

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230270

牡丹花青素苷合成关键基因 *PsDFR* 启动子活性分析

周琳¹, 袁梦¹, 齐宇^{1,2}, 张梦杰¹, 王雁^{1*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 山东省农业科学研究院, 山东 济南 250100)

摘要: [目的] 分析牡丹花青素苷合成关键基因 *PsDFR* 启动子的顺式作用元件及活性, 为进一步研究 *PsDFR* 启动子的功能及其在牡丹花色形成中的调控机制奠定基础。[方法] 以‘黑花魁’牡丹花瓣中提取的基因组 DNA 为模板, 通过染色体步移法克隆 *PsDFR* 的启动子序列。利用生物信息在线软件预测分析启动子序列的顺式作用元件。构建 5 个不同长度缺失启动子与 GUS 基因融合的表达载体, 并瞬时转化烟草叶片, 通过 GUS 组织化学染色和酶活性检测分析缺失启动子的活性, 及其对脱落酸 (ABA)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、光照等不同胁迫处理的响应。[结果] 克隆得到 *PsDFR* 上游 1 687 bp 的启动子序列。生物信息学分析发现 *PsDFR* 启动子含有多个光信号、激素响应、逆境响应及组织特异表达等顺式作用元件, 这暗示 *PsDFR* 的表达可能受光信号、激素和胁迫等多种信号的共同调节。GUS 组织化学染色和酶活性检测表明, 随启动子片段的缩短, 启动子活性逐渐下降, -1 623 至 -916 区段对于启动子活性具有重要作用。MeJA 和黑暗处理对各启动子片段活性均有显著抑制作用, 恢复光照可促使启动子活性明显回升, 而参与 ABA 响应的核心调控区域位于 -443 至 -76 bp。[结论] *PsDFR* 启动子含有多个光信号、激素响应、逆境响应及组织特异表达等顺式作用元件, 其活性受光的正调控以及 MeJA 的负调控; -1 623 至 -916 bp 间的区域对于启动子活性具有重要作用, -443 至 -76 bp 是响应 ABA 处理的核心区域。该研究为进一步揭示 *PsDFR* 应答环境信号参与牡丹花色形成的分子调控机制提供参考。

关键词: 牡丹; 花青素苷; *PsDFR*; 启动子; 顺式作用元件; 启动子活性

中图分类号: S685.11

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)02-0016-11

花色是观赏植物重要的园艺性状, 也是吸引传粉者的主要因素^[1-3]。花青素苷对植物呈色起重要作用^[4]。在其生物合成途径中, 二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 是下游阶段的关键酶, 可催化二氢黄酮醇还原为无色花青素苷元, 进而转变成橙色到砖红色的天竺葵素糖苷、红色的矢车菊素糖苷和蓝色到紫色的飞燕草素糖苷, 与花色的产生直接相关^[4]。目前, *DFR* 基因的克隆及其功能分析已在亚洲百合 (*Lilium Asiatic hybrids*)^[5]、玫瑰 (*Rosa rugosa*

Thunb.)^[6]、牵牛花 (*Ipomoea nil* (L.) Roth.)^[7]、一品红 (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch)^[8]、马樱杜鹃 (*Rhododendron delavayi* Franch.)^[9] 和橙花龙胆 (*Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (M. Laínz) M. Laínz)^[10] 等多种观赏植物中得到研究。

对不同植物的研究发现, *DFR* 在转录水平上的调控机制十分复杂, 受光照、温度、激素等一系列外部环境和内部因子的影响。孟祥春等^[11] 研究发现经过短暂光照处理的非洲菊 (*Gerbera*

收稿日期: 2023-06-30 修回日期: 2024-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972456); 国家重点研发计划项目 (2018YFD1000405)

* 通讯作者: 王雁, 研究员, 博士生导师。主要研究方向: 花卉分子育种。E-mail: wyancaf@163.com

hybrida Hort.) 花青素苷含量及 *DFR* 基因表达量均显著增加, 且基因表达水平与光照时间呈正相关。在芜菁 (*Brassica rapa* L.) 中, 与花青素苷积累相关的 *BrDFR* 对冷胁迫表现出明显响应^[12]。紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.)^[13]、欧洲油菜 (*Brassica napus* L.)^[14] 和金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.)^[15] 中的 *DFR* 基因可分别响应干旱、盐和植物激素等非生物胁迫, 转录水平发生明显变化。

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 是我国的传统名花, 具有极高的观赏价值和经济价值。研究表明, *PsDFR* 在牡丹花色形成中起重要作用^[16-18], 不仅作为转录因子 *PsbHLH1* 的靶基因参与调控花青素苷的生物合成, 还可能与转运蛋白 *PsGSTF3* 互作, 与花青素苷的转运和积累相关^[19-20]。启动子是位于结构基因上游的一段 DNA 序列, 包含控制基因表达的多种调控元件, 能够特异性结合 RNA 聚合酶, 在基因表达调控中起核心作用^[21]。开展启动子研究对于理解基因的时空表达模式^[22]、环境响应机制^[23] 等具有重要意义。

本研究利用染色体步移法从牡丹花瓣中克隆了 *PsDFR* 的启动子序列, 对其顺式作用元件进行了分析, 探究了不同长度缺失启动子的活性及其对 ABA、MeJA、光照等不同胁迫处理的响应, 并初步确定了相关调控区域, 为进一步研究 *PsDFR*

启动子的功能及其在牡丹花色形成中的转录调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以‘黑花魁’牡丹 (*P. Suffruticosa* ‘Hei Hua Kui’) 盛花期花瓣为试材。于4月中下旬, 取自中国林业科学研究院玉泉山牡丹资源圃, 用锡箔纸包好, 经液氮速冻后, 保存于-80℃超低温冰箱。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 购自北京天根生化科技有限公司。烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 野生型为本实验室保存, 在23℃、16 h/8 h 光暗周期下生长。

1.2 *PsDFR* 启动子的克隆和顺式作用元件分析

参照北京天根生化科技有限公司 Plant Genomic DNA Kit 说明书提取‘黑花魁’花瓣基因组 DNA。根据课题组已克隆的 *PsDFR* 基因 cDNA 序列 (Accession No: HQ283448) 及前期获得的牡丹花瓣转录组数据库 (Accession No: PRJNA594258), 利用生物学软件 Primer Premier 5.0 设计特异引物 *PsDFR*-F/*PsDFR*-R (表1), 用于 *PsDFR* 基因的 gDNA 全长序列扩增。根据测序得到的 DNA 序列, 在启动子下游不同位置设计3条特异性嵌套反向引物 SP1、

