

柑橘 *CsTBL1* 启动子的克隆及其在转基因拟南芥中的活性分析

马岩岩¹, 陈 娇¹, 吴天利¹, 张 军¹, 钟广炎^{2,*}

(¹ 西南大学园艺园林学院/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400715; ² 农业部南亚热带果树生物学和遗传资源利用重点实验室/广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

摘 要: 以奥林达夏橙 [*Citrus sinensis* (L.) 'Olinda'] 为材料, 克隆了 *CsTBL1* 基因编码起始位点上游长度为 2361 bp 的启动子序列。生物信息学预测表明, 该启动子中含有多个与逆境应答相关的顺式作用元件。为进一步分析 *CsTBL1* 启动子的功能, 构建了该基因启动子与 *GUS* 基因融合的植物表达载体, 并用浸花法转化拟南芥, 对 T₃ 代转基因拟南芥进行 GUS 活性染色。结果显示, *CsTBL1* 启动子在 1~3 d 龄幼苗所有组织中的活性都非常强, 在 7~20 d 龄幼苗的子叶和根中的活性仍然较强, 但在下胚轴中基本检测不到活性。在 50 d 龄幼苗中, 只在叶、茎的毛状体以及还在生长的根中检测到 GUS 活性。转基因植株的 *GUS* 表达受到 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (乙烯合成前体, ACC)、脱落酸 (ABA)、甲基茉莉酸 (MeJA) 和水杨酸 (SA) 诱导。上述结果表明 *CsTBL1* 可能在植物发育和抗外界逆境胁迫中起到非常重要的作用。

关键词: 柑橘; 启动子; *GUS* 基因; *CsTBL1* 基因

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 05-0817-08

Isolation of the Citrus *CsTBL1* Gene Promoter and Its Activity in Transgenic *Arabidopsis*

MA Yan-yan¹, CHEN Jiao¹, WU Tian-li¹, ZHANG Jun¹, and ZHONG Guang-yan^{2,*}

(¹ College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400715, China; ² Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture/Institution of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A 2361 bp long promoter of the *CsTBL1* gene was isolated from sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) 'Olinda']. Sequence analysis showed that the promoter harbors multiple stress-responsive cis-elements. To gather clues of the specific functions of the promoter a promoter-reporter vector was constructed, and introduced it into *Arabidopsis* by floral dip method. Analysis of T₃ transgenic progenies with histochemical staining showed that high GUS activity in whole plants of 1- and 3-day-old seedlings. Strong GUS activity was still detected in cotyledons and roots of 7- and 20-day-old seedlings, but disappeared in hypocotyls. In 50-day-old seedlings, however, GUS activity was only detected in root tips and trichomes. *GUS* expression was induced by treatments with ethylene precursor ACC, ABA, MeJA, and

收稿日期: 2014-01-16; 修回日期: 2014-03-18

基金项目: 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (201203075-07); 重庆市科技攻关计划项目 (CSTTC, 2007AA1018)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gy_zhong@163.com)

SA, suggesting that *CsTBL1* could be involved in plant development and stress responses.

Key words: citrus; promoter; *GUS* gene; *CsTBL1* gene

启动子是调控基因表达过程中重要的转录调节因子, 分析启动子时空表达模式可以精确可靠地定位基因的表达部位, 对研究基因的时空表达模式和验证基因功能具有重要意义 (Ayoubi & van De Ven, 1996; 聂丽娜 等, 2008)。

DUF231 家族是一类植物特有但功能未知的蛋白, 这类蛋白的主要特点是包含保守的 DUF231 结构域 (Bouchabke-Coussa et al., 2008; Synthase, 2010; Gille et al., 2011)。拟南芥中包含 46 个 DUF231 家族成员, 只有 3 个成员 (*ESK1*、*AXY4/AXY4L* 和 *TBR/TBL3*) 被克隆鉴定, 其功能主要涉及植物抗逆反应以及植物发育阶段细胞壁的次生代谢 (Xin, 1998; Xin et al., 2007; Lugan et al., 2009; Bischoff et al., 2010)。鉴于 DUF231 家族基因功能的重要性, 研究其表达的调控机制具有重要意义。已报道的 DUF231 家族基因表达多具有组织特异性和时空表达模式, 如 *ESK1* 基因主要在次生壁形成的细胞、木质部和维管束纤维上表达 (Yuan et al., 2013); *TBR* 基因启动子驱动 *GUS* 报告基因在 9 d 龄拟南芥幼苗根和叶片毛状体中高表达, 在 3~4 周龄植株中却只在叶片维管束和快速生长的根尖上表达, 而 6 周后基本不表达 (Bischoff et al., 2010)。目前对 DUF231 家族基因功能的了解只局限于模式植物拟南芥, 在其它物种中还未见报道。

