

橡胶树热诱导启动子的筛选及初步鉴定

王文平¹, 罗小梅¹, 曹杰^{1,2}, 张盛敏^{1,2}, 戚继艳^{1,2}, 张义^{1,2*}

1. 海南大学热带农林学院(农业农村学院、乡村振兴学院), 海南海口 570228; 2. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572025

摘要: 基因工程技术是缩短作物育种周期、定向培育农作物新品种的有效途径, 也是鉴定植物基因功能的重要手段。诱导型启动子是基因工程研究的重要工具, 其中热诱导启动子由于其载体结构简单, 诱导方便, 成本低, 在植物分子生物学领域广泛使用。目前, 橡胶树基因工程技术发展相对滞后, 目的基因功能研究通常一般使用组成型启动子, 限制了相关工作的开展。本研究对橡胶树愈伤组织进行热处理, 通过转录组测序分析, 筛选出 8 个热诱导前不表达或几乎不表达, 但热诱导后表达量较高的基因; 经过热诱导表达量变化和特异性评价, 鉴定出 2 个特异性响应热处理的候选基因 *HbHSP17.6B* 和 *HbHSP17.6C*; 进一步通过巢式 PCR 克隆出 *HbHSP17.6C* 起始密码子上游 1962 nt 的启动子序列, 确认其由核心转录区和多个顺式作用元件等组成, 命名为 pHbHSP17.6C。分析该启动子可用于橡胶树及其他近源植物基因功能研究, 有望为相关研究提供新的工具选择。

关键词: 橡胶树; 愈伤组织; 热诱导启动子

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

Screening and Preliminary Identification of a Heat-Inducible Promoter of *Hevea*

WANG Wenping¹, LUO Xiaomei¹, CAO Jie^{1,2}, ZHANG Shengmin^{1,2}, QI Jiyan^{1,2}, ZHANG Yi^{1,2*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry (Agriculture and Rural College, Rural Revitalization College), Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China

Abstract: Genetic engineering technology serves as an effective method to shorten crop breeding cycles, specifically cultivate new crop varieties, and identify plant gene functions. Induced promoters are important tools in genetic engineering research, among which thermally inducible promoters being extensively utilized in plant molecular biology owing to the simple vector structure, convenient induction, and low cost. At present, the development of genetic engineering technology in rubber trees lags behind. Functional studies of target genes typically use constitutive promoters, which limits the progress of related work. In this study, rubber tree calli were treated by heat. Through transcriptome sequencing analysis, identified eight genes that were non-expressed or minimally expressed, but exhibited high level expression after heat induction in calli. After heat induced expression changes and specificity evaluation, two candidate genes *HbHSP17.6C* and *HbHSP17.6B* that specifically respond to heat treatment were identified. Further through nested PCR, we cloned the 1962 nt sequence upstream of the start codon of the heat shock protein gene *HbHSP17.6C*. Confirm that it is composed of a core transcription region and multiple cis acting elements, and is named pHbHSP17.6C. It is inferred that this promoter could be used for gene function research in rubber trees and other closely related plants, which is expected to provide new tool options for related research.

Keywords: rubber tree; callus; heat-inducible promoter

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.001

收稿日期 2024-12-03; 接受日期 2025-02-02

基金项目 国家自然科学基金地区项目 (No. 32260402); 海南省自然科学基金面上项目 (No. 322MS026); 海南省崖州湾种子实验室“揭榜挂帅”项目 (No. B21HJ0902)。

作者简介 王文平 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然橡胶高产机制与分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 张义 (ZHANG Yi), E-mail: hudazhangyi@126.com。

天然橡胶是战略性工业原料^[1], 但我国天然橡胶自给率常年低于 15%。橡胶树是天然橡胶的主要来源, 为热带乔木, 传统杂交育种周期需要 21~30 a^[2]。近年来, 随着分子生物学等学科的发展, 特别是橡胶树基因组学方面的研究, 天然橡胶生物合成通路的解析已经比较清楚^[3], 但其产量形成机制、主要病害的致病机理、抗寒及抗风分子机制等方面尚不明确。

启动子是植物基因工程技术中用来驱动目标基因表达的关键工具, 不同类型启动子的作用机制不同。其中, 诱导型启动子只能在诱导条件满足时, 才能诱导外源基因高效表达, 因此在基因功能鉴定和分子育种方面具有重要意义^[4]。常见的诱导型启动子类型主要有: 化学诱导型、物理诱导型、生物胁迫诱导型等^[5]。橡胶树是典型的热带植物, 耐热性较好, 而热诱导启动子具有系统简洁、载体易构建、诱导条件容易满足等优点^[6], 因此该类启动子在橡胶树基因工程研究中有良好的应用前景。

