

# *CclSAUR49* 基因的表达特征及对类柠檬苦素生物合成的影响

余洪, 易倩, 张曼曼, 朱世平, 王福生\*, 赵晓春\*

(西南大学·中国农业科学院柑桔研究所·国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

**摘要:**【目的】探究 *CclSAUR49* 基因对柑橘类柠檬苦素生物合成的影响。【方法】通过高效液相色谱(HPLC)检测叶片中的诺米林和柠檬苦素含量;利用实时荧光定量PCR分析基因的表达量。分别从柚和湖北早实枳中克隆 *CclSAUR49* 基因编码序列(coding sequence, CDS)及启动子,利用瞬时转化烟草对 *CclSAUR49* 蛋白进行表达定位;通过遗传转化湖北早实枳分析该基因的组织表达特性及其对类柠檬苦素生物合成的影响。【结果】类柠檬苦素含量和 *CclSAUR49* 表达水平在2个沙田柚品种间以及叶片的生长发育中均呈显著负相关。*CclSAUR49* 蛋白定位于质膜和细胞核。从湖北早实枳中克隆得到的 *CclSAUR49* 基因的启动子序列中不含吲哚乙酸(IAA)响应元件。启动子活性分析发现, *CclSAUR49* 基因主要在茎、根和老叶中表达,在嫩叶中没有表达。超量表达 *CclSAUR49* 导致类柠檬苦素含量显著降低,植株的叶片和节间显著伸长,茎增粗。【结论】柑橘 *CclSAUR49* 基因的表达有明显的组织特异性,对类柠檬苦素的合成或积累有抑制作用。

**关键词:** 柚;枳; *CclSAUR49* 基因;类柠檬苦素;启动子;顺式作用元件;超量表达

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)08-1240-12

## Characteristics of *CclSAUR49* expression and its effect on limonoids biosynthesis in citrus

YU Hong, YI Qian, ZHANG Manman, ZHU Shiping, WANG Fusheng\*, ZHAO Xiaochun\*

(Citrus Research Institute of Southwest University/ Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** 【Objective】Limonoids are secondary metabolites widely distributed in the Rutaceae and Meliaceae, with biological and pharmacological activities such as anti-oxidation, anti-allergy, anti-obesity, anti-osteoporosis, anti-cancer, anti-bacteria, anti-virus. The genetic modulation of limonoids biosynthesis is still poorly understood. So the investigation of genes regulating the limonoids biosynthesis and the study of their functions will help to understand the regulatory mechanism of limonoids biosynthesis and provide a theoretical basis for further cultivation of high-quality citrus. It has been shown that the *SAUR* significantly affects the biological yield and production of secondary metabolites by regulating the hormone metabolism in the plant, but whether it is involved in the biosynthesis of limonoids has not been reported. To study the role of *CclSAUR49* gene in biosynthesis of limonoids and characteristics of its promoter in citrus, the open reading frame (ORF) and promoter of *CclSAUR49* gene were cloned from citrus. Limonoids contents, gene expression levels, subcellular location and promoter activity were analyzed. 【Methods】Limonoids contents and expression of the *CclSAUR49* in the leaves of different developmental stages from two genotypes of Shatianyou pomelos [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] varied in limonoids content were analyzed with HPLC and Real-time qRT-PCR. Specific primers were designed to amplify the target fragment using the sequence in the Clementine genome (<http://phytozome.jgi.doe>).

收稿日期: 2021-03-21 接受日期: 2021-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(31901995); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-26)

作者简介: 余洪, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树种质资源与遗传。Tel: 18392467414, E-mail: zijinfuyi@163.com

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: wfs980135@163.com; E-mail: zxc@cric.cn

gov/pz/portal.) as a reference. The coding region and promoter of the *CclSAUR49* were isolated from Shatianyou pomelo and precocious trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) via PCR amplification, respectively. Subcellular localization of the *CclSAUR49* protein was accomplished with transient expression of 35S::SAUR49-GFP fusion protein in the leaves of *Nicotiana benthamiana* and observed using confocal microscope. *cis*-acting element of the promoter was predicted through the PlantCARE website. In order to analyze the characteristics of the promoter, pSAUR49::GUS fusion expression vector was constructed and transformed into precocious trifoliolate orange. Using uninfested precocious trifoliolate orange as a control, the whole positive plants were stained chemically with GUS (beta-glucuronidase) and decoloured with 75% ethanol until the chlorophyll in the leaves of the plants had completely faded to a white colour and then observed and photographed. The overexpression vector of the pSAUR49::GFP fusion protein was constructed and transformed into precocious trifoliolate orange. Resistant shoots were obtained and grafted on potted rootstock. Limonoids content and expression of the *CclSAUR49* gene in transgenic plants were analyzed, the length of leaf and internode and circumference of stem were determined three months after grafting. 【Results】HPLC results showed that the limonoids content of the two Shatianyou genotypes was significantly different, with STY2 containing significantly more limonoids than STY1. The contents of nomilin and limonin were continuously decreasing along with the growth and development of leaves, while the gene expression level of the *CclSAUR49* showed an increasing trend. This revealed that limonoids contents and levels of the *CclSAUR49* expression demonstrated a significant negative correlation during the development of the leaf with correlation coefficients of  $-0.978$ ,  $-0.958$  ( $p < 0.01$ ) in STY1 and STY2, respectively. Subcellular localization analysis indicated that *CclSAUR49* protein was located in the plasma membrane and nucleus. A 1600 bp fragment upstream of the *CclSAUR49* gene start codon (ATG) was cloned from citrus. The results of bioinformatic analysis predicted several types of *cis*-acting elements in the promoter of the *CclSAUR49* gene, but no AuxREs -responsive elements had been found. Six transgenic seedlings of the *CclSAUR49* and *GUS* fusion expression were obtained by citrus genetic transformation. The results of GUS staining transgenic seedlings indicated that *GUS* was mainly expressed in the stems, roots and old leaves, but not in the young leaves. Two transgenic seedlings of the *CclSAUR49* and *GFP* fusion expression were obtained. Comparing the growth performance of the positive transgenic with the control plants grown under the same conditions, significant morphological difference was observed in the transgenic plants with larger size of leaves, longer internodes and thicker stems. Compared with the wild type control, both nomilin and limonin content were significantly reduced, with reductions of 44.81% and 22.60% of nomilin content and 23.74% and 67.36% of limonin content in OE-1 and OE-2, respectively. qRT-PCR results showed that the expression levels of the *CclSAUR49* was largely and significantly increased in the overexpression transgenic plants, with 661 and 156 fold increases in OE-1 and OE-2, respectively. Analysis of the expression of the *CclSAUR49* in relation to the limonoids content revealed a significant negative correlation with correlation coefficients of  $-0.983$  ( $p < 0.01$ ) and  $-0.975$  ( $p < 0.01$ ) in OE-1 and OE-2, respectively. In order to clarify the role of the *CclSAUR49* gene in the limonoids biosyntheses, the expression analysis was also performed on the six genes associated with limonoids synthesis identified by previous transcriptomic analysis. The overexpression of the *CclSAUR49* affected the expression of those genes, suggesting that the *CclSAUR49* might interact with some of those genes to regulate the biosynthesis or accumulation of limonoids in citrus. 【Conclusion】The *CclSAUR49* gene was a tissue-specific expression gene. It negatively affected the biosynthesis or accumulation of limonoids in citrus.

