

桂花 *OfPSY*、*OfPDS* 和 *OfHYB* 基因启动子克隆及表达特性分析

周俊杰^{1,2}, 王艺光^{1,2}, 董彬^{1,2}, 赵宏波^{1,2}

(1. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质创新与利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】探究高温和外源脱落酸对桂花 *Osmanthus fragrans* 类胡萝卜素生物合成的 3 个相关基因, 包括八氢番茄红素合成酶基因 (*PSY*)、八氢番茄红素脱氢酶基因 (*PDS*)、 β -胡萝卜素羟化酶基因 (*HYB*) 的调控作用, 为阐释桂花类胡萝卜素代谢调控的机制提供研究基础。【方法】根据桂花基因组数据库的序列, 从桂花品种‘堰虹桂’‘Yanhong Gui’中克隆 *OfPSY*、*OfPDS*、*OfHYB* 基因的启动子序列, 并进行生物信息学分析, 再构建 PCAMBIA3301-LUC 载体在烟草 *Nicotiana benthamiana* 中瞬时表达, 结合高温 (37 °C) 和 200 mg·L⁻¹ 脱落酸处理, 分析启动子活性。【结果】获得 *OfPSY*、*OfPDS*、*OfHYB* 基因的部分启动子, 其长度分别为 1 908、1 521 及 1 830 bp。作用元件分析表明: 3 个启动子中均存在 TATA-box 和 CAAT-box 等启动子基本元件、光响应元件、脱落酸响应元件以及 MYB 和 MYC 结合位点。此外, 在 *OfPSY* 启动子中, 存在赤霉素响应元件; 在 *OfPDS* 启动子中, 存在茉莉酸甲酯响应元件、赤霉素响应元件、厌氧诱导型元件参与防御和胁迫的元件; 在 *OfHYB* 启动子中, 存在生长素、乙烯、茉莉酸甲酯等激素响应元件、低温响应元件和厌氧诱导型元件。烟草瞬时转化试验表明: 相对高温能激活 *OfPSY*、*OfPDS* 和 *OfHYB* 的启动子活性, 脱落酸能激活 *OfPDS* 和 *OfHYB* 的启动子活性。【结论】高温和脱落酸可能通过调控桂花类胡萝卜素合成基因启动子活性, 影响桂花类胡萝卜素的积累。图 4 表 5 参 28

关键词: 桂花; 类胡萝卜素; 启动子; 温度; 脱落酸

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2023)01-0064-08

Cloning and expression characterization of *OfPSY*, *OfPDS* and *OfHYB* gene promoters in *Osmanthus fragrans*

ZHOU Junjie^{1,2}, WANG Yiguang^{1,2}, DONG Bin^{1,2}, ZHAO Hongbo^{1,2}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Landscape and Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This paper aims to investigate the regulation of high temperature and abscisic acid (ABA) on promoters of three carotenoid biosynthesis genes in *Osmanthus fragrans* including *PSY*, *PDS*, *HYB*, providing the research foundation for regulation of carotenoid biosynthesis in *O. fragrans*. [Method] According to the sequences in genome database of *O. fragrans*, promoters of *OfPSY*, *OfPDS*, *OfHYB* were cloned from an *O. fragrans* cultivar ‘Yanhong Gui’, which were used for bioinformatics analysis. Then, these promoters were inserted into PCAMBIA3301-LUC vectors and used for transient expression in

收稿日期: 2022-01-10; 修回日期: 2022-07-10

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (32072615); 中国博士后科学基金第 71 批面上资助项目 (2022M712828)

作者简介: 周俊杰 (ORCID: 0000-0003-3459-6220), 从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: 747782261@qq.com。通信作者: 赵宏波 (ORCID: 0000-0003-4714-8240), 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

tobacco(*Nicotiana benthamiana*) leaves under treatments of high temperature (37 °C) and 200 mg·L⁻¹ABA. [Result] Our research cloned the promoter of *OfPSY*, *OfPDS* and *OfHYB* from genomic database of *O. fragrans* in length as 1908 bp, 1521 bp and 1830 bp respectively. All three promoters contain promoter basic elements TATA-box and CAAT-box, light response element, ABA response element as well as the binding site of MYB and MYC. Moreover, there was gibberellins (GA) response element in *OfPSYP*; *OfPDSP* contains methyl jasmonate (MeJA) and GA response element, pathogen induction element as well as element involved in defense and stress responsiveness; *OfHYBP* contains hormone response elements as auxin, ethylene and MeJA, as well as low temperature response element and pathogen induction element. The assays of in transient expression in tobacco leaves showed that relative high temperature can activate the promoter activities of *OfPSY*, *OfPDS* and *OfHYB*, and ABA can activate the promoter activities of *OfPDS* and *OfHYB*. [Conclusion] High temperature and ABA probably affect the carotenoid accumulation in *O. fragrans* by regulating the promoter activities of carotenoid biosynthesis genes. [Ch, 4 fig. 5 tab. 28 ref.]

