

2个水稻 *PLT* 基因启动子的克隆及其表达分析

张晨¹ 王利凯¹ 包亮¹ 龙湍¹ 陈春丽² 须健¹

1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为研究水稻中 *PLT* 基因的表达及功能, 利用同源序列分析, 在水稻基因数据库中检索到 2 个与拟南芥 *PLT* 基因高度同源的基因序列, 命名为 *OsPLT7* 和 *OsPLT11*。根据进一步预测的 *PLT* 启动子序列设计引物, 以水稻品种中花 11 的基因组 DNA 为模板, 用 PCR 方法扩增得到 *PLT7*、*PLT11* 的启动子片段, 克隆至含有报告基因的表达载体上并转化水稻。通过 GUS 染色观察 T₁ 代转基因阳性植株, 发现 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 在水稻根部干细胞小生境和中柱部位表达, 表达模式类似于其同源基因在拟南芥中的表达谱。

关键词 水稻; 拟南芥; 干细胞; *PLT*; 启动子报告基因融合载体

中图分类号 S 511.503; Q 343.1⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0147-05

生物体干细胞是 50 多年前被定义的一类能够维持生物体生长发育的细胞^[1]。由于其源源不断的分裂能力^[2-4]和在医药领域的应用潜能^[5-6], 如今不论在基础理论研究还是应用方面均受到越来越多的关注。在植物中, 最具特点的是茎尖分生组织 (shoot apical meristem, SAM) 和根尖分生组织 (root apical meristem, RAM) 中的干细胞。这些干细胞不仅能够持续自我更新并产生各种植物发育需要的子细胞, 同时还是植物根、茎、叶和花等器官发生的起始组织和发育的信号源泉^[7-8]。

在植物界, 2 个研究最深入的干细胞小生境来自于拟南芥的茎尖和根尖分生组织^[9-10]。在 SAM 中, 产生和维持干细胞需要一个基本的组织中心, 该中心靠 WUSCHEL (WUS)/CLV 调节途径控制^[11]; 而 AP2 家族的转录因子之一, *PLETHORA* (*PLT*) 则是维持拟南芥根部 QC (静止中心: quiescent center, QC) 区特异性以及根部干细胞活性的重要基因^[12]。*PLT* 与生长素关系密切, 是依赖生长素的积聚进行转录的转录因子。作为根部形态建成的必须基因, 将 *PLT* 异位表达可诱导茎尖分生区形成异位的根尖干细胞微环境。同时, *PLT* 对于根部干细胞的形成和小生境的维持存在巨大的剂量效应^[13], 过量的 *PLT* 表达可转化为独特的细胞间

信号, 为调控干细胞和植株的发育服务。最近研究^[14]发现, *PLT* 和转录因子 *WOX5*、生长素反馈因子 *ARF10/16* 和转录抑制子 *IAA17* 在生长素作用下共同调节根部干细胞的分化。

根作为植物的重要营养吸收器官, 在植物的各生长发育阶段^[15]及抗逆境胁迫^[16-17]中均起到关键作用, 具有巨大的研究价值。前人关于植物根系干细胞的研究均以拟南芥为材料, 未能应用于实际生产。本研究以我国重要粮食作物水稻为材料, 以拟南芥 *PLT* 的研究结果为依据, 构建 2 个 *OsPLT* 的启动子报告基因融合载体并转化水稻, 检测其在水稻根部中的表达模式, 探索其水稻中同源基因的表达和功能, 为研究水稻 *OsPLT* 的功能提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种中花 11、作为遗传转化受体的水稻品种中花 11 愈伤、转化用菌株大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 EHA105、C58 和启动子报告基因融合载体 pG2NHL-H2BYFP-GUSplus-Nost 均由华中农业大学国家作物遗传改良重点实验室水稻研究组提供。PCR 所用引物由上海英骏生物技术

收稿日期: 2011-05-18

基金项目: 国家基础科学与人才培养基金项目 (J0730649)

张晨, 硕士研究生, 研究方向: 发育生物学, E-mail: sophi214@yahoo.cn

通讯作者: 须健, 博士, 教授, 研究方向: 植物根系细胞发育生物学、植物干细胞生物学, E-mail: tuliproot@gmail.com

有限公司合成;DNA 测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。PCR 所用 DNA 聚合酶采用 NEB 公司的 Phusion 高保真 DNA 聚合酶。DNA 片段采用 Promega 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。酶切、连接试剂均采用 Fermentas 公司产品。

