菊花 *DgCCD7* 启动子克隆与顺式作用元件分析

郗 琳，温 超，吕素慧，聂 静，杨云燕，赵梁军

（中国农业大学园艺学院，花卉发育与品质调控北京市重点实验室，北京 100193）

摘要：以切花菊‘神马’（*Dendranthema grandiflorum* cv. ‘Jinba’）为材料，对菊花独脚金内酯（strigolactone，SL）合成基因 *DgCCD7* 基因启动子克隆，获得 *DgCCD7* 基因启动子 1 442 bp. 利用数据库 PLACE 分别对菊花 SL 合成基因 *DgCCD7* 与 *DgCCD8* 的启动子序列进行分析，并对两者上游 1 200 bp 内的顺势作用元件进行比对分析，发现 2 个基因均含有 2 个共同的生长素相关元件：生长素响应元件 CATATGGMSAUR 以及类生长素响应元件 SEBFCONSSTPR10A；除此之外，在 2 个启动子共同含有的元件中，均具有一个 P1Bs 结合位点，分别位于 *ProDgCCD7* 的–610 bp 和 *ProDgCCD8* 的–427 bp，该位点参与响应磷胁迫相关转录因子 PHR1 的结合。通过转染拟南芥 GUS 染色结果也可看到 *DgCCD7* 在下胚轴及分生组织染色较深，其根部的 GUS 表达受到 NAA 与缺磷的诱导。研究结果为进一步研究基因 *DgCCD7* 与 *DgCCD8* 的转录调控机制奠定基础，以期揭示 SL 对菊花侧枝发育的调控机理，为进一步利用人工合成的 SL 调控菊花侧枝生长特性提供理论和实践基础。

关键词：园艺学；菊花；启动子；CCDs；独脚金内酯；转录调控

中图分类号：S682.1+1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674-2850(2017)03-0281-10

Clone and *cis*-element analysis of *DgCCD7* promoter in chrysanthemums

XI Lin, WEN Chao, LÜ Suhui, NIE Jing, YANG Yunyan, ZHAO Liangjun

(*Beijing Key Laboratory of Development and Quality Control of Ornamental Crops*, *College of Horticulture*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100193, *China*)

Abstract: Strigolactone (SL) is known as a long-distance signal in regulation of chrysanthemum shoot branching. The promoter of SL biosynthesis gene *DgCCD7* was isolated from chrysanthemum ‘Shenma’ (*Dendranthema grandiflorum* cv. ‘Jinba’), which contains full-length of 1 442 bp. By using PLACE database, analysis of promoter sequences of *DgCCD7* and *DgCCD8* as well as comparative analysis of the cis-regulatory elements within the upstream of 1 200 bp were carried out. Two common auxin related components were found in both genes, which are auxin responsive motif CATATGGMSAUR and auxin-like responsive motif SEBFCONSSTPR10A. Furthermore, one P1Bs binding motif were identified on both *DgCCD7* and *DgCCD8* promoters, which located on –610 bp of *ProDgCCD7* and –427 bp of *ProDgCCD8*, respectively. And this binding motif is involved in the binding of phosphorus stress related transcription factor PHR1. By transformation of *Arabidopsis* fusion with GUS gene, *DgCCD7* promoter can be activated at meristems and hypocotyledonary region. Meanwhile NAA and Pi starvation can active GUS expression in roots of transgene *Arabidopsis*. To sum up, this study may lay a foundation on the study of the transcriptional regulation mechanism of gene *DgCCD7* and *DgCCD8* to reveal the regulation mechanism of SL on shoot branching of chrysanthemum, which can be used for controlling branching during cut flower production.

Key words: horticulture; chrysanthemum; promoter; CCDs; strigolactone; transcription regulation

---

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金（20110008110021）

作者简介：郗琳（1987—），女，博士研究生，主要研究方向：观赏植物发育生理与分子生物学

通信联系人：赵梁军，教授，主要研究方向：观赏植物发育生理与分子生物学. E-mail: zhaolj5073@sina.com

0　引言

SL 是一类类胡萝卜素衍生物，属于植物内源激素，同时也会通过根系分泌过程分泌至植物体外。SL 的合成起始于类胡萝卜素前体的异构化，参与这一步骤的异构化酶为 D27. 随后，异构化类胡萝卜素被依次裂解，通过 2 种定位在质体的酶：类胡萝卜素裂解双加氧酶 7（carotenoid cleavage dioxygenase 7，CCD7）与类胡萝卜素裂解双加氧酶 8（carotenoid cleavage dioxygenase 8，CCD8）继续催化剪切；产物最终在 MAX1 等因子的作用下进行修饰，获得 SL[1~5].

