DOI: 10. 13718/j. cnki. xdzk. 2022. 10. 005

# 柑橘主要砧木品种耐缺铁特性及 FRO 基因启动子特性分析

张梅,	王金娟,	高美美,	王莹,
罗添鸣,	冯邻,	罗小英,	李德谋

西南大学 生物技术中心,重庆 400715

摘要:分析了目前柑橘果园中常用砧木以及具砧木价值的 17 个柑橘砧木品种的耐缺铁特性,筛选出缺铁响应较强的铁螯合还原酶基因(FRO),分析了不同品种中受缺铁诱导铁螯合还原酶基因的上游调控区序列特征和缺铁诱导特性.结果表明:17 个柑橘砧木品种中枳柚、资阳香橙和枳雀为耐缺铁类型,莽山野柑、红橘、朱橘、酸橘、扁平橘、土橘、枳、兴义大红袍和皱皮橘属于缺铁敏感型,枳橙、汕头酸橘、兰卜莱檬、枸头橙和黄橼檬属于中间型.在克里曼丁橘(Citrus clementina)基因组中 CcFRO1, CcFRO2 和 CcFRO3 基因表达受缺铁诱导明显,在柑橘砧木品种中,CcFRO1和 CcFRO3 基因的上游调控序列存在较大差异.缺铁条件下,耐受型启动子在植株中表达特性发生明显改变,而敏感型启动子表达特性则不受缺铁影响.研究结果表明,柑橘砧木耐缺铁特性可能与铁螯合还原酶基因上游调控区有关,为选育耐缺铁柑橘砧木品种提供了理论基础.

关键 词: 柑橘砧木; 耐缺铁特性; 铁螯合还原酶基因;

上游调控序列

中图分类号: S666 文献标志码: A 文章编号: 1673-9868(2022)10-0037-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID): ■

## Analysis of Iron Deficiency Tolerance and FRO Gene Promoter Characteristics of Main Citrus Rootstock Varieties

ZHANG Mei, WANG Jinjuan, GAO Meimei, WANG Ying, LUO Tianming, FENG Lin, LUO Xiaoying, LI Demou

Biotechnology Research Center, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Seventeen common citrus rootstock varieties were used in this research. Analysis of iron deficiency tolerance and expression level of *FRO* homologous genes from Citrus clementina genome were performed. We cloned and analyzed the promoter sequence of *CcFRO* genes in response to iron deficiency,

收稿日期: 2022-01-06

基金项目:国家自然科学基金项目(30370984);重庆市科技局基础研究与前沿探索项目(cstc2016jcyjA0446).

作者简介:张梅,硕士研究生,主要从事植物基因工程的研究.

通信作者:李德谋,副教授.

and analyzed relationship between genotype and iron deficient characteristics. The results indicated that the physiological characteristics of iron deficiency of 17 citrus rootstocks were divided into tolerant, intermediate and sensitive types, among which the tolerant type includes *Poncirus trifoliata* (L.) Raf  $\times$  C. grandis Osb. Zhiyou, Citrus junos cv. Ziyangxiangcheng and C. ichangensis Swing  $\times$  P. trifoliata. Zhique, the sensitive type includes C. mangsanensis Mangshanyegan, C. reticulata Blanco, Citrus erythrosa Hort., C. sunki Hort., C. depressa Hayata cv. Shiikuwasha, C. chuana Hort., P. trifoliataa (L.) Raf Trifoliate orange, C. reticulate cv. Xingyidahongpao and C. vessucosa Hort., and the intermediate type includes P. tri foliata (L.) Raf  $\times$  C. sinensis Osb Carrizo citrange, C. reticulata Blanco cv. Shantoy suanju, C. limonia Osbeck cv. Rangpur lime, C. aurantium L. and C. limonia Osbeck cv. Huanglumeng. In Citrus clementina genome, there are five FRO homologous genes. Among them, the expression of CcFRO1, CcFRO2 and CcFRO3 genes were induced by iron deficiency. The upstream sequences of regulatory of CcFRO1 and CcFRO3 genes are quite different in citrus rootstock varieties, but only the upstream regulatory sequences of CcFRO3 was significantly correlated with the ability of iron deficiency tolerance. The expression increased in stem and root, and decreased in leaf and tip of shoot. However, the expression characteristics of the sensitive CcFRO3 promoter was not affected by iron deficiency. The results indicated that the iron deficiency tolerance of citrus rootstocks was related to the upstream region of regulatory of FRO gene.

Key words: citrus rootstocks; iron tolerance; FRO; upstream regulation sequence

柑橘生产主要是采用嫁接苗木,而砧木对植物的耐盐性起关键性作用<sup>[1]</sup>.在传统以枳为砧木的柑橘 果园中,土壤高 pH 值(7.55~8.50)使得果树普遍发生缺铁黄化,严重影响柑橘生长和产量<sup>[2]</sup>.柑橘砧 木对接穗生长发育具有重要的基础作用,了解柑橘砧木缺铁的生理特性及其分子机制具有重要的理论 价值和实际意义.

