

文章编号: 1674-7054(2019)01-0052-08

橡胶树 *HbHMGS1* 启动子对光照、干旱及热击处理的表达响应

巩笑笑, 闫冰玉, 谭玉荣, 王 鹏, 李双江, 王 艺, 周璐瑶, 刘进平

(海南大学 热带农林学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228)

摘 要: 克隆了橡胶树 *HbHMGS1* 基因上游长 1 656 bp 的启动子序列及其一系列 5' 缺失片段, 并利用 Plant-CARE 启动子预测软件对其进行分析, 同时, 以 *GUS* 基因作为报告基因, 构建植物缺失表达载体并通过农杆菌介导的方法转化烟草和拟南芥, 并对 *GUS* 蛋白的表达活性进行定性及定量检测分析。结果表明: 该启动子能够在烟草叶片和 T2 代转基因拟南芥植株幼苗时期及成熟期不同组织器官中驱动下游 *GUS* 基因的表达, 且叶片染色呈现明显的蓝色。将包含有 *HbHMGS1* 启动子的转基因拟南芥苗进行光周期处理发现, *GUS* 蛋白活性在光照 96 h 处理时瞬间增大到处理 72 h 时的 3.2 倍, 黑暗条件下处理 72, 96 h 后叶片 *GUS* 活性也显著增加, 分别是处理 48 h 时 *GUS* 活性的 1.38 和 2.13 倍。通过定量检测 *HbHMGS1* 启动子及其各缺失启动子响应热击及干旱处理的 *GUS* 蛋白活性发现, -699 到起始密码子 -1 处的 699 bp 序列可能是主要的热击响应区域; 干旱响应区域则主要位于 -213 到起始密码子 -1 处的 213 bp 序列中。结果表明, *HbHMGS1* 启动子在调控 *HbHMGS1* 基因响应光照、热击及干旱诱导表达方面起到重要作用。

关键词: 橡胶树; 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 1; 启动子分析; *GUS* 染色

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.01.009

橡胶树(*Hevea brasiliensis*)作为最主要的产胶植物已在我国海南、云南、广东、广西及福建等地区广泛种植。天然橡胶因其在工业、农业及国防领域的广泛应用,已成为不可或缺的工业原料及战略物资^[1-4]。目前,天然橡胶的生物合成已取得较大进展,但是橡胶生物合成的调控机制研究仍然很少^[5]。天然橡胶是以异戊二烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)作为单体聚合形成的聚异戊二烯(cis-1,4, -polyisoprene)^[6]。目前认为,在高等植物中 IPP 通过甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)及甲基赤藓醇四磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 2 条途径合成,但早期放射性标记实验证明,天然橡胶生物合成的前体 IPP 来源于 MVA 途径^[7]。其中,羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS)是橡胶树中参与橡胶生物合成及 MVA 途径中其他类异戊二烯生物合成的关键酶^[8],橡胶树中编码该酶的基因已被克隆, SUWANMANEE 等^[9]与 SIRINUPONG 等^[10]先后克隆了该基因家族的 2 个成员 *hmgs1* 和 *hmgs2*, 且 *hmgs1* 在乳胶细胞的表达量要比叶片中高, *hmgs2* 在乳胶、叶柄及叶片中的 mRNA 表达量各不同,其中,乳胶中的表达量最高,叶柄次之,叶片中最低。研究表明, *HbHMGS* 基因的 cDNA 序列与拟南芥和樟子松的 cDNA 序列相似性分别达到了 81% 及 74%^[9]。目前已有研究表明,乙烯利刺激橡胶树后能够显著增加 *HbHMGS* 的酶活性^[11],但是尚未见光照、干旱和热击等环境因素对该基因表达调控的报道。启动子是基因编码区上游与基因转录相关的一段非编码 DNA 序列,并且在基因表达与调控方面起到重要作用^[12]。植物启动子根据基因表达调控类型不同可以分为组成型、诱导性及组织特异型启动子几

收稿日期: 2018-12-05

修回日期: 2018-12-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560573); 海南大学热带农林学院作物学科研究生科研创新课题(ZWCX2018030); 海南大学作物学优秀本科生人才培养计划课题(ZWCX2018046)

