



荔枝古树胚性愈伤组织 *LcCu/Zn-SOD3* 基因启动子的克隆及功能验证

练从龙,卢秉国,赖钟雄*,冯新,林玉玲,陈裕坤,张梓浩

(福建农林大学 园艺植物生物工程研究所,福州 350002)

摘要:以荔枝古树“宋荔”胚性愈伤组织为材料,采用接头染色体步移法,分离获得 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子片段长度为 1 426 bp,命名为 *ProLcCSD3*(GenBank 登录号:KF672186.1)。生物信息学分析表明,该启动子含有多个逆境应答元件、激素应答元件、胚乳特异表达元件,且可能受 WRKY 和 MYB 等转录因子调控。通过双酶切方法,以 *ProLcCSD3* 替换载体 pCAMBIA1301 上的 *CaMV35S* 启动子,构建了重组质粒 p1301-proLcCSD3-GUS,并成功转化农杆菌 EHA105 和 GV3101。注射烟草的瞬时表达分析表明,该启动子片段可以驱动下游报告基因表达。转化拟南芥分析表明,该启动子驱动的下游 GUS 可以在拟南芥的根、茎、叶中表达,且可响应 NaCl、PEG-6000、ABA、MeJA 和损伤等非生物胁迫。研究表明,荔枝古树 *LcCu/Zn-SOD3* 可能参与多种非生物胁迫应答和激素信号转导途径。

关键词:荔枝古树;胚性愈伤组织;*Cu/Zn-SOD3*;启动子;功能验证

中图分类号:Q785;Q786 文献标志码:A

Cloning and Functional Analysis of *LcCu/Zn-SOD3* Promoter from Embryogenic Callus of the Ancient Litchi Tree

LIAN Conglong, LU Bingguo, LAI Zhongxiong*, FENG Xin,

LIN Yuling, CHEN Yukun, ZHANG Zihao

(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this experiment, the 1 426 bp promoter fragment of *LcCu/Zn-SOD3* from embryogenic callus of the ancient litchi tree ‘Songli’ which named *ProLcCSD3*(GenBank: KF672186.1) was cloned by means of adapter chromosome walking method. The bioinformatics analysis showed that *ProLcCSD3* contains a number of environmental stress response elements, hormone response elements, endosperm expression elements and also might be regulation by MYB and WRKY transcription factors. A novel plant expression vector p1301-proLcCSD3-GUS was constructed with *ProLcCSD3* replace 35S promoter in the pCAMBIA1301 vector by using the double-digested method and then transferred into *Agrobacterium* strain EHA105 and GV3101. Furthermore, transformation analysis showed that *ProLcCSD3* has promoter activity by the infection of tobacco leaves and could drive the downstream reporter GUS gene expression in the roots, stems and leaves by *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis*. And stress treatments showed that *ProLcCSD3* could response to some abiotic stresses, such as NaCl, PEG-6000, ABA, MeJA and wounding. Our results demonstrated that *LcCu/Zn-SOD3* might response to abiotic stresses and participate in the signal transduction pathways of hormones in the ancient litchi tree.

Key words: the ancient litchi tree; embryogenic callus; *Cu/Zn-SOD3*; promoter; functional analysis

收稿日期:2014-08-07;修改稿收到日期:2014-11-09

基金项目:福建省农业科技平台(2008N2001);国家科技支撑计划项目(2007BAD07B01)

作者简介:练从龙(1988—),男,硕士,主要从事花卉与景观园艺生物技术研究。E-mail:770379183@qq.com

*通信作者:赖钟雄,博士,研究员,博士生导师,主要从事园艺植物生物技术与遗传资源。E-mail:laizx01@163.com

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 属无患子科 (Sapindaceae) 荔枝属 (*Litchi*), 是热带亚热带地区风光的代表性树种, 也是重要的经济树种。古树被誉为“活化石”, 具有较高的观赏、经济、文化价值, 同时也是一座优良种源基因库^[1]。‘宋荔’作为荔枝古树的代表性品种, 位于福州西禅寺, 历经千年, 可能是国内最高龄的古荔之一^[2]。‘宋荔’凭借顽强的生命力经历 4 次枯荣到目前仍长势良好, 且每年仍可结出沉甸甸的果实, 其强大的生命力可算是生命的奇迹^[3]。体现了其自身强大的环境适应能力, 也代表着荔枝整个生命的长期演化过程。超氧化物歧化酶(SOD)抗性基因作为抗氧化系统的第一道防线, 具有防御氧毒性、清除体内氧自由基等作用, 在植物抗氧化、抗逆等方面起着关键的作用^[4], 可能在维持“宋荔”整个生长过程中活性氧的代谢平衡, 防止其衰老而历经千年中起重要作用。