表1 *PsDFR* 启动子克隆和活性分析相关引物

Table 1 The primers used in cloning and functional analysis of *PsDFR* promoters

用途 Usage	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
<i>PsDFR</i> 启动子克隆 Cloning of <i>PsDFR</i> promoter sequence	<i>PsDFR</i> -F	ATGGAGGTAGAAAGAGTTCAGTCA
	<i>PsDFR</i> -R	TTACTGGGGAAGCTTGTTGAGCTT
	SP1	CACTTCATTCTCAGGGTCCTTGG
	SP2	CCACAGGGTCAAATGGGTATCC
	SP3	ATTCTCTGGATCCCGCACCGTG
<i>PsDFR</i> 系列缺失片段构建 Construction of <i>PsDFR</i> series deletion fragments	1301- <i>PsDFR</i> p0-F	tcctctagagtgcacctgcagTTGTGCGACTACGGAAGCAG
	1301- <i>PsDFR</i> p0-R	ttaccctcagatctaccatggTTGCTTTTGTTTTTTAAC
	<i>PsDFR</i> (1287)-F	tcctctagagtgcacctgcagTTTGAATTAGTTTGTTTTAAT
	<i>PsDFR</i> (980)-F	tcctctagagtgcacctgcagTTCGTGTCATCTTCTCTTCT
	<i>PsDFR</i> (507)-F	tcctctagagtgcacctgcagGAAATAACCACCTGCAGTT
<i>PsDFR</i> (140)-F	tcctctagagtgcacctgcagCAGCTGGTGAGTTGATCACC	

注: 1301-*PsDFR*p0-R和5条正向引物分别配对扩增产生不同长度的*PsDFR*启动子片段

Note: 1301-*PsDFR*p0-R and 5 forward primers were paired and amplified to generate *PsDFR* promoter fragments of different lengths

SP2、SP3 (表 1), 以花瓣基因组 DNA 为模板, 按照 TaKaRa 公司的 Genome Walking Kit 说明书, 连续开展 3 轮 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收清晰条带, 连接到 pMD-19T 载体上并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取转化平板上的白色菌落进行培养, 通过菌液 PCR 和质粒酶切鉴定阳性克隆后, 委托生工生物公司 (上海) 测序。

利用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) 分析启动子序列所包含的调控元件, 并用 TBtools 软件绘制各顺式作用元件分布图; 通过 TSSP 在线网站 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>) 预测转录起始位点。

1.3 不同缺失表达载体的构建

根据 *PsDFR* 启动子的全长序列, 设计了 5' 端分别含有相应侧翼序列和酶切位点的扩增引物 1301-*PsDFR*p0-F 和 1301-*PsDFR*p0-R (表 1), 以包含全长启动子序列的质粒为模板, 通过同源重组方法将 *PsDFR* 启动子构建至 pCambia1301-GUS 表达载体上。根据 *PsDFR* 启动子顺式作用元件的分布情况, 设计了 4 条启动子系列缺失引物, 分别命名为 *PsDFR*(1287)-F、*PsDFR*(980)-F、*PsDFR*(507)-F 和 *PsDFR*(140)-F (表 1)。以上述构建好的 *PsDFR* 全长启动子重组质粒为模板, 以 1301-*PsDFR*p0-R 为共用反向引物, 通过同源重组方法, 构建了不同长度启动子片段的 pCambia1301-GUS 融合表达载体。最后, 对含有 5 个不同长度启动子片段, 即 1 687 bp (-1 623 至 + 64)、1 287 bp (-1 223 至 + 64)、980 bp (-916 至 + 64)、507 bp (-443 至 + 64) 和 140 bp (-76 至 + 64) 的重组质粒进行菌液 PCR 和测序验证后, 用于启动子瞬时表达分析。

1.4 重组质粒农杆菌菌液转化烟草的瞬时表达分析

将构建好的 5 个不同长度启动子融合表达载体的质粒分别转化到农杆菌 GV3101 中。菌液 PCR 验证后, 取 2 mL 接种于 50 mL LB 液体培养基 (含 50 mg·L⁻¹ Rif、50 mg·L⁻¹ Kan 和 25 mg·L⁻¹ Gen) 中过夜培养至 OD₆₀₀=1.0 左右。离心收集菌体, 用悬浮液 (含 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、

10 mmol·L⁻¹ MES 和 100 μ mol·L⁻¹ AS) 重悬至 OD₆₀₀ 约等于 0.6, 室温避光静置 3 h 以上后, 取 2 mL 分别注射到 4~5 叶期的烟草叶片中。72 h 后取侵染后的叶片放入 GUS 染色液进行组织化学染色。70% 乙醇浸泡脱色后拍照记录。以注射 pCambia1301-35S-GUS 空载体的叶片为阳性对照, 注射无菌水的叶片为阴性对照。

1.5 不同处理下 *PsDFR* 启动子的 GUS 活性分析

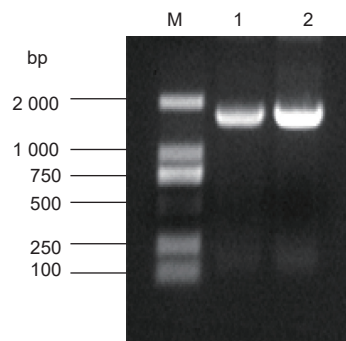
为分析 *PsDFR* 启动子对不同激素的响应, 取不同菌液注射 2 d 后的烟草植株, 对其叶片正反面分别喷洒外源茉莉酸甲酯 (MeJA, 100 μ mol·L⁻¹) 和脱落酸 (ABA, 100 μ mol·L⁻¹) 直到叶面呈滴水状态, 其中 MeJA 喷洒后进行套袋密闭处理。以喷洒清水的烟草叶片为对照, 每组设置 5 个重复, 处理 24 h 后取样 (每 12 h 追加喷洒一次)。同时, 为了解启动子对光照诱导的响应, 对侵染 2 d 后的烟草植株分别进行暗培养 24 h 后取样, 以及暗培养 24 h 后恢复全光照培养 12 h 后再取样两种处理。每组设置 5 个重复。所有样品经液氮速冻后, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。参照阴霞等^[24]的方法, 利用荧光分光光度计检测 GUS 酶活。

