

藤稔葡萄花发育相关基因启动子的克隆及功能分析

张 睿, 陶建敏, 蔡斌华, 章 镇^①

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用基于热不对称交错式 PCR 的基因组步移法, 从藤稔葡萄 (*Vitis vinifera* × *V. labrusca* ‘Fujiminori’) 的基因组总 DNA 中扩增花发育相关基因 *FT*、*FLC*、*AP3* 和 *AG* 的启动子上游序列片段, 并通过序列分析及 PlantCARE 在线预测对 *FT*、*FLC* 和 *AP3* 启动子片段的序列及顺式调控作用元件和功能进行了分析。扩增结果表明: *AG* 的第 1 轮扩增产物无明显条带, 第 2 轮扩增产物条带弥散, 不能用于序列分析及顺式调控作用元件和功能分析; *FT*、*FLC* 和 *AP3* 基因 2 轮扩增产物均有特异条带, *FT*、*FLC* 和 *AP3* 启动子序列的实际长度分别为 1 470、1 698 和 1 061 bp, GenBank 登录号分别为 HM192806、HM192805 和 HM192804。PlantCARE 在线预测结果表明: *FT*、*FLC* 和 *AP3* 启动子片段中均含有 TATA-box、CAAT-box 等启动子的特异表达元件及光响应元件、真菌刺激响应元件、MYB 结合位点等多个顺式调控作用元件, 共同受真菌刺激、MYB 和光等因素的调控; *FT*、*FLC* 和 *AP3* 均可能在花的分生组织中表达, 且 *FT* 和 *AP3* 还可能在胚乳中表达。根据研究结果推测: *FT*、*FLC* 和 *AP3* 基因的启动子序列片段中均存在多种诱导响应元件, 可能均为诱导型启动子。

关键词: 藤稔葡萄; 花发育相关基因; 启动子; 克隆; 序列分析; 顺式调控作用元件

中图分类号: Q943.2; S663.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)04-0017-07

Cloning and function analysis of promoters of flower development related genes of *Vitis vinifera* × *V. labrusca* ‘Fujiminori’ ZHANG Rui, TAO Jian-min, CAI Bin-hua, ZHANG Zhen^① (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(4): 17-23

Abstract: Using genome walking method based on thermal asymmetric interlaced PCR, upstream sequence fragments of promoters of flower development related genes *FT*, *FLC*, *AP3* and *AG* were amplified from the total genomic DNA of *Vitis vinifera* × *V. labrusca* ‘Fujiminori’, and sequence and *cis*-acting regulatory elements and functions of promoter fragments of *FT*, *FLC* and *AP3* were analyzed by methods of sequence analysis and PlantCARE on-line prediction. The amplification results show that bands of the first round amplification products of *AG* are not obvious while those of the second round amplification products are dispersed, so it can not be used for analyses of sequence and *cis*-acting regulatory element and function. And the two round amplification products of *FT*, *FLC* and *AP3* all have special bands, actual length of promoter sequences of *FT*, *FLC* and *AP3* is 1 470, 1 698 and 1 061 bp, and GenBank accession number is HM192806, HM192805 and HM192804, respectively. The results of PlantCARE on-line prediction show that promoter fragments of *FT*, *FLC* and *AP3* all have promoter specific elements such as TATA-box and CAAT-box, etc, and *cis*-acting regulatory elements such as light responsive element, fungal elicitor responsive element, MYB binding site, etc. And their expression may be controlled by fungal elicitor, MYB, light and other factors. *FT*, *FLC* and *AP3* may express in floral meristem, and *FT* and *AP3* may also express in endosperm. According to the results, it is conjectured that promoter fragments of *FT*, *FLC* and *AP3* all contain many induction-responsive elements, which may be inducible promoters.

