

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2014-0562

陈梦词,张婧,未丽,段丽婕,王锁民.组织特异性启动子的结构特征及其调控作用[J].草业科学,2015,32(5):780-795.

CHEN Meng-ci, ZHANG Jing, WEI Li, Duan Li-jie, WANG Suo-min. Structural features and regulating functions of tissue-specific promoters[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(5): 780-795.

组织特异性启动子的结构 特征及其调控作用

陈梦词, 张 婧, 未 丽, 段丽婕, 王锁民

(草地农业生态系统国家重点实验室 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020)

摘要:植物组织特异性启动子能够调控优良基因在特定器官或组织中表达,具有与基因特异表达相关的结构元件。研究发现,其在调节植物生长发育过程、抵抗生物和非生物胁迫等方面具有重要作用。本文分类概述了近年来植物不同组织特异性启动子的结构特征及调控作用的最新研究进展,并对今后组织特异性启动子研究方向进行展望。

关键词:组织特异性启动子;结构元件;植物基因工程

中图分类号:Q943.2;Q944.6

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2015)05-0780-16*

Structural features and regulating functions of tissue-specific promoters

CHEN Meng-ci, ZHANG Jing, WEI Li, Duan Li-jie, WANG Suo-min

(State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

Abstract: Tissue-specific promoters can regulate excellent gene expression in certain organs or tissues, with some structural elements relevant to gene-specific expression. Many researches indicated that tissue-specific promoters play critical roles in regulating plant growth and development processes and improving plant resistance to biotic and abiotic stresses. In the present paper, the latest research advances on structural features and regulating functions of tissue-specific promoters were reviewed and the research direction regarding tissue-specific promoters were also prospected.

Key words: tissue specific promoter; structural element; plant genetic engineering

Corresponding author: WANG Suo-min E-mail: smwang@lzu.edu.cn

植物组织特异性启动子亦称器官特异性启动子,能够调控基因在某些特定器官或组织中表达,并与植物发育相关。基因工程研究的关键是外源基因在细胞中的表达,而组织特异性启动子不仅能够一定器官或组织部位积累目的基因的表达产物,增加区域表达量,同时也能避免植物营养的不必要浪

费^[1]。经序列分析研究发现,组织特异性启动子中含有与其特异性调控相关的结构元件,此外,其活性也受特定的物理和化学信号诱导。作为调控外源基因在转基因植株体内定位、定时表达的重要元件,组织特异性启动子已成为分子生物研究工作的热点之一^[2]。近年来,研究者在植物的各种组织中都发现

* 收稿日期:2014-12-08 接受日期:2015-03-10

基金项目:教育部博士点基金优先发展领域项目(20130211130001);国家自然科学基金项目(31470503)

第一作者:陈梦词(1989-),女,青海西宁人,在读硕士生,研究方向为植物逆境生理与分子生物学。E-mail: chenmc08@lzu.edu.cn

通信作者:王锁民(1965-),男,甘肃宁县人,教授,博导,博士,研究方向为植物逆境生理与荒漠化治理。E-mail: smwang@lzu.edu.cn

有调控基因表达的特异性启动子,特别是在根、维管束和花器官特异性启动子研究中取得了很大进展,并且发现组织特异性启动子在植物器官发育、营养物质运输和贮藏、能量固定、抵抗生物和非生物胁迫以及植物与微生物互作方面具有重要作用。

1 植物组织特异性启动子的结构特征

高等植物组织特异性启动子具有真核生物启动子的基本结构元件,通常由核心启动子元件(Core Promoter Element)和启动子近端元件(Promoter Proximal Element)两部分组成,启动子区域与转录起始点相接,大约位于 $-250\sim+250$ 核苷酸区域,大部分植物基因多数情况下转录起点为A(腺嘌呤),且两侧多为嘧啶碱基。通过核心启动子起始转录至少需要 $-35\sim+35$ 核苷酸连续区域^[3],这个区域在 -30 至 -25 bp处通常包括一段TATAAA保守序列,称为TATA盒^[4]。近端启动子区域位于核心启动子区上游, -78 至 -70 bp处有另一段保守序列CCAAT,称为CAAT盒, -110 至 -80 bp区域有GC保守序列,称为GC盒^[4]。另外,起始因子(Inr)也是基因启动子的核心结构,与转录起始位点相重叠,一致序列为PyPyANT/ApyPy,其功能与TATA盒相似,能指导转录起始前复合物的装配、决定转录起始位点并调节上游激活蛋白的活性^[4]。组织特异性启动子除了具有以上基本结构元件外,位于TATA盒上游的一些特殊元件是决定其特异性调控的关键,以下分类概述了植物不同组织特异性启动子的结构特征于。

1.1 叶片特异性启动子结构特征

有关叶片特异性启动子结构元件的研究较少。Ye等^[5]从水稻(*Oryza sativa*)中克隆了绿色组织特异表达基因的启动子 P_{DX1} ,该启动子能够驱动GUS基因在绿色组织(如叶片、叶鞘和茎)中表达,同时发现该启动子包含两种顺式作用元件GSE1(CAGGACATATT)和GSE2(ATGAACTCAAAGAGCC),GSE1位于 -71 至 -61 bp,GSE2位于 $+1$ 至 $+16$ bp。GSE1元件对于该启动子在所有绿色组织中的GUS基因表达均有重要影响,而GSE2元件只在叶鞘和茎中发挥作用,且对于GUS基因表达影响较小。也有研究发现,在水杨酸(SA)调控下,玄参(*Scrophularia ningpoensis*)花叶病毒启动子中的TGACG元件能够增强该启动子在叶

片中的活性^[6]。另外,研究还发现一种重要的顺式作用元件L1盒(TAAATGCA),该元件在分生组织最外层表达的基因启动子中均有发现,对于该类启动子驱动下游基因特异表达发挥关键作用^[7]。

1.2 维管组织特异性启动子结构特征

在菜豆(*Phaseolus vulgaris*)GRP1.8启动子的研究中发现维管束特异性启动子元件vs-1(CATGCTCCGTTGGATGTGGAAGACAGCA),是转录激活因子蛋白VSF-1(C端有一个碱性区及亮氨酸拉链结构-bZIP基元序列)的结合序列^[8]。当两者不能结合时,就会失去维管束特异性^[8]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)proflin2维管束特异表达启动子的特异性区域表现在 $-1\ 667$ 至 $-1\ 380$ bp处,该区域中并没有vs-1或类似序列,只在 $-1\ 391$ 至 $-1\ 388$ bp及 -565 至 -562 bp处各有一个ACGT序列,这可能影响该启动子的维管束特异性^[9]。Freitas等^[10]从大豆(*Glycine max*)中克隆了维管组织特异表达的蔗糖结合蛋白启动子GmSBP2,分析了该启动子不同区域对于驱动下游基因表达部位的影响,发现 $-1\ 236$ 至 -971 bp区域对于该基因在维管组织特异表达具有重要作用。对菜豆苯丙氨酸裂解酶2启动子PAL2的研究中发现,AC-I(CCCACCTACC),AC-II(CCACCAACCCCC),AC-III(GTTAGGTTA)蛋白结合位点,其中AC-I和AC-II对于维管束特异性不可或缺^[11]。

另外,维管组织中韧皮部特异性启动子结构元件的研究较为详细,其序列中存在一个有13个核苷酸的保守序列T/ATAAGT/AACGAAT/CC/A,可能调控下游基因在韧皮部的特异表达^[12],例如,椰子(*Cocos nucifera*)腐叶病毒启动子中的ATAAGAACGAATC^[13],水稻东格鲁杆状病毒启动子中的TTAAGTACHAATC^[14],竹节花(*Dianthus chinensis*)黄斑驳病毒启动子中的ATAAGAACGAACA^[15],毛根农杆菌RoiC启动子中的TTAAGTACAGACA^[16],豌豆(*Pisum sativum*)谷氨酰胺合成酶启动子中的ATAAGACAGAATC^[17]。除此保守序列外,(GC)(GC)TATG序列可能也影响启动子的韧皮部特异性及其活性,例如美洲黑杨(*Populus deltoides*)树皮贮藏蛋白(BSP)和笋瓜(*Cucurbita pepo*)韧皮部蛋白2(PP2)启动子中的GCTATG,竹节花黄斑驳病毒启动子中的CGTATG^[18]。另外,该类启动子具有