运用 SPSS19.0 的 Duncan's 新复极差法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *PsDFR* 启动子克隆及顺式作用元件分析

以牡丹基因组 DNA 作为模板, 利用染色体步移法进行 3 次巢式 PCR 后, 扩增到 1 条长为 1 687 bp 的目的片段 (图 1)。生物信息学预测结



注: M: DNA 分子量标准 DL2000; 1,2: *PsDFR* 启动子 PCR 扩增产物
Notes: M: DNA marker DL2000; 1,2: *PsDFR* promoter PCR amplification product

图 1 牡丹 *PsDFR* 启动子的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR production of *PsDFR* promoter from tree peony

果显示, *PsDFR* 启动子含有多个 CAAT-box, 转录起始位点位于翻译起始密码子 ATG 上游 63 bp

处。转录起始位点上游 16 bp 处有一个 TATA-box 结构 (图 2)。

```

-1 623 TTGTCGACTA CGGAAGCAGA GTATTTTGCT GCTGCTGCTT GTTCTTGTC A GTGTGTCTGG ATACAGAGAA
-1 553 TTCTTGTCAG TCTTGGCAT GAAAAGTGTAA AGTGTGTAC TTTATTTTGT GA[CAAT]ACTT CTG[CAAT]TAA
-1 483 GTTAGCCAAG AACCTGTGT TTCATGGTAG AAGCAAACAC ATCAGTGTGA GATTTCAATTT CATTTCGAGAT
-1 413 CTTACTAAGG ATGGTGTGT GAAACTTGAA TTATGTGGGA GCAGTGAGCA GCTCGCAGAC ATTTTAAACA
-1 343 AGCCTTTGAA GTTAGAAGCA TTTGAAAGGT TTCGAAGAAT GCTTGGAGTT GTGGCCAAAG AAGAAGTAAA
-1 273 CTGAAGTGC TTCATCAGCT TCAGTTTAGG GGAAGGATTG TTATTGTTTCG TTTGAATTAG TTTGTTTTAA
-1 203 TTAGTTTGT TGTGTTGAAGT [CAAA]AACTT CTGTATTTTA GGAGAAGTTA GAATCAGTCA TTAAGTTTGT
-1 133 TTGTGTTTGT ACGAGTCCTT AGATGAGTCG CCA[CAAT]CTC AGGGTTGTTG AGATGTGGTT AAGTTTTTAT
-1 063 TTCCCTGTAC G[CAAA]TGCT ATTTAAAGTC AGTTTGACAT GAT[CAAT]AAA TATGAAAACA GAGATTTTTC
-993 ATCAGTGTGT CCTT[TATA]AT AACAGGTTTG AGTCCAAAGT TTGAGTTTTT TGCCCTTTTT CTCTCTGGG
-923 TGGGCTTTTC GTCATCTTTC TCTCCTCGG AGTCTGATAA GAAGACTTTC TTCTCGCGAT CGGCAAGTTG
-853 TTTAA[CAAT]G TGATCTGGAA TCATTCCATC ACTGCCAAAA AAATACTGCT CTGTTTCTGG TTCTTCGCATA
-783 ACATCATGGA [CAAA]TCATC CGCTCGTGAT GGTCTGGTG TTTTCTTTTG AGTCCATTGT CTGCGACGTT
-713 CTTTACCTTC ACGAA[CAAT]C CTTGCTTTAT TATCTATCTG ATTTTTTCTT AGCTCTTCAT CTTGTTGTAC
-643 TCCCTGCTCG GCTGTGAACT CCTTCGGTGC ATTGGAGT[TA TA]CTCTTCTC GATTC[CAAT]C TCTTTTTTCG
-573 ATCTCTAGGG TTTACGAAGG AGAGGTTTTA CTAACCTGA TTTTCTACA GAAAGGGGAC TGTAACAGAC
-503 TTGACGATTC TCCACCGTCC ACTTTTTAAT TTAACATCAG TTTATGAATA GGTTTACAAG GAAATAACCA
-433 CCTGCAGTTT TTTAAAACGT GGGGTATGTA TTTTCAACAT AAATGTTTCA TTTATA]ACAA AGAAACTCTG
-363 CAAACAGAGG AAAGAAAAAG ATTAACCATG GTGCAGAAGA CGGCAGGAAA AA[CAAT]AGTA AA[TATA]GGTT
-293 AATTTTTTAAATATTATCTC CCTATTGTTT TAAAATTAA AAAAGACCTC AAAAATGTGG GATGTATGTT
-223 ATCAAAAATG CAGGGGCATT TTTTGTTTCA TAAT[TATA]GG ATGAGGGTGA CAAAATGGTA GATGCACGTA
-153 ACATCATCTT AATTTTATTC AAAACTCTAT TCGGAAAACG TGGAGCGGGT AGACAACATA CAGCCCACGT
-83 GCCAGCTGGT GAGTTGATCA CGTGATTGGG AAGTTAAAC GTGTTAGATG GCTCACCTAC CCGTGTG[TAT]
-13 [AAA]ACAAAGC TAGC[AT]GAAC CCAAACACAG CCAAATTCT ATTCTCTCCT CGTATCGTGG TAAAAAACA
58 AAAGCAAATG

```

注: C 为转录起始位点, 该位置标记为 + 1; 数字表示相对于转录起始位点 + 1 的位置; ATG 为翻译起始位点; 方框内序列为 CAAT box 或 TATA box

Notes: 'C' represents the transcriptional start site which position is defined as + 1; Numbers indicate the positions relative to the transcription start site 'ATG' represents the translation start site; CAAT box or TATA box are framed

图 2 *PsDFR* 基因启动子序列

Fig. 2 The sequence of the *PsDFR* promoter

如表 2、图 3 所示, *PsDFR* 启动子除含有核心启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box 外, 还包含参与大多数植物启动子转录起始过程的 Inr 元件 INRNTSPADB 和大量光调控元件, 有 G-Box、Box 4、GA-motif、GATA-motif、TCCC-motif、TCT-motif、GT1-motif、I-Box、SORLIP1AT 和 TBOXATGAPB 等, 以及多个激素和胁迫响应相关元件。其中, 激素响应元件包括: ABA 响应元件 ABRE 和 DPBFCORED CDC3; 细胞分裂素诱导