**Key words:** *Citrus grandis*; *Poncirus trifoliata*; *CclSAUR49*; Limonoids; Promoter; *Cis*-acting element; Overexpression

类柠檬苦素化合物是一种广泛分布于芸香科和楝科植物中的次生代谢产物,具有杀虫、抗氧化、抗炎、抗细菌、抗病毒和抗癌等生物学活性和药理学活性<sup>[1-6]</sup>。目前,对类柠檬苦素化合物生物合成的遗传调控仍缺乏了解,挖掘柑橘类柠檬苦素化合物生物合成的相关基因并对其功能进行研究,有助于了解类柠檬苦素化合物生物合成的调控机制,同时为次生代谢产物的遗传改良提供理论基础。生长素早期响应基因包括3大基因家族:*Aux/IAA* (Auxin/Indole Acetic Acid)、*GH3* (Gretchen hagen3)和 *SAUR* (small auxin up RNA)<sup>[7]</sup>。*SAUR* 基因是最大的基因家族,其主要功能是促进细胞伸长、参与生长素合成和转运、控制叶片的发育和衰老、参与植物弯钩反应、响应逆境胁迫等<sup>[8-14]</sup>。拟南芥中的 *SAUR* 基因家族在系统发育树上可分为3个分支:分支 I 和 II 中的基因在非胁迫环境下趋向于在叶中高表达,在根中低表达,通过调节生长素的转运正向调控细胞的扩增;而分支 III 中的基因表现出相反的表达模式。拟南芥中的 *SAUR63*、*SAUR19* 和 *SAUR41* 基因分别属于 I、II 和 III 亚族<sup>[15]</sup>。在拟南芥中过量表达 *SAUR63*、*SAUR19* 和 *SAUR41* 基因均能引起下胚轴伸长,下胚轴表皮细胞扩增,下胚轴基部的吲哚乙酸 (IAA) 转运增强,其中, *SAUR41* 和 *SAUR19* 基因过量表达株系的生物产量显著增加<sup>[16-18]</sup>。而在水稻中过量表达 *OsSAUR39* 基因后,IAA 向植株基部运输的能力降低,与生长素生物合成和转运蛋白相关的基因表达下调,叶绿素含量减少,花青素、脱落酸、蔗糖和淀粉含量增加,同时,一些与糖的合成和运输相关的基因表达上调<sup>[9]</sup>。*OsSAUR45* 与 *OsSAUR39* 基因具有相似功能,2个基因均位于水稻第9条染色体上,过量表达 *OsSAUR45* 基因的水稻转基因植株的叶片变窄,结实减少,生长素含量及转运水平降低<sup>[20]</sup>。在颠茄中,过量表达 *AbSAUR1* 基因的植株生物产量显著提高,莨菪烷生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 的产量也随之提高<sup>[21]</sup>。因此,过量表达 *SAUR* 基因不仅能提高植物的生物产量,还能提高次生代谢产物的产量。类柠檬苦素化合物是三萜类次生代谢物质,以法尼基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 为底物,在韧皮部合成诺米林,转运到叶片、果实、种子等器官,进一步合成其他的类柠檬苦素化合物<sup>[22]</sup>。笔者课题组在前期研究中发现, *CcISAUR49* 基因与拟南芥的 *AtSAUR19* 亚家族 (*AtSAUR19-24*)

基因聚在一组,在资阳香橙上主要在茎、叶、花中表达,在果实中表达水平较低,而在根中几乎不表达,且 *CcISAUR49* 基因的表达量随着叶片的生长发育呈现持续上升的趋势<sup>[23]</sup>。已有研究表明, *SAUR* 基因通过调控植物的激素代谢显著影响植株的生物产量以及次生代谢产物的产量,对其是否参与调控类柠檬苦素的生物合成未见研究报道。因此,笔者在本研究中将从柑橘中克隆 *CcISAUR49* 基因的启动子,通过转基因分析该启动子的活性和表达特征。同时通过过量表达分析 *CcISAUR49* 基因对类柠檬苦素生物合成的影响,探索该基因在柑橘类柠檬苦素生物合成中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验所用的沙田柚 [*Citrus grandis* (L.) Osbeck, STY1] 为本实验室保存的遗传材料,冬瓜圈沙田柚 [*C. grandis* (L.) Osbeck, STY2] 和湖北早实枳 (*Poncirus trifoliata* Raf.) 由国家果树种质重庆柑橘圃提供。根据 Wang 等<sup>[24]</sup> 的方法从2个沙田柚品种的植株上分别采集3个不同发育时期的叶片 (L1、L2 和 L3), 经液氮处理后保存于 -80 °C 超低温冰箱,用于基因表达和类柠檬苦素含量分析。用湖北早实枳的上胚轴进行遗传转化。启动子驱动  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因 (beta-glucuronidase, *GUS*) 的植物表达载体为 p1300GNGM, 含绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein, *GFP*) 和 *GUS* 报告基因; 亚细胞定位载体为 Cam 35S-*GFP*, 含 *GFP* 报告基因。2个载体均由西南大学/中国农业科学院柑桔研究所的柑桔改良中心课题组馈赠。过量表达载体 PGBi 为笔者实验室保存。大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自北京擎科生物科技有限公司, 植物遗传转化用农杆菌为 EHA105 菌株 (笔者实验室冻存)。引物合成及测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

植物总 DNA 提取试剂盒购自北京君诺德生物技术有限公司; 植物总 RNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒购自南京赛泓瑞生物公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自北京百奥创新科技有限公司; 实时 PCR 荧光染料试剂购自近岸蛋白质科技有限公司; 限制性内切酶及反转录试剂盒购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 其余常规酶制品购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 植物

组织培养基本培养基为 MS (murashige and skoog basal medium with vitamins), 购自 Phyto Technology Laboratories<sup>®</sup>; 高效液相色谱 (HPLC) 级乙腈购自上海安普实验科技股份有限公司; 甲醇 (分析纯) 购自重庆市钛新化工有限公司; HPLC 级柠檬苦素和诺米林标准品购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国)。

## 1.2 类柠檬苦素含量的检测

将液氮冷冻的叶片用磨样机磨成粉末, 称取 1.00 g 细粉至装有 10 mL 甲醇的玻璃烧杯, 置于超声震荡仪中超声提取 10 min, 静置后取上清液至另一干净的 50 mL 烧杯中, 再加入甲醇重复提取 2 次, 合并 3 次提取的上清液置于电热板上的 40 °C 沙浴中过夜蒸干, 用 3 mL 体积分数 30% 乙腈溶解干物质, 将溶解液转入 2 mL 离心管中, 6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液用微孔过滤器过滤后用于 HPLC 检测, 每个样品 3 次重复。

柠檬苦素和诺米林的检测条件: 以  $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=38:62$  为流动相, 等度洗脱, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 检测波长为 210 nm。以质量浓度均为 25 mg·L<sup>-1</sup> 的柠檬苦素 (Cat. No. L9647) 和诺米林

(Cat. No. 77518) 混合溶液为标样, 用柠檬苦素和诺米林的总量代表类柠檬苦素的含量。

## 1.3 基因表达分析

以 STY1 和 STY2 的 3 个发育时期叶片为材料, 用植物总 RNA 提取试剂盒 (Cat. No. RN38) 提取总 RNA, 采用 RevertAid First Strand cDNA synthesis 试剂盒 (Cat. No. K1622) 将 1.0 μg RNA 反转录合成 cDNA。 *CelSAUR49* 基因实时荧光定量 PCR 引物参照王福生等<sup>[23]</sup> 的研究 (表 1)。用 NovoStart<sup>®</sup> SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒 (Cat. No. E096-01A) 检测目的基因表达水平。 qRT-PCR 反应体系为 10 μL, 以稀释 10 倍的 2 μL cDNA 为模板, 上、下游引物各 0.2 μL (10 μmol·L<sup>-1</sup>), SYBR mix 5 μL, ddH<sub>2</sub>O 2.6 μL; 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 30 s, 循环 40 次; 每个样品 3 次重复。于 CFX96 Touch<sup>™</sup> 荧光定量 PCR 检测系统 (BioRad, 美国) 检测基因表达水平。 选用柑橘 *GAPDH* 基因为内参基因, 用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算基因相对表达量。

