - 685.
14. Länneppää M, Jänönen I, Hölttä-Vuori M, et al. A new SBP-box gene *BpSPL1* in silver birch (*Betula pendula*) [J]. *Physiologia Plantarum* 2004, 120(3): 491 - 500.
15. Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database : 1999 [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 27(1): 297 - 300.
16. Wei H, Meilan R, Brunner A M, et al. Transgenic sterility in *Populus*: expression properties of the poplar *PTLF*, *Agrobacterium NOS* and two minimal 35S promoters in vegetative tissues [J]. *Tree Physiology* 2006, 26(4): 401 - 410.
17. 陈聪. 茶树花特异表达启动子——花粉壁蛋白基因启动子表达研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009.
Chen C. Study on *Cpcc* (pollen coat protein gene) promoter expression of Tea Plant (*Camellia sinensis*) [D]. Hefei: Anhui Agriculture University, 2009.
18. 郑万钧. 中国树木志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1985.
Zheng W J. Records of Chinese Trees [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1985.

19. 刘雪梅, 杨传平. 白桦雌雄花发育周期的时序特征[J]. 林业科学, 2006, 42(12): 28-32.
Liu X M, Yang C P. Temporal characteristics of developmental cycles of female and male flowers in *Betula platyphylla* in Northeastern China[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2006, 42(12): 28-32.
20. 许思佳, 颜斌, 董京祥, 等. 白桦 *BpBEE1* 基因启动子的表达特性分析[J]. 植物研究, 2018, 38(2): 247-253.
Xu S J, Yan B, Dong J X, et al. Analysis of *BpBEE1* gene promoter in *Betula platyphylla*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2018, 38(2): 247-253.
21. 官民晓, 刘雪梅, 张妍, 等. 白桦 *SPL8* 转录因子基因的分离及转录表达分析[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2013, 37(3): 17-22.
Guan M X, Liu X M, Zhang Y, et al. Isolation and transcription expression analysis of *SPL8* transcription factors gene of *Betula platyphylla*[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2013, 37(3): 17-22.
22. 郭勇, 王玉成, 王智博. 一种基于农杆菌介导的拟南芥瞬时转化技术优化[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(6): 41-44, 83.
Guo Y, Wang Y C, Wang Z B. Optimizing transient genetic transformation method on *Arabidopsis* plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2016, 44(6): 41-44, 83.
23. 李萌, 哈努拉·塔斯肯, 陈卓, 等. 白桦 *4CL* 基因启动子克隆及表达分析[J]. 中国农学通报, 2017, 33(5): 29-34.
Li M, Tasiken H, Chen Z, et al. Cloning and expression analysis of *4CL* gene promoter of *Betula platyphylla*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(5): 29-34.
24. Padmanabhan M S, Ma S S, Burch-Smith T M, et al. Novel positive regulatory role for the SPL6 transcription factor in the N TIR-NB-LRR receptor-mediated plant innate immunity[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(3): e1003235.
25. Xing S P, Salinas M, Höhmann S, et al. miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(12): 3935-3950.
26. Li X Y, Lin E P, Huang H H, et al. Molecular characterization of *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* gene family in *Betula luminifera*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 608.
27. 杨洋, 王子佳, 李慧玉, 等. 白桦 *BpMADS12* 基因启动子的克隆及表达分析[J]. 西南林业大学学报, 2016, 36(1): 9-15.
Yang Y, Wang Z J, Li H Y, et al. Cloning and expression analysis of *BpMADS12* promoter from *Betula platyphylla*[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2016, 36(1): 9-15.
28. 王遂. 欧洲白桦 *BpCUC2* 基因及其启动子的克隆与功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
Wang S. Isolation and functional analysis of the *BpCUC2* gene and its promoter in *Betula pendula*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2015.
29. Arshad M, Feyissa B A, Amyot L, et al. MicroRNA156 improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing SPL13[J]. Plant Science, 2017, 258: 122-136.