作者简介: 巩笑笑(1993-),女,海南大学热带农林学院 2016 级硕士研究生. E-mail: 2557500933@qq.com

通信作者: 刘进平(1970-),男,教授,博导. 研究方向: 作物遗传育种. E-mail: liu3305602@163.com

种类型^[3]。目前,花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 启动子和 nos(胭脂碱合酶)启动子^[4]是应用比较广泛的组成型启动子^[3],它能在双子叶转基因植物中高效表达^[4]。由于启动子在表达调控方面的重要作用,笔者克隆了橡胶树 *HbHMGS1* 基因启动子,并构建与 *GUS* 基因融合的植物表达缺失载体,通过农杆菌介导的方法转化烟草和拟南芥进行表达分析,确定了 *HbHMGS1* 启动子在 T2 代转基因拟南芥植株中的组织特异性及对光照、干旱及热击等处理响应表达情况,旨在了解 *HbHMGS1* 基因表达模式及其在橡胶生物合成与对非生物胁迫响应中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验所用的橡胶树叶片取自海南大学试验基地热研 7-33-97 品系嫁接植株。野生型拟南芥种子哥伦比亚型(col-0)及烟草种子(本生烟),植物表达载体 pCambia1301,农杆菌菌株 GV3101 均由本实验室保存;LA Taq DNA polymerase(TaKaRa, RR02MB),限制性内切酶(TaKaRa),T4DNA 连接酶(TaKaRa)均购自大连宝生物公司;质粒 DNA 提取(OMEGA,D6943-02)和胶回收试剂盒(OMEGA,D2500-02)购自北京智远方杰有限公司;生化试剂购自上海生工,Marker,抗生素及 19T 载体购自大连宝生物公司。引物合成和基因测序由上海英潍捷基贸易有限公司完成。GUS 染液配置:2 mmol · L⁻¹ X-GLuc,100 mmol · L⁻¹ Na₃PO₄ 缓冲液,5 mmol · L⁻¹ K₃Fe(CN)₆,5 mmol · L⁻¹ K₄Fe(CN)₆,10 mmol · L⁻¹ EDTA,0.2% Triton X-100。

植物材料的处理:(1)光照处理:选取 2 组长势基本一致且健康的 T2 代转基因拟南芥植株,分别置于持续光照和黑暗条件下进行处理,分别在处理 12,24,48,72,96,120 和 144 h 后进行取样。(2)热击与干旱处理:将 2 组含有 6 个缺失片段的转基因苗 1 组放置在 37 °C 培养箱(16 h 光照/8 h 黑暗)中进行热击处理 5 h 后取样,另外 1 组置于原来环境中停浇水约 10 d 后进行取样,各缺失片段转基因拟南芥苗作为对照不进行任何处理。含有 CaMV35S 启动子的转基因拟南芥植株同时进行以上处理。

1.2 *HbHMGS1* 启动子克隆及缺失表达载体的构建 以橡胶树叶片为主要材料,采用 CTAB 法提取基因组 DNA。下载 NCBI 上已发布的橡胶树 *HbHMGS1* 基因 mRNA 序列(GenBank Accession number: AF396829)和橡胶树全基因组数据库^[7]进行 BLAST 比对,获取 *HbHMGS1* 启动子序列。利用 Primerpremier5 软件设计正向引物 HbHMGS1-F: CGggtaccGCAAACAAGAGGAATGGTTG 及反向引物 HbHMGS1-R: CATGccatggTCTCTACGCCTCTCCAATTCC 扩增 *HbHMGS1* 基因起始密码子 ATG 上游 1 656 bp 的序列,在基因的上下游引物中分别引入了 *Bam*HI 和 *Nco*I 酶切位点,进一步构建 T 载体送测序。以验证正确的包含 *HbHMGS1* 启动子质粒 DNA 为模板,分别在 *HbHMGS1* 启动子上游-1290/-1、-1040/-1、-699/-1、-454/-1 及-213/-1(ATG)处设计 5'缺失特异性引物作为上游引物,反向引物不变,通过 PCR 扩增 *HbHMGS1* 启动子 5'侧翼序列各缺失片段。引物序列分别是,D2-cF(-1290/-1): CGggtaccTCCTTAAATTTAAGAGTTTAACGAG; D3-cF(-1040/-1): CGggtaccTGGATGGCTTCTGATTTGGT; D4-cF(-699/-1): CGggtaccGATTCGTGTCGCATGAGGTT; D5-cF(-454/-1): CGggtaccGAAGTGGGCTCCAAAAGATT 和 D6-cF(-213/-1): CGggtaccTTCTCTCTTGCTGCTTCCA。PCR 产物胶回收后,连接 T 载体经克隆转化后测序验证。将携带 *HbHMGS1* 启动子 5'各缺失片段的 T 载体用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Nco*I 进行双酶切,同时用这 2 个酶对植物表达载体 pCambia1301 进行双酶切,双酶切产物回收后进行连接转化,构建各缺失片段与 *GUS* 基因的融合表达载体,各构建载体分别命名为 D1-1656,D2-1290,D3-1040,D4-699,D5-454 及 D6-213。

1.3 生物信息学分析 将克隆获得的 *HbHMGS1* 启动子序列,通过 DNAMAN 的生物信息分析软件进行序列比对,利用 PlantCARE^[8](<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线软件进行分析预测,以期对 *HbHMGS1* 启动子的功能进行初步的预测。

1.4 农杆菌介导的烟草叶片瞬时转化 将构建好的 *HbHMGS1* 启动子各缺失片段与 *GUS* 融合的植物表达载体通过冻融法转入 GV3101 农杆菌菌株中,取适量的农杆菌转化子扩大培养至 100 mL LB + Rif(25 mg · L⁻¹) + kan(50 mg · L⁻¹) 液体培养基中,至 OD₆₀₀ 值为 1.5 ~ 2.0,用 10 mmol · L⁻¹ MgCl₂,10 mmol · L⁻¹ MES (pH5.7) 和 400 μmol · L⁻¹ AS(乙酰丁香酮)的无菌溶液悬浮,调整菌液浓度使其 OD₆₀₀ 值约为 2.0,室温静置

