

桂花 *OfCCD1* 基因启动子克隆与表达特性

刘玉成¹, 王艺光¹, 张超¹, 董彬¹, 付建新¹, 胡绍庆², 赵宏波¹

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江理工大学 建筑工程学院, 浙江 杭州 310018)

摘要: 类胡萝卜素裂解双加氧酶(CCDs)参与植物中多种类胡萝卜素的代谢, 在桂花 *Osmanthus fragrans* 中类胡萝卜素裂解双加氧酶基因1(*OfCCD1*)对花香物质的合成具有重要作用。根据前期获得的桂花‘堰虹桂’*O. fragrans* ‘Yanhong Gui’转录组数据库中*OfCCD1*的序列和前人已发表的*OfCCD1*序列设计引物, 利用染色体步移技术从桂花基因组DNA中扩增获得*OfCCD1*基因2个拷贝的启动子序列*OfCCD1P-L*和*OfCCD1P-S*, 其长度分别为2 747 bp和981 bp。2个启动子序列中均含有参与光响应的元件, 热激响应元件(HSE), 脱落酸(ABA)响应元件(ABRE)和乙烯响应元件; 此外, 2个启动子中均含有4个ACGT序列。将2个启动子序列分别替代pBI121上的35 S启动子, 将构建的载体通过农杆菌*Agrobacterium tumefaciens*介导转化烟草*Nicotiana tabacum*叶片进行瞬时表达, 发现2个启动子都具有驱动GUS报告基因表达的功能。图5表3参25

关键词: 林木育种学; 桂花; 类胡萝卜素; 类胡萝卜素裂解双加氧酶; 启动子; 瞬时表达

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)04-0596-08

Cloning and transient expression assay of *OfCCD1* gene promoters from *Osmanthus fragrans*

LIU Yucheng¹, WANG Yiguang¹, ZHANG Chao¹, DONG Bin¹, FU Jianxin¹, HU Shaoqing², ZHAO Hongbo¹

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Civil Engineering and Architecture, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China)

Abstract: Charge-coupled devices (CCDs) are involved in the degradation and biosynthesis pathways of carotenoid metabolism, and in *Osmanthus fragrans*, *OfCCD1* plays an important role in the biosynthesis of scent compounds. In this study, primers were designed based on the transcriptome database of *O. fragrans* ‘Yanhong Gui’ and another reported *OfCCD1* gene sequence. Two promoter sequences of *OfCCD1*, named *OfCCD1P-L* and *OfCCD1P-S*, were cloned by genome walking. Results showed that the two promoter sequences in length were 981 bp for *OfCCD1P-L* and 2 747 bp for *OfCCD1P-S*. Also, the light responsive element, heat stress element, abscisic acid (ABA) responsive element, and ethylene responsive element were found in the two promoter sequences which including four sequences: ACGT Adenine (A), cytosine (C), guanine (G), and thymine (T). The 35 S promoter in pBI121 was replaced by *OfCCD1P-L* and *OfCCD1P-S*. Afterward, the new vectors were transformed into *Nicotiana tabacum* leaves by *Agrobacterium tumefaciens*. The transient expression showed that the two cloned promoters could drive the expression of downstream reporter genes. [Ch, 5 fig. 3 tab. 25 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Osmanthus fragrans*; carotenoid; CCD; promoter; transient expression analysis

收稿日期: 2017-08-25; 修回日期: 2017-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31501790); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ15C160004; LQ16C160003); 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02056-12); 浙江农林大学科研发展基金人才启动项目(2016FR031)

作者简介: 刘玉成, 从事桂花花色研究。E-mail: 1035778489@qq.com。通信作者: 赵宏波, 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种等研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

类胡萝卜素是广泛分布于自然界的一类色素, 迄今已发现了近 800 种^[1], 主要存在于植物的叶、花、果实和根等器官中, 在吸引昆虫、鸟类传播花粉和种子中发挥作用^[2]。类胡萝卜素可作为多种生物活性物质的前体, 经过氧合酶或非酶裂解作用可以形成阿朴类胡萝卜素^[3], 后者及其衍生物可生成 β -紫罗兰酮(β -ionone)等香气物质及脱落酸(abscisic acid, ABA)等植物生长调节剂^[4]。作为类胡萝卜素裂解氧合酶(carotenoid cleavage oxygenases, CCO)中的重要成员, 类胡萝卜素裂解双加氧酶 1(carotenoid cleavage dioxygenase 1, CCD1)在不同的植物中所裂解的底物、作用位点不尽相同。研究发现^[5], CCD1 在 C9~C10(C9'~C10')位时剪切番茄红素、胡萝卜素、玉米黄质或脱辅基类胡萝卜素等, 形成 β -紫罗兰酮, β -环柠檬醛(β -cyclocitral), 香叶基丙酮(geranylacetone)和假紫罗兰酮(pseudoionone)等芳香类物质; 在番茄红素 C5~C6(C5'~C6')位裂解时则形成 6-甲基-5-庚烯-2-酮^[6], 认为 CCD1 对基于类胡萝卜素代谢途径的香气物质合成发挥着重要作用。桂花 *Osmanthus fragrans* 在中国栽培历史悠久, 集绿化、美化和香化为一体, 花香和花色是其重要观赏性状。类胡萝卜素裂解双加氧酶 1(*OfCCD1*)^[7]降解桂花中的着色物质—— α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素^[8], 合成主要香气物质 α -紫罗兰酮和 β -紫罗兰酮^[9]。基因启动子控制着基因在特定的组织^[10]、特定的发育阶段^[11]以及一定的环境条件下表达^[12]; 分离相关基因启动子, 分析其序列及其作用元件, 并研究其功能, 可明确该基因的调控因子及其作用机制。本研究利用染色体步移技术克隆了 *OfCCD1* 启动子, 通过启动子序列分析、载体构建和瞬时表达分析, 初步明确了其功能, 为揭示 *OfCCD1* 基因调控花色花香代谢机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为 6~8 年生地栽丹桂品种‘堰虹桂’ ‘Yanhong Gui’, 栽植于浙江农林大学桂花资源圃。

