

木薯细胞壁酸性转化酶 *MeCWINC5* 基因启动子的克隆和序列分析

夏文睿^{1,2,3}, 刘姣^{2,3}, 胡艳平^{1,2,3}, 郭建春^{2,3*}, 李瑞梅^{2,3}, 段瑞军^{2,3}, 符少萍^{2,3} (1. 海南大学农学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院生物技术研究所, 海南海口 571101; 3. 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101)

摘要 [目的]了解 *MeCWINC5* 在植物生长发育、激素调节和逆境胁迫应答中的功能。[方法]采用 PCR 方法从木薯基因组中分离 *MeCWINC5* 基因启动子序列, 考察 *MeCWINC5* 对植物生长发育、激素调节和逆境胁迫应答的影响。[结果]分析显示启动子的长度为 1 170 bp, 含有 TATA box 和 CAAT box 等多个典型的真核生物启动子基本元件, 还存在大量逆境胁迫诱导相关的顺式调控元件, 如 HSE, MBS, SARE, GARE-motif 和 TATC-box 等多个与植物逆境胁迫相关的元件。[结论] *MeCWINC5* 基因启动子与逆境胁迫有关, 在木薯抵御逆境胁迫的生理过程中具有重要作用。

关键词 木薯; 细胞壁酸性转化酶; 启动子; 逆境胁迫; 顺式调控元件

中图分类号 S632 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)11-03179-03

Cloning and Function Analysis of Promoter *MeCWINC5* in Cassava

XIA Wen-rui, GUO Jian-chun et al (College of Agriculture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101; Key Lab of Tropical Crops Biological and Genetic Resources of Ministry of Agriculture, Haikou, Hainan 571101)

Abstract [Objective] In order to study the promoter *MeCWINC5* in cassava which play important roles in plant growth and development, hormone regulations and stress responses. [Method] An 1 170 bp promoter region upstream of the *MeCWINC5* gene was isolated from cassava genomic DNA using PCR methods. [Result] Sequence analysis found that it contains a typical TATA box and CAAT box, and several cis-acting elements that relate plant stress responses, such as HSE, MBS, SARE, GARE-motif, TATC-box transcription factor. [Conclusion] It is suggested that *MeCWINC5* gene may play important roles in response to various stresses.

Key words Cassava; Cell wall acid invertase; Promoter; Stress responsiveness; Cis-acting element

木薯是全球最重要的粮食作物之一, 但是块根中积累的淀粉含量远远低于理论产量。蔗糖在淀粉积累过程中作为沟通源器官和库器官的桥梁, 而在源叶中合成的蔗糖从叶(源)到块根(库)的长途运输过程主要由蔗糖转化酶(INV)来调控完成^[1-3]。蔗糖转化酶根据其最适 pH 值分为中性转化酶(neutral invertase, NI)和酸性转化酶(acid invertase, AI)^[4]。细胞壁酸性转化酶催化蔗糖的分解是韧皮部卸载的关键步骤^[5]。在库器官中提高细胞壁酸性转化酶的活性有利于蔗糖在库器官中的积累, 也是植物源库器官蔗糖代谢的关键酶^[6]。研究者通过研究木薯细胞壁酸性转化酶基因启动子上的生长激素相关元件和逆境相关反应元件与启动子的相互作用来探讨木薯细胞壁酸性转化酶基因启动子对转化酶基因的调控作用^[7]。笔者采用 PCR 方法从木薯基因组中分离 *MeCWINC5* 基因启动子序列, 考察 *MeCWINC5* 对植物生长发育、激素调节和逆境胁迫应答的影响, 以期 *MeCWINC5* 的合理开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 华南木薯 8 号, 由实验室采购。

1.2 方法

1.2.1 华南木薯 8 号基因组 DNA 的提取(CTAB 法)^[8]。取 1.000 g 经暗培养 2~3 d 的幼嫩木薯叶片(去叶脉), 经液氮研磨后加入预热至 65 °C 的 CTAB 提取缓冲液中提取, 上清

