

拟南芥 *FRUITFULL (FUL)* 基因的表达调控模式

褚婷婷^{1,2}, 谢华^{1,2}, 徐勇², 马荣才^{1,2}

1 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

2 北京市农林科学院 农业生物技术研究中心, 北京 100097

摘要: *FRUITFULL (FUL)* 基因是一类 *MADS* box 基因, 在控制开花时间、花分生组织分化、茎生叶形态以及心皮和果实的发育中发挥重要作用。为了阐明 *FUL* 的表达调控模式, 克隆了拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *FUL* 启动子区 (-2 148 bp~+96 bp) 及其第一内含子, 并构建一系列启动子分段缺失表达载体及含 *FUL* 第一内含子的融合载体。并进一步构建了各顺式作用元件融合拟南芥 *TUBULIN* 和 *ACTIN* 启动子的表达载体。转基因拟南芥分析结果表明, *FUL* 启动子的上游存在 2 个抑制其表达的顺式作用元件, 其中一个很可能与转录因子 AP1 的结合有关; 2 个存在于上游调控区的 CArG-box 对 *FUL* 基因表达起到重要的调控作用; *FUL* 基因第一内含子参与拟南芥心皮和雄蕊的发育调控, 而且有增强基因表达的作用。

关键词: 拟南芥, *FUL* 基因, 启动子, 第一内含子, 缺失分析, GUS 活性

Regulation pattern of the *FRUITFULL (FUL)* gene of *Arabidopsis thaliana*

Tingting Chu^{1,2}, Hua Xie^{1,2}, Yong Xu², and Rongcai Ma^{1,2}

1 College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China

2 Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: *FRUITFULL (FUL)* is an *MADS* box gene that functions early in controlling flowering time, meristem identity and cauline leaf morphology and later in carpel and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. In order to clarify the regulation of *FUL* expression the upstream regulatory region, -2 148 bp~+96 bp and the first intron of the *FUL* gene were cloned, and vectors with a series of deletion of *FUL* promoter, and the ones fused with the first intron were constructed. Vectors harboring the fusion of *cis*-acting elements with the constitutive promoters of *TUBULIN* and *ACTIN* were also constructed. β -Glucuronidase activity assays of the transgenic *Arabidopsis* plants showed that two *cis*-elements were involved in the repression of *FUL* expression, with one of the two being probably the binding site of the transcriptional factor AP1. And the two CArG boxes played a important role in *FUL* initiation particularly. Furthermore, the first intron of *FUL* was shown to participate in the development of carpel and stamen as an enhancer.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *FUL* gene, upstream regulatory region, the first intron, deletion analysis, GUS activity

Received: March 18, 2010; **Accepted:** May 24, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB1087).

Corresponding author: Rongcai Ma. E-mail: marc@bjny.gov.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB1087) 资助。

拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中 *FRUITFULL (FUL)* 基因, 也称为 *AGL8 (AGAMOUS-LIKE 8)*^[1], 属于一类 *MADS box* 基因, 编码一种特异性转录因子。*FUL* 和 *APETALA1 (API)*、*CAULIFLOWER (CAL)* 都属于 *API/SQUA-like* 基因亚家族^[2], 在花同源异型器官发育的 ABCDE 模型中, 同属 A 类基因^[3]。其中 *API* 是花序分生组织特征基因, 也是花器官特征基因, 促进花瓣和萼片的发育^[4]。而 *API* 的旁系同源基因 *CAL*, 只在花发育过程中促进花分生组织的形成^[5]。与 *API* 和 *CAL* 相比, *FUL* 基因则具有更广泛的功能: 它既能在花发育早期促进花序分生组织的形成, 又能在花发育晚期心皮及幼嫩角果中表达, 同时还能调控叶片的发育^[6]。

在控制拟南芥开花时间方面, *FUL* 和 *TERMINAL FLOWER (TFL)*^[7]、*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*^[8] 等起到促进花起始发育的作用。拟南芥是兼性长日照植物, 在长日照 (16 h/d) 条件下比短日照 (8 h/d) 提前开花。在光周期依赖性开花途径中, 各种光周期调节基因由整合子 *CONSTANS (CO)* 整合后, 激活 *FLOWER LOCUS T (FT)* 基因在叶片维管束中表达, *FT* 被运送到顶端分生组织后, 引发 *FUL* 和 *SOC1* 在顶端分生组织中表达, *FUL* 参与调控芽分生组织向花序分生组织的转变, 随后 *FUL* 和 *SOC1* 在发育的花序原形成层中表达诱导其向花分生组织的转变, 从而控制开花时间^[9]。

在拟南芥发育早期, *FUL* 受 *API* 负调控。早期的营养器官内 *FUL* 几乎不表达, 直至拟南芥转变为生殖生长后, *FUL* 基因才在花序分生组织中强烈表达^[1]。*FUL* 由于受到 *API* 抑制, 最初只限定在花序分生组织中间的肋状区 (Rib zone) 中表达。植株抽薹后, 主茎花序延伸明显, 茎生叶发育成披针形, 叶腋处产生无限花序分生组织, 后来, 产生侧生有限花序分生组织, 后者只分化为不含托叶的花。在花发育过程中, *FUL* 在花分生组织的中央区域表达, 此区域后期发育成心皮。在心皮发育初期, *FUL* 在整个心皮原基中表达, 而随着心皮的继续发育, *FUL* 则主要集中在心皮的外壁上表达, 并从其他类型的

