

水稻 *Xa1* 基因启动子的克隆及功能分析

牟少亮^{1,3}, 官德义^{2,3}, 林琳³, 赖燕^{1,3}, 何水林^{2,3}

(¹ 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002; ² 福建农林大学作物科学学院, 福州 350002;

³ 作物遗传改良与综合利用教育部重点实验室, 福州 350002)

摘要: *Xa1* 是一个能对日本白叶枯病优势小种(小种 1 号)产生专化性抗性的 R 基因, 虽已有该基因克隆、表达和功能方面的研究, 但对其表达调控分子机制还不很清楚。本研究利用 *Xa1* 启动子与 *GUS* 报告基因的转基因 T₁ 株系, 研究了 *Xa1* 启动子的时空表达及对不同外源激素的应答特征。结果表明, *Xa1* 启动子驱动的 *GUS* 基因在水稻根中的表达量明显高于茎和叶, 且在根部的中柱区 *GUS* 的表达量明显高于周围组织; 在外源 MeJA 作用下 *GUS* 的表达显著增强, 在 SA 和 ABA 处理下也有一定程度的增强, 这些结果暗示 *Xa1* 的抗病作用与其在根系中柱的组织特异性表达存在一定的相关性, MeJA 对 *Xa1* 启动子的活性起重要的调控作用。

关键词: 水稻; *Xa1*; 启动子; 功能分析

Cloning and Functional Analysis of Rice *Xa1* Gene Promoter

MOU Shao-liang^{1,3}, GUAN De-yi^{2,3}, LIN Lin³, LAI Yan^{1,3}, HE Shui-lin^{2,3}

(¹ College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

² College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

³ Crop Genetic Improvement and Utilization Key Laboratory of Ministry of Education, Fuzhou 350002)

Abstract: A bacterial blight resistance gene, *Xa1*, confers a high level of specific resistance to race 1 strains of *Xoo* in Japan. The molecular mechanism of expression regulation of *Xa1* is obscure, though it was cloned and its expression and function were studied. In this paper, we analyzed the temporal and spatial expression and different hormones inducibility of *Xa1* promoter, in the T₁ generation of transgenic rice by fusing *Xa1* promoter with a reporter gene *GUS*. The results indicated that *GUS* expression driven by *Xa1* promoter in roots was higher than in stems and leaves, especially strong in filling post of roots. *GUS* expression was increased significantly treated by MeJA and increased slightly by SA and ABA. These results suggested that the resistance of *Xa1* was related to its tissue-specific expression in filling post. MeJA played a critical role in activity regulation of *Xa1* promoter.

Key words: Rice; *Xa1*; Promoter; Functional analysis

植物在长期的进化中发展了对病原菌的诱导抗性, 由彼此相互关联的 PTI (PAMP-triggered immunity) 和 ETI (effector-triggered immunity) 组成^[1], PTI 是由病原菌关联的保守的分子信号 (pathogen/microbe-associated molecular patterns, PAMP) 所激活, 是非寄主抗性。植物在与病原菌的协同进化过程中又发展了 ETI, 它由抗性基因 (R) 编码蛋白与特异性受体蛋白识别并激活下游的高效防御反应。对

ETI 的开发和利用是水稻抗病分子机制和遗传改良研究的主攻方向^[2]。

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 水稻生产关乎人类粮食安全。白叶枯病是水稻主要病害之一, 常造成水稻严重减产和米质下降^[3]。人类对水稻抗白叶枯病的分子机制进行了大量的研究, 已经报道的白叶枯病抗病主效基因有 30 多个, 其中 *Xa1* 是一个能对日本的白叶枯病优势小种(小种 1 号)

收稿日期: 2011-11-28 修回日期: 2012-02-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30971718); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08001-015B)