相关元件 ARR1AT; 乙烯诱导相关元件 ERE; GA 响应元件 GARE-motif 和 TATCCAOSAMY; 茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif 等。逆境胁迫响应元件包括: 水分胁迫相关响应元件 ACGTATERD1 和 CBFHV; 低温响应元件 CRTDREHVCBF2 以及受伤和病原体应答相关元件 W box 等。值得注意的是, 其他作用元件中类黄酮生物合成相关的调控元件或转录因子识别位点 MYBCORE、MYBPLANT 和 MYCCONSEN-

表 2 应用 PlantCARE 和 PLACE 预测 *PsDFR* 启动子区顺式作用元件特性Table 2 *cis*-acting regulatory elements characteristic of *PsDFR* promoters by PlantCARE and PLACE

元件种类 Element type	基序名称 Motif name	基序 (5'-3') Motif (5'-3')	数量 No.	功能 Function
核心启动子 Core promoter	CAAT-box	CAAT	8	启动子和增强子区调控元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
		CAAAT	3	
	TATA-box	TATA/TATAAA	5/1	转录起始-30核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start
	INRNTPSADB	YTCANTYY	3	Inr (initiator) elements
光调控 Light regulatory	Box 4	ATTAAT	1	参与光响应的保守DNA模块的部分元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
	G-Box	CACGTG (T)	8	参与光响应的元件 Element involved in light responsiveness
	GA-motif	ATAGATAA	1	部分光应答元件 Part of a light responsive element
	GATA-motif	GATAGGA	7	部分光应答元件 Part of a light responsive element
	TCCC-motif	TCTCCCT	1	部分光应答元件 Part of a light responsive element
	TCT-motif	TCTTAC	1	部分光应答元件 Part of a light responsive element
	GT1-motif	GGTTAA	5	光应答元件 Light responsive element
	I-Box	GATAAG	6	部分光应答元件 Part of a light responsive element
	SORLIP1AT	GCCAC	2	参与光响应的元件 Element involved in light responsiveness
	TBOXATGAPB	ACTTTG	1	参与光响应的元件 Element involved in light responsiveness
激素相关 Hormone response	ABRE	ACGTG	13	ABA响应元件 Element involved in the abscisic acid responsiveness
	ARR1AT	NGATT	14	细胞分裂素诱导相关元件 Induced by cytokinin
	DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	3	ABA诱导相关元件 Induced by ABA
	ERE	AWTTCAAA	1	乙烯诱导相关元件 Induced by ethylene
	GARE-motif	TAACAAR	6	赤霉素响应元件 GA-responsive element
	TGACG-motif	AACGTG	3	茉莉酸甲酯响应元件 Element involved in the MeJA-responsiveness
	T/GBOXATPIN2	AACGTG	3	茉莉酸响应元件 Element related to jasmonate signaling
	TATCCAOSAMY	TATCCA	1	糖和赤霉素诱导相关元件 Induced by sugar and GA
逆境胁迫 Stress response	W box	TGAC	13	诱导子、受伤及病原体应答, 结合WRKY类转录因子 Inducer, injury and pathogen responses, combined with WRKY transcription factors
	ACGTATERD1	ACGT	14	脱水胁迫诱导相关元件 Induced by dehydration stress
	CBFHV	RYCGAC	2	失水响应元件 Element involved in dehydration-responsiveness
	CRTDREHVCBF2	GTCGAC	2	低温响应元件 Element involved in low temperature-responsiveness
组织特异表达 Tissue specific expression	CACTFTPPCA1	YACT	17	叶肉细胞特异表达元件 Mesophyll specific element
	GTGANTG10	GTGA	14	花粉特异表达相关元件 Pollen specific element
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	10	<i>lat52</i> 基因花粉特异激活元件 Element responsible for pollen specific activation of <i>lat52</i> gene
其它 Others	MYBCORE	CNGTTR	3	类黄酮生物合成调控元件 Element involved in the regulation of flavonoid biosynthesis
	MYBPLANT	MACCWAMC	2	植物MYB结合元件 Binding site of plant MYB, known as flower-specific protein activating flavonoid biosynthesis
	MYBPZM	CCWACC	1	花青素合成的诱导元件 Induced by anthocyanin biosynthesis
	MYCCONSENSUSA T	CANNTG	12	MYC/bHLH 识别位点 Binding site of MYC/bHLH, known as protein regulating flavonoid biosynthesis
	CARGCW8GAT	CWWWWWWWWWG	4	MADS-box 特异结合位点 Binding site of MADS-box
	CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	4	昼夜节律响应元件 Element involved in circadian

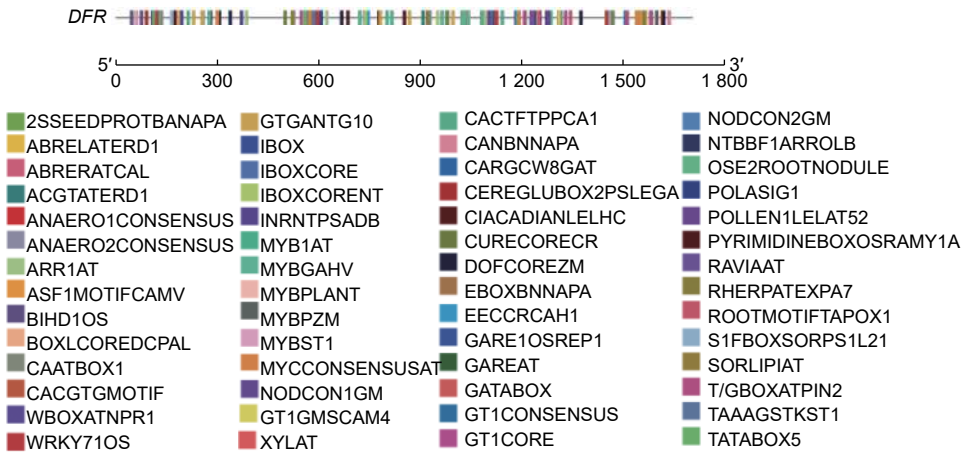


图 3 *PsDFR* 启动子顺式作用元件分布图

Fig. 3 Distribution map of the *cis*-elements of *PsDFR* promoter

SUSAT 多达 17 个。这些元件的存在表明 *PsDFR* 在牡丹花青素苷的生物合成中发挥重要作用, 并可能在转录水平上受到光照、激素 (如 GA、ABA、乙烯) 和非生物胁迫 (如干旱、低温) 等多种因素的调节。此外, 在 *PsDFR* 启动子序列中还发现了叶肉细胞特异表达作用元