CCD7 与 CCD8 属于 CCDs 家族，这一家族的酶会以类胡萝卜素作为底物，裂解其不同位点，产生不同的类胡萝卜素衍生物。这是一类由来已久的酶类，广泛出现在细菌、植物及动物中。这一类酶的特点是：1)CCD 酶的催化活性需要亚铁离子参与催化底物裂解过程，依据加氧离子的数目分为单加氧 CCDs 与双加氧 CCDs；2）CCD 酶包含 4 个保守的组氨酸，其三级结构具有铁离子螯合功能；3）CCD 酶羧端（C 端）包含一段保守肽段序列，属于这一家族的标志序列。拟南芥中，这一家族有 9 个成员，在其他植物中，其同源性依据与拟南芥成员的同源性决定。在已报道的研究中，这一类酶参与植物休眠、光合作用、果实成熟及分枝发育的调控。CCD 酶剪切双键，但底物是混杂的类胡萝卜素类。植物中，CCD1 与 CCD7 切割裂解类胡萝卜素 9,10 位双键，而 NCED 切割 11, 12 位双键。拟南芥 NCEDs 参与脱落酸（ABA）合成。其中，NCED3 主要在种子中表达，而 NCED5 与 NCED6 在受精前的雌雄配体、胚乳及胚组织中均有表达[6~7]。CCD1 参与胡萝卜素的分解代谢，在拟南芥、番茄、矮牵牛及葡萄等作物中均有同源基因，影响果实成色[8~9]。拟南芥中，两个 CCDs 成员参与植物分枝发育，即 CCD7（MAX3）与 CCD8（MAX4）[1~2, 10]. 这两个蛋白定位于质体，依次裂解 SL 的类胡萝卜素前体[3, 11]。生长素可以调节这两个基因的表达。在豌豆中，生长素可以上调 *RMS1*（*CCD8*）的表达而在拟南芥中有微弱影响[1, 12]。在菊花中，生长素可以显著上调 *DgCCD8* 基因的表达，外源 GR24 可以加剧这一调控[13]。已有研究表明，生长素与缺磷均可诱导 *DgCCD7* 与 *DgCCD8* 的表达，然而这一诱导的转录调控机制并不清楚。

本研究以切花菊‘神马’（*Dendranthema grandiflorum* cv.‘Jinba’）为材料，对菊花 SL 合成基因 *DgCCD7* 基因启动子进行克隆。结合已经获得的菊花 *DgCCD8*，利用数据库 PLACE 对菊花 SL 合成基因 *DgCCD7* 与 *DgCCD8* 的启动子序列分别进行分析，并对两者上游 1 200 bp 内的顺势作用元件进行比对分析，探讨两者共同的作用元件并预测两者转录调控模式，为进一步研究基因 *DgCCD7* 与 *DgCCD8* 的转录调控机制奠定基础，以期揭示 SL 对菊花侧枝发育的调控机理，为进一步利用人工合成的 SL 调控菊花侧枝生长特性或通过基因工程手段培育理想株型的切花菊品种提供理论和实践基础。

1　材料与方法

1.1　材料与菌种

本实验所用材料为切花菊‘神马’组培苗。切花菊‘神马’（*Dendranthema grandiflorum* cv.‘Jinba’）取自中国农业大学科学园温室，将其茎段脱毒再生获得组培苗，于 MS 固体培养基上进行继代繁殖，培养于 24℃/22℃组培室，光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗，光强度为 100～120 μmol·m^{-2}·s^{-1}. 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α、农杆菌 GV3101 和载体 pBI121. 植物转化受体选用拟南芥野生型（Col-0），待种子充分成熟并干燥后，置于硫酸纸袋通风干燥保存。拟南芥种子用 70%乙醇浸润 30 s，1%次氯酸钠溶液浸润 15 min，无菌水冲洗 5 次，点播于 1/2MS 固体培养基。待 6 d 后，植株子叶充分展开，根系舒展，移栽至草炭:蛭石=1:1 的基质中培养。培养温度为 22℃，光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗，光强度为 100～120 μmol·m^{-1}·s^{-2}.

1.2 菊花 DNA 提取、*DgCCD7* 启动子克隆及顺式作用元件分析

本实验采用康为世纪植物基因组 DNA 提取试剂盒（CW0531）提取菊花基因组 DNA，用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。采用反向 PCR（inverse-PCR）克隆 *DgCCD7* 的基因组上游启动子序列。依据 *DgCCD7* 基因组序列，选择单一酶切位点内切酶 *Apa* Ⅰ对基因组 DNA 进行酶切，将酶切产物纯化后，T4 连接酶进行自身环化连接。根据目的基因 5′端序列设计两队巢式引物，以自身环化连接产物作为模板，先用一些外侧引物 *7-IF2* 和 *7-IR2* 进行第一轮 PCR 扩增；随后以第一轮 PCR 产物（稀释后）和第二轮 PCR 产物于 1.0%琼脂糖凝胶上电泳，分离目的片段并测序。采用植物顺式元件查询数据库 PLACE 对所获得的上游启动子区段进行分析（http://www.dna.affrc.go.jp/sigscan），如表 1 所示。