作者简介: 牟少亮, 讲师, 博士研究生, 研究方向为植物抗逆基因工程。E-mail: moushaoliang@163.com

通讯作者: 何水林, 博导, 教授, 主要从事作物功能基因组学与遗传改良。E-mail: hsl324@yahoo.com.cn

产生专化性抗性的 R 基因,编码产物为由 1802 个氨基酸组成的胞质蛋白,含有 NBS-LRR 功能域,但没有明显的跨膜结构域^[4-5],*Xa1* 是诱导型的抗病基因,能够被创伤或病原菌胁迫所诱导,其表达量的增加可提高 *Xa1* 与无毒基因互作的效率,提高水稻对白叶枯病的抗性^[4]。但是,关于 *Xa1* 诱导表达的分子机制及相关信号通路的研究还不多见。本研究通过分离 *Xa1* 的启动子,分析其顺式作用元件及其分布,并构建其与 *GUS* 报告基因的转基因水稻株系,利用转基因株系进一步研究了 *Xa1* 表达的时空特异性,及其对不同外源激素处理的诱导表达活力,以进一步阐明 *Xa1* 在水稻抗病中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 启动子的克隆和测序

以 GenBank 上公布的水稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L. *japonica*. cv. Nipponbare) 为参考进行引物设计, *Xa1*-F: 5'-TGGGAACTTCTGAGGGAAA-3'; *Xa1*-R: 5'-TGCAGAGTGAAACTAGGTGG-3', 以日本晴 DNA 作为模板, Takara 公司生产的 ExTaq 高保真酶进行 PCR 反应 (94℃ 30s; 53℃ 60s; 72℃ 120s), 获得 PCR 产物回收并连接到 PMD-18T 载体, 送三博远志生物有限公司测序。

1.2 *Xa1* 启动子的 GUS 融合表达载体构建

利用 Gateway 技术, 分别以 pDNOR-207 和 pMDC163 为入门载体和目的载体。构建了 *Xa1* 启动子的 GUS 融合表达载体。PCR 验证后, 转化到农杆菌 EHA105 菌株中用于水稻转化。

1.3 农杆菌介导的水稻遗传转化及转基因植株的获得

以水稻品种日本晴为受体材料, 愈伤组织的诱导和转化方法参照 Seiichi 等^[6]的方法。

1.4 GUS 蛋白组织化学染色法检测与活性分析

水稻转基因植株不同器官的化学染色分析参照 Jefferson 等^[7]的方法。GUS 酶活的定量分析采用分光光度法, 具体步骤参照曾凡锁等^[8]的方法。以每 1mg 蛋白的酶活力表示 GUS 活性。酶活力单位定义为每 1min 水解 PNPG 生成 1nmol/L 对硝基苯酚的酶量是一个单位。

1.5 水稻处理方法

将收获的 T_1 转基因种子经潮霉素抗性筛选, 培养 7~8d 后取能正常萌发的绿色小苗种到盛有土壤的塑料花盆中。待长到 4~5 叶期选取相同部位的叶片进行处理和取样, 每个株系选择 5 个抗性小苗。机械损伤处理用解剖刀对叶片切割数处 2~3cm 伤口,

12h 后进行取样。水杨酸 (SA, 500 μ mol/L)、脱落酸 (ABA, 100 μ mol/L)、茉莉酸甲酯 (MeJA, 100 μ mol/L) 进行叶面喷洒, 12h 后取叶片进行 GUS 活性分析。

2 结果与分析

2.1 启动子的克隆和序列分析

通过 PCR 反应获得了 1 条大小约为 2000bp 的 PCR 扩增产物 (图 1), 将该 PCR 产物连接到 PMD-18T 载体并测序, 结果表明, 其长度为 2117bp, 与 GenBank 网站上的 *Xa1* 相应的启动子区域 (日本晴) 进行比对, 同源性的 99.54%, 进一步利用网络软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线分析其顺式作用元件, 发现在该 DNA 片段上存在着 MBS、TCA-element、CGTCA-motif 等植物应答逆境的通用顺式作用元件 (图 2)。

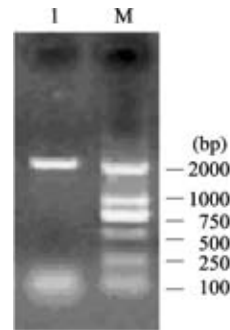


图 1 *Xa1* 启动子的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of promoter of *Xa1*

