

维管束特异表达启动子及其顺式调控元件

刘昱辉 贾士荣*

(中国农业科学院生物技术研究所,北京 100081)

摘要 综述了维管束特异表达启动子及其顺式调控元件和基元序列调控基因表达的研究进展,它们在抗细菌、真菌性维管束病害的作物基因工程中具有广阔的应用前景。

关键词 维管束特异启动子,顺式调控元件,基元序列

中图分类号 Q756 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)02-0131-05

80年代初,随着农杆菌介导法将外源基因成功地导入植物,开始了对转基因植物中外源基因表达调控的研究。对多数基因而言,转录调控是基因表达的主要调控步骤。顺式作用元件(cis-elements)和反式作用因子(trans-elements或trans-acting factors)共同作用控制基因的转录。大量实验证据表明,顺式元件和某些基元序列(Motif)在控制基因的特异表达中起重要作用。本文将就维管束特异表达基因及其

顺式调控元件作一综述。

迄今为止,已克隆的启动子包括(1)组成型启动子(2)组织特异型启动子(如木质部、韧皮部、分生组织、绒毡层),维管束特异表达启动子见表1(3)器官和发育阶段特异启动子(如根、茎、叶、花、果实、种子)(4)细胞特异启动子(如保卫细胞、花粉)(5)激素诱导启动子(如ABA、GA)(6)环境诱导启动子(如冷、热、光、盐、病原物、紫外线)等。

表1 维管束特异表达启动子

Table 1 Vascular specific promoters

Gene	Source	Expression	References
Phenylalanine ammonia lyase	Bean	Vascular, sepals, anthers, carpels	[1]
<i>Profilin2 (PFN2)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Vascular	[2, 3]
<i>GRP1.8</i>	Bean	Vascular	[4]
<i>MsPR10-1</i>	<i>Medicago sativa</i>	Vascular	[5]
TED2, TED3, TED4	<i>Zinnia elegans</i>	Vascular	[6]
<i>rol A, B, and C</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Phloem, root cap	[7]
Sucrose synthase-1	Rice, maize	Phloem	[8, 9]
Glutamine synthetase	Pea	Phloem	[10]
<i>Vein 1</i>	Bean	Phloem	[11]
CoYMV	Commelina yellow mottle virus	Phloem	[12, 13, 14]
<i>VAHOX 1</i>	Tomato	Phloem	[15]
<i>PP1</i>	Pumpkin	Phloem	[16]
<i>PP2</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	Phloem	[17, 18]
<i>BSP</i>	<i>Populus deltoides</i>	Phloem	[19]
<i>rs-1</i>	Tomato	Xylem	[20]
<i>SodA2</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	Predominantly in vascular bundles of roots, leaves, stems and flowers	[21]

Actin1、Ubiquitin、Emu等启动子是适于在单子叶植物中表达的组成型启动子。CaMV35S启动子(350 bp, -343 ~ +8)是目前在植物基因工程中应用最广的组成型启动子,尤

其适合于双子叶植物中基因的表达。蔡南海实验室的研究表明^[22-24],35S启动子可分为两个主要区段(1)A区(-90 ~ +8)。主要在根中及行将发育成根的胚性组织中表达,在

收稿日期 2002-09-19, 修回日期 2002-12-25。

基金项目 国家 863 高科技研究发展计划项目资助(No. 2001AA212171)。

* 通讯作者。 Tel 86-10-68919847, Fax 86-10-68975085, E-mail jiasr@public3.bta.net.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

根分生组织中表达最强。在表达调控中起关键作用,其中 A1 区(-90~-46)含 3 个基元序列(Motif),即 *as-1* (转录激活序列 1)、GATA 及 CA,它们分别与反式作用因子 ASF-1, GATA1 及 CAF 相结合,起转录调控作用。-46~+8 区含 TATA box,称为 35S 启动子的最小 TATA 区。-72~+8 区段称为 35S 启动子的最小启动子,因为将该区段与 B 区连接融合,在转基因烟草的所有发育阶段都检测不到 *gus* 报告基因的表达。(2)B 区(-343~-90)。主要控制在植物地上部分的表达,在子叶期胚及叶片的维管束、表皮及叶肉细胞、以及茎维管束中表达最强,在根中主要表达在维管束及根冠细胞中。A 区和 B 区是互补表达方式,且其作用很少重叠,既是一种简单的加性关系,又有复杂的组合关系,不同区段的相互组合,调控在不同物种、不同发育阶段、不同细胞和组织中基因的特异表达。他们称之为组合转录调控机制或顺式元件的组合控制。