在本实验室前期工作中首次从木本植物奥林达夏橙中克隆到 1 个受乙烯强烈诱导的 DUF231 家族基因 *CsTBL1* (登录号: KJ094573), 该基因与拟南芥 *TBR* 有 57% 相似度, 但是其功能和表达模式尚不清楚 (张凌云, 2010)。本研究中利用甜橙基因组信息, 从奥林达夏橙中克隆到 *CsTBL1* 的启动子, 利用生物信息学手段分析了启动子的顺式作用元件, 用该启动子与 *GUS* 基因融合的植物表达载体转化拟南芥, 并研究该启动子时空表达模式及对外源植物激素的响应, 为初步了解 *CsTBL1* 在植物发育过程中的表达模式提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2012—2013 年在中国农业科学院柑桔研究所资源室进行。奥林达夏橙 [*Citrus sinensis* (L.) ‘Olinda’] 叶片采自中国农业科学院柑桔研究所资源圃。pEASY-T₁ Vector 购自北京全式金生物技术有限公司, 大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 LBA4404、表达载体 pBI121 由本实验室保存。

用于转化的哥伦比亚 (Columbia, Co1) 野生型拟南芥在 22 °C, 16 h 黑暗/8 h 光照条件下营养生长 4 周, 然后在 22 °C, 8 h 黑暗/16 h 光照条件下生殖生长至盛花期。

1.2 DNA 和 RNA 的提取与 cDNA 的合成

柑橘叶片和拟南芥植株的 DNA 小量提取参照天根公司 Plant Genomic DNA Kit 说明书操作。使用 QIAGEN 公司 DNeasy Plant Maxi Kit 提取转基因拟南芥基因组 DNA 用于 Southern 杂交, 提取过程按操作说明书进行。使用天根公司 RNAPrep pure Kit 试剂盒提取拟南芥植株总 RNA。使用 TaKaRa 公司 PrimeScriptTM RT reagent Kit 反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3 启动子序列克隆、分析和载体构建

用 *CsTBL1* cDNA 全长与甜橙基因组序列进行 Blastn 比对 (<http://www.phytozome.net/sinensis>) 获得 *CsTBL1* 上游启动子参考序列。利用参考序列设计引物 (P1/P2, 表 1), 以奥林达夏橙基因组

DNA 为模板, 经 PCR 扩增获得的产物连接到 pEASY-T₁ 载体上, 交北京华大公司测序。测序返还序列与参考序列利用 DNASTar 软件进行比对分析, 利用 PLACE 数据库 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 分析该启动子序列的调控元件 (Lescot et al., 2002)。测序正确的转化子利用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切替换 35S 启动子, 连接到含有 *GUS* 基因的 pBI121 载体上, 重组质粒 p*CsTBL1-GUS* (图 1)。经过酶切和测序 (测序用载体引物 PF/PR, 表 1) 检测正确的重组质粒利用冻融法转入农杆菌 LBA4404。

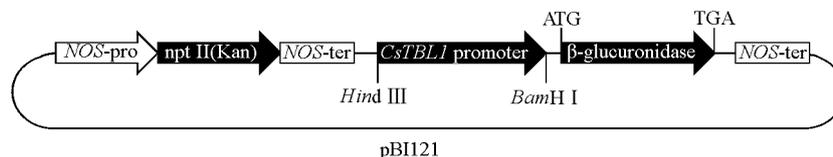


图 1 p*CsTBL1-GUS* 启动子表达载体构建

Fig. 1 Construction p*CsTBL1-GUS* of expression vectors

1.4 *CsTBL1* 基因启动子转化拟南芥

根据农杆菌介导的浸花法用重组质粒 p*CsTBL1-GUS* 转化拟南芥 (Zhang et al., 2006)。将获得的 T₁ 拟南芥种子消毒后播种在含有 50 mg · L⁻¹ Kan (卡那霉素) 的 MS 培养基中培养, 初步挑选出绿色抗性苗, 并移栽到营养土中。提取 T₁ 代抗性苗的 DNA, 用 Kan 抗性位点序列设计引物 NPT II (NPT II F/NPT II R, 产物大小是 589 bp, 表 1) 检测转基因植株。

以 NPT II 引物 PCR 扩增产物制作探针, 对 T₃ 代转基因拟南芥拷贝数进行 Southern 杂交鉴定。具体方法参照 Roche 公司生产的“DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit I”试剂盒说明书进行。