铁螯合还原酶基因(FRO)是双子叶植物从土壤中吸收铁的关键基因,在其铁营养吸收过程中发挥 着至关重要的作用.研究表明,拟南芥基因组存在8个编码铁螯合还原酶的基因<sup>[3-4]</sup>(AtFRO1-8),其中, AtFRO2 在拟南芥根系中高水平表达,负责将土壤中氧化铁还原为二价铁,供植物利用<sup>[3-4]</sup>.AtFRO3 在 根和地上部分均表达,缺铁能提高其表达水平,同时受到铜的诱导<sup>[5]</sup>.AtFRO4 在子叶和角果中有表达, AtFRO5 主要在茎和花中表达<sup>[5-6]</sup>,这两个基因具有冗余功能,参与铜响应和吸收过程<sup>[7]</sup>.AtFRO6 和 AtFRO7 在植物绿色组织器官中高水平表达,并受光调控<sup>[5,8]</sup>.烟草中组成型表达 AtFRO6 基因能增加叶 片中铁螯合还原酶活性和亚铁含量,但其根中铁螯合还原酶活性和亚铁含量均未提高,表明 AtFRO6 在叶 细胞中可发挥螯合还原三价铁的作用<sup>[9]</sup>.AtFRO7 参与缺铁条件下幼苗光合作用过程中叶绿体中铁的获取 过程<sup>[10]</sup>.AtFRO8 主要在地上部分表达<sup>[5]</sup>,在衰老叶片维管组织中也有表达<sup>[6]</sup>.而 AtFRO1 在各植物组织 器官中表达水平极低<sup>[5-6]</sup>.这些结果显示植物基因组存在多个 FRO 同源基因,且各 FRO 同源基因在植物 铁营养吸收过程中发挥着不同的作用.

Sudahono 等<sup>[11]</sup>分析了 18 种柑橘砧木在缺铁性土壤中的表现,其结果表明非枳类型的柑橘砧木对缺铁 表现出耐性或中等耐性,而大部分的枳类型则表现出中等敏感或非常敏感.朱世平等<sup>[12-13]</sup>对 15 种柑橘砧 木品种耐盐性的研究表明,不同砧木品种在耐盐耐碱方面存在非常大的差异,如印度酸橘、扁平橘、红皮 酸橘、资阳香橙和枸头橙适应盐碱能力强,而枳、莽山野柑对盐比较敏感,柑橘砧木可以通过调控相关离 子吸收和提高抗氧化物质活性从而增强耐盐性.这些研究结果表明不同柑橘砧木品种在耐缺铁、耐盐碱方 面存在较大差异,但具体机制还不是很清楚.

为研究缺铁对不同柑橘砧木材料的影响,了解柑橘基因组中 FRO 基因的遗传背景,本研究选取了目前常用以及新发现的具有砧木价值的17 个柑橘砧木品种,进行缺铁胁迫处理,分析其耐缺铁特性和柑橘基

因组中编码铁螯合还原酶的同源基因的缺铁诱导特性,克隆了明显受缺铁诱导的同源基因上游调控区,分 析其序列特征及其单体类型,进而分析了主要柑橘砧木的耐缺铁特性和其单体型的相关性,并通过转基因 拟南芥分析了不同单体类型上游调控区的缺铁诱导特性.这将有助于进一步了解不同柑橘砧木种质资源在 耐缺铁特性方面存在差异的原因,为筛选优良的柑橘砧木提供理论依据.

### 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与处理

柑橘砧木品种种子购自中国农业科学院柑桔研究所种质资源研究室(表 1). 柑橘种子经 3%的高锰 酸钾溶液浸泡 30 min,去离子水漂洗 3次以上,剥去外种皮置于 28 ℃培养箱中暗培养 2周至种子萌发; 将萌发的种子放入 PNS 营养液中进行水培.光照条件为 20 000 Lx,16 h光照/8 h黑暗.水培 4周,每 7 d更换 1次营养液,水培过程中进行通气处理. 铁缺乏实验组 EDTA-Fe<sup>2+</sup>浓度为 2 μmol/L,铁充足对照 组 EDTA-Fe<sup>2+</sup>浓度为 20 μmol/L.