液加等体积氯仿-异戊醇(24:1, V/V)混匀后离心; 上清液用等体积苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V/V)和氯仿-异戊醇(24:1, V/V)反复抽提。加入 1/10 体积 NaAc(3 mol/L, pH5.2)和 2 倍体积冷乙醇以沉淀 DNA(2 h), 分别用 70%、80% 乙醇洗涤沉淀并加入 100 μL TE 缓冲液回溶 DNA 沉淀, 同时加入 2 μL RNase, 置 37 °C 处理 2 h。再用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V/V)和氯仿-异戊醇(24:1, V/V)分别抽提, 吸取上清液, 重新沉淀 DNA, 用浓度 70% 乙醇, 清洗风干, 加入适量体积的去离子水回溶。

1.2.2 木薯细胞壁酸性转化酶 *MeCWINC5* 基因启动子。根据课题组已经克隆得到的木薯细胞壁酸性转化酶基因 *MCWINV5* 序列(GeneBank: X291159)和 phytozome 植物基因序列预测库的木薯 *MCWINV5* 基因序列, 设计引物如下, CW5-F: 5'-ATGAGCTCTAATGCAGTCCGACAC-3' 和 CW5-R: 5'-GTGGATCCGATCGAAGAAAAAAG-3', PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 98 °C 变性 10 s, 56 °C 退火延伸 150 s, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 生物信息学分析。将测序得到的片段序列与 *MeCWINC5* 基因的序列比对, 确定扩增的启动子序列的正确性。利用 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)和 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线软件分析启动子序列, 预测顺式作用元件位点^[9]。

2 结果与分析

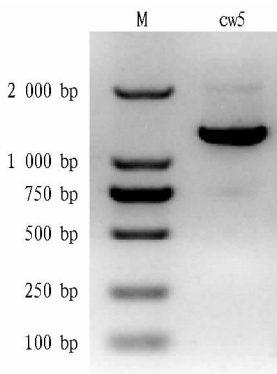
2.1 启动子片段的扩增与克隆 根据已经克隆得到的木薯细胞壁转化酶基因 *MeCWINC5* (GeneBank: X291159) 序列和 phytozome 植物基因序列预测库的木薯 *MeCWINC5* 基因序列设计引物为 CW5-F: 5'-ATGAGCTCTAATGCAGTCCGACAC-

基金项目 国家“973”计划项目(2010CB126600); 国家自然科学基金(31170234, 31371706); 中央级公益性科研院所基本科研项目(ITBB130202); 国家木薯产业技术体系。

作者简介 夏文睿(1989-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子遗传学。* 通讯作者, 从事植物分子遗传学研究。

收稿日期 2014-03-08

3' 和 CW5-R:5'-GTGGATCCGA TCGAAGAAAAAG-3', 从华南 8 号木薯组培苗中扩增得到一段长为 1 300 bp 的序列, 命名为 cw5(图 1)。将片段与 pMD-19T 进行连接, 通过菌液 PCR, 筛选获得阳性单克隆测序后, 将其与 MeCWINV5 基因 CDs 区序列和 phytozome 植物基因序列预测库中相应序列进行比对, 结果发现此片段含有 MeCWINV2 基因从 ATG 起始的长为 130 bp 的 CDs 序列和 ATG 上游长为 1 170 bp 的潜在启动子序列(图 2)。



注: M; DL 2000 marker。

图 1 MeCWINV5 启动子克隆结果

2.2 MeCWINV2 基因启动子的生物信息学分析 用 Plant-CARE 和 PLACE 在线软件分析 MeCWINV5 基因启动子序列, 可发现该启动子上面有 CAAT box 和 TATA box 等多个典型的真核生物启动子元件(图 3)。此外还含有大量响应激素元件和胁迫相关元件, 各元件的具体信息及功能见表 2。