1.2 主要试剂

Taq 聚合酶、限制酶(*Dra* I, *Eco*R V, *Pvu* II, *Stu* I), 质粒载体 PMD18-T, 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α , 胶回收试剂盒, DNA 片段纯化试剂盒和无缝连接试剂盒均购自 Takara 公司(大连)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 参照十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB)提取‘堰虹桂’基因组 DNA^[13]。

1.3.2 引物设计与合成 根据‘堰虹桂’转录组数据库中的 *CCD1* 序列(GenBank 登录号 MG138152)^[14]和 BALDERMANN 等发表的 *OfCCD1* (GenBank 登录号 AB526197.1)序列^[9], 用 Primer Primer 5.0 设计下游特异性引物 1(GSP1), 特异性引物 2(GSP2)和特异性引物 4(GSP4); 利用上述 2 段序列的重复序列设计特异性引物 3(GSP3); 利用接头引物 1(API1)与 GSP1, 接头引物 2(API2)与 GSP2 经 2 轮聚合酶链式反应(PCR)获得的启动子片段设计特异性引物 5(GSP5)。利用 pBI121 质粒上的 β -葡萄糖苷酸酶(β -Glucosidase, GUS)基因序列设计上游引物 GUS-F 和下游引物 GUS-R。引物及接头均由上海生工合成(表 1)。

1.3.3 DNA 文库的构建、扩增 ①DNA 文库的构建。分别用 *Dra* I, *Eco*R V, *Pvu* II, *Stu* I 4 种限制性内切酶对提取到的 DNA 进行酶切。酶切体系为基因组 DNA 25.0 μ L(100 mg $\cdot$ L⁻¹), 限制内切酶 8.0 μ L, 10 $\times$ 限制酶 buffer 10.0 μ L, 灭菌水 57.0 μ L, 总体积 100.0 μ L, 37 $^{\circ}$ C 过夜。取 5.0 μ L 酶切产物用质量分数 0.6% 琼脂糖进行检测。按照 DNA 纯化试剂盒的说明书对酶切产物进行纯化后加接头。分别取 4 组酶切纯化的 DNA 各 4.8 μ L, 染色体步移接头 GWA 1.9 μ L, 10 $\times$ 连接缓冲液 0.8 μ L, T4 DNA 连接酶 0.5 μ L, 16.0 $^{\circ}$ C 过夜; 70.0 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 加入 32.0 μ L 去离子水。②聚合酶链式反应(PCR)扩增。取 API1, 引物 GSP1/GSP3, 模板各 1.0 μ L, 预混合 *Taq* 酶 10.0 μ L, 去离子水补至 20.0 μ L 进行第 1 轮 PCR。扩增程序为 94.0 $^{\circ}$ C 5 min; 94.0 $^{\circ}$ C 25 s, 72.0 $^{\circ}$ C 3 min, 7 循环; 94.0 $^{\circ}$ C 25 s, 65.0 $^{\circ}$ C 3 min, 32 循环; 67.0 $^{\circ}$ C 7 min。取第 1 轮产物 1.0 μ L 并稀释 50 倍作为第 2 轮 PCR 的模板。第 2 轮 PCR 体系为: API2, GSP2/GSP4/GSP5, 模板各 1.0 μ L, 预混合 *Taq* 酶 10.0 μ L, 去离子水补至 20.0 μ L。扩增程序为 94.0 $^{\circ}$ C 5 min; 94.0 $^{\circ}$ C 25 s, 72.0 $^{\circ}$ C 3 min, 5 循环; 94.0 $^{\circ}$ C 25 s, 65.0 $^{\circ}$ C 3 min, 20 循环; 67.0 $^{\circ}$ C 7 min。取 GUS-F, GUS-R 和 pBI121 质粒各 1.0 μ L, 预混合 *Taq* 酶 10.0 μ L, 去离子水补至 20.0 μ L 进行 GUS 序列扩增。扩增程序为 95.0 $^{\circ}$ C 5 min; 95.0 $^{\circ}$ C 30 s, 69.8 $^{\circ}$ C 30 s, 72.0 $^{\circ}$ C 1 min, 35 循环; 72.0 $^{\circ}$ C 10 min; 4.0 $^{\circ}$ C 10 min。质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 *OfCCD1* 启动子克隆所用引物