Key words: *Vitis vinifera* × *V. labrusca* ‘Fujiminori’; flower development related gene; promoter; cloning; sequence analysis; *cis*-acting regulatory element

收稿日期: 2011-06-14

作者简介: 张 睿(1984—), 女, 河北廊坊人, 硕士研究生, 主要从事果树分子生物学研究。

^①通信作者 E-mail: zhangzhen_nj@hotmail.com

基因的表达有着严格的时间及空间顺序。开花诱导调控普遍存在于高等植物中,当植物生长到一定时期后,在外界适宜环境条件的诱导下启动自身发育程序,由营养生长转入生殖生长。*FT* (*FLOWERING LOCUS T*)、*AP3* (*APETALLA3*)、*AG* (*AGAMOUS*) 和 *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) 是调控成花时间及花器官原基分化与发育的关键基因。*FT* 基因为重要的成花转变信号,是多个成花途径的交汇作用基因^[1],*FT* 与 *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) 基因的表达均可被光周期途径正向调控,且 *FT* 可通过 *CO* (*CONSTANS*) 基因调节 *SOC1* 的表达^[2]。*FLC* 基因是调控春化作用需求和响应的关键基因之一,是具有抑制成花转变作用的 MADS-box 转录因子^[3],可直接阻遏 *FT* 和 *SOC1* 的表达^[4],且 *FLC* 的表达与多种正负调节因子紧密相关;春化作用可减弱 *FLC* 对成花的抑制能力,*FRI* (*FRIGIDA*) 及 *FRI* 类似基因均可增强 *FLC* 的抑制作用^[5]; *FLC* 的作用部分依赖于另一 MADS 蛋白 *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*)^[6],自主途径也可通过下调 *FLC* 基因表达促进成花^[7]。*AP3* 基因在启动花瓣和雄蕊发育程序中有 B 类基因的功能,并在花的第 2 轮和第 3 轮器官发育中表达。*AG* 基因在雄蕊和心皮的发育中起 C 类基因的作用^[8],可能在花发育后期表达,并直接调控细胞内特异基因的表达。

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^[9]。启动子通过选择性影响目的基因的转录水平来调节基因的表达量,并可限定基因在特定时空条件下的表达,在基因工程中具有广阔的应用前景。

基于热不对称交错式 PCR 的基因组步移法 (SEFA-PCR, self-formed adaptor PCR) 具有高效经济的特点,仅需 2 条特异的巢式引物和 1 条部分随机引物即可进行 PCR 扩增;其特殊的热循环程序有利于特异产物的扩增,并抑制随机引物产生的非特异产物。此方法由 Wang 等^[10]通过对 TAIL-PCR 技术^[11]的改良而产生,具有较高的灵敏度和特异性,在高等植物的相关研究中已有应用这一技术克隆启动子的报道。杨国栋^[12]利用 TAIL-PCR 技术,从棉花 (*Gossypium* spp.) 基因组中克隆到长度为 1 610 bp 的

GhNHX1 基因启动子片段;李娜等^[13]采用 SEFA-PCR 法克隆获得灵芝螯烯合酶基因启动子;欧阳翔等^[14]通过 SEFA-PCR 方法,扩增得到灵芝漆酶基因起始密码子上游长 832 bp 的启动子序列,该启动子区域除分布有基本的转录起始元件外,还存在多个潜在的顺式作用元件序列位点。SEFA-PCR 反应对 DNA 模板质量要求不高,适宜的热循环程序是其获得特异目标产物的关键。采用该方法扩增获得的片段长度通常大于 2 kb,是一种有效的启动子克隆手段。

目前,葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 中 *FT*、*FLC*、*AP3* 和 *AG* 基因已被克隆,但关于这 4 个基因启动子克隆及功能分析的报道尚不多见。作者采用 SEFA-PCR 法,从藤稔葡萄 (*V. vinifera* × *V. labrusca* ‘Fujiminori’) 基因组中克隆这 4 个基因的启动子序列,并对 *FT*、*FLC* 和 *AP3* 启动子进行序列分析和顺式调控作用元件及功能预测,以期为进一步深入研究这些基因的表达调控模式提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的藤稔葡萄新鲜幼嫩叶片采自南京农业大学沧波门实验基地。