## 1.4 亚细胞定位

以克里曼丁橘基因组 (<http://phytozome.jgi.doe>。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')
SAU49sub-F	<u>AGAACACGGGGGACGAGCTCATGGCTATTCATGTACCTGGAATC</u>
SAU49sub-R	<u>CGACTCTAGAGGATCCATATGATTCATTCAAGCTGGAAGT</u>
SAUR49-qPCR-F	GTACCTGGAATCATGTACGCTA
SAUR49-qPCR-R	CACGACTTTGGATGTTGAAACT
257P450-qPCR-F	ATGGAGGCTTGCAAAGGAGA
257P450-qPCR-R	AATGGGCTGATCTTGCATCC
209P450-qPCR-F	CAGGCTTATGTCCCGTTTGG
209P450-qPCR-R	TTCTGAAAGCGGGAGAGTGC
632P450-qPCR-F	TATGGGAATCGCAACTGTGG
632P450-qPCR-R	CGGCAGAACATCAAAGTCCA
367bHLH-qPCR-F	GCTGCGTGTTCCTCTAACGA
367bHLH-qPCR-R	TGCCCATATCTCCATCTCCA
CiOSC-qPCR-F	CTTTTGGCCITGGTACTATGGT
CiOSC-qPCR-R	CATTTCCCTTCGATGTTCCACT
CiMYB-qPCR-F	GGGCGAACCGATAACGAGAT
CiMYB-qPCR-R	GCTGGAGTCTGGCAGCAAAT
SAU49-Pr1F	TCTTCACTACCAGTTCACCTGCAG
SAU49-Pr2F	<u>GGCCAGTGCCAAGCTTGCTCTCCTTTCTGCTCCCAAATCACT</u>
SAU49-SP1	ACCCGAATTCTCCTCAGCCTTACT
SAU49-SP2	<u>GACCACCCGGGGATCCGAAATGGCCTTTTGGCACGACTT</u>
SAU49OE-F	<b>ATTTAAATATGGCTATTCATGTACCTGGAATC</b>
SAU49OE-R	<b>GGATCCATATGATTCATTCAAGCTGGAAGT</b>
M13Rf	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC
GUS-R	CTGCCACTGACCGGATGCCG

注: 下划线为构建载体时所用的接头; 加粗为 *Swa* I 和 *Bam*H I 酶切位点。

Note: Underlined sequences are the adaptors for constructing vector. Bolded sequences are *Swa* I and *Bam*H I cleavage sites.

gov/pz/portal.)中的 *CclSAUR49* 基因的 CDS 序列为参考,利用 Primer3(<https://primer3.ut.ee/>)设计 1 对带有 Cam35S-GFP 接头的特异引物(表 1),以反转录得到的沙田柚 cDNA 为模板,使用 TaKaRa Ex Taq (Cat. No. RR01AM)通过 PCR 扩增基因 CDS 序列,将回收得到的 CDS 片段使用 In-Fusion® HD Cloning Kit 试剂盒(Cat. No. 639649)构建到经 *Bam*H I /*Sac* I 双酶切的 Cam35S-GFP 载体上,得到 Cam35S::SAUR49-GFP 融合蛋白瞬时表达载体。连接产物经转化、检测后,选取 5 个阳性克隆送至北京擎科生物科技有限公司测序。将验证过的重组质粒利用电转法转入农杆菌菌株 EHA105,保存 PCR 鉴定为阳性的菌液于 -80 °C 冰箱备用。通过农杆菌渗透法将融合表达载体注射到培养 30 d 的本氏烟草叶片中,同时注射 Cam 35S-GFP 载体作为对照,培养 3 d 后用 FV300 激光共聚焦显微镜(Olympus, 日本)观察荧光信号。

### 1.5 启动子活性分析

用 GENENODE™ CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取湖北早实枳基因组 DNA,以克里曼丁基因组(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal/>)中的序列为参考,提取 *CclSAUR49* 基因 ATG 起始密码子上游 2000 bp 的基因组 DNA 序列,用 Primer3(<https://primer3.ut.ee/>)设计 2 对特异引物(表 1)扩增目的片段。使用 PrimeSTAR® Max DNA polymerase (Cat. No. R045A)进行 2 轮扩增。第一轮用 SAU49-Pr1F 和 SAU49-SP1 扩增,反应体系为 25  $\mu$ L: DNA 模板 2  $\mu$ L (50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), SAU49-Pr1F、SAU49-SP1 引物(均为 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L, PrimeSTAR Max Premix 12.5  $\mu$ L,用 ddH<sub>2</sub>O 补足体积,反应条件为:98 °C 10 s,65 °C 15 s,72 °C 2 min,共 35 个循环。第二轮扩增以第一轮扩增产物为模板,利用 SAU49-Pr2F 和 SAU49-SP2 为引物进行扩增,扩增体系与第一轮扩增相同,扩增程序为:98 °C 10 s,65 °C 15 s,72 °C 20 s。扩增产物电泳后用 Bioflux 公司的 BioSpin Gel Extraction Kit 试剂盒(Cat. No. BSC02M1)回收。

经 PCR 扩增回收后的 *CclSAUR49* 基因启动子片段用 In-Fusion® HD Cloning Kit (Cat. No. 639649) 构建到经 *Hind* III/*Bam*H I 双酶切的 p1300GNGM 表达载体中,得到启动子与 *GUS* 报告基因融合表达的载体 pSAUR49::GUS。连接产物经转化、检测后,挑取 5 个阳性菌斑送至北京擎科生物科技有限公司测序,得到 *CclSAUR49* 基因的启动子

序列,利用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析该启动子序列中的潜在调控元件。

将重组质粒利用电转法转入农杆菌菌株 EHA105。柑橘遗传转化参照 Peng 等<sup>[25]</sup>的方法。将含有目的质粒的农杆菌培养至 OD<sub>600</sub>=0.5~0.6 时,侵染湖北早实枳的上胚轴。共培养 3 d 后转至筛选培养基上进行抗性芽再生和筛选培养,两端愈伤组织长出新芽后用紫外光灯照射挑选阳性转基因芽,待抗性芽长为 1~2 cm 后,将阳性茎段转入生根培养基中,待根长为 1~2 cm 后,取叶片利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,用表达载体上的序列引物 GUS-R 和启动子下游引物 SAU49-SP2 (表 1)对转基因植株进行 PCR 鉴定,筛选阳性植株。以未侵染的湖北早实枳植株作为对照,参照 Jefferson 等<sup>[26]</sup>的方法对整个阳性植株进行 GUS 化学染色,用 75%( $\varphi$ )乙醇脱色至植株叶片的叶绿素完全褪去呈现白色后,观察拍照。

### 1.6 超量表达分析

将柚中克隆到的 *CclSAUR49* 基因的 CDS 连接到 T-Vector PMD 19(Cat. No. 3271),测序正确后提取质粒,经 *Swa* I 和 *Bam*H I 双酶切后连接到超量表达载体 PGBi 上,将超量表达载体 pSAUR49::GFP 通过农杆菌转化湖北早实枳,待抗性芽长为 1~2 cm 后,将筛选得到的阳性芽嫁接到田间,同时嫁接遗传转化的湖北早实枳作为阴性对照。嫁接植株在温室生长 90 d 后,取植株叶片提取 DNA 进行阳性 PCR 检测;提取总 RNA 进行实时荧光定量 PCR 分析;并检测转基因植株叶片中的类柠檬苦素含量。

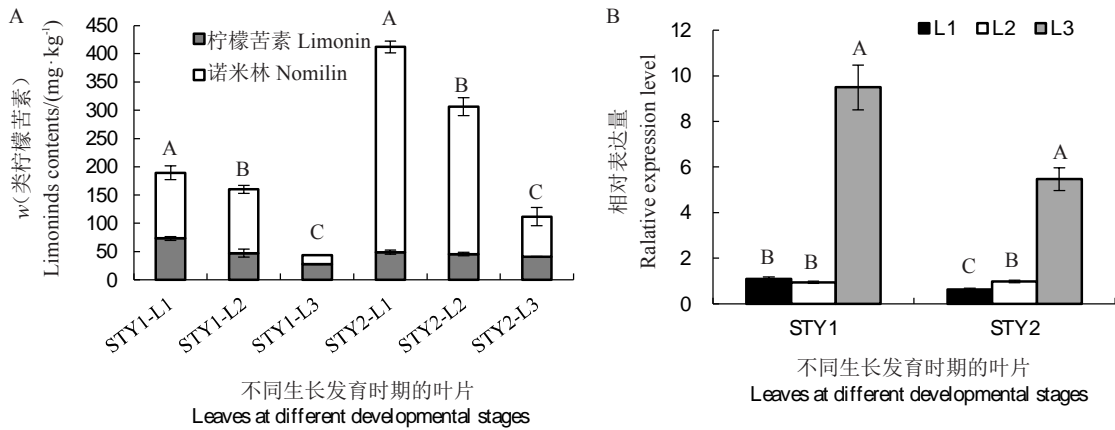
### 1.7 数据分析

试验结果均为 3 次重复的平均值,采用 Excel 2010 进行数据整理、标准偏差计算及图表绘制,差异显著性及相关性分析采用 SPSS 20.0 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CclSAUR49* 对类柠檬苦素生物合成的影响