目前, 在橡胶树基因工程研究中, 通常使用花椰菜花叶病毒的 35S 启动子和橡胶树内源的组织特异性启动子来开展相关工作, 未见诱导性启动子的应用报道^[7-9]。因此, 本研究开展热处理条件下橡胶树差异基因表达分析和热诱导启动子的筛选、鉴定工作, 以期对相关研究提供新的工具选择。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料为实验室继代培养的橡胶树愈伤组织细胞系 073、084、340 和 363, 培养条件为 27 °C 暗培养。这 4 个细胞系来自于橡胶树品种热研 7-33-97 不同内珠被的不同部位, 其体胚发生效率高, 是用于橡胶树转基因操作的优良受体。参照 LUO 等^[10]的方法, 制备橡胶树愈伤组织增殖培养基以及农杆菌浸染相关的脱毒培养基和筛选培养基。转化所用农杆菌菌株为 EHA105 (携带有 pCambia2300 质粒)。

RNAprep Pure 多酚多糖植物总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, Prime STAR HS DNA Polymerase 购自宝日医生物技术北京有限公司, 2×ES Taq MatserMix (Dye) 购自康为世纪生物科技股份有限公司, RNA 反转录试剂盒 Hiscript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit

(+gDNA wiper)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、Q711 和 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 产物纯化试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 购自北京全式金生物科技股份有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织热处理条件筛选 将继代培养 1 周后的橡胶树 4 个细胞系的愈伤组织于 42 °C 进行暗培养热处理, 时间设 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36 h。处理完毕进行继代培养, 第 3 周后观察其生长状态是否正常。

1.2.2 橡胶树愈伤组织中热激活表达基因的筛选 将增殖培养 14 d 后的橡胶树 4 个愈伤组织细胞系分别在 42 °C 条件下处理 3 h, 收集未处理及热处理愈伤组织, 提取 RNA 并测序, 将未处理和热处理后的基因表达数据进行比较分析, 筛选出未处理愈伤中不表达且热处理后激活表达的基因作为候选基因。

1.2.3 候选基因表达特异性分析 将增殖培养 14 d 后的橡胶树 4 个愈伤组织细胞系, 分别在 42 °C 条件下处理 2 h, 37 °C 条件下处理 2 h; 将预培养 (无 Ag⁺) 14 d 后的橡胶树 4 个愈伤组织细胞系进行农杆菌侵染处理, 侵染方法参照 LECLERCQ 等^[11]的报道; 侵染后在 20 °C 条件下共培养 3 d, 然后进行脱毒培养, 21 d 后进行筛选培养。分别收集以上不同处理阶段的橡胶树愈伤组织, 液氮速冻后于 -80 °C 暂存, 用于 RNA 提取, 通过实时荧光定量 PCR 检测候选基因的表达特性。

1.2.4 愈伤组织 RNA 的提取及测序 取 1~2 g 不同处理的橡胶树愈伤组织, 液氮研磨后, 参照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 使用 Infinite 200 pro 检测 RNA 的浓度和纯度。将其中未处理及 42 °C 处理 3 h 后的 4 个细胞系的 RNA 样品送北京格致博雅生物科技股份有限公司进行转录组数据测序。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 将 1.2.2 中得到的候选基因的氨基酸序列, 在公共数据库 Tair (<https://www.arabidopsis.org/>) 中进行 BLASTP 检索, 参考结果中排名第一位的拟南芥基因的名称, 对这些热激活表达的基因命名。根据热研 7-33-97 基因组注释信息, 检索出这些候选基因的 cDNA 序列, 设计实时荧光定量 PCR 引物(表 1)。

分别取 1 μg 不同样品的总 RNA 进行反转录，将反转录获得的 cDNA 稀释 50 倍，使用实时荧光定量 PCR 试剂盒对热激活表达基因进行表达丰度检测。实时荧光定量 PCR 程序采用诺唯赞标准程序^[10]，反应结束后，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值法计算各个不同处理阶段样品的相对表达量。

1.2.6 热诱导启动子克隆 根据荧光定量 PCR 验证结果，筛选出特异性好、热处理诱导下表达量高的目标基因。以这些基因的 cDNA 序列对橡胶树热研 7-33-97 基因组进行本地 BLASTN 比对，提取其起始密码子上游 2000 nt 序列作为其启动子序列。根据该序列设计巢式 PCR 引物（表 1），

以基因组 DNA 为模板，进行启动子的 PCR 扩增。扩增得到的第二轮 PCR 产物经检测后送至广州生工生物技术有限公司测序。

1.2.7 热诱导启动子序列验证及分析 以特异性应答热处理表达基因的 cDNA 序列，设计引物（表 1）扩增出热激活特异性表达基因的 cDNA 全长。使用 2×ES Taq Matser Mix（Dye），以 42 ℃ 3 h 热处理过后 084 细胞系的 cDNA 作为模板，扩增得到 PCR 产物的检测、纯化、测序同 1.2.5。根据热激活特异性表达基因的 gDNA 序列设计跨启动子和外显子克隆基因全长的引物（表 1）。使用 100 ng 热研 7-33-97 的 gDNA 作为模板进行 PCR