LA *Taq* DNA 聚合酶、10×LA buffer、MgCl₂、dNTPs mixture、pMD19-T 载体连接试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司;Axyprep 1 kb DNA marker 及 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术 (杭州) 有限公司;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 为本实验室保存的菌株;PCR 引物合成及 PCR 产物测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

所用仪器有 DYY-6C 型琼脂糖凝胶电泳仪 (北京市六一仪器厂)、BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪 (德国 Eppendorf 公司)、凝胶成像系统 FR-200 紫外与可见分析装置 (上海复日科技有限公司) 和 BIO-RAD mylyder 梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取及检测方法 采用改良 CTAB 法^[15]提取基因组总 DNA,实际操作过程略有改动。取约 200 mg 样叶,于液氮中研成粉末,加入 1 mL 65 °C 预热的提取缓冲液 [含 1.4 mol · L⁻¹ NaCl、0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)、质量体积分数 2% CTAB 和 20 mmol · L⁻¹ EDTA,使用前加入体积

分数2% β -巯基乙醇],混匀后于65℃水浴保温50 min,期间上下轻轻颠倒2~3次,4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min;上清液加入等体积三氯甲烷,充分混合后于4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min;上清液加入等体积 *V*(苯酚):*V*(三氯甲烷)=1:1的混合液,充分混合,于4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min;上清液加入0.8倍体积三氯甲烷抽提1次,于4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min;向上清液中加入1/10体积的3 mol·L⁻¹乙酸钠(pH 5.2)和2倍体积预冷的无水乙醇,混合均匀后置于-20℃冰箱中静置30 min沉淀DNA,于4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清液;用体积分数75%乙醇洗涤沉淀3次,将沉淀干燥后加入30 μ L双蒸水,溶解后即总DNA溶液。

取2 μ L总DNA溶液,用含有溴化乙锭(EB)的质量体积分数1%的非变性琼脂糖凝胶进行电泳检测。取1 μ L总DNA溶液,加入49 μ L双蒸水,用核酸蛋白测定仪检测DNA纯度。

1.2.2 引物设计和PCR扩增条件 根据本实验室克隆获得的藤稔葡萄 *FT*、*FLC*、*AP3*及*AG*基因cDNA序列(GenBank 登录号分别为HM192810、HM192809、HM192808和HM192807),参照Wang等^[10]的方法为每个基因设计2条巢式引物和1条部分随机引物,引物名称及序列详见表1。

表1 用于藤稔葡萄花发育相关基因启动子克隆的引物序列
Table 1 Primer sequences used for cloning of promoters of flower development related genes of *Vitis vinifera*×*V. labrusca* ‘Fujiminori’

基因	引物	5'→3'引物序列
Gene	Primer	5'→3' primer sequence
<i>AP3</i>	<i>AP3</i> -SP1	TGGAGAGCATGATGATAGAAACCTTAG
	<i>AP3</i> -SP2	ACCATTTCTCTCTTGGAGTAGGTGAC
	<i>AP3</i> -SP3	AGGTGACCTGCTGTTCGNNNNNNNTCTATC
<i>FLC</i>	<i>FLC</i> -SP1	GGCAACATCGACATCGCAGAGAACAGAG
	<i>FLC</i> -SP2	CTTGATCGAGCCATTTTCGCCTCTTTGAG
	<i>FLC</i> -SP3	AGCCATTTTCGCCTCTTTGNNNNNNNACCTGG
<i>FT</i>	<i>FT</i> -SP1	GAAGGTCCTCAAGTCATCCCCTCCAAT
	<i>FT</i> -SP2	AGAGGGTCTGAACTCACAGCCATTTGC
	<i>FT</i> -SP3	CCAGAACATCCCCGACAANNNNNNNAACAAC
<i>AG</i>	<i>AG</i> -SP1	GTTGTTGGCATATTCGTAGAGGCGGC
	<i>AG</i> -SP2	CGGCTGGAGAAGACGATGAGGGCTAC
	<i>AG</i> -SP3	GGAGAAGACGATGAGGGCNNNNNNNCATCAC