启动子作为基因表达的重要调控元件, 是转录的调控中心, 指导着 RNA 聚合酶与 DNA 模板的正确结合, 并通过活化 RNA 聚合酶, 募集相应的转录因子形成特异性的转录起始复合体, 进而决定转录的方向和效率^[5]; 同时, 启动子作为精确调控基因表达的“开关”, 直接控制着下游基因的表达, 其含有的顺式元件也直接反映了该基因的生物学功能。因此, 通过对 SOD 基因启动子进行研究, 分析其调控元件, 可为 SOD 基因的研究奠定一定的基础。许珊珊^[6]对‘宋荔’SOD 基因的克隆与表达进行了较为全面的研究。因此, 本试验在此基础上, 采用接头染色体步移法分离获得荔枝古树 SOD 基因家族 *LcCu/Zn-SOD3* 基因的启动子, 并通过转化烟草和拟南芥对其功能进行初步验证分析, 为进一步深入研究 SOD 在荔枝古树中的时空表达特性、生物学功能以及抗逆转基因研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

‘宋荔’胚性愈伤组织, 采自福州西禅寺‘宋荔’

的花药诱导而成, 由福建农林大学园艺植物生物工程研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 荔枝基因组 DNA 的提取及检测 采用改良 CTAB 法^[7] 提取‘宋荔’基因组 DNA, 并经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测。

1.2.2 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子的克隆及测序

利用接头染色体步移法对荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子进行克隆。参照 Genome Walking™ Universal kit(Clonetech)试剂盒说明进行操作, 步骤如下:首先, 对检验合格的荔枝基因组 DNA 分别进行 *Dra* I、*Eco* RV、*Pvu* II 和 *Stu* I 4 种平末端限制酶切并纯化;然后, 将荔枝基因组 DNA 的 4 种酶切产物分别与试剂盒中的 Genome Walker™ Adapters 连接构建 4 种 Genome Walker 文库;最后, 以构建好的 4 种文库为模板, 在 *LcCu/Zn-SOD3* 基因组序列(KF672186)靠近 5 端处设计的两条反向互补引物分别与接头引物 AP1、AP2 引物配对, 进行两轮的巢式 PCR。PCR 体系及 two-step cycle 程序详见 Genome Walking™ Universal kit(Clonetech)说明书。其中所用引物有 AP1、AP2、LcCSD3-GSP1 和 LcCSD3-GSP2(表 1)。

1.2.3 目的片段的回收、TA 克隆与测序 将 PCR 扩增产物进行琼脂糖(1.0%)电泳检测, 割胶回收目的片段。将目的片段克隆至 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5a 并进行培养。最后, PCR 菌检后挑取阳性克隆, 送华大基因公司测序。

1.2.4 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子的序列分析

首先, 利用 Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 在线软件分析该启动子可能的核心启动子区域及转录起始位点;其次, 使用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 并结合 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html>) 在线软件分析该启动子序列潜在的顺式作用元件。

表 1 启动子克隆及载体构建引物

Table 1 Primers for promoter cloning and vector construction

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	产物大小 Product size/bp	退火温度 Tm/°C
AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	1 678	67
<i>LcCSD3-GSP1</i>	5'-TCACCAAGGGCGTGAATATGGAAG-3'		
AP2	5'-ACTATAGGGCACGCGTG-3'	1 491	67
<i>LcCSD3-GSP2</i>	5'-GCTTTCACTGTGCTCTTCCACTCTC-3'		
pro <i>LcCSD3-F</i>	5'-ATGGAT <u>CCCC</u> TAATGAGCTGTTAGCTGG-3'	1 409	59
pro <i>LcCSD3-R</i>	5'-TACCAT <u>GGCAA</u> ATGTTCTCGTCGAGGCTG-3'		