2.2 *Xa1* 基因启动子时空表达特征分析

将 T_1 转基因植株进行 GUS 染色分析表明, 相对于茎和叶, 根部组织 *Xa1* 启动子活性较强 (图 3)。GUS 活性的定量分析表明 (图 4), 根部的 GUS 活性为叶的 2.80 倍, 茎比叶稍高 (为叶的 1.24 倍)。值得注意的是, 在根尖 (图 3-D) 以及根伸长区的中柱区域 (图 3-E), *Xa1* 启动子活性明显较强。

分别选择 3 叶期 (第 3 片叶)、5 叶期 (第 5 片叶)、8~9 叶期 (第 8 片叶) 的叶片进行 GUS 活性定量分析, 结果表明, 不同的时期水稻叶片中 *Xa1* 启动子活性差异不显著 (图 4)。

2.3 *Xa1* 基因启动子在不同逆境和激素处理下的表达特征分析

本研究结果表明, 相对于未处理的水稻叶片, 机械损伤处理下 *GUS* 基因的表达显著增强 (1.69 倍)。在外源 MeJA 处理后, 转基因水稻株叶片中 *GUS* 基因的表达也显著增强 (1.91 倍), 而外源 SA 和 ABA 对转基因水稻叶片中 *GUS* 基因表达也有一定的影响, 分别达到 1.41 和 1.47 倍 (图 5)。



图2 *Xa1* 基因启动子上的顺式作用元件

Fig.2 cis-elements in the promoter of *Xa1*

TCA-element; SA 应答元件; MBS; 干旱应答元件; TC-rich; 逆境信号应答元件; LTR; 低温应答元件; ABRE; ABA 应答元件;
CGTCA-motif; Me-JA 应答元件; CCGTCC-box; 分生组织表达相关元件

TCA-element; cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness, MBS; MYB binding site involved in drought-inducibility,

TC-rich; cis-acting element involved in defense and stress responsiveness, LTR; cis-acting element involved in low-temperature responsiveness,

ABRE; cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness, CGTCA-motif; cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness,

CCGTCC-box; cis-acting regulatory element related to meristem specific activation

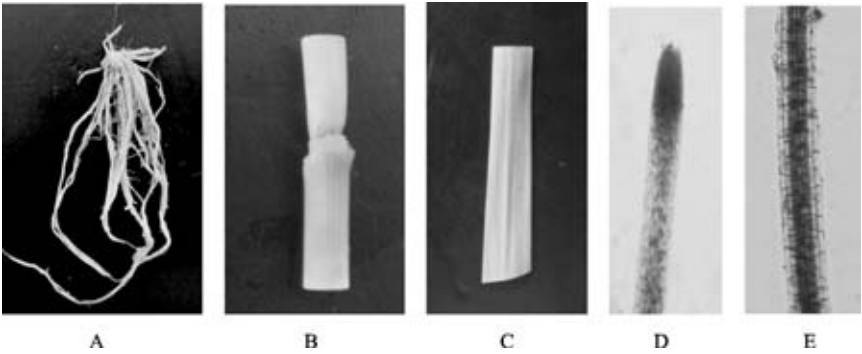


图3 *Xa1* 启动子转基因植株不同器官的 GUS 染色结果

Fig.3 Histochemical staining of GUS driven by promoter of *Xa1* in different organs

A:根;B:茎;C:叶;D:根分生区(100×);E:根伸长区(200×)

A:Roots,B:Stem,C:Leaf,D:Meristematic zone(100×),E:Elongation zone(200×)