表 1 引物信息
Tab. 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	用途 Application
20582F	TGCCGAAAATGCTAAGACTG	<i>HbHSP17.6C</i> 基因荧光定量 PCR 分析
20582R	TCTCAATCACCTTCTCTCTG	
30710F	GATGGATCAAGTGAAGGCTTCAATG	<i>HbHSP17.6B</i> 基因荧光定量 PCR 分析
30710R	GCTCCTTAAATACATACAGCCATGAATTTTA	
6300F	ACATAAGGCTTGAGAGGAGGG	<i>EVM0006300</i> 基因荧光定量 PCR 分析
6300R	TTTTTGGCCTTAGGTGGTGA	
6899F	TTGCAGAGGCTAGAATGGCTT	<i>EVM0006899</i> 基因荧光定量 PCR 分析
6899R	CATCCTTCCAGGCTACTTCCC	
17927F	TTGGGCTCAGTGGGTCTG	<i>EVM0017927</i> 基因荧光定量 PCR 分析
17927R	GCTGAAAATTGGTTTCTCTGCAACA	
20623F	CTACTCTGGCAATTTAACCTACT	<i>EVM0020623</i> 基因荧光定量 PCR 分析
20623R	CGCCCAGATCCCTGATAT	
12326F	CTGCCAGATACTCCAGAGAGC	<i>EVM0012326</i> 基因荧光定量 PCR 分析
12326R	GGAGATGATTGCACTATTGGG	
3506F	CTAAAGAGGTTTGCTGGTACAGAG	<i>EVM0003506</i> 基因荧光定量 PCR 分析
3506R	GTTAATAAATGGTTTGTGTTGGGACAGG	
YLS8F	CCTCGTCGTCATCCGATTC	<i>YLS8</i> 内参基因荧光定量 PCR 分析
YLS8R	CAGGCACCTCAGTGATGTC	
20582F1	GCATTAGAATCATTATTGTAGACA	<i>HbHSP17.6C</i> 启动子克隆巢式 PCR 第一轮引物
20582R1	TTGTTGACCATTGAAAGGAAAG	
20582F2	AGAATCATTATTGTAGACAGCAC	<i>HbHSP17.6C</i> 启动子克隆巢式 PCR 第二轮引物
20582R2	CACCCCACAGTTGAGAAATG	
30710F1	AGCTCACTTAGAGTCACGCC	<i>HbHSP17.6B</i> 启动子克隆巢式 PCR 第一轮引物
30710R1	CAAAAACGCTATATCGCGAG	
30710F2	CTCACTTAGAGTCACGCCCTTG	<i>HbHSP17.6B</i> 启动子克隆巢式 PCR 第二轮引物
30710R2	AGCTTGGAATCATCGCCATT	
30710R1-2	AGACATGAGCGTCGGGAG	<i>HbHSP17.6B</i> 启动子克隆巢式 PCR 第二轮引物
30710R2-2	GTCGGGAGTCTCTTTCCAGTC	
HspF	ATGTCGTCCCTCATTTCTCAA	<i>HbHSP17.6C</i> 基因 cDNA 克隆引物
HspR	AGCTTAGGCATGGAAATTCAC	
20582R2-2	TCTCAATCACCTTCTCTCTG	<i>HbHSP17.6C</i> 启动子和 cDNA 序列克隆

扩增, PCR 产物的检测、纯化、测序同 1.2.5。使用 PlantCare (<https://www.plantcare.co.uk/>) 在线分析工具对启动子序列进行顺式作用元件检索分析。

2 结果与分析

2.1 热处理激活表达基因的筛选

研究发现, 橡胶树愈伤组织在 42 °C 进行不同时间处理后, 发现热处理 36 h 以内, 愈伤组织生长情况无明显差异, 因此选择 3 h 作为后续转录组测序的热处理时间。将 4 个愈伤组织细胞

系 42 °C 处理 3 h 的所有基因的 FPKM 值进行比较分析发现, 未处理不表达或几乎不表达而热处理诱导表达的基因并不多。*HbHSP17.6C*、*HbHSP17.6B*、*EVM0006300*、*EVM0006899*、*EVM0017927*、*EVM0020623*、*EVM0012326* 和 *EVM0003506* 是排名靠前的 8 个基因, 4 个愈伤组织中的结果基本一致。其中, *HbHSP17.6C* 和 *HbHSP17.6B* 基因未处理和热处理后表达量变化最大, 其他 6 个基因热处理后的表达量并不高 (图 1)。