1.2.5 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子瞬时表达载体的构建 首先,克隆带酶切位点的目的片段 *Bam*H I -*proLcCSD3*-*Neo* I。在启动子上游引物引入 *Bam*H I (5'-GGATCC-3')酶切位点,下游引入 *Nco* I (5'-CCATGG-3')酶切位点,所设计引物见表 1 的 *proLcCSD3*-F 和 *proLcCSD3*-R。以含有该启动子序列的质粒为模板,利用高保真酶 KOD-Plus-*Neo*(Code:KOD041)进行 PCR,获得目的片段后割胶回收,测序正确后,将该回收产物命名为 *Bam*H I -*proLcCSD3*-*Nco* I。

其次,构建 p1301-*proLcCSD3*-GUS 重组质粒。利用 Thermo 公司的 FastDigest *Bam*H I 和 Fast-Digest *Nco* I 双酶切 pCAMBIA1301 和回收产物 *Bam*H I -*proLcCSD3*-*Nco* I,并分别回收 pCAMBIA1301 的大片段和 *Bam*H I -*proLcCSD3*-*Nco* I 酶切的目的片段。将回收的两条片段进行连接,并转化大肠杆菌,菌液鉴定,提取该重组质粒,并进行双酶切和特异引物 PCR 的双重鉴定,将构建成功质粒命名为 p1301-*proLcCSD3*-GUS。

最后,将重组质粒 p1301-*proLcCSD3*-GUS 转化农杆菌 EHA105 和 GV3101。取 5 μ L 重组质粒于 100 μ L 的农杆菌中,充分混匀,通过冻融法转化农杆菌^[8],并进行菌检。

1.2.6 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子转化烟草的瞬时表达鉴定 以不携带任何载体的空菌株 EHA105 为阴性对照、*CaMV35S* 启动子驱动 GUS 基因的 pCAMBIA1301 的 EHA105 菌株为阳性对照,和携带目的质粒的阳性 EHA105 分别通过注射法注入烟草叶片^[9],3 d 后用打孔器取下烟草叶片的注射部位进行 GUS 组织化学染色^[10]鉴定。

1.2.7 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子转化拟南芥的功能鉴定 以 Columbia 野生型拟南芥植株为阴性对照,以 *CaMV35S* 启动子驱动 GUS 基因的 pCAMBIA1301 的 GV3101 菌株为阳性对照和携带目的质粒的阳性 GV3101 分别通过花絮浸染法转化拟南芥^[11]。即将待转化的农杆菌 GV3101 单菌落于含 str+kan 各 100 mg/L 的 50 mL YEB 中,28 °C、250 r/min 振荡培养;离心,收集菌体,重悬于 5% 蔗糖悬浮液中,悬浮液浓度调至 OD₆₀₀ 为 0.8 左右;选取花蕾期的拟南芥,将花蕾浸泡到重悬液中数秒;培养室下黑暗保湿培养 1 d,之后正常光照生长,直至开花收种。

1.2.8 T₁ 代转基因拟南芥筛选 将存放在 4 °C 冰箱的 T₀ 代拟南芥种子先采用 75% 的乙醇处理 1

min,后用 10% 的 NaClO 处理 10 min,期间不断振荡,最后用无菌水漂洗种子数次进行消毒。将消毒后的种子平铺在含有潮霉素的 MS 固体培养基上,4 °C 春化 2 d 后移至培养箱中正常光照萌发。待长出 2 片真叶后,将植株移至营养土中正常光照生长。

1.2.9 转基因拟南芥 GUS 组织化学染色分析和 DNA 水平检测 选取部分经潮霉素筛选的转化植株,于 GUS 染色液中过夜染色后,加入 75% 乙醇 70 °C 水浴脱色至无色后,观察拍照^[10]。之后,每种转基因株系分别随机选取经 GUS 染色验证成功的 8 株植株,进行 DNA 水平的鉴定,即提取植物总 DNA,采用相应启动子的载体构建引物进行目的片段的 PCR 验证。

1.2.10 转基因拟南芥不同株系胁迫处理 选取经 GUS 染色和 DNA 水平鉴定转化成功的转 Pro-*LcCSD3* 拟南芥株系,待其莲座叶片完全展开而还未抽薹时,分别进行 200 mmol/L NaCl、15% PEG-6000 模拟干旱、100 μ mol/L ABA、50 μ mol/L MeJA 和针刺叶片的损伤处理,分别在处理后的 0、6 和 24 h 取样,同一单株的取样根据拟南芥生长特点取大小、长势相同的靠基部相对较大的叶片。其中 NaCl 和模拟干旱处理采用浇灌法,即在营养钵上分别注入等体积配置好的溶液;ABA 和 MeJA 处理采用叶片喷施,即在处理的叶面上均匀的喷洒配置好的液体,并以水喷洒处理为对照,覆盖保鲜膜;损伤处理采用针刺造成叶片上等量的多个小孔伤害。最后,将采取的样本进行 GUS 荧光定量活性分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子的克隆