3 h 后用无针头的注射器将悬浮液注射到生长 1 月左右的烟草叶片背面, 28 °C 培养 3 d, 然后用打孔器取叶片进行 GUS 染色。

1.5 拟南芥转化及转基因植株的鉴定 将前期保存的 *HbHMGS1* 启动子及其缺失启动子菌液扩大培养到 100 mL LB + Rif (25 mg · L⁻¹) + kan (50 mg · L⁻¹) 液体培养基中, 28 °C 培养至 $OD_{600} = 1.0 \sim 1.3$; 5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后收集农杆菌细胞; 配置 $w = 5\%$ 蔗糖的侵染液溶解农杆菌沉淀, 并调整 $OD_{600} \approx 1.0$, 转化前加 $\varphi = 0.02\%$ 的 Silwet L-77, 采用浸花法转化拟南芥。剪去长势较好的野生型拟南芥植株的果夹, 将未授粉的花序浸没在侵染液中约 90 s。待植株成熟后收取 T0 代转基因拟南芥种子, 用 $\varphi = 70\%$ 酒精及 $w = 10\%$ 次氯酸钠进行杀菌, 最后将种子均匀平铺在含有 50 g · L⁻¹ 潮霉素的 MS 培养基上进行筛选。将转入 *HbHMGS1* 启动子及其他缺失片段的转基因拟南芥 T0 代种子经潮霉素抗性板筛选后, 待其成熟进一步提取 T1 代转基因拟南芥植株的 DNA, 以 DNA 为模板使用特异性引物和 GUS 引物进行 PCR 检测。

1.6 组织化学染色及 GUS 活性荧光检测 取 T2 代转基因拟南芥幼苗不同时期和成熟阶段各组织器官进行 GUS 染色, 以 X-Gluc 为底物, GUS 染液浸没材料即可, 37 °C 过夜, 用 70% 乙醇脱色后, 观察染色结果并拍照。GUS 活性的定量分析利用 4-MUG 作为底物^[19-21]。

2 结果与分析

2.1 *HbHMGS1* 启动子及其缺失片段克隆以及植物表达载体的构建 橡胶树 *HbHMGS1* 启动子及 5' 缺失片段的 PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 分别在 1 600 bp, 1 200 bp, 1 000 bp, 700 bp, 500 bp 及 250 bp 处可见特异性单一的条带, 与预期目的条带大小相似(图 1A)。进一步进行产物胶回收, 连接 pMD19T 载体后进行测序, 测序结果与数据库序列一致。将以上测序验证正确的包含 *HbHMGS1* 启动子及 5' 各缺失片段的 T 载体酶切后进一步构建与 GUS 基因的融合植物表达载体。对目的表达载体进行双酶切验证, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1B 所示, 分别在 1 600 bp, 1 200 bp, 1 000 bp, 700 bp, 500 bp 及 250 bp 处各切出一条单一的条带, 这些条带大小与预期结果相符。进一步测序验证, 用 DNAMAN 软件将测序结果与原始序列比对后, 序列正确。结果表明 *HbHMGS1* 启动子及其 5' 缺失片段与 GUS 基因融合的植物表达载体构建成功。