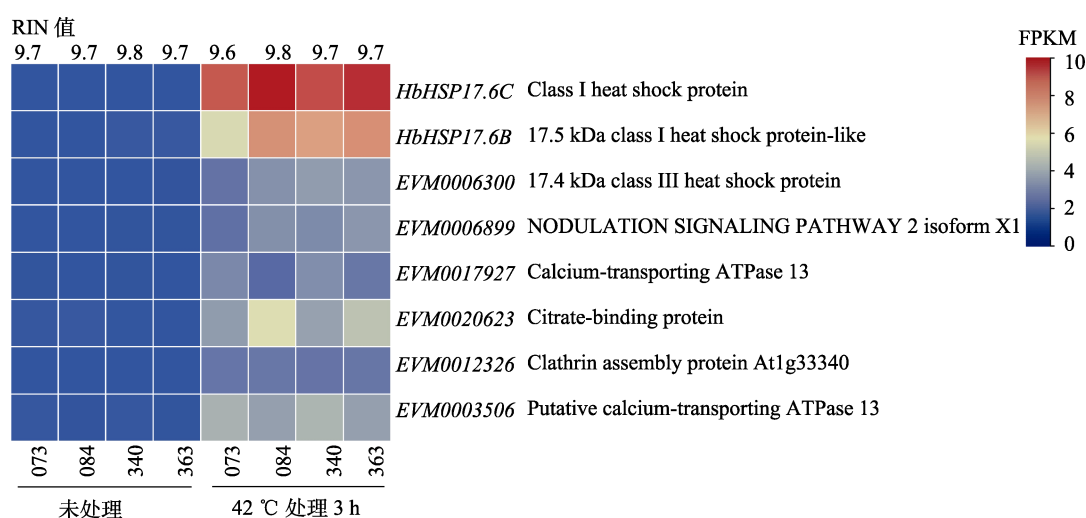


图 1 橡胶树愈伤组织未处理和处理后的转录组数据分析

Fig. 1 Transcriptome data analysis of untreated and treated rubber tree callus tissue

克隆热诱导启动子的最终目的是应用其作为橡胶树基因工程技术中控制目的基因表达的分子开关。理想的热启动子在愈伤组织中应该特异性响应热激活, 愈伤组织继代培养过程(有/无 Ag^+), 以及转基因过程中的各种环境变化都不应该激活该启动子。本研究对愈伤组织进行了多种条件的处理, 包括温度变化、不同类型的培养基、农杆菌浸染、脱毒培养、筛选培养等。对上述 8 个热激活表达的候选基因进行 RT-qPCR 分析发现, 只有 *HbHSP17.6C* (图 2) 和 *HbHSP17.6B* 在愈伤中的表达特异性响应热激活, 其他 6 个候选基因, 愈伤组织在其他处理条件下也有低丰度的表达, 说明其特异性不强。

2.2 热诱导基因启动子的克隆

以橡胶树热研 7-33-97 的基因组中检索到的 *HbHSP17.6C* 和 *HbHSP17.6B* 启动子序列设计 2 对 PCR 引物, 通过巢式 PCR 扩增 *HbHSP17.6C* 基因的启动子序列片段, 成功克隆得到了 *HbHSP17.6C*

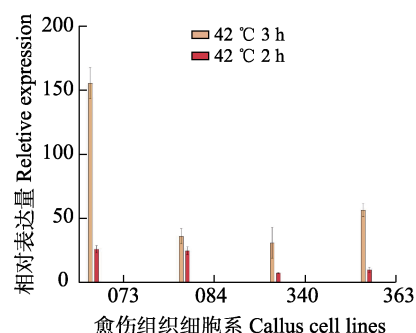


图 2 不同处理条件下愈伤组织细胞系 *HbHSP17.6C* 基因的表达水平

Fig. 2 Expression levels of the *HbHSP17.6C* gene under various treatment conditions in callus cell lines

基因的启动子片段, 但未能获得 *HbHSP17.6B* 的启动子片段。PCR 产物纯化、克隆后, 序列分析发现克隆出 *HbHSP17.6C* 基因起始密码子上游的 1962 nt 的序列。

2.3 *HbHSP17.6C* 基因的 cDNA 和启动子序列的验证

橡胶树基因组比对结果显示, *HbHSP17.6C*

基因只有 1 个外显子，没有内含子。以橡胶树愈伤组织热处理后的 cDNA 作为模板，PCR 扩增获得 *HbHSP17.6C* 基因的 cDNA 全长。通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测，成功克隆得到了 428 nt 的目标片段。测序结果显示，该序列包含 *HbHSP17.6C* 基因的 411 nt 的编码序列全长，在拟南芥数据库 (Tair) 中进行检索分析，*HbHSP17.6C* 是拟南芥 *AtHSP17.6C* (AT1G53540.1) 的同源基因，氨基酸序列一致性为 59%。以橡胶树热研 7-33-97 基因组 DNA 为模板，使用引物 20582F2 和 20582R2-2 进行 PCR 扩增，成功克隆得到了包含 *HbHSP17.6C* 基因的启动子区和编码区序列的 2360 nt 的片段。测序分析显示，克隆的 1962 nt 启动子序列位于 *HbHSP17.6C* 基因编码序列的起始密码子的相邻上游，*HbHSP17.6C* 基因只有 1 个外显子。

