

玉米脱氧麦根酸分泌通道蛋白基因 *YS3* 启动子的克隆与启动活性分析

尹朝华, 李岩, 张春庆, 杨翠翠, 吴承来, 刘翔攀, 王明明

山东农业大学农学院, 作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018

摘要: 缺铁是世界范围内农业生产面临的严重问题, 玉米通过分泌脱氧麦根酸(2'-deoxymugineic acid, DMA)吸收利用土壤中的难溶性铁。为探明玉米 DMA 分泌通道蛋白基因 *YS3* 的表达和调控机制, 本文通过克隆获得长为 2813 bp 的 *YS3* 基因启动子, 该序列含有大量 TATA-box、CAAT-box 等启动子基本元件, 以及光响应、激素调控等多个顺式调控元件; 构建 *YS3* 启动子驱动 *GUS* 基因的植物表达重组载体 pCambia-*YS3GUS*, 利用农杆菌介导转化拟南芥, 获得 *pYS3::GUS* 转基因植株, 对转基因植株进行 *GUS* 组织化学染色, 并通过石蜡切片技术对转基因植株进行组织观察, 分析 *pYS3::GUS* 转基因植株中 *YS3* 基因启动子的活性。结果表明, *YS3* 启动子主要驱动 *GUS* 基因在拟南芥根部表达, 且主要集中在根部表皮细胞, 机械损伤可激发 *YS3* 启动子活性, 驱动 *GUS* 基因在损伤临近部位表达。本研究对于理解玉米 DMA 分泌的分子调控机理具有重要意义。

关键词: 玉米; 脱氧麦根酸; *YS3* 基因; 启动子; *GUS* 基因

Cloning and promoter activity analyses of the promoter of 2'-deoxymugineic acid (DMA) secretion channel gene *YS3* in maize

Zhaohua Yin, Yan Li, Chunqing Zhang, Cuicui Yang, Chenglai Wu, Xiangpan Liu, Mingming Wang

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: Iron (Fe) deficiency is a world-wide serious agricultural problem. Maize secretes 2'-deoxymugineic acid (DMA) to uptake and utilize Fe from the soil. In order to explore the gene expression patterns of the DMA secretion channel gene *YS3*, we cloned the 2813 bp *YS3* promoter, and constructed the plant expression vector pCAM-

收稿日期: 2015-12-31; 修回日期: 2016-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31101160, 31271808), 山东省现代农业产业技术体系创新团队岗位专家项目(编号: SDAIT-01-022-02)和山东省博士后创新项目专项资金(编号: 201102038)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31101160, 31271808), Shandong Province Modern Agriculture Industrial Production Technology System (No. SDAIT-01-022-02), and Shandong Postdoctoral Innovation Foundation (No. 201102038)]

作者简介: 尹朝华, 硕士研究生, 专业方向: 植物生物技术及其在育种上的应用。E-mail: yinzhaohua2009@163.com

通讯作者: 李岩, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: liyan5011@163.com

张春庆, 教授, 博士生导师, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: cqzhang@sdaa.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-174

网络出版时间: 2016/4/28 8:51:27

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160428.0851.002.html>

BIA-*YS3GUS*. The promoter contains a lot of TATA-boxes and CAAT-boxes, and cis-acting regulatory elements such as the light responsive elements and the hormone responsive elements. *Arabidopsis* was transformed via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedures to obtain the *pYS3::GUS* transgenic plants, which were confirmed by GUS staining. Then, the stained tissue was observed using paraffin section methods and the *YS3* promoter activity was also analyzed. We found that the promoter could drive *GUS* gene expression specifically in the root epidermal cells. Mechanical damage could activate the promoter, and drive the *GUS* gene expression adjacent to the damage sites. Our results provide a molecular basis to understand the DMA secretion process in maize.

Keywords: maize; 2'-deoxymugineic acid; *YS3*; promoter; *GUS*

缺铁是世界范围内农业生产面临的严重问题^[1]。在长期进化过程中,植物形成了两种缺铁适应性机制:还原机制(机制 I 植物)和螯合机制(机制 II 植物)^[2]。机制 I 植物包括双子叶植物和非禾本科单子叶植物,它们主要依靠 Fe^{3+} 螯合物还原酶 FRO (Ferric reductase oxidase) 的活动,将 Fe^{3+} 还原为可直接吸收的 Fe^{2+} ,供植物体吸收利用;机制 II 植物仅指禾本科单子叶植物,它们主要依靠分泌麦根酸类物质(Mugineic acids, MAs),也称为铁载体(Phytosiderophores, PS),螯合土壤中难溶的铁离子,完成铁的活化和吸收^[3]。