表 1 菊花 *DgCCD7* 基因启动子克隆引物

Tab. 1 Primers used in isolation for promoter sequence of chrysanthemum *DgCCD7*

引物名称	序列 5′-3′	目的
7-IF2	AAGGCTCAAGTGGAAGAACATG	反向 PCR
7-IR2	ACGCTCTAAGATAGCCATGACC	反向 PCR
7-IF	GGGAATACTAAAGTTATGAAGAATG	反向 PCR
7-IR	CCGTTAGATAATATGTTCCTAGTGG	反向 PCR
7-Promoter-F	GAGGTTGTTTTGTTTGTGGGAGTGGATA	启动子克隆
7-Promoter-R	AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA	启动子克隆

1.3 表达载体构建

根据 *DgCCD7* 基因启动子序列测序结果，设计并合成用于分离不同长度启动子序列的 PCR 正向引物 *FQ7* 和反向引物 *RQ7*. 为克隆方便，在引物 5′端分别加 *Hin*dⅢ和 *Bam*HⅠ位点，*FQ7* 的序列为 5′- TGACCA TGATTACGC CAAGCTTTACGATTTCA TTGTTTTAAC-3′（36 bp）；*RQ7* 的序列为 5′-GACTGACCA CCCGGGGATC CTTTGTCGAA GTTGGTGGTG A-3′（27 bp）. 以包含全长启动子序列质粒为模板，扩增获得不同长度的启动子片段，其反应程序为 95℃ 5 min，接着 94℃ 30 s，40℃ 1 min，72℃ 1 min，40 个循环，最后在 72℃延伸 10 min. 回收目的片段后分别与 pGEM-T-easy 连接，再用 *Hin*dⅢ和 *Bam*HⅠ酶切，回收后与用同样酶切的载体 pBI121 大片段连接，得到启动子表达载体。

1.4 GUS 染色

0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液（pH=7.0）：1 mol/L Na_2HPO_4 57.7 mL，1 mol/L NaH_2PO_4 42.3 mL，加水稀释至 1.0 L；0.5 mol/L EDTA（pH=8.0）：称取 186.1 g $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$，至于 1 L 烧杯中，加入约 800 mL 去离子水，充分搅拌。用 NaOH 调节至 pH=8.0（约 20 g NaOH）。注意：pH=8.0 时，EDTA 才能完全溶解。加去离子水将溶液定容至 1 L，高温高压灭菌，室温保存。GUS 染色液：0.5 g/L 5-溴-4-氯-3-吲哚基-*β*-葡糖苷酸（X-gluc）溶液，配方如下：X-gluc，5.0 mg；*N*,*N*-二甲基甲酰胺，1～2 滴；0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH=7.0），5.8 mL；5.0 mmol/L 铁氰化钾，1.0 mL；5.0 mmol/L 亚铁氰化钾，1.0 mL；0.5 mol/L EDTA（pH=8.0），200 μL；甲醇，2.0 mL；Triton X-100，10 μL；总体积，10 mL.

N,*N*-二甲基甲酰胺加入到 X-gluc 中，搅拌直到溶解，再将 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液、5.0 mmol/L 铁氰化钾和 5.0 mmol/L 亚铁氰化钾加入到 X-gluc 溶液中，混匀，最后加入 0.5 mol/L EDTA（pH=8.0）、甲醇和 Triton X-100，混匀备用。染色后先用 70%乙醇于 4℃过夜脱色；然后用透明液（合氯醛:水:甘油=8:1:1，

体积比）室温过夜透明；再用 70%，50%，30%，20%，10%的乙醇梯度复水，即可观察。

1.5　拟南芥转化与纯合株系筛选

采用花序浸蘸法[14]，选取含有目的载体的农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）菌株 GV3101，选用单克隆，接种于 10 mL 加有抗生素的 LB 液体培养基；28℃，180 r/min 过夜震荡培养；4 000 r/min 室温离心 10 min，去除上清，用侵染液（5%蔗糖，0.02% Silwet-77）悬浮菌体，使 OD 值至 0.8 左右；将拟南芥完全开放花减去，将未展开花瓣的花序浸泡在侵染液中，约 30 s，保鲜膜密封保湿，黑暗条件下避光过夜；将拟南芥从黑暗条件中去除，转移至正常条件培养：培养温度为 18～22℃，光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗，光强度为 120 μmol·m^{-2}·s^{-1}. 转基因纯合体株系筛选：从侵染后植株上收集的 T0 代转基因种子被播种在添加了 35 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养基上，进行阳性植株筛选，每一株阳性植株代表一个株系；同一个株系产生的 T1 代种子多株栽种后分别收集它们的 T2 代种子。为确定纯合的 T2 代，来自同一株系不同个体的 T2 代种子被分别播种到添加 35 mg/L 潮霉素的 MS 培养基上，完全萌发的被认为是纯合的 T2 代。

2　结果与分析

2.1　菊花 *DgCCD7* 启动子序列分析

利用反向 PCR 方法，以菊花基因组 DNA 为模板，获得了包括起始位点在内的上游 2 045 bp DNA 片段。将所得到的序列与 *DgCCD7* 的基因组 DNA 序列比对，发现有 603 bp 的重叠，证实了所得到的序列是 *DgCCD7* 基因的启动子序列，即获得启动子 1 442 bp，命名为 *ProDgCCD7*.