Key words: *Osmanthus fragrans*; carotenoids; promoters; temperature; abscisic acid

类胡萝卜素是一种亲脂类异戊二烯, 是一种自然界中广泛存在的生物色素, 主要反射黄色、橙色和红色的光^[1]。在植物器官中, 类胡萝卜素在质体中的积累对吸收过量光能、清除活性氧、合成植物激素提供前体物质都起重要的作用^[2]。八氢番茄红素合成酶 (phytoene synthase, PSY) 是类胡萝卜素合成途径中的第 1 个限速酶, 它的作用是将 2 分子的香叶酰香叶酰二磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 合成无色的八氢番茄红素^[3]。随后, 八氢番茄红素经过包括八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 在内的 4 次去饱和反应和 2 次异构化反应的多顺式转化, 最终生成红色的全反式番茄红素^[4]。而 β -羟化酶 (β -carotene hydroxylase, HYB) 既可以单独作用使 β -胡萝卜素经羟化作用转化为紫黄质, 也可与 ϵ -羟化酶 (ϵ -carotene hydroxylase, HYE) 协同作用使 α -胡萝卜素经羟化作用形成叶黄素^[5]。桂花 *Osmanthus fragrans* 是重要的观赏植物, 花色和花香是其主要观赏性状。已有研究发现: 类胡萝卜素既是桂花花瓣中主要色素成分^[6], 也是桂花香气物质的前体物质^[7]。目前已在多种植物中发现, 植物器官中的类胡萝卜素含量及相关基因的表达水平受到多种因素的影响, 如温度^[8]、光照^[9]、干旱胁迫^[10]、乙烯^[11]等。前期研究^[12]发现: 在 200 mg·L⁻¹脱落酸处理下, 桂花花色明显加深, 花瓣类胡萝卜素含量上升, 类胡萝卜素合成关键基因 *OfPSY*、*OfPDS* 和 *OfHYB* 表达水平显著上调。相关基因在前人的研究中均已克隆到^[13-15], 但对其调控的作用机制仍知之甚少。基因的启动子作为上游调控因子识别并结合的部位, 是基因表达调控的重要作用位点。为进一步揭示桂花花色形成及其调控的分子机制, 本研究克隆了 *OfPSY*、*OfPDS* 和 *OfHYB* 基因的启动子, 通过作用元件分析、表达载体构建和瞬时表达分析, 初步明确其作用。

1 材料与方法

1.1 植物材料

8~10 年生丹桂品种 ‘堰虹桂’ *Osmanthus fragrans* ‘Yanhong Gui’ 栽植于浙江农林大学桂花资源圃; 烟草 *Nicotiana benthamiana* 栽培于浙江农林大学园林植物实验室。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒、Premix Taq 聚合酶、质粒载体 PMD18-T、大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 、切胶回收试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、限制性内切酶 *EcoR* I、*Nco* I、DNA 连接酶等购自 Takara 公司(大连)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 参照 DNA 提取试剂盒所用方法提取桂花 ‘堰虹桂’ 基因组 DNA。

1.3.2 引物设计与合成 根据桂花基因组数据^[16]中的 *OfPSY*、*OfPDS*、*OfHYB* 基因启动子序列, 用 Primer Premier 5.0 分别设计上下游引物。引物由有康生物公司(杭州)合成(表 1)。

1.3.3 桂花 *OfPSY*、*OfPDS*、*OfHYB* 基因启动子克隆及序列分析 以桂花 ‘堰虹桂’ 基因组 DNA 为模

板, 分别用引物 *OfPSYP*-F 和 *OfPSYP*-R、*OfPDSP*-F 和 *OfPDSP*-R、*OfHYBP*-F 和 *OfHYBP*-R 对其启动子进行扩增。将扩增产物连接至质粒载体 PMD18-T 并转化大肠埃希菌 DH5 α , 随后鉴定阳性克隆并送至有康公司 (杭州) 测序。启动子作用元件分析通过在线网站 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行。

1.3.4 桂花 *PSY*、*PDS*、*HYB* 启动子驱动 LUC 基因表达载体构建 设计包含酶切位点的引物 (表 2), 用于构建启动子表达载体。使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nco* I 分别对 PCAMBIA3301-LUC 载体和添加了酶切位点的启动子进行双酶切。用 T4 连接酶连接回收的启动子和载体片段。再经转化大肠埃希菌 DH5 α 鉴定, 得到重组的 *PSYP*::LUC、*PDSP*::LUC、*HYBP*::LUC 载体。再将重组质粒转化农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101。

表 1 启动子克隆所用引物

Table 1 Primers used for promoter cloning

引物名称	序列(5'→3')
<i>OfPDSP</i> -F	TTAAATGGACGACTCATGTAATA
<i>OfPDSP</i> -R	CTCAAATTAACAGCAGAAACAT
<i>OfPSYP</i> -F	AAGCTTCAAAATTGCTGCTCAACTCATAC
<i>OfPSYP</i> -R	TCTAGAGCTGATACTGAACTATTAACGGTC
<i>OfHYBP</i> -F	AAGCTTTGGGTCTTACCTAACATCTTGGC
<i>OfHYBP</i> -R	TCTAGAGGACGGTAGTTTCAAGGGGGTG