表 1 引物序列及使用

Table 1 Sequence of primers and application

用途 Used	引物名称 Name of primer	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
启动子克隆 Cloning of <i>CsTBL1</i> promoter sequence	P1	CCACATTGCCTATTGTAAAGGACTC
	P2	TTTGATTCTGGGTTAAGACACAATCAA
转基因植株鉴定 Verification of transgenic plants	NPTII-F	GACGAGGCAGCGCGGTAT
	NPTII-R	AAGAAGGCGATAGAAGGCGA
qRT-PCR	Tubulin-F	ATCACAGCAATACAGAGCCTTAACC
	Tubulin-R	GCTGTTGTTATTGCTCCTCCTGCA
qRT-PCR	GUS-F	TACCGTACCTCGCATTACCC
	GUS-R	CTGTAAGTGGCTTGCTGAG
p <i>CsTBL1-GUS</i> 重组质粒测序 Sequencing of p <i>CsTBL1-GUS</i>	PF	TCATTAGGCACCCAGGCTTTACAC
	PR	GATTTACGGGTTGGGGTTTCTACA

1.5 *GUS* 组织化学染色

参照 Ni 等 (2008) 的 *GUS* 组织化学染色法配置染液。取不同生长时间段的拟南芥组织放入 *GUS* 染液中 37 °C 过夜, 用 75% 的酒精脱色至完全, 然后在显微镜下观察拍照。

1.6 外源激素处理下转基因拟南芥 *GUS* 基因的表达分析

对生长 20 d 的 T₃ 代转基因拟南芥用 100 μmol · L⁻¹ ABA, 20 μmol · L⁻¹ ACC, 200 μmol · L⁻¹ MeJA, 20 μmol · L⁻¹ SA 处理 12 h 后, 收集样品 - 80 °C 保存。使用 qRT-PCR 分析 *GUS* 基因的表达量。 *GUS* (GUS-F/GUS-R) 引物和拟南芥内参引物 Tubulin (Tubulin-F 和 Tubulin-R) (Oñate-Sánchez et al., 2007) 见表 1。定量实时 PCR 使用 Promega GoTaq[®] qPCR Master Mix, 在 Bio-Rad CFX96[™] 荧光定量 PCR 仪 (Bio-RAD, USA) 上进行。PCR 反应体系 (20 μL) 包含 10 μL Master Mix (2×)、0.2 μL

正向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $0.2 \mu\text{L}$ 反向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、总 cDNA $1 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 2 min 后按如下参数循环 40 次: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s 、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s , 设置溶解曲线, 以检测引物是否可用。设置 3 次生物学重复和 3 个计数重复。数据分析按照公式 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目标基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$) 计算。设定未处理材料的数据 (对照) 为 1, 其他数据相对进行比较。使用 Spass19.0 软件进行数据显著性分析。