参考文献[10]采用SEFA-PCR法进行PCR扩增,2轮反应体系的总体积均为30 μ L。

第1轮PCR反应体系包括10×LA buffer 3 μ L、

0.25 mol·L⁻¹ MgCl₂ 3 μ L、0.25 mol·L⁻¹ dNTPs mixture 5 μ L、5 U· μ L⁻¹ LA *Taq* DNA聚合酶0.3 μ L、DNA模板1.5 μ L(约1 μ g)和10 μ mol·L⁻¹引物SP3 0.5 μ L,用双蒸水补足至30 μ L。反应程序为:94℃ 90 s、30℃ 3 min;以0.2℃·s⁻¹的速率缓慢升温至70℃,保持5 min;加入10 μ mol·L⁻¹引物SP1 1.5 μ L,继续进行PCR反应。反应程序为94℃ 30 s、70℃ 5.5 min,运行25个循环;94℃ 30 s、70℃ 5 min、94℃ 30 s、70℃ 5 min、94℃ 30 s、55℃ 30 s、70℃ 5 min,运行10个循环。

第2轮PCR反应体系包括10×LA buffer 3 μ L、0.25 mol·L⁻¹ MgCl₂ 3 μ L、0.25 mol·L⁻¹ dNTPs mixture 5 μ L、5 U· μ L⁻¹ LA *Taq* DNA聚合酶0.3 μ L、10 μ mol·L⁻¹引物SP2 1.5 μ L和稀释10倍的第1轮PCR反应产物1 μ L,用双蒸水补足至30 μ L。扩增反应程序为94℃ 30 s、68℃ 5.5 min,运行30个循环;94℃ 30 s、70℃ 5 min、94℃ 30 s、70℃ 5 min、94℃ 30 s、66℃ 30 s、70℃ 5 min,运行10个循环;94℃ 30 s、70℃ 5 min、94℃ 30 s、70℃ 5 min、94℃ 30 s、55℃ 30 s、70℃ 5 min,运行10个循环。

1.2.3 目的基因片段的回收及克隆 用含有EB的质量体积分数1%的非变性琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳,切下目的基因片段,按Axyprep DNA凝胶回收试剂盒的操作说明回收DNA。将目的基因片段与pMD19-T载体连接,并转化到大肠杆菌DH5 α 中,经Amp筛选,随机挑选PCR阳性克隆进行测序。