2.4 橡胶树 pHbHSP17.6C 热诱导启动子序列的顺式作用元件分析

通过启动子在线分析工具 (Plantcare) 检索发现, pHbHSP17.6C 启动子序列的顺式作用元件根据分布密度可分为高、中、低 3 个明显的区域, 分别是 -1962~-1696 nt、-1695~-994 nt 和 -993~-1 nt, 越靠近起始密码子密度越高 (图 3)。顺式作用元件分析显示, 除了含有启动子的核心转录区 TATA-box 和启动子、增强子区域中常见的顺式作用元件 CAAT-box 外, 还有参与脱落酸反应的 ABRE 顺式作用元件, 参与光反应的顺式调控元件 G-box、AE-box、Box 4、GATA-motif、GT1-motif、I-box、TCCC-motif 顺式作用元件, 厌氧诱导所必需的顺式调控元件 ARE, 与分生组织表达相关的顺式调控元件 CAT-box, 赤霉素反应元件 GARE-motif, 参与低温响应的顺式作用元件 LTR, MYB 结合位点参与干旱诱导 MBS 顺式作用元件, 参与种子特异性调控的顺式调控元件 RY-element, 水杨酸反应性中的顺式作用元件 TCA-element, 60K 蛋白结合位点的顺式作用元件 Unnamed__1 等类型, 不含有已知的热反应顺式作用元件。

3 讨论

本研究以橡胶树热研 7-33-97 的胚性愈伤组织为材料, 热处理后通过转录组比较分析以及实时荧光定量表达分析筛选并鉴定到 2 个热激活特异性表达基因 *HbHSP17.6B* 和 *HbHSP17.6C*, 成功

PlantCARE_19817

+ GAATTCATCA TTGTAGACAG CACTTGGTTC **CTGGCGGAGCT** GAAGACGAGG CTTC**GGTCTC** AACAAAGAA
- CTTATGTAA**GT** AACATCTGTC GTGAACCAAG GAGGCGCTCGA CTTT**GGTCC** GAAGACGAAG TTGTTTCCCT

+ ACAAAATAAA TTTCCTCTTA **TCTCGTGGAC** TTTCGACGAA AGACAAGAAG AGGATATGCG GGGAGAATAAT
- TGTTTATTTT AATAAGAG**CA**AT AGAGCGTCTA AACAGCTTTCT TCTGTTCTCT TCCATCAGCG CTTCTTCTTA

+ TTTCAGCTGA CAAGAAGAAA AAGAGAGCAC **GAATCTGCAC** ACATATATATC ACCATGCGCT TCTTGGGG**CT**
- AAGGTGAGCT GTTCTCTTTT TCTCTCGTGT CTTAGAGCTG TGTATATATG TGGTACAGGAA AGAGACCGGTA

+ **GTTCGACGTC** GCTCTTTCTA TCGCTGTCTA ACAAAAGGCT **TCAACTGTGA** ATTATACAGA TCAAAAGATTA
- CAGGTGACGA CGAGAAGAAT AGAGCAGCAT TGGTTTTCGA AGGTTGACAT **TAAATGGCTAT** AGGTTGCGAT

+ TGCCTTTGCC TGCATGTTTG AARCCG**AGG** CAGTCAATA TCCCTCGCTC GCTTTAT**TC** **TCCATCTG**
- AGCGGAAGCG AGGTACAAAC TTGGGGTATG GTAGTGTTAT AGGAGAGGAG CGAAATTTAG AGGTAGAGG

+ **TATGCTC** ACCATATTA CCACACAAAG CACAGGCCAA **TATGAGGAG** AGTGGGGGT GTTGCTGTTT
- TTATACAGAG TGGTATAAAI GGTATGTTT GTTGTCGTTT **ACTATCCCTC** **TAC**CAACCCCA CACAGACAAA

+ ACATCAAGTT AATAGGGAGA TCGTGGAAG AGTTAAGTTG **TGTAAAGAT** **AGG**GTGAGG TTATGTTGAA
- TGATGATCA **TAT** **TATCCCTCT** **ACGCGATCC** **TCAATCTCAC** AACCTTTCTA TCCGCCCTCT AATACACAT

+ TGGGAAGAAT AAAAAGCCAT GGTGTA**AGG** **AGG**CGAA TTGATAAGAA TAATATACTT TTTCGTATC
- ACCCTTCTTA TTTTGGGTA CCACATCTCT TCACGSGCTT ACATATCTT ATTTATAGGA AAGACATATG

+ AATGTGCAAT TGAATGTATG TGCATATCA ACAMAA**TTTA** **AT**TTTG**CT** **ATA** **GGTCTTC** ATTTCCTGG
- TTAGAGTGA CTAATAACTC ACCTTAATGT TGGTTTAAAT TAAAAGCTGA TATACGAAGA TAAGAAGACC