组成型启动子顺式元件,例如竹节花黄斑病毒启动子中存在花椰菜花叶病毒 35S 启动子的激活序列(as-1),并含有类似该序列的 TGACG 重复序列,但区别是该序列在两种启动子中的位置不同^[18]。

1.3 根特异性启动子结构特征

ROOTMOTIFTAPOX1(ATATT)元件是根特异性启动子的基本元件^[19]。研究发现,水稻根尖特异性启动子 *Os04g24469* 的序列中存在 7 个与根系特异性密切相关的 ROOTMOTIFTAPOX1 元件,其中 5 个的位置靠近启动子序列 5' 端,两个位于起始密码子上游 500 bp 内,并且推测该启动子区域内的一些抑制或者阻遏基因的顺式作用元件同时也影响着 *Os04g24469* 启动子发挥作用^[19]。番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 根特异性基因 *LeGRP2* 的启动子中也包括 9 个 ROOTMOTIFTAPOX1 元件^[20]。同时还发现,根特异性启动子中细胞分裂素相关元件的含量很高^[21]。另外,根中不同区域特异性启动子也有各自特殊的调控元件,比如影响根毛特异性的 RHES 调控元件(CACG)^[22],影响根冠特异性的 AC 序列^[23]等。

1.4 花器官特异性启动子结构特征

矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 花器官特异性启动子 *CHSA* 受 UV 诱导,其中包含顺式作用元件 box2、box1、两个 G-box、两个 TACPyAT box、TA-TA box 和 cap site, -67 至 +1 bp 区域影响该启动子在 UV 诱导条件下发挥作用^[24]。不同花器官特异性启动子的元件不同,例如,菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) *MYBPLANT* 基因启动子中花茎特异性元件 MYBPLANT(MACCWAMC)^[25]; 豌豆 *MYB26PS* 基因启动子中花蕾特异性元件 MYB26PS(GT-TAGGTT)^[26]。

1.5 花粉特异性启动子结构特征

番茄花粉特异性启动子 *LAT52* 存在两个 PB (Pollen Box) 核心基序(TGTGGTT), -71 至 +110 bp 区域为调控花粉特异性的必需区域, -492 至 -145 bp 和 -124 至 -86 bp 区域可以增强该启动子驱动下游基因表达,但是真正影响其花粉特异性的顺式作用元件是位于 TATA box 上游 -72 至 -52 bp 的 AGAAA 和 TCCACCATA 序列^[27]。玉米 (*Zea mays*) 花粉特异性启动子 *Zm13* 中 -314 至 +61 bp 区域是花粉特异性的关键区域, -84 至 -53 bp 区域也决定着花粉特异性, -260 至 -100

bp 和 -107 至 -102 bp 区域可以增强该启动子驱动下游基因表达,其中 TTTCT 序列影响其活性^[28]。另外 GTGA 序列也影响该类启动子的特异性^[29]。

1.6 果实特异性启动子结构特征

由于果实特异性启动子调控的复杂性,对该启动子调控机理的研究不多,相关的顺式作用元件报道也较少^[30]。Yamagata 等^[31]研究了甜瓜 (*Cucumis melo*) *cucumisin* 基因启动子,发现在 -254 至 -215 bp 之间存在 1 个嘧啶碱基回文结构 TGT-CACA,并证明该序列对于果实特异性十分必要。此外,西瓜 (*Citrullus lanatus*) 果实特异性启动子 *AGPL1* 中存在 cis 元件(TC/TCAAAA),其抑制外源基因在果实外表达,从而形成果实特异性^[32]。

1.7 种子特异性启动子结构特征

RY 重复序列(CATGCATG)是种子特异性启动子驱动外源基因表达的重要元件,该序列常见于豆科和禾本科植物种子贮藏蛋白基因的上游调控区,能够调控下游基因的种子特异表达时间顺序^[33]。另外,还存在其他与种子蛋白贮藏及驱动下游基因特异表达相关的结构元件,例如, A(G/C/A) CCCA 序列^[34], ACGT 盒^[35]; TACACAT 盒^[36]; E 盒(CANNTG)^[37]等(表 1)。

2 植物组织特异性启动子的调控作用

2.1 叶片特异性启动子

叶片特异性启动子能在植物抵御逆境胁迫方面发挥重要作用。叶表皮蜡质能够阻止植物体内非气孔性水分散失^[38],因此叶表皮特异性启动子对于植物抵御干旱胁迫具有重要意义。Sessions 等^[39]最早克隆了驱动下游基因在地上部表皮表达的拟南芥 *AtML1* 启动子,该启动子能驱动 *CCT8* 基因在叶片表皮细胞中表达^[40]。另外,拟南芥 *AtCER6* 启动子也是地上部表皮特异性启动子,其 GUS 活性在茎、叶表皮细胞均具有较高的表达^[41]。Jiang 等^[42]用拟南芥 *AtCER6* 启动子驱动 *WXP1* 表达的转基因紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 植株中发现,干旱条件下转基因植株比野生型植株有更高的相对含水量、叶片水势和蜡质含量,增加了植株的抗旱性。笔者课题组(兰州大学草地农业科技学院王锁民课题组)克隆了拟南芥 *AtML1*、*AtCER6* 和蒺藜苜蓿 (*M. truncatula*) *MtML1* 启动子,并通过农杆菌介

导的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 瞬时侵染和拟南芥花粉管通道转染验证其活性, 拟构建 *ML1-ZxAB-CG11* (霸王蜡质转运蛋白) 和 *CER6-ZxABCG11* 载体并转入 *ZxNHX-ZxVP1* 共表达转基因紫花苜蓿, 增加植物表皮蜡质从而提高转基因苜蓿的抗旱性。同时叶片特异性启动子也能够参与植株抵御重金属胁迫和病虫害侵袭^[43]。植物通过产生一些有机分子从而降低重金属的毒害作用, 由植物螯合肽合酶催化产生的植物低分子质量蛋白螯合肽通过一些金属 (Ag、Cu、As、Hg 和 Cd, 其中 Cd 是最有效的催化剂) 诱导恢复活性状态, 而 Cd 通常积累在植物叶片中^[44]。Peterson 和 Oliver^[43] 将叶片特异性的水稻光系统 II 叶绿素 a/b 结合蛋白基因启动子 (*cab3*)^[45] 与拟南芥螯合肽基因构建表达载体, 并转入拟南芥 Cd 敏感型突变体和野生型植株, 研究表明, 该启动子能使拟南芥螯合肽基因表达在

表 1 组织特异性启动子结构元件
Table 1 Elements of tissue-specific promoter

组织 Tissue	结构元件/序列 Element/Sequence	参考文献 Reference
叶片 Leaf	GSE1 元件 element(CAGGACATATT)	[5]
	GSE2 元件 element(ATGAACTCAAAGAGCC)	[5]
	TGACG 序列 sequence	[6]
	L1 盒 box(TAAATGCA)	[7]
维管束 Vascular bundle	vs-1 序列 sequence(CATGCTCCGTTGGATGTGGAAGACAGCA) bZIP 基序 motif	[8]
	ACGT 序列 sequence	[9]
	AC- I (CCCACCTACC)、AC- II (CCACCAACCCCC) 序列 sequence	[11]
韧皮部 Phloem	T/ATAAGT/AACGAAT/CC/A 序列 sequence	[12]
	(GC)(GC)TATG 序列 sequence	[18]
	as-1 序列 sequence(TGACG)	[18]
	TGACG 序列 sequence	[18]
根 Root	ROOTMOTIFTAPOX1 元件 element(ATATT)	[19]
	RHES 元件 element(CACG)	[22]
	AC 序列 sequence	[23]
花器官 Floral organ	MYBPLANT 元件 element(MACCWAMC)	[25]
	MYB26PS 元件 element(GTTAGGTT)	[26]
花粉 Pollen	PB 基序 motif(TGTGGTT)	[27]
	AGAAA 序列 sequence	[27]
	TCCACCATA 序列 sequence	[27]
	TTTCT 序列 sequence	[28]
	GTGA 序列 sequence	[29]
果实 Fruit	TGTCACA 序列 sequence	[31]
	TC/TCAAAA 序列 sequence	[32]
种子 Seed	RY 重复序列 repeat sequence(CATGCATG)	[33]
	A(G/C/A)CCCA 序列 sequence	[34]
	ACGT 盒 box	[35]
	TACACAT 盒 box	[36]
	E 盒 box(CANNTG)	[37]