在 2 个沙田柚品种中,*CclSAUR49* 的表达水平与叶片中的类柠檬苦素含量呈负相关。虽然 2 个沙田柚品种中的类柠檬苦素含量有明显差异,但以诺米林和柠檬苦素为代表的类柠檬苦素含量在 2 个沙田柚品种中均表现出随着叶片的生长发育逐渐降低的趋势(图 1-A),特别在 L2~L3 时期下降较快。其



A. STY1 和 STY2 叶片 3 个生长发育时期的类柠檬苦素含量; B. *CclSAUR49* 基因在叶片 3 个生长发育时期的相对表达量。不同大写字母表示在同一基因型中差异显著 ( $p < 0.01$ )。

A. The limonoids contents of leaves at three developmental stages in STY1 and STY2; B. Relative expression level of *CclSAUR49* gene at three developmental stages of leaves in STY1 and STY2. Different capital letters indicate significant difference ( $p < 0.01$ ).

图 1 叶片中的类柠檬苦素含量和 *CclSAUR49* 基因表达量的变化

Fig. 1 The changes of limonoids content and *CclSAUR49* gene expression level in leaves

中, 诺米林含量的变化更为明显。 *CclSAUR49* 基因表达的变化与类柠檬苦素含量的变化刚好相反, 在叶片生长发育的早期缓慢上升, 至叶片生长发育后期急速上升, 而且在低类柠檬苦素的 STY1 中的表达高于高类柠檬苦素的 STY2 (图 1-B)。叶片 3 个生长发育时期中类柠檬苦素含量和 *CclSAUR49* 基因表达的变化在 2 个沙田柚品种中均呈极显著负相关, 相关系数分别为  $-0.978, -0.958$  ( $p < 0.01$ ), 而且在 2 个沙田柚品种间也是显著负相关。这些结果表明, *CclSAUR49* 基因对柑橘类柠檬苦素的生物合成有抑制作用。

## 2.2 STY 与克里曼丁橘 *CclSAUR49* 的 CDS 序列比对

从 STY1 cDNA 中克隆得到 *CclSAUR49* 基因的

CDS 序列, 根据测序结果分析, 该序列编码区为 303 bp, 编码 101 个氨基酸残基的多肽, 仅有 1 个外显子, 没有内含子, 其 3' 非编码区没有影响基因稳定性的 *DST* 元件。与克里曼丁橘参考序列相比, 该序列存在 3 个同义突变, 2 个序列相似度为 99.01% (图 2)。

## 2.3 亚细胞定位分析

以注射空载体菌液的烟草细胞作为对照, 在激光共聚焦显微镜下观察, 发绿色荧光的区域即为基因表达位置, 结果表明, *CclSAUR49* 基因的表达定位在质膜和细胞核上 (图 3)。

## 2.4 启动子克隆及表达分析

从柑橘中克隆到 *CclSAUR49* 基因起始密码子 (ATG) 上游的 1600 bp 片段, 经在线软件 Plant

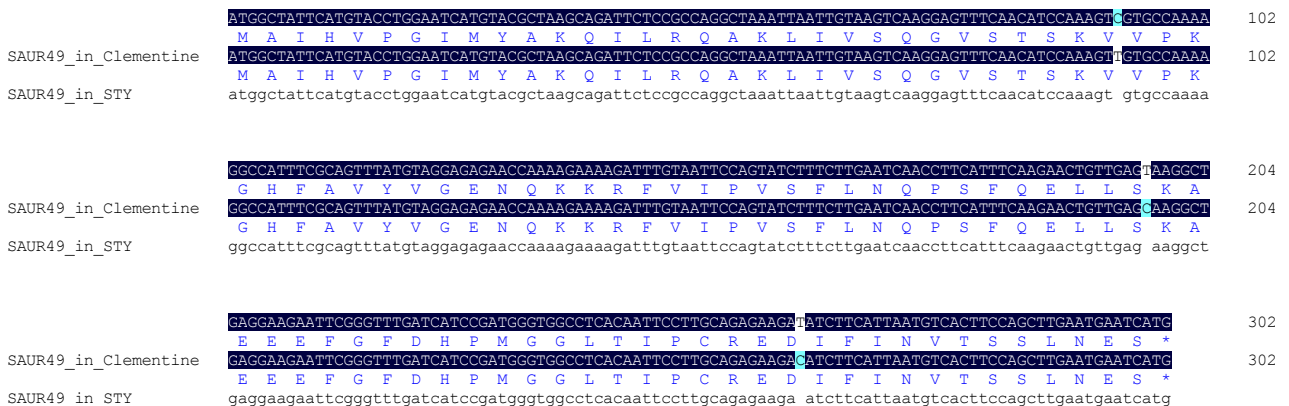


图 2 STY 与克里曼丁橘 *CclSAUR49* 的 CDS 序列比对

Fig. 2 Alignment of STY and Clementine *CclSAUR49* CDS sequence

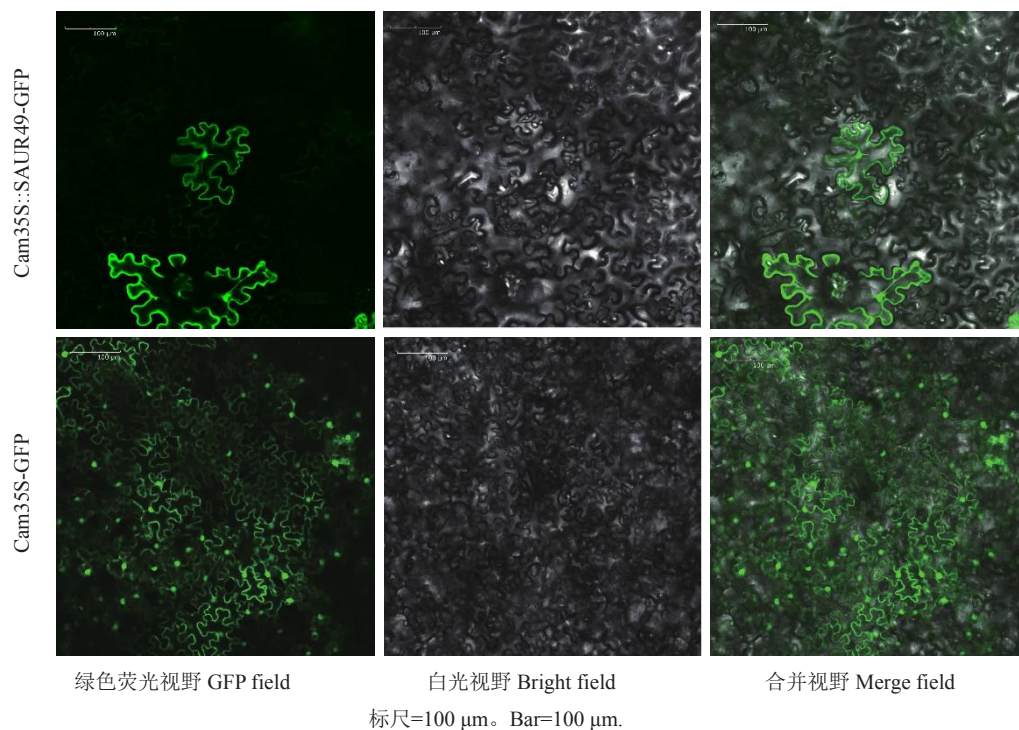


图3 Cam35S::SAUR49-GFP融合蛋白的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of Cam35S::SAUR49-GFP fusion protein