+ TGCGCTAGGT GACCTTCTTA GAGAGTATCA **AATATATACA** AGGTAATTAAT ACTAGC**TATA** GACATTAAT
- ACCGGTATCA CTGAAGAGAT CTCTCAATAT TTATATTTGT TCCATATTTT TATGTCTAGT CTGGAATTA

+ AGATCTTCTT TTCTTAAGAA CCGTAAAGAG TATCATCAAT **TTCTAGCTG** **CTG**CTACTT TAATTAATYA
- TCTAGAATA AAGAAATCTT GGCATTTCC ATAGGTAGTT AGAGGATACC GAGCGGATGA ATTAATTAIT

+ **CTATGTTTG** ATAAGGAATTT GAATTTAATTT **TTAATATATC** TTATGTATAA ATGTATAAAT ATTCAATCA
- GATACACAAAT TATCTCTAA TTAATTAATTA AATTAATATG TAAATCAAT TAACTATTAAT TAAGTATGTT

+ CTAGAGAGCC AAAAGTGAGA TTGTCATTC AAAATTAGA CAATAAATAA AAAATT**TA** **GATTA**TTAC
- GATCTCTG TTTTCACTCT AACCAATGAG TTTTATATCT GTTTTATTT TTTTAAATTT CTATATTATG

+ **AACAATCA** **TTA** **TTA**AGGAA ATCTTCAATTA AAAATTGAT TATCATAAAT TAAATATTA **ATA**ATGACG
- TTGTTATGAT AAATTTCTTT TGAATATTA **TTTA**ACTATA TATGATATTA AATTTATAT TATATGACTC

+ ACTCAATAT TTAATTAATA AATTTT**TA** **CA**CAATTA **TT**TTTTTTTT TTTTAAATAA CCCCACATTA
- TGAGTATATA ATATTAATTT TTAATATGAC AAGTAGTATA AAAAATAAAA AATTTTTT GGGTGTAAI

+ AATAACAGCG GCTGTGCAIT TATATCTCT **GTG**GTATCA CAGATCCAGT GCAATCTATC TAAATAAATA
- TTAATTTGCC CGACAGTATA AATATACAGA CACAT**AGG** **GT** **GC** **AGG**GTAC CGTAGATAGT ATTATTTTT

+ AAAAATCAAT GGCATCTAAT TATGCGCTGG GTATTATGA ATCAGTGTAG GCTG**CTCT** **CTCCCTCT** **TA**
- TTTTATGTA CGTAGATATA ATTAAGGCCAT CAACATCACT TATGATCACT TATGATCACT GAGGAAGAAI

+ ATCCAACTTA GGCCTGCCCA **CCAA**TTTGGT CGAGCGCTGT TTAAGATCAG AATTAGTAAT TGAAGTCTGA
- TAGTGTGAT CGAGCGGGT GTATTAACCA GCGTGGACCA AACTATGCTT GAAATTTATA ACTTCAGAT

+ TTAGAGAGTG AATCAAGATT GGAATGATG GTACACACTC TAGTCAATTT GCAATTTTCA TGGATTGGA
- AATCTCCTAC TTAGTCTTAA CCTTATCAAC CAGTGTGAGG ATCAGTTAAA GCTAAAGATT AACTAAGCT

+ TTTAATTTG AATTGATTTA ATTTTATATT TGAACAAITTT AATTITGATC ATTTTATATT TGAATTGAAT
- AAATTAAGC TAATACAAAT TAATAATATA ACTGTUAAA TTAATAGACT TAATATAATA ACTATACCTT

+ ATGTGTTAAT **TCACTG**ATG TCTCAGAAG TTTTTTTTTT TTTTAAATG AATTGATGAC AACCAAACT
- TACCAAAITTA ATGTCATCAC GAGAGCTTTC AATTAAGAAA AAAATTAATC TAATCTTAGC TTGGTTAGT

+ GAGGATTGTA ACTCTAAAT TTGATCTAGG AACTTGGCAGG **GA****CCG**AA **TGG**CGCTTAT AGGCCATTCA
- TCCCTAAAT GATGAATTAA AGCTATGCTG TGAACCTTCC CTGGCTTTCT ACCGGGATAA TGGGCTAAGT

+ GTTCTAGTCT AGGCGCTTAA TGTCTTTGGCC TGAACCAATTT CTCTGATTGA TCAAAACTGA TCTCTGTGTG
- CAGATACAG TCGGAATATT TGTCACTCAAT ACTGTGTATA GAGTCAATCT AATTGTGATC AATGACACAG