Table 1 Primer sequences used in the cloning of *OfCCD1* promoters

引物名称	序列(5'→3')
GSP1	CTTCACAAACAGCCATTCCAACCAGTCTAT
GSP2	TCGGGCTTTACTGCCACCACACCATTTTC
GSP3	GAGGAGGACTCTCATCAACTGGAGCAAAAT
GSP4	GCATCATTTTCACAAACAGCCATTCCAAC
GSP5	AGCCTCAAGTTTTGTCCTATTGCCAC
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCAGCGCTGGT
GWA	GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCCGACGGCCCGGGCTGCT
CCD1P-L-F	TGATTACGCCAAGCTAAAGGAAGACTATTCACTTTTGGC
CCD1P-L-R	CCGGGGATCCTCTAGCTGTTGATCCTAATTGAACTCTCAC
CCD1P-S-F	TGATTACGCCAAGCTGAAGCACATGTCTCCCA
CCD1P-S-R	CCGGGGATCCTCTAGCTCTTGTTCTGAATTGA
GUS-F	TGATTACGCCAAGCTGATCAGTTCGCCGATGCAG
GUS-R	CCGGGGATCCTCTAGAAGTGCCTTGCTG

1.3.4 PCR 产物回收、连接、转化鉴定及序列测定与分析 切胶回收按照 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0(TaKaRa, 大连)的说明书进行。载体连接按照 PMD18-T 载体说明书(Takara, 大连)进行, 连接后的重组质粒导入大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中, 在 50 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的固体 LB 培养基上进行蓝白斑筛选, 挑取白色单菌落菌液 PCR 检测后将阳性克隆送公司测序。序列初步分析采用 DNAMAN 软件进行。启动子序列作用元件分析采用在线网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行。

1.3.5 表达载体的构建及瞬时表达分析 根据获得的 *OfCCD1* 的启动子序列, 利用 Takara(<http://www.clontech.com>)无缝连接引物设计软件设计 3 对无缝连接引物 CCD1P-S-F 和 CCD1P-S-R, CCD1P-L-F 和 CCD1P-L-R, GUS-F 和 GUS-R。具体操作步骤按照 Takara 无缝连接试剂盒的说明书进行。将重组好的表达载体利用冻融法转入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 感受态。随后将烟草 *Nicotiana tabacum* 叶片剪切成 0.5 cm × 0.5 cm 的叶块, 在农杆菌菌液吸光度 $D(600)$ 为 0.6 的侵染液中浸染 10 min; 无菌滤纸吸干叶片表面的菌液, 将侵染的外植体移至于无菌水浸润的滤纸上培养 24 h 并进行 GUS 染色, 37 °C 下保温 16~24 h。V(乙酸):V(乙醇)=3:1 的混合液脱色后取出, 对染色结果进行拍照。

2 结果与分析

2.1 启动子克隆

以‘堰虹桂’DNA 为模板, 分别利用引物 GSP1 和 GSP2, 接头引物 AP1 和 AP2 进行 2 轮 PCR, 在 *EcoR* 文库扩增得到条带; 经比对和拼接得到长度为 511 bp 的序列(图 1A)。利用引物 GSP3 和 GSP4, 接头引物 AP1 和 AP2 经过 2 轮 PCR, 在 *DraI* 文库中得到约 2 000 bp 的条带(图 1B)。测序后, 经比对和拼接得到长度为 2 747 bp 的条带, 命名为 *OfCCD1P-L*(图 2)。利用 GSP3 和 GSP5 经过 2 轮 PCR 后在 *Pvu II* 文库中得到 750 bp 左右的条带(图 1B), 经过拼接比对得到 *OfCCD1* 上游 981 bp 的启动子序列, 命名为 *OfCCD1P-S*(图 3)。

2.2 启动子序列分析

利用 PlantCARE 网站对启动子序列进行序列分析发现, *OfCCD1P-L* 有 TATA-box 和 CAAT-box 等基本作用元件, 同时有 7 个响应元件, 响应茉莉酸甲酯、赤霉素、水杨酸、乙烯的元件, 以及热激元件, 鸟类成髓细胞性白血病病毒癌基因同源物(MYB)结合位点, 并有 4 个响应脱落酸(ABA)的核心序列 ACGT(表 2)。*OfCCD1P-S* 中含有 TATA-box 和 CAAT-box 等基本作用元件, 同时有 3 个光响应元件, 1 个热激响应元件以及 1 个 ABA 响应元件(表 3), 并有 4 个 ABA 响应元件(ABRE)核心序列 ACGT。