心皮组织细胞如胚珠、花柱、柱头以及子房隔膜上消失^[10]。此外, 当拟南芥转为生殖生长后可检测到 *FUL* 在芽分生组织、莲座叶、茎生叶中也有表达。Bamnlker 等发现, 在叶片中, *FT* 的产物促进 *FUL* 和 *SEPALLATA3 (SEP3)* 在莲座叶、茎生叶的维管束中表达, 从而控制叶片的形态^[11]。

FUL 基因控制拟南芥果实发育的功能也备受关注。一方面, *FUL* 控制角果的伸长, 突变体 *ful* 植株的心皮在受精后不久就停止伸长, 导致生成短小的果荚。同时, *FUL* 也控制角果果皮细胞的发育, *ful* 突变体的果皮细胞发育受阻, 形成拉链状扭曲的果皮^[12]。另外, *FUL* 基因也与拟南芥角果果荚开裂的性状有关。研究表明果荚离层特异基因 *SHATTERPROOF1 (SHP1)/SHATTERPROOF2 (SHP2)*^[13] 促进下游基因 *ALCATRAZ (ALC)* 和 *INDEHISCENT (IND)* 的表达, 其中基因 *IND* 控制果荚离层的 7 层细胞的不均等分裂^[14], 而 *ALC* 控制果荚离层细胞的木质化^[15]。在果荚中 *FUL* 基因抑制 *SHP1/2* 基因的表达, 进而抑制 *ALC* 和 *IND* 在果荚中的表达, 阻止果荚的木质化^[16]。假隔膜中有 *REPLUMLESS (RPL)* 基因^[17] 抑制 *SHP1/2*、*ALC* 和 *IND* 在假隔膜中的表达。因此, 在 *FUL* 和 *RPL* 共同抑制作用下, *SHP1/2*、*ALC* 和 *IND* 基因只在果荚离层里表达, 从而调控了果荚的开裂。研究表明, 过表达 *FUL* 的转基因拟南芥果荚离层细胞中 *SHP1/2*、*ALC* 和 *IND* 表达量下降, 离层细胞形成受阻, 且木质化程度降低, 导致成熟角果的果荚不开裂^[18]。芸苔属农作物, 如油菜, 由于果荚开裂造成产量降低, 是导致农业生产损失的重要方面, 而易位表达 *FUL* 在控制果荚开裂的特性中起到重要作用, 因此具有一定的研究价值^[19]。

对于 *FUL* 基因功能的研究已经比较深入, 然而对于 *FUL* 基因上游调控元件、内含子作用及表达调控模式的研究还很不深入。因此本实验旨在进一步阐明 *FUL* 基因表达的时空特异性及调控模式, 试图找到起作用的顺式作用元件, 及其调控的分子基础, 以期进一步揭示调控 *FUL* 基因表达的上游基因产物的作用位点, 为后期深入研究 *FUL* 基因的新功能及其参与的调控网络奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

野生型拟南芥 *Arabidopsis thaliana* Col-0 植株; 菌种为大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α , 根癌农杆菌菌株 *Agrobacterium tumefaciens* C58 (GV 3101::pMP90RK); 质粒为 pBI121。所用菌种、质粒均由本实验室保藏。限制性内切酶、*Taq* 酶、*Ex Taq* 酶和 T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 试剂公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 各种植物表达载体的构建

根据 <http://www.arabidopsis.org/> 搜索到基因 *FRUITFULL*(At5G60910)、*ACTIN* (At3G46520)^[20]和 *TUBULIN* (At5G62690)^[21]的序列, 设计各种引物, 见表 1。通过 PCR 扩增得到 *FUL* 的启动子序列 (简称为 *PFUL*) 及第一内含子序列 (简称为 Intron1), *ACTIN* 启动子序列 (简称为 *PACT*), *TUBULIN* 启动子序列(简称为 *PTUB*)。并通过 PLACE Web Signal Scan 找到 *FUL* 启动子上游 DNA 元件 CarG box (CC(A/T)6GG)^[22]。CaMV 35S 启动子中 46 bp 的基本启动子区 mini35S 序列^[23]。

构建一系列表达框: *FUL* 启动子序列的分段缺

失表达框 *PFUL2244*(-2 148 bp~+96 bp); *PFUL2083* (-1 987 bp~+96 bp); *PFUL1580*(-1 484 bp~+96 bp); *PFUL1124* (-1 028 bp~+96 bp); *PFUL474*(-378 bp~+96 bp); *FUL* 第一内含子融合 CaMV35S 基本启动子 mini35S 的表达框 Intron1+mini35S; *PFUL2244* 融合 Intron1 的表达框 *PFUL2244*+Intron1; *PFUL2244* 删除含 2 个 CarG-box 的 -1 916 bp~-1 737 bp 区的表达框 *PFUL* Δ CarG; *TUBULIN*、*ACTIN* 启动子的表达框 *PTUB*、*PACT*; *FUL* 的上游调控序列 *PFUL161* (-2 148 bp~-1 987 bp) 分别融合 *PTUB*、*PACT* 的表达框 *PFUL161*+*TUB*、*PFUL161*+*ACT*; *PTUB*、*PACT* 分别融合 Intron1 的表达框 *PTUB*+Intron1、*PACT*+Intron1。将上述所有表达框代替 pBI121 载体中的 CaMV35S 启动子, 启动 GUS 表达, 各表达框示意图见图 1。