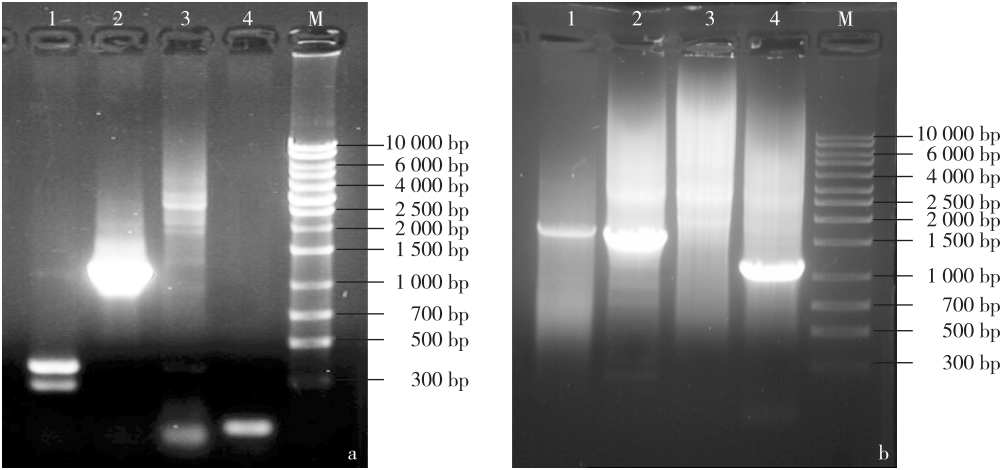
1.3 序列分析

将获得的核酸序列在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上用BLASTn进行序列相似性分析。应用在线植物转录元件分析工具PlantCARE对获得的启动子序列进行分析,寻找转录因子结合位点(TFBS,transcription factor binding site)。

2 结果和分析

2.1 SEFA-PCR 扩增产物的凝胶电泳结果分析

采用SEFA-PCR方法获得的藤稔葡萄基因组总DNA第1轮和第2轮PCR扩增产物的凝胶电泳图谱见图1。由图1-a可见:除AG基因没有扩增出明显条带外,其他3个基因均扩增出特异条带,有的甚至还有多条带。由图1-b可见:AP3、FT和FLC 3个基因均扩增出单一且特异的目的条带,且长度均大于



a. 第 1 轮扩增产物 The first round amplification product; b. 第 2 轮扩增产物 The second round amplification product.

1: *FLC* 扩增产物 *FLC* amplification product; 2: *FT* 扩增产物 *FT* amplification product; 3: *AG* 扩增产物 *AG* amplification product; 4: *AP3* 扩增产物 *AP3* amplification product; M: 分子量标记 Molecular marker.

图 1 藤稔葡萄花发育相关基因启动子 SEFA-PCR 第 1 轮和第 2 轮扩增产物的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of the first and the second round amplification products of SEFA-PCR of promoters of flower development related gene of *Vitis vinifera*×*V. labrusca* 'Fujiminori'

1 000 bp;*AG* 基因也能扩增出条带,但条带呈弥散状,没有特异条带,因而无法回收用于序列分析及顺式调控作用元件预测。

2.2 序列分析及顺式调控作用元件和功能预测结果

藤稔葡萄 3 个花发育相关基因 *FT*、*FLC* 和 *AP3* 的启动子序列的 GenBank 登录号分别为 HM192806、HM192805 和 HM192804,且均包含多种具有不同功能的顺式调控作用元件。

FT 片段长 1 605 bp,包含基因区域 135 bp 和实际启动子区域 1 470 bp,其中,*FT* 启动子区序列与葡萄基因组序列 (AM459941) 的相似性为 97%。经 PlantCARE 在线预测的 *FT* 启动子区顺式调控作用元件及功能见表 2。*FT* 启动子区片段包含参与茉莉酸甲酯响应的顺式调控作用元件、真菌刺激响应元件、参与玉米蛋白代谢调控的顺式调控作用元件、参与干旱诱导的 MYB 结合位点、参与植物生长素响应的顺式调控作用元件、参与胚乳表达的顺式调控作用元件以及与花分生组织特定激活有关的顺式调控作用元件及多个光响应元件等,说明藤稔葡萄 *FT* 基因的表达可能受茉莉酸甲酯、玉米蛋白代谢、MYB、植物生长素、真菌刺激、干旱和光调控,并可能在花的分生组织和胚乳中表达。

FLC 片段长 1 788 bp,包含基因区域 90 bp 和实际启动子区域 1 698 bp,其中,*FLC* 启动子区序列与葡

萄基因组序列 (AM444662.2) 的相似性为 96%。经 PlantCARE 在线预测的 *FLC* 启动子区顺式调控作用元件及功能见表 3。*FLC* 启动子区片段包含参与茉莉酸甲酯响应的顺式调控作用元件、参与脱落酸和 VP1 响应的顺式作用元件、厌氧诱导必需的顺式调控作用元件、MYB 结合位点、真菌刺激响应元件、参与昼夜节律控制的顺式调控作用元件、光响应元件及与花分生组织表达有关的顺式调控作用元件等,说明藤稔葡萄 *FLC* 基因的表达可能受茉莉酸甲酯、脱落酸、MYB、VP1、厌氧诱导、昼夜节律、真菌刺激和光调控,并可能在花的分生组织中表达。