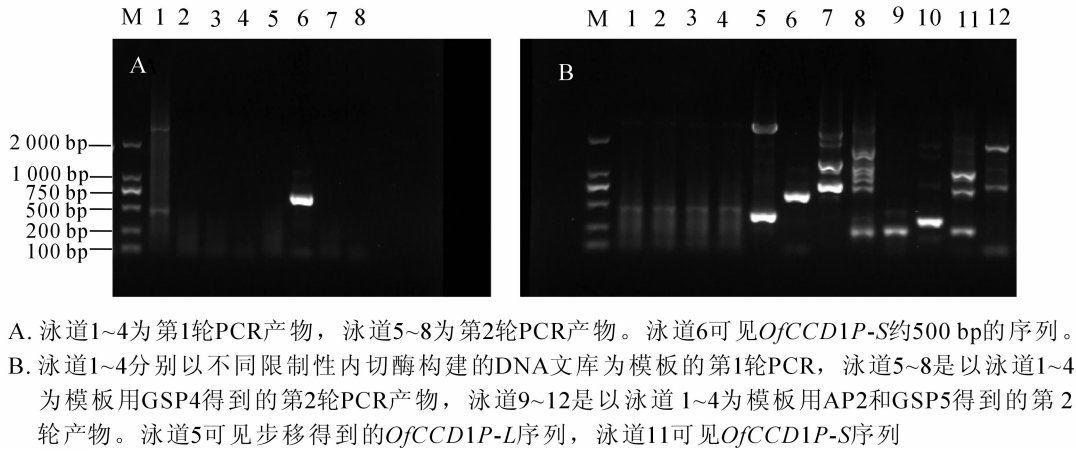


图 1 *OfCCD1* 启动子克隆电泳图
Figure 1 PCR products of *OfCCD1* promoters

表 2 *OfCCD1P-L* 中顺式作用元件
Table 2 Cis-acting elements in *OfCCD1P-L*

顺式作用元件名称	位置	序列 (5'→3')	功能
G-Box	-326, -664, -2 584	CACGTA	光响应元件
GA-motif	-257, -2 738	AAAGATGA	光响应元件的一部分
ATCT-motif	-2 564	AATCTAATCT	参与光响应的部分保守 DNA 序列
Box I	-429, -1 649	TTTCAAA	光响应元件
AE-box	-737	AGAAACAT	光响应元件的一部分
Box 4	-733	ATTAAT	参与光响应的部分保守 DNA 序列
GAG-motif	-300	AGAGATG	光响应元件的一部分
CAAT-box	-115, -569	CAAT	一般元件
CAT-box	-1 839	GCCACT	与分生组织相关的顺式元件
CGTCA-motif	-2 580	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件
TGACG-motif	-486	TGACG	茉莉酸甲酯响应元件
HSE	-2 066	AAAAAATTTC	热激响应元件
LTR	-1 411	CCGAAA	低温响应元件
MBS	-961, -1 256	TAACTG	MYB 结合位点
P-box	-2 002	CCTTTTG	赤霉素响应元件
Skn-1_motif	-968, -1 310, -1 544, -2 331	GTCAT	胚乳中表达的必备元件
TATA-box	-268, -356, -879, -894, -909	TATA	一般元件
TC-rich repeats	-1 149, -2 519	ATTTTCATCA	参与防御和胁迫的元件
TCA-element	-421, -1 340	TCAGAAGAGGA	水杨酸响应元件
GCN4_motif	-402	TGTGTCA	胚乳中表达的必备元件
ERE	-428	ATTTCAAA	乙烯响应元件
GCN4_motif	-402	TGTGTCA	胚乳中表达的必备元件

2.3 植物表达载体构建与瞬时表达分析

将克隆得到的启动子和 GUS 片段分别与 pBI121 质粒进行重组(图 4)，以含 GUS: :GUS 表达载体的菌株为阴性对照(ck₁)，以含 pBI 121 载体菌株为阳性对照(ck₂)，对构建的 *OfCCD1P-L*: :GUS 和 *OfCCD1P-S*: :GUS 表达载体进行瞬时表达分析(图 5)。从图 5 可以看出，阴性对照没有着色，阳性对照着色范围和程度最好，*OfCCD1P-L*: :GUS 表达载体和 *OfCCD1P-S*: :GUS 表达载体均有着色，但着色都比阳性对照要弱。

