

十字花科植物 *PIN3* 基因调控元件及表达分析

李玉军 赵燕 黄丽华 汤宾 黄好 张学文*

(湖南农业大学 生物科学技术学院,长沙 410128)

摘要 为探明十字花科不同物种 *PIN3* 基因的表达调控差异,从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、红花芥菜 (*Capsella rubella*)、白菜 (*Brassica rapa*)、油菜 (*Brassica napus*) 和甘蓝 (*Brassica oleracea*) 等 17 个已完成基因组测序的十字花科物种基因组数据库中鉴定出 18 个 *PIN3* 同源基因。对这 18 个同源基因编码序列上游 1 500 bp 启动子区域顺式作用元件进行预测及比对分析,结果发现,光响应、多种激素响应及胁迫响应等相关元件呈现出较大差异,其中生长素以及向地性响应相关元件具有较高的保守性。克隆普通芥菜 *PIN3* 同源基因 (*CbPIN3*) 并构建普通芥菜 *PIN3* 基因启动子的 GUS 报告系统 *CbPIN3pro::GUS* 转化拟南芥。与拟南芥基因表达数据库比较,芥菜启动子表达与拟南芥 *PIN3* 具有基本一致的组织表达模式,但也存在一定的组织差异,说明植株形态建成中生长素极性转运调控的差异。拟南芥和芥菜 *PIN3* 的表达差异是十字花科物种适应性进化模式的缩影。

关键词 十字花科;*PIN3* 基因;启动子元件;基因表达

中图分类号 Q943

文章编号 1007-4333(2017)07-0024-10

文献标志码 A

Regulating elements and expression analysis of *PIN3* gene in Brassicaceae family

LI Yujun, ZHAO Yan, HUANG Lihua, TANG Bin, HUANG Yu, ZHANG Xuewen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract A total of 18 homologous *PIN3* genes were identified in 17 species in Brassicaceae family based on genomic data available including *Arabidopsis thaliana*, *Capsella rubella*, *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* etc. Gene sequences were subjected to bioinformatics analysis and light-, hormone- response elements and stress-response elements are differently contained in the gene promoter as *cis* elements. The auxin-response and geotropism response elements are conservative among the 18 homologous genes. The promoter of *PIN3* (*CbPIN3*) from *Capsella bursa-pastoris* was recombined with GUS reporter system *CbPIN3pro::GUS* and transformed into *Arabidopsis thaliana* to investigate the specific expression model of the homologous gene. By comparison of GUS staining, it was found that the *CbPIN3* gene displayed same expression pattern with the chip data of *PIN3* in *Arabidopsis*. However, the expression pattern of *CbPIN3* varies in some tissue. This might be related to the differentiation of auxin polar transport regulation in plant morphogenesis. The differences in expression pattern of *PIN3* between *Capsella bursa-pastoris* and *Arabidopsis thaliana* were adaptive evolution in the Brassicaceae family.

Keywords Brassicaceae family; *PIN3* gene; promoter elements; expression

十字花科 (Brassicaceae) 植物是分布范围最广的草本植物之一,约有 338 属 3 700 种,其中有多个种类作为蔬菜或油料作物种植^[1]。十字花科植物还以其广泛的分布、繁多的种类、较大的种子结实量、

成熟的培养体系以及较短的生长周期等特点被广泛作为植物学研究的对象和模式植物。目前,十字花科已有 17 个物种完成了基因组测序,为十字花科物种深入分子水平的相关研究提供了基因数据。

收稿日期:2016-06-27

基金项目:湖南省教育厅高校重点实验室开放项目(15K060)

第一作者:李玉军,硕士研究生,E-mail:15974267467@163.com

通讯作者:张学文,教授,主要从事植物分子生物学研究,E-mail:xwzhang@hunau.edu.cn

从拟南芥中鉴定出 1 个参与生长素输出载体蛋白 PIN(PIN-FORMED),其基因家族共有 8 个成员,是生长素调控植物生长发育和形态建成的关键因子^[2]。通过对现有十字花科植物基因数据分析,生长素极性输出载体 PIN 蛋白可以分为两大类,一类是具有长亲水环的 PIN 蛋白,一类是短亲水环的 PIN 蛋白。在对 PIN 蛋白的进化研究发现,在植物登陆陆生前的藻类中发现内质网有类似 PIN 蛋白的分布,植物登陆后 PIN 蛋白分布扩展至质膜上,内质网上的 PIN 蛋白为短亲水环的 PIN 蛋白,质膜的 PIN 蛋白长亲水环的 PIN 蛋白^[3-4]。内质网上分布的 PIN 蛋白调节生长素的体内平衡和代谢活动,质膜上的 PIN 蛋白介导细胞间生长素的运输,PIN 在局部的不对称分布导致生长素极值的形成,以此完成了在局部生长素浓度梯度的建立和维持,参与植物多个发育过程,诸如胚胎发育、器官发育和向性生长^[5]。PIN 是植物中独有的蛋白质家族,作为植物进化研究指标有很好的参考价值^[6]。拟南芥中不同的 PIN 蛋白侧重行使不同的功能,其中 PIN3 主要参与细胞间生长素的横向运输,介导诸多环境信号的生长素极性运输,参与植物器官的发育及植物形态建成^[7]。PIN3 介导生长素向重力作用方向的极性运输导致局部生长素的不对称分布,引起横置拟南芥幼苗的下胚轴弯曲^[8-9]。植物的向光性也主要是 PIN3 基因差异性表达和 PIN3 的极性分布导致生长素不对称分布造成的^[10]。PIN3 广泛参与生长素信号调控网络,在植物器官发育事件及形态建成中发挥着重要作用,同时也是胁迫响应和防御反应机制的重要参与者,PIN3 的研究在整个植物发育事件调控机理的研究中有着重要的地位^[11-12]。