1 维管束特异表达基因及其顺式调控元件

已知许多基因在维管束中特异表达,如蔗糖合酶-1 启动子可驱动 *gus* 基因韧皮部的特异表达^[8,9]。拟南芥 Profilin2 启动子驱动 *gus* 基因在拟南芥根、胚轴、子叶、萼片、花药和发育种子柄的维管束中特异表达^[2]。西葫芦韧皮部蛋白 1 (PP1) 在西葫芦根、下胚轴、子叶、茎、叶的韧皮部特异表达^[16]。发根农杆菌 *rolC* 启动子驱动 *gus* 基因在韧皮部、维管束鞘细胞、维管束薄壁细胞中表达,在木质部或非维管束组织中无表达^[8]。菜豆 *Vein1* 基因主要在叶、茎、花萼韧皮部表达^[11]。将椰子小叶腐烂病毒(CFDV)单链环状 DNA 转为双链 DNA 连接 *gus* 基因,转入烟草,能启动 *gus* 基因在茎、叶、花维管束木质部中表达^[25]。竹节花黄斑病毒(CoYMV)启动子驱动 *gus* 基因在转基因烟草韧皮部、韧皮部相关细胞、根、茎、叶的轴向薄壁组织及在整个花药、尤其是绒毡层中的特异表达。对该启动子的分析结果表明:-230~-200 bp 区段上有与 CaMV35S 启动子转录激活序列 *as-1* 类似的序列,缺失这一序列,在玉米悬浮细胞系中表达的活性降低 85%; -159~-84 bp 区段为维管束特异表达所必需^[12,43]。

某些基因还可受诱导在维管束中表达,如紫花苜蓿的 *MsPR10-1* 可受病原侵染诱导在维管束中特异表达^[5]。马铃薯 *Osmotin* 基因编码产物为病程相关蛋白 PR-5,该基因可受 ABA、 C_2H_4 、NaCl 诱导,在表皮和茎维管束薄壁细胞中特异表达^[26,27]。其 -248~-108 bp 是控制 C_2H_4 、ABA、NaCl 诱导表达及组织特异表达的顺式元件^[28]。菠菜亚硝酸盐还原酶启动子(3100 bp)受硝酸盐诱导,在转基因烟草的叶肉细胞、根茎维管束组织中呈诱导性特异表达。Rastogi 等^[29]对该启动子作缺失分析,分别构建了 -1730、-773、-330 和 -200 bp 4 种不同长度的 5' 端缺失型启动子与 *gus* 基因连接的植物表达载体,检测转基因烟草中 *gus* 基因的表达,发现 5' 端缺失到 -330 bp 仍能驱动 *gus* 基因受硝酸盐诱导的组织特异性表达,说明 -3100~-330 bp 之间的区段对硝酸盐诱导的组织特异表达没有影响。当 5' 端缺失到 -200 bp 时不能检测

到 GUS 活性,据此推测 -330~-200 bp 之间的 DNA 区段存在为基因诱导表达所必需的顺式元件,该区段为亚硝酸盐还原酶基因受硝酸盐诱导表达所必需。

迄今为止,研究得最为深入的维管束特异表达启动子有菜豆 *GRP1.8* (富含氨基酸细胞壁结构蛋白)、拟南芥 *profilin2* 和菜豆苯丙氨酸氨裂合酶 *PAL* 基因的启动子,已有的研究结果显示,某些基元序列对基因的维管束特异表达具有重要的调控作用。

1.1 *Grp 1.8* 启动子

富含氨基酸蛋白是一类细胞壁结构蛋白,按摩尔浓度计算,甘氨酸约占 60%。经抗体标记研究,已知菜豆 *GRP1.8* 定位在种壳和下胚轴发育中的年幼导管(原生木质部)内,与木质部次生壁的加厚密切相关。在菜豆和大豆中已知 *GRP* 表达在初生和次生木质部以及初生韧皮部中,*grp1.8* 启动子为研究基因在维管束组织中特异表达的分子基础提供了一个很好的体系。

经研究,*grp1.8* 启动子的转录调控也存在与 CaMV35S 启动子一样的组合调控机制,所不同的是除顺式元件之间的相互作用之外,还存在负调控因子 NRE(图 1)。