1.3 拟南芥转化和阳性苗筛选

参考 Clough 和 Bent 的方法^[24]。电击法将植物表达载体转化至农杆菌 C58 中, 将含表达载体的农杆菌接入 YEP 培养基中 (含 Kan 100 mg/L; Ter 10 mg/L; Rif 50 mg/L), 200 r/min、28 $^{\circ}$ C 小摇过夜, 再在 400~500 mL YEP 培养基中 (含 Kan 100 mg/L; Ter 10 mg/L; Rif 50 mg/L) 接种 3 mL 菌液,

表 1 本实验所用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Purpose
pF-F1: CCCAAGCTTCGAATTAATAT	pF-R5: CGCGGATCCGAGAAA CGACAACCCTGAAAT	Construct <i>PFUL2244</i>
pF-F2: CCCAAGCTTTCAGGCC ACAGTCACGCAGT	pF-R5: CGCGGATCCGAGAAACG ACAACCCTGAAAT	Construct <i>PFUL2083</i>
pF-F3: CCCAAGCTTGGGACCGACATGAATGT TGTTTTG	pF-R5: CGCGGATCCGAGAAACGACAA CCCTGAAAT	Construct <i>PFUL1580</i>
pF-F4: CCCAAGCTTCAAGTGAATAA GTTATGGAATATAGGC	pF-R5: CGCGGATCCGAGAAACGAC AACCCTGAAAT	Construct <i>PFUL1124</i>
pF-F5: CCCAAGCTTATTGAGTTCTTTGGTCTG	pF-R5: CGCGGATCCGAGAAACGAC AACCCTGAAAT	Construct <i>PFUL474</i>
pF-F-412: GGAAGATCTAACAAATTTACGTCC GAAGGT	pF-R-231: GGAAGATCTTCCGGTG CCAGTTCTCC	Construct <i>PFUL</i> Δ CarG
In-F: CCCAAGCTTTCGTCGTC AGCCTTGAAATA	In-R: CGCGGATCCAGGTCAC CACTCGATTAATT	Construct Intron1
In-F: CCCAAGCTTTCGTCGTCAGCCTTGAAATA	In-mini35S-R: CGCGGATCCTCCTCTCCAAA TGAAATGAACCTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTG AGGTCAACACTCGATTAATT	Construct Intron1+mini35S
pA-F: CCCAAGCTTAAGTTTAAAT GGGTTTTGTTCCG	pA-R: CGCGGATCCGCGAAACGGTCA GATCATAGAGA	Construct <i>PACT</i>
pT-F: CCCAAGCTTGTGGGTAGTTGCT TGCCTAG	pT-R: CGCGGATCCTGGAAATTACGTCTGAAA CAACC	Construct <i>PTUB</i>

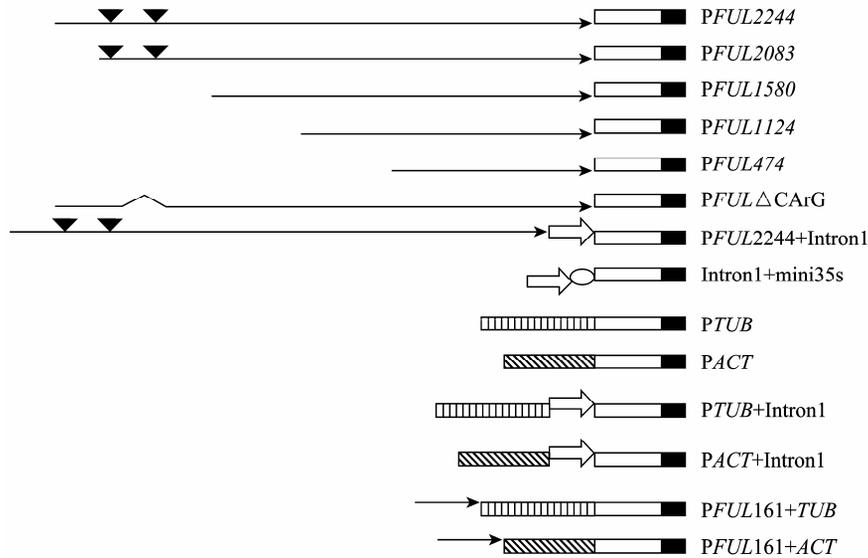


图1 构建的表达框

Fig. 1 Construction of expression cassettes. → represents the upstream regulatory sequences of *FUL*; □ represents *GUS* coding region; ■ represents *Nos*; ▼ represents *CArG* box; ⇨ represents *Intron1*; ▨ represents 1 *PTUB*; ▩ represents *PACT*; ○ represents *MINI35S* Promoter; ⋈ represents deletion of two *GArG* box.