CARE 分析发现,共含有20类顺式作用元件,其中未知功能的元件有5类(图4)。已知功能的作用元件主要有组成型核心启动子顺式作用元件,如 CAAT-box 和 TATA-box; 光响应元件,如 Box 4、chs-CMA2a、GATA-motif、G-box、MRE、MYB、TCT-motif; 植物激素响应元件,如 ABRE、ERE、P-box、TCA-element; 环境胁迫响应元件,如 MBS 和 WUN-motif(表2)。

通过柑橘的遗传转化,共获得6株转 *CclSAUR49* 基因启动子的阳性植株,提取阳性植株的DNA,利用PCR均能从6个植株中扩出目的基因片段(图5-A)。用GUS染液对整个植株进行组织化学染色后,发现阳性植株的根和老叶呈明显的蓝色,茎上有较浅的蓝色,而嫩叶没有蓝色;野生型无蓝色斑点(图5-B)。结果表明,*CclSAUR49* 基因在嫩叶中没有表达,在茎中有表达,在根和老叶中大量表达。

### 2.5 *CclSAUR49* 超量表达转基因植株的鉴定及其生长表现

通过柑橘的遗传转化,共获得2株 *CclSAUR49* 基因超量表达的阳性植株,提取阳性植株的DNA,用PCR从2个植株中扩增出了目的基因片段(图6-A),确定此2个植株为阳性植株。比较种植在同样生长条件下的阳性转基因和对照植株的生长表现,阳性转基因植株的生长势明显比对照植株强(图6-

B)。对阳性植株的叶片长度、茎粗度及节间长度进行测量分析,与对照相比,阳性植株的叶片长度和节间长度均显著伸长,茎粗度增大(图6-C,表3)。

### 2.6 *CclSAUR49* 基因超量表达对类柠檬苦素含量的影响

与对照相比,转基因植株中 *CclSAUR49* 基因的表达水平显著提高,但诺米林和柠檬苦素含量均显著下降。植株1中诺米林含量下降较柠檬苦素明显,分别降低了44.81%、23.74%;植株2中则是柠檬苦素含量变化更加显著,分别降低了67.36%、22.60%(图7-A)。qRT-PCR结果显示,转基因植株中 *CclSAUR49* 基因的表达量较对照有极显著提高,在OE-1与OE-2中分别是对照的661、156倍,超量表达效果显著(图7-B)。为了明确 *CclSAUR49* 基因对类柠檬苦素生物合成的影响,对前期转录组分析筛选到的与类柠檬苦素合成相关的6个基因的表达也进行了分析。与对照相比,这6个基因在 *CclSAUR49* 基因超量表达的转基因植株中的表达量均有明显变化,其中一部分基因的表达趋势和 *CclSAUR49* 基因的表达呈现出显著相关性。这些结果表明,转基因植株中类柠檬苦素积累的降低可能与超量表达 *CclSAUR49* 基因对类柠檬苦素合成相关基因的影响有关。

```

+ ACCAGCTCTC TTTCTGCTCC AATCACTTGT AACATTCATC ATTTTCTAGC AATAACTTCA ATAATAATGG
- TGGTCGAGAG AAAGACGAGG TTAGTGAACA TTGTAAGTAG TAAAAGATCG TTATGGAAGT TATTATTACC
+ CTATTCGTTT GCCTCGAATT TTGCATGCTA AACAAGTTTT TCGCAGATCA AATTTTTTCC CCAATCAATC
- GATAAGCAAA CGGAGCTTAA AACGTACGAT TTGTTCAAAA AGCGTCTAGT TTAAAAAAGG GGTTAGTTAG
+ TACATCCATA GATGTTCCAA AAGGCTACCT AGCAGTTTTAT GTTGACAGT GTGAAAGAA AAGATTTGTA
                                P-box                                GATA-motif
- ATGTAGGTAT CTACAAAGTTTTCGATGGA TCGTCAAATA CAACCTGTCA CACTTTTCTT TTCTAAACAT
+ ATCCCAATAT CATTCTTGAA TGAACCTTTA TTTCAGGAAT TGCTATACAA GGCAGAGGAA GAATTTGGGT
- TAGGGTTATA GTAAGAACTT ACTTGGAAT AAAGTCCTTA ACGATATGTT CCGTCTCCTT CTTAAACCCA
                                TCT-motif                                W-box
+ TCAATCATCC AATGGGAGGCTCTTATTTCCTGTGCTGA AGAGATGTTTCTTGACCTCA CTTCCCGCTT
- AGTTAGTAGG TTACCCTCCA GAATGATAAG GGACACGACT TCTCTACAAA GAACTGGAGT GAAGGGCGAA
+ GAGTAATTTG TGATATGGAAATFCAGAAGAGACGATTTTAT AACTCTTTTT TTGTGGGTAG AGAGAGATTT
                                TCA-element
                                WUN-motif
- TCATTAAACACTATACCTT TAGTCTTCTC TGCTAAAATA TTGAGAAAA AACACCCATC TCTCTCTAAA
+ GAATGAAAA TGTACTCTC TTCTAAGAGA GTGACTAGTA GAAAATCTT GCAGATTTGTTCACGTTCTT
                                MYC                                G-box
- CTTACCTTTT ACATGTGAGG AAGATTCTCT CACTGATCAT CTTTTAAGAA CGTCTAAACAATGCAAGAA
                                chs-CMA2a                                ABRE
+ TTATCAGCTA ATTGAAAACA AAATCAATC AGTGTATTTCACCTGAAAC TCAAAGTGT TAGTCTCTCT
- AATAGTCGAT TAACTTTTGT TTTAAGTTAG TCACAATAAA GTGAACCTTG AGTTTTTACA ATCAAGAGAA
+ TTCCAGTAGT AGATGACAGT ATTGAATAAA AACTAATGT ACATATACTT CCAGATTAAC ATTTTATAAA
- AAGGTCATCA TCTACTGTCA TAACTTATTT TTTGATTACA TGTATATGAA GGTCTAATTG TAAAATATTT
+ AGTTCTTGCC TTCATGAAAA ATGTTTCAGGA CTCACTTATC TCGTAGACCT TCTATACAAA TACATAATCA
- TCAAGAACGG AAGTACTTTT TACAAGTCC T GAGTGAATAG AGCATCTGGA AGATATGTTT ATGTATTAGT
                                TCA-element                                ERE
+ GAAGCGGACAGCCGAGTATT ATGGTAAATTTAAATAGTAA CTATTGGTGT CACCTGACCA CAATAGCATT
- CTTCCGCTGT CGGCTCATAA TACCATTAAA ATTTATCATT GATAACCACA GTGGACTGGT GTTATCGTAA
+ TTTAAATGGA TCCGTGACAG AAAAATGTGC AGGTGCAGCA CCTTGAAGTA CTTATAACTA AAGTTATACT
- AAATTTACTCTAGGCCTGTC TTTTACACG TCCACGTCGT GGAACCTCAT GAATATTGAT TTCAATATGA
                                dOCT                                Box 4
+ GCAAAAAGATTAATGTAGC ACTTCCACG AATCTTGCAA CCCACATCTA CTGAGAATAG TTCCTAGACT
- CGTTTTTCTA ATTACCATCG TGAAAGGTGC TTAGAACGTT GGGGTAGATGACTCTTATC AAGGATCTGA
                                MYB                                F-box
+ AAGAATATAT GCTTAAGCAACCACTCTTG AGATTCAGGT CTTTATGAAA AGGTCCATT TTCAACTACG
- TTCTTATATA CGAATTCCTG TGGTGAGAAC TCTAAGTCCA GAAGTACTTT TCCAAGGTAA AAGTTGATGC
                                TCT-motif
+ ACATTTGCT AATAAGTCTTCTTCTAAT AAGAGTACAT AAATTAGCAT AATTCATTT ATCATAATTT
- TGTAACCGA TTATCAAGA ATGAAGATTA TTCTCATGTA TTTAATCGTA TTAAGTTAAA TAGTATATAA
+ GGGCTAGTTA CTGAGATTT ACTTATACA GTTGCTTGC TGCCCTGCTG TTTACAAAAC TCTCATAAC
- CCCGATCAAT GACTCTAAAG TGAATAATGTCAACGAAACG ACGGAGCACA AAATGTTTTG AGAGTATGTG
                                MYB
+ ATCAGCTGCT AATTATTCAT GATATTTAAT ATCTTTAAT CATACTTTAA AAAAATGAAA TATATCTCAG
- TAGTCGACGA TTAATAAGTA CTATAAATTA TAGAAAATTA GTATGAAAT TTTTACTTT ATATAGAGTC
+ TCAATATTT AGTCAACTCA ACGATTATTA ATATTGTAAG AGAGAATCT TATGACATTG GGCAAAAGC
                                MYB
- AGTTATAAAG TCAGTTGAGT TGCTAATATATATTCATTCCTCTTAAGA ATACTGTAAC CCGTTTTTCCG
                                Box 4                                TCT-motif                                MRE                                GATA-motif
+ CCTTTGCTCA ATGATTATAA TGGCAATCAA GTAGGGTCCA AFAACCTAACGATAAGGTAC ATACTTATCT
- GGAAACAGGT TACTAATATT ACCGTTAGTT CATCCAGGT TTTTGGATTG CTATCCATG TATGAATAGA
+ TAATGGACTT CAAATACATA ATATCTTTT CAAAAGAATA GGTACCTGT TATCATCAA AATTTATAAA
- ATTACCTGAA GTTTATGTAT TATAAGAAAA GTTTCTTAT CCAATGGACA ATAGTAGTTT TAAAATATTT
+ TCATTAATGT TTCAAGCATA CCCTTATCC CGAGGAATCA GCAATTTAGA ATCTGGGGCC CTTTATAGTT
- AGTAATTACA AAGTTCGTAT GGGAAATAGG GCTCCTTAGT CGTTAAATCT TAGACCCCGG GAATAATCCAA
                                Box 4                                MYB                                MRE
+ GTTATCCAAG AAATGGTTGG GCATAAGATG TTATACAGTC TATGTCAACT CCAAATGTT AGTGATGACT
- CAATAGGTTT TTTACCAACCGTATTCTAC AATATGTCAG ATACAGTTGA GGTTAACAA TCACTACTGA
                                MYB
+ TGCAAGACAA GCCATGTGAA ACTTTGCTGG TGTGTCTATC AAATGCTTCT ATACCCTCA CTTAAAATTT
- ACGTTCTGTT CCGTACTACTT TGAAACGACC ACACAGATAG TTTACGAAGA TATGGTGAGT GAATTTTAAA