玉米(*Zea mays* L.)为机制 II 植物,仅分泌一种 MAs——脱氧麦根酸(2'-Deoxymugineic acid, DMA)^[4]。Basso 等^[5]分离到玉米突变体 *ys3*,该突变体具有明显的缺铁失绿症状,其缺铁症状可以通过与野生型植株共培养或外源施加 MAs 而得以消失,表明 DMA 分泌进入根际过程受到损害。研究发现,水稻 DMA 从根际到土壤的分泌主要由 DMA 外运载体(Transporter of mugineic acid family phytosiderophores 1, TOM1)负责^[6],在玉米基因组中,*TOM1* 含有 3 个同源基因:*ZmTOM1*、*ZmTOM2* 和 *ZmTOM3*,其中仅 *ZmTOM1* 主要集中在根部表达,其在 *ys3* 突变体的表达量远低于野生型,且受缺铁胁迫的强烈诱导^[7],表明该基因在玉米 DMA 分泌过程中发挥重要作用。本课题组已发现并克隆了 DMA 分泌通道蛋白基因 *YS3*(GenBank 登录号:JQ288305),该基因与 *ZmTOM1* 基因(GenBank 登录号:BR001186.1)为同一基因^[8]。

Marschner 等^[9]研究发现,植物 MAs 在缺铁胁迫时分泌速率比铁充足时高 10~20 倍,其中玉米提高约 10 倍。玉米 MAs 分泌没有明显的昼夜节律,全天都在缓慢分泌^[10],这种分泌特点导致玉米铁利用效率较低。但玉米白天 DMA 的分泌量明显高于晚上,玉米在日出后 3~4 h 左右 DMA 出现分泌最高峰,缺铁

胁迫处理植株的 DMA 分泌量明显增加,在 13:00~16:00 或 19:00~22:00 出现第二次分泌高峰,且 DMA 的分泌还受光暗因子显著诱导^[11]。对玉米缺铁胁迫调控研究发现,59 个转录因子基因受到缺铁胁迫的调控,涉及的转录因子包括 bHLH 类、MYB 类、MYC 类、CCCH 类以及乙烯应答转录因子^[8]。玉米 DMA 分泌通道蛋白基因 *YS3* 启动子对 *YS3* 基因表达、DMA 的分泌调控起着重要作用,决定基因表达节律、控制基因表达程度,是 DMA 分泌调控的重要组成部分。因此,研究 *YS3* 基因启动子对进一步理解玉米 DMA 分泌的分子调控机理具有重要价值。

本研究根据玉米 B73 全基因组序列设计引物,通过 PCR 扩增方法,克隆了玉米 *YS3* 基因上游 2813 bp 的启动子序列,利用生物信息学软件对启动子顺式作用元件进行预测和分析,构建 *YS3* 基因启动子驱动 *GUS* 基因表达的重组植物表达载体 pCambia-*YS3GUS*,并转化拟南芥,研究 *YS3* 基因启动子的活性。本研究对进一步理解玉米 DMA 分泌调控的分子机理具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

所用植物材料为玉米自交系郑 58 和野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Ecotype Columbia-0)。

1.2 方法

1.2.1 *YS3* 基因启动子的克隆

以郑 58 幼苗为材料,采用 CTAB 法^[12]从植物叶片中提取总 DNA。以 *YS3* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号:JQ288305)为 query 序列搜索玉米 B73 全基因组数据库(MaizeGDB <http://www.maizegdb.org/>),

获得 *YS3* 基因及其启动子序列。据此设计引物,引物序列为:正向引物 P1 :5'-GAGGGAGGCAGGCAA-AAGGGGAAAC-3';反向引物 P2 :5'-AAAGTAAGATGCACCAAGAAAACCAGCGTA-3';反向引物 P3 :5'-CGACGTACGTACAATGGACAGGGACACGCT-3'。P1 位于 *YS3* 起始密码子上游 2787 bp 处,P2 位于 *YS3* cDNA 起始密码子下游 234 bp 处,P3 位于 *YS3* 起始密码子上游 1 bp 处。引物由北京六合华大基因公司合成。

以郑 58 基因组 DNA 为模板,以 P1/P2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系包括:2×KOD FX Buffer 25 μ L、dNTPs(2 mmol/L)6 μ L、10 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L、模板 DNA 200 ng、高保真 KOD FX(1.0 U/ μ L)1 μ L,用无菌水补足到 50 μ L。PCR 反应条件:94°C 预变性 4 min,94°C 变性 15 s,63°C 复性 30 s,68°C 延伸 3.5 min,5 个循环;94°C 变性 15 s,59°C 复性 30 s,68°C 延伸 3.5 min,30 个循环;最后 68°C 延伸 5 min。回收 PCR 扩增片段 1,目的片段连接到 pEASY-blunt 载体上,转化 DH5 α 感受态细胞中,经菌落 PCR 检测为阳性的克隆,送北京六合华大基因公司测序。

以含 PCR 扩增片段 1 的质粒为模板,以 P1/P3 为引物进行第二次 PCR 扩增。PCR 扩增体系与反应条件同上。回收 PCR 扩增片段 2,连接转化,菌落 PCR 检测为阳性的克隆送北京六合华大基因公司测序。

1.2.2 玉米 *YS3* 基因启动子序列的生物信息学分析

转录起始位点和核心启动子通过软件 Softberry (<http://lintx1.softberry.com/berry.phtml>)和 BDGP:Neural Network Promoter Prediction(<http://www.fruitfly.org/seq>

tools/promoter.html)等在线工具预测;启动子调控元件分析借助植物顺式调控元件数据库 PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)完成。