200 r/min、28℃大摇过夜至 OD_{600} 大于 2.0。在 $4\ 900 \times g$ 、4℃离心 15 min 收集菌体，并悬浮于大约 3 倍体积的渗透培养液，此时的 OD_{600} 约为 0.8。采用花序浸渍法完成对拟南芥的侵染，将植株移入正常条件下培养 3~4 周，收集种子。将收获的拟南芥 T_0 代种子经消毒处理后，播种于含 50 mg/L Kan 的 1/2 MS 培养基平板上，4℃低温处理 2~3 d 转入 20℃光照培养室。将初步得到的阳性苗移到营养土中，继续培养。

1.4 GUS 活性检测

T_0 代植株收获种子后，经连续 4 代的卡那霉素抗性筛选、PCR 检测选择，在 T_3 代得到各转基因植株的纯合株系。GUS 组织化学染色参考 Jefferson 的方法^[25]。取每种转基因材料 T_3 代经 PCR 鉴定为阳性的 15~20 个独立株系，将植物组织浸入适量的染色缓冲液中，后加入适量的浓度为 1 mg/mL X-Gluc 溶液，抽真空 5 min，密封 37℃避光过夜，70%酒精漂洗多次脱除叶绿素，观察组织是否有蓝色出现。将各种转基因植株染色后在 Leica MZ16F 荧光体式显微镜下观察并拍照。

GUS 定量分析参考 Gallagher 的方法^[26]。GUS 活性用每毫克蛋白每分钟形成的 4-MU 的 pmol 表

示，取每种转基因材料 T_3 代 15~20 个独立株系进行测量求各自平均值。

2 结果与分析

2.1 *FUL* 启动子分段缺失转基因植株的 GUS 活性

各种转基因 T_3 代植株经 PCR 鉴定后，取 PCR 结果为阳性的 15~20 个独立株系进行 GUS 组织化学染色。其中每种转基因植株都有一定比例 (约 65%~82%) 的独立株系染色结果相同，具体比例数据见表 2。

转基因植株 *PFUL2244* 播种后 7 d (图 2a)、14 d (图 2b)、21 d (图 2c) 的植株 GUS 染色均为阴性。抽苔开花后，*PFUL2244* (图 2d, 2e) 在莲座叶、茎生叶和花的萼片中有 GUS 表达，而野生型 *Col-0* 没有 GUS 活性 (图 2f)。

转基因植株 *PFUL2083* 播种后 7 d (图 3a)、14 d (图 3b)、21 d (图 3c) 的植株幼苗期子叶和幼小莲座叶均有 GUS 表达。抽苔开花后，*PFUL2083* (图 3d, 3e) 在莲座叶、茎、茎生叶及花的萼片均有 GUS 活性。并且 *PFUL2083* 的 GUS 活性比 *PFUL2244* 增加 0.4 倍 (图 6)。

表 2 各转基因植株相同表达模式株系所占比例

Table 2 Proportion of same expression patterns in different transgenic plants

Transgenic plants	Number of sample	Number of same expression patterns	Proportion (%)
PFUL2244	18	12	66.70
PFUL2083	20	13	65.00
PFUL1580	15	11	73.33
PFUL1124	15	12	80.00
PFUL474	16	13	81.25
PFUL Δ CArG	17	12	70.59
PFUL2244+Intron1	16	11	68.75
Intron1+mini35S	20	16	80.00
PTUB	18	14	77.78
PACT	16	13	81.25
PTUB+Intron1	15	10	66.67
PACT+Intron1	17	12	70.59
PFUL161+TUB	20	14	70.00
PFUL161+ACT	19	13	68.42

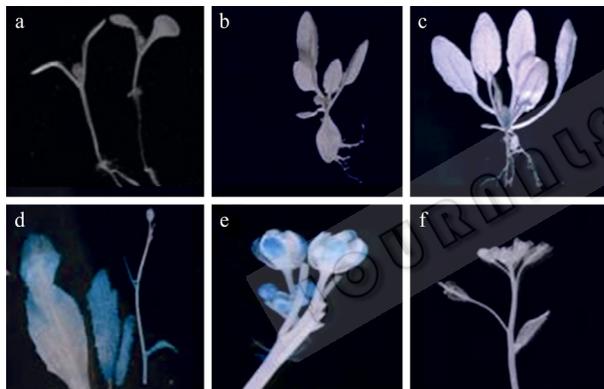


图 2 最长启动子 PFUL2244 的 GUS 染色模式

Fig. 2 GUS staining of transgenic plant PFUL2244. (a, b, c) GUS staining of seedlings at 7, 14 and 21 days of the transgenic plant PFUL2244, respectively. (d) GUS staining of PFUL2244 after the transition from vegetative growth to reproductive growth. (e) GUS staining of floral organ of PFUL2244. (f) GUS staining of Col.

抽苔开花后的转基因植株 PFUL1580 (图 3f)、PFUL1124 (图 3g) GUS 染色均为阳性, 而 PFUL474 (图 3h)、PFUL Δ CArG (图 3i) 和野生型 Col (图 2f) 无 GUS 活性。并且 PFUL1124 的 GUS 活性较强, PFUL1580 较弱。

2.2 *FUL* 第一内含子 (Intron1) 转基因植株的 GUS 活性

在营养器官中, PFUL2244+Intron1 和 PFUL2244 的 GUS 表达模式基本相同, 而在生殖器官中, 两者

产生明显差别 (图 4a, 左 PFUL2244+Intron1, 右 PFUL2244)。PFUL2244+Intron1 (图 4b) 从花蕾期到角果伸长期在萼片和心皮中 GUS 都有表达, 并且通过组织解剖染色可看到, 随着心皮的发育 GUS 活性从整个心皮向其两端集中 (图 4c)。而且 PFUL2244+Intron1 在成熟雄蕊的花粉中也有明显的 GUS 染色 (图 4d, 4e)。而 PFUL2244 只在萼片中表达 GUS, 心皮和雄蕊都没有活性 (图 4f, 4g, 4h, 4i)。这说明 *FUL* 的第一内含子在调控其表达模式中起着重要的作用。