叶片中,通过 Cd 催化发挥活性从而降低金属对植物的毒害作用。植物防御过程中还会产生其他次生代谢产物,如异黄酮。咖啡树(*Coffea aturaica*)异黄酮还原酶基因启动子 *CaIRL* 在咖啡叶片机械损伤的情况下发挥活性,并驱动 *GUS* 基因在叶片特异表达,然而该启动子在烟草中能在正常情况下发挥活性,说明该启动子在这两种植物中存在不同的调控机制,并且具有宿主专一性,同时,该启动子驱动异黄酮还原酶基因在咖啡叶片表达能够对其真菌感染和机械损伤产生相应响应^[46]。

另一方面,该类启动子活性往往制约着基因工程的发展,因此研究其活性的影响因素尤为重要。叶片特异性启动子介导下游基因表达有时需要光调节,二磷酸核酮糖羧化酶是催化植物碳固定的重要酶类,并在植物体内表达量高,因此对其有多方面的研究。二磷酸核酮糖羧化酶有 8 个大小亚基组成,其小亚基(SSU)的启动子使目的基因在叶片表达起到关键作用,Marraccini 等^[47]克隆了咖啡树二磷酸核酮糖羧化酶亚基叶片特异性启动子 *RBCS1*,转基因烟草 *GUS* 染色发现光影响其活性,与此相类似的还有水稻光系统 II 叶绿素 a/b 结合蛋白启动子 *CAB2-p*^[48]。同时,植物生长周期也影响该类启动子的活性。拟南芥赖氨酸合酶(DHS)启动子 *AtDHS* 驱动 *GUS* 基因在植物莲座叶和花药中表达,其活性随着莲座叶不同发育阶段而有所差异,且在 5 周龄时活性最强,花芽活性高于盛花期活性,因此该启动子在时间和空间上对植物的发育有至关重要的作用^[49]。另外,叶片特异性启动子的活性也受其他诱导条件调节。核糖体失活蛋白(RIPs),例如麻疯树(*Jatropha curcas*)毒蛋白能使核糖体失活从而抑制蛋白质的生物合成,对于植物抗病毒和真菌侵袭并形成抵御系统有重要意义^[50]。麻疯树毒蛋白 *Curcin-L CP2* 启动子能够驱动 *GUS* 基因在转基因烟草的叶片中特异表达,并且在不同胁迫诱导条件,譬如脱落酸(ABA)、水杨酸、聚乙二醇(PEG)、4 或 45 °C 和紫外灯下活性不同,其中以 PEG 诱导活性最高^[51]。除此之外,Stenzel 等^[52]研究了拟南芥丙二烯氧化物环化酶(AOC)多肽的 4 个基因启动子 *AOC1*、*AOC2*、*AOC3*、*AOC4*,其中 *AOC1*、*AOC2*、*AOC3* 是叶片特异性启动子,其活性受茉莉酸诱导(表 2)。

2.2 维管组织特异性启动子

植物维管组织由木质部和韧皮部组成,主要负责水分和营养物质的运输,因此,维管组织特异性启动子可能与营养物质吸收相关(表 2)。Kovalchuk 等^[53]通过将小麦(*Triticum aestivum*)同源异型域-亮氨酸拉链蛋白基因启动子 *TdGL9H1* 与 *GUS* 基因融合转入小麦、大豆和水稻的研究表明,该基因在小麦和大豆盾片的维管束中表达,并且表达活性高,说明他可能参与种子萌发与营养物质吸收。高木质素含量会对造纸工业产生不利影响,肉桂酰辅酶 A 还原酶(CCR)和肉桂醇脱氢酶(CAD)能减少植物木质素合成,银合欢肉桂酰辅酶 A 还原酶(*LICCR*)和肉桂醇脱氢酶(*LICAD*)基因启动子能驱动 *GUS* 基因在转基因植株的木质化组织中大量表达,同时也观察到其在维管组织木质素含量的降低,因此该研究能够克服下调植物木质素含量的难题^[54]。

另一方面,维管组织特异性启动子活性与逆境胁迫相关^[55]。与植物抵御病菌相关的类萌芽素蛋白(GLPs)在植物体内普遍存在,将类萌芽素蛋白 13 基因启动子 *GLP13* 与 *GUS* 基因融合并转入拟南芥和烟草的研究表明,该基因在所有器官的韧皮部表达,并且两者无明显差别,同时该启动子包含病原体的相关元件,植物病害可能影响其活性^[56]。茉莉酸(JA)是植物生长和逆境胁迫响应的重要信号,由丙二烯氧化物环化酶(AOC)催化形成,拟南芥丙二烯氧化物环化酶(AOC)多肽包括 4 个基因启动子 *AOC1*、*AOC2*、*AOC3*、*AOC4*,其中 *AOC4* 能有效地驱动 *GUS* 基因在叶脉和根维管束中特异表达,并且该启动子活性随着茉莉酸诱导增加^[52]。另外,茉莉酸的生物活性分子茉莉酸甲酯也影响相关启动子的活性。番茄原系统素基因启动子 *SIPS* 在转基因烟草的叶柄维管束具 *GUS* 特异表达活性,且活性受茉莉酸甲酯诱导,表明该启动子可能参与植物响应逆境胁迫^[57]。此外,生长周期也参与该类启动子活性的调控。Saad 等^[58]从马伴草(*Aeluropus littoralis*)中克隆了锌脂蛋白 *AtSAP* 基因启动子 *PrAtSAP*,研究该启动子在盐、甘露醇、脱落酸和水杨酸处理下对植物不同生长阶段的影响,*GUS* 染色研究表明,其活性随着器官生长发育增强;无胁迫诱导条件下,只在老叶叶脉和茎维管组织中具有活性,且非生物胁迫对活性有促进作用,是一种从顶部向

基部发展并与年龄相关的表达模式,根与幼叶组织中没有活性,说明该启动子由转录后机制调控。

研究还发现,其他维管组织特异性启动子:拟南芥热激蛋白相关基因启动子 *Athspr* 与植物耐热性相关^[59];大豆蔗糖结合蛋白启动子 *SPB2* 与蔗糖吸收相关;桉树 *EGJFLV3247C08.g* 启动子能够提高转基因桉树的纤维素含量,并能抵抗其内生病原菌^[3](表 2)。

2.3 根特异性启动子

植物依靠根系统固定和支撑,通过其吸收和运输土壤中的水分、养分并合成和贮藏营养物质,因此,根系对于植物生长发育有十分重要的作用。根特异性启动子在干旱响应、病虫害抵御、根系营养成分改善等方面有突出的应用价值^[60]。植物水通道蛋白属于多基因家族内在蛋白(MIP),包括 5 种不同的亚家族,液泡膜内在水通道蛋白是其中一种,他们促进植物水分运输,并响应非生物胁迫^[61]。桉树(*Eucalyptus robusta*)液泡膜内在水通道蛋白(TIP)启动子 *EgTIP2* 在渗透胁迫条件下表现出维管组织和根尖特异性,甘露醇正向调控其活性,而脱落酸相反,表明该启动子对于桉树适应干旱环境具有重要作用^[62]。植物通过根吸收的营养物质主要包括磷和氮。在正常的自然条件下,土壤中硝态氮(NO_3^-)的含量要显著高于铵态氮(NH_4^+)的含量,因此,硝态氮在植物的生育周期中发挥着更为重要的作用^[63]。高等植物中已发现的 NO_3^- 转运蛋白主要有 NRT1 和 NRT2 两个家族^[64],Kong 等^[65]将百脉根(*Lotus corniculatus*)*LjNRT2* 和拟南芥 *AtNRT2.1* 启动子与 *GUS* 基因融合后转入烟草的结果表明,二者在烟草根中均具有活性。几丁质合酶(NIC)能抑制真菌生长,该研究将这两个启动子与 *NIC* 基因构建表达载体并将其转入烟草和番茄,表明转基因的烟草和番茄将 NIC 蛋白积累在植物根部从而抵御根部尖孢镰刀菌,使植物正常生长,该研究为植物抑制土传真菌和细菌病原体提供一种重要策略^[65]。山葵防御素(WD)也是一种真菌和细菌的抑制剂,Kong 等^[66]还将这两个启动子与 *WD* 基因构建表达载体转入烟草和番茄中,转基因植物根系同样对尖孢镰刀菌有抵御作用。另外,通过研究木薯颗粒结合型淀粉合成酶启动子 *GBSSI*,表明其活性在茎和根中,且在块状根中活性最高,该研究有助于提高植物块状根的营养物质含量^[67]。豆科植物

