

杨树维管组织特异性启动子的克隆与活性分析

焦雪, 安轶, 卢孟柱, 张进*

(省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江农林大学, 浙江杭州, 311300)

摘要:【目的】由于树木世代周期较长, 林木育种过程往往非常耗时, 基因工程已成为加快林木遗传育种的可行方法。启动子在转录水平对基因表达的调控非常重要, 目前用于林木研究的基因工程技术通常使用组成型启动子, 如 CaMV 35S, 可能会导致转基因植株较对照植物生长缓慢、植株变矮、产量下降甚至导致死亡等问题。而通过特异性启动子使基因在维管组织中特异性表达, 不仅可以从分子水平了解维管组织的发生、分化过程, 还可以利用这些启动子精准调控外源基因表达位置, 调节维管植物的生长发育从而满足人类需求。【方法】本研究利用木材形成过程中的单细胞 RNA-Seq 数据和共表达网络分析, 在杨树中鉴定了三个维管组织特异性基因 *VNS07*、*PP2-A10* 和 *PXY*, 它们分别在成熟木质部、韧皮部和形成层/未成熟木质部中表达。并以银腺杨 (*Populus alba* × *P. glandulosa*) ‘84K’ 为材料, 在其基因组 DNA 中分别克隆到 *PagVNS07*、*PagPP2-A10*、*PagPXY* 基因的启动子, 将启动子片段连接到经改造的 *pCambia2300-Promoter-35s mini-GUS-35S-eyGFPuv* 载体中, 构建启动子表达载体 *ProPagVNS07::GUS*、*ProPagPP2-A10::GUS*、*ProPagPXY::GUS*。经农杆菌转化获得转基因植株, 采用组织化学染色、荧光定量 PCR、GUS 酶活检测、原位 PCR 的方法检测报告基因 GUS 的表达及活性。【结果】进行原位 PCR 鉴定 ‘84K’ 茎中三个基因的表达, *ProPagVNS07*、*ProPagPP2-A10*、*ProPagPXY* 启动子分别在维管组织的木质部、韧皮部和形成层/未成熟木质部特异表达。为进一步确定表达位置, 对转基因植株 GUS 报告基因进行检测发现, 转基因植株 GUS 表达量及活性显著增加。转基因植株经 GUS 染色及显微切片分析发现, *ProPagVNS07*、*ProPagPP2-A10*、*ProPagPXY* 启动子表达位置与原位 PCR 结果一致。【结论】所研究的 3 个基因启动子是组织特异性的启动子, 可以控制外源基因在次生维管组织中的特定部位表达, 通过利用维管组织的结构特征将功能基因与组织特异性启动子融合, 增加植物木质部生物量, 提高抗逆性, 从而充分利用韧皮部、形成层和木质部启动子。本研究为了解木本植物树木发育和木材形成的分子机制提供了新的理论依据和实际应用价值, 为基因工程中有目的的控制外源基因在维管组织中的表达研究奠定基础, 还可为定向改良树木材性提供手段和依据, 这对林业生产实践有良好的实用价值。

关键词: 杨树; 组织特异性启动子; 维管组织; GUS 基因