1.2.3 pCAMBIA-*YS3GUS* 植物表达载体构建

选用 pCAMBIA 1301 载体构建植物表达载体,根据载体质粒图谱上多克隆位点特点,用 *Hind* III、*Nco* I 对载体进行酶切,切除 35S 启动子片段,对粘性末端平端化,T4 DNA 连接酶连接构建质粒。

设计引物 P4/P5(P4 :5'-CGGAATTCGAGGGAGGCAGGCAAAAGGGGAAAC-3',P5 :5'-CGGAATTCGGCACCTCCTCAGCCATCGACGTA-3';下划线为 *Eco*R I 酶切识别序列)扩增启动子片段,从而使启动子 5'端带有 *Eco*R I 酶切位点,PCR 扩增和反应条件同上。用 *Eco*R I 酶切启动子片段和载体质粒,T4 DNA 连接酶连接,转化 DH5 α 感受态细胞,构建 *YS3* 启动子驱动 *GUS* 基因表达的植物表达载体。菌落 PCR 及测序鉴定方向正确后,获得植物重组表达载体,命名为 pCAMBIA-*YS3GUS*,构建方法如图 1 所示。

1.2.4 拟南芥遗传转化及 PCR 筛选

通过液氮冻融法将重组植物表达载体 pCAMBIA-*YS3GUS* 导入根癌农杆菌 LBA 4404 的感受态细胞中^[13],在含有 Rif(50 mg/mL)和 Kan(50 mg/mL)的 YEB 固体培养基上筛选单菌落,菌落 PCR 验证为阳性的单菌落转化子用于拟南芥的转化。采用蘸花法转化拟南芥,转化步骤参照 Clough 和 Bent 报道的研究方法^[14],将最终收获的 T₀ 代拟南芥种子用于筛选转基因植株。采用 DNA 快速提取方法从 T₁ 代拟

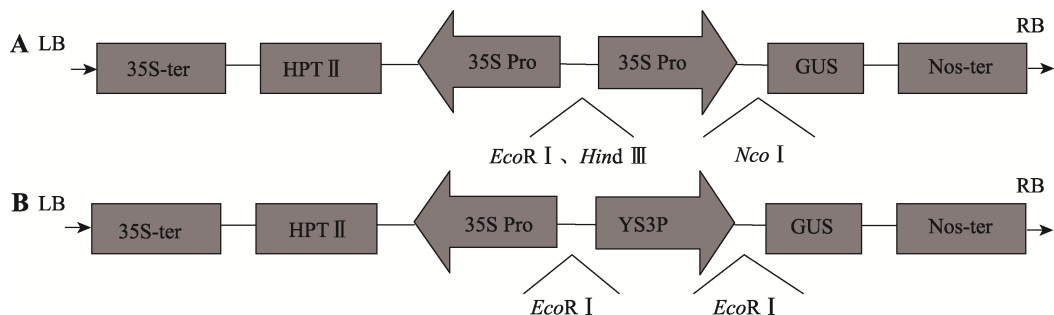


图 1 植物表达载体 pCAMBIA-*YS3GUS* 构建

Fig. 1 Construction diagrams of pCAMBIA-*YS3GUS* expression vectors

A: 植物表达载体 pCAMBIA 1301; B: 植物重组表达载体 pCAMBIA-*YS3GUS*。

南芥叶片中提取总 DNA^[15], 以引物 P1/P3 进行 PCR 扩增, 筛选阳性植株。

1.2.5 转基因植株 GUS 活性检测

转基因植株培养 10 d 后, 进行 GUS 组织化学分析, GUS 染色方法按照 Jefferson 等^[16]方法进行。将转基因植株及对照分别放入 1.5 mL 的离心管中, 加入 GUS 染色液, 37℃保温过夜, 75%乙醇脱色, 在体式镜下进行观察。

石蜡切片制作步骤参照李峰^[17]报道的研究方法, 切片厚度 10 μm, 显微镜下观察切片。

1.2.6 *pYS3::GUS* 在损伤处理后的转基因拟南芥叶片中的表达

转基因植株培养 10 d, 取植株基部一叶片用镊子微损伤, 30 min 后取植株进行 GUS 活性检测, 以未损伤的转基因植株作为阴性对照, 脱色后, 体式镜下进行观察。

2 结果与分析

2.1 玉米 *YS3* 基因启动子克隆、序列分析和顺式作用元件预测

以玉米自交系郑 58 总 DNA 为模板, 以 P1/P2 为引物进行 PCR 扩增, 获得长约 4.9 kb 的目的片段 1

(图 2A), 测序结果表明该片段包括 2 部分: 2813 bp 起始密码子上游序列和 2110 bp 起始密码子下游序列(含 2 个内含子, 长度分别为 1748 bp 和 98 bp, 图 2B)。以含片段 1 的质粒为模板、P1/P3 为引物进行 PCR 扩增, 获得位于 *YS3* 起始密码子 ATG 上游长约 2813 bp 启动子片段 2(GenBank 登录号: KR055672)(图 2C)。