的固氮作用能够促进植物根系吸收营养,研究发现大豆血红蛋白 *Ibc3* 启动子为固氮细菌提供营养需求,从而促进固氮作用^[68]。

研究还发现其他根特异性启动子:拟南芥钙调蛋白相关基因 *CML43* 启动子参与根吸收钙离子,并受水杨酸诱导^[69];水稻 *Os03g01700* 和 *Os02g37190* 启动子调控目的基因在主根及次根中表达,根毛中不表达,且表达量高^[70],与之类似的还有大豆根 *PCit1,9* 启动子^[71](表 2)。

2.4 花特异性启动子

组成型启动子在花的某些特定部位活性较弱,研究花特异性启动子活性的强弱对当前生物技术的发展至关重要^[72]。类黄酮及其衍生物参与花的着色,并显著影响花特异性启动子活性^[73]。目前已经研究了类黄酮途径中的多种调控基因,并且多集中于类黄酮合酶^[74]。类黄酮生物合成第一步反应需要查尔酮合酶(CHS)的参与,Liu 等^[75]将百合(*Lilium brownii*)查尔酮合酶启动子 *PLoCHS* 与 *GUS* 基因融合并转入矮牵牛(*Petunia hybrida*),发现该基因表达活性在花中最高,且表达主要集中在花药和柱头,子房、花瓣、花萼和花梗的活性相对较低,而叶和茎中几乎没有活性;此外,其活性随着花发育阶段而增强,且在盛花期达到最高。同时,花特异性启动子活性也受植物激素和逆境胁迫的影响。挥发性有机物(VOCs)参与调控植物花气味,主要包括 3 种化合物:脂肪族化合物、苯环型和苯丙酯类以及萜类化合物。其中萜类化合物的合成需要类萜合酶(TPSs)催化^[76]。研究发现,花特异性的姜花(*Hedychium coronarium*)类萜合酶基因启动子 *PrHcTPS1* 和 *PrHcTPS2* 的活性在盛花期最高,且活性强弱与萜类化合物挥发相关,同时受昆虫、茉莉酸甲酯和伤口的显著诱导,该研究对园艺植物花气味的修饰有重要作用^[76]。不同的是,某些与植物激素相关的启动子并不受激素或逆境胁迫影响,植物受体激酶(RLKs)是与植物生长调节、激素信号相关以及在生物、非生物胁迫下响应的关键蛋白,其中富含半胱氨酸受体激酶(CRKs)参与抵御植物病原体并调控细胞程序性死亡^[77]。将番茄半胱氨酸受体激酶基因启动子 *SlCRK1* 与 *GUS* 基因融合并转入番茄和拟南芥,该基因只在成熟花粉具表达活性,并且不受非生物胁迫或激素调控^[78]。另外,温度也影响花特异性启动子的活性。水稻蔗糖

转运基因启动子 *OsSUT4* 能够驱动下游基因在萌芽和成熟的花粉以及花粉管中表达,并且高温条件比低温条件下活性高^[79]。此外,为了得到更强活性的花特异性启动子,Du 等^[80]构建了 4 种表达载体(*p35S-PCHS-Ω*、*p35S-LCHS-Ω*、*pOCS-PCHS-Ω*、*pOCS-LCHS-Ω*),其中包括烟草花叶病毒 35S 启动子或章鱼碱合酶启动子 OCS 的增强子、矮牵牛或百合的查尔酮合酶启动子 *CHS* 的核心区域以及 Ω 元件,其中 *pOCS-PCHS-Ω* 表达载体只在花冠处表现出强 GUS 活性,并培育出只在花冠显蓝的百合新品种,该研究对于花冠颜色的修饰有重要意义。

花的研究包括其颜色的改变,类黄酮类物质的次生代谢产物花青素能够使花表现出更多颜色,因而相比其他植物色素更为重要。花青素合酶(ANS)参与花青素合成的最后阶段,Lim 等^[81]克隆了烟草花青素合酶基因启动子 *NtANS1*,其活性部位只存在于花瓣的花冠缘,且活性高,该研究为应用基因工程改变花瓣颜色奠定基础。另外,Cook 和 Thilmony^[82]克隆了水稻成熟花粉精细胞 *OsGEX2* 启动子,其活性在转基因水稻花粉的精细胞中,其他组织和器官中没有活性(表 2)。

2.5 果实、种子特异性启动子

外源蛋白在果实或者种子中表达是基因工程研究的关键,对于提高营养元素含量有重要意义。种子营养物质含量的积累是植物繁殖的基础,淀粉是种子中不可或缺的营养物质。二磷酸腺苷葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)是淀粉合成步骤中一种关键的酶,该酶由两个大亚基和两个小亚基组成,大小亚基分别由不同的基因编码,其中小亚基由 *Brittle2* 基因编码^[83]。Chen 等^[84]从玉米胚乳中克隆了 *Brittle2* 基因启动子,将该启动子与玉米蛋白基因启动子 *Ze19*^[85]进行比较,发现他们均能驱动 *GUS* 基因在烟草种子中特异表达,*Ze19* 基因启动子的活性高于 *Brittle2* 基因启动子,且在种子发育过程中更早发挥作用,表明 *Ze19* 基因启动子参与调控淀粉的早期合成。另外,该类启动子能够参与重金属毒害的抵御。金属硫因(MTs)是富含半胱氨酸的金属蛋白结合位点,与细胞生长调节、金属离子转运以及重金属毒害防御有关^[86]。Kamaladini 等^[87]从油棕(*Elaeis guineensis*)中克隆了启动子 *MT3-A*,该启动子在 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 条件下能够驱动 *GUS* 基因在果实中高效表达,将 *MT3-A* 启动子与金属

硫因基因构建表达载体并转入番茄,发现转基因番茄幼苗的生长会对 Cu^{2+} 产生响应,表明 Cu^{2+} 条件下,*MT3-A* 启动子能够驱动金属硫因和植物螯合肽基因表达。该启动子能够提高植物抵御重金属胁迫的能力从而维持植物果实营养物质含量的稳定,也可能对缓解土壤及水资源的重金属毒害具有重要意义。

种子、果实特异性启动子对于植物品质特征提高有重要影响,种皮结构的修饰可以进一步提高种子质量。拟南芥种皮的表皮细胞分化具显著变化特征,包括大量厚纤维形成的次生细胞壁上果胶粘液的合成和分泌,这种变化对于研究细胞壁(尤其是果胶)的修饰有重要意义^[88]。Esfandiari 等^[88]研究了种皮表达基因 *DIRIGENT PROTEIN1* 启动子 *DP1*,发现在转基因拟南芥中其活性主要集中于表皮的栅栏组织,欧洲油菜(*Brassica napus*)中也有类似表现,该启动子是高价值重组蛋白研究的重要工具。另外,提高果实、种子特异性启动子的活性是基因工程研究的重点。绿豆贮藏蛋白的 90% 是 8S 球蛋白,由 3 个亚基组成,分别是 8SG α 、8SG α' 和 8SG β ^[89]。Chen 等^[90]将绿豆(*Vigna radiata*)种子特异性启动子 8SG α 与 *GUS* 基因融合的研究表明,该启动子活性比烟草花叶病毒 35S 启动子和 8SG α' 启动子活性高 2~4 倍,该启动子对于双子叶植物异源蛋白基因在种子中的表达有关键意义。落花生(*Arachis hypogaea*)种子特异性启动子 *GSP* 的研究也表现出活性高于烟草花叶病毒 35S 启动子,该研究有利于改善重要种子作物生态型^[91]。油棕硬脂酰一酰基载体蛋白脱饱和酶启动子(*Des*)5'端缺失分析中发现,该启动子驱动 *GUS* 基因在转基因番茄的果实、种子中特异表达,并且活性比烟草花叶病毒 35S 启动子高 4 倍,不同 5'端缺失类型启动子驱动 *GUS* 基因表达活性不同,其中 *Des3* 类型活性最高,*Des4* 类型活性最低^[92]。