2 结果与分析

2.1 序列克隆、分析和表达载体的构建

以 *CsTBL1* cDNA 全长序列与甜橙基因组 (<http://www.phytozome.net/sinensis>) 序列进行 Blastn 比对, 获得了 *CsTBL1* 的基因上游启动子参考序列, 并据此设计了引物, 从奥林达夏橙的基因组 DNA 中克隆到该基因的启动子。测序结果表明获得的启动子长为 2361 bp (图 2), 与参考序列的相似度达到 98% 。用在线网站 PLACE 数据库 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 分析 *CsTBL1* 基因启动子序列, 结果见表 2, 可见该启动子含有与逆境和植物激素应答相关的顺式作用元件 ABRE、ASF、GARE、GT1 和 MYB 等。

```

-2361 CCACATTGCC TATTGTAAG GACTCTCGIC GTAGCTTTCC AGCATTTTCG ACCCACCACA CCAGTGCAGC CAAAGTGCTT TTGTTTTCTT GTTCTAGAAA
-2261 TTAGATAGTG CCACCGACAA CTCRAATATT AACCTGGTGT TGGCAACACA TCATATGTAT CAAAAATGCC GTCATCATTI CCGTGAICTT AAITTTCAAT
-2161 TCCTTGATTT TAAITTTAAA GGAGAGITTT TAITTGTAAG TTTTATGAAA TCGAAAATCA TCACTGCATA TATAATTATA TATAATGGCA ATCTTTGTGA
-2061 GAAAAATAAA TCAATTCAT AGCTTAATTA CGCCTTTTTT AACAAATAAA CAGTTTCATA TAGATTTATT TATAGGAATG GTAAATTTCC TCGGACTCCC
-1961 TAGGGTTIAG ACATCAATTT CGCATCGGTC ICCATAAAT TTCAAAAAGT AAAATGTTGT ACCAAAATCT CCTCTTTAAA TTAATGTGGCA AATGAGGTTA
-1861 AITTAATTAGT AAGTAGACAA TAAGATAATG TAATAAATTT TCTTGCAACT TGTAATCCA TTCACCCACT TGATTAATGA CATATTACTT GTTATATTAT
-1761 TICTGATAAA GACTTTGGGA TGTITAAGGT TAITTGCTA GGTITTAIGA CATCGGTAGC AAGTTGAGC AAAITATTGA AATTATACAA TAATGTTTTA
-1661 GOTTGATGA AGATATGCAT TCATTTTAGG AAAGAAATTA ATCAATCCCG CAAAAGAAGA TTCGATGATT AGTCAAAAAT AAGTTGAAAA TAAATGCCAA
-1561 AITCTTGTC TAAATAAACA CACAGCCAAT CGAGATTCGA GATAACGAAA ATGCAACATC TCATTTGTTG GCGGCATTTG GTAATTTTTG TGGCTGGCAG
-1461 TGACTGATT CAATCAACTG ACTCTTCACC AAATTCACGA ACAGAAACAA TTTCAITGTC GCCCCGCCCC AGTCGCATTT TCCCAACAAA AAAAAAGTGT
-1361 TGATCCATGG CCATTCAGA ACTCAACCGA AATGTTGTTG GTTGGCTGTC TCGCGTGTGT GAAAAAGTG TCTGGCAGCT GACCTAAATC AAATTAATA
-1261 CACGAAATAT ATTGGAATTA TGGRAITGCT TTGTGCCGGG CCAGCAAAAA TTTTGGTTTT CCGCATTTTT CTAATTTGA CGACATTTTT ATCGATCCAT
-1161 TGTAGCCAGC TGTTCAAAG AATGACGTGC TCAAGGCTAT CTCTTAATAA TTTCTTAATG TTAATGAGAT GTGATTTCTG AAAITTTTTAT TTAITTTTTT
-1061 TTTAATCGC GTCCCTATGG AGCTTTGAT CATTTTTAAA TTGTGAATTA TCTGATTTGC AAATCAGCACA ATAAATTTCTA TCCAGAGAAA
-961 AACGATCTG TTCACGTGTC CAATTTGCT CAAGTCATGA GGGCCATAAT TGCCATGTAA TCGAAAGTCA TGCCAAAAAT TAGCGTCATT TCAITGTAAA
-861 TAAATGATAT TAATTAATG GACRAGCATA TTCAAGAAAT TTGCAATATA ATCTGTATA TATTCAATAT TTGCACATTI CTCTCTTAC TATCTTCCAT
-761 AATTACAAGA TAAAACCTG TTAATTAAT CCCCTGCCCC ACCTCTTGT TTGCTGTGTA GAATTAATTC TCCCTCCATT AATTTCCCAT TTTCCGATAT
-661 AAACAGCTGT TTAGATGTA TAATTGCTT CCGCCGGGCA GGTATGGTAT ACATATTAAT ATGATAATGA CAAGCCAGTC CATAATGCAT GTGTAATGTT
-561 TAATTAATTT ATCAAAATAA TTAATACACA TAGGTCTCTT AATCTCCAT TAATTAATG TTTATGCATG TTCAATTTAA TCTAGAGTGC ATGATTAATA
-461 ACATGTCCC TGACATGCAG ACCAACAGAA GAATGTAAA AGAATTTTT ACAAGACTCC CATTCTCAGA CCAACATGAA ATGTAACATA GCATTTGCC
-361 CATTCTACC CAAAGATTTG AITTTTTTTT TTCCTCGTGC GACAAAATAA ATAAATACA TAAAGCCAAG AGTATATACA ATATCAAAAT TCCCCGGGG
-261 CAGAATTTGC AAACATCACA CATTGCACAA GAAGGAAGAA GAAAGAAATC ATCCAAGATA TCCCAATTC ATTGTACAGAA ATAAAAATCA GTGCTCTCT
-161 GCCTCTGTA ATATCACTCC GTGTGAACCC ACCAATTCAC CAAACCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCGCATAT ATAAGCAGAG AAAACAGGC
-61 AACTTTAAT CATTACAGG CTTTATTAGC TGTITGATTG TGCTTAACC CAGAATCCAA AATG
+1

```

图 2 *CsTBL1* 启动子序列

Fig. 2 The sequence of *CsTBL1* promoter

表 2 PLACE 预测 *CsTBL1* 启动子逆境相关的顺式作用原件

Table 2 Cis-acting regulatory elements in promoter of *CsTBL1* predicted by PLACE