件 CACTFTPPCA1、花粉特异激活元件 POLLEN1LELAT52 和 GTGANTG10 等控制基因器官特异表达的作用元件, 说明 *PsDFR* 在植物体内的表达可能具有一定的器官特异性。

2.2 启动子不同缺失片段的表达载体构建

5 个不同长度的缺失片段 (图 4) 是根据

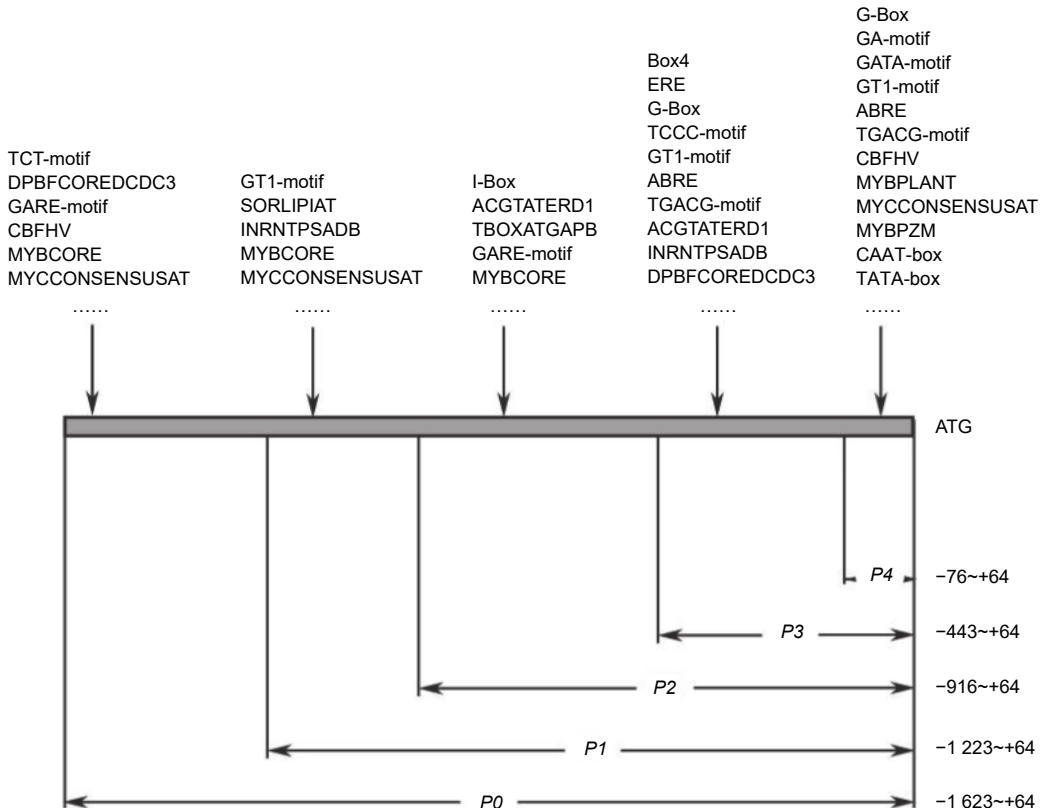
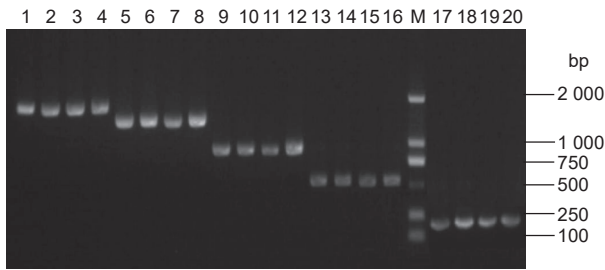


图 4 *PsDFR* 启动子缺失片段

Fig. 4 Schematic diagram of the *PsDFR* promoter deletions

PsDFR 启动子顺式作用元件预测结果, 从转录起始位点上游 1 623 bp 的 5'端对启动子序列进行逐步删除, 最终获得: 1687 bp (P_0 , -1623 至 + 64)、1287 bp (P_1 , -1223 至 + 64)、980 bp (P_2 , -916 至 + 64)、507 bp (P_3 , -443 至 + 64) 和 140 bp (P_4 ; -76 至 + 64)。

利用同源重组的方法将获得的 *PsDFR* 启动子全长序列 P_0 构建到 pCAMBIA1301-GUS 表达载体上, 菌液 PCR 和测序结果证明该序列已经替换了原有的 35S 启动子并与 GUS 基因融合 (图 5), 重组质粒被命名为 pCAM-*PsDFR*p0。以该质粒为模板, 通过同样的方法, 经菌液 PCR 和测序验证, 获得了另外 4 个不同缺失片段的 pCAMBIA1301-GUS 融合表达载体 pCAM-*PsDFR*p1、pCAM-*PsDFR*p2、pCAM-*PsDFR*p3 和 pCAM-*PsDFR*p4 (图 5)。

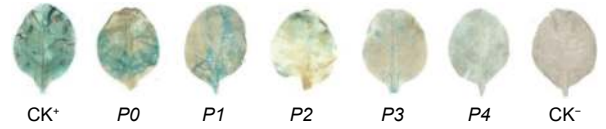


注: M: DNA marker DL2000; 1~20: 阳性克隆 PCR 扩增; 1~4: pCAM-*PsDFR*p0; 5~8: pCAM-*PsDFR*p1; 9~13: pCAM-*PsDFR*p2; 13~16: pCAM-*PsDFR*p3; 17~20: pCAM-*PsDFR*p4
Notes: M: DNA marker DL2000; 1~20: PCR amplification of positive clones; 1~4: pCAM-*PsDFR*p0; 5~8: pCAM-*PsDFR*p1; 9~13: pCAM-*PsDFR*p2; 13~16: pCAM-*PsDFR*p3; 17~20: pCAM-*PsDFR*p4

图 5 *PsDFR* 启动子及其缺失片段的融合表达载体验证
Fig. 5 Verification of *PsDFR* promoter and deletion fragment fusion expression vector