经 BDGP 软件对片段 2 序列进行分析, 结果表明, *YS3* 基因核心启动子区位于 -40~+10 bp 处, 转录起点为 G, 位于翻译起始密码子 ATG 上游 118 bp 处, 采用 PLANTCARE 数据库对 *YS3* 启动子的顺式作用元件分析, 结果显示该序列具有启动子核心序列 TATA-box 和增强子元件 CAAT-box 等多个典型的真核生物启动子基本元件, 除基本元件外, 该启动子所包含其他顺式作用元件详细信息见表 1。

2.2 拟南芥转基因和 GUS 活性检测

按照 1.2.3 部分描述的方法构建植物表达载体 pCambia-*YS3GUS*(构建过程如附图 1 所示), 然后通过液氮冻融法转化到根癌农杆菌 LBA 4404, 蘸花法转化拟南芥, 经 PCR 鉴定, 获得含有 *YS3* 启动子片段的转基因阳性植株(图 3)。

对 PCR 检测呈阳性的转基因植株进行 GUS 活性检测, X-Gluc 显色结果表明, 转基因植株根部均具有较强的 GUS 活性, 此外, 在少数转基因植株叶

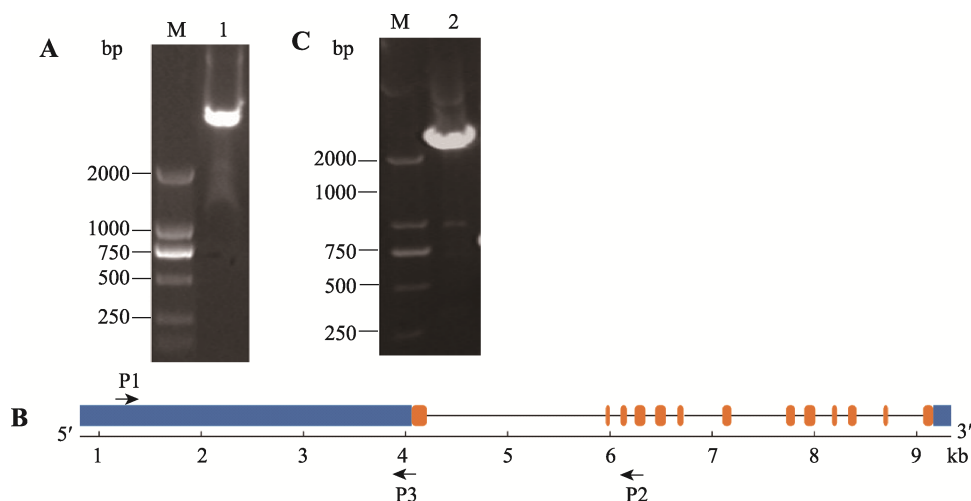


图 2 PCR 扩增 *YS3* 启动子

Fig. 2 PCR amplification products of the *YS3* promoter

A: 以 P1/P2 为引物的 PCR 产物电泳结果。M: DL2000 分子量标准; 1: 长约 4.9 kb 的 PCR 扩增片段 1。B: *YS3* 基因结构示意图。蓝色长方形表示 *YS3* 上下游序列; 橙色部分表示外显子; 实线表示内含子; 箭头表示引物位置和延伸方向。C: 以 P1/P3 为引物的 PCR 产物电泳结果。M: DL2000 分子量标准; 2: 长度为 2813 bp 的 PCR 扩增片段 2。

表 1 玉米 YS3 启动子顺式作用元件分析

Table 1 The *cis*-acting elements of the YS3 promoter

元件类型	元件名称	序列	各元件拷贝数	功能
光响应元件	ACE	GACACGTATG	2	光响应
	G-box	CACGAC	9	光响应
	GATA-motif	GATAGGG	1	光响应
	I-box	GATAGGG	1	光响应
	MNF1	GTGCCC(A/T)(A/T)	1	光响应
	Sp1	CC(G/A)CCC, CC(G/A)CCC, GGGCGG	10	光响应
	Box 4	ATTAAT	1	光响应
	GT1-motif	GGTTAA, GGTTAAT	2	光响应
	TCCC-motif	TCTCCCT	2	光响应
	TCT-motif	TCTTAC	1	光响应
	as-2-box	GATAATGATG	1	光响应及幼嫩叶特异表达
激素相应元件	ABRE	CCGCGTAGGC, TACGGTC	7	脱落酸响应
	motif IIb	CCGCCGCGCT	1	脱落酸响应
	P-box	CCTTTTG	1	赤霉素响应
	TGA-element	AACGAC	1	生长素响应
	AuxRR-core	GGTCCAT	1	生长素响应
	CGTCA-motif	CGTCA	6	茉莉酸甲酯响应
	TGACG-motif	TGACG	6	茉莉酸甲酯响应
其他调控原件	CAT-box	GCCACT	1	分生组织表达
	CCGTCC-box	CCGTCC	1	分生组织特异表达
	GCN4_motif	TGAGTCA	1	胚乳表达
	CCAAT-box	CAACGG	1	MYBHv1 结合位点
	MBS	CGGTCA	4	MYB 结合位点
	GC-motif	GCCGCGCG, GCCCCGG	4	缺氧特异表达
	ARE	TGGTTT	1	厌氧诱导
	O2-site	GTTGACGTGA	1	玉米 zein 蛋白代谢
	Box-W1	TTGACC	7	真菌诱导子响应
功能未知元件	Unnamed_1	CGTGG	4	
	Unnamed_2	CCCCGG	4	
	Unnamed_3	CGTGG	4	
	Unnamed_4	CTCC	39	
	Unnamed_6	TATAAATATCT	1	
	Unnamed_16	GCTGCCCCGTC	1	