已有 PIN3 相关研究大都以模式植物拟南芥为研究对象进行,但目前发现十字花科不同物种间存在诸多形态建成上的差异,且其分子机理依旧扑朔迷离。PIN3 作为参与植物形态建成的重要生长素运输基因,十字花科 PIN3 的表达调控分析将对不同物种间形态建成差异的进一步研究予以启示作用。本研究利用已完成基因组测序的 17 种十字花科植物基因序列数据,共鉴定出 18 个 PIN3 的同源基因,其中仅甘蓝型油菜含有 2 个 PIN3 基因。对鉴定的 18 个 PIN3 基因启动子进行了顺式作用元件预测分析,并克隆了普通芥菜的 PIN3 基因,利用该基因启动子序列构建了 GUS 基因表达报告系统,在拟南芥中开展其特异性表达分析,比较了普通

芥菜与拟南芥中该基因的表达差异。

1 材料与方 法

1.1 材 料

哥伦比亚型拟南芥(*Col*)于 16 h 光照、22 ℃、相对湿度 60%~70%的温室种植,芥菜 PIN3 基因启动子序列通过同源引物 PCR 扩增法获得;试验中所使用的 PCR 试剂、PCR 产物回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司,限制性内切酶和 T4 连接酶购自 Fermentas 公司,植物 GUS 报告载体 pBI121 为本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 十字花科 PIN3 基因启动子序列的获得及相关分析

从 NCBI 数据库和 Brassica Database (<http://brassicbrassicadb.org/brad/index.php>)^[13] 和 DOE Joint Genome Institute (<http://jgi.doe.gov/>) 数据库下载十字花科 17 个物种的全基因组数据,然后以拟南芥 PIN3 序列查找同源 PIN3 基因,获得十字花科 17 个物种共 18 个 PIN3 基因序列及相关信息并整理,同时为了便于区分采用物种拉丁名前两个单词的首字母缩写的命名(见表 1)。再与基因组序列比较出 PIN3 基因,获得上游 1 500 bp 的核苷酸序列,然后通过 Plantcare 软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/>)^[14] 对启动子序列进行顺式作用元件分析,同时,依据最新研究揭示的生长素和重力响应相关基序查找和整理这些基序的数量及整体分布^[15-16]。依据相关信息使用 Excel 软件进行归纳制作成表。

1.2.2 拟南芥 PIN3 基因组织表达特异性分析

从 *Arabidopsis*-FP(<http://bar.utoronto.ca/>)和 TAIR 的链接 AtGenExpress Visualization Tool (AVT)^[17] 网站中获取拟南芥 PIN3(AT1G70940)基因在各组织中的表达数据,并依据相关数据使用 Excel 制作柱型图。

1.2.3 芥菜 PIN3 基因启动子 GUS 报告载体 PIN3 $pro::GUS$ 转化植株的获得及 GUS 染色

依据已有的研究发现 PIN3 的表达调控元件主要集中在起始密码子上游的 1 500 bp 内,所以研究克隆了芥菜 PIN3 基因启动子约 1 500 bp,并将其重组入 pBI121 载体中,替换 GUS 报告基因前的 35S 启动子,构建了 *CbPIN3pro::GUS* 载体。通

过电激法将构建成功的启动子特异性表达重组质粒转入农杆菌 GV3101, 然后通过花序侵染的方法转化拟南芥 (*Col*), 通过卡那霉素抗性 (Kan) 筛选得到转化植株。植株经 PCR 检测验证其转化。

将检测阳性的转化拟南芥幼苗移栽, 并收获种子, 单株种子经 Kan^r 验证符合孟德尔遗传。取种子萌发的幼苗以及开花期的花序进行 GUS 检测: 90% 的预冷丙酮浸泡 10~20 min, 冰浴放置, 然后用磷酸钠缓冲液漂洗 2~3 次, 再将材料浸泡到已配制好的 GUS 染液中, 干燥器中抽真空 30~60 min

后, 37 °C 黑暗放置过夜。第二天吸出 GUS 染液, 加入卡诺固定液固定脱色 6~8 h, 然后更换卡诺固定液重复 1 次, 再用 70% 的乙醇脱色 6 h, 完成后于体视显微镜下观察, 拍摄^[18]。