AP3 片段长 1 143 bp,包含基因区域 82 bp 和实际启动子区域 1 061 bp,其中,*AP3* 启动子区序列与葡萄基因组序列 (AM469149.1) 的相似性为 100%。经 PlantCARE 在线预测的 *AP3* 启动子区顺式调控作用元件及功能见表 4。*AP3* 启动子区片段包含赤霉素响应元件、真菌刺激响应元件、参与干旱诱导的 MYB 结合位点、参与脱落酸响应的顺式作用元件、参与水杨酸响应的顺式作用元件、MYBHv1 结合位点、光响应元件、胚乳表达所需的顺式调控作用元件及与花分生组织特定激活有关的顺式调控作用元件等,说明藤稔葡萄 *AP3* 基因的表达可能受赤霉素、真菌刺激、脱落酸、水杨酸、MYB、MYBHv1、干旱诱导和光调控,并可能在花的分生组织及胚乳中表达。

表 2 应用 PlantCARE 在线预测的藤稔葡萄花发育相关基因 *FT* 启动子区的顺式调控作用元件及功能
Table 2 The *cis*-acting regulatory elements and functions of promoter region in flower development related gene *FT* of *Vitis vinifera*×*V. labrusca* ‘Fujiminori’ by PlantCARE on-line prediction

位点名称 Site name	位置 Location	信号序列 Signal sequence	位点功能 Site function
5UTR Py-rich stretch	−361	TTTCTTCTCT	赋予高转录水平的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element conferring high transcription level
ARE	−1050	AAACCA	厌氧诱导必需的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element essential for anaerobic induction
AuxRR-core	−1373	ATGGACC	参与植物生长素响应的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in auxin responsiveness
I-box	−990	TTTGAAA	光响应元件 Light responsive element
W1-box	−597	TTGACC	真菌刺激响应元件 Fungal elicitor responsive element
CCGTCC-box	−464	CCGTCC	与花分生组织特定激活有关的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element related to floral meristem specific activation
CGTCA-motif	−572	CGTCA	参与茉莉酸甲酯响应的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
G-box	−402	CCATGTG	参与光响应的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
GAG-motif	−1348	CATCTCC	光响应元件的一部分 A part of light responsive element
GCN4-motif	−421	TGTGTCA	参与胚乳表达的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in endosperm expression
GT1-motif	−807	TTAACC	光响应元件 Light responsive element
MBS	−1440, −1173, −1128	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-induction
O2-site	−294	GATGCTGTGG	参与玉米蛋白代谢调控的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in zein metabolism regulation
Skn-1_motif	−1243, −455	GTCAT	胚乳表达所需的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression
CAAT-box	−769, −551, −272, −60, −48	CAAT	启动子和增强子区域普通顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	−1319, −1091, −1041, −967, −663, −654, −258, −95	TATA, ATATAT, ATATAA	转录起始−30 核心启动子元件 Core promoter element around −30 of transcription start

表 3 应用 PlantCARE 在线预测的藤稔葡萄花发育相关基因 *FLC* 启动子区的顺式调控作用元件及功能
Table 3 The *cis*-acting regulatory elements and functions of promoter region in flower development related gene *FLC* of *Vitis vinifera*×*V. labrusca* ‘Fujiminori’ by PlantCARE on-line prediction