利用启动子顺式作用元件预测网站 PLACE 上相关软件对所得 *ProDgCCD7* 序列进行分析[15]，发现该序列含有大多数高等植物启动子的基本元件 TATA-box 和 CAAT-box（如图 1 所示）. 其中 TATA-box 位于–1 340，–1 197，–839，–523，–146，–110，–66 bp（起始密码子 ATG 前第一个碱基设为–1）处，TATA-box 是真核生物 RNA 聚合酶Ⅱ的结合部位，能指导起始前复合物的形成，决定转录的起始位点，并调控上游激活蛋白的行为；CAAT-box 位于–1 393，–1 366，–1 351，–1 004，–924，–908，–763，–750，–490，–380，–343，–198，–101 bp 处。CAAT-box 与 RNA 聚合酶的结合有关，它可以极大提高基本启动子的低水平转录活性。这说明克隆的序列符合真核基因启动子的基本结构特征，具有潜在的启动子活性。除了这些基础元件外，在 *DgCCD7* 启动子区域中，还发现与激素调控有关的反应元件：1 个典型的生长素响应元件 AUXRETGA1GMGH3（TGACGTAA），位于–808 bp 处；多个 ABA 应答元件 ACGT 和多个参与细胞分裂素信号途径 ARR1 蛋白的应答核心元件 NGATT.

另外，在启动子序列中还发现了 4 个 GATAboxes（–933，–899，–846，–609 bp）和 4 个 OSE（–1 385，–534，–502，–370 bp），这两类元件都已经证明是与组织特异性相关的元件，3 个 Ibox（GATAAG）位于–1 212，–933，–846 bp 处，1 个 Tboxes（ACTTTG）位于–1 159 bp 处，3 个 GT-1 结合位点（GGTTAA）位于–1 165，–472 bp 处，这些都是在光诱导表达启动子中的保守元件[16~18]，同时还含有 MYB 和 MYC 转录因子的识别位点，其核心序列分别为 YAACGG、CANNTG.

将校对后的启动子 *ProDgCCD7* 序列，融合 *GUS* 报告基因，构建表达载体（pCambia121），利用农杆菌介导的方法转化拟南芥野生型 WT（Col-0），筛选 *ProDgCCD7*::*GUS* 的过表达拟南芥纯合株系。如图 2 所示，对转基因株系的不同生长时期进行 GUS 组织化学染色，可以看到 *DgCCD7* 基因的组织特异转录

情况。跟踪记录了拟南芥萌发后的 2 d（如图 2a 所示），5 d（如图 2b 所示），12 d（如图 2c 所示）以及 35 d（如图 2d、图 2e 所示）的 GUS 染色。结果表明：*DgCCD7* 的启动子在拟南芥萌发早期就会启动转录，并且幼苗期主要在下胚轴部位启动；同时，在地上部的根茎部位（分生组织区域）表达相对较强烈；地下部分（根） GUS 染色不明显；35 d 时，地上部位茎中的 GUS 染色相对强烈，花蕾染色可见，果荚的着生端染色相对较明显。