表 2 构建 PCAMBIA3301-LUC 载体所用引物

Table 2 Primers used to construct PCAMBIA3301-LUC vector

引物名称	序列(5'→3')
<i>OfPDSP</i> -F	GGTACCTTAAATGGACGACTCATGTAATA
<i>OfPDSP</i> -R	CCATGGCTCAAATTAACAGCAGAAACAT
<i>OfPSYP</i> -F	GGTACCAAGCTTCAAAATTGCTGCTCAACTCATAC
<i>OfPSYP</i> -R	CCATGGTCTAGAGCTGATACTGAACTATTAACGGTC
<i>OfHYBP</i> -F	GGTACCAAGCTTTGGGTCTTACCTAACATCTTGGC
<i>OfHYBP</i> -R	CCATGGTCTAGAGGACGGTAGTTTCAAGGGGGTG

1.3.5 桂花 *OfPSY*、*OfPDS*、*OfHYB* 启动子烟草中瞬时表达 将含有重组质粒的农杆菌菌液在含有利福平和卡那霉素的 LB 培养基中振荡培养至 $D(600)$ 达 0.8~1.0, 在 4 ℃ 下以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集菌体, 随后以 2 mL 含 10 mmol·L⁻¹ MES、10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 和 150 μ mol·L⁻¹ 的乙酰丁香酮的悬浮液重悬菌体 2 次。选取长势较好的烟草, 将悬浮液用 1 mL 注射器从叶片下表皮注射到烟草叶片中直至整个叶片呈现水渍状。将烟草置于暗处培养 1 d 后转移至人工气候室继续培养 1~2 d, 随后将植株分别进行 37 ℃ 处理和 200 mg·L⁻¹ 脱落酸喷施处理, 12 h 后将注射后的叶片取下, 喷洒 1 mmol·L⁻¹ 的荧光素钠盐溶液, 暗处放置 5 min 后在 CCD 冷冻发光仪下观察 LUC 荧光信号。参考 Luciferase (Promega) 荧光素酶报告系统试剂盒对酶活性进行检测, 以对照组的比值为单位 1, 得到不同处理组的相对 Luciferase 活性, 每组实验均包括 3 次技术重复和生物学重复。利用 SPSS 19.0 软件进行数据差异分析。

2 结果与分析

2.1 启动子克隆及序列分析

以桂花‘堰虹桂’基因组 DNA 为模板, 用引物 *OfPSYP*-F 和 *OfPSYP*-R、*OfPDSP*-F 和 *OfPDSP*-R、*OfHYBP*-F 和 *OfHYBP*-R 对其启动子进行扩增, 分别得到 *OfPSY* 启动子长度为 1 908 bp (图 1), *OfPDS* 启动子长度为 1 521 bp (图 2), *OfHYB* 启动子长度为 1 830 bp (图 3) 的序列。利用 Plant CARE 在线软件对启动子序列的结合位点进行分析。在 *OfPSYP* 中, 存在 TATA-box、CAAT-box 等启动子基本元件, 和光响应元件、脱落酸 (ABA) 响应元件、赤霉素响应元件等响应元件, 以及 MYB、MYC 结合位点 (表 3); 在 *OfPDSP* 中, 存在 TATA-box、CAAT-box 等启动子基本元件, 和脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、赤霉素响应元件、光响应元件、厌氧诱导型元件、防御和胁迫响应元件等响应元件, 以及 MYB、MYC 结合位点 (表 4); 在 *OfHYBP* 中, 存在 TATA-box、CAAT-box 等启动子基本元件, 和脱落酸响应元件、生长素响应元件、低温响应元件、乙烯响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、光响应元件、厌氧诱导型元件等响应元件, 以及 MYB、MYC 结合位点 (表 5)。