位点名称 Site name	位置 Location	信号序列 Signal sequence	位点功能 Site function
ABRE	−772	TACGGTC	参与脱落酸响应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in abscisic acid responsiveness
ARE	−1199	TGGTTT	厌氧诱导必需的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element essential for anaerobic induction
ATCT-motif	−725	AATATAATCC	参与光响应的保守 DNA 模块的一部分 A part of conserved DNA module involved in light responsiveness
I-box	−739, −531	TTTCAAA	光响应元件 Light responsive element
W1-box	−1635	TTGACC	真菌刺激响应元件 Fungal elicitor responsive element
CAT-box	−1192, −469	AGTGCC	与花分生组织表达有关的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element related to floral meristem expression
CE3	−1413	GACGCGTGCC	参与脱落酸和 VP1 响应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in abscisic acid and VP1 responsiveness
CGTCA-motif	−33	CGTCA	参与茉莉酸甲酯响应的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in MeJA-responsiveness

续表 3 Table 3 (Continued)

位点名称 Site name	位置 Location	信号序列 Signal sequence	位点功能 Site function
G-box	-155	CACGTG	参与光响应的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
GA-motif	-714	ATAGATAA	光响应元件的一部分 A part of light responsive element
MBS	-771	CGGTCA	MYB 结合位点 MYB binding site
GT1-motif	-807	TTAACC	光响应元件 Light responsive element
TGACG-motif	-1419	TGACG	参与茉莉酸甲酯响应的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in MeJA-responsiveness
Circadian	-1148	CAANNNNATC	参与昼夜节律控制的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in circadian control
CAAT-box	-357,-1306	CAAT	启动子和增强子区域普通顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	-1585,-1566,-1501,-1219, -1175,-1058,-979,-894,-349	TATA,ATATAA,TAATA, TTTTA,TTTAAAAA	转录起始-30 核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start

表 4 应用 PlantCARE 在线预测的藤稔葡萄花发育相关基因 *AP3* 启动子区的顺式调控作用元件及功能
Table 4 The *cis*-acting regulatory elements and functions of promoter region in flower development related gene *AP3* of *Vitis vinifera*×*V. labrusca* ‘Fujiminori’ by PlantCARE on-line prediction

位点名称 Site name	位置 Location	信号序列 Signal sequence	位点功能 Site function
5UTR Py-rich stretch	-61	TTTCTTCTTT	赋予高转录水平的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element conferring high transcription level
ABRE	-397	CACGTG	参与脱落酸响应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in abscisic acid responsiveness
I-box	-904,-538	TTTCAAA	光响应元件 Light responsive element
W1-box	-713	TTGACC	真菌刺激响应元件 Fungal elicitor responsive element
CCAAT-box	-232	CCGTTG	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
GA-motif	-747	ATAGATAA	光响应元件的一部分 A part of light responsive element
GARE-motif	-37	AAACAGA	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
GATA-motif	-382	AAGGAAAAGG	光响应元件的一部分 A part of light responsive element
MBS	-632	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility
OCT	-1036	CGCGGATC	与花分生组织特定激活有关的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element related to floral meristem specific activation
P-box	-964	CCTTTG	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
Skn-1_motif	-176	GTCAT	胚乳表达所需的顺式调控作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression
TCA-element	-648	CCATCTTTT	参与水杨酸响应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness
CAAT-box	-843,-673,-119	CAAT,CAAAT	启动子和增强子区域普通顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	-803,-686,-597, -442,-224,-106	TATA,TAATA	转录起始-30 核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start

3 讨 论

植物成花过程中存在多种成花诱导途径,在拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]等模式植物中 *FT* 基因是光周期诱导途径的核心基因之一^[16]。潘才博等^[17]推测:菊花[*Dendranthema morifolium* (Ramat.)