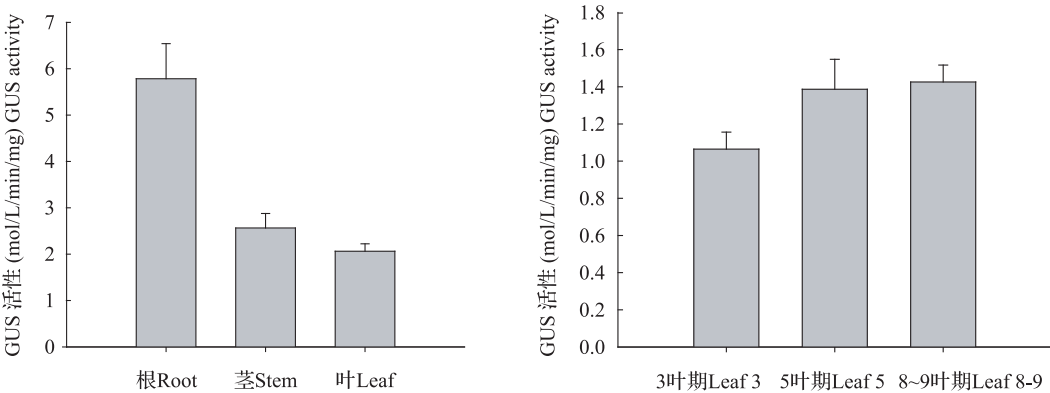


图4 转基因水稻不同器官及不同发育时期的 GUS 活性分析

Fig.4 GUS activity in different organs and in different stages of transformed rice

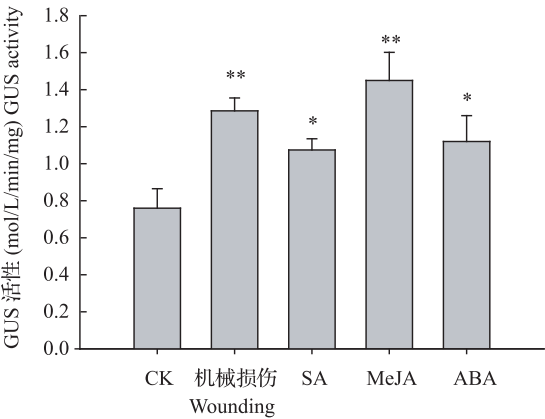


图5 机械损伤和不同激素处理条件下 GUS 活性定量分析

Fig.5 GUS activity induced by wounding and different hormones

* :差异显著, ** :差异极显著

* :significant difference, ** :extremely significant difference

3 讨论

利用启动子驱动的 *GUS* 报告基因,不仅可以研究基因的时空表达特征,同时还可以揭示基因的表

达、转运过程和诱导因素之间的关系^[9]。*Xa1* 基因启动子驱动的 *GUS* 基因在根系中表达显著高于其他器官,说明根部很可能是 *Xa1* 基因抗病蛋白合成的主要场所。在转录水平上,*Xa1* 在侧根中柱部位表达量明显较强。中柱由中柱鞘细胞、木质部、韧皮部和薄壁细胞 4 部分组成。白叶枯病是一种维管束疾病,病菌从叶片的水孔、伤口或茎基和根部的伤口侵入,*Xa1* 的这种表达模式与白叶枯病抗病基因的功能非常吻合,在维管束中的特异性高效表达可以最有效地起到抗病作用。这一点与其他的抗白叶枯病基因 (*Xa3/Xa26*) 也有一定的相似之处^[10]。

对水稻 *Xa1* 启动子的元件预测分析,发现 TC-rich、TCA-element、CGTCA-motif 等植物应答逆境的通用顺式作用元件。*Xa1* 启动子对 MeJA 的强烈应答特征,可能与启动子区的 2 个 MeJA 应答元件 (CGTCA-motif) 相关。在转基因植株根尖部位 GUS 活性较高可能与 1 个分生组织表达相关的 CCGTCC-box 元件有关。在下一步试验中将通过启动子的缺失分析,以明确这些元件对 *Xa1* 启动子中的影响。

前人研究发现,JA(或 MeJA)在创伤或病原菌激发子处理后的植物体内会大量累积,并可以在植物体内(包括细胞内)进行传递^[11]。JA 和 SA 在植物 ETI 中的信号传导过程中都能起重要的调节作用^[12]。本研究结果发现,外源 MeJA 可以显著地增强 *Xa1* 启动子驱动的 *GUS* 表达,说明 MeJA 对 *Xa1* 启动子的活力起重要的调控作用,而 SA 和 ABA 只能起到一定的调控作用。