调控序列 Regulatory sequence	序列 Sequence	特性 Characteristic
ABRE	ACGTG	脱落酸响应 Abscisic acid responsiveness
ASF	TGACG	生长素/水杨酸, 生物或非生物胁迫 Auxin/salicylic acid, abiotic and biotic stress
GARE	CAACTC	赤霉素响应 Gibberellins responsiveness
GT1	GRWAAW	病原和高盐诱导 Pathogen- and salt-induced gene expression
LTRE	CCGAA	低温应答 Low temperature responsiveness
MYB	WAACCA	水胁迫和干旱胁迫应答 Water stress and dehydration responsiveness
MYC	CAGCTG	逆境应答 Stress responsiveness
RAV	CAACA	病原应答 Pathogen responsiveness
WRKY	TGAC	水杨酸, 损伤和病原应答 Salicylic acid, wound and pathogen responsiveness

该启动子经双酶切从 TA 克隆中卸载, 并且经分子操作成功替换了 pBI121 载体上的 35S 启动子, 如图 3 所示, 所获得的 p*CsTBL1*-*GUS* 表达载体经过测序和双酶切, 证实构建正确。

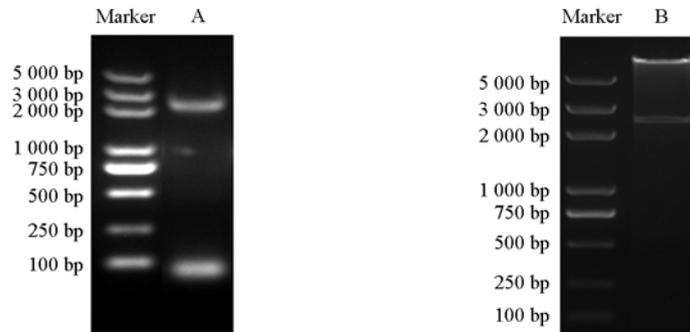


图 3 *CsTBL1* 启动子的 PCR 扩增 (A) 及重组质粒 p*CsTBL1*-*GUS* (B) 的酶切结果

Fig. 3 PCR amplification of *CsTBL1* promoter (A) and identification of the construct by digestion of p*CsTBL1*-*GUS* with *Hind* III and *Bam*H I (B)

2.2 转基因拟南芥的获得及验证

通过 Kan 抗性筛选, 共获得 8 株抗性转化植株。用 NPT II 引物检测所获得的 T₁ 代转基因植株, 发现所有抗性植株均呈转基因阳性 (图 4), 说明抗性筛选有效。有 6 个 T₂ 代转基因株系的抗性与非抗性苗比例为 3:1, 初步认为是单拷贝插入。对转基因株系后代 T₃ 进行 Southern 杂交验证 (图 5), 验证结果是 2、3、5、6、7 和 8 号株系确实为单拷贝 T-DNA 插入。

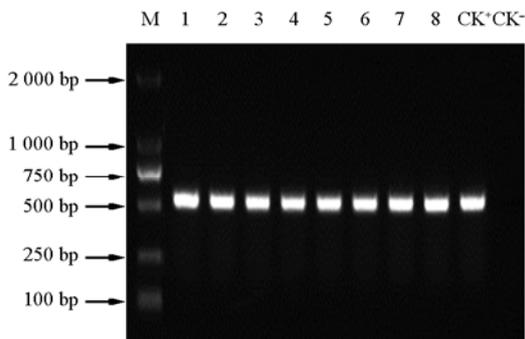


图 4 转基因拟南芥 PCR 检测

M: DNA marker; 1~8: 转基因株系; CK⁺: pBI121 质粒 (阳性对照); CK⁻: 未转基因株系 (阴性对照)。

Fig. 4 Detection for transgene by PCR in transgenic *Arabidopsis* plants

M: DNA marker; 1-8: Transgenic lines; CK⁺: pBI121 plasmid (positive control); CK⁻: Negative control.

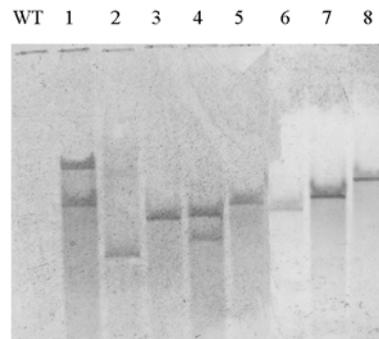


图 5 T₃ 代转基因拟南芥的 Southern 杂交分析

WT: 野生型植株; 1~8: 转基因植株。

Fig. 5 Southern blot analysis of transgenic *Arabidopsis* plants

WT: Wild-type plant; 1-8: Transgenic plants.