2.2 启动子瞬时表达分析

重组载体瞬时表达的荧光成像结果显示: 注射了含重组载体农杆菌的烟草叶片均显现出荧光 (图 4), 表明 *OfPSYP*、*OfPDSP*、*OfHYBP* 均能够驱动 LUC 报告基因的表达, 具有启动子活性。相对于 25 ℃ 处理的烟草叶片, 在 37 ℃ 处理下, 注射了 *OfPSYP*::LUC、*OfPDSP*::LUC 和 *OfHYBP*::LUC 的烟草叶片呈现

```

+ CTTTGGCCTA ATTTTATGGA AACAAATTG CTGCTCACT CATACTCG CG TGG ACGTTAT TCTTACTATC GTTGAAAAA CCCAAAAAG TGGTTAAITTT GCAAGTGGA ACATAGGTTA
                                Unnamed_1      TCT-motif                                GT1-motif
+ CTTCTCTGAA ACACGCTTAC AGTTGTGTGG TTTACATTGG TTTGAAATTT AAGAATTTTT TGGGACCATA TATTTATTGC TTTGTTTTAT GTTGAAAAA AATAAACAGG AGGAAAAAT
+ TAGGTGGTAG TTTTTCACAC ATGTACAAGT TTGGACGGTG TTAGTTGGT AATGTGAATT TAAGGTACCA AAAATAAGTG AAAA TATA AA TGAAAGAAA ATCAACTCTT TCCTTATTT
                                CAAT-box                                TATA-box
+ TTTTCAACAC AAAAAATAGT ATTACATTGT CA CAATGCCA CCCTTAGT AATTATTGG AACAAAATCA TATA TTTTTT TTTTATCCT GTGAGAAAT CAAT TTGGGC TATGCTATTT
                                CAAT-box
+ GTACACAGCG GTTGACACGC CCCTCACAAC AAAGGACTG TACATTTTT TATTGGACAT GAGCCCCAC T CATGTGAGG GGTGTGTGAG CGCCCCAGT TACACACA ACATTTCAAT
                                MYC      STRE                                CAAT-box
+ TTAGATCCCG TTTGATTCTC AATCTTTGTA GAATGAGAAT GAAAAA TATA GCTATTATGA GCTCCACACA AGAGATTGAA TGTAAAAAAT GGTGGCTGAA TGAATGAAT AACGATCATA
                                TATA-box      Unnamed_4
+ TTTTTCATTT TTTGTGAGGA AAAATGAATA CCAACGAGG GCCTTAATAT GCGCATCAA TAAATTTAAA TTTATGCA AGG TCAAGAAATA TATGCTTAC ACACAAAAA TCTTCACCTT
                                AAGAA-motif
+ ATACAGGAGT GCAATTCTAA ATTAAGAATT TACAATGTGA CATAGTTAAC TTACCTTGAA AACCAATCGAA GTTTTT ATTA AT CAAACACC ATTTTAACT TGTATTATCA AATTAAATTA
                                CAAT-box      CAAT-box      CAAT-box      BOX-4
+ ATATTTGTAA GCAGATTATG AATATTGTTA AAATACATTG GAATCTGCCG AAGATACCAA ACATTTTCACT ATGTCACTGG CAATAGTGGG ACCATTTTAT GGAAGCATAC CAAT TTAGAC
                                CAAT-box      G-box      CAAT-box
+ AGACATTATT AAACAACCCA ATTTTTTTTG GCACCTCCCT GAAATACTG AGAATGTGA ATCACT CAAT TC CAATGAGC AGATGAGAAC AAGAAA TACG TGATTATAT AAAAAAGACTG
                                CAAT-box      ABRE
+ TGAACCCAA AAGCAAATGA GTGAAAAATA TTAACCAAGGA AGGGAAAAA AAAAAAAGG AAGCAGCACT AAGAGAGTTG GTGGAGAGCT TTGAAAAATTT TCTTGAAGCT
                                MYB
+ ATCGAGCAGC GGTGTGCCAT TGTTAGTTTC TTCAGGCTTC TTTGATTGGT TGAAT CAAT GAGTAGGTAG GTTCTTTCT TCTTTCTTT ATTATTGATT ATAATTTTG TTTCATGAA
                                CAAT-box
+ TTTGGTGAT GCTATTGAA GATAGCCTTT TGAGACAGCA GAAAGTGGG TTATTATAGT GAAGTTGACT AAATTTAGAA AGTGCCCACT ATCATTTGA GTGTGATGAA CATTAGTCCA
                                P-box      TATA-box
+ GAACCTGTTT TATTTTGTCT A CAAT TCTAG AACAGTTCT TGGTTTTAG AATGGGATTG GAAGTGGTTC AAGTGTGTTT AATTGGTTA TTCATTTTG AGAAATCGCA TAAAGGTAGA
                                CAAT-box
+ GTTGCTGTTT AAGATCTCAA GACCTCTGTT TGAGTAGTAG AAGTGTGTTT GAATTTTTC TCGGATTTT TTATTATTTT CCATCAAAAG TGAAGTGGAT GGTCCAGAGT GGATAGACTT
+ GAGTGCTAAT TTTTTTAATA AAGTCAAGTA AAGAAGTTAA CAGAAAGGAG GACAAAACT TAGCATGTTT TAGACCGTTA ATAGTTCAGT ATCAGCATG T CTGTTGCTTT GTTTTGATG
                                GARE-motif