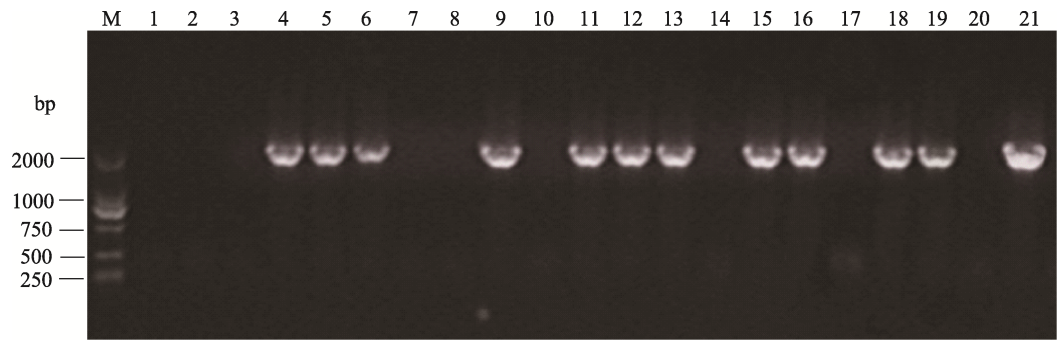


图 3 PCR 鉴定转基因拟南芥中的 *YS3* 启动子

Fig. 3 PCR identification of transgenic plants

M: DL2000 分子量标准; 1~19: 拟南芥转基因植株 PCR 产物电泳结果, 其中 4、5、6、9、11、12、13、15、16、18、19 为阳性, 1、2、3、7、8、10、14、17 为阴性; 20: 阴性对照; 21: 阳性对照。

片中也检测到 GUS 活性(图 4)。对拟南芥染色部位制作石蜡切片, 观察发现, 在根部表皮细胞染色较重, 其他细胞也有染色, 但染色较浅, 叶中表皮及叶肉细胞均有染色(图 5)。结果表明所获得的 *YS3* 上游序列具有启动子活性, 能启动 *GUS* 基因在拟南芥中表达, 且表达主要集中在根部表皮细胞。