3 讨论

桂花 *OfCCD1* 基因有 2 个拷贝^[14]。在启动子克隆过程中，第 1 次步移并未得到足够长的序列。目

-2747 AAGGAAGATTATTCACTTTTGGCCACAAATTCTTACCCTTAATAGGATTGACAATGTTTTCATAGCACTGTAGATAGGTTTGCA
 GA-motif
 -2662 CTGTATAGCACTTGTGCACATACCTTTGTAAGATTATCACCTCTGTCTAGTATTACAGCAACCCCATGCCCACATGGAAATCCCGTCA
 G-Box CGTCA-motif
 -2575 AATCTCATCTCTGTCATGCACATGTCTTGCTTGACAAATCAACCAATATTCTCTCAATGAGGACATTTTACATAGAACCCTGGGGCC
 ATCT-motif TC-rich repeats
 -2489 CCAAACCAGTCCACTACACACTCTCAGCTATTTCACATATTGGCTAATTTTGTGGATCTTAGGACACAAAGGCTCTCTAGC
 -2403 TTTTCTCATCTTATCCCTCCTTGATTGTATCTCTTCATGCAGCTGATATGCATGTCAATTAACATGTCATGATTGTTTTCCTAT
 Skn-1_motif
 -2314 CCTCTAACACCACATTGTTGAAAACCTCACATAGATTGTTAAGCACTATATCACTCTTACCTTAGCTAAGAAATGAGACTTACTCC
 -2227 ATTCACCTGGATCCCTTTTCATTAACCACTCATATGCACCCATACTCTCCTTCGCAAGTTCATCATCCAAAACCTCCAATCAGGCAC
 -2140 GGTGGTTGACTTCACAGCTTTCATAAGTAGCCTTTAAGTGCTAAACTCTTAAATAGCCTTAATAAATTTGATATCATGTGCC
 HSE
 -2054 TCACACAAAACCTCATGTTGAGCATCAGGGTACAAGTCTCAATGACTTTGTTAGTCCCTCTGTCTATCAGTTATAAAAGTTCAT
 P-box
 -1968 TCATTGCTATTACAATCCTTAAATCTTACCCTAATGACTAATGAACCATCTCCAACCTCTAGTATTCTCAGTCTCTACCCTGCGT
 -1880 ATGCTACTGGGTAAATGCAATCATTAGCATCTAGTCCCACTCCAACAAGCACCTGCCCGCCAAAATCCCTTTCAGAAAACACTC
 CAT-box
 -1795 GTCTAAGCCTAAAAGCTGCCTACAACCACTCATAAACGTCGCTTGCAAGCTTCTAAACATATATAATCCCTTAAAACCTTTGACT
 -1709 CATGCGTGGTAACATATCATGTGGATCTGGATTGCTTTTCAAAAGTCTCATGAGCAAAAGAACAAAGTAAGCCAAACTGGTGT
 TATA-box Box I
 -1625 CATTAGAACCCTCAATCATTATCCTGTGTCTTCTAGCTCGCTATGCAGTAACCTTATTGATTAGTAATTTCAATCTCTCAT
 Skn-1_motif
 -1537 GATCTTAACAACAAGCCCTGACTTCTAATCAGGGGCAACCTTGAAAGTCTCTAAGTACTTCTCAGCAATGACTTAGCTGTACAA
 -1452 TGCCAGTTTGTCTATCTCGTAAGCACATGTGTCCGAAATGAATGTTTTAATTGTTATGCAGCCCTTTTCTTATTCATGAAGCC
 LTR
 -1365 CAAATCTTCACTTGCATCTTTTGTGTCACACTCTCTGTGCTCTCTTGTCAATTCGCTTAAACTTCAAATTACGCCTAGTG
 TCA-element Skn-1_motif
 -1278 ACAACTCCATGATTTCTAATCTTTCTTAAATCTTCCATGTCTTTGAACTCTTCCCAACCTCTAGTTGTGGATTAAACCTCTCA
 MBS
 1191 CTTTCAACATCATAAGTGGGAAACGATAATATTTCATCACTGAAGAATGATCAGTCACTCAACTCCTCAGAAGATGCATAATA
 TC-rich repeats TATA-box
 -1105 TGGATCATCAATTTGTACCATCATCTTACCAGCTACTTGAAATCGAGGCTCCTGTTAAGACCAACCTCAACTCTTTCAAGTG
 1019 CATTATCTGGTAACGAAACCAACCATCGTCCACATCGACATCCGATGTCATTAAGTCACTCAATAGGCACCAATTCTTCATCT
 Skn-1_motif MBS
 -933 TCATTGTTCAATTATTGGAATATACAACATCTTAATCATGCAATAATATACAACTAGGAGCCAAAAGGAATTCAAACGC
 TATA-box TATA-box TATA-box
 -846 AAATCTTTTATGTATTAAGAATATGCCTCTGTAGGAAGTAATAATGCAAGAGGCATATTCTTAATACATAAAAGAATATGTGTG
 -759 CACTTTCTTCATTAAGAAACATTAATACAAAATCCAAGAAAGTGAGTAGAATAAAAACGAAATAATTATGAATTGTTACTTC
 AE-box Box 4
 -673 TTGACGATTTTCATCTAATTATAACTACAACAAAGTAATAATAAAATACCTTCTGTGGTCTCTCTTGTCTATCTCCAATAGT
 G-Box
 -585 GCATCTCCATCAATTTGATTCCATATGAAGGCAAGGTATATTTGACGATTTGAGGGACAATTTAGACAAGAGAAGATG
 CAAT-box TGACG-motif
 -500 TCCAAGTGTGACGATTTTCAGGGACGATTTTGAAGAAAGAGGGTTTATATTGAATAGTCGTGTTTCAATTTGAGAAATTCAGA
 TGACG-motif ERE Box I TCA-
 -416 AGAGGAATGTGTCTAGGTTGAAGAGAAATTCAGGTTGCACAGATTTAACGGGGTATTTGTACGTTTAATTCTGTTTGT
 element GCN4_motif TATA-box
 -331 ACGTATTTATTTTCATCCATTGGAGAGATGAAAGTTAAATGAGTGGTGGATGAATAATTAAGAAAGATGAGTGAATTGG
 G-Box GAG-motif TATA-box GA-motif
 -246 ATAATCCGTGAAGATAAGTGAATAACTAGTAATAAAATTAAGTTAAATGATTGTTGATTAAATTTAGTCACTAAAATTCATAGAT
 -159 CACTATGTAGTCGGCTTCTCATCAACCAACCAACTAGACAAATTAAGATAGTGACATCTCAATTCAAACAAACCACAATCACAC
 CAAT-box
 -73 AGACGCCTACCCACTCTGGCTACAGGCACACACTTAAATCTTCTATCTGTGAGAGTTCAATTAGGATCAACAGATG
 +1