除此以外,乙烯作为植物的天然激素,影响植物生长习性,促进果实成熟,并参与其衰老和脱落等,所以果实特异性启动子的研究离不开乙烯。研究者已经从番茄中克隆了与果实成熟相关的特异性启动子 *E4*、*E8*、*PG* 和 *2A11*^[93-94],其中 *E8* 启动子发挥作用需要乙烯的参与。另外还有其他启动子的研究中发现含有与乙烯相关的结构元件,如小麦脱水蛋白基因启动子 *TdCor410b*^[95]、水稻乙烯响应因子基

表 2 组织特异性启动子的调控作用
Table 2 Regulation of tissue-specific promoter

启动子 Promoter	来源 Source	相关组织 Relevant tissue	调控作用 Regulation	诱导条件 Induction condition	参考文献 Reference
异黄酮还原酶 <i>CaIRL</i> Isoflavone re- ductase-like promoter	咖啡树 Coffee	叶 Leaf	在叶片机械损伤的情况下发 挥活性,可能参与调控植物 响应逆境胁迫 Activation by abiotic stimu- lus, associated with plant regulate adversity stress possibility	机械损伤 Abiotic stimulus	[46]
二磷酸核酮糖 羧化酶 <i>RBCS1</i> Ribulose diphosphate carboxylase promoter	咖啡树 Coffee	叶 Leaf	存在很多与光调节相关的启 动子元件,可能参与植物对 光的调节 Contained a lot of the cis-el- ements required for light- mediated control of gene ex- pression	光 Light	[47]
赖氨酸合酶 <i>AtDHS</i> Deoxyhypusine synthase pro- moter	拟南芥 <i>Arabidop- sis</i>	莲座叶、花 Rosette leaf, flower	活性不仅与植物初穗和莲座 叶运输营养物质运输有关, 而且与花和种子的发育有关 Activation with not only se- nescing flowers and trans- porting nutrition by rosette leaf, but also flowers and seed development	无 None	[49]
麻风树毒蛋白 <i>CP2</i> Curcin-L pro- teins promoter	麻风树 Jatropha	叶 Leaf	不同胁迫诱导条件下活性不 同,PEG 诱导条件下活性最 高,可能参与植物响应逆境 胁迫 Activity was different under different stress-induction condition, activity was most strongest under PEG induc- tion, associated with plant regulate adversity stress possibility	ABA、SA、PEG、4 或 45 ℃、紫外灯 ABA, SA, PEG, 4 or 45 ℃, ultra- violet light	[51]
丙二烯氧化物 环化酶 <i>AOC1</i> 、 <i>AOC2</i> 、 <i>AOC3</i> Allene oxide cy- clase promoter	拟南芥 <i>Arabidop- sis</i>	叶 Leaf	活性与茉莉酸可诱导基因有 关,可能参与植物响应逆境 胁迫 Activation with indicative of JA gene, associated with plant regulate adversity stress possibility	茉莉酸 Jasmonic acid	[52]

续表 2(1)

启动子 Promoter	来源 Source	相关组织 Relevant tissue	调控作用 Regulation	诱导条件 Induction condition	参考文献 Reference
<i>TdGL9H1</i> HD-GL2 family gene promoter	小麦 Wheat	盾片维管束 Vascular bundle of scutellum	活性与种子萌发期营养物质吸收有关 Activation with uptake of nutrients from the endosperm during germination	无 None	[53]
肉桂酰辅酶 A 还原酶 <i>LICCR</i> 和肉桂醇脱氢酶 <i>LICAD</i> Cinnamoyl CoA reductase and Cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter	银合欢 Leucaena	根维管束、叶、茎 Vascular tissues of leaves, stems, roots	参与调控降低植物维管组织中木质素含量 Associated with reducing the lignin content	无 None	[54]
类萌芽素蛋白 <i>GLP13</i> Germin-like proteins promoter	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	韧皮部 Phloem	对植物病害抵御有响应作用 Associated with disease control	无 None	[56]
丙二烯氧化物环化酶 <i>AOC4</i> Allene oxide cyclase promoter	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	根维管束、叶脉 Vascular bundle of root, leaf vein	活性随着茉莉酸诱导增加,可能参与植物响应逆境胁迫 Activity was up-regulated of JA, associated with plant regulate adversity stress possibility	茉莉酸 Jasmonic acid	[52]
番茄原系统素 <i>SIPS</i> Prosystemin promoter	番茄 Tomato	叶柄维管束 Vascular bundle of leaf	活性与茉莉酸甲酯诱导有关,可能参与植物响应逆境胁迫 Activity was induced of MeJA, associated with plant regulate adversity stress possibility	茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate	[57]
锌脂蛋白 <i>AlSAP</i> Zinc-finger protein promoter	马伴草 <i>Aeluropus littoralis</i>	茎维管束、叶脉 Vascular bundle of stem, leaf vein	盐、甘露醇、ABA、SA 诱导条件下活性不同,与年龄相关 Activity was up-regulated by salt, dehydration, ABA, and SA treatment, age-dependent	盐、甘露醇、ABA、SA Salt, Mannitol, ABA, SA	[58]
液泡膜内在水通道蛋白 <i>EgTIP2</i> Tonoplast intrinsic aquaporin promoter	桉树 Eucalyptus	根尖、维管结构 Root tips, vasculature	甘露醇胁迫条件对于启动子活性有正向调节的作用,脱落酸胁迫下结果相反,参与调控桉树抵御干旱胁迫 Activity was up-regulated by mannitol treatment, but was down-regulated by ABA, response to drought	甘露醇、ABA Mannitol, ABA	[62]

续表 2(2)

启动子 Promoter	来源 Source	相关组织 Relevant tissue	调控作用 Regulation	诱导条件 Induction condition	参考文献 Reference
高亲和氮运输 <i>LjNRT2 AtNRT2.1</i> High-affinity nitrate transporters promoter	百脉根、拟 南芥 <i>Lotus ja-</i> <i>ponicus</i> , <i>Arabidop-</i> <i>sis</i>	根 Root	与 <i>NIC</i> 基因构建表达载体 将其转入烟草和番茄,转基 因的烟草和番茄将 <i>NIC</i> 蛋 白积累在植物根部从而抵御 根部尖孢镰刀菌 <i>NIC</i> gene triggered by the root-specific promoters suc- cessfully expressed only in the roots and conferred in- creased levels of resistance against the root pathogen, <i>F. oxysporum</i>	无 None	[65]
高亲和氮运输 <i>LjNRT2</i> <i>AtNRT2.1</i> High-af- finity nitrate trans- porters promoter	百脉根、拟 南芥 <i>Lotus ja-</i> <i>ponicus</i> , <i>Arabidop-</i> <i>sis</i>	根 Root	与 <i>WD</i> 基因构建表达载体 将其转入烟草和番茄,转基 因的烟草和番茄将 <i>NIC</i> 蛋 白积累在植物根部从而抵御 根部尖孢镰刀菌 <i>WD</i> gene triggered by the root-specific promoters suc- cessfully expressed only in the roots and conferred in- creased levels of resistance against the root pathogen, <i>F. oxysporum</i>	无 None	[66]
颗粒结合型淀粉合成 酶 <i>GBSSI</i> Granule-bound starch synthase promoter	木薯 Cassava	块状根、叶、茎 Tuberous roots, leaves, stems	可能参与调控提高植物块状 根营养物质含量 Associated with regulating nutrition of tuberous roots	无 None	[67]
血红蛋白 <i>Ibc3</i> Leghemoglobin pro- moter	黄豆 Soybean	根 Root	支持固氮细菌的养需求,促 进豆科植物固氮 Support the nitrogen fixing by increase oxygen for bac- teria	无 None	[68]
查尔酮合酶 <i>PLoCHS</i> Chalcone synthase promoter	百合 Orential	花瓣 Petals	不仅与花着色有关,同时也 参与花粉发育过程 Associated with color of flower, pollen development	无 None	[75]
类萜合酶 <i>PrHcTPS1</i> <i>PrHcTPS2</i> Terpe- noid synthases pro- moter	姜花 <i>Hedychium</i> <i>coronarum</i>	花 Flower	活性在盛花期最高,活性强 弱与萜类化合物挥发相关, 受昆虫、茉莉酸甲酯和伤口 影响发生上调,可能参与植 物抵御逆境胁迫 Activity was most strongest in blossom and up-regulated by insect feeding, methyl jasmonate, and wounding treatments, associated with plant regulate adversity stress possibility	昆虫、茉莉酸甲 酯、伤口 Insect feeding, MeJA, woun- ding	[76]