+ GTTCTAGGCG TGAAACGGCC CTGGCGGGGT CTAAACACAC CACCAACAAA CACAGAGAAA TGGCTGGGGA
- CAGTCTGCG ACTTGGCCGG GACCGGCCCA TTGTGTGTGG GTGTGTTTGT TGTGCTCTTT AAGGAGCCT

+ GAGGGGCCAA TTAGTACATA AGTCATCTT TTTATGAATT GTGTGTGAA CAGAGAGAAA ATATGTTCTG
- TCCCGGGGTT AATCAGTGTA TCGATPARAA AATACATATA CAAACATCTT GCTGCTTTT TATPACAGC

+ **NCCT**CTATAT CAGAAGAAG TCGTAGAAC TCCCACTATA ATCTTATCTT TAATCAAACT **AG**AA**GAAGA**
- TCGAGTATA GTCTTCTCC AGCATCTGT AGGGTGTAAT TAGGAATAGA AATGATGTG TCTCTTCTT

+ **AG**AGATGCA **AG**AACTCA AGCATCTC **AGCTCTCA** **TT**ATATATA **AG**CAATCTT CGACCATTT
- TCTCTAGGT TCTTTAGGT TCTGTAGG TGTAGAGGG AATTTATAT TCTGTAGGA CGTGTAGAG

+ **CTCC**CT**GGT** TAATGAAAT TCTGTCTGA AACATCCACT AGCGAGCTAG **CCAA**CTCTT **GA**AG
- GAGGGTACA ATACTTTTA AAGACAGAT TTGTAGGTGA TCGTGGATC GGTTAGAAA **CTTT**

Motifs Found

图 3 启动子 pHbHSP17.6C 的顺式作用元件分析
Fig. 3 Analysis of cis acting elements of promoter pHbHSP17.6C

克隆出这 2 个基因的 cDNA 全长；通过巢式 PCR 方法,仅克隆出 1 个热激活启动子 pHbHSP17.6C,对 *HbHSP17.6C* 基因启动子区和编码区序列片段进行整体克隆,证实了 pHbHSP17.6C 序列位于 *HbHSP17.6C* 基因起始密码子的上游,而 *HbHSP17.6C* 基因只有 1 个外显子。*HbHSP17.6C* 属于小热休克蛋白,植物小热休克蛋白通常作为分子伴侣参与植物抗逆反应^[12]。在拟南芥的根和茎中,*HbHSP17.6C* 的同源基因 *AtHSP17.6C* 应对

热、冷、渗透胁迫、盐、干旱、遗传毒性、紫外线、氧化应激、伤害和病原体感染等胁迫时，都会有大量的激活表达^[13]。

20 世纪很多物种还没有参考基因组，通过 gDNA 片段的质粒文库杂交及测序，在果蝇中克隆到热休克蛋白基因 *hsp70* 及其启动子序列^[14]。在烟草中应用该启动子驱动不同目的基因的表达，实现了通过调节温度来人为控制目的基因在植物中的表达，并产生不同表型^[15-16]。利用果蝇 *hsp70* 的启动子驱动 *Cre* 重组酶基因的表达，通过热激活 *Cre/loxP* 系统的重组反应，在转基因马铃薯中删除了筛选标记基因，但效率仅为 4%^[17]；分别利用大豆和拟南芥的热休克蛋白基因的启动子 pGmHSP17.6-L 和 pHSP18.2 驱动 *Cre* 基因的表达，在转基因香蕉中删除标记基因的效率分别达到了 60%和 40%^[18]；在水稻中应用 *GmHSP17.5E* 基因的启动子驱动 *Cre* 基因的表达，删除标签基因的效率最高可达 94%^[19]；在杨树中应用 *GmHSP17.5E* 基因的启动子分别驱动 *Cre/loxP* 和 FLP/FRT 系统，基因删除效率分别为 63%和 65%^[20]；使用玉米自身的热休克蛋白 HSP70 的启动子驱动 *Cre/loxP* 系统，基因删除效率最高可达 100%^[21]。以上研究说明，虽然热休克蛋白基因的启动子功能具有一定的保守性，但是同一个启动子在不同物种中的通用性并不是特别高，应用物种自身的热休克蛋白基因的启动子可以增加基因工程技术的工作效率。

HbHSP17.6C 基因具有热休克蛋白基因的典型特征：在热处理前不表达，只有热处理后才迅速启动表达。在橡胶树愈伤组织中，经过农杆菌浸染处理、各种培养条件变化，*HbHSP17.6C* 基因均不激活表达，表明该基因的启动子在橡胶树愈伤组织中能够特异性响应热激活处理，对农杆菌介导的转基因过程不敏感，有望作为人为控制的分子开关在橡胶树及近源作物基因工程研究中发挥作用。