2.3 转基因拟南芥叶片受损伤后的 *pYS3:GUS* 的表达检测

用镊子对转基因植株叶片进行微损伤, 并对转基因植株进行 GUS 活性检测。观察发现, GUS 活性除在转基因植株根部检测到外, 在经损伤处理叶片中也

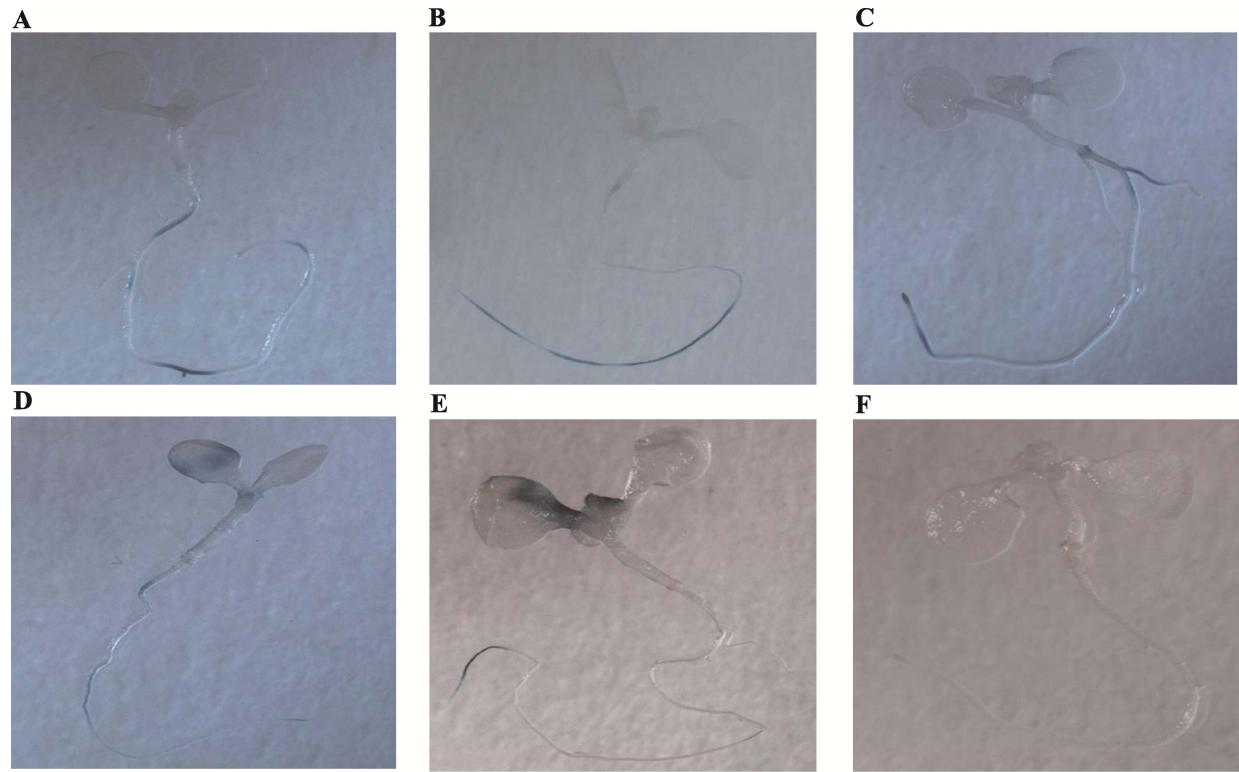


图 4 转基因拟南芥的 GUS 组织化学染色

Fig. 4 GUS expression in the transgenic *Arabidopsis*

A~E: 转 *pCambia-YS3GUS* 质粒拟南芥 GUS 化学染色结果; F: 非转化拟南芥 GUS 化学染色结果。其中 A~C 染色集中在根部, D、E 在根和叶片中均有染色。

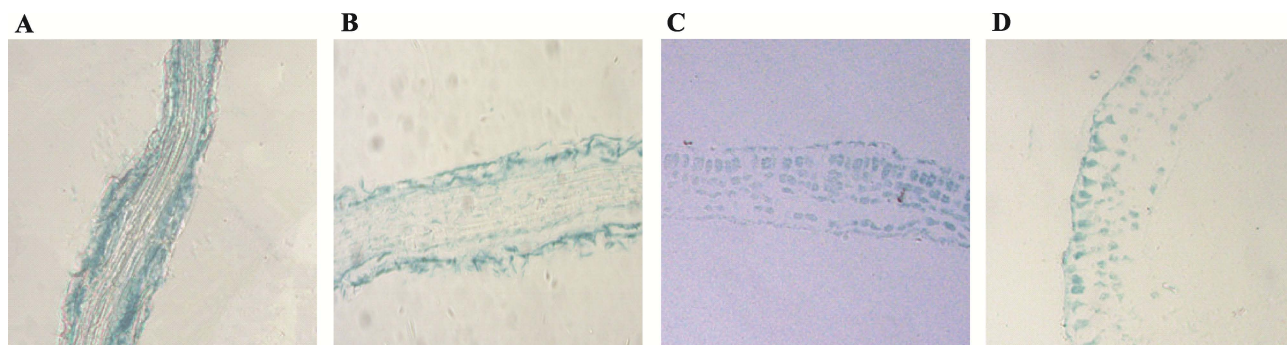


图 5 转基因拟南芥的 GUS 组织化学染色组织观察

Fig. 5 Histochemical staining of the GUS activity in the transgenic *Arabidopsis*

A、B：转基因拟南芥根部 GUS 染色纵切图；C、D：转基因拟南芥叶片 GUS 染色横切图。

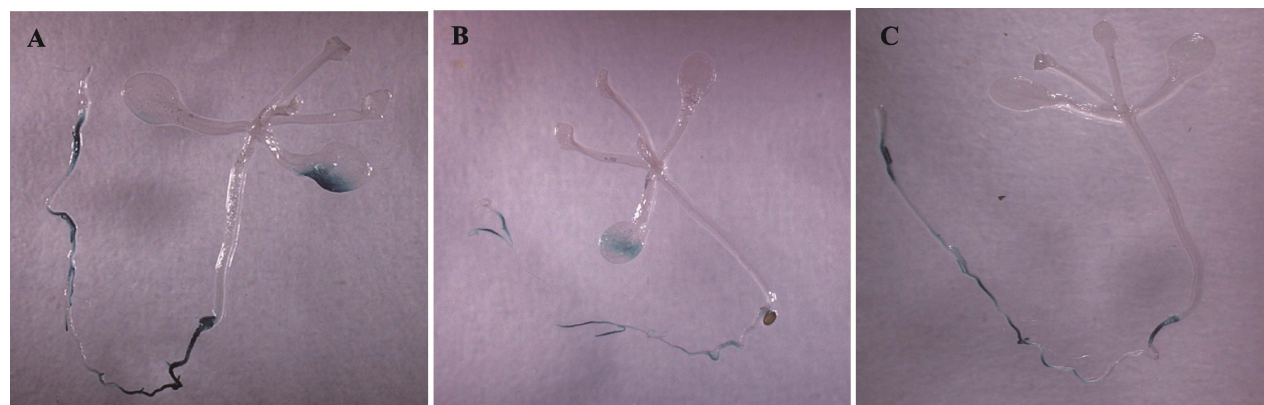


图 6 转基因拟南芥叶片微损伤后的 GUS 组织化学染色

Fig. 6 Histochemical staining of the GUS activity in the leaves of microdamaged transgenic *Arabidopsis*