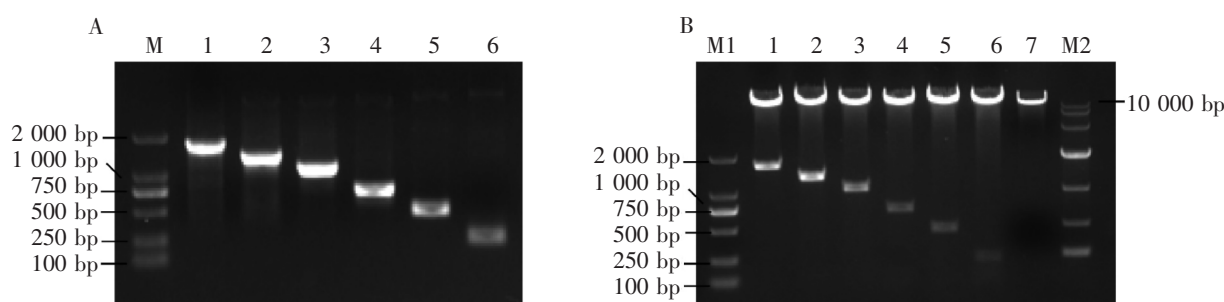


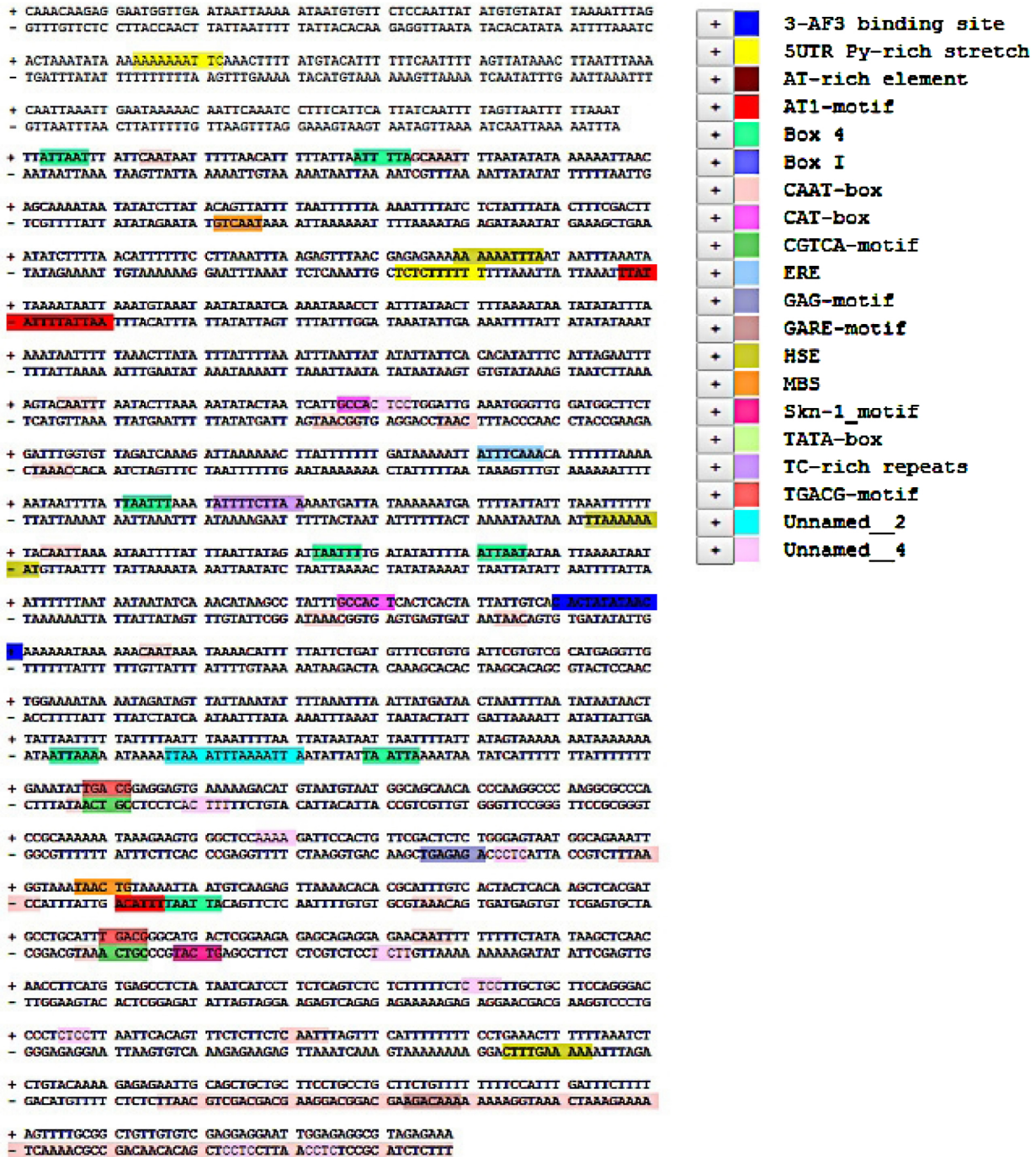
图 1 *HbHMGS1* 启动子 5' 缺失片段克隆及双酶切结果

M, M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; 1-6: 缺失片段-1656/-1, -1290/-1, -1040/-1, -699/-1, -454/-1 及 -213/-1 PCR 产物与植物表达载体的酶切鉴定; 7: PCAMBIA1301 空载体酶切鉴定

Fig. 1 The cloning of 5' deletions of the *HbHMGS1* promoter and identification by restriction enzyme digestion

M, M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; 1-6: The PCR product of 5' deletions and restriction enzyme digestion the expressing vector; 7: Identification of the PCAMBIA1301 vector

2.2 *HbHMGS1* 启动子序列特征分析 将克隆获得的 *HbHMGS1* 启动子序列, 通过 PlantCARE 在线软件分析, 预测结果(图 2)表明, *HbHMGS1* 启动子含有 TATA-box、CAAT-box 等基本顺式作用元件以及多种调控元件, 如 4 个光反应相关元件 AT1-motif、Box 4、Box 1、GAG-motif、1 个乙烯响应元件 ERE、1 个赤霉素响应元件 GARE-motif、2 个茉莉酸响应元件 CGTCA-motif、TGACG-motif、1 个热胁迫相关元件 HSE 及 1 个干旱响应元件 MBS 等其他重要作用元件。

图 2 橡胶树 *HbHMGS1* 启动子顺式作用元件分析Fig. 2 *HbHMGS1* promoter containing different motifs analyzed by PlantCARE