中文名	拉丁名	文中缩写
枳橙	P. $trfoliata$ (L.) Raf $ imes$ C. sinensis Osb Carrizo citrange	CC
莽山野柑	C. mangsanensis Mangshanyegan	MY
汕头酸橘	C. Reticulata Blanco cv. Shantoy suanju	SS
红橘	C. reticulata Blanco	BL
朱橘	Citrus erythrosa Hort.	EH
酸橘	C. sunki Hort.	SH
兰卜莱檬	C. limonia Osbeck cv. Rangpur lime	RL
扁平橘	C. Depressa Hayata cv. Shiikuwasha	SW
枸头橙	C. aurantium L.	AL
土橘	Citrus chuana Hort.	СН
枳	Poncirus trifoliate (L.) Raf Trifoliate orange	ТО
枳柚	P. trifoliata (L.) Raf $ imes$ C. grandis Osb. Zhiyou	ZY
资阳香橙	Citrus junos cv. Ziyangxiangcheng	ZX
兴义大红袍	C. reticulate cv. Xingyidahongpao	XD
皱皮橘	C. vessucosa Hort.	VH
枳雀	C. ichangensis Swing $ imes$ Poncirus trifoliata. Zhique	ZQ
黄樑檬	C. limonia Osbeck cv. Huanglumeng	HL

表1 本研究所用柑橘砧木品种

### 1.2 叶绿素质量分数、铁质量分数和铁螯合还原酶活性的测定方法

叶绿素质量分数的测定参考张志良等<sup>[14]</sup>的方法. 总铁质量分数的测定采用原子吸收分光光度计(TAS-900)法. 柑橘砧木根尖 FCR 酶活性测定参考 Waters 等<sup>[15]</sup>的方法.

### 1.3 基因的克隆测序与信息学分析

对克里曼丁橘(Citrus clementina)和甜橙(Citrus sinesis)基因组数据库进行检索,获得 FRO 同源基因 序列,然后用 Clontech Advantage 高保真酶扩增 FRO 同源基因及其启动子序列,进行亚克隆后送华大基 因公司测序验证.

序列聚类分析结果经 MEGA6 软件 UPGMA 算法产生, motif 结合位点经 MEME(Suite 5.0.5, http://meme-suite.org/)和 PlantRegMap(http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/binding\_site\_prediction.php)获得<sup>[16]</sup>,

聚类分析与 motif 结合位点的整合经 TBtools(v. 0. 6669)软件生成<sup>[17]</sup>.

### 1.4 基因表达分析

实验操作步骤参照天根生化科技有限公司的植物 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒说明书.按照表 2 设计不同基因的 RT-qPCR 引物对,并使用 Bio-Rad 公司 96 FX 型定量 PCR 仪进行基因表达水平分析,循环参数为 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 15 s, 58 ℃ 15 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环;最后反应产物进行熔解曲 线分析(60~95 ℃),鉴定产物特异性,根据 Ct 值计算基因的相对表达水平.

引物名称	引物序列	检测基因
$CsEF1\alpha$ - $RT$ - $F$	GTAACCAAGTCTGCTGCCAAG	$EF1\alpha$
$CsEF1\alpha$ -RT-R	GACCCAAACACCCAACACATT	$EF1\alpha$
CcFRO1-RT-F	AGGCACCCTTTACTACCTCCTAC	CcFRO1
CcFRO1-RT-R	GACAAGACTTCCCTTCGTTGATA	CcFRO1
CcFRO2-RT-F	GGTGCCAATGCGATCTCTTGG	CcFRO2
CcFRO2-RT-R	CATTGTCTGCAGCTACTCCTGC	CcFRO2
CcFRO3-RT-F	CCATTTTACAGGGCACGACAT	CcFRO3
CcFRO3-RT-R	ATTATTGGCCAAAGAGAGCAGC	CcFRO3
CcFRO4-RT-F	GACCTGAGCTAAAGAGGATGCT	CcFRO4
CcFRO4-RT-R	GCCAGACCAGATGAACAGATTG	CcFRO4
CcFRO5-RT-F	CCAGCTTTGAGATTCTGTTGGT	CcFRO5
CcFRO5-RT-R	GGTACTTGAGTTGCCATGTGTT	CcFRO5

表 2 定量 PCR 分析所用引物序列

### 2 结果与分析

#### 2.1 缺铁胁迫对 17 种柑橘砧木品种生理特性的影响

2.1.1 缺铁胁迫对17种柑橘砧木品种叶绿素质量分数和铁质量分数的影响

缺铁症状主要表现在柑橘叶片中,其中积橙(CC)、莽山野柑(MY)、酸橘(SH)、扁平橘(SW)、 构头橙(AL)、枳(TO)和兴义大红袍(XD)等几个柑橘砧木的黄化现象最为明显;汕头酸橘(SS)、红 橘(BL)、朱橘(EH)、兰卜莱檬(RL)、土橘(CH)、枳雀(ZQ)的黄化现象较明显;而枳柚(ZY)、资阳 香橙(ZX)、皱皮橘(VH)和黄檫檬(HL)等的缺铁黄化现象最轻.叶绿素质量分数检测结果显示,多 数砧木品种在缺铁处理后其叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素质量分数均明显下降(图 1a,1b,1c).以 叶绿素 a 为例,下降幅度最为明显的有莽山野柑(MY)、枳橙(CC)、黄檫檬(HL)、枳(TO)、汕头酸 橘(SS)等.另外,对主根长度和侧根数目进行统计,发现各品种主根长度和侧根数量在缺铁处理组和 对照组间差异无统计学意义.