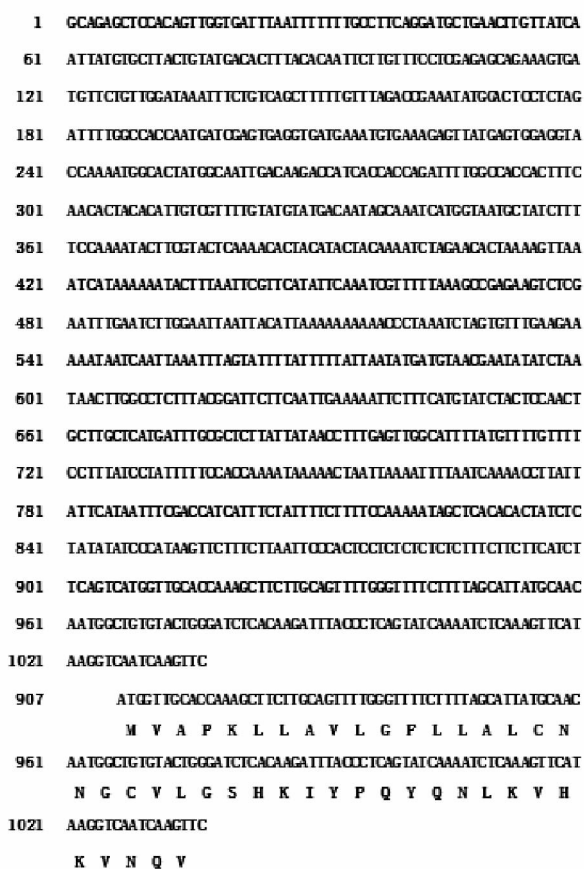


图 2 MeCWINV5 启动子序列

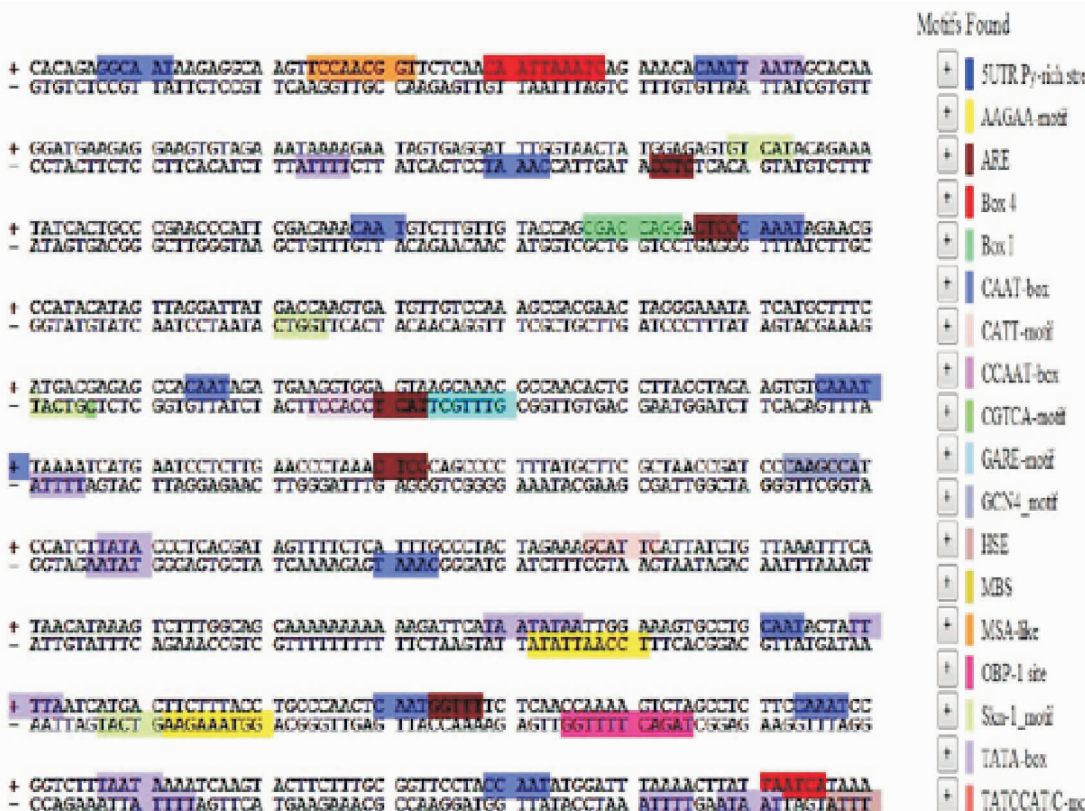


图3 *MeCWINV5* 启动子序列元件分析表2 *MeCWINV5* 启动子上顺式作用元件分析

调控元件	序列	位置 (-) 正义链 (+) 互补链	功能
GARE-motif	AAACAGA	46 (+)	gibberellin-responsive element
MBS	CAACTG	912 (+)	MYB binding site involved in drought-inducibility
Skn-1_motif	GTCAT	199 (+) 351 (-)	cis-acting regulatory element required for endosperm expression
circadian	CAANNNATC	109 (+)	cis-acting regulatory element involved in circadian control
5UTR Py-rich stretch	TTTCTCTCT	1149 (+)	cis-acting element conferring high transcription levels
MBS	CAACTG	912 (+)	MYB binding site involved in drought-inducibility
TC-rich	ATTTTCTTCA	381 (-)	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
SARE	TTCGACCATCTT	798 (+)	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
EIRE	TTCGACC	798 (+)	Elicitor-responsive element
CGTCA-motif	CGTCA	352 (-)	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
CCAAT	CAACGG	96 (+)	MYBHv1 binding site
HSE	AAAAAATTC	767 (-)	cis-acting element involved in heat stress responsiveness
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	381 (-)	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
Box 4	ATTAAT	128 (+)	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
Box I	TTTCAAA	1075 (+)	light responsive element