2 结果与分析

2.1 17 种十字花科植物中鉴定的 PIN3 同源性基因

从 17 种十字花科植物中共鉴定出 18 个 PIN3 同源基因, 除甘蓝型油菜含有 2 个同源基因外, 其他种内都只有 1 个同源基因。

表 1 十字花科 PIN3 同源基因信息表

Table 1 The information of homologous PIN3 gene in Brassicaceae family

物种 Species	基因名称 Gene name	基因编号 Gene ID
阿拉伯岩芥 <i>Aethionema arabicum</i>	<i>AaPIN3</i>	AA_scaffold4006_35
琴叶拟南芥 <i>Arabidopsis lyrata</i>	<i>AlPIN3</i>	Al_scaffold_0002_1774
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtPIN3</i>	AT1G70940.1
甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	<i>BnPIN3-1</i>	GSBRNA2T00072118001
甘蓝型油菜 <i>Brassicanaapus</i>	<i>BnPIN3-2</i>	GSBRNA2T00102427001
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	<i>BoPIN3</i>	Bol016172
白菜 <i>Brassica rapa</i>	<i>BrPIN3</i>	Bra016173
美洲芜菁 <i>Brassicarapa FPsc</i>	<i>BrfPIN3</i>	Brara. G02422.1
<i>Boecherastricta</i>	<i>BsPIN3</i>	Bostr. 10273s0258.1
普通芥菜 <i>Capsella bursa-pastoris</i>	<i>CbPIN3</i>	JF966673.1
大花芥菜 <i>Capsella grandiflora</i>	<i>CgPIN3</i>	Cagra. 0147s0051.1
红芥菜 <i>Capsella rubella</i>	<i>CrPIN3</i>	Carubv10019932m
亚麻芥 <i>Camelina sativa</i>	<i>CsPIN3</i>	Csa07g037850.1
<i>Leavenworthia alabamica</i>	<i>LaPIN3</i>	LA_scaffold743_28
小盐芥 <i>Thellungiella halophila</i>	<i>ThPIN3</i>	Thhalv10018257m
条叶蓝芥 <i>Thellugiella parvula</i>	<i>TpPIN3</i>	c0012_00416
盐芥 <i>Thellungiella salsuginea</i>	<i>TsPIN3</i>	Tsa5g28600
水蒜芥 <i>Sisymbriumirio Linn</i>	<i>SiPIN3</i>	SI_scaffold427_37

表2(续)

元件 Element	启动子 Promoter																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
TCCACCT-motif	-	-	-	-	-	-	-	-	√1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCA-element	√2	√1	√2	-	-	√1	-	-	-	√1	√1	√2	-	√2	√1	-	√1	-
CGTCA-motif	-	-	-	-	-	-	-	-	√1	√1	√1	-	-	-	√1	-	-	-
ERE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√1	-	-	-	-	-
胁迫响应相关元件																		
WUN-motif	-	-	-	-	-	√1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARE	-	√1	√1	-	-	-	-	√1	√1	√1	√1	-	-	√1	√1	-	√1	-
TC-rich repeats	√3	√2	-	√2	-	-	-	-	√1	√1	√1	√2	√3	√1	-	-	-	-
Box-W1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√1	-	-	√1	-	-	-	-
MBS	-	-	-	-	-	√1	-	-	-	√1	√1	-	-	-	-	-	-	-
HSE	-	-	-	-	-	-	√1	-	√2	-	-	-	-	√1	-	-	-	-
LTR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√1	-	-	-	-	-
蛋白或转录因子结合位点																		
Proteins or transcription factor binding sites																		
MBSI	-	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBSII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	√
MRE	√	√	√	√	√	√	√	√	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Box III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	√	-	-	-	-
HD-Zip 3	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	-	√	√	-	-	-	-	-
CCAAT-box	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
组织特异性表达元件																		
Tissue specificity expression elements																		
Skn-1-motif	-	√	√	√	√	-	-	√	-	√	-	√	√	-	-	√	-	√
GCN4-motif	-	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-
as-2-box	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
其他元件																		
Other elements																		
AAGAA-motif	√	√	√	√	√	√	√	√	-	√	√	-	√	√	√	√	-	√
TA-rich region	-	-	-	-	√	-	-	-	-	√	√	-	-	-	-	-	-	-
Box E	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATGCAAAT	-	-	-	-	-	-	-	-	√	-	√	-	-	-	-	-	-	-
Circadian	-	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	√	√	-	-	-	-	-
5UTRPy-richstretch	-	-	-	√	-	√	√	-	-	-	-	-	-	-	√	-	√	-

注: 序号 1~18 依次表 (*CgPIN3*, *CrPIN3*, *CbPIN3*, *BsPIN3*, *CsPIN3*, *AlPIN3*, *AtPIN3*, *LaPIN3*, *AaPIN3*, *ThPIN3*, *TsPIN3*, *SiPIN3*, *TpPIN3*, *BrfPIN3*, *BnPIN3-1*, *BnPIN3-2*, *BrPIN3*, *BoPIN3*) 启动子加到表头中; - 表示缺失对应的元件; √ 表示包含对应的元件, 数字表示相应元件数量。

Note: The serial number 1-18 show in order (*CgPIN3*, *CrPIN3*, *CbPIN3*, *BsPIN3*, *CsPIN3*, *AlPIN3*, *AtPIN3*, *LaPIN3*, *AaPIN3*, *ThPIN3*, *TsPIN3*, *SiPIN3*, *TpPIN3*, *BrfPIN3*, *BnPIN3-1*, *BnPIN3-2*, *BrPIN3*, *BoPIN3*) promoter; - show deletion of homologous element; √ show contain of homologous element, figures show the number of element.