图2 *OfCCD1P-L* 序列Figure 2 Sequence of *OfCCD1P-L*

前, 已报道的 *OfCCD1* 序列有 2 个: ZHANG 等^[14]发现的 *CCD1* 序列(GenBank 登录号 MG138152)和 BAL-

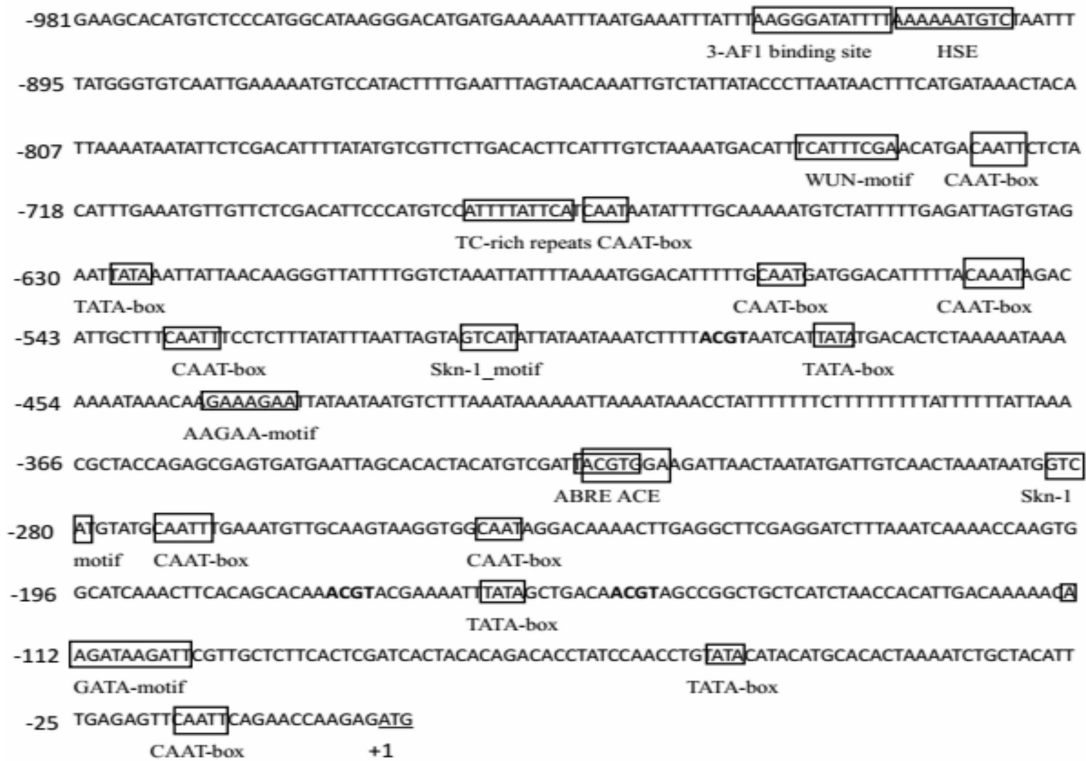


图 3 *OfCCD1P-S* 序列

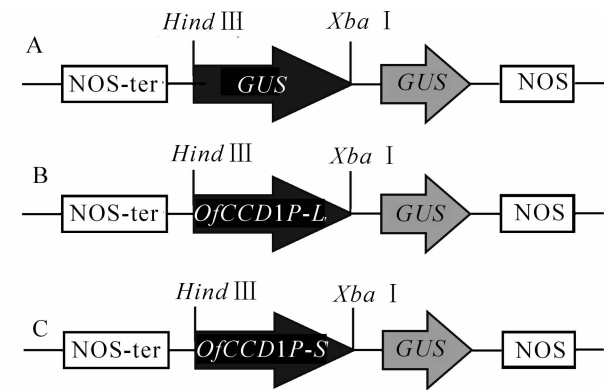
Figure 3 Sequence of *OfCCD1P-S*

表 3 *OfCCD1P-S* 中顺式作用元件

Table 3 Cis-acting elements in *OfCCD1P-S*

顺式作用元件名称	位置	序列(5'→3')	功能
3-AF1 binding site	-911	AAGAGATATTT	光响应元件
GATA-motif	-102	AAGATAAGATT	光响应元件的一部分
ACE	-316	ACGTGGA	光响应元件
AAGAA-motif	-443	GAAAGAA	
ABRE	-324	ACGT	脱落酸响应元件
CAAT-box	-12, -267, -530, -547, -566, -659, -723	CAAT(T)	一般元件
HSE	-901	AAAAAATTTTC	热激响应元件
Skn-1_motif	-278, -503	GTCAT	在胚乳中表达所必须的元件
TATA-box	-54, -158, -472, -623	TAATA/TATA	基本元件
TC-rich repeats	-673	ATTTTCTTCA	参与防御和胁迫的元件

DERMANN 发表的 *OfCCD1* 序列 (GenBank 登录号 AB526197.1)^[9]。本研究利用上述 2 个序列的重复序列设计了引物 GSP3, 并在 GSP3 5' 上游设计了 GSP4, 利用已获得的部分 *OfCCD1* 启动子序列设计了引物 GSP5, 分别步移从而获得了 *OfCCD1P-S* 和 *OfCCD1P-L* 的启动子序列。其中 *OfCCD1P-L* 长度为 2 747 bp, *OfCCD1P-S* 长度为 981 bp。原因是 *OfCCD1* 启动子区域的 2 个拷贝所含酶切位点不同, 构建文库时 *OfCCD1P-L* 启动子区域被内切酶截断的区域短, 步移得到的启动子就较长; 而 *OfCCD1P-S* 启动子区域大部分被截断, 所得的启动子序列就较短。类似地,