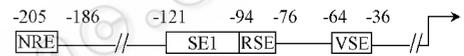


图 1 菜豆 *grp1.8* 启动子的调控元件

Fig. 1 Regulatory elements in the bean *grp 1.8* promoter

NRE: negative regulatory element; SE1: stem element; RSE: root-specific element; VSE: vascular specific element

Keller 等^[4]构建了以 -427 bp *grp1.8* 启动子驱动 *gus* 基因的植物表达载体,转化烟草,发现 *gus* 基因在转基因烟草中呈维管束特异表达。Keller & Baumgartner^[30]对 *grp1.8* 启动子进行了 5' 端缺失分析,分别构建了 -502、-304、-205、-199、-186、-143、-121、-94、-76、-22 bp 5' 端缺失型启动子,发现 7 个植物表达载体均能驱动 *gus* 基因在转基因烟草茎中表达,表达强度无明显改变。其中 -502/*gus*、-304/*gus*、-205/*gus* 呈维管束特异表达,-199/*gus* 除维管束中表达较强外,在皮层中也可检测到 *gus* 基因的表达,-186/*gus* 则明显由维管束特异表达变为组成型表达,即:非维管束细胞中的 *gus* 表达增强,维管束中的 *gus* 表达减弱。-94/*gus* 在茎中的表达明显降低,仅约为 -121/*gus* 的 1/10,这表明在 *grp1.8* 启动子的 -121~-94 bp 之间存在一个控制茎表达的正调控序列 -SE(Stem element)(图 1)。转基因植株根中 *gus* 基因的表达情况与茎中不同,-502/*gus*、-304/*gus*、-205/*gus*、-199/*gus*、-186/*gus*、-143/*gus*、-121/*gus*、-94/*gus* 在转基因植株根中的表达强度基本相同,-76/*gus* 在根中的表达较 -94/*gus* 显著降低,因此推测 *grp1.8* 启动子 -94~-76 bp 之间存在控制根表达的正调控元件 RSE(图 1)。

Keller & Heierl^[31]发现,将 *grp1.8* -205~-64 连接到 CaMV 35S-82 启动子 5' 端构成融合启动子,可驱动 *gus* 基因在转基因烟草中组成型表达,-205~-36 连接到 35S-82 启动子的 5' 端,*gus* 基因只在维管束中表达,推测 -64~-36

之间 28 bp (CTTTGCTCTCAACGCGCCTTCCCA ATCC, *vse-1*) 为 *grp1.8* 维管束特异表达所必需(图 1 中 VSE)。

据文献报道, *vs-1* (CATGCTCCGTTGGATGTGAAGACAGCA) 为转录因子 bZIP 蛋白 (VSF-1) 的结合序列。VSF-1 是一个转录激活因子蛋白, 其 C 端有一个亮氨酸拉链结构 - bZIP 基元序列, 与 *vs-1* DNA 呈序列特异性结合。*vs-1* 突变后不能与 VSF-1 结合, 同时也不再能驱动 *gus* 基因的维管束特异表达。为进一步验证 *grp1.8* 启动子这一区段的功能, 将 28 bp 的 *vs-1* 片段连接到 CaMV35S-82 bp 启动子的 5' 端, 构成融合启动子, 发现在转基因烟草中 *gus* 基因呈维管束特异表达, *vs-1* 连接到 *grp1.8-76* bp 启动子 5' 端构成的融合启动子, 也能驱动 *gus* 基因在转基因烟草中的维管束特异表达^[32]。

1.2 PFN2 启动子的维管束特异表达

Profilin 是一种 12 ~ 15 kD 的小分子量蛋白, 广泛存在于多种动植物的各种组织中, 如动物的巨噬细胞、血小板、脑、脾等植物的根、茎、叶、花、胚轴、子叶、萼片等。Profilin 参与调节肌动蛋白 (Actin) 的聚合和磷酸肌醇途径, 具有多种生物学功能, 通过调节 actin 的聚合可影响细胞骨架和细胞的形状, 改变细胞周期及物质运输等^[33]。