启动子克隆结果表明,从限制性内切酶 *Eco*RV 和 *Stu* I 酶切的文库中,分别获得长度约 1 100 bp 和 1 500 bp 的扩增条带(图 1)。测序所得实际长度分别为 1 062 bp 和 1 491 bp, DNAMEN 软件比对分析表明其为同一条序列。取 1 491 bp 长片段,经拼接和 NCBI Blast 比对显示所得序列即为 *LcCu/Zn-SOD3* 的启动子序列,命名为 *ProLcCSD3*(GenBank 登入号: KF672186)。因此,获得 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子长度为 1 426 bp。

2.2 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 基因启动子的序列结构分析

Neural Network Promoter Prediction 预测表明,该启动子可能存在的核心启动子区域有 3 处,分值分别为 0.88、0.85 和 0.80,分别位于第 -782~

—733 bp、—418—369 bp 和—93—44 bp 之间(将起始密码子 ATG 中的 A 定义为位+1),而可能的转录起始位点为 T 和 A。PlantCARE 顺式元件分析表明(图 2),该序列存在大量的调控元件,其中核心元件 TATA-Box 和 CAAT-Box 最为丰富,此外,还存在多个光响应元件 Box 4、Box I、I-box、Sp1 和 3-AF1 binding site;激素应答元件 CE3、GARE-motif 和 TCA-element;胚乳表达响应元件 Skn-1 motif 和 GCN4_motif;环境胁迫中的厌氧诱导响应元件 ARE 和 GC-motif、热压响应元件 HSE、防御与胁迫响应元件 TC-rich repeat、干旱诱导响应元件 MBS 和昼夜节律元件 circadian;以及一些功能未知的相关元件。其中 MBS 元件为干旱诱导下的 MYB 结合位点。此外,PLACE 软件分析表明该启

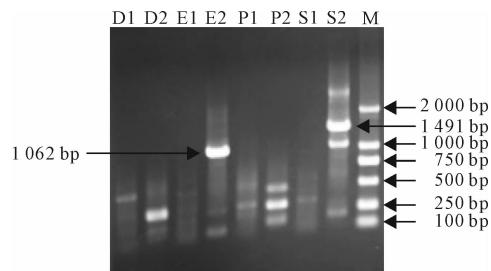


图 1 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 基因启动子扩增的琼脂糖电泳检测

D1、D2、E1、E2、P1、P2 和 S1、S2 分别是 *Dra* I、*Eco*RV、*Pvu* II 和 *Stu* I 4 种酶切后为模板的第一、第二轮扩增产物；M. D2000 DNA ladder

Fig. 1 Agarose gel of PCR amplifications of *LcCu/Zn-SOD3* promoter in the ancient litchi tree
 D1, D2, E1, E2, P1, P2 and S1, S2 were the first and second round products of four different template which digested by *Dra* I ,*Eco*RV, *Pvu* II and *Stu* I , respectively; M, D2000 DNA ladder

D1,D2,E1,E2,P1,P2 and S1,S2 were the first and second round products of four different template which digested by *Dra* I ,*EcoRV* ,*Pvu* II and *Stu* I , respectively; M. D2000 DNA ladder

动子还存在 WBOX 和 WRKY71OS 元件。

2.3 荔枝 *LcCu/Zn-SOD3* 基因启动子载体构建

重组质粒双酶切和目的序列的 PCR 双重鉴定分析(图 3)表明,所切下的小片段及特异引物 PCR 所得条带与目的地启动子长度一致,说明 p1301-pro-LcCSD3-GUS 重组质粒构建成功。重组质粒 p1301-proLcCSD3-GUS 转化农杆菌 EHA105 和 GV3101

图 2 PlantCARE 预测 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子顺式元件分析

波浪线为载体构建引物；下划线为顺式元件，箭头方向为正负链；**ATG**为翻译起始位点；阴影部分为可能的核心转录区域；突出加粗字体为可能的转录起始位点。

Fig. 2 *Cis*-elements analysis of *LcCu/Zn-SOD3* promoter by PlantCARE

Wave lines were primers of vector construction; Arrow lines were *cis*-elements and which direction represents sense and antisense strand; [ATG] was the translation initiation site; Shadowed area was the core promoter region; Stand out bold characters were possible transcription start site