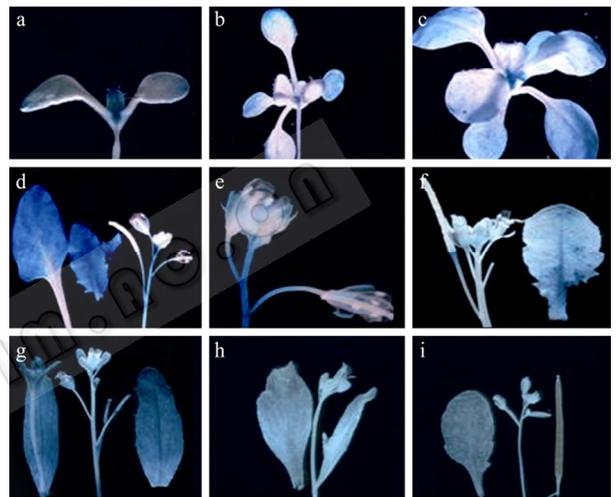
图 3 各 *FUL* 启动子缺失片段转基因植株 GUS 染色模式

Fig. 3 GUS staining of transgenic plants harboring different deletion of *FUL* promoter. (a, b, c) GUS staining of seedlings at 7, 14 and 21 days of the transgenic plant PFUL2083, respectively. (d) GUS staining of PFUL2083 after the transition from vegetative growth to reproductive growth. (e) GUS staining of floral organ of PFUL2083. GUS staining of transgenic plants PFUL1580 (f), PFUL1124 (g), PFUL474 (h) and PFUL Δ CArG (i), respectively.

2.3 Intron1 和 PFUL161 功能的进一步研究

进一步研究 *FUL* 第一内含子 Intron1 和上游 -2 148 bp~-1 987 bp (PFUL161) 区的功能。转基因植株 Intron1+mini35S (图 5e) 在茎、叶片、萼片和柱头中 GUS 表达均很强, 比 CaMV35S 启动 GUS (图 5a, 为转 pBI121 植株) 活性还强。ACTIN 和 TUBULIN 启动 GUS 表达活性都比较弱, 只在 PTUB (图 5b) 叶脉、花芽中和 PACT (图 5f) 叶片的叶脉、花托基部有少量表达。而 PTUB+Intron1 (图 5c) 的 GUS 活性明显提高, 在叶片、花芽和茎中表达较强, PACT+Intron1 (图 5g) GUS 活性也有提高, 在花柄、

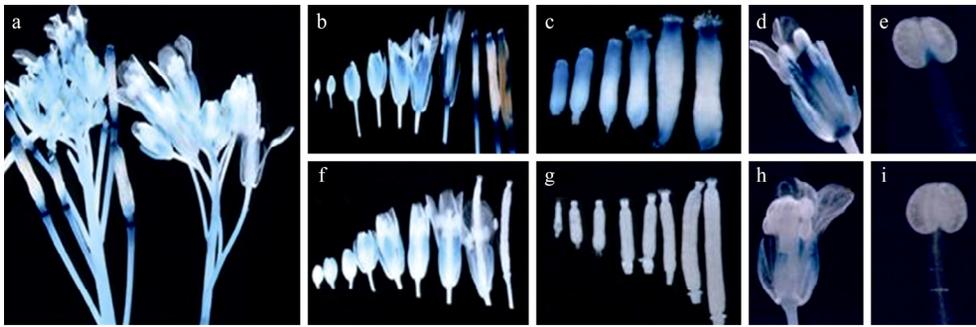


图 4 转基因植株 *PFUL2244+Intron1* 和 *PFUL2244* 的 GUS 染色

Fig. 4 GUS staining of transgenic plants *PFUL2244+Intron1* and *PFUL2244*. (a) GUS staining of *PFUL2244+Intron1* (left) and *PFUL2244* (right). (b, f) GUS staining of floral organs of *PFUL2244+Intron1* and *PFUL2244* from bud to silique, respectively. (c, g) GUS staining of the carpels of *PFUL2244+Intron1* and *PFUL2244* in different stages, respectively. (d, h) GUS staining of anatomical floral organ of *PFUL2244+Intron1* and *PFUL2244*, respectively. (e, i) GUS staining of stamens of *PFUL2244+Intron1* and *PFUL2244*, respectively.