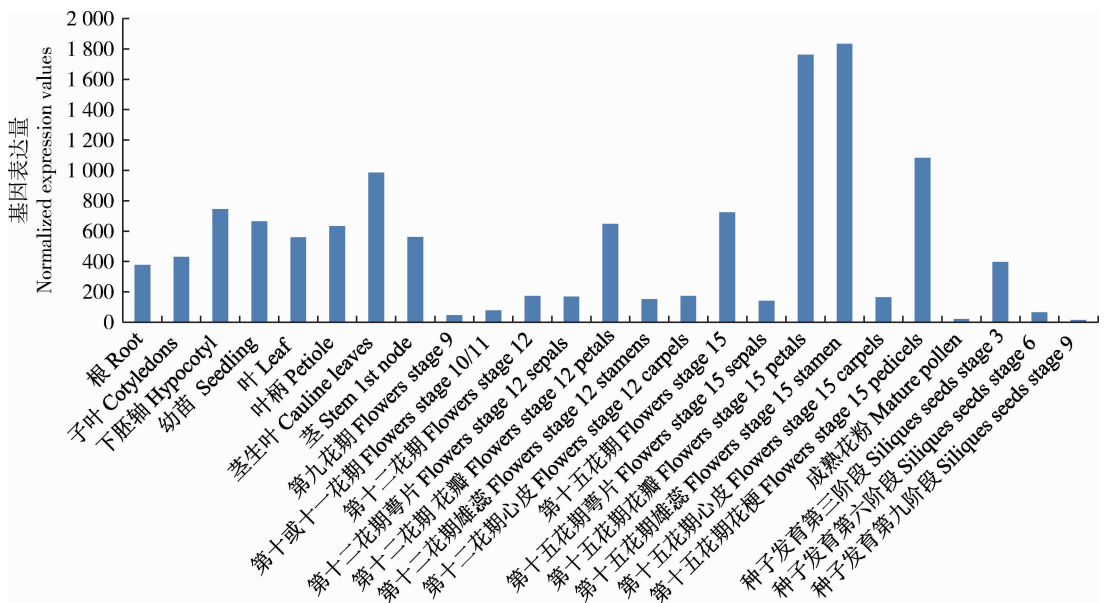
激响应元件(HSE)等,个别物种特异性的含有乙烯响应元件(ERE)和低温胁迫响应元件(LTR)和芥菜属(*Capsella*)的 3 个物种 *PIN3* 启动子也存在较多的与防卫反应相关元件(TC-rich repeats, TCA-element)见表 2。

2.3 芥菜 *PIN3* 基因 GUS 的组织表达特异性

针对所克隆的芥菜 *PIN3* 启动子构建了 PBI121-*CbPIN3pro*::GUS 重组载体,利用花序浸染的方法获得拟南芥转化植株,*CbPIN3Pro*::GUS 转化植株的 GUS 组织染色结果显示,8 d 幼苗阶段 GUS 在根部、子叶和子叶下胚轴都有很深着色,侧根形成区域都检测到高水平的 GUS 活性,根毛中也有一定的表达,这表明芥菜 *PIN3* 参与诸多根部的发育事件(图 2(a),(b)和(c))。令人惊讶的是在真叶的早期几乎没有检测到 GUS 活性,这意味着芥菜 *PIN3* 并没有参与真叶的早期发育,直到叶片的维管组织形成 *PIN3* 才在叶片中表达(图 2(a)箭头所示)。花序中花器的基部和花梗以及花丝显示出很深的 GUS 着色,柱头和花瓣的维管也检测出有较高的 GUS 活性,而在花药中没有检测到明显的 GUS 活性(图 2(d))。整体观察花序的 GUS 染色结果可以发现,花器发育过程中 *PIN3* 最早在 7~8 花期的花梗表达,随后在心皮顶端、花瓣、花丝

和蜜腺中表达,在第十五花期左右花器中的 *PIN3* 表达量达到最大值(图 2(f)和(g))。在后续的心皮发育过程中芥菜 *PIN3* 依然在心皮的顶端维持相对恒定水平的表达,同时在心皮的基部也存在很高的表达量,同时在珠柄的维管中也发现 *PIN3* 有较高的表达量(图 2(e))。