A、B：转基因拟南芥叶片损伤后植株 GUS 染色结果；C：未损伤的转基因拟南芥植株 GUS 染色结果。

检测到，未经损伤处理的叶片中未检测到 GUS 活性（图 6）。表明机械损伤诱导 GUS 基因表达，YS3 启动子活性受机械损伤诱导激发，驱动 GUS 基因在损伤临近部位表达。

3 讨 论

玉米作为重要的粮食和经济作物，在生产上具有重要地位，但其属于铁低效植物，铁利用效率很低^[2]，因此研究玉米铁吸收机制对农业生产具有重要意义。玉米 DMA 的分泌存在昼夜变化规律，虽在一天当中持续分泌，但白天的分泌量明显高于晚上，并且在日出后 3~4 h 左右出现分泌最高峰，缺铁处理条件下 DMA 分泌在 13:00~16:00 或 19:00~22:00 出现第二次分泌高峰^[6]。在 DMA 收集前对玉米进行 24 h 遮光处理，DMA 分泌量显著增加^[6]。在植物调

节铁元素吸收和利用的过程中，一氧化氮、乙烯等正调控缺铁应答反应^[18~20]，细胞分裂素和茉莉酸起负调控的作用^[21,22]。在玉米中发现 59 个转录因子基因受到缺铁胁迫的调控，涉及的转录因子包括 bHLH 类、MYB 类、MYC 类、CCCH 类以及乙烯应答转录因子；在翻译后水平，102 个蛋白激酶基因和 26 个蛋白磷酸酶基因受到缺铁胁迫的调控，表明蛋白质磷酸化和去磷酸化在玉米应对缺铁胁迫逆境中发挥重要作用^[8]。本研究根据玉米 B73 全基因组序列设计引物，通过 PCR 扩增获得该基因上游 2813 bp 启动子序列，分析发现 YS3 启动子参与多种调控途径，在启动子区域有多个光响应、激素调控、生理节奏调控、MYB 类等多种顺式作用元件。该结果与前人对 DMA 分泌规律的研究结果一致。

为进一步分析 YS3 启动子的活性，研究玉米

DMA 分泌过程的分子机理,本研究构建重组植物表达载体 pCAMBIA-*YS3GUS*, 农杆菌介导转化拟南芥, 鉴定了该启动子的作用位置。该启动子具有启动子活性, 启动基因在根部表达, 且主要集中在根部表皮细胞。考虑到 *YS3* 蛋白主要负责将玉米合成的 DMA 分泌到土壤中, 这种表达模式符合预期。

研究发现除根部以外, 少数转基因植株叶片中也检测到了 GUS 活性, 仔细观察发现, 部分此类植株的叶片具有明显的损伤。启动子顺式作用元件分析发现该启动子含有大量的茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)响应元件(表 1), 而 MeJA 是一种与损伤有关的信号分子^[23]。研究中对转基因拟南芥植株叶片进行微损伤, 受损伤叶片检测到 GUS 活性, 验证机械损伤可激发 *YS3* 启动活性, 驱动 *GUS* 基因在损伤临近部位表达, 表明植物缺铁胁迫响应机制与机械损伤响应机制之间存在内在联系, 具体内在关系将在后续研究中进一步研究确认。

附录:

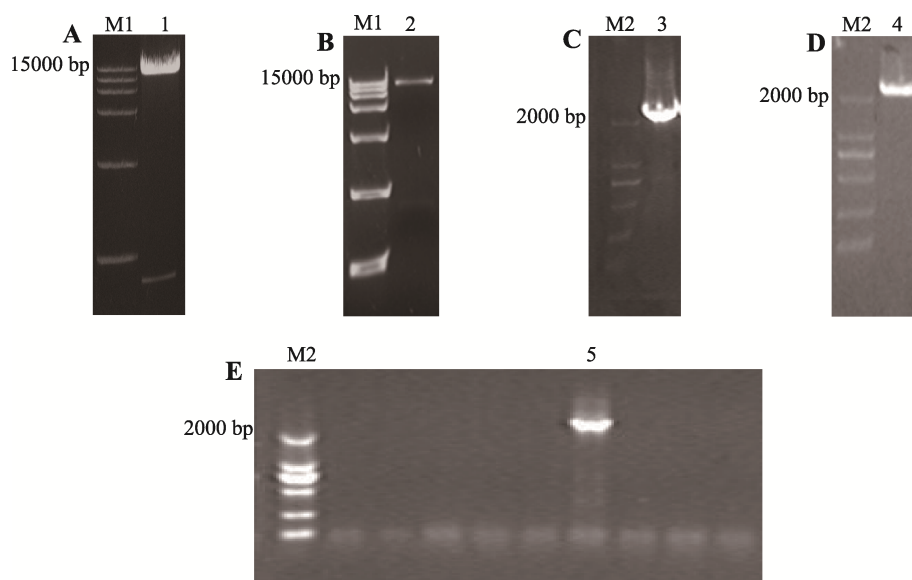
附图见电子版 www.chinagene.cn。

参考文献(References):