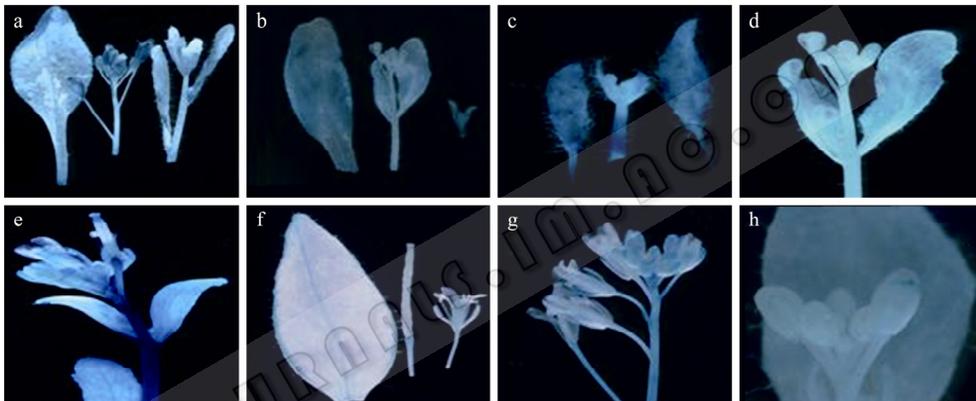


图 5 其他转基因植株的 GUS 染色

Fig. 5 GUS staining of other transgenic plants. GUS staining of transgenic plants pBI121 (a), *PTUB* (b), *PTUB+Intron1* (c), *PFUL161+TUB* (d), *Intron1+mini35S* (e), *PACT* (f), *PACT+Intron1* (g), *PFUL161+ACT* (h), respectively.

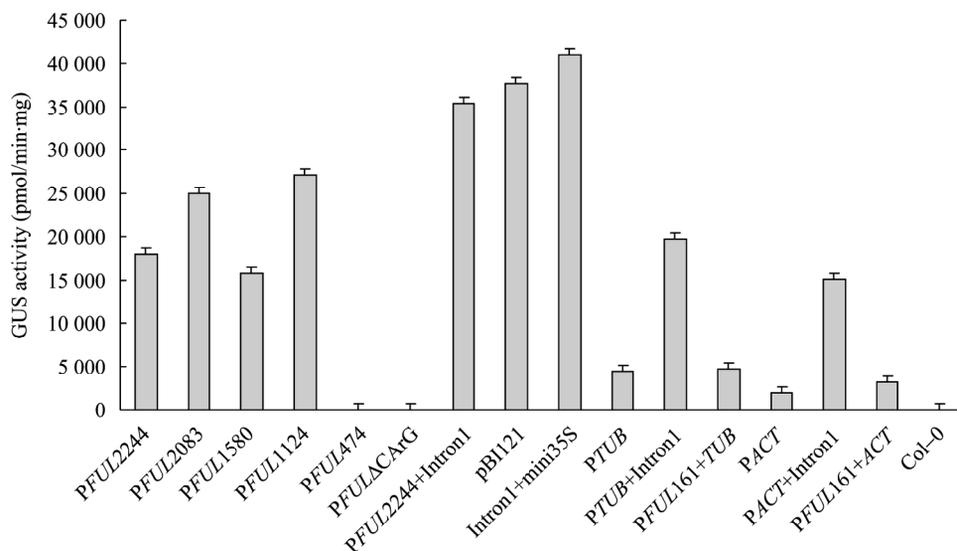


图 6 各转基因植株 GUS 定量分析

Fig. 6 GUS activity analyses of different transgenic plants.

萼片及茎中有较强表达。但 *PFUL161+TUB* (图 5d) 和 *PFUL161+ACT* (图 5h) 的 GUS 活性分别与 *PTUB*、*PACT* 没有太大的差别。

2.4 各种转基因植株 GUS 活性定量分析

从每种转基因株系 T₃ 代植株选取 15~20 株 GUS 组织化学检测为阳性的进行 GUS 定量分析, 各自取平均值代表各转基因植株 GUS 表达的活性, 见图 6。定量结果表明, 转基因植株 *Intron1+mini35S* GUS 染色活性最高, 约是转基因植株 *pBI121* 的 1.1 倍。*PFUL2244+Intron1*、*PFUL2083*、*PFUL1124* GUS 活性较强; *PFUL2244*、*PFUL1580* 活性较弱; *PFUL474* 和 *PFULΔCarG* 几乎无 GUS 活性; *Intron1* 使 *TUBULIN* 和 *ACTIN* 驱动 GUS 表达的能力增强; *PFUL161* 抑制 *TUBULIN* 和 *ACTIN* 启动子的能力并不明显, 与 GUS 组织化学染色结果基本相符。

3 讨论

基因的表达受到由 DNA 上的顺式作用元件与特异的反式作用因子构成的调控复合物的调控, 从而表现出时空特异性。转录因子与顺式元件的相互作用可能诱导或抑制基因的表达, 这些作用是通过复杂的调控机制来实现的^[27]。启动子分段缺失是研究相关的顺式作用元件的有效方法。本实验通过构建 *FUL* 一系列启动子分段缺失片段及内含子载体, 通过转基因、GUS 活性分析等技术, 分析实验结果, 可得到以下结论:

拟南芥 *FUL* 启动子上游调控序列 -2 148 bp~-1 987 bp 区能够抑制其自身启动子的活性, 而将 -2 148 bp~-1 987 bp 区连接到启动子 *TUBULIN* 和 *ACTIN* 中则不能抑制它们的活性。这说明 *FUL* 启动子上游调控序列 -2 148 bp~-1 987 bp 区的抑制作用不具有普遍性, 很可能是拟南芥中某个抑制 *FUL* 基因表达的转录因子的特异结合区域。*PFUL2244* (-2 148 bp~+96 bp) 在营养生长阶段无 GUS 活性, 表明在营养生长阶段 *FUL* 启动子及上游调控区 (-2 148 bp~+96 bp) 无法启动 GUS 表达, 直至转变为生殖生长阶段, 茎生叶和花器官中才有 GUS 活性, 这与 Jefferson 等^[25]的研究一致, 他们将 2.3 kb *FUL* 启动子融合 GUS 基因, 转基因拟南芥在营养生长阶