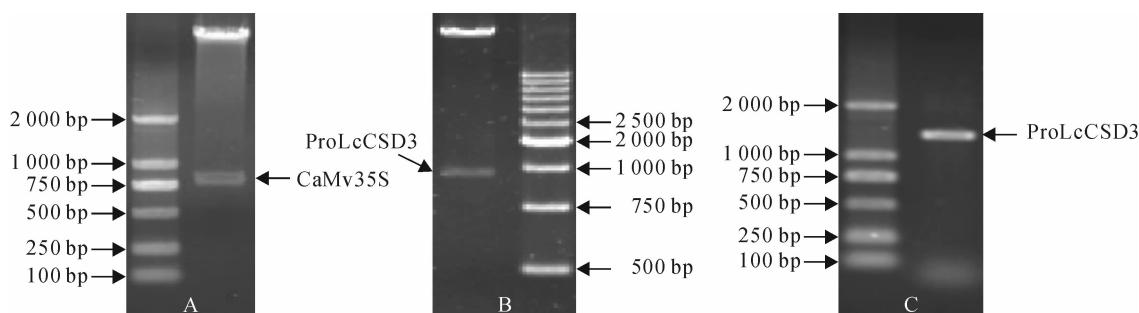


图 3 p1301-proLcCSD3-GUS 载体构建凝胶成像图

A. pCAMBIA1301 双酶切条带；B. p1301-proLcCSD3-GUS 酶切验证条带；C. p1301-proLcCSD3-GUS PCR 验证

Fig. 3 Agarose gel of the construction of p1301-proLcCSD3-GUS vector

A, Double-digested lines of pCAMBIA1301; B, Double-digested lines of p1301-proLcCSD3-GUS;

C. The PCR verification of p1301-proLcCSD3-GUS

的 PCR 检测均得到与该启动子大小一致的条带,说明 p1301-proLcCSD3-GUS 重组质粒已分别成功地转化农杆菌 EHA105 和 GV3101,可用于后续试验。

2.4 荔枝 LcCu/Zn-SOD3 启动子转化烟草的功能鉴定

GUS 组织化学染色如图 4 所示,阴性对照的叶片未能染色,而注射目的启动子 ProLcCSD3 和阳性对照的 CaMv35S 驱动 GUS 的叶片均染成蓝色,但 ProLcCSD3 驱动下的染色程度不及 CaMv35S 启动子。该结果表明 ProLcCSD3 启动子具有驱动下游 GUS 基因表达能力,即具有启动子活性,但其活性不及 CaMv35S 启动子。

2.5 荔枝 LcCu/Zn-SOD3 启动子转化拟南芥 T₁ 代筛选及鉴定

潮霉素筛选结果表明:转化成功的拟南芥小苗根系生长良好且植株长势相对较强。拟南芥小苗 GUS 组织化学染色分析(图 5)显示,ProLcCSD3 驱动的 GUS 在转基因拟南芥的根、茎和叶中均有表达。进一步 DNA 水平上的 PCR 鉴定结果(图 6)表明,随机选取的 8 株转基因拟南芥株系均为阳性植株。