```

图 1 *OjPSY* 基因的启动子序列Figure 1 Promoter sequence of *OjPSY* gene

```

+ TCTACATTCG TTTTTTAA TGGACGACTC ATGTAATAAA ATGAAATAT AT TATA TGAA AGTCACATGC CAACA TCGTG G TAGGCCTAG AAAAACTT AAACATGTCG AGTTAGGCTT
                                TATA-box      Unnamed_1
+ GTAAGACTAA ATGATGATCT ACCAGTTTAT ATAGCAAGGA TAGTAAACA AATACA ATTA AT CATCATTT GTAGAGTAGA GATT CAATGC CAACTAACT CCCATTAAGC ATCAAGGTTG
                                BOX 4      CAAT-box
+ ATAGATAACA TTATTCCAAT CGCAAATTGA ATCAAATTA TTAACCAAA CAAGTCTGT CATATT TATA TA AGTTAATT TTTTATGTTT TAATAGTTC TACATAACA TCAATTTTAC
GA-motif      ARE      CGTCA-motif      AT-TATA-box      CAAT-box
+ TTCCTTATTA GTAAAGACAA GAAATATGAA TATTTTGCA TAAACATCAC TGCACCTTCA ATTTACTAT AAATTAACCT CTACAATAAC TT CAATTTAT GGTGATTAG ACCTAATTCA
                                CAAT-box      CAAT-box
+ CATTTTATTC CAGTTTGTTA CATCCATATT CAAAGAGTGA CT CAATTTTT GGAGGCTAAT AGAGTGGAGC GATGGATGGA TAGCATATTC TTACCTGCGG CAAACTATCG CACATGCGGC
                                CAAT-box      TCT-motif
+ CAAACCAACA CACCAATTAC AACTG CTTAA TTTTCCCTTT TTTGTTTTTG GGGAACCCCC CCCCCCCCCA CCGCACCCAA CCCTGCCAGT GCGGCAAACT ATCGCACATG CGGGCTGCGG
                                ARE      CAAT-box      MBS
+ TAACCA CGACCCCCCA CCCAACCTG CCATCTGGC TCTTAC GAGC CCCTCCCCAC GCAACCCTG CATCTGGC T CTACGATGC CACGCCCA TAACCTGGT CT TATAAAT
                                MYB      G-box      TCT-motif      TCT-motif      TATA-box
+ CCACCTATTA TCCAAGTTCT TGAAAGAAA ATACCCTGTT CATCTTTC CTTACAGTT GCTGAATTA GAGTGGGTC GAGTGCAACCCTTTGAT ATCACCAGAA T GGTGAAATTC
WRE3
+ TCTAATTTTA CAGAAATTG TTCGTTTTT AAAAAAATA AAATATTTG TGATGAGCTG GTTTGTTAG AAAAAAATA ATCTGAGTT GGGATT TATA AGAGAAATA TTAATTAGAA
TC-rich repeats      TATA-box
+ ATGAATTGAT AGTGTGTTCT GAAGGTATT GAAAGTTAC TGCCCTTTAA TTATCTGTCT ATGGGTTCTT TGATTCAAGT TACGCTCGC AATTCTGGAG TTTAT CATT ATGTTAATAT
                                MYC
+ GCATAAACAA GATAAATAT TTGGACCTTT TGAGGTAGAA TTCTGAAAGT TTTAAATTT AAGGATTCCA TGTATGTC TAAATTACG TATTACGCA AATTATTTG TTTTGGGATT
+ CTGATATGG ATACATTTTT AAACATGCG ACAAATTTAC AGTTGCAGG CTG CAAT TTTT TGAGCTTGTG GAATTCATA ACATTGTTG AAGGAAATCT TGAATTTTCG AAATGTCCA
                                CAAT-box
+ ATTTGGACAT GTTCTGCTG TTAATTTGA

```

图 2 *OjPDS* 基因的启动子序列Figure 2 Promoter sequence of *OjPDS* gene

出更强的荧光信号；在 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱落酸处理下，注射了 *OjPDS*::LUC 和 *OjHYB*::LUC 的烟草叶片呈现出更强的荧光信号。结果表明：相对高温胁迫上调了 *OjPSY*、*OjPDS* 和 *OjHYB* 的启动子活性，脱落酸上调了 *OjPDS* 和 *OjHYB* 的启动子活性。

3 讨论

植物中类胡萝卜素的成分和含量是由一系列酶促反应完成的。研究发现类胡萝卜素代谢关键基因的表达受到各种环境因素和激素的调控。在香蕉 *Musa nana* 中，高温可以上调 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素生物合成途径相关基因的转录水平^[17]；在蓝莓 *Vaccinium* spp. 中，红光和远红光对果实中类胡萝卜素合成



图 3 *OfHYB* 基因的启动子序列

Figure 3 Promoter sequence of *OfHYB* gene

表 3 *OfPSY* 启动子中的顺式作用元件

Table 3 Cis-acting elements in <i>OfPSY</i> promoters			
元件名称	数量	序列(5'→3')	功能
AAGAA-motif	1	GTAAAGAAA	
ABRE	1	ACGTG	脱落酸响应元件
Box 4	1	ATTAAT	参与光响应的部分保守 DNA 序列
CAAT-box	20	CAAT	一般元件
G-box	1	TACGTG	光响应元件
GARE-motif	1	TCTGTTG	赤霉素响应元件
GT1-motif	1	GGTTAAT	光响应元件
MYB	1	TAACCA	MYB 结合位点
MYC	1	CATGTG	MYC 结合位点
P-box	1	CCTTTTG	赤霉素响应元件
STRE	1	AGGGG	
TATA-box	14	TATA	一般元件
TCT-motif	1	TCTTAC	光响应元件的一部分
Unnamed_1	1	CGTGG	