ARE	TGGTTT	663 (+)	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
CATT	GCATTC	537 (+)	Part of light responsive element
CGTCA	CGTCA	352 (-)	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
GCN_4	CAAGCCA	483 (+)	cis-regulatory element involved in endosperm expression
TGACG-motif	TGACG	352 (+)	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness

3 结论与讨论

试验采用 PCR 的方法对华南木薯 8 号 *MeCWINV5* 基因启动子进行了克隆,得到一段长为 1 170 bp 的启动子序列,对该片段序列进行分析,发现此片段上含有 CAAT box 和 TATA box 等多个典型的真核生物启动子元件,并且含有胁迫响应的答元件 HSE,干旱诱导相关元件 MBS,水杨酸响应元件 SARE,赤霉素反应元件 GARE-motif、TATC-box 和胁迫防御元件 TC-rich repeats 等多个顺式作用元件。在拟南芥^[10]、烟草^[11]、大豆^[12]等植物转化酶基因启动子已验证上述激素调控和胁迫,由此可以看出 *MeCWINV5* 可能参与多种信号传播,并且在木薯逆境胁迫应答中起到了重要作用。由于细胞壁转化酶 *MeCWINV5* 基因在植物生命活动中和逆境胁迫起到越来越重要的作用,而被人们所关注,近年来关于细胞壁转化酶基因的研究有了一定的进展,但是大部分停留在对启动子的克隆以及序列分析阶段,其作用机制依然空

缺,启动子在基因上游部分,调控基因的表达,预测基因的功能,如果能进一步对启动子序列进行研究,就可以为研究基因功能和启动子作用元件分析提供方向和依据。

参考文献

- [1] 李开锦,林雄,黄洁. 国内外木薯科研发展概况[J]. 热带农业科学, 2001,1(2):56-60.
- [2] 陆飞伍,罗兴录,李红雨,等. 不同木薯品种叶片碳氮代谢与块根淀粉积累特性研究[J]. 中国农学通报,2009,25(10):120-124.
- [3] 池敏青. 木薯块根淀粉积累过程生理生化特性研究[D]. 南宁:广西大学,2007:32-53.
- [4] 潘秋红,张大鹏. 植物转化酶的种类、特性与功能[J]. 植物生理学通讯,2004,40(3):275-280.
- [5] 卢合全,沈法富,刘凌霄,等. 植物蔗糖合成酶功能与分子生物学研究进展[J]. 中国农学通报,2005,21(7):34-37.
- [6] 刘永忠,李道高. 柑橘果实糖积累与蔗糖代谢酶活性的研究[J]. 园艺学,2003,30(4):457-459.
- [7] 潘秋红,张大鹏. 植物酸性转化酶基因及其表达调控[J]. 植物学通报, 2005,22(2):129-137.