Christensen 等^[2]从拟南芥 (Columbia 生态型) cDNA 文库和基因组文库中, 克隆了 4 种 *pfn* 基因, 即 *pfn1*、*pfn2*、*pfn3*、*pfn4*。根据其氨基酸序列将其分为两类, 即 *Pfn1*、*Pfn2* 为一类 (氨基酸序列同源性为 89%), *Pfn3*、*Pfn4* 为另一类 (氨基酸序列同源性为 91%), 两类 profilin 间的氨基酸序列同源性仅为 71% ~ 75%。Northern 杂交表明, *pfn1*、*pfn2* 可在植物各器官中表达, *pfn3*、*pfn4* 仅在花中表达, 据此可将 profilin 分为两类, 即 *pfn1*、*pfn2* 为一类, *pfn3*、*pfn4* 为另一类, 这同根据氨基酸序列对其进行的分类一致。分析 *pfn2*、*pfn4* 启动子驱动 *gus* 基因在转基因拟南芥中的表达发现, *pfn4* 启动子驱动 *gus* 基因在花粉粒中特异表达, *pfn2* 启动子则为维管束特异表达, 如在根、下胚轴、子叶、叶片、萼片、花瓣、花丝和发育种子的种柄中均为维管束特异表达。

Liu 等^[3]在对 *pfn2* 启动子作 5' 端缺失分析中发现, -1667 ~ -1 bp *pfn2* 全长启动子驱动 *gus* 基因在转基因伽蓝菜的根、茎、叶中均呈维管束特异表达。5' 端缺失的 -1380 bp 启动子驱动 *gus* 基因除在根、茎、叶的维管束中表达较强外, 还在皮层和髓部的薄壁细胞中表达。-1153 bp 和 -969 bp 启动子不能驱动 *gus* 基因的表达。-597 bp 启动子驱动 *gus* 基因在根、茎、叶中的表达模式与 -1380 bp 启动子基本相同, 即除在维管束中表达较强外, 还在皮层薄壁细胞中表达。根据以上缺失分析结果, 将 *pfn2* 全长启动子分成三部分: 区段 A, -1667 ~ -1380 bp, 缺失该区段, 由维管束特异表达变为组成型表达, 由此推测在该区段内存在维管束特异表达的元件。区段 B, -1153 ~ -597 bp, 强烈抑制 *gus* 基因的表达, 推测在该区段中存在负调控因子。区段 C, -597 ~ -1 bp, 除在维管束中表达较强外, 还在薄壁细胞中表达, 故可认为它是 *pfn2* 的基本启动子。对 *pfn2* 启动子核苷酸序列

的进一步分析发现, -1391 ~ -1388 bp 处及 -565 ~ -562 bp 处各有一个 bZIP 蛋白结合位点的核心序列 ACGT。值得指出的是除玉米 O₂ 蛋白和 VSF-1 以外, 目前发现的所有 bZIP 蛋白的 DNA 结合位点处均含 ACGT 核心序列。bZIP 蛋白是植物中最丰富的一类转录因子, 它们参与调控查尔酮合酶基因的光诱导表达, 参与调节基因的 ABA 诱导表达及基因的病诱导表达等, 在植物中具有重要的作用。我们还发现^[3]在 *pfn2* 启动子的 -1647 ~ -1640 bp 处有一个与控制菜豆 PAL2 维管束特异表达的序列 AC-(CCCACCTACC) 相类似的序列 (CCACCTAC)。ACGT 及 AC-I 序列在 *pfn2* 启动子中调控维管束特异表达的作用正在作进一步实验验证。

1.3 PAL2 启动子

在高等植物发育过程中, 苯丙酸类化合物 (Phenylpropanoid) 代谢途径可提供多种前体, 它们积聚在不同类型的细胞中。其中包括细胞壁的结构成份, 如构成木质部细胞壁的木质素及构成细胞壁基质的木栓质 (Suberin)。来自苯丙酸类化合物代谢途径的花青素, 则在繁殖器官的特异细胞中积累, 如花瓣的着色区及花粉粒的外壳中。苯丙酸类化合物亦是植物对逆境反应 (如紫外线、创伤、病原感染等) 的产物。与细胞类型的特异积累不同, 这种环境激发因子诱导下的苯丙酸类化合物可表达在各种不同的细胞中。