2.3 启动子缺失片段在烟草叶片中的瞬时表达及 GUS 染色分析

为研究 *PsDFR* 启动子各区域的表达活性, 将含有不同缺失片段的融合表达载体分别转化农杆菌后, 注射至烟草叶片中进行 GUS 组织化学染色分析。结果由图 6 所示, 注射无菌水的阴性对照的叶片没有染色, 而由启动子 CaMV35S 驱动阳性对照 GUS 染色最明显。在不同 *PsDFR* 启动子缺失片段的瞬时表达中, 随着启动子 5'端序列的缺失, 染色程度由深到浅变化, 染色部位也越来越小。特别是全长启动子 P_0 在相继缺失了 -1 623 至



注: CK⁺: 阳性对照 (CaMV35S); CK⁻: 阴性对照

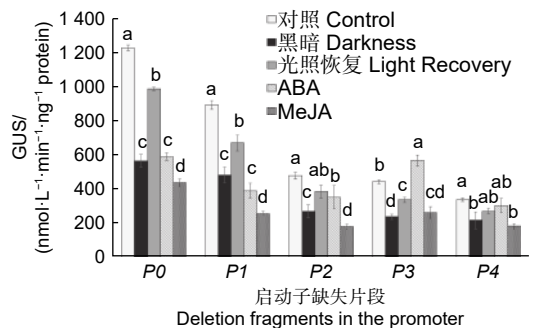
Notes: CK⁺: Positive control (CaMV35S); CK⁻: Negative control

图 6 *PsDFR* 启动子缺失片段瞬时转化烟草染色结果
Fig. 6 Detection of transient expression of different *PsDFR* promoter deletion regions in tobacco leaves

-1 223 (P_1) 以及 -1 223 至 -916 (P_2) 之间的区域后, 缺失材料的 GUS 染色明显变浅, 最后仅在叶脉周围观察到稀疏分散的蓝色斑点, 表明 5 个缺失片段均具有启动子活性, 但活性随片段的缩短而减弱, -1 623 至 -916 之间的区域对于其活性具有重要作用。

2.4 光照和激素对启动子不同缺失片段活性的影响

对不同农杆菌侵染 48 h 后的烟草分别进行 ABA、MeJA、黑暗和光照处理后, 检测叶片 GUS 活性, 结果如图 7 所示, 对照中, GUS 活性随启动子缺失片段的缩短而不断降低, 这与染色结果 (图 6) 相一致。黑暗处理后, 所有启动子缺失片段诱导的 GUS 酶活性均受到不同程度抑制, 恢复光照后, 除 P_4 外其余启动子活性均有显著升高 ($p < 0.05$); ABA 处理明显抑制了 P_0 和 P_1 下游 GUS 的表达活性, 与对照相比, 分别下降了 51.85% 和 56.12%, 但随着 5'端序列的逐渐缺失, ABA 对启动子 P_2 的抑制作用明显降低, 并反



注: 不同小写字母表示处理与对照之间差异显著 ($p < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate the significant difference between treatment and untreated control ($p < 0.05$)

图 7 光照和激素诱导下 *PsDFR* 启动子缺失片段驱动的 GUS 活性分析

Fig. 7 Analysis of the GUS activity driven by *PsDFR* promoter deletion regions in response to light and hormone treatments

而促进了 *P3* 的启动子活性, 约达对照的 1.28 倍; MeJA 明显抑制了不同启动子片段诱导的 GUS 活性, 与对照相比, 均下降了 40% 以上。

3 讨论

本研究利用染色体步移法从牡丹花瓣中分离到 *PsDFR* 基因长 1 687 bp 的启动子序列。该序列位于转录起始位点上游的 -1 623 bp 处, 除了包含调控转录起始精确度和效率的核心启动子元件外, 还具有光响应元件、激素和逆境胁迫相关元件以及组织特异性表达相关元件等。

前期研究发现, 随着花朵的着色, *PsDFR* 基因的表达量与花青素苷的含量呈正相关, 并且在花瓣中特异高表达, 在叶片、萼片、雄蕊和心皮中的表达水平很低^[16,25]。然而, 除一些花粉特异激活元件外, 在 *PsDFR* 启动子中未发现其他花器官相关特异元件。Roh 等^[26] 通过启动子缺失发现, 花瓣特异性启动子 *PISTILLATA* (BnPI) 中的光响应元件 G-box 可能与花瓣特异性表达有关。Imai 等^[27] 发现在菊花 (*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel.) *CmCCD4a* 的 ATG 上游存在一些与花瓣特异性表达相关的未知顺式元件。在非洲菊中, 不同花器官间的着色差异与 *DFR* 启动子的结构无关, 而是由调控其表达的上游转录因子启动子上的空间特异性顺式作用元件调控的^[28]。因此, 为了明确哪些顺式元件在 *PsDFR* 的花瓣特异性高表达中起重要作用, 还需对其启动子或与其互作的转录因子启动子进行更全面、细致的片段缺失分析。

在启动子缺失片段的 GUS 染色分析中, 发现不同区域的 *PsDFR* 启动子表达活性具有明显差异。全长启动子片段 (*P0*) 活性最高, 但随着 5'端序列的逐步缺失, 活性不断降低。特别是删除 -1 623 至 -916 之间 707 bp 的片段后, 启动子活性迅速下降, 推测该片段中可能含有与启动子活性相关的核心元件。根据顺式元件分析结果, 发现该片段包含 2 个 Inr 元件 (INRNTPSADB)。Nakamura 等^[29] 证实该元件可在缺乏 TATA-box 的情况下对转录激活起关键作用。在 *PsDFR* 启动子中, Inr 元件是否在 TATA-box 存在的情况下也具有激活转录起始的作用, 还有待进一步研究。

光照是影响植物合成花青素苷的重要环境因子之一, 不同光质、光照强度和光周期信号可通过促

进或抑制类黄酮合成相关基因的表达, 调控花青素苷的合成和积累。Hartmann 等^[30] 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) *CHS* 启动子区域发现了一个由 G-Box 核心元件 (ACGT) 和 MYB 识别元件 (ACCWACCNN) 组成的光响应单元 LRU。小麦 (*Triticum aestivum* L.) *TaDFR-B* 在花青素苷积累的部位高表达, 并受光诱导明显上调, 也与其启动子中包含这两个元件有关^[31]。本研究中, *PsDFR* 启动子也含有该元件组合 (G-Box 和 MYBPZM), 并同时具有 Box4、GA-motif、TCT-motif、GT1-motif、I-Box 等多个光响应元件。光处理后, 不同启动子缺失片段对光照变化均有明显响应, 即在黑暗条件下启动子活性降低, 恢复光照后启动子活性升高, 这与 Gollop 等^[32] 对葡萄 (*Vitis vinifera* L.) *DFR* 启动子的研究结果一致, 推测这些元件在牡丹花青素苷生物合成对光照的响应中起重要作用。