1 CAAACGCTTC CTAGTGTCCA CCTAGTGATG ATTGAGTACA AGCAAAAACA ATTTGCAAAG

61 ATTCACATAA AACTCCAATT TGGCCACCAA CAATAACCTA CTATTAATAG AAATACGTAC

121 ATTAAGAAAC ATAGGATGAG CATTGAGCAG TTTGATGTAG TTATTGGAAA AACCAAATCT

181 TAAACCAAAC AAAGTTTGGT TTATGCATTT CCTTCAAATA AAAACTCATA GGTTTTTGTT

241 GGTTTTATTT TACGATTTCA TTGTTTTAAC TTTTTGGGTT AAACTTTGGT TTTATGTTTT

301 TTCAAAGTGA TCAAGCAACT AACTAGTTGA CCTCATTGTT TGGGTTCCGT GTATTCTAAG

361 TGACGTGAAA GAAATGGAAA CGGAATTGTC AGGTGACTTT CTTTCCTAAA CTTCCTCCCC

421 GGTGTAAGAA GGTTGGACAA TTAAAAAAAA AAAAAAGAAT CGATCCGCAC ACTCCATTTA

481 TTGATTAGCT CACTCCACAG TACAAGTGGA TAATACACAA TATGAGTTTT GTACAATTTA

541 TTGATACATG AAAACAGTGT TTTGATGAGT ATGCAAATCA CTTGTCTAAA AAAATGATAA

601 CTTATATAAT TTCATTAATA ACATAAATAT CTTGACGTAA CCAACATTTT CCATACGAAA

AUXRETGA1GMGH3

661 TTACTGGTTG AACACCAACA ATTTTCTCAC ACAATATGAG CCCGTGTAAG GACGGGTTAC

721 TTAAGAGTTT CCTAGTGACT AGTGTCGGAA AGACGTCACA AAGCTGTCAA AAATTAGCGA

781 CATATTTGTT TTTTTTAGAA TTTATACACG TATGACTGTT GTAAATGCAT AGGATATTCA

841 TATGTCGCAG GGACTTCGTA GGAGTTATCG ACCAAACTTA ATACGTCACA TATCCGCCAC

901 TACGTACCTC TTAAGGGGTA TTAATGGATT TGCGGAGAAA AAGATTTCCG CCAATATATA

961 CCCCATAAGG GTTAATGGCG GATTTGCAAA CAAAGGAACG AGGGGTTTCA TAAAGAGTAA

1 021 GATTAATGAT TTTAGAATGT GACAAATATT TATTACTATA ACAATATTTC AAAAGATTGT

1 081 GAAAATGTTT GTAGGGCTCA ATTTCAAAGT CGTCCTCAGC TATATGTAAC TGAAATTGCT

1 141 ATTTCGGGGT TGTTTTCCTA GCTTCTCACA AACAAGAGAT TAGTTGTTAT ATTAAGAAAT

1 201 ATTAGGACTA GTTATCATGG TTTTTACTAG GACTTCAAGT CTTCAATTGG TTACGAGAGT

1 261 CATATGTAAC TTGCTATATT AAGAAATACT TACTTTATTA ATAATTTCTA ATTAAACCAG

1 321 ACATTCAAGG GTATAAATGT CAATTCCTAA AACACTCGTC CATGATGTCT TTCTATATAT

1 381 AAATCTAGCA CCATTCCTAC TAAGTTATTA TATTTGAAAT TGTCACCACC AACTTCGACA

1 441 AAATG

注：双下划线表示 ATG 起始位点；浅灰色和深灰色标注分别表示预测的 TATA box 和 CAAT box；方框表示生长素应答元件

图 1 菊花 *DgCCD7* 启动子序列及结构

Fig. 1 Nucleic acid sequence and structure of *DgCCD7* gene promoter from chrysanthemum

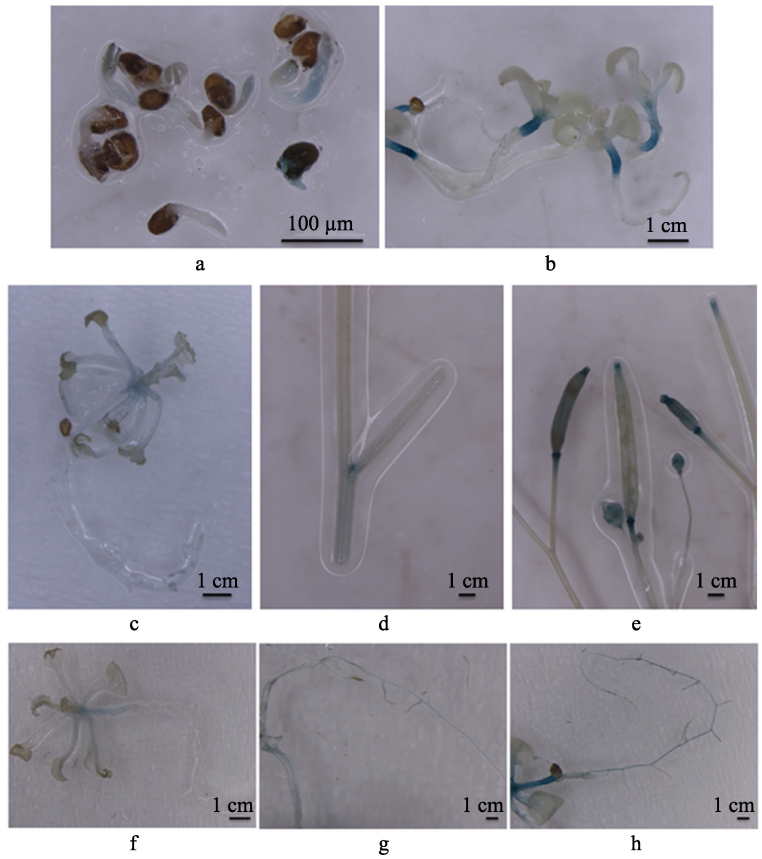


图 2　表达 *ProDgCCD7*::*GUS* 的拟南芥植株组织化学染色分析

Fig. 2　Histochemical staining of transgenic *Araidopsis* harboring *ProDgCCD7*::*GUS*

a—拟南芥植株在 2 d 的 GUS 染色情况；b—拟南芥植株在 5 d 的 GUS 染色情况；c—拟南芥植株在 12 d 的 GUS 染色情况；d，e—拟南芥植株在 35 d 的 GUS 染色情况；f—对照；g—12 d 拟南芥植株用 5 μmol/L NAA 处理根系 GUS 染色情况；h—12 d 拟南芥植株缺磷处理（–1 mmol/L Pi）根系 GUS 染色情况

a-*Araidopsis* plants subjected to GUS stain on 2 d; b-*Araidopsis* plants subjected to GUS stain on 5 d; c-*Araidopsis* plants subjected to GUS stain on 12 d; d, e-*Araidopsis* plants subjected to GUS stain on 35 d; f-Mock control; g-*Araidopsis* roots treated with 5 μmol/L NAA subjected to GUS stain on 12 d; h-*Araidopsis* roots depleted with −1 mmol/L Pi subjected to GUS stain on 12 d