2.3 烟草叶片瞬时表达分析 笔者将构建好的 6 个与 GUS 基因融合的表达载体 D1-4656, D2-4290, D3-1040, D4-699, D5-454 及 D6-213 和阳性对照 pCambia1301 通过农杆菌介导的方法分别转化到烟草叶片中进行瞬时表达。取包含每个缺失片段的烟草叶片进行 GUS 染色, 结果显示, 缺失片段 D1-4656、D2-1290、D3-1040、D4-699 及 D5-454 都能够启动 GUS 基因的表达, 叶片染色显蓝色, 但是 D6-213 缺失启动子却不能够启动 GUS 基因的表达, GUS 染色没有呈现蓝色, 这一结果可能是因为距 ATG 上游的 213 bp (-213/-1) 缺少了转录起始或翻译必须的顺式作用元件, 导致下游 GUS 蛋白不能够正常表达, 且 35S 启动子能够正常启动 GUS 蛋白表达, GUS 染色显蓝色 (图 4), 说明 *HbHMGS1* 启动子具有启动活性。

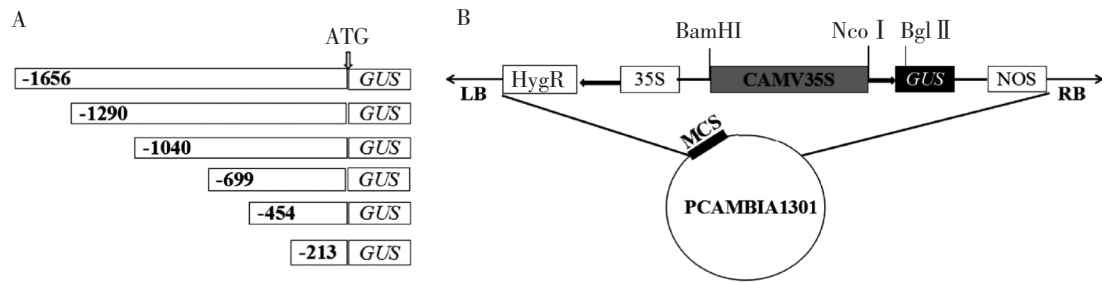


图3 *HbHMGS1* 启动子及其5'缺失启动子与GUS报告基因融合表达载体示意图

A. “-1656”代表ATG上游的1656个核苷酸,其他同理。B. PCAMBIA1301载体示意图 Hyg R: 植物筛选标记; LB: 左边界; RB: 右边界。

Fig. 3 Schematic diagram of the *HbHMGS1* promoter and its different 5' truncated promoters fused to the GUS reporter gene. A. “-1656” represents the nucleotide number was 1656 upstream of ATG, of the *HbHMGS1* promoter. B. The bacterail *hygro-mycin-resistance* gene (*Hyg R*) used as a selectable marker. LB and RB represent the left and right D-DNA border, respectively.

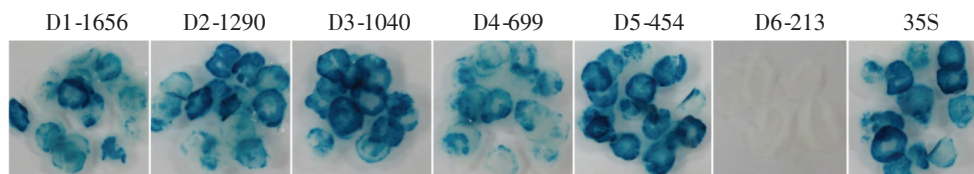


图4 *HbHMGS1* 启动子及其5'缺失片段瞬时转化烟草GUS组织化学染色

Fig. 4 Transient expressions of the *GUS* gene driven by the *HbHMGS1* promoter and its deletions in tobacco leaves

2.4 *HbHMGS1* 启动子在转基因拟南芥植株中的功能分析

2.4.1 *HbHMGS1* 启动子组织特异性分析 按照上述方法将构建好的 *HbHMGS1* 启动子与 *GUS* 融合的植物表达载体通过浸花法转化拟南芥。将检测为阳性植株的 T2 代转基因拟南芥植株进行 GUS 染色,获得了 9 株 T1 代株系,随机挑选 2 个株系进行 GUS 组织化学染色,分别选取了种子春化后生长 6, 12 和 17 d 的幼苗, 45 d 成熟植株的根、茎、叶、花序、果荚,以及 17 d 的 35S 驱动 GUS 转基因植株和野生型拟南芥进行 GUS 染色,染色结果表明, *HbHMGS1* 启动子能够在转基因拟南芥植株的幼苗及成熟苗的各个组织中启动 GUS 基因的表达,且染色后呈现明显的蓝色, 35S 启动子转基因植株的 GUS 染色也很明显,但是野生型拟南芥显示 GUS 基因没有表达(图 5)。