段没有 GUS 活性, 而一旦转入生殖生长, 在花分生组织和新生的茎生叶中表现出 GUS 活性。本实验中转基因植株 *PFUL2083* (-1 987 bp~+96 bp) 营养生长阶段的子叶、幼小莲座叶、茎以及生殖生长阶段的茎生叶、萼片均有 GUS 活性。根据 Mandel 和 Yanofsky^[1]研究表明 *AP1* 抑制 *FUL* 在营养生长阶段的表达, 直到转为生殖生长阶段在花分生组织发育到第 3 阶段时 *FUL* 才开始大量上调表达, 并且在新生的茎生叶中 *FUL* 也开始表达。综上, 我们认为 -2 148 bp~-1 987 bp 及其附近区域很可能就是转录因子 *AP1* 的结合位点。但是对于 *AP1* 是否真正作用于此区域, 直接作用, 还是与其他转录因子结合后再作用于此位点等问题还有待下一步深入研究。

FUL 上游调控序列 -1 484 bp~-1 028 bp 区也能够抑制自身启动子的活性, 其作用机制还需进一步研究。-378 bp~+96 bp 区不能单独启动 *FUL* 表达, 表明这是启动子最基本的核心区域。序列分析表明 *FUL* 启动子在 -1 916 bp~-1 737 bp 区含有 2 个 *CArG*-box。*CArG*-box 是具有 *MADS* 结构域的转录因子结合位点, 具有序列保守性, 一般为 CC(A/T)6GG^[28]。将 -1 916 bp~-1 737 bp 删除, 则 *PFULΔCarG* 失去启动活力, 说明对于 *FUL* 启动子来说, 这 2 个 *CArG*-box 起到很重要的作用。但是很难解释的是, 更短的 *FUL* 启动子缺失表达载体虽然不含这 2 个 *CArG*-box 却能启动 GUS 的表达。这暗示了在靠近基本启动子的区域有与这 2 个 *CArG*-box 共同起作用的顺式作用元件, 它们与转录因子相互作用形成复杂的复合体, 共同调控基因表达。

本实验研究还表明 *FUL* 的第一内含子参与 *FUL* 的表达调控。Deyholos 和 Sieburth 的研究表明拟南芥 *AG* 基因的第二内含子具有调控功能, 其 3'端序列对于激活 *AG* 的早期表达和调控 *AG* 在心皮中的表达有重要作用, 而 5'端的序列对 *AG* 在雄蕊中的表达更为重要^[29]。*AG-Like* 基因与 *AG* 基因有一定的序列相似性, 调控元件也有一定保守性, *AG-Like* 基因的内含子中大多至少包含一个 *CArG*-box^[30]。根据 PLACE Web Signal Scan 序列分析表明 *FUL* (*AGL8*) 的第一内含子内部存在 2 个 *CArG*-box (图 7)。本实验的结果证明 *FUL* 的第一内含子对拟南芥从幼蕾期

```

1   GTAAATGTTTTTAAATGTTTTATATTATATATACACATCGATCATATCTATCTGTTTTCTTGATCTTAAACCAGATTTTGTTTTTATTCGTA CTCTCG
101  ATCTCGATCGTCGTCAGCCITGGAAATAAAATCCAAAATCTCGTATCTTGGICTTTCATATCTTCTCTAGATTTGTTTGTTCCTAAGAACTGGCTCGAGAA
201  ATTAGGGTTTTTTTTGGGATTTTACGTACGGACGCATGAAAAGCTGTTTATGTTTTATTCTAAATTTCTTTCC TTTACCCAA TTGAAAATAGCATAA
301  AATTATGAAA CTTAGTACACACTCACGATTTGATGCCCCCTTTGATGTATGGAAGCACGTGCACTCAGACACGTACGAAGATATGTATGTAGATAAC
401  ATGTATAATAACTTGTAGTATACCATATATTGAAAGAAAGGTTGATTTGAAACGATGAAATAAAGCATTATAACAAGGATGTGCTATAATCCCCAAT
      CArG box
501  GGACAATAACATAACGTTAAACATATATGTAAGTTCGTA CTACTGATATTTTAAATGCGTTTTGTGAAAGTGTATATATATGTTTTATGTAC GATCATAGAG
601  ATTTATAGTGATCGTTTGCTTTGATAACCGAGTCAGGAGGGAAACTCGAATCTTTAAATTGAATTTGTACGTATGTTTTCTATGATGTTTTGTGGACTCA
      CArG box
701  CAAAACAGGTTCTATATACATTTTTGTGTTATATTCTTATTTTTAGCTATCTTTGTGCGGTATACCAAATACGGTAAACTTTTGGCTTGCA GTTTGTGA
801  ACAAATGTTACACATTATAACATGTGAAATTATAATAATTTTTATGGATCAAATTAATCGAGTGTGACCTTTTTTTTCTTTCTTAAATCTAG

```

图 7 *FUL* 第一内含子含两个 CARG box

Fig. 7 Two CArG box in the first intron of *FUL*.