参考文献

- [1] Schwessinger B, Zipfel C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(4): 389-395
- [2] 吴俊, 刘雄伦, 戴良英, 等. 水稻广谱抗稻瘟病基因研究进展[J]. *生命科学*, 2007, 19(2): 233-238
- [3] 翟文学, 朱立煌. 水稻白叶枯病抗性基因的研究与分子育种[J]. *生物工程进展*, 1999, 19(6): 9-15
- [4] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, et al. Expression of

Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(4): 1663-1668

- [5] 鄂志国, 王磊. 水稻抗病性基因的克隆和功能研究进展[J]. *遗传*, 2009, 31(10): 999-1005
- [6] Seiichi T, Naho H, Kazuko O. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice[J]. *Plant J*, 2006, 47: 969-976
- [7] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5(1): 387-405
- [8] 曾凡锁, 钱晶晶, 康君, 等. 转基因白桦中 *GUS* 基因表达的定量分析[J]. *植物学报*, 2009, 44(4): 484-490
- [9] 李婵娟, 杨世湖, 武亮, 等. *pib* 基因启动子及其诱导启动性初探[J]. *遗传*, 2006, 28(6): 689-694
- [10] 徐雷, 李香花, 王石平. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa3/Xa26* 家族成员的表达模式分析[J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(6): 559-563
- [11] 王妮妍, 蒋德安. 茉莉酸及其甲酯与植物诱导抗病性[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(3): 279-283
- [12] Tsuda K, Katagiri F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(4): 459-465

欢迎订阅 2013 年《果树学报》

《果树学报》是中国农业科学院郑州果树研究所主办的国家级学术期刊, 中国农林水产类权威学术期刊, 中文园艺学核心期刊, 中国科技核心期刊, 已被美国化学文摘、俄罗斯文摘杂志、英国 CABI 等 20 余种国内外重要数据库收录。据《中国科技期刊引证报告》统计结果,《果树学报》的影响因子达 0.954, 已成为国内外有影响的学术期刊之一。《果树学报》着重选发密切结合我国果树科研、教学、生产实际, 反映学科学术水平和发展动向的优秀稿件, 及时报道重大科研成果、阶段性成果和科研进展情况。栏目设置有种质资源·遗传育种·分子生物学、栽培·生理·生态、植物保护·果品质量与安全、贮藏·加工、专论与综述、技术与方法、新品种选育报告等。读者对象为果树学科的科研人员、高等农业院校师生及基层果树管理技术人员。

本刊为双月刊, 2013 年每期 160 页码, 定价 20 元, 全年 6 期共 120 元。邮发代号: 36-93, 国际代号 BM/1107。欢迎投稿, 欢迎订阅。

地址: (450009) 中国农业科学院郑州果树研究所

电话: 0371-63387308 传真: 0371-63387308

E-mail: chinagxb@163.com

2013 年《草地学报》征订启事

《草地学报》是中国科协主管、中国草学会主办、中国农业大学草地研究所承办的学术刊物, 主要刊登国内外草地科学研究及相关领域的新成果、新理论、新进展, 以研究论文为主, 兼发少量专稿、综述、简报和硕博论文精要, 主要面向从事草地科学、草地生态、草地畜牧业和草坪业及相关领域的高校师生和科研院、所、站的科研人员。本刊从 2012 年 6 月 20 日正式开始在线投稿和审稿, 欢迎各位审稿专家、作者和读者通过本刊网站 (<http://www.cdxb.org>) 进行审稿、投稿和查阅。

《草地学报》为中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国农业核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊。

双月刊, 逢单月月末出版, 国内外公开发行(国内邮发代号: 80-135; 国外代号: Q1949), 每期定价 20 元, 全年 120 元。若错过邮订时间, 可直接向本刊编辑部订购(中国草学会会员订阅可优惠 25%)。

地址: (100193) 北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农大动科大楼 152 室

电话: 010-62733894

E-mail: cdxb@cau.edu.cn

网址: <http://www.cdxb.org>