1.2 水稻同源 *PLT* 基因预测及启动子序列分析

利用 Blast 对拟南芥中已发表的 *PLT1*、*PLT2*、*PLT3*、*BBM* 基因蛋白序列检索水稻基因组数据库,检测到 2 个与拟南芥 *PLT* 高度同源的水稻基因序列,分别命名为 *OsPLT7* 和 *OsPLT11*。通过序列分析,确定这 2 个基因的启动子序列。

1.3 水稻基因组 DNA 的提取

野生型水稻品种中花 11 作为 PCR 模板的基因组 DNA 以及转基因植株 PCR 阳性检测的基因组 DNA 均采用 CTAB(小样快速制备法)法提取。

1.4 *OsPLT7*、*OsPLT11* 启动子报告基因融合载体的构建

以预测的 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 启动子序列,紧靠基因转录起点设计引物,

p*OsPLT7*-F: 5'-CGGGTACCAAACCTGCGGTACCTGTG-3';

p*OsPLT7*-R: 5'-CGCTGCAG GCGATAGATATGATC -GATGC-3';

p*OsPLT11*-F: 5'-CGGTGCACATTGATTTGCTATAGTTGCCACAAC -3';

p*OsPLT11*-R: 5'-CGCTGCAGTTTTTGTGTGGGGTCAAAG-3';

在 p*OsPLT7*-F 引物 5' 端引入 *Kpn* I 酶切位点, p*OsPLT11*-F 引物 5' 端引入 *Sal* I 酶切位点, p*OsPLT7*-R 和 p*OsPLT11*-R 引物 5' 端引入 *Pst* I 酶切位点。以水稻品种中花 11 基因组 DNA 为 PCR 模板,分别以 p*OsPLT7*-F/p*OsPLT7*-R、p*OsPLT11*-F/p*OsPLT11*-R 两对引物,按 Phusion DNA 聚合酶的标准体系和参数进行 PCR 扩增,目标片段大小分别为 2 129 和 2 187 bp。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后用 Promega 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收,并酶切连接到 pG2NHL-H2BYFP-GUSplus-Nost 载体中,通过卡那霉素(kanamycin)抗性筛选得到阳性克隆,送金斯瑞公司测序。

1.5 载体转化水稻

将测序完全正确的 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载体转入农杆菌。菌液 PCR 检测正确的菌株,以水稻野生型中花 11 的愈伤为材料,使用高效农杆菌介导的水稻遗传转化体系^[18]进行

转化。

1.6 转化苗 PCR 阳性检测

以基因启动子插入载体两端的序列设计引物,用于测序和阳性检测均可。

Seq-pf-yfpgus:5'-ACTCCAGAAACCCGCGGCT-3';

Seq-pr-yfpgus:5'-AGATCTTGTATGTCTCAACG-3';

以 T₀ 代和 T₁ 代转化植株的 DNA 为模板进行 PCR 阳性检测。非转基因品种中花 11 基因组 DNA 和水为阴性对照,扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

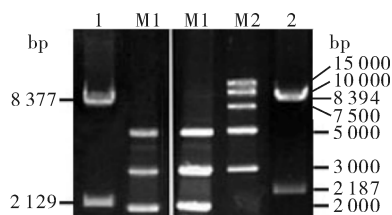
1.7 转化植株 GUS 染色观察

转基因 T₁ 代水稻种子 HgCl₂ 消毒 20 min,灭菌水清洗 3~5 次,竖直暗培养于 1/2 MS(duchafa)培养基,28 °C 4 d。待根长 1~2 cm 时用 GUS 染液(1 mol/L NaH₂PO₄ 2.1 mL,1 mol/L Na₂HPO₄ 2.9 mL,0.5 mol/L EDTA[pH 8.0] 2 mL,Trion-X 100 μL,50 mg/mL CM 200 μL,0.1 mol/L 铁氰化钾 1 mL,0.1 mol/L 亚铁氰化钾 1 mL,甲醇 20 mL,X-Gluc 100 mg,ddH₂O 定容到 100 mL)染色 24 h。压片后用 Nikon 体视显微镜和 Nikon 80i 显微镜镜检拍照。

2 结果与分析

2.1 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载体的构建

以野生型水稻品种中花 11 基因组 DNA 为模板,分别用 2 对引物 p*OsPLT7*-F/p*OsPLT7*-R 和 p*OsPLT11*-F/p*OsPLT11*-R 进行 PCR 扩增反应,



1: *Kpn* I / *Pst* I 双酶切 *OsPLT7* 启动子报告基因融合载体产生 2 129 bp 和 8 377 bp 的片段 *Kpn* I / *Pst* I restriction enzyme of *OsPLT7* promoter-reporter produces fragment of 2 129 bp and 8 377 bp; 2: *Sal* I / *Pst* I 双酶切 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载体产生 2 187 bp 和 8 394 bp 的片段 *Sal* I / *Pst* I restriction enzyme of *OsPLT11* promoter-reporter produces fragment of 2 187 bp and 8 394 bp; M1, M2: DNA marker.