2.3 不同时期转 *CsTBL1* 拟南芥植株的 *GUS* 组织化学染色

选取萌发 1、3、7、20 和 50 d 的 T₃ 代单拷贝插入转基因株系进行 *GUS* 染色。结果表明, 种子刚刚萌发 1 和 3 d 时 *GUS* 表达量最高 (图 6, A、B)。萌发 7 和 20 d 的幼苗的子叶、真叶和根中 *GUS* 活性也很强 (图 6, C、D)。在幼苗生长 50 d 后, 转基因拟南芥中 *GUS* 活性下降, 只在叶片

和茎的毛状体以及生长的根中有表达(图 6, E~H)。说明 *CsTBL1* 在拟南芥中的表达存在时空差异, 主要在生长初期以及正在发育的组织中表达。

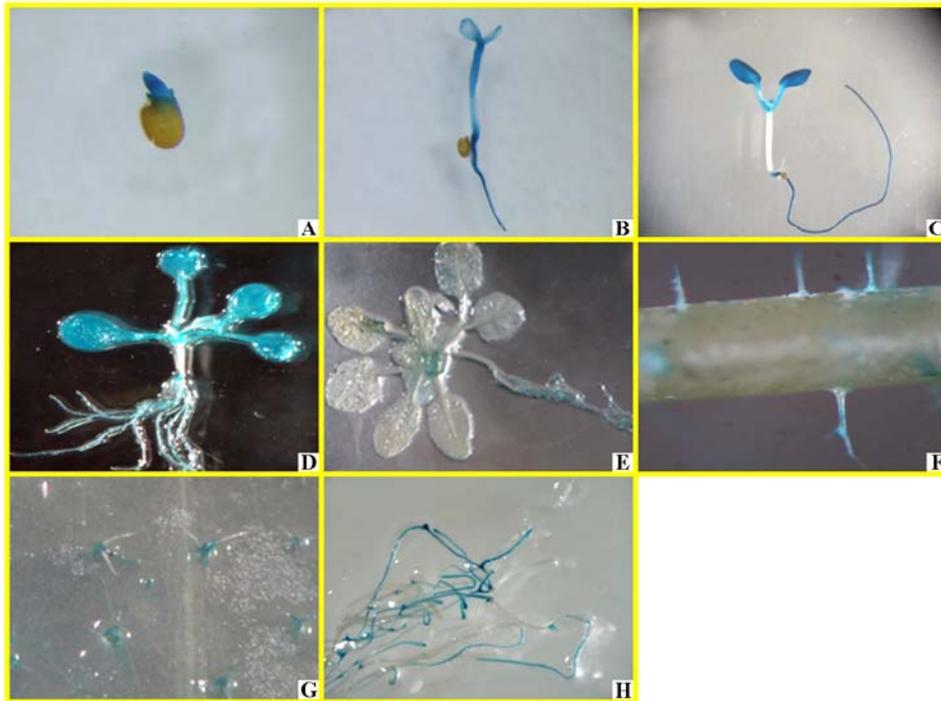


图 6 拟南芥 T_3 代转基因的 GUS 染色

A: 种子萌发 1 d; B: 萌发 3 d; C: 萌发 7 d; D: 20 d 龄幼苗; E~H: 50 d 的植株、茎、叶片和根。

Fig. 6 GUS staining of T_3 transgenic *Arabidopsis* plants

A: 1-day-old seedling; B: 3-day-old seedling; C: 7-day-old seedling; D: 20-day-old seedling;
E-H: 50-day-old seedling, stem, leaf and root.

2.4 转 *CsTBL1* 启动子拟南芥中 *GUS* 基因在 ABA、ACC、MeJA 和 SA 处理下的表达

用不同植物激素对生长 20 d 的转基因拟南芥幼苗处理 12 h, 检测其叶片中 *GUS* 的转录水平。结果(图 7)显示, 乙烯合成前体 ACC (1-氨基环丙烷-1-羧酸) 可以强烈诱导 *GUS* 的表达, 这与之前期芯片数据显示的 *CsTBL1* 基因受乙烯强烈诱导的结果(张凌云, 2010)相一致。外源 ABA(脱落酸), MeJA(甲基茉莉酸)和 SA(水杨酸)也均可诱导 *GUS* 基因的表达。

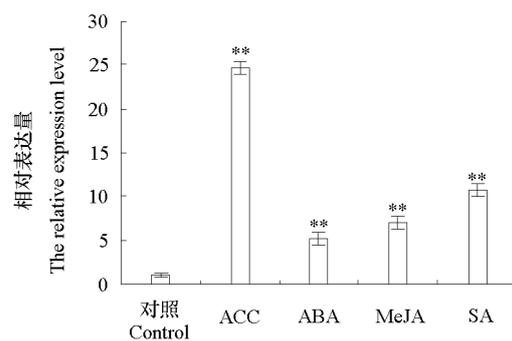


图 7 转基因拟南芥叶片中 *GUS* 基因在 ABA、ACC、MeJA 和 SA 处理 12 h 的表达

Fig. 7 The expression of *GUS* in rosette leaves of transgenic *Arabidopsis* plants under treatments with ABA, ACC, MeJA and SA