从已知的拟南芥 *PIN3* 基因表达芯片数据(图 1)显示,拟南芥 *PIN3* 基因在幼苗期的各组织中都有较高的表达水平,根部始终维持着一定水平的表达量,子叶和子叶下胚轴中 *PIN3* 的表达水平相对较高。在花发育过程中 *PIN3* 基因的表达很可能起始于第七到第八花期,在第九花期开始检测到有一定的表达活性,第九到第十二花期 *PIN3* 基因的表达量缓慢上升,第十二到第十五花期 *PIN3* 的表达水平急剧上调,在第十五花期 *PIN3* 在花中的表达水平可能达到顶峰。在第十二到第十五花期花器组织(雄蕊和萼片)的表达也呈现在整体花器中表达趋势,但花器的心皮组织 *PIN3* 的表达依旧维持较低水平;同时花器的花瓣中 *PIN3* 的表达水平显著高于其他组织,花梗中的 *PIN3* 表达量也处于很高水平,雄蕊和萼片的 *PIN3* 处在相同的表达水平;在成熟的花粉中 *PIN3* 的表达水平很低,由此看来 *PIN3* 在花药中的表达活性应该处于

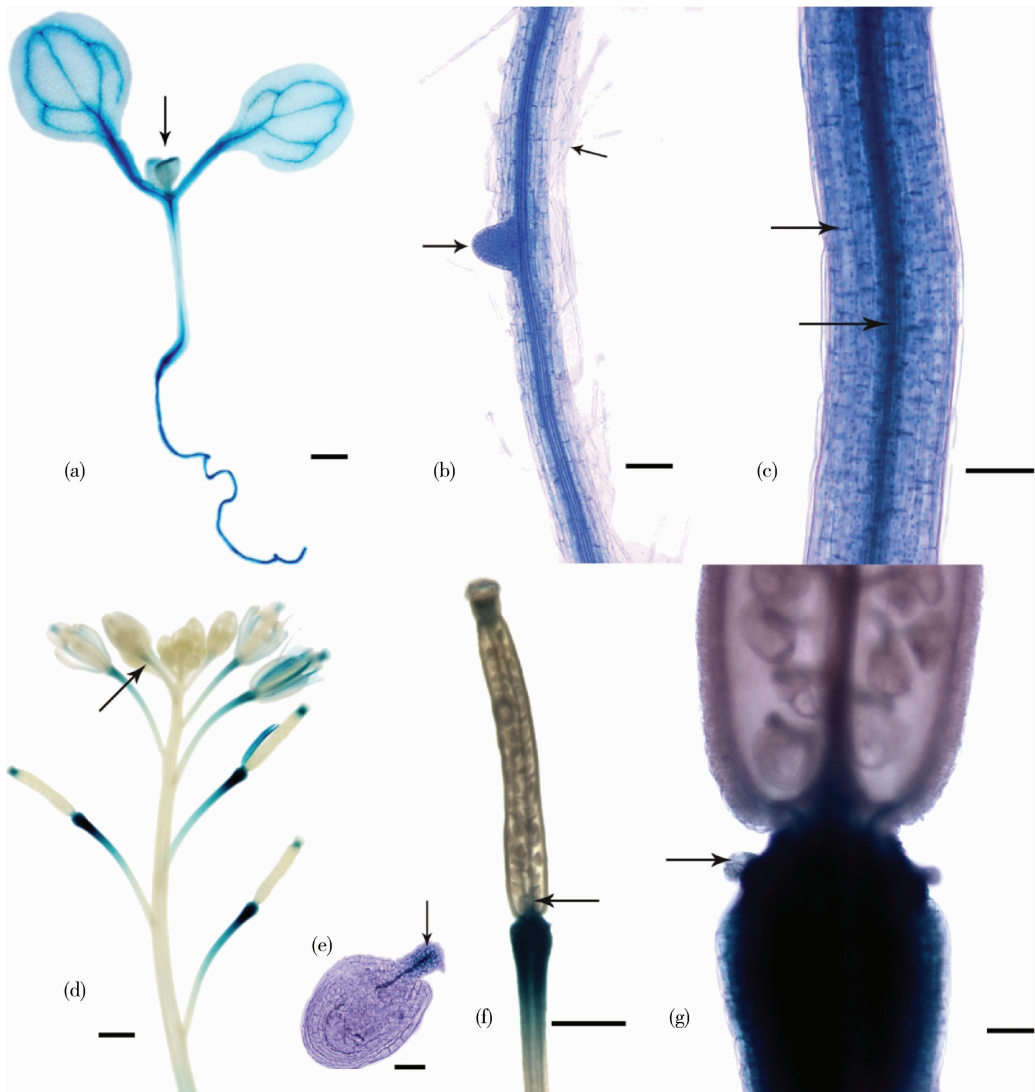


Root 为萌发后 8 d 幼苗的根;seedling 为萌发后 8 d 幼苗。

Root show the root of 8 days after germination in seedling;Seedling show the seedling of 8 days after germination.