续表 2(3)

启动子 Promoter	来源 Source	相关组织 Relevant tissue	调控作用 Regulation	诱导条件 Induction condition	参考文献 Reference
蔗糖转运 <i>OsSUT4</i> Sucrose transport- er promoter	水稻 Rice	花粉、花粉管 Pollen, pollen tube	高温条件比低温条件下活性 高,可能促进糖的转运 Activity was stronger at higher temperature than that at lower temperature condi- tion, promote glucose trans- port activity	温度 Temperature	[79]
半胱氨酸受体激 酶 <i>SlCRK1</i> Cysteine-rich re- ceptor-like kinases promoter	番茄 Tomato	成熟花粉 Mature pollen	可能参与植物抵御逆境胁迫 Associated with plant regu- late adversity stress possi- bility	无 None	[78]
花青素合酶 <i>Nt-ANS1</i> Anthocyanidin synthase promoter	烟草 Tobacco	花冠缘 Authentic petal	提高花品质生物技术的发展 Have value in engineering desirable changes in petal color in the flowers of ge- netically modified plants	无 None	[81]
胱氨酸的金属蛋 白 <i>MT3-A</i> Metallothioneins promoter	油棕 Oil palm	种子、果实、花 粉 Seed, fruit, pollen	参与植物抵御重金属胁迫 Associated with plant a- gainst heavy metal stress	Cu ²⁺	[87]
种皮表达 <i>DP1</i> Seed-coat-specific promoter	拟南芥 <i>Arabidop- sis</i>	种皮 Seed coat	是高价值重组蛋白研究的重 要工具 An experimental tool for expressing high-valued re- combinant proteins as well as modifying seed coat traits in economically important crops	无 None	[88]
贮藏球蛋白 <i>8SGa</i> Storage globulins promoter	绿豆 Mungbean	种子 Seed	活性比烟草花叶病毒 35S 启 动子活性高 2 至 4 倍,参与 贮藏异源蛋白 Activity was 2- to 4-fold higher than the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter, associated with storage het- erologous proteins	无 None	[90]
果实成熟相关 <i>E4</i> 、 <i>E8</i> 、 <i>PG</i> 和 <i>2A11</i> Fruits maturation related promoter	番茄 Tomato	果实 Fruit	活性与乙烯相关,参与调控 植物器官成熟 Activity was ethylene-re- sponsive, associated with regulating organ maturity	其中 <i>E8</i> 发挥作 用需要乙烯参与 Ethylene	[93-94]

因启动子 *OsERF4a*^[96]、葡萄(*Vitis vinifera*)乙烯响应因子基因启动子 *VvERF3b*^[97]等,以上发现对于果实特异性启动子的进一步研究有重要意义。

3 展望

组织特异性启动子在植物生长、营养物质吸收、逆境响应和病虫害抵御等方面发挥着极其重要的作用,成为学术界研究的热点之一。大多数组织特异性启动子的研究只局限于克隆阶段,其调控机制尚有待深入研究,基于目前的研究现状,今后的研究可以从以下几个方面展开:1)从不同类型的植物中,选择具有代表性的植物,发掘更多特异性强、活性高的

组织特异性启动子。2)在模式植物拟南芥和水稻中进一步分析其特异性及其活性强弱的调控机制。3)利用生物信息学方法优化启动子的鉴定过程,提前对组织特异性启动子特征有更清楚的了解。4)通过分子生物学技术和基因工程等手段,插入所需结构元件,以期得到特异性更强、活性更高的启动子,再将其与优良目的基因构建表达载体,实现启动子对外源基因的人工调控,更好地服务于生产。

致谢:该论文是第二届全国草业生物技术大会评选出的优秀论文,并得到中国草业生物技术专业委员会提供的版面费支持。

参考文献

- [1] 糜赛男,曹明富.植物组织特异性启动子的研究进展[J].生物学教学,2010(7):2-4.
- [2] 贺红霞,陈亮,林春晶,柳青.组织特异性启动子在作物基因工程中的研究进展[J].中国农学通报,2014,30(9):225-231.
- [3] Porto M S,Pinheiro M P N,Batista V G L,dos Santos R C,de Albuquerque M F P,de Lima L M.Plant promoters:An approach of structure and function[J].Molecular Biotechnology,2014,56(1):38-49.
- [4] 朱玉贤,李毅,郑晓峰.现在分子生物学[M].第3版.北京:高等教育出版社,2007:68-77.
- [5] Ye R,Zhou F,Lin Y.Two novel positive cis-regulatory elements involved in green tissue-specific promoter activity in rice (*Oryza sativa* L ssp.)[J].Plant Cell Reports,2012,31(7):1159-1172.
- [6] Kumar D,Patro S,Ghosh J,Das A,Maiti I B,Dey N.Development of a salicylic acid inducible minimal sub-genomic transcript promoter from *Figwort mosaic virus* with enhanced root-and leaf-activity using TGACG motif rearrangement[J].Gene,2012,503(1):36-47.
- [7] Abe M,Takahashi T,Komeda Y.Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression,which is targeted by an L1-specific homeodomain protein[J].The Plant Journal,2001,26(5):487-494.
- [8] Keller B,Baumgartner C.Vascular-specific expression of the bean *GRP1.8* gene is negatively regulated[J].The Plant Cell,1991,3(10):1051-1061.
- [9] 刘昱辉,王志兴.拟南芥 *profilin2* 启动子 5'端缺失对维管束特异表达的影响[J].科学通报,2001,46(10):835-838.
- [10] Freitas R L,Carvalho C M,Fietto L G,Loureiro M E,Almeida A M,Fontes E P.Distinct repressing modules on the distal region of the SBP2 promoter contribute to its vascular tissue-specific expression in different vegetative organs[J].Plant Molecular Biology,2007,65(5):603-614.
- [11] Hatton D,Sablowski R,Yung M H,Smith C,Schuch W,Bevan M.Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco[J].The Plant Journal,1995,7(6):859-876.
- [12] 张海利,吕淑霞,田颖川.韧皮部特异性启动子研究概述[J].中国生物工程杂志,2003,23(11):11-15.
- [13] Hehn A,Rohde W.Characterization of cis-acting elements affecting strength and phloem specificity of the coconut foliar decay virus promoter[J].Journal of General Virology,1998,79(6):1495-1499.
- [14] Yin Y,Chen L,Beachy R.Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice[J].The Plant Journal,1997,12(5):1179-1188.
- [15] Medberry S L,Olszewski N E.Identification of cis elements involved in *Commelina yellow mottle virus* promoter activity[J].The Plant Journal,1993,3(4):619-626.
- [16] Nilsson O,Little C A,Sandberg G,Olsson O.Expression of two heterologous promoters,*Agrobacterium rhizogenes* rolC and cauliflower mosaic virus 35S,in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy[J].Plant Molecular Biology,1996,31(4):887-895.