铁质量分数可以在一定程度上衡量植物吸收铁的能力.与对照组相比,柑橘砧木在缺铁胁迫条件下,地上部分及地下部分的总铁质量分数均降低(图 1d,1e);由于铁元素的主要吸收部位在根部,所以 其地下部分的总铁质量分数高于地上部分,并且缺铁处理后总铁质量分数的降低程度也是地下部分高 于地上部分.

2.1.2 缺铁胁迫对 17 种柑橘砧木品种根系 FCR 酶活性的影响

铁螯合还原酶(FCR)是双子叶和非禾本科单子叶植物从土壤中吸收铁的关键酶,比较了 17 种砧木品种根系在铁营养充足与缺乏条件下 FCR 酶活性.与铁充足条件相比,17 种柑橘砧木品种在铁缺乏条件下,大部分砧木品种根系 FCR 酶活性均被诱导升高,其中资阳香橙(ZX)、枸头橙(AL)、枳柚(ZY)、枳雀(ZQ)、枳橙(CC)、兰卜莱檬(RL)、兴义大红袍(XD)、汕头酸橘(SS)和黄橡檬(HL)FCR 酶活性均极显著

升高,分别升高了 850%,133%,95%,61%,57%,53%,53%,34%,26%; 而莽山野柑(MY)、红橘(BL)、 朱橘(EH)、酸橘(SH)、扁平橘(SW)、土橘(CH)、枳(TO)和皱皮橘(VH)FCR 酶活性在铁营养欠缺条件 下与对照组的差异无统计学意义(图 2).



(e) 地下部分

CC 为枳橙, MY 为莽山野柑, SS 为汕头酸橘, BL 为红橘, EH 为朱橘, SH 为酸橘, RL 为兰卜莱檬, SW 为扁平橘, AL 为枸头橙, CH 为 土橘, TO 为枳, ZY 为枳柚, ZX 为资阳香橙, XD 为兴义大红袍, VH 为皱皮橘, ZQ 为枳雀, HL 为黄 檬檬; 铁充足表示铁营养充足 (20 μmol/L EDTA-Fe<sup>2+</sup>), 铁缺乏表示铁营养欠缺(2 μmol/L EDTA-Fe<sup>2+</sup>); \*表示 p<0.05, \*\*表示 p<0.01, 差异有统计学意义.</li>
图 1 柑橘砧木品种在缺铁处理和铁充足培养条件下叶片中的叶绿素 a、叶绿素 b 与

类胡萝卜素质量分数及其地上部分和地下部分的铁质量分数

根据这 17 种柑橘砧木品种在铁缺乏条件下其根系 FCR 酶活性是否被显著诱导升高,并结合其叶片黄 化程度、叶绿素质量分数变化等生理指标,将砧木分为 3 种类型:枳柚(ZY)、资阳香橙(ZX)和枳雀(ZQ) 属于缺铁耐受型;莽山野柑(MY)、红橘(BL)、朱橘(EH)、酸橘(SH)、扁平橘(SW)、土橘(CH)、枳 (TO)、兴义大红袍(XO)和皱皮橘(VH)属于缺铁敏感型;枳橙(CC)、汕头酸橘(SS)、兰卜莱檬(RL)、枸 头橙(AL)和黄橼檬(HL)属于中间型.

### 2.2 柑橘中铁螯合还原酶同源基因 CcFROs 对缺铁胁迫的响应

为了解柑橘中 FRO 基因家族成员的缺铁 胁迫响应特性以及在各砧木品种根中受缺铁诱 导表达特性,通过定量 PCR 检测了克里曼丁橘 基因组中 5 个同源基因在铁充足和缺乏条件下 不同砧木根中的表达水平.结果显示:与铁充 足相比,缺铁胁迫后 CcFRO1, CcFRO2 和 Cc-FRO3 基因在 17 种柑橘砧木品种根中的表达量 都上调(图 3a,3b,3c),而 CcFRO4 和 CcFRO5 基因表达量仅在少数砧木品种中上调(图 3d, 3e).在17 个柑橘砧木品种中,资阳香橙(ZX)、 红橘(BL)和土橘(CH)根中的 CcFRO1, Cc-FRO2 和 CcFRO3 基因的表达量上调幅度最 大,而枳(TO)、枳橙(CC)和兴义大红袍(XD)



CC 为枳橙, MY 为莽山野柑, SS 为汕头酸橘, BL 为红橘, EH 为朱橘, SH 为酸橘, RL 为兰卜莱檬, SW 为扁平橘, AL 为枸头橙, CH 为土橘, TO 为 枳, ZY 为枳柚, ZX 为资阳香橙, XD 为兴义大红袍, VH 为皱皮橘, ZQ 为 枳雀, HL 为黄檫檬; 铁充足表示铁营养充足(20  $\mu$ mol/L EDTA-Fe<sup>2+</sup>); \*表示 p < 0.05, \* \*表示 p < 0.05, \* \*表示 p < 0.01, 差异有统计学意义.