2.6 荔枝 LcCu/Zn-SOD3 启动子响应非生物胁迫分析

转基因拟南芥植株在不同非生物胁迫处理下的

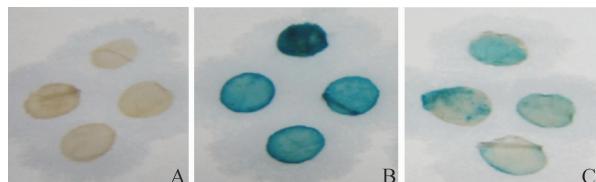


图 4 组织化学染色法检测 GUS 酶活性

A. 阴性对照;B. 阳性对照;C. p1301-proLcCSD3-GUS;下同

Fig. 4 GUS activity detected by histochemical staining

A. Negative control; B. Positive control; C. p1301-proLcCSD3-GUS; The same as below

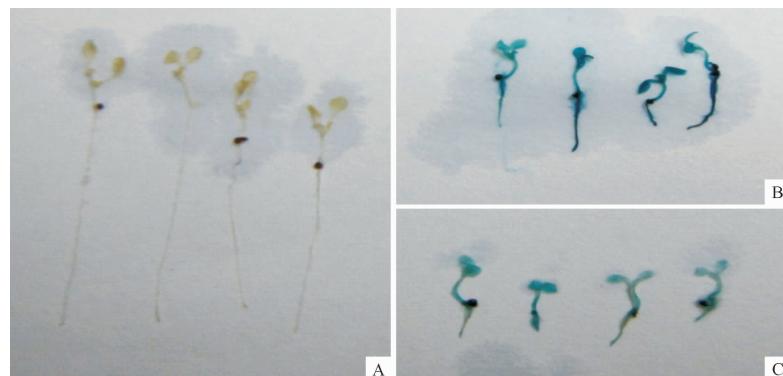


图 5 转基因拟南芥植株的 GUS 组织化学染色

Fig. 5 Histochemical staining of transgenic *Arabidopsis* plants

GUS 荧光活性变化分析如图 7。首先,从图中可看出在水处理下,其 GUS 活性变化不显著,因此,可排除 ABA 和 MeJA 处理时水成分的影响。分析转 ProLcCSD3 株系在各非生物胁迫下 GUS 活性变化,表明 LcCu/Zn-SOD3 启动子可响应 NaCl、PEG-6000、ABA、MeJA 和损伤等非生物胁迫。其中在 NaCl、PEG-6000 和 ABA 处理 6 h 时其 GUS 活性即显著升高,可达到未处理的 1.7~3.2 倍,而在 24

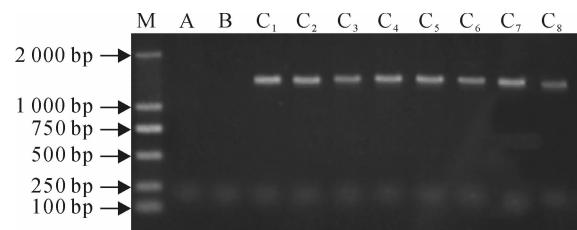


图 6 转基因拟南芥株系 DNA 水平验证

M. D2000 DNA ladder; A. 阴性对照; B. 阳性对照;
C₁~C₇. 转基因拟南芥不同株系

Fig. 6 Screening of transformed *Arabidopsis* strains on DNA level

M. D2000 DNA ladder; A. Negative control; B. Positive control;
C₁~C₇. Different strains of transformed *Arabidopsis*

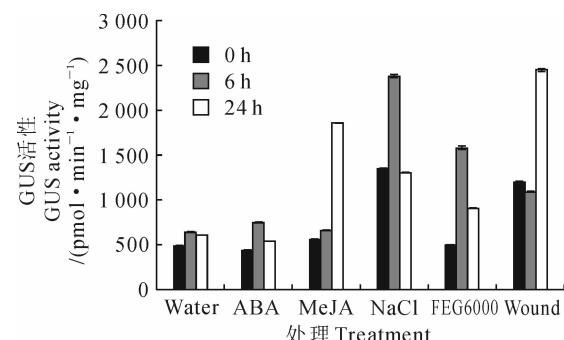


图 7 转基因拟南芥不同胁迫处理下 GUS 活性分析

Fig. 7 The analysis of GUS activity of transgenic *Arabidopsis* under different abiotic stresses

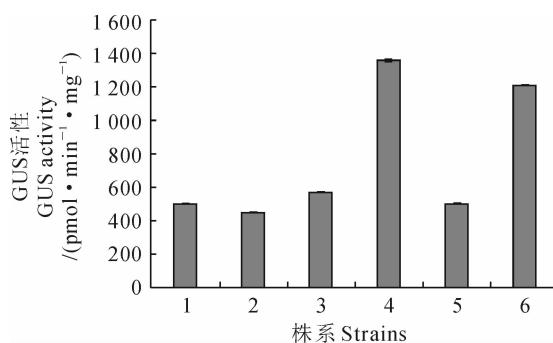


图 8 转基因拟南芥不同株系 GUS 活性差异分析

Fig. 8 The difference analysis of GUS activity of different transgenic *Arabidopsis* strains

h 时均又下降; MeJA 和损伤胁迫处理 6 h 时其活性变化不明显,而在处理 24 h 时其 GUS 活性显著升高,约为未处理的 2~3 倍,且两者的表达模式相近。

此外,进一步分析(图 8)发现,不同的转基因株系叶片中的 GUS 活性差异较大,表明在转 Pro-LcCSD3 的拟南芥不同株系中,其 ProLcCSD3 驱动下游 GUS 的活性存在差异,这可能是该启动子插入拟南芥基因组中的位置不同所致。