- [17] Brears T, Walker E L, Coruzzi G M. A promoter sequence involved in cell-specific expression of the pea glutamine synthetase *GS3A* gene in organs of transgenic tobacco and alfalfa[J]. *The Plant Journal*, 1991, 1(2): 235-244.
- [18] 袁正强, 贾燕涛, 吴家和. 三个韧皮部特异性启动子在转基因烟草中表达的比较研究[J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(1): 6-9.
- [19] 赵红玉, 徐磊, 魏溪涓, 邓敏娟, 王芳, 易可可. 一个新水稻根尖特异表达启动子的分离与鉴定[J]. *中国水稻科学*, 2014, 28(4): 351-357.
- [20] 李志邈, 杨悦俭, 杨飞, 叶青静, 王荣青, 阮美颖, 姚祝平. 番茄根特异表达基因 *LeGRP2* 启动子的克隆及其在拟南芥的表达分析[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(9): 1877-1882.
- [21] Zhang T, Zhao X, Wang W, Huang L, Liu X, Zong Y, Li Z. Deep transcriptome sequencing of rhizome and aerial-shoot in *Sorghum propinquum*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 84(3): 315-327.
- [22] Kim D W, Lee S H, Choi S B, Won S K, Heo Y K, Cho M, Cho H T. Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(11): 2958-2970.
- [23] Zhu Y, Wen F, Zhao X, Hawes M C. Isolation of the promoter of a root cap expressed pectinmethylesterase gene from *Pisum sativum* L. (rcpme1) and its use in the study of gene activity[J]. *Plant and Soil*, 2004, 265(1-2): 47-59.
- [24] 张树珍, 杨本鹏, 刘飞虎. 花特异表达启动子 *PchsA* 的克隆及其序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(2): 116-119.
- [25] Sablowski R W, Moyano E, Culianez-Macia F A, Schuch W, Martin C, Bevan M. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes[J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(1): 128.
- [26] Uimari A, Strommer J. Myb26: A MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes[J]. *The Plant Journal*, 1997, 12(6): 1273-1284.
- [27] Twell D, Yamaguchi J, Wing R A, Ushiba J, McCormick S. Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements[J]. *Genes & Development*, 1991, 5(3): 496-507.
- [28] 陈冷. Tritordeum 花粉特异性启动子的克隆与研究[D]. 武汉: 华中科技大学硕士论文, 2005.
- [29] Rogers H J, Bate N, Combe J, Sullivan J, Sweetman J, Swan C, Twell D. Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45(5): 577-585.
- [30] 尹涛, 张上隆, 刘敬梅, 陈大明. 果实特异性启动子研究现状及其应用[J]. *农业生物技术学报*, 2009(2): 355-360.
- [31] Yamagata H, Yonesu K, Hirata A, Aizono Y. TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the cucumis gene[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(13): 11582-11590.
- [32] 尹涛. 西瓜 *AGPL1* 启动子果实特异调控机理的研究及在番茄遗传转化中的应用[D]. 杭州: 浙江大学博士论文, 2008.
- [33] Dickinson C D, Evans R P, Nielsen N C. RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(1): 371-371.
- [34] Chen Z L, Schuler M A, Beachy R N. Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986, 83(22): 8560-8564.
- [35] Vincentz M, Leite A, Neshich G, Vriend G, Mattar C, Barros L, Gander E S. ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognized by the opaque-2 regulatory protein[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34(6): 879-889.
- [36] Josefsson L G, Lenman M, Ericson M L, Rask L. Structure of a gene encoding the 1.7S storage protein, napin, from *Brassica napus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(25): 12196-12201.
- [37] Kawagoe Y, Murai N. A novel basic region/helix-loop-helix protein binds to a G-box motif CACGTG of the bean seed storage protein *β -phaseolin* gene[J]. *Plant Science*, 1996, 116(1): 47-57.
- [38] Premachandra G S, Saneoka H, Fujita K, Ogata S. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in *Sorghum*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1992, 43(257): 1569-1576.
- [39] Sessions A, Weigel D, Yanofsky M F. The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia[J]. *The Plant Journal*, 1999, 20(2): 259-263.
- [40] Xu X M, Wang J, Xuan Z, Goldshmidt A, Borrill P G, Hariharan N, Jackson D. Chaperonins facilitate KNOTTED1 cell-to-

- cell trafficking and stem cell function[J]. *Science*, 2011, 333: 1141-1144.
- [41] Hooker T S, Millar A A, Kunst L. Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1568-1580.
- [42] Jiang Q Z, Zhang J Y, Guo X I, Maria J M, Wang Z Y. Physiological characterization of transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) plants for improved drought tolerance [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2009, 170(8): 969-978.
- [43] Peterson A G, Oliver D J. Leaf-targeted phytochelatin synthase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(11): 885-892.
- [44] Clemens S, Kim E J, Neumann D, Schroeder J I. Tolerance to toxic metals by a gene family of Phytochelatin synthases from plants and yeast [J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(12): 3325-3333.
- [45] Mitra A, Choi H K, An G. Structural and functional analyses of *Arabidopsis thaliana* chlorophyll a/b-binding protein (cab) promoters [J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12(2): 169-179.
- [46] Brandalise M, Severino F E, Maluf M P, Maia I G. The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(11): 1699-1708.
- [47] Marraccini P, Courjault C, Caillet V, Lepage B, Rogers W J, Tessereau S, Deshayes A. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, 41(1): 17-25.
- [48] Song G Q, Honda H, Yamaguchi K I. Expression of a rice chlorophyll a/b binding protein promoter in sweetpotato [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2007, 132(4): 551-556.
- [49] Duguay J, Jamal S, Liu Z, Wang T W, Thompson J E. Leaf-specific suppression of deoxyhypusine synthase in *Arabidopsis thaliana* enhances growth without negative pleiotropic effects [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(4): 408-420.
- [50] Battelli M G. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins [J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, 4(5): 513-521.
- [51] Qin X, Zheng X, Shao C, Gao J, Jiang L, Zhu X, Chen F. Stress-induced curcin-L promoter in leaves of *Jatropha curcas* L. and characterization in transgenic tobacco [J]. *Planta*, 2009, 230(2): 387-395.
- [52] Stenzel I, Otto M, Delker C, Kirmse N, Schmidt D, Miersch O, Wasternack C. *ALLENE OXIDE CYCLASE* (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: Tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(17): 6125-6138.
- [53] Kovalchuk N, Wu W, Eini O, Bazanova N, Pallotta M, Shirley N, Lopato S. The scutellar vascular bundle-specific promoter of the wheat HD-Zip IV transcription factor shows similar spatial and temporal activity in transgenic wheat, barley and rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(1): 43-53.
- [54] Prashant S, Sunita M S L, Sirisha V L, Bhaskar V V, Rao A M, Narasu M L, Kishor P K. Isolation of cinnamoyl CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase gene promoters from *Leucaena leucocephala*, a leguminous tree species, and characterization of tissue-specific activity in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2012, 108(3): 421-436.
- [55] Beneteau J, Renard D, Marché L, Douville E, Lavenant L, Rahbé Y, Dinant S. Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1345-1361.
- [56] Yang L, Li T, Zhang S C, Gao G L, Yang C W. Characterization of the *GLP13* gene promoter in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biologia Plantarum*, 2013, 57(2): 231-237.
- [57] Avilés-Arnaut H, Délano-Frier J P. Characterization of the tomato prosystemin promoter: Organ-specific expression, hormone specificity and methyl jasmonate responsiveness by deletion analysis in transgenic tobacco plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(1): 15-32.
- [58] Saad R B, Romdhan W B, Zouari N, Azaza J, Mieulet D, Verdeil J L, Hassairi A. Promoter of the *AtSAP* gene from the halophyte grass *Aeluropus litoralis* directs developmental-regulated, stress-inducible, and organ-specific gene expression in transgenic tobacco [J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(5): 1003-1018.
- [59] Zhang L, Yang T, Li X, Hao H, Xu S, Cheng W, Sun Y, Wang C. Cloning and characterization of a novel *Athspr* promoter specifically active in vascular tissue [J]. *Plant Physiology Biochem*, 2014, 78(5): 88-96.