图 2 两种供铁水平下 17 种柑橘砧木品种根系 FCR 酶活性

根中的 CcFRO1, CcFRO2 和 CcFRO3 基因的表达量都比较低.以上结果表明不同柑橘砧木品种根中的 CcFRO 基因对缺铁诱导存在差异,其中 CcFRO1, CcFRO2 和 CcFRO3 表达明显受缺铁诱导.

分析铁充足与缺乏条件下 CcFROs 基因表达水平变化与砧木根中 FCR 酶活性间的相关性,结果显示 CcFRO1和 CcFRO3表达水平变化与砧木根中 FCR 酶活性变化存在正相关关系,其余 CcFROs 基因表达 水平变化与 FCR 酶活性变化均无正相关关系(图 3f). 推测 CcFRO1和 CcFRO3表达水平增加可能是导致 其根系铁螯合还原酶活性上升的主要原因.

2.3 CcFRO1 和 CcFRO3 基因上游调控区序列特征及其转基因分析

2.3.1 CcFRO1和CcFRO3基因上游调控区序列聚类、motif和序列差异分析

从柑橘砧木品种中克隆了 CcFRO1 和 CcFRO3 两个基因长约 3 000 bp 上游调控区,序列进化树分析 发现:柑橘砧木品种中 CcFRO1 上游调控序列可分为 5 类(黄橡檬在各网站上均无其基因组序列,且设计 引物多次扩增未能成功,因此去除):资阳香橙(ZX)、枳柚(ZY)与其他品种序列差异最大,各自单独成为 一类;枳雀(ZQ)、枳橙(CC)和枳(TO)为一类;酸橘(SH)和兰卜莱檬(RL)为一类;其余砧木品种为一类 (图 4a). CcFRO3 上游调控序列可分为 4 类:红橘(BL)、兴义大红袍(XD)、扁平橘(SW)、酸橘(SH)和莽 山野柑(MY)为一类;汕头酸橘(SS)、兰卜莱檬(RL)和资阳香橙(ZX)为一类;枳橙(CC)、土橘(CH)、朱橘 (EH)、枳(TO)和皱皮橘(VH)为一类;构头橙(AL)、枳柚(ZY)和枳雀(ZQ)为一类(图 4b).

砧木品种 CcFRO1 和 CcFRO3 启动子序列的转录因子结合位点分析结果显示: CcFRO1 基因启动子 序列在克里曼丁橘和甜橙基因组中分别检测到 289 和 272 个转录因子结合位点,资阳香橙的 CcFRO1 启动 子序列中转录结合位点和其他品种存在较大差异,ARR-B,BBR-BPC,BES1 和 TALE 等转录结合位点只 存在于资阳香橙 CcFRO1 基因上游调控序列中(图 4a).而 CcFRO3 启动子序列进行转录因子结合位点分 析发现,在 Citrus clementina 和 Citrus sinesis 基因组中分别检测到 169 和 151 个转录因子结合位点,在耐 缺铁和敏感类型砧木品种间存在 5 个差异的结合位点,其中仅在耐缺铁砧木品种启动子序列存在转录因子 E2F/DP,BBR-BPC 和 bZIP 结合位点,在敏感型砧木品种启动子序列中存在转录因子 GRAS 和 EIL 结合 位点(图 4b).作为调控铁吸收关键转录因子 FIT 的结合位点 E-box 特征序列(5'-CANNTG-3'),在敏感类 型品种中最多的存在 2 个,在耐缺铁品种中存在 2~5 个,其中资阳香橙 CcFRO1 启动子区存在 E-box 序 列最多,为5 个.





CC 为枳橙, MY 为莽山野柑, SS 为汕头酸橘, BL 为红橘, EH 为朱橘, SH 为酸橘, RL 为兰卜莱檬, SW 为扁平橘, AL 为枸头橙, CH 为 土橘, TO 为枳, ZY 为枳柚, ZX 为资阳香橙, XD 为兴义大红袍, VH 为皱皮橘, ZQ 为枳雀, HL 为黄 檫檬; 铁充足表示铁营养充足 (20  $\mu$ mol/L EDTA-Fe<sup>2+</sup>), 铁缺乏表示铁营养欠缺(2  $\mu$ mol/L EDTA-Fe<sup>2+</sup>);  $\Delta$ FCR 活性为缺铁条件下 FCR 酶活性/铁充足条件下 FCR 酶活,  $\Delta$ CeFRO 为缺铁条件下 CeFRO 基因表达水平/铁充足条件下 CeFRO 基因表达水平, 线性( $\Delta$ CeFRO)为  $\Delta$ CeFRO 表达水平与  $\Delta$ FCR 活性的线性关系趋势.