A. *GUS::GUS*; B. *OfCCD1P-L::GUS*; C. *OfCCD1P-S::GUS*

图 4 *OfCCD1* 的 2 个启动子重组质粒图

Figure 4 Recombinant vectors of two *OfCCD1*

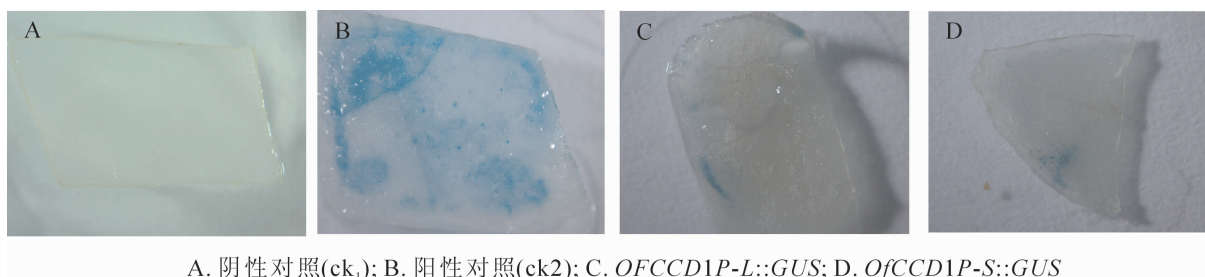


图5 瞬时表达检测

Figure 5 Detection of transient expression

已报道的 CCD 家族其他成员的启动子长度也有差异, 如拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *AtCCD7*^[10] 和 *AtNCED2*^[15], 花生 *Arachis hypogaea* 的 *AhNCED1*^[16] 启动子都有 2 000 bp 左右, 而菊花 *Chrysanthemum morifolium* 的 *CmCCD4a-5*^[17] 和桂花的 *OfCCD4*^[18] 启动子则分别为 1 094 bp 和 1 337 bp。上述文献中进行启动子克隆所用方法不尽相同, 这也是造成获得启动子长度不一的因素。

本研究所获得的 2 个 *OfCCD1* 启动子所含元件种类是具有一致性的, 都含有光响应元件、热激响应元件和 ABA 响应元件, 其中较多的是光响应元件。在桂花中, *OfCCD1* 的表达受光照影响^[9], 证实了 *OfCCD1* 启动子中的光响应元件的存在。同一个亚家族的其他成员, 如 *CCD4*^[19] 和 *CCD2*^[20] 的启动子中也发现了光响应元件。这表明光响应元件在 CCD 家族的启动子中可能是普遍存在的。不过功能上可能有差异, 因为在藏红花 *Crocus sativus* 中, *CsCCD2* 的表达是受光抑制的^[20]。

此外, 克隆得到的 2 个启动子中含有 4 个 ACGT 序列^[21]。ACGT 是启动子中一个重要的顺式作用元件, 该序列可以响应水杨酸(salicylic acid, SA), 紫外线, ABA 和茉莉酸(jasmonic acid, JA)^[22] 的处理。有研究表明: 响应 ABA 至少需要 2 个 ACGT 序列, 且 2 个 ACGT 之间的碱基数不同, 响应的激素种类也不同。MEHROTRA 等^[23] 的研究发现: 当 2 个 ACGT 序列之间的距离是 5 bp 时, 这段序列响应 SA 的处理; 当距离是 25 bp 时, 该序列响应 ABA 处理。在碱蓬 *Suaeda salsa*^[24] 和大豆 *Glycine max*^[25] 中 ABA 处理会使 *CCD1* 的表达量升高, 因此, 桂花中 *OfCCD1* 的表达极有可能响应 ABA 的诱导, 具体的响应机制还需要进一步研究。

4 参考文献

- [1] JOHNSON J D. Do carotenoids serve as transmembrane radical channels? [J]. *Free Rad Biol Med*, 2009, **47**(3): 321 – 323.
- [2] CAZZONELLI C I, POGSON B J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, **15**(5): 266 – 274.
- [3] HOU Xin, RIVERS J, LEÓN P, *et al.* Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2016, **21**(9): 792 – 803.
- [4] WALTER M H, FLOSS D S, STRACK D. Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles [J]. *Planta*, 2010, **232**(1): 1 – 17.
- [5] SIMKIN A J, SCHWARTZ S H, AULDRIDGE M, *et al.* The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2004, **40** (6): 882 – 892.
- [6] ILG A, BEYER P, ALBABILI S. Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranial biosynthesis [J]. *Febs J*, 2009, **276**(3): 736 – 747.
- [7] BALDERMANN S, KATO M, FLEISCHMANN P, *et al.* Biosynthesis of α - and β -ionone, prominent scent compounds, in flowers of *Osmanthus fragrans* [J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, **59**(1): 79 – 81.
- [8] HAN Yuanji, WANG Xiaohui, CHEN Weicai, *et al.* Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans* [J]. *Tree Genet Genomes*, 2014, **10**(2): 329 – 338.
- [9] BALDERMANN S, KATO M, KUROSAWA M, *et al.* Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus*