图 1 拟南芥 *PIN3* 基因各组织的表达水平柱型图 (AtGenExpress Visualization Tool)

Fig. 1 The expression level analysis of *Arabidopsis thaliana* *PIN3* gene (AtGenExpress Visualization Tool)



(a) 萌发后 8 d 的幼苗 GUS 染色, 箭头所指为新生叶片, Bar=0.5 mm; (b) 根的 GUS 染色, 箭头所指为侧根起始部位, Bar=0.02 mm; (c) 根的生长区 GUS 染色, 箭头所指为维管组织和细胞基底部, Bar=0.005 mm; (d) 花序 GUS 染色, 箭头所指为花梗, Bar=2 mm; (e) 胚珠 GUS 染色, 箭头所指为珠柄, Bar=0.01 mm; (f) 心皮 GUS 染色, Bar=2 mm; (g) 蜜腺 GUS 染色, Bar=0.2 mm。

(a) The GUS staining of 8 days seedlings, Arrow for Young leaves; (b) The GUS staining of root, Arrow for Lateral root initiation place; (c) The GUS staining of Elongation zone in root, Arrow for Vascular tissue and the basilar part of cells; (d) The GUS staining of inflorescence and arrow points to pedicel; (e) The GUS staining of ovul and arrow pointsto funiculus; (f) The GUS staining of carpel; (g) The GUS staining of nectary.

图 2 荠菜 *PIN3* 拟南芥转基因植株各组织 GUS 染色观察分析

Fig. 2 GUS staining observation analysis of *Capsella bursa-pastoris PIN3* in *Arabidopsis thaliana*

较低水平, *PIN3* 基因在胚珠发育早期呈现较高水平的表达, 并随着胚珠发育 *PIN3* 表达水平逐渐降低。整体来看, *PIN3* 基因几乎在拟南芥所有的发育过程都有表达, 在营养生长过程 *PIN3* 的表达水平相对恒定, 在生殖生长过程 *PIN3* 的表达水平处在频繁的调控状态, *PIN3* 在不同花器的表达水平差异极大, *PIN3* 是拟南芥生殖发育过程中的重要参与者。

3 讨论

3.1 十字花科 *PIN3* 启动子的差异和适应性进化分析

十字花科 *PIN3* 启动子的分析显示其光响应、生长素及向重力性元件的分布和数量具有较高的保守性, 激素响应元件和胁迫响应相关元件明显呈现物种差异, 而激素响应元件、胁迫响应元件是生物或

非生物胁迫防御性反应的关键纽带,同时 *PIN3* 作为生长素输出载体广泛参与胁迫应激响应过程。目前发现参与生物胁迫防御反应主要有 3 条途径:生长素信号途径、SA 途径和 JA 途径,这些路径的调控手段最终都是通过生长素极性运输载体 *PIN* 蛋白实现的。在病原菌的防御应答过程中 SA 调控植物感染部位的 *PIN* 基因表达水平下调、延缓甚至阻止病原菌的进一步入侵^[12,19]。Armengot 等^[20]研究也证实了这一点,外源 SA 刺激导致大部分 *PIN* 蛋白的表达水平都出现明显的下调,其中 *PIN3* 参与 SA 诱导下的生长素再分配过程。而生长素和 JA 路径的协同作用则通过 *PIN* 蛋白将感染部位的生长素向未感染部位转运减少损失,同时在局部形成加厚的细胞壁屏障隔离生物性侵害^[19]。在非生物胁迫(如高温、低温和干旱等)下的应答过程同样是通过 SA 和 JA 等激素介导调控 *PIN* 基因的表达以及分布发挥防御性的生理机制,最大限度地保证植物自身的正常生长发育^[21-23]。当然植物激素参与的发育事件同样依赖于 *PIN* 蛋白发挥作用,Löfke 等^[24]和 Willige 等^[25]证实在子叶分化以及根的向地性响应过程中赤霉素可以通过对 *PIN* 表达的调控施加一个持续性信号刺激,维持一个稳定的生长素极性运输流形成生长素局部的不对称分布。在根的发育中施加外源乙烯刺激使 *PIN3* 和 *PIN7* 的表达均显著上调,抑制局部皮层生长素极值点的形成,从而抑制侧根发育起始,而 MeJA 或 JA 的外源诱导使得多数 *PIN* 表达下调,维持侧根和根毛起始中后期的局部生长素不对称分布,促进侧根和根毛的发育^[26-27]。*PIN3* 作为生长素信号调控网络和逆境响应信号网络的交汇点,在维持植物各项发育事件正常进行的过程中发挥着关键性作用。

导致十字花科植物 *PIN3* 启动子出现较大差异主要与不同物种适应性进化结果相关,十字花科物种的进化趋势显示物种进化趋向于更广泛的地域和气候适应性,通过频繁的种间基因流动在较短时间内完成环境适应性进化过程,实现地域性的分布扩张^[28]。而环境适应性的提高必然涉及植物发育过程中信号系统的调整和优化,生长素运输载体 *PIN* 蛋白在某些方面需要进行微调以便适应更快节奏的信号响应。生活在极端环境下的盐芥属(*Thellungiella* Schulz)、条叶蓝芥(*Thellungiella parvula*)和美洲芜菁(*Brassica rapa* FPsc)相对于拟南芥而言包含更多的非生物胁迫逆境响应元件,这一点上与这些物种的基因组分