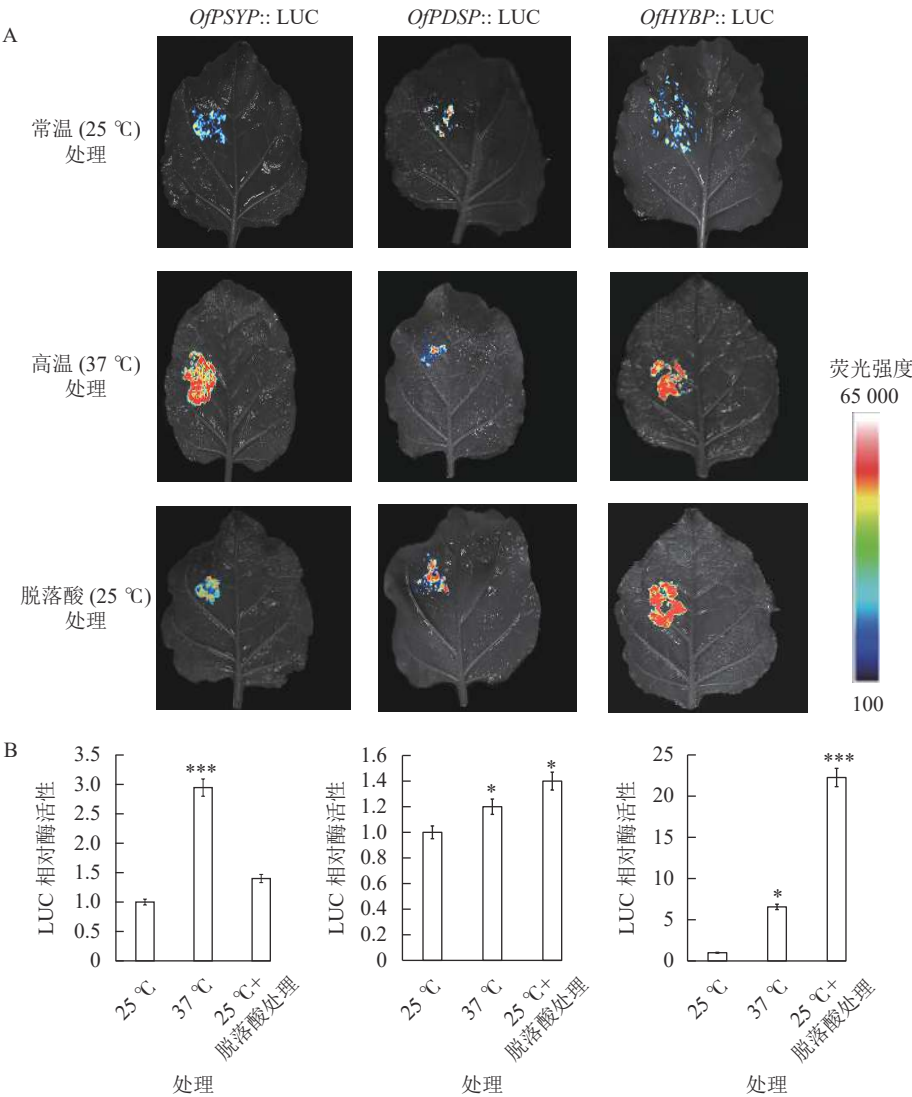
表 4 *OfPDS* 启动子中的顺式作用元件

Table 4 Cis-acting elements in <i>OfPDS</i> promoters			
元件名称	数量	序列(5'→3')	功能
ARE	3	AAACCA	厌氧诱导相关的顺式调节元件
AT~TATA-box	1	TATATA	一般元件
Box 4	1	ATTAAT	参与光响应的部分保守 DNA 序列
CAAT-box	21	CAAT	一般元件
CCGTCC motif	1	CCGTCC	
CGTCA-motif	1	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件
G-box	1	TACGTG	光响应元件
GA-motif	1	ATAGATAA	光响应元件
MBS	2	CAACTG	MYB 结合位点
MYB	1	TAACCA	MYB 结合位点
MYC	1	CATGTG	MYC 结合位点
P-box	2	CCTTTTG	赤霉素响应元件
TATA-box	9	TATA	一般元件
TC-rich repeats	1	ATTCTCTAAC	参与防御和胁迫的元件
TCT-motif	3	TCTTAC	光响应元件的一部分
Unnamed_1	1	CGTGG	
Unnamed_4	4	CTCC	
WRE3	1	CCACCT	

和降解基因的表达均起到上调作用^[18]；在大豆 *Glycine max* 中，氯化钠 (NaCl)、聚乙二醇 (PEG)、高温、低温等胁迫和 ABA 处理对类胡萝卜素降解基因起明显的上调作用^[19]。此外，转录因子对类胡萝卜素代谢关键基因的启动子存在直接调控作用。在柑橘 *Citrus reticulata* 中，*CsMADS6* 基因可以结合 *CsPSY* 和 *CsPDS* 基因的启动子^[20]，从而促进其基因的表达；在番木瓜 *Carica papaya* 中，*CpEIN3a* 既可以直接识

表 5 *OjHYB* 启动子中的顺式作用元件

Table 5 Cis-acting elements in <i>OjHYB</i> promoters							
元件名称	数量	序列(5'→3')	功能	元件名称	数量	序列(5'→3')	功能
ARE	2	AAACCA	厌氧诱导相关的顺式调节元件	GT1-motif	2	GGTTAA	光响应元件
A-box	1	CCGTCC	顺势调控元件	Gap-box	1	CAAATGAA	光响应元件的一部分
ABRE	4	ACGTG	脱落酸响应元件	LTR	1	CCGAAA	低温响应元件
AE-box	1	AGAAACTT	光响应元件的一部分	MYC	1	CATGTG	MYC结合位点
AT~TATA-box	1	TATATA	一般元件	Myb	1	TAACTG	MYB结合位点
AuxRR-core	1	GGTCCAT	生长素响应元件	TATA	1	TATAAAAT	一般元件
CAAT-box	20	CAAT	一般元件	TATA-box	6	TATA	一般元件
CCGTCC motif	1	CCGTCC		TCCC-motif	1	TCTCCCT	光响应元件的一部分
CGTCA-motif	1	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件	TCT-motif	2	TCTTAC	光响应元件的一部分
ERE	1	ATTTTAAA	乙烯响应元件	Unnamed_1	1	GAATTTAATTAA	60K蛋白质结合位点
G-box	2	TACGTG	光响应元件的一部分	Unnamed_4	9	CTCC	
G-Box	1	CACGTT	光响应元件的一部分	WRE3	1	CCACCT	
GC-motif	1	CCCCCG	参与缺氧特异性诱导的元件				