苯丙氨酸氨裂合酶 (Phenylalanine ammonia lyase, PAL) 催化苯丙酸类化合物合成的第一步, 它是该代谢途径中的主要控制点。Bevan 等^[1]在转基因烟草和马铃薯中发现, 菜豆 PAL2 启动子 (全长 1200 bp) 驱动 *gus* 基因在茎木质部、皮层、表皮细胞、根尖、花瓣着色区和花粉粒中特异表达。Hattton 等^[34]对该启动子进行了更加深入的研究, 分别构建了 -1190/*gus*、-420/*gus*、-342/*gus*、-283/*gus*、-254/*gus*、-123/*gus*、-75/*gus* 等 7 个 5' 端缺失型启动子的植物表达载体, 转化烟草, 发现前 5 个的 *gus* 基因表达特性未发生改变; -123/*gus* 仅在花瓣着色区和花粉粒中表达, 根、茎木质部和表皮层中均测不到 GUS, 但可在韧皮部中清楚地检测到 *gus* 基因的表达; -75/*gus* 不能驱动 *gus* 基因的表达。PAL2 启动子中间缺失实验发现, 全长启动子中间缺失 -194 bp ~ -75 bp 或缺失 -194 ~ -123 bp 区段时, *gus* 基因在木质部中的表达强度降低, 缺失 -245 ~ -123 bp 区段, *gus* 基因的表达进一步降低, 当 -245 ~ -75 bp 区段缺失后, *gus* 基因在木质部中的表达强度降得很低, 但可在韧皮部中检测到 *gus* 基因的表达。这与 Leyva 等^[35]的实验结论基本一致, 即 -289 ~ -74 bp 区段为 PAL2 启动子根、茎木质部、皮层、花瓣着色区和花粉粒中特异表达所必需。将 -383 ~ -75 启动子连接到 CaMV35S-60 启动子的 5' 端构成融合启动子, 可驱动 *gus* 基因在根、茎木质部、皮层、花瓣着色区和花粉粒中特异表达, 与 1200 bp 全长启动子驱动 *gus* 基因在转基因植株中的表达相同。

进一步研究表明, 在 PAL2 启动子的 -83 ~ -74、-131 ~ -120、-246 ~ -238 处分别存在 3 个转录因子结合位点 (ACG-(CCCACCTACC)-ACG-I-(CCACCAACCCCG) 和 ACG-III-

(GTTATTTTC) 对 AC-I、AC-II 和 AC-III 进行突变,即以 T 代替双链 AC-I、AC-II 和 AC-III 中的 G,并改变其它碱基保持 GC 总量不变,发现 AC-I 或 AC-II 突变后, *gus* 基因在茎维管束中的表达均明显降低,为野生型的 1/2 ~ 1/3。AC-I 突变后在根中检测不到 *gus* 基因的表达; AC-II 突变对 *gus* 基因在根中的表达无影响。AC-I 和 AC-II 同时突变,在根、茎维管束、表皮中均检测不到 *gus* 基因的表达。AC-III 突变对 *gus* 基因的表达影响不大。说明 AC-I、AC-II 为 *PAL2* 启动子驱动 *gus* 基因维管束表达所必需, *PAL2* 启动子驱动 *gus* 基因维管束表达至少需要有 AC-I 或 AC-II 的存在。欧芹、拟南芥 *PAL* 启动子上也有与菜豆 *PAL2* - 132 ~ -121 (含有 AC-II, TCCACCAACCCC) 相似的保守序列 CCA(A/C)C(A/T)AAC(C/T)CC^[36]。欧芹的这一序列控制其细胞悬浮培养系受紫外和真菌诱导转录激活^[37]。与此类似, *ACL* 和其它编码苯丙酸类化合物的基因的 AC-rich 保守区也有转录因子结合位点^[38]。