- [60] 王春燕,王孝坤,李巧玲,谢成建,杨星勇.根特异性启动子的种类和功能[J].生物技术通报,2013,1(5):15-21.
- [61] Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, Santoni V. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 595-624.
- [62] Rodrigues M I, Bravo J P, Sasaki F T, Severino F E, Maia I G. The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: Characterization of *EgTIP2*, a root-specific and osmotic stress-responsive gene[J]. Plant Science, 2013, 213: 106-113.
- [63] Fan X, Jia L, Li Y, Smith S J, Miller A J, Shen Q. Comparing nitrate storage and remobilization in two rice cultivars that differ in their nitrogen use efficiency[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(7): 1729-1740.
- [64] Crawford N M, Glass A D. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants[J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(10): 389-395.
- [65] Kong K, Makabe S, Ntui V O, Khan R S, Nakamura I. Synthetic chitinase gene driven by root-specific *LjNRT2* and *AtNRT2.1* promoters confers resistance to *Fusarium oxysporum* in transgenic tobacco and tomato[J]. Plant Biotechnology Reports, 2014, 8(2): 151-159.
- [66] Kong K, Ntui V O, Makabe S, Khan R S, Mii M, Nakamura I. Transgenic tobacco and tomato plants expressing Wasabi defensin genes driven by root-specific *LjNRT2* and *AtNRT2.1* promoters confer resistance against *Fusarium oxysporum*[J]. Plant Biotechnology, 2014, 31(2): 89-96.
- [67] Koehorst-van Putten H J, Wolters A M A, Pereira-Bertram I M, van den Berg H H, van der Krol A R, Visser R G. Cloning and characterization of a tuberous root-specific promoter from cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Planta, 2012, 236(6): 1955-1965.
- [68] Ramlov K B, Laursen N B, Stougaard J. Site-directed mutagenesis of the organ-specific element in the soybean leghemoglobin *Ibc3* gene promoter[J]. The Plant Journal, 1993, 4(3): 577-580.
- [69] Bender K W, Dobney S, Ogunrinde A, Chiasson D, Mullen R T, Teresinski H J, Singh P, Munro K, Smith S P, Snedden W A. The calmodulin-like protein CML43 functions as a salicylic-acid-inducible root-specific Ca^{2+} sensor in *Arabidopsis* [J]. Biochemical Journal, 2014, 457: 127-136.
- [70] Li Y Y, Liu S J, Yu Z M, Liu Y, Wu P. Isolation and characterization of two novel root-specific promoters in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Science, 2013, 207: 37-44.
- [71] Santana R H. Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos de plantas de soja (*Glycine max*) [D]. Dissertação Brasília-DF: Universidade de Brasília, 2012.
- [72] 杨丽. 百合查尔酮合成酶基因(*CHS*)及其启动子的克隆与分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士论文, 2006.
- [73] Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F, Mason J. Genetic engineering in floriculture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 80(1): 1-24.
- [74] Koes R E, Spelt C E, Mol J N. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): Differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction[J]. Plant Molecular Biology, 1989, 12(2): 213-225.
- [75] Liu Y, Lou Q, Xu W, Xin Y, Bassett C, Wang Y. Characterization of a chalcone synthase (CHS) flower-specific promoter from *Lilium oriental* 'Sorbonne'[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(12): 2187-2194.
- [76] Li X Y, Zheng S Y, Yu R C, Fan Y P. Promoters of *HcTPS1* and *HcTPS2* genes from *Hedychium coronarium* direct floral-specific, developmental-regulated and stress-inducible gene expression in transgenic tobacco[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014: 1-17.
- [77] Shiu S H, Bleecker A B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(19): 10763-10768.
- [78] Kim W B, Yi S Y, Oh S K, Lim C J, Kim H A, Jang H A, Kwon S Y. Identification of a pollen-specific gene, *SlCRK1* (*RFK2*) in tomato[J]. Genes & Genomics, 2014, 36(3): 303-311.
- [79] Chung P, Hsiao H H, Chen H J, Chang C W, Wang S J. Influence of temperature on the expression of the rice sucrose transporter 4 gene, *OsSUT4*, in germinating embryos and maturing pollen[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(1): 217-229.
- [80] Du L, Lou Q, Zhang X, Jiao S, Liu Y, Wang Y. Construction of flower-specific chimeric promoters and analysis of their

- activities in transgenic torenia[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(1): 234-245.
- [81] Lim S H, Kim J K, Lee J Y, Kim Y M, Sohn S H, Kim D H, Ha S H. Petal-specific activity of the promoter of an anthocyanidin synthase gene of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2013, 114(3): 373-383.
- [82] Cook M, Thilmony R. The *OsGEX2* gene promoter confers sperm cell expression in transgenic rice [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30(5): 1138-1148.
- [83] Cross J M, Clancy M, Shaw J R, Greene T W, Schmidt R R, Okita T W, Hannah L C. Both subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase are regulatory [J]. Plant Physiology, 2004, 135(1): 137-144.
- [84] Chen X, Wang Z, Wang J, Wang M, Zhao L, Wang G. Isolation and characterization of Brittle2 promoter from *Zea mays* and its comparison with *Ze19* promoter in transgenic tobacco plants [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 88(1): 11-20.
- [85] Quattrocchio F, Tolk M A, Coraggio I, Mol J N, Viotti A, Koes R E. The maize zein gene *zE19* contains two distinct promoters which are independently activated in endosperm and anthers of transgenic *Petunia* plants [J]. Plant Molecular Biology, 1990, 15(1): 81-93.
- [86] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis [J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53(1): 159-182.
- [87] Kamaladini H, Nor Akmar Abdullah S, Aziz M A, Ismail I B, Haddadi F. Breaking-off tissue specific activity of the oil palm metallothionein-like gene promoter in T1 seedlings of tomato exposed to metal ions [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(3): 346-354.
- [88] Esfandiari E, Jin Z, Abdeen A, Griffiths J S, Western T L, Haughn G W. Identification and analysis of an outer-seed-coat-specific promoter from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 81(1-2): 93-104.
- [89] Bernardo A E N, Garcia R N, Adachi M, Angeles J G C, Kaga A, Ishimoto M, Tecson-Mendoza EM. 8S globulin of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]: Cloning and characterization of its cDNA isoforms, expression in *Escherichia coli*, purification, and crystallization of the major recombinant 8S isoform [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(9): 2552-2560.
- [90] Chen M X, Yang Y N, Zheng S X, Xu C, Wang Y, Liu J S, Li H Y. A *vigna radiata* 8S globulin α' promoter drives efficient expression of *GUS* in *Arabidopsis* cotyledonary embryos [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(26): 6423-6429.
- [91] Sunkara S, Bhatnagar-Mathur P, Sharma K K. Isolation and functional characterization of a novel seed-specific promoter region from peanut [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(1): 325-339.
- [92] Saed Taha R, Ismail I, Zainal Z, Abdullah S N A. The stearyl-acyl-carrier-protein desaturase promoter (Des) from oil palm confers fruit-specific *GUS* expression in transgenic tomato [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(13): 1290-1300.
- [93] Montgomery J, Goldman S, Deikman J, Margossian L, Fischer R L. Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90(13): 5939-5943.
- [94] Deikman J, Xu R, Kneissl M L, Ciardi J A, Kim K N, Pelah D. Separation of cis elements responsive to ethylene, fruit development, and ripening in the 5'-flanking region of the ripening-related *E8* gene [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(6): 1001-1011.
- [95] Eini O, Yang N, Pyvovarenko T, Pillman K, Bazanova N, Tikhomirov N, Lopato S. Complex regulation by *Apetala2* domain-containing transcription factors revealed through analysis of the stress-responsive *TdCor410b* promoter from durum wheat [J]. PloS One, 2013, 8(3): e58713.
- [96] Joo J, Choi H J, Lee Y H, Kim Y K, Song S I. A transcriptional repressor of the ERF family confers drought tolerance to rice and regulates genes preferentially located on chromosome 11 [J]. Planta, 2013, 238(1): 155-170.
- [97] Song Y, Lin Y, Tong S, Hou H. Molecular cloning, promoter analysis, and expression profile of *VvERF3b* gene in *Vitis vinifera* [J]. Biologia Plantarum, 2012, 56(1): 31-36.