除光照外, *DFR* 在表达过程中还受 ABA、MeJA 等多种激素影响。如 ABA 可上调草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.)^[33] 和葡萄^[34] 果实中 *DFR* 的表达水平, 进而促进花青素苷的积累; 红肉苹果 (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana* (Dieck) Langenf.) *MdDFR* 的转录受 MeJA 正调控, 但受 ABA 负调控^[35]。目前, 关于激素如何影响牡丹 *DFR* 的表达以及 *DFR* 的启动子活性如何响应激素处理的报道很少。在 *PsDFR* 启动子中, 发现了典型的 ABA 响应元件 ABRE 和 DPBFCOREDCDC3 以及 MeJA 响应元件 TGACG-motif 和 T/GBOXATPIN2。ABA 处理抑制了 *P0* 和 *P1* 的启动子活性, 但对启动子缺失片段 *P2* 的抑制作用明显降低, 而 *P3* 的启动子活性显著高于对照, 推测这与启动子 -443 至 -76 bp 序列区段存在 ABA 应答相关元件有关, 且 -1 623 至 -916 bp 之间可能存在抑制 ABA 响应的未知元件。在 MeJA 方面, 尽管 MeJA 处理通常被认为可促进花青素苷的积累^[36], 但在拟南芥、甘薯 (*Ipomoea batatas* Lam.) 等植物中发现, 受糖信号、品种及组织特异性或处理浓度的影响, MeJA 处理也会对 *DFR* 基因的表达及花青素苷合成起抑制作用^[37-38]。本研究中, MeJA 处理后各缺失片段的启动子活性均有明显下降, 推测 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 在‘黑花魁’牡丹花青素苷的合成中

可能起负调控作用。

4 结 论

DFR 是植物花青素苷生物合成下游阶段的关键酶。本研究通过染色体步移法分离了牡丹 *PsDFR* 基因长 1 687 bp 的启动子序列。顺式作用元件分析结果表明 *PsDFR* 的表达可能受光信号、激素和胁迫等多种信号的共同调节。通过对瞬时转化烟草叶片的 GUS 组织化学染色和酶活性进行分析,明确了 *PsDFR* 启动子活性受光的正调控以及 MeJA 的负调控;-1 623 至-916 bp 间的区域对于启动子活性具有重要作用,-443 至-76 bp 是响应 ABA 处理的核心区域。上述结果为进一步揭示 *PsDFR* 响应不同环境信号参与牡丹花色形成的调控机制提供参考。

参 考 文 献:

- [1] SHANG Y J, VENAIL J, MACKAY S, *et al.* The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum*[J]. *New Phytologist*, 2011, 189(2): 602-615.
- [2] SHRESTHA M, DYER A G, BOYD-GERNY S, *et al.* Shades of red: bird-pollinated flowers target the specific colour discrimination abilities of avian vision[J]. *New Phytologist*, 2013, 198(1): 301-310.
- [3] ZHAO D Q, TAO J. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 261.
- [4] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 733-749.
- [5] NAKATSUKA A, IZUMI Y, YAMAGISHI M. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the Asiatic hybrid lily[J]. *Plant Science*, 2003, 165(4): 759-767.
- [6] LUO P, NING G G, WANG Z, *et al.* Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red color flower formation in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1257.
- [7] WATANABE K, KOBAYASHI A, ENDO M, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B* (*DFR-B*) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea* (*Pharbitis*) *nil*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 10028.
- [8] GU Z Y, CHEN H, YANG R N, *et al.* Identification of DFR as a promoter of anthocyanin accumulation in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, willd. ex Klotzsch) bracts under short-day conditions[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 236: 158-165.
- [9] SUN W, ZHOU N N, WANG Y H, *et al.* Characterization and functional analysis of *RdDFR1* regulation on flower color formation in *Rhododendron delavayi*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 169: 203-210.
- [10] YU T T, HAN G J, LUAN Z H, *et al.* Functional analysis of genes *GlaDFR1* and *GlaDFR2* encoding dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) in *Gentiana lutea* L. var. *Aurantiaca* (M. Lainz) M. Lainz[J]. *BioMed Research International*, 2022: 1382604.
- [11] 孟祥春, 彭建宗, 王小菁. 光和糖对非洲菊花色色素苷积累及 *CHS*、*DFR* 基因表达的影响[J]. *园艺学报*, 2007, 34 (1): 227-230.
- [12] AHMED N U, PARK J I, JUNG H J, *et al.* Characterization of dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) genes and their association with cold and freezing stress in *Brassica rapa*[J]. *Gene*, 2014, 550(1): 46-55.
- [13] FEYISSA B A, ARSHAD M, GRUBER M Y, *et al.* The interplay between *miR156/SPL13* and *DFR/WD40-1* regulate drought tolerance in alfalfa[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 434.
- [14] KIM J, LEE W J, VU T T, *et al.* High accumulation of anthocyanins via the ectopic expression of *AtDFR* confers significant salt stress tolerance in *Brassica napus* L.[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36: 1215-1224.
- [15] NAING A H, AI T N, LIM K B, *et al.* Overexpression of *Rosea1* from snapdragon enhances anthocyanin accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic tobacco[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1070.
- [16] ZHANG Y Z, CHENG Y W, YA H Y, *et al.* Transcriptome sequencing of purple petal spot region in tree peony reveals differentially expressed anthocyanin structural genes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 964.
- [17] ZHAO D Q, TANG W H, HAO Z J, *et al.* Identification of flavonoids and expression of flavonoid biosynthetic genes in two coloured tree peony flowers[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 459(3): 450-456.
- [18] 周 琳, 王 雁, 任 磊, 等. 牡丹二氢黄酮醇4-还原酶基因 *PsDFR1* 的克隆及表达分析[J]. *植物生理学报*, 2011, 47 (9): 885-892.
- [19] QI Y, ZHOU L, HAN L L, *et al.* *PsbHLH1*, a novel transcription factor involved in regulating anthocyanin biosynthesis in tree peony (*Paeonia suffruticosa*)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 154: 396-408.
- [20] HAN L L, ZOU H Z, ZHOU L, *et al.* Transcriptome-based identification and expression analysis of the glutathione S-transferase (GST) family in tree peony reveals a likely role in anthocyanin transport[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2022, 8(6): 787-802.
- [21] XU F, HUANG X H, LI L L, *et al.* Molecular cloning and characterization of *GbDXS* and *GbGGPPS* gene promoters from *Ginkgo biloba*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013,