综上所述,启动子中的顺式元件和基元序列对调控维管束特异表达有重要作用。众所周知,细菌和真菌性维管束病害如马铃薯青枯病、棉花黄枯萎病、香蕉 Panama 病等常造成严重的产量损失,由于缺乏抗源,常规育种进展缓慢,加之维管束病害难以用药剂防治,因而至今仍为生产中亟待解决的问题之一。维管束特异表达及其调控研究将为抗维管束病害作物基因工程提供最佳的启动子和元件。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Bevan M, Shufflebottom D, Edwards K *et al.* Tissue and cell specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *EMBO J*, 1989, **8**(7): 1899 - 1906
- [2] Christensen H E M, Ramachandran S, Tan C T *et al.* *Arabidopsis* profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant J*, 1996, **10**(2): 269 - 279
- [3] Liu Yuhui, Wang Zhixing, Jia Shirong. Effect of 5'-deletion of *Arabidopsis* profilin2 promoter on its vascular specific expression. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46**(19): 1627 - 1630
- [4] Keller B, Schmid J, Lamb C J. Vascular expression of a bean cell wall glycine-rich protein- β -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco. *EMBO J*, 1989, **8**: 1309-1314
- [5] Breda C, Sallaud C, El-Turk J *et al.* Defense reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles. *Mol Plant Microbe Interactions*, 1996, **9**(8): 713 - 719
- [6] Demura T, Fukuda H. Novel vascular cell-specific genes whose expression is regulated temporally and spatially during vascular system development. *Plant Cell*, 1994, **6**(7): 967 - 981
- [7] Schmulling T, Schell J, Spena A. Promoters of rolA, B and C genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants. *Plant Cell*, 1989, **1**: 665 - 670
- [8] Graham M W, Craig S, Waterhouse P M. Expression patterns of vascular-specific promoters RolC and Sh in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants. *Plant Mol Biol*, 1997, **33**(4): 729 - 735
- [9] Shi Y, Wang M B, Powell K S *et al.* Use of the rice sucrose synthase-I promoter to direct phloem-specific expression of β -glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco. *Plants J Exper Bot*, 1994, **45**(274): 623 - 631
- [10] Brears T, Walker E, Coruzzi G A. Promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthetase GS3A gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa. *Plant J*, 1991, **1**: 235 - 244
- [11] Foley R C, Liang Z M, Singh K B. A novel phloem-specific gene is expressed preferentially in aerial portions of *Vicia faba*. *Plant Mol Biol*, 1996, **30**: 687 - 695
- [12] Medberry S L, Olszewski N E. Identification of cis-elements involved in commelina yellow mottle virus promoter activity. *Plant J*, 1993, **3**: 619 - 626
- [13] WU B (吴标), PAN R Q (潘瑞琴), JU R (芦睿) *et al.* Deletion analysis and functional studies of the promoter from commelina yellow mottle virus. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1999, **39**: 15 - 21
- [14] YUAN Z Q (袁正强), JIA Y T (贾燕涛), WU J H (吴家和) *et al.* Comparison of three phloem-specific promoters in transgenic tobacco plants. *J Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2002, **10**(1): 6 - 9
- [15] Tomero P, Conejero V, Vera P. Phloem-specific expression of a plant homeobox gene during secondary phases of vascular development. *Plant J*, 1996, **9**: 639 - 648
- [16] Clark A M, Jacobsen K R, Bostwick D E *et al.* Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PPI), from *Cucurbita maxima*. *Plant J*, 1997, **12**(1): 49 - 61
- [17] Bostwick D E, Dannenhoffer J M, Skaggs M I *et al.* Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell*, 1992, **4**: 1539 - 1548
- [18] JIANG H (蒋浩), QIN H M (秦红敏), YU H M (虞红梅) *et al.* Cloning and function of the phloem protein gene promoter from *cucurbita maxima*. *J Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 1999, **7**(1): 63 - 68
- [19] JIANG H (蒋浩), QIN H M (秦红敏), TIAN Y C (田颖川). Cloning of a promoter fragment of bark storage protein gene from populus deltoids and its function in transgenic tobacco plants. *Scientia silvae sinica* (林业科学), 1999, **35**(5): 46 - 50
- [20] Torres-Schumann S, Ringli C, Heierli D *et al.* *In vitro* binding of the tomato bZIP transcriptional activator VSF-1 to a regulatory element that controls xylem-specific gene expression. *Plant J*, 1996, **9**: 283 - 296
- [21] Camp W V, Herouart D, Willekens H *et al.* Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 1996, **112**: 525 - 535
- [22] Odell J T, Nagy F, Chua N H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 1985, **313**(28): 810 - 812
- [23] Odell J T, Knowlton S, Lin W *et al.* Properties of an isolated transcription stimulating sequence derived from the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Plant Mol Biol*, 1988, **10**: 263 - 272
- [24] Benfey P N, Chua N H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: a