```

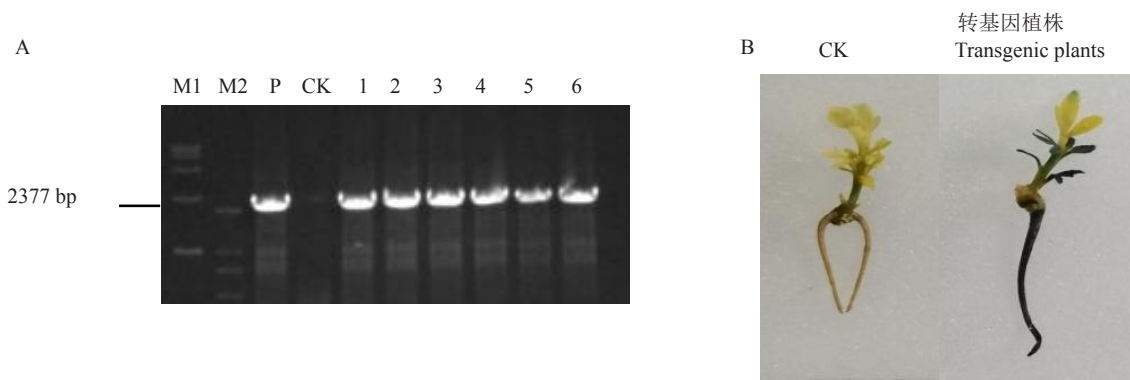
ATG. 起始密码子; 灰色阴影或方框标记. Plant CARE 预测得到的顺式作用元件.

ATG. Initiation codon; Gray shaded position or box. Predicted *cis*-acting elements by PlantCARE.

图 4 *CclSAUR49* 基因启动子序列

Fig. 4 The promoter sequence of *CclSAUR49* gene





A. PCR 扩增转基因植株的目的片段; B. 转基因植株的 GUS 组织化学染色图。M1、M2. DNA marker DL15000 和 DL2000; P. 质粒模板; 1~6. 6 株转基因植株的目的片段; CK. 对照植株。

A. PCR amplification of target fragment in transgenic plants; B. GUS histochemical staining of transgenic plants. M1. DNA marker, DL15000; M2. DNA marker, DL2000; P. Plasmid template; 1-6. Target fragment in transgenic plants; CK. Control plants.

图 5 转基因植株的鉴定  
Fig. 5 Identification of transgenic plants

表 2 *CclSAUR49* 基因启动子区域的顺式作用元件

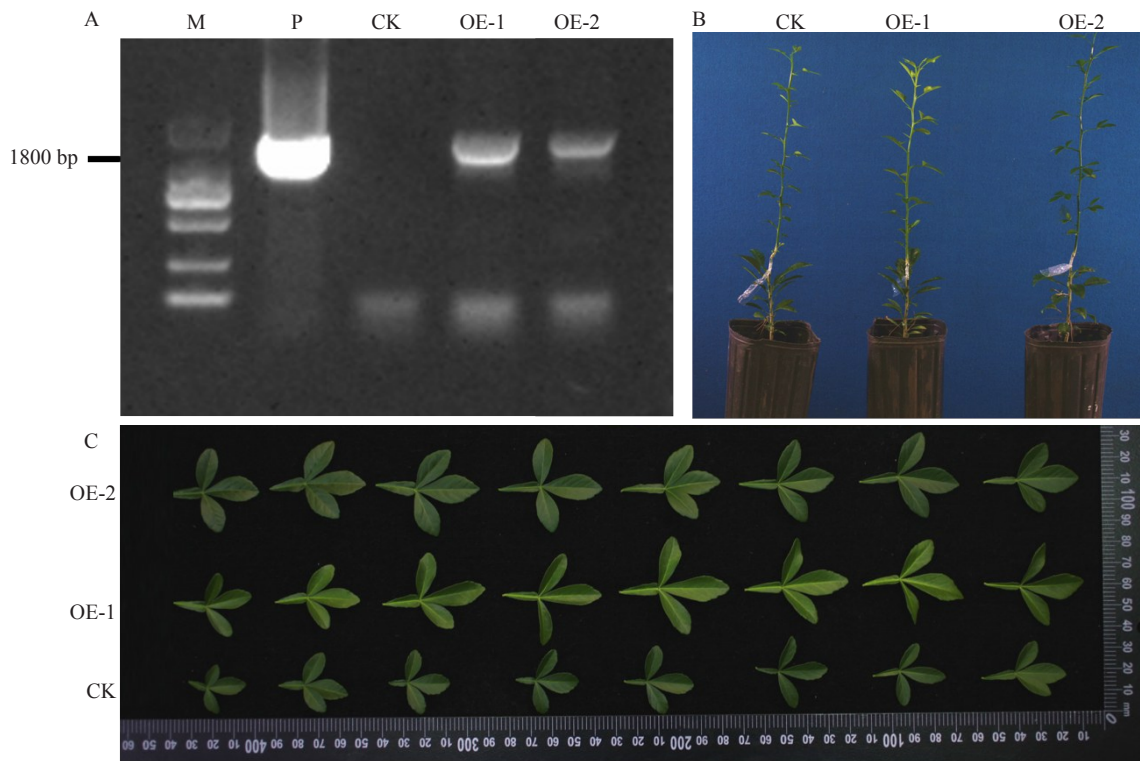
Table 2 *Cis*-acting elements in the promoter of *CclSAUR49*