析相符。叶蓝芥基因组和转录组数据分析发现相较于拟南芥和叶蓝芥包含更多与逆境适应相关的重复基因,有过量的发育相关和胁迫应答相关基因存在,从而具有耐盐、抗寒和抗热的特性;在盐芥基因组包含更多的“应激响应”基因及转座子序列,基因的表达分析表明其离子转运及逆境响应过程变得更快更强,以便适应高盐环境^[29-30]。与此同时 Chen 等^[15]和 Wang 等^[16]的酵母单杂交、凝胶迁移(EMSA)和免疫共沉淀(ChIP assays)等试验结果中发现 *PIN3* 启动子包含若干生长素及与向地性响应相关元件和结合位点,在对所获得的 18 个 *PIN3* 启动子进行相关元件和结合位点序列进行检索,发现这些基序的分布以及数量在十字花科 *PIN3* 启动子中也具有较高的保守性。

3.2 拟南芥和芥菜 *PIN3* 基因表达分析及比对

就十字花科中亲缘关系较近的芥菜与模式植物拟南芥进行比对分析,结果发现芥菜与拟南芥 *PIN3* 基因在许多地方表现出一致性,如芥菜和拟南芥 *PIN3* 都在花丝中高水平表达而在花药中几乎不表达^[31];Luca 等^[32]在拟南芥的孢子体和珠柄的维管中也发现 *PIN3* 的表达,但同时胚珠中出现 *PIN* 基因的表达重叠现象且 *PIN3* 的缺失对胚珠的发育影响甚微,*PIN3* 的表达对拟南芥胚珠的发育并非是非必要条件,而芥菜 *PIN3* 是否处在同样的地位还待进一步的研究;芥菜 *PIN3* 的 GUS 分析显示 *PIN3* 未参与在真叶的叶原基的起始和早期发育,根据 Guenot 等^[33]的结果也发现拟南芥 *PIN3* 在真叶的分生组织和原基的表皮没有表达,但在子叶原基的表皮细胞却有较高的表达量。但两者也存在差异,根据朱占伟等^[34]的荧光定量试验结果显示芥菜与拟南芥茎和叶的表达水平有显著差异,在根和花器中的表达也存在差异,而且芥菜 *PIN3* 的表达水平整体上都高于拟南芥,这意味着芥菜 *PIN3* 具有更高的组织表达活性,可能在某些发育事件中发挥着更大的作用,甚至出现功能性的扩展现象,两者 *PIN3* 启动子在环境胁迫响应元件的差异也印证了这一点。

参考文献 References

- [1] Koch M A, Mummenhoff K. Editorial: Evolution and phylogeny of the Brassicaceae [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2006, 259(2): 81-83

- [2] Ganguly A, Lee S H, Cho M, Yoo H, Cho HT. Differential auxin-transporting activities of PIN-FORMED proteins in *Arabidopsis* root hair cells[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3):1046-1061
- [3] Viaene T, Delwiche C F, Rensing S A, Friml J. Origin and evolution of PIN auxin transporters in the green lineage[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(1):5-10
- [4] Bennett T. PIN proteins and the evolution of plant development[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 20(8):498-507
- [5] Zařimalová E, Křeček P, Skůpa P, Hoyerova K, Petrůšek J. Polar transport of the plant hormone auxin: the role of PIN-FORMED (PIN) proteins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(13):1621-1637
- [6] Křeček P, Skůpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zařimalová E. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(12):249
- [7] Vieten A, Vanneste S, Wiřniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression[J]. *Development*, 2005, 132(20):4521-4531
- [8] Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2003, 426(6963):147-153
- [9] Rakusová H, Gallego-Bartolomé J, Vanstraelen M, Robert H S, Alabadi D, Blázquez M A, Benkova E, Friml J. Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2011, 67(5):817-826
- [10] Ding Z, Galván-Ampudia C S, Demarsy E, Langowski Ł, Kleine-Vehn J, Fan Y, Morita M T, Tasaka M, Fankhauser C, Offringa R, Friml J. Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis* [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(4):447-452
- [11] Petrůšek J, Friml J. Auxin transport routes in plant development[J]. *Development*, 2009, 136(16):2675-2688
- [12] Kazan K, Manners J M. Linking development to defense: Auxin in plant-pathogen interactions[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(7):373-382
- [13] 丁淑丽, 卢钢, 李建勇, 任彦, 曹家树. 十字花科植物 SAMDC 基因同源序列的克隆与进化分析[J]. *遗传*, 2007, 29(1):109-117
Ding S L, Lu G, Li J Y, Ren Y, Cao J S. Cloning and evolutionary analysis of homologous sequences of SAMDC gene in Cruciferae[J]. *Hereditas*, 2007, 29(1):109-117 (in Chinese)
- [14] Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzép, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1):325-327
- [15] Wang H Z, Yang K Z, Zou J J, Zhu L L, Xie Z D, Morita M T, Tasaka M, Friml J, Grotewold E, Beeckman T, Vanneste C, Sack F, Vanneste S. Transcriptional regulation of PIN genes by FOUR LIPS and MYB88 during *Arabidopsis* root gravitropism [J]. *Nature Communications*, 2015, 18(6):1-9
- [16] Chen Q, Liu Y, Maere S, Lee E, Van Isterdael G, Xie Z, Xuan W, Lucas J, Vassilev V, Kitakural S, Marhavy P, Wabnickl K, Geldner N, Benkova E, Jie L, Fukaki H, Grotewold E, you C L, Friml J, Sack F, Beeckman T, Marhavy P. A coherent transcriptional feed-forward motif model for mediating auxin-sensitive PIN3 expression during lateral root development[J]. *Nature Communications*, 2015, 18(6):1-12
- [17] 张亮生, 马成荣, 戢茜, 王翼飞. 拟南芥和水稻 SET 结构域基因家族全基因组鉴定、分类和表达[J]. *遗传*, 2009, 31(2):186-198
Zhang L S, Ma C R, Ji Q, Wang Y F. Genome-wide identification, classification and expression analyses of SET domain gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Hereditas*, 2009, 31(2):186-198 (in Chinese)
- [18] Stangeland B, Salehian Z. An improved clearing method for GUS assay in *Arabidopsis* endosperm and seeds [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20(2):107-114
- [19] Qi L, Yan J, Li Y, Jiang H, Sun J, Chen Q, Li H, Chu J, Yan C, Sun X, Li C, Li C, Yu Y. *Arabidopsis thaliana* plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola* [J]. *New Phytologist*, 2012, 195(4):872-882
- [20] Armengot L, Marquès-Bueno M M, Soria-García A, Müller M, Munné-Bosch S, Martínez M C. Functional interplay between protein kinase CK2 and salicylic acid sustains PIN transcriptional expression and root development[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(3):411-423
- [21] De Wit M, Lorrain S, Fankhauser C. Auxin-mediated plant architectural changes in response to shade and high temperature[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 151(1):13-24
- [22] Xia J, Zhao H, Liu W, Li L, He Y. Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures[J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, 57(3):211-221
- [23] Zhang Q, Li J, Zhang W, Yan S, Wang R, Zhao J, Li Y, Qi Z, Sun Z, Zhu Z. The putative auxin efflux carrier OsPIN3t is involved in the drought stress response and drought tolerance [J]. *The Plant Journal*, 2012, 72(5):805-816
- [24] Löffke C, Zwiewka M, Heilmann I, Van Montagu M C, Teichmann T, Friml J. Asymmetric gibberellin signaling regulates vacuolar trafficking of PIN auxin transporters during root gravitropism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(9):3627-3632
- [25] Willige B C, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwachheimer C. Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(6):