- 12(1): 293-301.
- [22] KOLACHEVSKAYA O O, SERGEEVA L I, FLOKOVÁ K, *et al.* Auxin synthesis gene *tms1* driven by tuber-specific promoter alters hormonal status of transgenic potato plants and their responses to exogenous phytohormones[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(3): 419-435.
- [23] MARTÍNEZ F, ARIF A, NEBAUER S G, *et al.* A fungal transcription factor gene is expressed in plants from its own promoter and improves drought tolerance[J]. *Planta*, 2015, 242(1): 39-52.
- [24] 阴霞, 陈雯, 王磊, 等. 激素和非生物胁迫对月季 *RhPIP1;1* 启动子活性的调节作用[J]. *园艺学报*, 2014, 41(1): 107-117.
- [25] 齐宇. MYB-bHLH-WD40对牡丹花青苷生物合成的转录调控机制[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2020.
- [26] ROH K H, CHOI S B, KANG H C, *et al.* Isolation and functional characterization of a *PISTILLATA-1* gene promoter from *Brassica napus*[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2014, 57: 759-768.
- [27] IMAI A, TAKAHASHI S, NAKAYAMA K, *et al.* The promoter of the carotenoid cleavage dioxygenase 4a-5 gene of *Chrysanthemum morifolium* (*CmCCD4a-5*) drives petal-specific transcription of a conjugated gene in the developing flower[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(14): 1295-1299.
- [28] ELOMAA P, MEHTO M, KOTILAINEN M, *et al.* A bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on dihydroflavonol-4-reductase (*dfr*) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae)[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(1): 93-99.
- [29] NAKAMURA M, TSUNODA T, OBOKATA J. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-box boxes: A tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator[J]. *The Plant Journal*, 2002, 29(1): 1-10.
- [30] HARTMANN U, VALENTINE W J, CHRISTIE J M, *et al.* Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a homologous pro-toplast transient expression system[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36(5): 741-754.
- [31] HIMI E, NODA K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) genes of wheat and their tissue-dependent expression[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(396): 365-375.
- [32] GOLLOP R, EVEN S, COLOVA-TSOLOVA V, *et al.* Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(373): 1397-1409.
- [33] CHEN R, MAO L, GUAN W, *et al.* ABA-mediated miR5290 promotes anthocyanin biosynthesis by inhibiting the expression of *FaMADS1* in postharvest strawberry fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 189: 111934.
- [34] ENOKI S, HATTORI T, ISHIAI S, *et al.* Vanillylacetone up-regulates anthocyanin accumulation and expression of anthocyanin biosynthetic genes by inducing endogenous abscisic acid in grapevine tissues[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 219: 22-27.
- [35] SUN J J, WANG Y C, CHEN X S, *et al.* Effects of methyl jasmonate and abscisic acid on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 130(2): 227-237.
- [36] NAIK J, MISRA P, TRIVEDI P K, *et al.* Molecular components associated with the regulation of flavonoid biosynthesis[J]. *Plant Science*, 2022, 317: 111196.
- [37] LORETI E, POVERO G, NOVI G, *et al.* Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*[J]. *New Phytologist*, 2008, 179(4): 1004-1016.
- [38] FU D W, ZHANG J C, WANG D C, *et al.* Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of the promoter of dihydroflavonol-4-reductase gene from purple-fleshed sweet potato[J]. *South African Journal of Botany*, 2020, 131: 206-213.

Promoter Functional Analysis of the Key Gene *PsDFR* Involved in *Paeonia suffruticosa* Anthocyanin Biosynthesis

ZHOU Lin¹, YUAN Meng¹, Qi Yu^{1,2}, ZHANG Meng-jie¹, WANG Yan¹

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong, China)

Abstract: [Objective] To analyze the *cis*-acting element and activity of the tree peony anthocyanin biosynthetic key gene *PsDFR* promoter for further research on its function and regulation mechanism involved in tree peony flower coloration. [Method] The genomic DNA extracted from the petals of tree peony 'Hei Hua Kui' was used as a template. *PsDFR* promoter was isolated by genomic walking method. The *cis*-acting elements of promoter were analyzed and predicted through Bioinformatics online software. Five different length of deletion fragments were fused with *GUS* gene to construct promoter-reporter vectors, and then were transiently expressed in tobacco leaves. The activities of deletion promoters and their response to different stress treatments such as Abscisic acid (ABA), Methyl jasmonate (MeJA) and light were analyzed by GUS staining and GUS activity assay. [Result] A 1 687 bp sequence of *PsDFR* promoter was isolated. The results of bioinformatics analysis showed that the promoter contains multiple *cis*-acting elements associated with light signals, hormone response, stress response, and tissue-specific expression, indicating that the expression of *PsDFR* may be regulated by various signals such as light signaling, plant hormone and stress. GUS staining and quantitative analysis of GUS activity showed that GUS activities decreased gradually with decrease of the length of *PsDFR* promoters, and the region of -1 623 bp to -916 bp played an important role on the activity of the *PsDFR* promoter. The GUS activities were inhibited significantly by MeJA or dark treatment, and were induced obviously after light restoration. And core regulation region involved in ABA-response might be located between -443 and -76 bp. [Conclusion] *PsDFR* promoter contains multiple *cis*-acting elements associated with light signals, hormone response, stress response, and tissue-specific expression. Its activity is positively regulated by light and negatively regulated by MeJA. The region of -1 623 bp to -916 bp is important for the activity of the *PsDFR* promoter, and -443 and -76 bp is the core region in response to ABA treatment. This study provides a reference for further revealing the regulatory mechanism of *PsDFR* response to environmental signals involved in tree peony flower coloration.

Keywords: *Paeonia suffruticosa*; anthocyanin; *PsDFR*; promoter; *cis*-acting elements; promoter activity

(责任编辑: 张 研)