22 011.00 kg/hm² 增产 2 833.50 kg/hm², 差异显著; 外婆藤鲜薯产量较第 3 名广薯 87 的 18 009.00 kg/hm² 增产 4 002.00 kg/hm², 差异极显著; 广薯 87 鲜薯产量较第 4 名紫罗兰(CK)的 17 176.65 kg/hm² 增产 669.00 kg/hm², 差异不显著; 广薯 87、紫罗兰(CK)、桂紫薯 1 号 3 个品种间鲜薯产量差异不显著, 其他 4 个品种桂薯 131、桂粉 2 号、富硒 11 选和桂薯 3 号均比对照减产, 且达极显著水平。

表 2 甘薯各品种鲜薯产量比较

参试品种	小区产量	折合产量	较 CK ±	位次
	kg	kg/hm ²	%	
桂薯 131	37.50	15 007.50 cdBC	-12.63	6
桂粉 2 号	34.58	13 838.85 dC	-19.43	8
外婆藤	55.00	22 011.00 bA	28.15	2
富硒 11 选	35.21	14 091.00 dC	-17.96	7
桂紫薯 1 号	41.25	16 508.25 cB	-3.89	5
广薯 87	45.00	18 009.00 cB	4.85	3
紫罗(CK)	42.92	17 176.65 cB		4
桂薯 3 号	34.38	13 758.90 dC	-19.90	9
桂薯 96-8	62.08	24 844.50 aA	44.64	1

注: 同列数据后无相同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 无相同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 各品种茎叶产量分析 从表 3 可以看出, 外婆藤鲜茎叶产量为 14 007.00 kg/hm², 居首位, 比 CK 增产 10.51%; 其他品种均比对照减产, 产量最低的 2 个品种为广薯 87 和桂薯 3 号, 分别为 6 003.00、6 171.15 kg/hm²。各参试品种中, 单株结薯最多的是广薯 87、外婆藤、桂薯 131 和桂薯 96-8, 平均株结薯分别为 9.3、7.4、6.8 和 6.0 个, 单株结薯重 171.7~496.6 g, 以桂薯 96-8 最重, 平均株薯重为 496.6 g, 最轻的是紫罗兰(CK), 平均株薯重为 171.7 g; 单薯块重量 30.66~82.77 g, 以桂薯 96-8 最重, 平均单薯重为 82.77 g, 最轻的是紫罗兰(CK), 平均单薯重为 30.66 g。从长势、耐旱方面看, 除外婆藤最强、桂薯 131 最差外, 其他各参试品种在中上水平。

表 3 甘薯各品种鲜茎叶产量比较

参试品种	小区产量	折合产量	较 CK ±	位次
	kg	kg/hm ²	%	
桂薯 131	15.50	6 203.10	-51.06	6
桂粉 2 号	17.29	6 919.50	-45.41	4
外婆藤	35.00	14 007.00	10.51	1
富硒 11 选	16.25	6 503.25	-48.69	5
桂紫薯 1 号	17.50	7 003.50	-44.75	3
广薯 87	15.00	6 003.00	-52.64	8
紫罗(CK)	31.67	12 675.00		
桂薯 3 号	15.42	6 171.15	-51.31	7
桂薯 96-8	22.93	9 176.55	-27.60	2

2.3 各品种品质分析 采收后, 洗净煮熟品尝, 初步评价,

(上接第 3181 页)