- 250 959 – 966
- [25] Rohde W , Becker D , Randles J W . The promoters of coconut foliar decay-associated circular single-stranded DNA directs phoem-specific reporter gene expression in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* , 1995 , **27** (3) : 623 – 628
- [26] Singh N K , Nelson D E , Kuhn D *et al.* . Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol* , 1989 , **90** : 1096 – 1101
- [27] Bol J F , Linthorst H J M , Cornelissen B J C . Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Ann Rev Phytopath* , 1990 , **28** : 113 – 138
- [28] Raghothama K G , Maggio A , Narasimhan M L *et al.* . Tissue-specific activation of the osmotin gene by ABA , C₂H₄ and NaCl involves the same promoter region. *Plant Mol Biol* , 1997 , **34** : 393 – 402
- [29] Rastogi R , Back E , Schneiderbauer A *et al.* . A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. *Plant J* , 1993 , **4** (2) : 317 – 326
- [30] Keller B , Baumgarther C . Vascular-specific expression of the bean GRP1.8 gene is negatively regulated. *Plant Cell* , 1991 , **3** : 1051 – 1061
- [31] Keller B , Heierli D . Vascular expression of the *grp1.8* promoter is controlled by three specific regulatory elements and one unspecific activating sequence. *Plant Mol Biol* , 1994 , **26** : 747 – 756
- [32] Ringli C , Keller B . Specific interaction of the tomato bZIP transcription factor VSF-1 with a non-palindromic DNA sequence that controls vascular gene expression. *Plant Mol Biol* , 1998 , **37** : 977 – 988
- [33] Cao L G , Babcock G G , Rubenstein P A *et al.* . Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells. *J Cell Biol* , 1992 , **117** (5) : 1023 – 1029
- [34] Hatton D , Sablowski R , Yung M *et al.* . Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a *PAL2* promoter in transgenic tobacco. *Plant J* , 1995 , **7** (6) : 859 – 876
- [35] Leyva A , Liang X , Pintor-Toro J A *et al.* . cis-element combinations determine phenylalanine ammonia lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* , 1992 , **4** : 263 – 271
- [36] Seguin A , Laible G , Leyva A *et al.* . Characterization of a gene encoding a DNA-binding protein that interacts *in vitro* with vascular specific cis elements of the phenylalanine ammonia-lyase promoter. *Plant Mol Biol* , 1997 , **35** : 281 – 291
- [37] Lois R , Dietrich A , Hahlbrock K *et al.* . A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley : structure , regulation and identification of elicitor- and light-responsive cis element. *EMBO J* , 1989 , **8** : 1641 – 1648
- [38] Douglas C J . Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis : from weeds to trees. *Trends Plant Sci* , 1996 , **1** : 171 – 178

Vascular-specific Promoters and cis-regulatory Elements

LIU Yu-Hui JIA Shi-Rong*

(Biotechnology Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China)

Abstract Vascular-resided bacterial and fungal diseases have caused a great deal of yield loss and quality reduction in crop production world-wide. For genetic engineering of crops resistant to these diseases , it is desirable to have a strong and vascular-specific promoter. This article reviews the progress in identification of vascular-specific promoters and its function. To date , roughly twenty vascular-specific promoters have been documented. The cis-elements and motifs have been studied in detail for the promoters of bean phenylalanine ammonia lyase(*PAL2*) , bean glycine-rich protein(*grp1.8*) and *Arabidopsis* profilin(*pfn2*) in particular. The motif of *vs-1* (CATGCTCCGTTCGATGTGGAAGACAGCA) found in *grp1.8* promoter was a cis-element that specifically bind to a transcription activation factor VSF-1 protein(one of the bZIP proteins). Mutation of *vs-1* prevented it from binding to VSF-1 that resulted in abolishing the vascular-specific expression of *gus* gene. Motifs of AC- I and AC- II found in *PAL2* promoter were also found to be essential for vascular-specific expression. In our laboratory we have dissected *pfn2* promoter into three domains(A , B , C) through 5'-deletion analysis. In this promoter we have identified two core sequences of ACGT that is commonly found in the binding sites of bZIP protein , the most abundant transcription factor existed in plants. In addition , the *pfn2* promoter also contains an AC- I like sequence(CCACCTAC) that is similar to the AC- I motif(CCCACCTACC) found in *PAL2* promoter. These promoters and cis-elements may have a wide range of potential applications to the genetic improvement of crops resistant to vascular diseases.

Key words vascular-specific promoter , cis-regulatory element , motif

Received : 09-02-2002

This work was supported by the Grant of National High-Tech Program(No. 2001AA212171).

* Corresponding author. Tel : 86-10-68919847 ; Fax : 86-10-68975085 ; E-mail : jiasr@public3.bta.net.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>