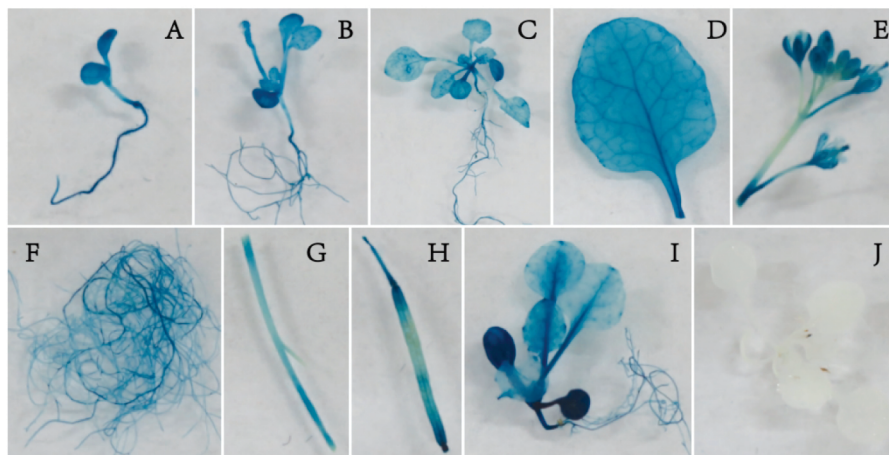


图5 *HbHMGS1*(D1-1656) 启动子在转基因拟南芥幼苗时期及各组织器官中GUS染色结果

A: 6d 天幼苗; B: 12d 幼苗; C: 17d 幼苗; D-H: 分别为 45d 苗的叶片、花序、根、茎和荚; I: 35S 启动子; J: 野生型拟南芥

Fig. 5 The results of GUS staining of *HbHMGS1* (D1-1656) promoter in tissues and organs of transgenic *Arabidopsis* plants

A: A Transgenic plant of 7 days after vernalization; B: A Transgenic plant of 12 days after vernalization; C: A Transgenic plant of 17 days after vernalization; D-H: Leaf, inflorescence, root, stem and silique of plants of 45 days after vernalization, respectively; I: CaMV35S; J: Wild type.

2.4.2 *HbHMGS1* 启动子光照处理 GUS 活性表达分析

笔者将2组含有 *HbHMGS1* 启动子的转基因拟南芥植株同时进行光照及黑暗处理后进行取样提蛋白测其酶活。结果显示: 在持续光照条件下, 光照 24, 48, 72 h 后, GUS 蛋白活性逐渐上升, 且光照处理 96 h 后, GUS 活性增大到处理 72 h 的 3.2 倍, 但是在处理 120 h 后, GUS 活性下降到原来水平, 随后保持平稳(图6)。持续黑暗处理转基因拟南芥苗后, 黑暗处理 12 h ~ 48 h 后, 叶片 GUS 活性检测持续上升, 在继续处理 72, 96 h 后叶片 GUS 活性显著增加, 且分别是处理 48 h 时 GUS 活性的 1.38 倍和 2.13 倍, 但是在黑暗处理 120 h 后 GUS 活性没有继续显著上升, 与处理 96 h 后 GUS 活性相近(图6)。

2.4.3 *HbHMGS1* 启动子及其缺失片段响应热击和干旱

处理表达分析 热击(37 °C)胁迫时, 如图7A所示, D4-699、D5-454 和 D6-213 缺失片段 GUS 活性都有明显的增强, 且分别是未处理之前的 1.40 倍, 1.54 倍及 1.94 倍, 表明 -699 到起始密码子 -1 处的这一段序列中可能存在数个响应热击处理的元件, 且 -656 到 -699 这一区域在响应热击处理后可能抑制了 GUS 基因的表达(图7A)。干旱胁迫时, 如图7B所示, *HbHMGS1* 启动子及其各缺失片段 GUS 活性检测基本有下降, 但 D6-213 缺失片段 GUS 活性增加了 1.63 倍(图7B)。以上数据表明: *HbHMGS1* 启动子响应热击区域可能主要集中在距起始密码子 -1 到上游 -699 这一段序列中; 干旱响应区域则主要位于 -213 到起始密码子 -1 (ATG) 处的 213bp 序列中。

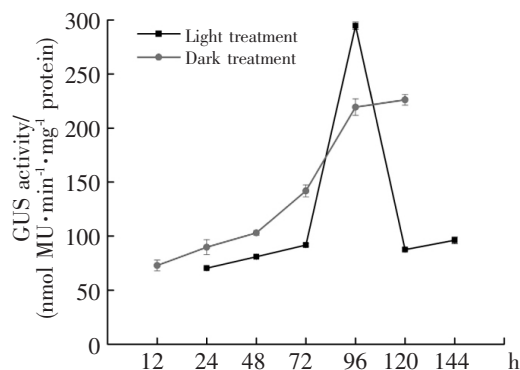


图6 *HbHMGS1* 启动子在转基因拟南芥中光照和黑暗处理中的表达响应

Fig.6 Expressional responses of *HbHMGS1* promoter in transgenic *Arabidopsis* to light and dark treatments