基序名称 Motif name	基序序列 Motif sequence	数量 Number	生物学功能 Biological function
ABRE	ACGTG	1	参与脱落酸反应的元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
Box 4	ATTAAT	3	参与光反应的保守 DNA 模块 Conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	CAAAT	39	启动子和增强子共同作用的顺式作用元件 Cis-acting element in promoter and enhancer regions
chs-CMA2a	TCACTTGA	1	光响应元件 Light responsive element
ERE	ATTTTAAA	1	乙烯响应元件 Ethylene-responsive element
GATA-motif	AAGATAAGATT、AAGGATAAGG	2	光响应元件 Light responsive element
G-Box	CACGTT	1	参与光响应的顺式调节元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
MBS	CAACTG	1	干旱诱导响应元件 MYB binding site involved in drought-inducibility
MRE	AACCTAA	2	参与光响应的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness
MYB	CAACTG、CAACCA	3	参与光响应的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness
P-box	CCTTTTG	1	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
TATA-box	TATA	28	-30 位置附近核心启动子转录起始位点 Core promoter element around -30 of transcription start
TCA-element	TCAGAAGAGG	2	参与水杨酸响应的元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TCT-motif	TCTTAC	3	光响应元件 Light responsive element
WUN-motif	AAATTACT	1	机械伤害响应元件 Mechanical injury responsive element

### 3 讨 论

植物基因启动子中包含多种重要的顺式作用元件,在转录水平上参与调控下游基因表达,研究启动子表达模式有助于了解基因表达的特异性及其调控模式<sup>[27]</sup>。本研究中,融合 *GUS* 报告基因的 *CclSAUR49* 基因的启动子在转基因阳性植株的根和老叶中大量表达,而在嫩叶中未表达,说明 *CclSAUR49*

基因的表达具有明显的组织特异性。前期研究发现,受生长素诱导的 *SAUR* 基因主要在茎叶中大量表达,而许多受生长素抑制或是不响应生长素诱导的 *SAUR* 基因则优先在根中表达<sup>[28]</sup>。Li 等<sup>[29]</sup>认为,生长素通过启动 *SAUR* 启动子上的生长素响应元件 (AuxREs) 诱导 *SAUR* 基因表达。在 *CclSAUR49* 基因的启动子区域不含生长素响应元件 AuxREs,且该基因主要在根和老叶中表达,因此,说明该基因是属



A. PCR 扩增转基因植株的目的片段; B. 转基因植株; C. 对照与转基因植株叶片形态比较。M. DNA marker; P. 质粒模板; CK. 对照植株。  
A. PCR amplification of target fragment in transgenic plants; B. Transgenic plants. C. Comparison of leaf morphology between control and transgenic plants. M. DNA marker, DL2000; P. Plasmid template; CK. Control plants.

图6 转基因植株的鉴定及形态特征

Fig. 6 Characteristics of transgenic plants

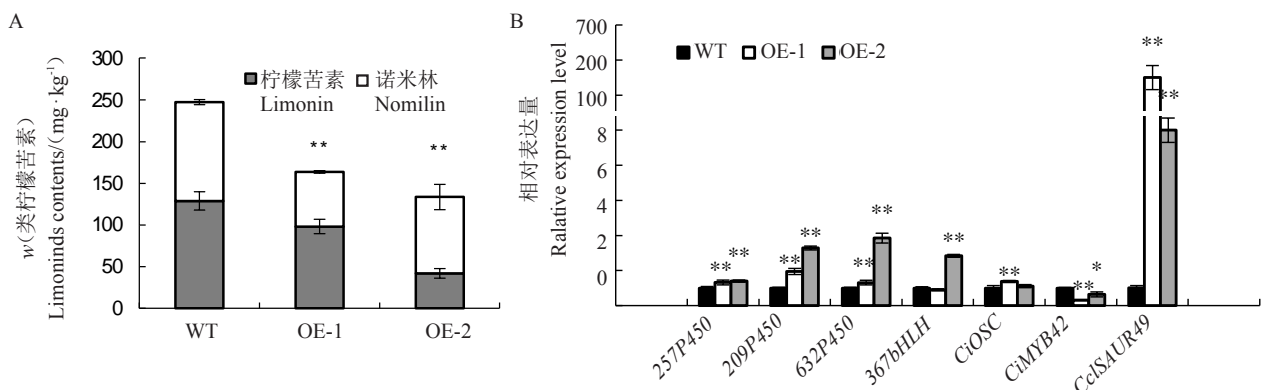
表3 阳性植株的生长表现

Table 3 Phenotype analysis of transgenic plants

植株 Plant	叶长度 Length of leaf/mm	茎粗度 Circumference of stem/mm	节间长度 Length of internode/mm
CK	32.08±3.80	2.21±0.40	14.49±1.61
OE-1	45.00±4.41**	2.71±0.42*	17.71±3.88*
OE-2	45.64±2.15**	2.58±0.53	19.83±3.65**

注: \*表示在  $p < 0.05$  差异显著; \*\*表示在  $p < 0.01$  差异极显著。下同。

Note: \* indicate significant difference at  $p < 0.05$ ; \*\* indicate extremely significant difference at  $p < 0.01$ . The same below.



A. 转基因植株叶片的类柠檬苦素含量; B. 7 个基因在转基因植株叶片中的相对表达量。

A. The limonoids contents of leaves in OE-1 and OE-2; B. Relative expression level of 7 genes of leaves in OE-1 and OE2.

图7 转基因植株中 *CclSAUR49* 基因表达水平和类柠檬苦素含量的鉴定

Fig. 7 *CclSAUR49* gene expression and limonoids contents in transgenic plants

于不响应生长素的SAUR基因。

拟南芥的SAUR19蛋白能与PP2C.D互作磷酸化PP2C并抑制磷酸酶的活性,增强H<sup>+</sup>-ATP泵的活性,引起细胞膜酸化,促进细胞扩增,从而促进叶面积的增加<sup>[17]</sup>。笔者课题组前期研究发现,CclSAUR49基因与拟南芥的AtSAUR19亚家族(AtSAUR19-24)基因聚在一组,CclSAUR49蛋白定位于质膜和细胞核上,与AtSAUR19蛋白定位结果一致。同时,超量表达CclSAUR49基因的植株也表现出叶片伸长、茎粗增大、节间伸长等现象,推测CclSAUR49基因也是通过同样的机制促进了柑橘叶片细胞的增大,从而促进植株的生长。

目前,对类柠檬苦素生物合成的遗传调控研究较少,虽然已发现一些基因和转录因子对类柠檬苦素的生物合成有明显的影响,但直接调控类柠檬苦素生物合成的关键基因目前还未见报道。在本研究中,CclSAUR49基因的表达水平在2个类柠檬苦素含量有显著差异的沙田柚品种的叶片发育过程中表现出显著的负相关,说明该基因可能影响柑橘类柠檬苦素的合成。超量表达CclSAUR49基因的植株中该基因表达量极显著上调,但类柠檬苦素含量却显著下降,进一步说明CclSAUR49基因对类柠檬苦素的生物合成有重要作用。在超量表达CclSAUR49基因的植株中对目前已知的与类柠檬苦素合成相关的6个基因的表达水平进行了检测,没有发现这些基因与CclSAUR49基因的表达水平相关,表明CclSAUR49可能与这些基因没有直接的调控关系。CclSAUR49基因对类柠檬苦素生物合成的影响可能是通过调控其他未知基因,或CclSAUR49基因并没有直接参与对类柠檬苦素生物合成的调控,而是通过调控植株的生长对类柠檬苦素的合成或积累产生影响。基于次生代谢理论和前期研究,当植物处于逆境胁迫时,生长发育会受到限制,但次生代谢产物产量增加;相反,在资源充足的条件下,植物以生长为主。在干旱和高温共同胁迫下,卡里佐枳橙(*Poncirus trifoliata* × *Citrus sinensis*)和克里奥特帕拉酸橘(*C. reshni*)叶片均会积累黄酮醇、多甲氧基黄酮和类柠檬苦素等次生代谢物质<sup>[30]</sup>。在富氮、磷、钾的条件下,积雪草苷(asiaticoside)的含量与叶片N<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>浓度呈负相关<sup>[31]</sup>。本研究中,转基因阳性株系生长势较阴性对照旺盛,作为次生代谢产物的类柠檬苦素含量显著降低,表明转基因植株处于高资源水