参考文献

- [1] PUSKAS J E, CHIANG K, BARKAKATY B. Natural rubber (NR) biosynthesis: perspectives from polymer chemistry[J]. *Chemistry Manufacture Applications of Natural Rubber*, 2014: 30-67.
- [2] 孙永帅, 田维敏, 翟德利, 杨永平. 我国橡胶树育种的技术瓶颈与创新建议[J]. *中国科学院院刊*, 2024, 39(1): 191-197.
- [3] SUN Y S, TIAN W M, ZHAI D L, YANG Y P. Technical bottlenecks and innovative development suggestions for rubber tree breeding in China[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2024, 39(1): 191-197. (in Chinese)
- [4] TANG C R, YANG M, FANG Y J, LUO Y F, GAO S H, XIAO X H, AN Z W, ZHOU B H, ZHANG B, TAN X Y, YEANG H Y, QIN Y X, YANG J H, LIN Q, MEI H L, MONTORO P, LONG X Y, QI J Y, HUA Y W, HE Z L, SUN M, LI W J, ZENG X, CHENG H, LIU Y, YANG J, TIAN W M, ZHUANG N S, ZENG R Z, LI D J HE P, LI Z, ZOU Z, LI S L, LI C J, WANG J X, WEI D, LAI C Q, LUO W, YU J, HU S N, HUANG H S. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(6): 16073.
- [5] GLIGOROVSKI V, SADEGHI A, RAHI S J. Multidimensional characterization of inducible promoters and a highly light-sensitive LOV-transcription factor[J]. *Nature Communications*, 2023(14): 3810.
- [6] HERNANDEZ-GARCIA C M, FINER J J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements[J]. *Plant Science*, 2014, 217/218: 109-119.
- [7] WANG Y, CHEN B, HU Y, LI J, LIN Z. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the *cre/lox* site-specific recombination system[J]. *Transgenic Research*, 2005, 14(5): 605-614.
- [8] AROKIARAJ P, YEANG H Y, CHEONG K F, HAMZAH S, JONES H, COOMBER S, CHARLWOOD BV. CaMV 35S promoter directs β -glucuronidase expression in the laticiferous system of transgenic *Hevea brasiliensis* (rubber tree)[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(8): 621-625.
- [9] AMACK S C, ANTUNES M S. CaMV35S promoter-A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology[J]. *Current Plant Biology*, 2020, 24: 100179.
- [10] GANESH I, CHOI S C, BAE S W, PARK J C, RYU S B. Heterologous activation of the *Hevea PEP16* promoter in the rubber-producing laticiferous tissues of *Taraxacum kok-saghyz*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 10844.
- [11] LUO X M, ZHANG Y, ZHOU M M, LIU K Y, ZHANG S M, YE D, TANG C R, CAO J. Overexpression of HbGRF4 or HbGRF4-HbGIF1 chimera improves the efficiency of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(5): 2921.
- [12] LECLERCQ J, LARDET L, MARTIN F, CHAPUSET T, OLIVER G, MONTORO P. The green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg)[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(5): 513-522.

- [12] SUN W N, VAN MONTAGU M, VERBRUGGEN N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1577(1): 1-9.
- [13] SWINDELL W R, HUEBNER M, WEBER A P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 125.
- [14] INGOLIA T D, CRAIG E A, MCCARTHY B J. Sequence of three copies of the gene for the major *Drosophila* heat shock induced protein and their flanking regions[J]. *Cell*, 1980, 21(3): 669-679.
- [15] SPENA A, HAIN R, ZIERVOGEL U, SAEDLER H, SCHELL J. Construction of a heat-inducible gene for plants. Demonstration of heat-inducible activity of the *Drosophila* hsp70 promoter in plants[J]. *The EMBO Journal*, 1985, 4(11): 2739-2743.
- [16] SCHMÜLLING T, BEINSBERGER S, DE GREEF J, SCHELL J, VAN ONCKELEN H, SPENA A. Construction of a heat-inducible chimeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue[J]. *FEBS Letters*, 1989, 249: 401-406.
- [17] CUELLAR W, GAUDIN A, SOLÓRZANO D, CASAS A, NOPO L, CHUDALAYANDI P, MEDRANO G, KREUZE J, GHISLAIN M. Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible *Cre-loxP* system from transgenic potato[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62(1/2): 71-82.
- [18] CHONG-PÉREZ B, KOSKY R, REYES M, ROJAS L, OCAÑA B, TEJEDA M, PÉREZ B, ANGENON G. Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the *Cre-lox* site-specific recombination system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 159(4): 265-273.
- [19] KHATTTRI A, NANDY S, SRIVASTAVA V. Heat-inducible *Cre-lox* system for marker excision in transgenic rice[J]. *Journal of Biosciences*, 2011, 36(1): 37-42.
- [20] FLADUNG M, BECKER D. Targeted integration and removal of transgenes in hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) using site-specific recombination systems[J]. *Plant Biology*, 2010, 12(2): 334-340.
- [21] DU D X, JIN R C, GUO J J, ZHANG F D. Construction of marker-free genetically modified maize using a heat-inducible auto-excision vector[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(5): 374.