#### 图 3 缺铁胁迫柑橘砧木根中 CcFRO 基因表达水平及其与 FCR 酶活性变化分析

为进一步了解柑橘砧木 CcFRO1 和 CcFRO3 启动子序列和其耐缺铁特性的关系,用生物学软件 MegAlign 比较分析了所研究柑橘砧木的启动子序列.结果(图 4c)显示,不同柑橘砧木的启动子序列存在 较大的差异. CcFRO1 启动子序列中第 IV 类枳柚的差异最大,有 702 bp 的缺失,在不同位置分别有 45 bp 和 101 bp 的插入;第 II 类的酸橘(SH)和兰卜莱檬(RL)也存在较大的差异,均有 498 bp 缺失;第 III 类的



### (c) CcFRO1启动子序列比对

(d) CcFRO3启动子序列比对

CC 为枳橙, MY 为莽山野柑, SS 为汕头酸橘, BL 为红橘, EH 为朱橘, SH 为酸橘, RL 为兰卜莱檬, SW 为扁平橘, AL 为枸头橙, CH 为 土橘, TO 为枳, ZY 为枳柚, ZX 为资阳香橙, XD 为兴义大红袍, VH 为皱皮橘, ZQ 为枳雀, HL 为黄楝檬; "---"表示缺失的序列, "—" 表示没有差异的序列, "←→"表示插入的序列, "+"表示插入的碱基数, "一"表示缺失的碱基数.

图 4 CcFRO1, CcFRO3 启动子进化树与预测的 motif 结合位点示意图及序列比对

积橙(CC)、枳(TO)和枳雀(ZQ)在多个位置存在碱基的缺失和插入;第 I 类的汕头酸橘(SS)、莽山野柑(MY)、红橘(BL)、朱橘(EH)等砧木的序列同源性较高,不同砧木之间只有少数碱基的差异(资阳香橙 CcFRO1 启动子片段经多次扩增未能成功,图中未对其序列进行比对). CcFRO3 启动子序列中差异最大的 是第 III 类的枳橙(CC)、朱橘(EH)、土橘(CH)、枳(TO)、皱皮橘(VH)和第 IV 类的构头橙(AL),分别缺 失了 826 bp 和 822 bp,并且这 6 个品种的 pFRO3 序列同源性较高;其次第 IV 类的枳柚(ZY)和枳雀(ZQ) 的差异较大,在多个位置存在几十个碱基的缺失和插入,且枳雀(ZQ)和枳柚(ZY)的 pFRO3 序列同源性较 高;汕头酸橘(SS)、酸橘(SH)、扁平橘(SW)、资阳香橙(ZX)和兴义大红袍(XD)之间的 pFRO3 序列同源 性较高,都在同一位置缺失了 16 bp 的序列(图 4d).

2.3.2 CcFRO1 和 CcFRO3 基因上游调控区序列的启动特性

构建各类型启动子控制 GUS 基因表达的植物表达载体,并获得相应 T<sub>3</sub> 代转基因拟南芥株系,组织化 学染色结果显示:来源于不同砧木品种 CcFRO1 基因启动子表达特性存在很大差异,如来源于敏感型砧木 莽山野柑的启动子信号很弱,而来源于酸橘的启动子在根、茎、叶中均有很强的信号,资阳香橙的启动子 在根尖有很强的信号,来源于枳柚的启动子未见明显的组织化学染色.但在铁充足和缺乏情况下,不同砧 木品种的 CcFRO1 基因启动子的表达均未见明显差异.

在铁充足条件下,来源于敏感型砧木品种的 CcFRO3 基因启动子在根和地上组织器官中无明显的蓝 色,来源于耐缺铁砧木品种 CcFRO3 基因启动子在根尖、侧根和地上部分生长中心和叶柄中呈现出强烈的 蓝色,来源于中间型砧木品种 CcFRO3 基因启动子仅在地上部分生长中心和叶柄中有蓝色出现(图 5).在 缺铁条件下,敏感型和中间型品种启动子转基因植株在地上部分生长中心出现较淡的蓝色,而耐缺铁品种 启动子转基因植株在整个根系、茎中出现很强的蓝色,特别是主根根冠、伸长区以及成熟区蓝色都加深, 在地上部分生长中心蓝色较铁充足条件下变浅(图 5).这些结果表明在缺铁条件下,来源于敏感型和中间 型砧木品种的 CcFRO3 基因启动子表达活性变化较弱,耐缺铁砧木品种该基因启动子表达活性增强,有较强的缺铁诱导特性.



铁充足为铁营养充足(20 μmol/L EDTA-Fe<sup>2+</sup>), 铁缺乏为铁营养欠缺(2 μmol/L EDTA-Fe<sup>2+</sup>), *pFRO3-S* 幼苗为敏感型启动子植株幼苗, *pFRO3-M* 幼苗为中间型启动子植株幼苗, *pFRO3-T* 幼苗为耐受型启动子植株幼苗, *pFRO3-T* 根为耐受型启动子转基因植株根部. **图 5** 铁充足与欠缺条件下, *CcFRO1*, *CcFRO3* 启动子转基因拟南芥幼苗组织化学分析