- [8] AN Z W, WANG Q T, HU Y S, et al. Co-extraction of high-quality RNA and DNA from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Afr J Biotechnol*, 2012, 11: 9308-9314.
- [9] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 Nucleic [J]. *Acids Res*, 1999, 27(1): 297-300.
- [10] FUJIMOTO S Y, OHTA M, USUI A, et al. Arabidopsis ethylene responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of

桂薯 98-6 食味粉香、肉细、口感好; 广薯 87 熟食味粉香、薯味香浓, 口感好; 桂粉 2 号食味香、甜、粉、肉细腻。桂紫薯 1 号、桂薯 131 和富硒 11 食味香、甜、黏、细, 达到优质水平。桂薯 3 号甜度高, 品质优, 口感好; 外婆藤含纤维偏多, 影响口感; 紫罗兰甜度偏淡, 但适合于制作红薯果脯。

2.4 品种评述

2.4.1 桂薯 96-8。综合性状最好, 产量 24 844.50 kg/hm², 比对照增产 44.64%, 达极显著水平。萌芽性好, 中后期长势旺, 结薯性好, 单株结薯平均 5.3 个, 大中薯率 60% 以上, 薯形美观, 熟食口感好。可在合浦县进行示范推广。

2.4.2 外婆藤。株型半直立, 萌芽性好, 整个生长期茎叶生长较旺, 平均株结薯 7.4 个, 中蔓分枝较多, 茎叶产量高, 14 007.00 kg/hm², 居第 1 位, 比对照增产 10.51%, 鲜薯产量 22 011.00 kg/hm², 居第 2 位, 比对照增产 28.15%, 但煮熟薯块含有少量纤维, 薯形不美观, 可以作为养殖饲料种植。

2.4.3 广薯 87。单株分枝数 7 条, 蔓粗中等; 单株结薯平均 9.3 个, 产量 18 009.00 kg/hm², 比对照增产 4.85%, 增产未达显著水平, 但单株结薯多, 在 9 个参试品种中排第 1 位, 薯形较美观, 熟食口感好, 可作为食用栽培品种选择。

2.4.4 桂紫薯 1 号。鲜薯产量比对照减产 3.89%, 减产不显著, 有待于进一步试验。

2.4.5 桂粉 2 号。结薯性好, 单株结薯 4.7 个, 中薯率高。鲜薯产量 13 838.85 kg/hm², 茎叶产量 6 919.50 kg/hm², 均比对照减产。虽然产量偏低, 但熟薯味香、甜、粉、肉细腻, 可作为食用栽培品种选择。

2.4.6 桂薯 131。分枝数中等, 单株结薯 6.8 个, 鲜薯产量 15 007.50 kg/hm², 茎叶产量 6 203.10 kg/hm², 均比对照减产; 富硒 11 选和桂薯 3 号鲜薯产量和茎叶产量均比对照减产。

3 小结

参试品种中, 桂薯 96-8 综合表现较好, 品质好, 产量高, 适宜在合浦县薯区示范推广种植; 外婆藤丰产性较好, 但食用口感稍逊于其他品种, 可以作为饲料种植品种。紫罗兰、广薯 87、桂薯 131、桂粉 2 号、桂紫薯 1 号和桂薯 3 号虽然丰产性欠佳, 但食用口感好, 各有风味, 可根据爱好选择种植。桂紫薯 1 号、紫罗兰和富硒 11 由于具有特殊的保健功效认可, 有一定市场需求量。

参考文献

- [1] 王志发, 付纪勇, 江丹会. 贵州省甘薯(红薯)品种区域试验[J]. 现代农业科技, 2011(12): 92.
- [2] 伊莉萍. 甘薯品种试验小结[J]. 福建农业科技, 2009(5): 5-7.
- GCC box-mediated gene expression[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(3): 393-404.
- [11] 刘文奇, 陈旭君, 徐晓辉, 等. ERF 类转录因子 OPBP1 基因的超表达提高烟草的耐盐能力[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2002, 28(6): 473-478.
- [12] ZHANG G Y, CHEN M, LI L C. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(13): 3781-3796.