图 1 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载体酶切鉴定

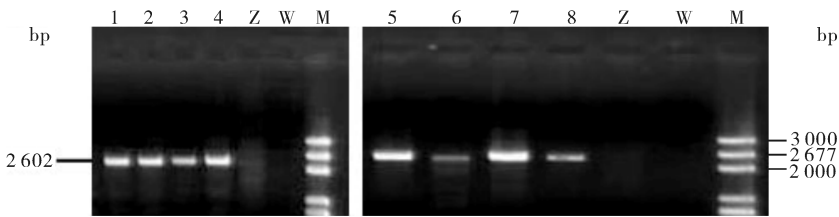
Fig. 1 Enzyme digestion in identifying promoter-reporter fusion vectors of *OsPLT7* and *OsPLT11*

得到 2 129 和 2 187 bp 的片段,并连入 pG2NHL-H2BYFP-GUSplus-Nost(8 431 bp)载体中。分别采用启动子片段连入载体时所用的酶切位点, *OsPLT7* (*Kpn* I/*Pst* I) 和 *OsPLT11* (*Sal* I/*Pst* I) 对构建成功的载体进行酶切鉴定(图 1)。*OsPLT7* 启动子报告基因融合载体应切出 2 129 bp 启动子片段和 8 377 bp 载体片段;*OsPLT11* 启动子报告基因融合载体应切出 2 187 bp 启动子片段和 8 394 bp 载体片段。测序结果显示,载体中的 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 启动子序列完全正确。

2.2 转化苗阳性检测

OsPLT7 和 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载

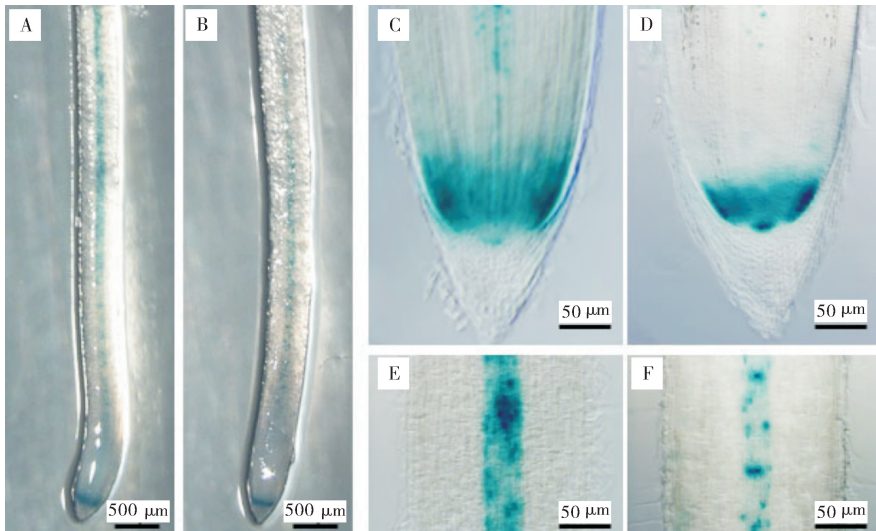
体成功转化水稻野生型中花 11 愈伤,得到 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载体 T₀代转化苗各 37 株。取所有转基因植株叶片提取基因组 DNA,用阳性检测特异引物 Seq-pf-yfpgus/Seq-pr-yfpgus 进行 PCR 扩增检测。该对引物扩增空载体产物大小应为 527 bp。*OsPLT7* 启动子报告基因融合载体转基因阳性植株 DNA 应扩增至 2 602 bp 大小的片段,*OsPLT11* 启动子报告基因融合载体转基因阳性植株 DNA 应扩增至 2 677 bp 大小的片段,凝胶电泳检测(图 2)显示从 *OsPLT7* 和 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载体转基因植株基因组 DNA 扩增得到的条带大小与预期一致,*OsPLT7*启动子



1~4:*OsPLT7* 启动子报告基因融合载体 T₀/T₁代转化苗 T₀/T₁ transgenic seedlings of *OsPLT7* promoter-reporter fusion vector; 5~8:*OsPLT11*启动子报告基因融合载体 T₀/T₁代转化苗 T₀/T₁ transgenic seedlings of *OsPLT11* promoter-reporter fusion vector; Z:中花 11 品种(阴性对照) Zhonghua 11(Negative); W:水(阴性对照) Water(Negative); M:DNA marker.