### 3 讨论

### 3.1 CcFRO 基因在柑橘砧木缺铁胁迫中的作用

AtFRO 基因家族成员在植物各组织器官的金属离子稳态中起作用,其中 AtFRO2 基因编码缺铁诱导的铁螯合还原酶,负责还原根表面的三价铁,随后被还原的二价铁通过质膜的转运蛋白 IRT1 被运输至细胞内<sup>[4,18]</sup>.本文用拟南芥的 8 个 AtFRO 基因的氨基酸序列作为参考,检索和克隆了柑橘的 5 个 FRO 同源 基因.根据 CcFROs 转录水平以及缺铁诱导特性,表明 CcFRO1, CcFRO2 和 CcFRO3 基因能够响应柑橘

砧木缺铁胁迫. 根据与拟南芥的 AtFROs 基因亲缘关系推测, CcFRO1 参与柑橘砧木叶绿体中的铁还原过程, CcFRO2 参与种子中的铁还原过程, CcFRO3 负责根部的铁还原过程, CcFRO4 和 CcFRO5 则可能在 维持细胞内金属离子的动态平衡中发挥重要作用,至于具体的作用和机制还有待进一步实验.

### 3.2 转录因子参与柑橘对铁的吸收过程

转录因子在植物响应非生物胁迫中发挥着重要作用.其中 bHLH 类 FIT 转录因子调控双子叶植物铁 吸收关键基因 FRO2, IRT1 等的表达,参与铁吸收过程.在拟南芥中,AtFRO2 的表达受转录因子 FIT 与 AtbHLH38, AtbHLH39, AtbHLH100 和 AtbHLH101 的共同调节<sup>[19-20]</sup>.在本研究的柑橘砧木对铁响应 的 CcFRO1 和 CcFRO3 启动子区存在多个 bHLH 结合位点和 E-box 特征序列(5'-CANNTG-3'),但是柑橘基因组中所预测的能结合 CcFRO1 和 CcFRO3 启动子的 bHLH 类转录因子中并没有包括同属于 bHLH 类的 FIT 转录因子.这表明柑橘基因组中调控铁吸收的 bHLH 类转录因子可能不是 FIT, 而是其他 bHLH 类转录因子.

在耐缺铁柑橘砧木品种的 CcFRO1 和 CcFRO3 启动子区特异存在有 E2F/DP, TALE, ARR-B, BBR-BPC, BES1, CAMTA 和 bZIP 结合位点,其中 E2F/DP 和 BBR-BPC 在耐缺铁柑橘品种的 CcFRO1 和 Cc-FRO3 启动子序列中都存在.这些转录因子参与调控细胞增殖<sup>[21]</sup>、分生组织形成<sup>[22]</sup>、以及 CK<sup>[23]</sup>, GA<sup>[24]</sup>, BR<sup>[25]</sup>等激素信号和钙信号<sup>[26-27]</sup>的响应过程等.暗示缺铁过程中,耐缺铁柑橘品种会调配激素信号来刺激 或激活根发育相关转录因子的表达,从而提升植物根系吸收铁的能力.而在敏感型品种中特异存在 GRAS 和 EIL 两个转录因子结合位点,EIL1 与 FIT 直接作用保持 FIT 蛋白水平来参与乙烯对缺铁的响应过 程<sup>[28]</sup>,GRAS 在植物根、茎顶端以及茎的顶端分生组织发育阶段中发挥作用<sup>[29]</sup>,这时转录因子在敏感砧木中可能起负调控作用.这些分析结果表明多个转录因子参与柑橘砧木缺铁响应过程,为下一步深入研究提供了重要的线索.

### 参考文献:

- [1] 周心智,张云贵. NaCl 胁迫对 5 种柑橘砧木生长及生理特性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(11): 1-6.
- [2] 吉前华,李玉堂,王永清.石灰性土壤上柑桔缺铁黄化研究进展 [J].四川农业大学学报,1998,16(3):365-369.
- [3] CONNOLLY E L, CAMPBELL N H, GROTZ N, et al. Overexpression of the FRO2 Ferric Chelate Reductase Confers Tolerance to Growth on Low Iron and Uncovers Posttranscriptional Control [J]. Plant Physiology, 2003, 133(3): 1102-1110.
- [4] ROBINSON N J, PROCTER C M, CONNOLLY E L, et al. A Ferric-Chelate Reductase for Iron Uptake from Soils[J]. Nature, 1999, 397(6721): 694-697.
- [5] MUKHERJEE I, CAMPBELL N H, ASH J S, et al. Expression Profiling of the Arabidopsis Ferric Chelate Reductase (FRO) Gene Family Reveals Differential Regulation by Iron and Copper [J]. Planta, 2006, 223(6): 1178-1190.
- [6] WU H L, LI L H, DU J, et al. Molecular and Biochemical Characterization of the Fe(III) Chelate Reductase Gene Family in Arabidopsis Thaliana [J]. Plant and Cell Physiology, 2005, 46(9): 1505-1514.
- [7] BERNAL M, CASERO D, SINGH V, et al. Transcriptome Sequencing Identifies SPL7-Regulated Copper Acquisition Genes FRO4/FRO5 and the Copper Dependence of Iron Homeostasis in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2012, 24(2): 738-761.
- [8] FENG H Z, AN F Y, ZHANG S Z, et al. Light-Regulated, Tissue-Specific, and Cell Differentiation-Specific Expression of the Arabidopsis Fe(III)-Chelate Reductase Gene AtFRO6 [J]. Plant Physiology, 2006, 140(4): 1345-1354.
- [9] LI L Y, CAI Q Y, YU D S, et al. Overexpression of AtFRO6 in Transgenic Tobacco Enhances Ferric Chelate Reductase Activity in Leaves and Increases Tolerance to Iron-Deficiency Chlorosis [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(6): 3605-3613.
- [10] JEONG J, COHU C, KERKEB L, et al. Chloroplast Fe(III) Chelate Reductase Activity is Essential for Seedling Viability under Iron Limiting Conditions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(30): 10619-10624.
- [11] SUDAHONO, BYRNE D H, ROUSE R E. Greenhouse Screening of Citrus Rootstock for Tolerance to Bicarbonate-In-