同时，对转基因植株进行 NAA 处理（6 h）以及磷缺乏培养处理（1 d）。配置含 5 μmol/L NAA 的 MS 固体培养基平板，以及磷缺乏（KH_2PO_4 浓度为 2 μmol/L）的 MS 固体培养基平板，对 12 d 拟南芥进行处理，对照是正常 MS 固体平板处理的植株。结果可见，NAA 以及磷缺乏会诱导 *DgCCD7* 的转录。NAA 对 GUS 活性的诱导与 RT-PCR[19]结果一致。

2.2　菊花 *DgCCD7* 启动子与 *DgCCD8* 启动子序列共分析

利用启动子顺式作用元件预测网站 PLACE 上相关软件对所得 *ProDgCCD8* 序列进行分析（如图 3 所示）[13]，发现该序列含有大多数高等植物启动子的基本元件 TATA-box 和 CAAT-box（如图 4 所示），其中，TATA-box 位于 1 274，1 276，1 311，1 351，1 768，1 770，1 886 bp 处，TATA-box 是真核生物 RNA 聚合酶 II 的结合部位，能指导起始前复合物的形成，决定转录的起始位点，并调控上游激活蛋白的行为；CAAT-box 位于 634，1 400，1 701，1 903 bp 处。CAAT-box 与 RNA 聚合酶的结合有关，它可以极大提高基本启动子的低水平转录活性。这说明克隆的序列符合真核基因启动子的基本结构特征，具有潜在的启动子活性。除这些基础元件外，在 *DgCCD8* 启动子区域中，还发现了与激素调控有关的反应元

件：1 个典型的生长素响应元件 AuxRE（TGTCTC），位于 1 898 bp 处；多个脱落酸（ABA）应答元件 ACGT 和多个参与细胞分裂素信号途径 ARR1 蛋白的应答核心元件 NGATT.



注：双下划线为翻译起始位点；浅灰色和深灰色标注分别为 TATA box 和 CAAT box；方框为生长素应答元件

图 3 菊花 *DgCCD8* 启动子序列及结构[13]

Fig. 3 Nucleic acid sequence and structure of *DgCCD8* gene promoter from chrysanthemum[13]

另外，在启动子序列中还发现了 6 个 GATAboxes（58，228，349，1 602，1 960，2 166 bp）和 3 个 OSE（236，1 843，2 081 bp），这两类元件都已经证明是与组织特异性相关的元件[20~21]，1 个 Ibox（GATAAG）位于 349 bp 处，2 个 Tboxes（ACTTTG）位于 1 194，1 224 bp 处，3 个 GT-1 结合位点（GGTTAA）位于 304，662，947 bp 处，这些都是在光诱导表达启动子中的保守元件[16~18]，同时还含有 MYB 和 MYC

转录因子的识别位点，其核心序列分别为 YAACGG、CANNTG.

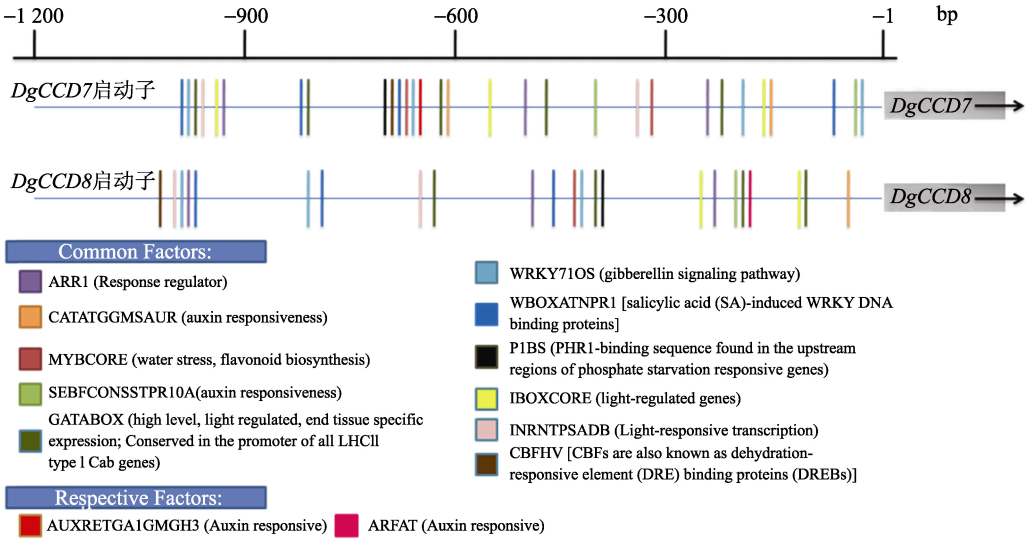


图 4　菊花 *DgCCD7* 与 *DgCCD8* 启动子 1 200 bp 内序列结构比较分析

Fig. 4　Structure of the 1 200 bp *DgCCD7/8* promoters from chrysanthemum showing potential transcription binding DNA motifs