- fragrans* Lour. [J]. *J Exp Bot*, 2010, **61**(11): 2967 – 2977.
- [10] LIANG Yingshi, JEON Y A, LIM S H, *et al.* Vascular-specific activity of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase 7 gene promoter [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, **30**(6): 973 – 980.
- [11] ZHENG Xiongjie, XIE Zongzhou, ZHU Kaijie, *et al.* Isolation and characterization of *carotenoid cleavage dioxygenase* 4 genes from different citrus species [J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, **290**(4): 1589 – 1603.
- [12] RUBIO-MORAGA A, RAMBLA J L, FERNÁNDEZ-de-CARMEN A, *et al.* New target carotenoids for CCD4 enzymes are revealed with the characterization of a novel stress-induced carotenoid cleavage dioxygenase gene from *Crocus sativus* [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, **86**(4/5): 555 – 569.
- [13] 徐沂春, 胡绍庆, 赵宏波. 基于 AFLP 分子标记的不同类型野生桂花种群遗传结构分析[J]. 浙江农林大学学报, 2014, **31**(2): 217 – 223.
- XU Yichun, HU Shaoqing, ZHAO Hongbo. Genetic structure of different natural *Osmanthus fragrans* populations based on AFLP method [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2014, **31**(2): 217 – 223.
- [14] ZHANG Chao, WANG Yiguang, FU Jianxin, *et al.* Transcriptomic analysis and carotenogenic gene expression related to petal coloration in *Osmanthus fragrans* ‘Yanhong Gui’ [J]. *Trees*, 2016, **30**(4): 1207 – 1223.
- [15] 万小荣, 莫爱琼, 潘家辉, 等. 拟南芥 *AtNCED2* 基因启动子区域序列克隆及其活性分析[J]. 生物技术, 2010, **20**(6): 18 – 23.
- WAN Xiaorong, MO Aiqiong, PAN Jiahui, *et al.* Molecular cloning and GUS-aided activity analysis of promoter region sequence of *AtNCED2* gene from *Arabidopsis thaliana* L. [J]. *Biotechnology*, 2010, **20**(6): 18 – 23.
- [16] 万小荣, 莫爱琼, 刘帅, 等. 粤油 7 号花生 *AhNCED1* 基因启动子克隆及其活性分析[J]. 核农学报, 2011, **25**(4): 692 – 699.
- WAN Xiaorong, MO Aiqiong, LIU Shuai, *et al.* Molecular cloning and GUS-aided activity analyzing of promoter sequence of *AhNCED2* gene from *Arachis hypogaea* L. cv. Yueyou 7 [J]. *J Nucl Agri Sci*, 2011, **25**(4): 692 – 699.
- [17] IMAI A, TAKAHASHI S, NAKAYAMA K, *et al.* The promoter of the carotenoid cleavage dioxygenase 4a-5 gene of *Chrysanthemum morifolium* (*CmCCD4a-5*) drives petal-specific transcription of a conjugated gene in the developing flower [J]. *J Plant Physiol*, 2013, **170**(14): 1295 – 1299.
- [18] 韩远记. 桂花花色变异的机理和不同花色品种花瓣的 cDNA-AFLP 差异分析[D]. 开封: 河南大学, 2014.
- HAN Yuanji. *Mechanism of Flower Color Variation and cDNA-AFLP Analysis of 2 Cultivars with Different Flower Color in Osmanthus fragrans* [D]. Kaifeng: Henan University, 2014.
- [19] AHRAZEM O, TRAPERO A, GÓMEZ M D, *et al.* Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: a deeper study in *Crocus sativus* and its allies [J]. *Genomics*, 2010, **96**(4): 239 – 250.
- [20] AHRAZEM O, RUBIO-MORAGA A, ARGANDOÑA-PICAZO J, *et al.* Intron retention and rhythmic diel pattern regulation of carotenoid cleavage dioxygenase 2 during crocetin biosynthesis in saffron [J]. *Plant Mol Biol*, 2016, **91**(3): 355 – 374.
- [21] CHOI H I, HONG J H, HA J O, *et al.* ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(3): 1723 – 1730.
- [22] BHALOTHIA P, SANGWAN C, ALOK A, *et al.* PP2C-like promoter and its deletion variants are induced by aba but not by MeJA and SA in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, **7**(14): 547. doi: 10.3389/fpls.2016.00547.
- [23] MEHROTRA R, MEHROTRA S. Promoter activation by ACGT in response to salicylic and abscisic acids is differentially regulated by the spacing between two copies of the motif [J]. *J Plant Physiol*, 2010, **167**(14): 1214 – 1218.
- [24] CAO Yongrong, GUO Xiaoli, ZHANG Quan, *et al.* Isolation and characterization of carotenoid cleavage dioxygenase gene in halophyte *Suaeda salsa* [J]. *Plant Growth Regul*, 2005, **46**(1): 61 – 67.
- [25] WANG Ruikai, WANG Chune, FEI Yunyan, *et al.* Genome-wide identification and transcription analysis of soybean carotenoid oxygenase genes during abiotic stress treatments [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, **40**(8): 4737 – 4745.