A. LUC 荧光强度; B. LUC 相对酶活性; *和***分别表示 Duncan 检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著

图 4 瞬时表达分析 *OjPSY*、*OjPDS* 和 *OjHYB* 启动子表达特性

Figure 4 Transient expression analysis of *OjPSY*, *OjPDS* and *OjHYB* promoter expression characteristics

别并结合 *CpPDS* 和 *CpCHYB* 基因的启动子,也可与 *CpNAC1/2* 基因共同促进 *CpPDS* 的表达^[21],而 *CpSBP1* 则对 *CpPDS* 基因存在负调控作用^[22];在胡萝卜 *Daucus carota* 中, *DcAREB3* 可响应盐胁迫和 ABA 处理,识别并结合 *DcPSY2* 启动子的 ABRE 作用元件,从而促进其表达^[23]。

前期通过对桂花进行 ABA 处理发现,相对于未处理的桂花,经 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理的桂花花瓣中的类胡萝卜素含量上升;对花瓣中类胡萝卜素代谢关键基因实时荧光定量表达显示:经 ABA 处理后 *OjPSY*、*OjPDS*、*OjHYB* 等基因的表达量显著上调,推测 ABA 通过调控这几个基因的表达,从而影响了桂花花色^[12]。本研究在 *OjHYB* 启动子中发现了 4 个 ABRE 作用元件,该作用元件被认为是 AREB 转录因子的结合位点^[24]。研究发现 AREB 转录因子能够识别并结合 2 个相距较近的 ABRE 作用元件^[25]。在 *OjHYB* 启动子的 4 个 ABRE 作用元件中,有 3 个元件之间相距 19 和 12 bp,表明 *OjHYB* 基因极有可能受到 ABA 调控,与此同时, *OjHYB* 启动子上发现了最多的激素响应元件,除 ABA 响应元件外,还存在生长素、茉莉酸甲酯和乙烯响应元件,表明 *OjHYB* 基因的表达可能受到多种激素的调控。本研究通过高温和外源施加 ABA,研究了几个启动子表达特性,进一步验证了相对高温对 *OjPSY* 和 *OjHYB* 基因启动子以及 ABA 对 *OjPDS* 和 *OjHYB* 启动子表达的调控作用。此外,在 3 个基因启动子中均存在数个光响应元件,在桂花中已经发现 *OjCCD1* 的表达可能受光照影响^[26-28],说明桂花花色物质的合成与降解均可能与光信号传导有关,但其具体作用机制仍有待进一步研究。本研究克隆得到的启动子经瞬时表达验证均具有启动子活性,下一步可将其构建酵母单杂载体,通过寻找上游的调控因子,明确桂花花瓣类胡萝卜素合成基因转录调控的分子机制。

4 参考文献

- [1] MCQUINN R P, GIOVANNONI J J, POGSON B J. More than meets the eye: from carotenoid biosynthesis, to new insights into apocarotenoid signaling [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, **27**: 172 – 179.
- [2] NISAR N, LI Li, LU Shan, *et al.* Carotenoid metabolism in plants [J]. *Molecular Plant*, 2015, **8**(1): 68 – 82.
- [3] HAN Y, LI L, DONG M, *et al.* cDNA cloning of the phytoene synthase (PSY) and expression analysis of PSY and carotenoid cleavage dioxygenase genes in *Osmanthus fragrans* [J]. *Biologia*, 2013, **68**(2): 258 – 263.
- [4] MCQUINN R P, WONG B, GIOVANNONI J J. AtPDS overexpression in tomato: exposing unique patterns of carotenoid self-regulation and an alternative strategy for the enhancement of fruit carotenoid content [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, **16**(2): 482 – 494.
- [5] DU Hao, WANG Nili, CUI Fei, *et al.* Characterization of a β -carotene hydroxylase gene *DSM2* conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and ABA synthesis in rice [J]. *Plant Physiology*, 2010, **154**(3): 1304 – 1318.
- [6] WANG Yiguang, ZHANG Chao, DONG Bin, *et al.* Carotenoid accumulation and its contribution to flower coloration of *Osmanthus fragrans* [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2018: 1499 [2022-01-04]. doi: 10.3389/fpls.2018.01499.
- [7] HAN Yuanji, WANG Hongyun, WANG Xiaodan, *et al.* Mechanism of floral scent production in *Osmanthus fragrans* and the production and regulation of its key floral constituents, β -ionone and linalool [J]. *Horticulture Research*, 2019, **6**(1): 432 – 443.
- [8] 侯丹, 付建新, 张超, 等. 桂花品种‘堰虹桂’‘玉玲珑’和‘杭州黄’的香气成分及释放节律[J]. *浙江农林大学学报*, 2015, **32**(2): 208 – 220.
HOU Dan, FU Jianxin, ZHANG Chao, *et al.* Flower scent composition of *Osmanthus fragrans* ‘Yanhong Gui’ ‘Yu Linglong’ and ‘Hangzhou Huang’, and their emission patterns [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2015, **32**(2): 208 – 220.
- [9] HE Yuan, MA Yafeng, DU Yu, *et al.* Differential gene expression for carotenoid biosynthesis in a green alga *Ulva prolifera* based on transcriptome analysis [J]. *BMC Genomics*, 2018, **19**(1): 916 – 930.
- [10] ZHANG Lancui, MA Gang, KATO M, *et al.* Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs in vitro [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012(2): 871 – 886.
- [11] 范敏, 金黎平, 黄三文, 等. 干旱胁迫对马铃薯类黄酮和类胡萝卜素合成关键酶基因表达的影响[J]. *园艺学报*, 2008, **35**(4): 535 – 542.