图 2 部分 T₀/T₁ 代转基因植株 PCR 阳性检测

Fig. 2 Parts of PCR identification of T₀/T₁ transgenic seedlings



A-B:水稻种子垂直培养于 1/2MS 固体培养基 4 d 后进行根部 GUS 染色及体视显微镜观察 Stereomicroscope observation of 4-day-old rice root grown on vertical hard 1/2MS medium surfaces by GUS staining; C-F:水稻种子垂直培养于 1/2 MS 固体培养基 4 d 后进行根部 GUS 染色及微分干涉显微观察 Differential interference contrast observation of 4-day-old rice root grown on vertical hard 1/2MS medium surfaces by GUS staining; T₁代 *OsPLT7* 启动子报告基因融合载体转基因植株(A, C, E) T₁ transgenic seedlings of *OsPLT7* promoter-reporter fusion vector(A, C, E); T₁代 *OsPLT11* 启动子报告基因融合载体转基因植株(B, D, F) T₁ transgenic seedlings of *OsPLT11* promoter-reporter fusion vector(B, D, F).

图 3 *OsPLT7*、*OsPLT11* 启动子报告基因融合载体转基因植株 GUS 染色

Fig. 3 GUS staining of transgenic plants with *OsPLT7* and *OsPLT11* promoter-GUS fusion vectors

报告基因融合载体 T_0 代转化苗阳性率为 97.2% (36/37)。选取 T_0 代阳性植株的种子混种培养生长, 共得到 T_1 代植株 25 株, 阳性检测表明阳性率为 72.0% (18/25)。 χ^2 测验表明, T_1 代转基因植株阳性率分离比符合遗传规律 ($\chi^2 = 0.00$; $P < 0.01$)。 O_sPLT11 启动子报告基因融合载体 T_0 代转化苗阳性率为 89.2% (33/37), 选取 T_0 代阳性植株种子混种培养生长, 共得到 T_1 代植株 34 株, 阳性率为 73.5% (25/34)。 χ^2 测验表明, T_1 代转基因植株阳性率分离比符合遗传规律 ($\chi^2 = 0.00$; $P < 0.01$)。

2.3 阳性转化苗 GUS 染色观察

选取 T_0 代阳性转基因苗的水稻种子, 经 GUS 染液染色后, 进行体视和微分干涉显微镜观察 GUS 组织化学染色情况。结果表明, O_sPLT7 和 O_sPLT11 启动子驱动 GUS 基因的表达模式类似 (图 3-A、B), 且类似于其同源基因在拟南芥的表达谱^[13]。 O_sPLT7 和 O_sPLT11 表达部位主要集中在水稻根部 QC 区、干细胞小生境部位 (图 3-C、D), 并在水稻主根中柱组织中呈不均匀点状分布 (图 3-E、F)。 O_sPLT7 较 O_sPLT11 的表达范围更广, 干细胞小生境部位 GUS 着色范围更大, 并于转基因植株主根分生区、生长区和成熟区中柱均有着色 (图 3-A、C); 而 O_sPLT11 未见于根部分生区中柱部位表达 (图 3-B、D)。此外, O_sPLT7 较 O_sPLT11 在中柱部位的表达范围更大程度更强 (图 3-E、F)。染色结果间接证明 O_sPLT7 和 O_sPLT11 与水稻根部 QC 细胞特异性和维持干细胞小生境的活性相关, 功能与拟南芥 PLT 基因类似。

3 讨论

水稻和拟南芥分属进化最高级的单子叶植物纲和双子叶植物纲中的模式植物, 而且大多数学者都赞同单子叶植物起源于双子叶植物。依此来看, 以拟南芥的研究结果作为水稻研究的依据是非常可行的。本研究以拟南芥 PLT 基因序列为基础, 通过 Blast 分析成功预测了 2 个水稻 PLT 基因 O_sPLT7 和 O_sPLT11 。通过构建 O_sPLT7 和 O_sPLT11 的启动子报告基因融合载体并转化水稻, 经 GUS 染色观察到 O_sPLT7 和 O_sPLT11 的表达区域与拟南芥中的同源 PLT 表达谱极为类似。间接证明 O_sPLT7 和 O_sPLT11 功能可能与水稻根部 QC 细胞特异性和维持干细胞小生境的活性相关, 功能与拟南芥 PLT 基因类似, 为进一步研究水稻的 PLT