3 讨 论

3.1 荔枝古树胚性愈伤组织 *LcCu/Zn-SOD3* 参与环境胁迫的调控

荔枝胚性愈伤组织 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子的转录活性受不同环境因素的诱导。顺式元件预测分析表明该启动子含有光、热压、厌氧、防御与胁迫、干旱和昼夜节律等响应元件,说明该启动子可能响应光、热、厌氧、干旱和昼夜等的诱导。本研究对转 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子的拟南芥植株进行 NaCl、PEG-6000 和损伤胁迫的结果验证了该启动子对盐、干旱和损伤逆境下的响应。这与以往 NaCl、干旱等逆境胁迫均诱导 *Cu/Zn-SOD* 基因表达的研究相符^[13-14]。因此,该研究表明 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子在逆境胁迫下,可通过响应相应的逆境顺式元件调控其下游基因的表达,从而调整植株对逆境的耐受能力。

3.2 荔枝古树胚性愈伤组织 *LcCu/Zn-SOD3* 参与激素胁迫调控

荔枝胚性愈伤组织 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子响应外源激素胁迫。PlantCARE 顺式元件分析表明,

该启动子含有参与 ABA、赤霉素和水杨酸应答元件。表明该启动子在上述激素信号转导中可能发挥了一定作用。Mundy 等^[15]指出一些基因的表达可能是外源激素直接作为反式作用因子与这些调控元件结合来调控的。ABA^[16]、赤霉素^[17]和水杨酸^[18]等均在植物的抗旱、抗盐、抗低温等逆境方面起到一定调控作用。其中,茉莉酸甲酯作为一种挥发性化合物,可以从植物的气孔进入植物体内,在细胞质中被酯酶水解为茉莉酸,实现长距离的信号传导和植物间的交流,诱导邻近植物产生诱导防御反应^[19],并可以产生与机械损伤和昆虫取食相似的效果^[20]。同样,在本研究对转 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子的拟南芥植株进行 ABA 和 MeJA 胁迫的结果验证了该启动子对 ABA 和 MeJA 激素的响应。因此,该研究也表明该启动子在外源激素胁迫下,可通过响应相应的激素顺式元件调控 *LcCu/Zn-SOD3* 基因的表达。

综上,本研究主要通过对 *LcCu/Zn-SOD3* 启动子进行克隆和功能分析,即在启动子研究的水平初步鉴定了 *LcCu/Zn-SOD3* 基因功能,为进一步对该基因的转基因抗逆性研究奠定一定的基础。此外,MBS、WBOX 和 WRKY71OS 等顺式元件的存在,暗示荔枝胚性愈伤组织 *LcCu/Zn-SOD3* 基因的调控可能还受 MYB 和 WRKY 转录因子的调控。其中,MYB 转录因子作为植物转录因子中最大的家族之一,参与植物对非生物胁迫的响应^[21],尤其在干旱胁迫下,大部分 MYB 转录因子均与 ABA 相关,且 MYB 转录因子对 ABA 的调控存在诱导型、介导型和依赖型三种方式^[22]。本试验所得的启动子中,也正含有一个干旱诱导的 MBS 元件和 ABA 响应的 CE3 元件,那么该两个元件是否也协同作用以及作用的方式有待进一步研究。WRKY 转录因子能够与 W-box 发生特异性作用,调节启动子中含有 W-box 元件的基因表达^[23],从而参与各种防御反应,调节植物的生长发育等^[24]。同时,以往的研究也表明 WRKY 转录因子还受外源激素如水杨酸^[25]、赤霉素^[26]、脱落酸^[27]和茉莉酸甲酯^[28]等胁迫。因此,以上的前人研究成果也为进一步深入研究该启动子的功能及上游调控因子的调控方式等提供新的思路。

参考文献:

- [1] LAI ZH X(赖钟雄), LI H L(李焕苓). The evaluation and utilization of the ancient and famous trees genes resources[J]. *Land Greening*(国土绿化), 2007,(5):6—7(in Chinese).