进一步对 *DgCCD7* 与 *DgCCD8* 启动子距离 ATG 上游 1 200 bp 以内的序列进行比对分析，并将两者的该区段元件绘制结构示意图（如图 3 所示），可以看出前文中提到的多种元件两者兼有。如，与组织特异性相关的元件 GATAboxes 和 OSE[20~21]；与光诱导表达相关的 Ibox、Tboxes 和 GT-1 结合位点[16~18]；与激素相关的 ABA 等逆境胁迫相关 CBF 结合位点，茉莉酸诱导相关的位点 WBOX，与赤霉素信号转导相关的 WRKY 结合位点；以及 MYB 位点（主要与水分胁迫、类黄酮合成有关），如图 3 所示。

通过对生长素响应元件的比较分析发现，两者均含有 2 个共同的生长素相关元件：生长素响应元件 CATATGGMSAUR 以及类生长素响应元件 SEBFCONSSTPR10A. 除此之外，由前文的分析可以发现，两者对生长素的响应包含不同的元件在启动子的区段。*ProDgCCD7* 含有一个 AUXRETGA1GMGH3 元件，而 *ProDgCCD8* 含有一个 AuxRE. 另外，在 2 个启动子共同含有的元件中，均具有 1 个 P1Bs 结合位点，分别位于 *ProDgCCD7* 的−610 bp 和 *ProDgCCD8* 的−427 bp，该位点参与响应磷胁迫相关转录因子 PHR1 的结合。

3　讨论与结论

植物基因启动子是基因表达调控的重要顺式作用元件，是位于结构基因 5′端上游区的 DNA 序列，能指导全酶与模板的正确结合，活化 RNA 聚合酶，使之具有起始特异性转录的形式，并决定转录的方向和效率以及所使用的 RNA 聚合酶类型，是转录调控的中心[22]。因此，启动子区的克隆与序列分析是对基因表达调控进行研究的前提。

CCD7 与 *CCD8* 基因是内源 SL 合成的关键基因，它的表达调控对 SL 的合成具有非常重要的意义。为研究菊花 *DgCCD7* 和 *DgCCD8* 的表达调控，研究从菊花基因组中分别获得 1 442 bp 长的 *DgCCD7* 启动子序列与 2 170 bp 长的 *DgCCD8* 启动子序列，并分别对两者进行序列分析。

高等植物中顺式作用元件分为两大类：一般上游元件和特异上游元件[23]。通过对启动子序列调控元件的分析，发现两者的序列中含有 TATA-box、CAAT-box 以及多个光反应元件和与组织特异性有关的元件。一方面，两者的启动子序列符合高等植物启动子序列的一般特性；另一方面，两者可能受到环境、

激素、营养等多种因素的调控，参照脱辅基类胡萝卜素合成途径（脱落酸合成途径与维他命 A 合成途径），结合 *DgCCD7* 和 *DgCCD8* 的启动子序列分析，推测两者可能调控模式相似。进一步比对两者的启动子序列后发现，两者含有多种共同的作用元件：生长素响应元件、多个细胞分裂素应答元件以及脱落酸等激素应答元件。不同之处在于，*DgCCD7* 启动子中含有一个生长素响应元件 AUXRETGA1GMGH3，而 *DgCCD8* 启动子序列中发现一个典型的生长素应答元件（AuxRE），前人研究表明，*DgCCD8* 受生长素的调控[13]，因此，这个分析与前人研究是吻合的，可以推测 *DgCCD7* 对生长素的响应调控模式与 *DgCCD8* 类似。

在两者的启动子近 1 200 bp 序列的共同比对分析中发现，两者的启动子区域均包含 1 个 P1Bs 结合位点。近年来多项研究表明，植物体内 SL 的合成受到磷胁迫的诱导[24~25]。这个位点的发现，对于进一步对 *DgCCD7* 和 *DgCCD8* 在磷胁迫下的表达模式预测具有重要的意义。

研究表明，虽然 *CCD7* 与 *CCD8* 基因的功能在不同物种中具有很高的保守性，但是在表达模式上仍有不同。如在拟南芥、矮牵牛和豌豆中[3, 26~27]，*CCD8* 在根中的表达量至少是茎中的 10 倍。而在水稻和菊花中，*CCD8* 在茎中的表达量却高于根中[28]；在拟南芥中，*CCD7* 在根中的表达量是茎中的 2 倍[29]，而在矮牵牛与番茄中，根、茎的表达量没有很大差异[30~31]。因此，不同物种间 *CCD7* 与 *CCD8* 基因启动子比较分析将有助于识别一些保守性区段，为全面揭示调控机制提供分子进化方面的证据。

[参考文献] (References)

[1] SOREFAN K, BOOKER J, HAUROGNÉ K, et al. *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea[J]. Genes & Development, 2003, 17(12): 1469-1474.