- FAN Min, JIN Liping, HUANG Sanwen, *et al.* Effects of drought stress on gene expression of key enzymes for flavonoid and carotenoid synthesis in potato [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, **35**(4): 535 – 542.
- [12] LIU Yudong, SHI Yuan, SU Deding, *et al.* SGRAS4 accelerates fruit ripening by regulating ethylene biosynthesis genes and SIMADS1 in tomato[J/OL]. *Horticulture Research*, 2021, **8**(3)[2022-01-02]. doi: 10.1038/S41438-020-00431-9.
- [13] LIU Yudong, DONG Bin, ZHANG Chao, *et al.* Effects of exogenous abscisic acid (ABA) on carotenoids and petal color in *Osmanthus fragrans* ‘Yanhonggui’ [J]. *Plants*, 2020, **9**(4): 454 – 466.
- [14] HAN Y, WANG X, CHEN W, *et al.* Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans* [J]. *Trees Genetics & Genomes*, 2014, **10**(2): 329 – 338.
- [15] BALDERMANN S, KATO M, FLEISCHMANN P, WATANABE N. Biosynthesis of α - and β -ionone, prominent scent compounds, in flowers of *Osmanthus fragrans* [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, **59**(1): 79 – 81.
- [16] YANG Xiulian, YUE Yuanzheng, LI Haiyan, *et al.* The chromosome-level quality genome provides insights into the evolution of the biosynthesis genes for aroma compounds of *Osmanthus fragrans* [J/OL]. *Horticulture Research*, 2018, **5**: 72[2021-12-23]. doi: 10.1038/s41438-018-0108-0.
- [17] FU Xiumin, CHENG Sihua, FENG Chao, *et al.* Lycopene cyclases determine high α -/ β -carotene ratio and increased carotenoids in bananas ripening at high temperatures [J]. *Food Chemistry*, 2019, **283**: 131 – 140.
- [18] KARPPINEN K, ZORATTI L, SARALA M, *et al.* Carotenoid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development under different light conditions is regulated by biosynthesis and degradation [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, **16**(1): 95 – 111.
- [19] WANG Ruikai, WANG Chun’e. Genome-wide identification and transcription analysis of soybean carotenoid oxygenase genes during abiotic stress treatments [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, **40**(8): 4737 – 4745.
- [20] LU Suwen, ZHANG Yin, ZHU Kaijie, *et al.* The citrus transcription factor *CsMADS6* modulates carotenoid metabolism by directly regulating carotenogenic genes [J]. *Plant Physiology*, 2018, **176**(4): 2657 – 2676.
- [21] FU Changchun, HAN Yanchao, KUANG Jianfei, *et al.* Papaya *CpEIN3a* and *CpNAC2* co-operatively regulate carotenoid biosynthesis-related genes *CpPDS2/4*, *CpLCY-e* and *CpCHY-b* during fruit ripening [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2017, **58**(12): 2155 – 2165.
- [22] HAN Yanchao, GAO Haiyan, CHEN Hangjun, *et al.* The involvement of papaya *CpSBP1* in modulating fruit softening and carotenoid accumulation by repressing *CpPME1/2* and *CpPDS4*[J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2019, **256**: 108582[2022-01-02]. doi:10.1016/j.scienta.2019.108582.
- [23] KEVIN S, PAULINA F, FELIPE Q I L, *et al.* Unraveling the induction of phytoene synthase 2 expression by salt stress and abscisic acid in *Daucus carota* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**(16): 4113 – 4126.
- [24] YOSHIDA T, FUJITA Y, SAYAMA H, *et al.* *AREB1*, *AREB2*, and *ABF3* are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation [J]. *The Plant Journal*, 2010, **61**(4): 672 – 685.
- [25] CHOI H I, HONG J H, HA J O, *et al.* ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(3): 1723 – 1730.
- [26] 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]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, **61**(11): 2967 – 2977.
- [27] 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.
- [28] 刘玉成, 王艺光, 张超, 等. 桂花 *OjCCD1* 基因启动子克隆与表达特性[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, **35**(4): 596 – 603.
- LIU Yucheng, WANG Yiguang, ZHANG Chao, *et al.* Cloning and transient expression assay of *OjCCD1* gene promoters from *Osmanthus fragrans* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2018, **35**(4): 596 – 603.