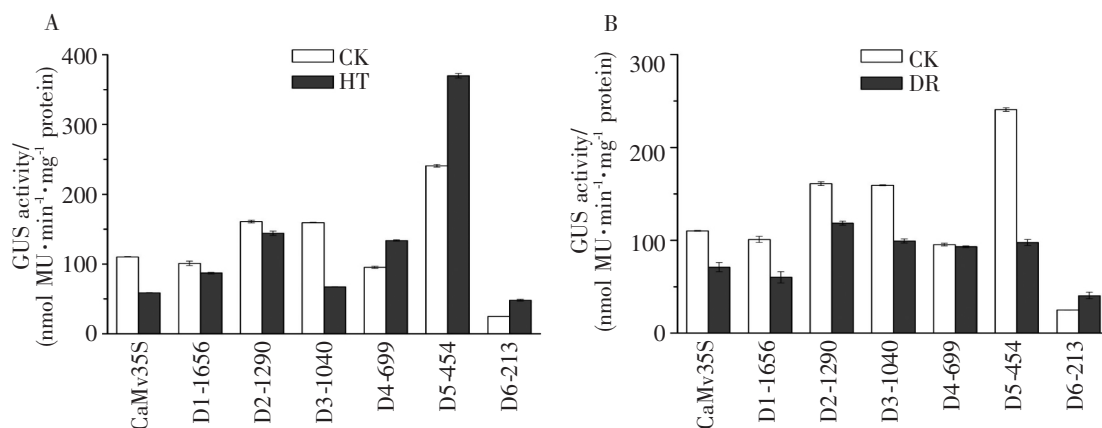


图7 *HbHMGS1* 启动子及其缺失片段在转基因拟南芥中热击(A)和干旱(B)处理中的表达响应

Fig.7 Expressional responses of *HbHMGS1* promoter and its 5' deletions in transgenic *Arabidopsis* to heat shock (A) and drought (B) treatments

3 讨论

本研究以 *GUS* 基因作为报告基因, 通过烟草瞬时表达及稳定转化拟南芥实验分析 *HbHMGS1* 基因 5' 上游启动子序列的启动活性, PlantCARE 在线软件预测发现 *HbHMGS1* 启动子包含多种调控元件, 通过 *GUS* 组织化学染色实验发现, *HbHMGS1* 启动子在转基因拟南芥的幼苗时期及成熟时期的各组织器官中都有启动活性, 其他研究发现芥菜中 *HMGS* 基因也可以在植株所有器官中表达^[21]。以上这一结果可能是因为类异戊二烯是植物中分布广泛的代谢物, 且参与多种重要的生理过程, 而 *HMGS* 基因对于生产各种类异戊二烯化合物起到至关重要的作用^[22,23], 因此, *HbHMGS1* 启动子能够驱动 *GUS* 蛋白在转基因拟南芥植株的各个组织器官中表达。

PlantCARE 在线软件预测发现 *HbHMGS1* 启动子有 4 个光响应相关元件 AT1-motif、Box 4、Box 1、GAG-motif, 且分布在该启动子序列的多个部位。因此, 本研究对包含 *HbHMGS1* 启动子的转基因拟南芥植株进

行了光照和黑暗处理,在光照处理 96 h 左右,GUS 活性瞬间增大后又降低到原来水平,同样在黑暗处理下,GUS 活性逐渐上升且在 96h 左右明显增加,但与光照条件下不同的是,GUS 活性并没有急剧下降而是持续增大该结果表明,*HbHMGS1* 启动子可能同时受光照和黑暗影响。本研究对 T2 代转基因拟南芥植株热击处理后,发现缺失启动子 D4-699、D5-454 及 D6-213 和对照相比 GUS 活性上升,D1-1656、D2-1290 及 D3-1040 GUS 活性则下降,结果表明,-699 到-1 和-1656 到-699 分别存在正调控和负调控的热击信号。启动子在线作用元件预测结果显示,-1656/-1290、-1290/-1040、-1040/-699 及-213/-1 几个区域均存在热击响应元件 HSE(AAAAAATTTC),但是定量 GUS 活性检测中发现,存在热击响应元件 HSE 的几个缺失启动子正负调控并不一致。预测结果还发现,*HbHMGS1* 启动子中包含有干旱诱导的响应元件 MBS,分别位于-1656 到-1290 和-454 到-213 这两个区域,但是,经干旱处理各缺失启动子后,GUS 活性除 D6-213 缺失启动子外均表现下降,MBS 干旱诱导响应元件可能在负调控方面起到重要作用,但仍需进一步的实验验证。

参考文献:

- [1] 许海平,傅国华.我国天然橡胶产业发展趋势 [J].中国热带农业,2007(2): 15-16.
- [2] 柯佑鹏,过建春.中国天然橡胶安全问题的探讨 [J].林业经济问题,2007(3): 199-205.
- [3] 杜亚光.我国天然橡胶产业发展现状及发展趋势 [J].橡胶科技市场,2006(10): 16-18.
- [4] 金华斌,田维敏,史敏晶.我国天然橡胶产业发展概况及现状分析 [J].热带农业科学,2017,37(5): 98-104.
- [5] GRONOVER C S, WAHLER D, PRUFER D. Natural rubber biosynthesis and physic-chemical studies on plant derived latex [M/OI] //ELNASHAR M. Biotechnology of Biopolymers, IntechOpen, 2011. doi: 10. 5772/17144.
- [6] KHAREL Y, KOYAMA T. Molecular analysis of cis-prenyl chain elongating enzymes [J]. Nat Prod Rep., 2003, 20: 111-118.
- [7] SKILLETER D N, KEKWICK R G O. The enzymes forming isopentenyl pyrophosphate from 5-phosphomevalonate(mevalonate-5-phosphate) in the latex of *Hevea brasiliensis* [J]. Biochem J., 1971, 124: 407-415.
- [8] LYNEN F. Biochemical problems of rubber synthesis [J]. J. Rubber Res. Inst. Malaya, 1969, 21: 389-406.
- [9] SUWANMANEE P, SUVACHITTANONT W, FINCHER G B, et al. Molecular cloning of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase in *Hevea brasiliensis* Arg Mull. [J]. Sci. Asia, 2002, 28: 29-36.
- [10] SIRINUPONG N, SUWANMANEE P, DOOLITTLE R F, et al. Molecular cloning of a new cDNA and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from *Hevea brasiliensis* [J]. Planta, 2005, 221: 502-512.
- [11] SUWANMANEE P, SIRINUPONG N, SUVACHITTANONT W. Regulation of the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene in *Hevea brasiliensis* (B. H. K) Mull. Arg, [J]. Plant Science, 2004, 166: 531-537.
- [12] DARE A P, SCHAFFER R J, LIN W, et al. Identification of a cis-regulatory element by transient analysis of co-ordinately regulated genes [J]. Plant Methods, 2008, 4: 17.
- [13] ZHANG C X, WANG W Q, JIANG X N, et al. Review on plant gene promoters [J]. Yi Chuan Xue Bao, 2004, 31(12): 1455-1464.
- [14] YUTAO Y, GUODONG Y, SHIJUAN L, et al. Isolation and functional analysis of a strong specific promoter in photosynthetic tissues [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2003, 46(6): 651-660.
- [15] ODELL J T, NAGY F, CHUA N H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter [J]. Nature, 1985, 313: 810-812.
- [16] BATTRA M J, HALL T C. Histochemical analysis of CaMV35S promoter-bglucuronidase gene expression in transgenic rice plants [J]. Plant Mol. Biol., 1990, 15(4): 527-538.
- [17] TANG C, YANG M, FANG Y, et al. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation [J]. Nat Plants, 2016, 2(6): 16073.
- [18] LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 325-327.
- [19] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J., 1987, 6(13): 3901-3907.
- [20] ZHU Q, SONG B, ZHANG C, et al. Construction and functional characteristics of tuber-specific and cold-inducible chimeric promoters in potato [J]. Plant cell Rep., 2008, 27(1): 47-55.
- [21] ALEX D, BACH T J, CHYE M L. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally

- regulated and stress – responsive [1]. Plant J. 2000, 22(5) : 415 – 26.
- [2] VRANOVÁ, E., COMAN D., GRUISSEM W, et al. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network [J]. Mol Plant, 2012, 5(2) : 318 – 333.
- [3] RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN M, CAMPOS N, FERRER A, et al. Biosynthesis of isoprenoid precursors in *Arabidopsis* [M] // BACH T J, ROHMER M. Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches. New York : Springer Science + Business Media New York, 2013: 439 – 456.

Expressional Responses of the *HbHMGS1* Promoter to Light, Drought and Heat-shock Treatments

GONG Xiaoxiao, YAN Bingyu, TAN Yurong, WANG Peng, LI Shuangjiang,
WANG Yi, ZHOU Luyao, LIU Jinping

(Tropical Agriculture and Forestry Institute/ Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources,
Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) synthase (HMGS) is an important enzyme in the mevalonate (MVA) pathway of isoprenoid biosynthesis, which regulates the rubber biosynthetic pathway in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in coordination with other genes. However, little information is available about the regulation of *HMGS* gene expression. The full-length *HbHMGS1* promoter was cloned, its promoter sequence analyzed with PlantCARE database, and a series of 5'-deletion constructs constructed. The constructs including CaMV35S-GUS were transformed into tobacco and *Arabidopsis thaliana* by using the *Agrobacterium*-mediated method, and characterized quantitatively and qualitatively in transgenic plants with the *GUS* gene as a reporter gene. The GUS histochemical staining was observed in the leaves of tobacco and different tissues of T2 transgenic *Arabidopsis* plants at the young and mature developmental stages. When the T2 transgenic *Arabidopsis* plants containing the *HbHMGS1* promoter were exposed to light and darkness, the activity of GUS protein 96 h after light treatment increased quickly to about 3.2 times of that 72 h after light treatment, and the GUS activity of leaves 72 h and 96 h after dark treatment increased to 1.38 and 2.13 times of that 48-h after dark treatment, respectively. Quantitative detection of the GUS protein activity in response to heat shock and drought treatments showed that the 699-bp sequence from -699 to the start codon-1 might be the major heat shock response region, and that the drought response region was mainly located in the 213-bp sequence from -213 to the start codon-1. These results indicated the *HbHMGS1* promoter may play important roles in regulating of expression of the *HbHMGS1* gene in response to light, heat-shock and drought.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) synthase1 (*HbHMGS1*); promoter analysis; GUS staining

(责任编辑: 潘学峰)