到角果伸长期的心皮发育起调控作用, 并且随着发育的进行, 调控的区域逐渐向心皮两端集中。而且 *FUL* 的第一内含子也参与雄蕊花粉管的发育。这与 *AG* 的第二内含子的调控模式比较相似。另外, *FUL* 的第一内含子具有类似增强子的作用, 其增强作用通过转基因植株 *PTUB*+Intron1 和 *PACT*+Intron1 的 *GUS* 活性得到验证。表明 Intron1 有普遍的增强表达的作用。而且 Intron1+mini35S 单独启动 *GUS* 表达的能力比 *CaMV35S* 还要强, 如图 5e 所示, 转基因植株的叶片、茎、花器官中的萼片、心皮都有比较深的染色。并且 *GUS* 定量分析的结果也验证了其启动 *GUS* 的能力比 *CaMV35S* 还要强。所以有可能将 *FUL* 的 Intron1+mini35S 开发成像 *CaMV35S* 一样的通用启动子, 但这有待于进一步的验证。

总之, 我们验证了在 *FUL* 启动子的上游存在 2 个抑制 *FUL* 表达的顺式作用元件, 并且其中一个很可能与转录因子 AP1 的结合有关。在 *FUL* 上游调控序列的 2 个 CArG-box, 对 *FUL* 的启动活性起到重要作用。*FUL* 基因的第一内含子参与拟南芥心皮和雄蕊的发育调控, 而且有增强基因表达的作用。对于 *FUL* 基因表达模式的研究有利于将其更好地应用于作物新品种的培育, 如通过在油菜上过表达 *FUL* 或其同源基因可防止油菜角果开裂, 其他木本植物如桃、苹果和桦树的 *FUL* 同源基因的异源表达, 能促进早花, 改变植株形态, 减少二级分枝。相信随

着 *FUL* 基因的深入研究, 必将在农作物增产、品种改良方面作出重大贡献。

REFERENCES

- [1] Mandel MA, Yanofsky MF. The *Arabidopsis AGL8 MADS* box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1*. *Plant Cell*, 1995, 7: 1763–1771.
- [2] Litt A, Irish VF. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: implications for the evolution of floral development. *Genetics*, 2003, 165: 821–833.
- [3] Theißen G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 75–85.
- [4] Coen ES, Meyerowitz EM. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353: 31–37.
- [5] Kempin SA, Savidge B, Yanofsky MF. Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*, 1995, 267: 522–525.
- [6] Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, et al. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*, 2000, 127: 725–734.
- [7] Alvarez J, Guli CL, Yu XH, et al. *Terminal flower*: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1992, 2(1): 103–116.
- [8] Borner R, Kampmann G, Chandler J, et al. A MADS

- domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2000, **24**(5): 591–599.
- [9] Melzer S, Lens F, Gennen J, *et al.* Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 2008, **40**: 1489–1492.
- [10] Ferrándiz C, Pelaz S, Yanofsky MF. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem*, 1999, **68**: 321–354.
- [11] Bamnolker PT, Samach A. The flowering integrator FT regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 2005, **17**: 2661–2675.
- [12] Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky MF, *et al.* The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*, 1998, **125**: 1509–1511.
- [13] Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, *et al.* *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, 2000, **404**: 766–770.
- [14] Liljegren, SJ, Roeder A, Kempin S, *et al.* Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell*, 2004, **116**(6): 843–853.
- [15] Rajani S, Sundaresan V. The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr Biol*, 2001, **11**(24): 1914–1922.
- [16] Ferrándiz C, Liljegren SJ, Yanofsky MF. Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science*, 2000, **289**: 436–438.
- [17] Roeder A., Ferrándiz C, Yanofsky MF. The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Curr Biol*, 2003, **13**(18): 1630–1635.
- [18] Jack T. Plant development going MADS. *Plant Mol Biol*, 2001, **46**: 515–520.
- [19] Chandler J, Corbesier L, Spielmann P, *et al.* Modulating flowering time and prevention of pod shatter in oilseed rape. *Mol Breed*, 2005, **15**: 87–94.
- [20] Kabsch W, Vandekerckhove J. Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1992, **21**: 49–76.
- [21] Kopczak SD, Haas NA, Hussey PJ, *et al.* The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed [alpha]-*Tubulin* genes. *Plant Cell*, 1992, **4**(5): 539–547.
- [22] Riechmann JL, Meyerowitz EM. MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem*, 1997, **378**: 1079–1101.
- [23] Zhang JD, Lu LT, Ji LS, *et al.* Functional characterization of a tobacco matrix attachment region-mediated enhancement of transgene expression. *Transgenic Res*, 2009, **18**: 377–385.
- [24] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, **16**: 735–743.
- [25] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, **6**(13): 3901–3907.
- [26] Gallagher SR. GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. San Diego, CA: Academic Press Inc, 1992: 47–59.
- [27] Zhu C, Perry SE. Control of expression and autoregulation of *AGL15*, a member of the MADS-box family. *Plant J*, 2005, **41**: 583–594.
- [28] Miwa T, Kedes L. Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin gene. *Mol Cell Biol*, 1987, **7**(8): 2803–2813.
- [29] Deyholos MK, Sieburth LE. Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. *Plant Cell*, 2000, **12**(10): 1799–1810.
- [30] Parcy F, Nilsson O, Busch MA, *et al.* A genetic framework for floral patterning. *Nature*, 1998, **395**(6702): 561–566.