[2] BOOKER J, AULDRIDGE M, WILLS S, et al. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule[J]. Current Biology, 2004, 14(14): 1232-1238.

[3] AULDRIDGE M E, BLOCK A, VOGEL J T, et al. Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family[J]. The Plant Journal, 2006, 45(6): 982-993.

[4] ARITE T, UMEHARA M, ISHIKAWA S, et al. *d14*, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(8): 1416-1424.

[5] LIN H, WANG R, QIAN Q, et al. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth[J]. The Plant Cell, 2009, 21(5): 1512-1525.

[6] LUCHI S, KOBAYASHI M, TAJI T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2001, 27(4): 325-333.

[7] TIAN L, MAGALLANES-LUNDBACK M, MUSETTI V, et al. Functional analysis of *β*-and *ε*-ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2003, 15(6): 1320-1332.

[8] SIMKIN A J, UNDERWOOD B A, AULDRIDGE M, et al. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of *β*-ionone, a fragrance volatile of *Petunia* flowers[J]. Plant Physiol., 2004, 136: 3504-3514.

[9] 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 *b*-ionone, pseudoionone, and geranylacetone[J]. The Plant Journal, 2004, 40(6): 882-892.

[10] BAINBRIDGE K, SOREFAN K, WARD S, et al. Hormonally controlled expression of the *Arabidopsis MAX4* shoot branching regulatory gene[J]. The Plant Journal, 2005, 44(4): 569-580.

[11] SCHWARTZ S H, QIN X, LOEWEN M C. The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(45): 46940-46945.

[12] BEVERIDGE C A. Axillary bud outgrowth: sending a message[J]. Curr. Opin. Plant Biol., 2006, 9: 35-40.

[13] 梁建丽. 菊花 *DgCCD8* 基因及启动子的克隆和功能分析[D]. 北京：中国农业大学，2010.
LIANG J L. Isolation and characterization of *DgCCD8* genes and its promoter from chrysanthemum[D]. Beijing: China Agricultural University, 2010. (in Chinese)

[14] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Jounal, 1998, 16(6): 735-743.

[15] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999[J]. Nucleic Acids Res., 1999, 27(1): 297-300.

[16] DONALD R G, CASHMORE A R. Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis* rbcS-1A promoter[J]. EMBO J., 1990, 9(6): 1717-1726.

[17] CHAN C S, GUO L, SHIH M C. Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 46(2): 131-141.

[18] LE G J, LI Y F, ZHOU D X. Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex[J]. The Plant Journal, 1999, 18(6): 663-668.

[19] XI L, WEN C, FANG S, et al. Impacts of strigolactone on shoot branching under phosphate starvation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* cv. Jinba)[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 694.

[20] VIEWEG M F, FRÜHLING M, QUANDT H J, et al. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2004, 17(1): 62-69.

[21] LAM E, CHUA N H. ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters[J]. The Plant Cell, 1989, 1(12): 1147-1156.

[22] 朱玉贤，李毅，郑晓峰. 现代分子生物学[M]. 北京：高等教育出版社，1997.
ZHU Y X, LI Y, ZHENG X F. Modern molecular biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1997. (in Chinese)

[23] ROEDER R G. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996, 21(9): 327-335.

[24] UMEHARA M, HANADA A, YOSHIDA S, et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones[J]. Nature, 2008, 455(7210): 195-200.

[25] LÓPEZ-RÁEZ J A, CHARNIKHOVA T, GÓMEZ-ROLDÁN V, et al. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation[J]. New Phytologist, 2008, 178(4): 863-874.

[26] SNOWDEN K C, SIMKIN A J, JANSSEN B J, et al. The decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* carotenoid cleavage *dioxygenase8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development[J]. The Plant Cell, 2005, 17(3): 746-759.

[27] FOO E, TURNBULL C G N, BEVERIDGE C A. Long-distance signaling and the control of branching in therms1 mutant of pea[J]. Plant Physiology, 2001, 126(1): 203-209.

[28] ARITE T, IWATA H, OHSHIMA K, et al. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice[J]. The Plant Journal, 2007, 51(6): 1019-1029.

[29] JOHNSON X, BRCICH T, DUN E A, et al. Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals[J]. Plant Physiology, 2006, 142(3): 1014-1026.

[30] REDMOND T M, GENTLEMAN S, DUNCAN T, et al. Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian *β*-carotene 15,15’-dioxygenase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9): 6560-6565.

[31] VOGEL J T, WALTER M H, GIAVALISCO P, et al. SlCCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato[J]. The Plant Journal, 2010, 61(2): 300-311.