苹果山梨醇运输基因 *MdSOT3* 启动子克隆与功能分析

李　芳，沈欣杰，赵　凯，袁华招，李天红*

（中国农业大学农学与生物技术学院果树系，北京 100193）

干旱胁迫条件下苹果叶片和根系中山梨醇的含量升高，从而提高苹果的渗透调节能力。山梨醇运输基因是山梨醇运转的重要载体，前期的研究结果表明干旱胁迫可以上调苹果组培苗叶片中山梨醇运输基因 *MdSOT3* 的表达。本试验中拟克隆了苹果 *MdSOT3* 的启动子序列，确定启动子中干旱响应的关键调控元件，以期揭示干旱胁迫条件下山梨醇运输基因可能的作用机制。

以‘宫藤’富士苹果组培苗为试材，利用 CTAB 法提取苹果叶片基因组 DNA。通过锚定 PCR 的方法，设计特异引物和通用引物，克隆山梨醇运输基因 *MdSOT3* 的 5′侧翼序列。利用 PlantCARE 预测该启动子序列中可能存在的响应干旱胁迫的调控元件，根据预测结果，通过 PCR 的方法对启动子序列进行不同程度的短截。用全长序列及短截序列替代 pBI121 载体上的 35S 启动子，启动下游 *GUS* 基因的表达，构建植物表达载体。使用叶盘法将一系列启动子短截后的植物表达载体转入‘珊西’烟草（*Nicotiana tabacum*），对抗性植株进行 PCR 检测和 GUS 染色，鉴定转基因植株。对转基因烟草进行干旱胁迫处理，测定不同长度启动子的 GUS 活性，以确定响应干旱胁迫的关键顺式作用元件。

以苹果基因组 DNA 为模板，经过 3 轮锚定 PCR 扩增，克隆得到 2 207 bp 的片段。利用 DNAMAN 将该序列与 *MdSOT3* 的全长序列进行同源性比对，该序列的 3′端与 *MdSOT3* 基因的 5′端有 121 bp 的序列同源性为 100%。在 NCBI 网站（http://www.ncbi.nlm.gov）经 Blastn 分析表明，该基因与 *MdSOT3* 的同源性最高，确定该序列为 *MdSOT3* 的 5′上游序列。PlantCARE 分析结果显示，序列含有启动子的核心元件，如 TATA-box、CAAT-box、Skn1-motif 等，以及多个与干旱相关的顺式作用元件，如 TC-rich、W-box、MBS、ABRE 等。GUS 染色结果表明，全长 *MdSOT3* 5′侧翼序列具有启动子活性。将一系列启动子短截植物表达载体转入烟草，对获得的阳性烟草植株进行 GUS 活性分析，结果显示，转化了不同短截程度 *MdSOT3* 启动子的植株在干旱条件下表现出不同的 GUS 活性，其中转化了 *MdSOT3* 全长启动子的烟草受干旱胁迫后 GUS 活性受诱导最为明显，为对照的 1.6 倍；当短截掉含有 ABRE 和 MBS 序列后，GUS 活性受干旱诱导变化幅度显著降低，从而推测，ABRE 和 MBS 是 *MdSOT3* 启动子中响应干旱胁迫最为关键的顺式作用元件。综上，*MdSOT3* 启动子中与干旱相关的顺式作用元件是调控干旱胁迫下山梨醇运输基因 *MdSOT3* 转录和表达水平上调的根本原因，在提高苹果组培苗抗旱性中发挥着重要作用。

关键词：苹果；山梨醇运输基因；启动子；GUS 活性

中图分类号：S 661.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0513-353X（2011）S-2457-01

收稿日期：2011 – 08 – 23

基金项目：国家自然科学基金项目（30871696）；公益性行业（农业）科研专项经费项目（201003021）

* 通信作者（E-mail：lith@cau.edu.cn；Tel：010-62733957）