Tzvel.]的花发育相关基因 *FT* 主要与光周期敏感性密切相关,可能在光周期诱导途径中具有促进开花的作用。Kong 等^[18]认为:*FT* 的 2 个同源基因 *GmFT2a* 和 *GmFT5a* 的表达量在短日照条件下被高度上调,并诱导大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]开花。
尽管目前没有证据表明葡萄存在经典的成花途

径(如春化作用和光周期等),但葡萄中仍存在相关途径的调控基因,如 *FT* 和 *FLC* 等,这些基因在葡萄成花过程中的作用有待深入研究。藤稔葡萄的 *FT*、*FLC* 和 *AP3* 基因启动子序列片段中均存在多种诱导响应元件,可能均为诱导型启动子;3 个基因的表达均受光调控,且均与真菌刺激和 MYB 相关。

藤稔葡萄花发育相关基因 *FT*、*FLC* 和 *AP3* 的启动子中均含有不同的组织特异表达元件,*FT*、*FLC* 和 *AP3* 均可能在花的分生组织中表达,而 *FT* 和 *AP3* 还可能在胚乳中表达。Fumie 等^[19] 从 *Citrus* 种子中分离出 1 个 *FT/TFL1* 的同源基因 *CuMFT1*,并在成熟种子中检测到该基因的高量表达,经克隆获得 2.4 kb 的 *CuMFT1* 基因 5'端上游片段,通过序列分析和转化拟南芥证实其具有种子特异启动子活性。本研究结果在一定程度上印证了这一结果。

虽然通过对藤稔葡萄花发育相关基因启动子进行序列分析判断出一些顺式调控作用元件,为最终了解这些基因的表达调控模式提供了依据,但若需全面了解这些元件在转录过程中的调节作用,还有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Hepworth S R, Valverde F, Ravenscroft D, et al. Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs [J]. The European Molecular Biology Organization Journal, 2002, 21(16): 4327-4337.
- [2] Yoo S K, Chung K S, Kim J, et al. *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2005, 139(2): 770-778.
- [3] Schmitz R J, Amasino R M. Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1769(5/6): 269-275.
- [4] Helliwell C A, Wood C C, Robertson M, et al. The *Arabidopsis FLC* protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex [J]. The Plant Journal, 2006, 46(2): 183-192.
- [5] Gendall A R, Levy Y Y, Wilson A, et al. The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2001, 107(4): 525-535.

- [6] Lee J H, Yoo S J, Park S H, et al. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis* [J]. Genes and Development, 2007, 21(4): 397-402.
- [7] Boss P K, Bastow R M, Mylne J S, et al. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting [J]. The Plant Cell, 2004, 16: 18-31.
- [8] Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors [J]. Nature, 1990, 346: 35-39.
- [9] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 297-300.
- [10] Wang S M, He J, Cui Z L, et al. Self-formed adaptor PCR: a simple and efficient method for chromosome walking [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(15): 5048-5051.
- [11] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. Genomics, 1995, 25(3): 674-681.
- [12] 杨国栋. 棉花耐盐基因 *GhNHX1* 启动子的克隆及功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学生命科学学院, 2007.
- [13] 李娜, 王世明, 陈军, 等. SEFA-PCR 法克隆灵芝鲨烯合酶基因启动子及其序列分析 [J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 245-253.
- [14] 欧阳翔, 吴婧, 丁一新, 等. 灵芝漆酶基因转录 Cu^{2+} 诱导特性及其启动子的克隆与序列分析 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 36-40.
- [15] 宗成文. 葡萄花发育相关基因的克隆与表达特性研究 [D]. 南京: 南京农业大学园艺学院, 2007.
- [16] Simpson G G, Dean C. *Arabidopsis* the rosetta stone of flowering time [J]. Science, 2002, 296: 285-289.
- [17] 潘才博, 张启翔, 潘会堂, 等. 菊花 *FT* 类似基因的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(5): 769-776.
- [18] Kong F J, Liu B H, Xia Z J, et al. Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean [J]. Plant Physiology, 2010, 154(3): 1220-1231.
- [19] Fumie N, Tomoko E, Takehiko S, et al. Isolation and characterization of a *Citrus FT/TFL1* homologue (*CuMFT1*), which shows quantitatively preferential expression in *Citrus* seeds [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2008, 77(1): 38-46.

(责任编辑: 佟金凤)