- [2] HU SH M(胡善美). The ancient litchi trees in the Xichan temple of Fuzhou[J]. *Fujian Geography*(福建地理), 2000, **15**(4): 35—38(in Chinese).
- [3] 刘枫. 福州市寺庙园林研究[D]. 福州:福建农林大学,2008.
- [4] BUBLIY O, LOESCHKE V. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2005, **18**(4): 789—803.
- [5] 孙乃恩,孙东旭,朱德煦. 分子遗传学[M]. 南京:南京大学出版社,1999.
- [6] 许珊珊. 福州荔枝古树离体种质保存及抗性基因 SOD 的克隆与表达[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [7] DING X D(丁晓东), LÜ L X(吕柳新). Study on genomic DNA extraction from recalcitrant litichi[J]. *Chinese Journal Applied Environmental Biology*(应用与环境生物学报), 2000, **6**(2): 142—145(in Chinese).
- [8] WANG X Q(王全学), SHEN X(沈晓), HE Z M(何赞绵), et al. An optimized freeze-thaw for transformation of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 and LBA4404[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*(药物生物技术), 2011, **18**(5): 382—386(in Chinese).
- [9] LI Y(黎茵), ZHANG Y SH(张以顺). Study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient transformation of tobacco by infiltration [J]. *Experimental Technology and Management*(实验技术与管理), 2010, **27**(11): 50—52(in Chinese).
- [10] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions; β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *The EMBO Journal*, 1987, **6**(13): 3 901—3 907.
- [11] BENT A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method[M]. Agrobacterium Protocols. Humana Press, 2006: 87—104.
- [12] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, **5**(4): 387—405.
- [13] WANG SH(王盛), ZHANG B Q(张保青), HUANG X(黄杏), et al. Molecular cloning of sugarcane Cu/Zn Superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) and its expression analysis[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2013, **46**(15): 3 277—3 284(in Chinese).
- [14] ZANG J(臧洁), YU M(余梅), WANG X L(王先磊), et al. Cloning and salt-tolerance analysis of the *Salicornia europaea* gene Cu/Zn-SOD[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2013, **21**(7): 847—854(in Chinese).
- [15] MUNDY J, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, CHUA N H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, **87**(4): 1 406—1 410.
- [16] NAMBARA E, KUCHITSU K. Opening a new era of ABA research[J]. *Journal of Plant Research*, 2011, **124**(4): 431—435.
- [17] SHADDAD M A K, HM A E S, MOSTSFA D. Role of gibberellic acid(GA₃) in improving salt stress tolerance of two wheat cultivars [J]. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, **5**(4): 50—57.
- [18] MENG X J(孟雪娇), DI K(邸昆), DING G H(丁国华). Progress of study on the physiological role of salicylic acid in plant[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报), 2010, **26**(15): 207—214(in Chinese).
- [19] FARMER E E, RYAN C A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, **87**(19): 7 713—7 716.
- [20] XU W(徐伟), YAN SH CH(严善春). The function of jasmonic acid in induced plant defence[J]. *Acta Ecologica Sinica*(生态学报), 2005, **25**(08): 2 074—2 082(in Chinese).
- [21] LIAO Y, ZOU H F, WANG H W, et al. Soybean *GmMYB76*, *GmMYB92*, and *GmMYB177* genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Cell Research*, 2008, **18**(10): 1 047—1 060.
- [22] ZUO R(左然), XU M L(徐美玲), CHAI G H(柴国华), et al. Function and regulation mechanism of plant MYB transcription factors [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*(生命科学), 2012, **24**(10): 1 133—1 140(in Chinese).
- [23] TIAN Y(田云), LU X Y(卢向阳), PENG L SH(彭丽莎), et al. The structure and function of plant WRKY transcription factors[J]. *Hereditas*(遗传), 2006, **28**(12): 1 607—1 612(in Chinese).
- [24] 李玥. 3个玉米WRKY转录因子基因的表达模式分析[D]. 四川成都:四川农业大学,2012.
- [25] DONG J, CHEN C, CHEN Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, **51**(1): 21—37.
- [26] ZHANG Z L, XIE Z, ZOU X, et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells[J]. *Plant Physiology*, 2004, **134**(4): 1 500—1 513.
- [27] XIE Z, ZHANG Z L, ZOU X, et al. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells[J]. *Plant Physiology*, 2005, **137**(1): 176—189.
- [28] PENG X X(彭喜旭), HU Y J(胡耀军), et al. Isolation and expression profiles of rice WRKY30 induced by jasmonic acid application and fungal pathogen infection[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2011, **44**(12): 2 454—2 461(in Chinese).

(编辑:宋亚珍)