- [1] Schmidt W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(4): 188–193. [DOI]
- [2] Yin LP, Huang QN, Wu P. Plant nutrition molecular biology and signal transduction. Beijing: Science Press, 2006. 印莉萍, 黄勤妮, 吴平. 植物营养分子生物学及信号传导. 北京: 科学出版社, 2006. [DOI]
- [3] Mori S. Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(3): 250–253. [DOI]
- [4] Mori S, Nishizawa NK. Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in *Graminaceae* plants. *Plant Cell Physiol*, 1987, 28(6): 1081–1092. [DOI]
- [5] Nozoye T, Inoue H, Takahashi M, Ishimaru Y, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. The expression of iron homeostasis-related genes during rice germination. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(1–2): 35–47. [DOI]
- [6] Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J Biol Chem*, 2011, 286(7): 5446–5454. [DOI]
- [7] Nozoye T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Characterizing the crucial components of iron homeostasis in the maize mutants *ys1* and *ys3*. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62567. [DOI]
- [8] Li Y, Wang N, Zhao FT, Song XJ, Yin ZH, Huang R, Zhang CQ. Changes in the transcriptomic profiles of maize roots in response to iron-deficiency stress. *Plant Mol Biol*, 2014, 85(4–5): 349–363. [DOI]
- [9] Marschner H, Römheld V. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil*, 1994, 165(2): 261–274. [DOI]
- [10] Neumann G. Root exudates and nutrient cycling. In: Marschner P, Rengel Z, eds. *Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems*. Berlin Heidelberg: Springer, 2007: 123–157. [DOI]
- [11] Dong BX. Association analysis between mugineic acid release character and SSR markers in seedling stage of maize inbred lines[Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012. 董炳雪. 玉米自交系苗期麦根酸分泌特性及其与 SSR 标记的关联分析[学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2012. [DOI]
- [12] Wei CH, Li Y. The extraction of total DNA of plants. In: Wei CH, Li Y, eds. *Modern Molecular Biology Technology*. Beijing: Higher Education Press, 2006. 魏春红, 李毅. 植物总 DNA 的提取. 见: 魏春红, 李毅. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 2006. [DOI]
- [13] Hofen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(20): 9877. [DOI]
- [14] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743. [DOI]
- [15] Wen DX. Studies on rapid testing genetic purity of maize seeds with molecular technique[Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013. 温大兴. 玉米种子纯度快速分子检测技术研究[学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2013. [DOI]
- [16] Jefferson RA. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Bio Rep*, 1987, 5(4): 387–391.

- 387–405. [DOI]
- [17] Li F. Test process to investigate of paraffin section of the plant. *Sci Technol Inf*, 2012, (5): 104–105.
- 李峰. 植物石蜡切片制作(*paraffin section*) 的试验流程探讨. 科技信息, 2012, (5): 104–105. [DOI]
- [18] Chen WW, Yang JL, Qin C, Jin CW, Mo JH, Ye T, Zheng SJ. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2010, 154(2): 810–819. [DOI]
- [19] Graziano M, Lamattina L. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *Plant J*, 2007, 52(5): 949–960. [DOI]
- [20] Jin CW, Du ST, Chen WW, Li GX, Zhang YS, Zheng SJ. Elevated carbon dioxide improves plant iron nutrition through enhancing the iron-deficiency-induced responses under iron-limited conditions in tomato. *Plant Physiol*, 2009, 150(1): 272–280. [DOI]
- [21] Maurer F, Müller S, Bauer P. Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(5): 530–536. [DOI]
- [22] Séguéla M, Briat JF, Vert G, Curie C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J*, 2008, 55(2): 289–300. [DOI]
- [23] Fung RWM, Wang CYW, Smith DL, Gross KC, Tian MS. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci*, 2004, 166(3): 711–719. [DOI]

(责任编辑: 赖锦盛)



附图 1 植物表达载体 pCAMBIA-YS3GUS 构建过程

Supplementary Fig. 1 Construction processes of pCAMBIA-YS3GUS expression vectors

A: 载体 pCAMBIA 1301 双酶切切除 35S 启动子; B: 无 35S 启动子载体质粒经 *EcoR* I 酶切回收; C: 带有 *EcoR* I 酶切位点的 *YS3* 启动子片段; D: *YS3* 启动子 *EcoR* I 酶切回收产物; E: PCR 鉴定重组表达载体; M1: DL15000 分子量标准; M2: DL2000 分子量标准; 1: 载体 pCAMBIA 1301 经 *Hind* III、*Nco* I 双酶产物; 2: 无 35S 启动子载体质粒 *EcoR* I 酶切产物; 3: 含 *EcoR* I 酶切位点的 *YS3* 启动子 PCR 扩增片段; 4: *YS3* 启动子 *EcoR* I 酶切回收片段; 5: 重组表达载体 pCAMBIA-YS3GUS PCR 筛选阳性结果。