平,光合产物优先用于植株生长。因此,CclSAUR49基因可能是通过促进植物生长发育影响光合作用产物的分配,从而减少类柠檬苦素的积累。

## 4 结 论

CclSAUR49的表达有明显的组织特异性。CclSAUR49基因与类柠檬苦素的积累呈显著负相关,对类柠檬苦素的合成或积累有明显的抑制作用。

## 参考文献 References:

- [1] CHONG S L, HEMATPOOR A, HAZNI H, SOFIAN-AZIRUN M, LITAUDON M, SUPRATMAN U, MURATA M, AWANG K. Mosquito larvicidal limonoids from the fruits of *Chisocheton erythrocarpus* Hiern[J]. *Phytochemistry Letters*, 2019, 30: 69-73.
- [2] QIN S, LÜ C H, WANG Q S, ZHENG Z B, SUN X, TANG M Y, DENG F M. Extraction, identification, and antioxidant property evaluation of limonin from pummelo seeds[J]. *Animal Nutrition*, 2018, 4(3): 281-287.
- [3] HU J, SONG Y, MAO X, WANG Z J, ZHAO Q J. Limonoids isolated from *Toona sinensis* and their radical scavenging, anti-inflammatory and cytotoxic activities[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 20: 1-9.
- [4] MANEERAT W, LAPHOOKHIEO S, KOYSOMBOON S, CHANTRAPROMMA K. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*[J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(12): 1130-1134.
- [5] GE Y H, LIU K X, ZHANG J X, MU S Z, HAO X J. The limonoids and their antitobacco mosaic virus (TMV) activities from *Munronia unifoliolata* Oliv[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(17): 4289-4295.
- [6] EL-READI M Z, HAMDAN D, FARRAG N, EL-SHAZLY A, WINK M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from *Citrus species* in human colon and leukaemia cell lines[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 626(2/3): 139-145.
- [7] HAGEN G, GUILFOYLE T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49(3/4): 373-385.
- [8] STAMM P, KUMAR P P. Auxin and gibberellin responsive *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA36 regulates hypocotyl elongation in the light[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(6): 759-769.
- [9] HOU K, WU W, GAN S S. SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(2): 1002-1009.
- [10] VANNESTE S, FRIML J. Calcium: the missing link in auxin action[J]. *Plants*, 2013, 2(4): 650-675.
- [11] QIU T, CHEN Y, LI M M, KONG Y Y, HAN N, BIAN H W, ZHU M Y, WANG J H. The tissue-specific and developmentally

- regulated expression patterns of the *SAUR41* subfamily of *SMALL AUXIN UP RNA* genes[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(8):e25283.
- [12] MARKAKIS M N, BORON A K, LOOCK B V, SAINI K, CIRERA S, VERBELEN J P, VISSENBERG K. Characterization of a *small auxin-up RNA* (SAUR)-like gene involved in *Arabidopsis thaliana* development[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e82596.
- [13] PARK J E, KIM Y S, YOON H K, PARK C M. Functional characterization of a *small auxin-up RNA* gene in apical hook development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Science*, 2006, 172(1): 150-157.
- [14] GUO Y, XU C B, SUN X J, ZHENG H, FAN S J, JIANG Q Y, ZHANG H. *TaSAUR78* enhances multiple abiotic stress tolerance by regulating the interacting gene *TaVDAC1*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(12):2682-2690.
- [15] KODAIRA K S, QIN F, TRAN L S P, MARUYAMA K, KIDOKORO S, FUJITA Y, SHINOZAKI K, SHINOZAKI Y K. *Arabidopsis*Gys2/Hise zinc-finger proteins AZF1 and AZF2 negatively regulate aba-repressive and auxin-inducible genes under abiotic stress conditions[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(2):742-56.
- [16] CHAE K, ISAACS C G, REEVES P H, MALONEY G S, MURPHY G K, NAGPAL P, REED J W. *Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63* promotes hypocotyl and stamen filament elongation [J]. *Plant Journal*, 2012, 71(4): 684-697.
- [17] SPARTZ A K, LEE S H, WENGER J P, GONZALEZ N, ITOH H, INZÉ D, PEER W A, MURPHY A S, OVERVOORDE A J, GRAY W M. The *SAUR19* subfamily of *SMALL AUXIN UP RNA* genes promote cell expansion[J]. *Plant Journal*, 2012, 70(6):978-990.
- [18] KONG Y Y, ZHU Y B, GAO C, SHE W J, LIN W Q, CHEN Y, HAN N, BIAN H W, ZHU M Y, WANG J H. Tissue-specific expression of *SMALL AUXIN UP RNA41* differentially regulates cell expansion and root meristem patterning in *Arabidopsis*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54(4):609-621.
- [19] KANT S, BI Y M, ZHU T, ROTHSTEIN S J. *SAUR39*, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 151(2):691-701.
- [20] XU Y X, XIAO M Z, LIU Y, FU J L, HE Y, JIANG D A. The small auxin-up RNA *OsSAUR45* affects auxin synthesis and transport in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 94(1/2): 97-107.
- [21] BAI F, LI S Q, YANG C X, ZHAO T F, LAN X Z, CHEN M, LIAO Z H. Overexpression of the *AbSAUR1* gene enhanced biomass production and alkaloid yield in *Atropa belladonna*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 140: 111705.
- [22] HASEGAWA S, HERMAN Z, ORME E, OU P. Biosynthesis of limonoids in citrus: sites and translocation[J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(12):2783-2785.
- [23] 王福生, 余洪, 胡洲, 管德龙, 张盼, 朱世平, 赵晓春. 柑橘属 SAUR 基因家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. *园艺学报*, 2020, 47(1):23-40.
- WANG Fusheng, YU Hong, HU Zhou, GUAN Delong, ZHANG Pan, ZHU Shiping, ZHAO Xiaochun. Genome-wide analysis of SAUR gene family in *Citrus*[J]. *Acta Horticulture*, 2020, 47(1): 23-40.
- [24] WANG F S, WANG M, LIU X F, XU Y Y, ZHU S P, SHEN W X, ZHAO X C. Identification of putative genes involved in limonoids biosynthesis in citrus by comparative transcriptomic analysis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 782.
- [25] PENG A H, XU L Z, HE Y R, LEI T G, YAO L X, CHEN S C, ZOU X P. Efficient production of marker-free transgenic 'Tarocco' blood orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with enhanced resistance to citrus canker using a *Cre/loxP* site-recombination system[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2015, 123(1): 1-13.
- [26] 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]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [27] 聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 高东尧, 李琳, 于卓, 陈明, 李连城, 马有志. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(3):385-391.
- NIE Lina, XIA Lanqin, XU Zhaoshi, GAO Dongyao, LI Lin, YU Zhuo, CHEN Ming, LI Liancheng, MA Youzhi. Progress on cloning and functional study of plant gene promoters[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2008, 9(3):385-391.
- [28] PAPONOV I A, PAPONOV M, TEALE W, MENGES M, CHAKRABORTEE S, MURRAY J A H, PALME K. Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2008, 1(2):321-337.
- [29] LI Y, LIU Z B, SHI X Y, HAGEN G, GUILFOYLE T J. An auxin-inducible element in soybean *SAUR* promoters[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(1):37-43.
- [30] ZANDALINAS S I, CARLOS S, BELTRÁN J, GÓMEZ-CADENAS A, ARBONA V. Activation of secondary metabolism in citrus plants is associated to sensitivity to combined drought and high temperatures[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1954.
- [31] MÜLLER V, LANKES C, ZIMMERMANN B F, NOGA G, HUNSCHE M. Centelloside accumulation in leaves of *Centella asiatica* is determined by resource partitioning between primary and secondary metabolism while influenced by supply levels of either nitrogen, phosphorus or potassium[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170: 1165-1175.