2184-2195

- [26] Yan S, Zhang T, Dong S, McLamore E S, Wang N, Shan X, Shen Y, Wan Y. *MeJA* affects root growth by modulation of transmembrane auxin flux in the transition zone[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2016, 35: 256-265
- [27] Yang N, Zhu C, Gan L, Ng D, Xia K. Ammonium-stimulated root hair branching is enhanced by methyl jasmonate and suppressed by ethylene in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Plant Biology*, 2011, 54(2): 92-100
- [28] Kagale S, Robinson S J, Nixon J, Xiao R, Huebert T, Condie J, Kessler D, Clarke W E, Edger P P, Links M G, Parkin I A, Sharpe A G. Polyploid evolution of the *Brassicaceae* during the Cenozoic era[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(7): 2777-2791
- [29] Wu H J, Zhang Z, Wang J Y, Oh D H, Dassanayake M, Liu B, Zhang W, Zhang H, Chu J, Yan C, Fang S, Zhang J, Wang Y, Zhang F, Wang G, Lee S Y, Cheeseman J M, Yang B, Li B, Min J, Yang L, Wang J, Chu C, Chen S Y, Bohnert H J, Zhu J K, Wang X J, Wang Y N. Insights into salt tolerance from the genome of *Thellungiella salsuginea* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(30): 12219-12224
- [30] Dassanayake M, Oh D H, Haas J S, Hernandez A, Hong H, Ali S, Yun D J, Cheeseman J M. The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula* [J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(9): 913-918
- [31] Cardarelli M, Cecchetti V. Auxin polar transport in stamen formation and development: How many actors? [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 16(5): 1-13
- [32] Ceccato L, Masiero S, Roy D S, Bencivenga S, Roig-Villanova I, Ditengou F A, Palme K, Simon R, Colombo L. Maternal control of PIN1 is required for female gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, (2013-06-17). Doi: 10.1371/journal.pone.0066148
- [33] Guenot B, Bayer E, Kierzkowski D, Smith R S, Mandel T, Žádníková P, Benková E, Kuhlemeier C. PIN1-independent leaf initiation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1501-1510
- [34] 朱占伟, 彭彦, 赵燕, 胡清云, 张学文. 生长素极性运输 PIN 基因在拟南芥和荠菜不同组织表达的定量分析 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, (5): 495-499
- Zhu Z W, Peng Y, Zhao Y, Hu Q Y, Zhuang X W. Quantitative analysis of expression of auxin polar transport PIN genes in different tissues of *Arabidopsis thaliana* and *Capsella bursa-pastoris* [J]. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences*, 2013, (5): 495-499 (in chinese)

责任编辑: 吕晓梅