** $P < 0.01$.

3 讨论

现已报道的启动子主要分为 3 大类: 组成型、诱导型和组织特异型(Carninci et al., 2006; Li et al., 2006)。组织特异型启动子是启动子

中一种重要的类型, 其结构类型比较复杂, 这类启动子控制目的基因在特定组织和器官表达, 所被调控基因往往表现出与特定的代谢活动或发育时期相关的特点(宋扬等, 2007; 梅丽, 2008; 颜彦, 2013)。本研究显示, *CsTBL1* 启动子驱动 *GUS* 报告基因在 1~3 d 龄的整株幼苗与 7~20 d 龄幼苗的叶片和根中强烈表达, 随着植株的发育 *GUS* 活性降低, 50 d 龄幼苗中只在叶片和茎的毛状体以及根尖中检测到 *GUS* 活性。这与其拟南芥同源基因 *TBR* 启动子的表达模式相似, 报告基因在幼苗的叶片和茎的毛状体中大量表达, 而成年植株中只在快速生长部位表达(Bischoff et al., 2010)。这说明 *CsTBL1* 表达具有时空和组织特异性, 与植物早期发育密切相关。

组织特异性启动子不仅具有一般启动子的结构, 在其上游区域还含有控制特异组织表达的调控位点(Guilfoyle, 1997; 梅丽, 2008)。根据已报道的启动子分析, 组织特异性启动子的顺式作用元件多成保守性, 如 GTGA 和 TGTGG 序列是花特异性表达元件(郭盈盈等, 2013), B-box 元件在种子特异启动子中高度保守(Ezcurra et al., 1999)。*CsTBL1* 基因启动子顺式元件分析, 它含有多拷贝与毛状体特异表达相关的顺式作用元件 MYB(Wang et al., 2002; Ni et al., 2008; Shangguan et al., 2008)。在柑橘的幼叶、幼梢、幼果甚至成熟果实上也有纤毛, 纤毛的发育是否也有 *CsTBL1* 的参与尚需进一步的研究。

CsTBL1 启动子生物信息学分析显示其含有诸多逆境应答作用相关元件, 如 ASF、ABRE、GT1MYC 和 GARE 等, 推测该启动子可能响应多个调控因子。茉莉酸/乙烯途径和水杨酸依赖途径是植物两大重要的防卫应答信号途径(Pieterse et al., 2001; Horváth et al., 2007; Loake & Grant, 2007)。而本试验中外源 ACC、MeJA 和 SA 的处理均可显著提升 *GUS* 的表达量, 证实了上述推论的正确性, 同时也说明了 *CsTBL1* 可能受这两种防卫信号途径交叉调节。值得注意的是, 前期研究及本试验均证明 *CsTBL1* 受乙烯强烈诱导, 是乙烯信号途径中的下游基因, 但是 *CsTBL1* 启动子生物信息预测却没有发现乙烯相关的调控元件, 此结果暗示了 *CsTBL1* 启动子中存在受乙烯调控的未知元件, 有待于进一步挖掘。

References

- Ayoubi T A, van De Ven W J. 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. *The FASEB Journal*, 10 (4): 453 - 460.
- Bischoff V, Nita S, Neumetzler L, Schindelasch D, Urbain A, Eshed R, Scheible W R. 2010. TRICHOME BIREFRINGENCE and its homolog AT5G01360 encode plant-specific DUF231 proteins required for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 153 (2): 590 - 602.
- Bouchabke-Coussa O, Quashie M L, Seoane-Redondo J, Fortabat M N, Gery C, Yu A, Durand-Tardif M. 2008. *ESKIMO1* is a key gene involved in water economy as well as cold acclimation and salt tolerance. *BMC Plant Biology*, 8 (1): 125.
- Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Hayashizaki Y. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*, 38 (6): 626 - 635.
- Ezcurra I, Ellerström M, Wycliffe P, Stålberg K, Rask L. 1999. Interaction between composite elements in the napA promoter: Both the B-box, ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Molecular Biology*, 40 (4): 699 - 709.
- Gille S, de Souza A, Xiong G, Benz M, Cheng K, Schultink A, Pauly M. 2011. O-acetylation of *Arabidopsis* hemicellulose xyloglucan requires AX4 or AX4L, proteins with a TBL and DUF231 domain. *The Plant Cell Online*, 23 (11): 4041 - 4053.
- Guilfoyle T J. 1997. The structure of plant gene promoters. *Genetic engineering*. US: Springer: 15 - 47.
- Guo Ying-ying, Xie Jian-ming, Jian Yuan-cai, Yu Ji-hua, Kang Jun-gen. 2013. Cloning and functional analysis of OguCMS-related gene *BoMF1* promoter in *Brassica oleracea*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (5): 887 - 895. (in Chinese)
- 郭盈盈, 颀建明, 简元才, 郁继华, 康俊根. 2013. 甘蓝 *Ogura* 细胞质雄性不育相关基因 *BoMF1* 启动子的克隆及功能分析. *园艺学报*, 40 (5): 887 - 895.
- Horváth E, Szalai G, Janda T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26 (3): 290 - 300.

- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rombauts S. 2002. Plant CARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30 (1): 325 - 327.
- Li Y, Lee K K, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Bevan M W. 2006. Establishing glucose-and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine. *Genome Research*, 16 (3): 414 - 427.
- Loake G, Grant M. 2007. Salicylic acid in plant defence: The players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (5): 466 - 472.
- Lugan R, Niogret M F, Kervazo L, Larher F R, Kopka J, Bouchereau A. 2009. Metabolome and water status phenotyping of *Arabidopsis* under abiotic stress cues reveals new insight into *ESK1* function. *Plant, Cell & Environment*, 32 (2): 95 - 108.
- Mei Li. 2008. Isolation and characterization of promoters of flowering-related genes in precocious trifoliolate mutant (*Poncirus trifoliolate* L. Raf.) [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 梅 丽. 2008. 早实枳成花相关基因启动子的分离与功能鉴定[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Ni S, Meng L, Zhao J, Wang X, Chen J. 2008. Isolation and characterization of the trichome-specific *AtTSG1* promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 26 (4): 263 - 276.
- Nie Li-na, Xia Lan-qin, Xu Zhao-shi, Gao Dong-yao, Li Lin, Yu Zhuo, Chen Ming, Li Lian-cheng, Ma You-zhi. 2008. Progress on cloning and functional study of plant gene promoters. *Journal of Plant Genetic Resources*, 9 (3): 385 - 391. (in Chinese)
- 聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 高东尧, 李 琳, 于 卓, 陈 明, 李连城, 马有志. 2008. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展. *植物遗传资源学报*, 9 (3): 385 - 391.
- Oñate-Sánchez L, Anderson J P, Young J, Singh K B. 2007. *AtERF14*, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiology*, 143 (1): 400 - 409.
- Pieterse C M, Ton J, van Loon L C. 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: Boost or burden. *Ag Biotech Net*, 3 (1): 8.
- Shangguan X X, Xu B, Yu Z X, Wang L J, Chen X Y. 2008. Promoter of a cotton fibre *MYB* gene functional in trichomes of *Arabidopsis* and glandular trichomes of tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 59 (13): 3533 - 3542.
- Song Yang, Zhou Jun-hui, Zhang Yong-qiang. 2007. Research on plant tissue-specific promoters. *Biotechnology Bulletin*, (6): 21 - 24. (in Chinese)
- 宋 扬, 周军会, 张永强. 2007. 植物组织特异性启动子研究. *生物技术通报*, (6): 21 - 24.
- Synthase C. 2010. Involvement of TBL/DUF231 proteins into cell wall biology. *Plant Signaling & Behavior*, 5 (8): 1057 - 1059.
- Wang E, Gan S, Wagner G J. 2002. Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental Botany*, 53 (376): 1891 - 1897.
- Xin Z. 1998. *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (13): 7799 - 7804.
- Xin Z, Mandaokar A, Chen J, Last R L, Browse J. 2007. *Arabidopsis ESK1* encodes a novel regulator of freezing tolerance. *The Plant Journal*, 49 (5): 786 - 799.
- Yan Yan. 2013. Isolation and functional analysis of tissue specific expression promoters in rice [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 颜 彦. 2013. 水稻组织特异表达启动子的克隆及功能分析[硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Yuan Y, Teng Q, Zhong R, Ye Z H. 2013. The *Arabidopsis* DUF231 domain-containing protein ESK1 mediates 2-O- and 3-O-acetylation of xylosyl residues in xylan. *Plant and Cell Physiology*, 54 (7): 1186 - 1199.
- Zhang Ling-yun. 2010. Transcriptome profiling of genes involved in ethylene-induced fruit abscission, cloning and characterization of ethylene-regulated genes in *Citrus sinensis* [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 张凌云. 2010. 乙烯诱导柑橘果实脱落的转录基因组学及乙烯诱导基因的克隆和鉴定[博士学位论文]. 重庆: 西南大学.
- Zhang X, Henriques R, Lin S S, Niu Q W, Chua N H. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1 (2): 641 - 646.