基因的功能打下了基础。由于水稻的根相比拟南芥细胞层数多得多, 不易观察, 故此部分研究还需要对 O_sPLT7 和 O_sPLT11 启动子融合载体的转基因阳性苗根部进行 GUS 染色后, 对其进行树脂切片观察, 从而更清晰地观察其表达部位。同时, 由于拟南芥 PLT 基因与生长素关系密切, 可将阳性苗的根部经过生长素等激素处理后, 再进一步观察表型变化。此外, 利用分子生物学方法在水稻中进行 PLT 基因敲除和表型互补实验也都是必要的。由于根对植物的营养吸收、生长发育阶段及抗逆境胁迫极为重要, 本研究成果有望应用于水稻品种的根系改良, 从而提高水稻生产效率。

参 考 文 献

- [1] RICHARDS B M. Deoxyribose nucleic acid values in tumour cells with reference to the stem-cell theory of tumour growth [J]. Nature, 1955, 175: 259-261.
- [2] ALISON M R, POULSOM R, FORBES S, et al. An introduction to stem cells [J]. J Pathol, 2002, 197: 419-423.
- [3] MIKKERS H, FRISEN J. Deconstructing stemness [J]. EMBO J, 2005, 24: 2715-2719.
- [4] WEIGEL D, JURGENS G. Stem cells that make stems [J]. Nature, 2002, 415: 751-754.
- [5] WEISSMAN L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities [J]. Science, 2000, 287: 1442-1446.
- [6] MORRISON S J. Stem cell potential: can anything make anything [J]. Curr Biol, 2001, 11(1): 7-9.
- [7] ROBERT S. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14: 605-611.
- [8] SCHERES B. Stem cells: a plant biology perspective [J]. Cell, 2005, 122: 499-504.
- [9] BYRNE M E, KIDNER C A, MARTIENSSEN R A, et al. Plant stem cells: divergent pathways and common themes in shoots and roots [J]. Curr Opin Genet Dev, 2003, 13: 551-557.
- [10] BAURLE I, LAUX T. Apical meristems: the plant's fountain of youth [J]. Bio Essays, 2003, 25: 961-970.
- [11] MAYER K F, SCHOOF H, HAECKER A, et al. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem [J]. Cell, 1998, 95: 805-815.
- [12] AIDA M, BEIS D, HEIDSTRA R, et al. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche [J]. Cell, 2004, 119: 109-120.
- [13] GALINHA C, HUGO H, MARIJN L, et al. *PLETHORA* proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development [J]. Nature, 2007, 449: 1053-1057.
- [14] DING Z, FRIML J. Auxin regulates distal stem cell differentia-

- tion in *Arabidopsis* roots[J]. PNAS, 2010, 107: 10246-10251.
- [15] LOPEZ B J, CRUZ R A, HERRERA L. The role of nutrient availability in regulating root architecture[J]. Curr Opin Plant Biol, 2003, 6: 280-287.
- [16] FUKAI S, COOPER M. Development of drought-resistant cultivars using physiomorphological traits in rice[J]. Field Crops Research, 1994, 40: 67-86.
- [17] RICHARDS A R. Genetic opportunities to improve cereal root systems for dryland agriculture [J]. Crop Science Society of Japan, 2008, 11(1): 12-16.
- [18] 林拥军. 农杆菌介导的水稻基因转化研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2001.

Cloning and expression analysis of two *PLT* genes promoters in rice

ZHANG Chen¹ WANG Li-kai¹ BAO Liang¹ LONG Tuan¹ CHEN Chun-li² XU Jian¹

1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To study the expression and function of *PLT* in rice, two *PLT* genes in rice (*OsPLT7* and *OsPLT11*) were firstly predicted from searching the homology of *Arabidopsis PLT* genes protein sequences against rice database. According to the predicted promoter sequences of *OsPLT7* and *OsPLT11*, we designed the PCR primers and amplified the consequent promoter fragments of *OsPLT7* and *OsPLT11* using genomic DNA of *Oryza sativa* L. Zhonghua 11 as templates. Finally, we cloned these fragments into the vector containing reporter genes GUS/YFP and successfully transformed these promoter-reporter fusion vectors into rice. GUS staining observation of T₁ transgenic seedlings of *OsPLT7* and *OsPLT11* promoter-reporter fusion vectors indicated that both *OsPLT7* and *OsPLT11* are expressed mainly in stem cell niche and stele area in rice root, which are very similar to the expression profile of their homologous genes in *Arabidopsis*. These results will be useful for the functional studies of the *PLT* family transcription factors.

Key words rice; *Arabidopsis*; stem cell; *PLT*; promoter reporter gene fusion vector

(责任编辑: 张志钰)