duced Iron Chlorosis [J]. HortScience, 1994, 29(2): 113-116.

[12] 朱世平,陈娇,马岩岩,等. 柑橘砧木评价及应用研究进展 [J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1669-1678.

- [13] 朱世平, 陈娇, 刘小丰, 等. 15 种柑橘砧木出苗期耐盐碱性评价 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(6): 47-52.
- [14] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导 [M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2009: 33-35.
- [15] WATERS B M, BLEVINS D G, EIDE D J. Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase Involved in Root Iron Acquisition [J]. Plant Physiology, 2002, 129(1): 85-94.
- [16] JIN J P, TIAN F, YANG D C, et al. PlantTFDB 4.0: Toward a Central Hub for Transcription Factors and Regulatory Interactions in Plants [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 45(D1): 1040-1045.
- [17] CHEN C J, XIA R, CHEN H, et al. TBtools, a Toolkit for Biologists Integrating Various HTS-Data Handling Tools with a User-Friendly Interface [J]. Molecular Plant, 2020, 13: 1194-1202.
- [18] CONNOLLY E L, FETT J P, GUERINOT M L. Expression of the IRT1 Metal Transporter is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation [J]. The Plant Cell, 2002, 14(6): 1347-1357.
- [19] WANG N, CUI Y, LIU Y, et al. Requirement and Functional Redundancy of Ib Subgroup BHLH Proteins for Iron Deficiency Responses and Uptake in Arabidopsis Thaliana [J]. Molecular Plant, 2013, 6(2): 503-513.
- [20] YUAN Y X, WU H L, WANG N, et al. FIT Interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in Regulating Iron Uptake Gene Expression for Iron Homeostasis in Arabidopsis [J]. Cell Research, 2008, 18(3): 385-397.
- [21] DEL POZO J C, DIAZ-TRIVINO S, CISNEROS N, et al. The E2FC-DPB Transcription Factor Controls Cell Division, Endoreplication and Lateral Root Formation in a SCF-Dependent Manner [J]. Plant Signaling & Behavior, 2007, 2(4): 273-274.
- [22] HAMANT O, PAUTOT V. Plant Development: a TALE Story [J]. Comptes Rendus Biologies, 2010, 333(4): 371-381.
- [23] SAKAI H, HONMA T, AOYAMA T, et al. ARR1, a Transcription Factor for Genes Immediately Responsive to Cytokinins [J]. Science, 2001, 294(5546): 1519-1521.
- [24] KOOIKER M, AIROLDI C A, LOSA A, et al. BASIC PENTACYSTEINE1, a GA Binding Protein that Induces Conformational Changes in the Regulatory Region of the Homeotic Arabidopsis Gene SEEDSTICK [J]. The Plant Cell, 2005, 17(3): 722-729.
- [25] YIN Y H, VAFEADOS D, TAO Y, et al. A New Class of Transcription Factors Mediates Brassinosteroid-Regulated Gene Expression in Arabidopsis [J]. Cell, 2005, 120(2): 249-259.
- [26] FINKLER A, ASHERY-PADAN R, FROMM H. CAMTAs: Calmodulin-Binding Transcription Activators from Plants to Human [J]. FEBS Letters, 2007, 581(21): 3893-3898.
- [27] BOUCHÉ N, SCHARLAT A, SNEDDEN W, et al. A Novel Family of Calmodulin-Binding Transcription Activators in Multicellular Organisms [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(24): 21851-21861.
- [28] LINGAM S, MOHRBACHER J, BRUMBAROVA T, et al. Interaction between the BHLH Transcription Factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Reveals Molecular Linkage between the Regulation of Iron Acquisition and Ethylene Signaling in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2011, 23(5): 1815-1829.
- [29] BOLLE C. The Role of GRAS Proteins in Plant Signal Transduction and Development [J]. Planta, 2004, 218(5): 683-692.

#### 责任编辑 周仁惠