

ZmCBL1 和 ZmCBL9 启动子在转基因拟南芥中的活性分析

张 丛 来佳佳 王婷婷 郇付菊

河南省粮食作物协同创新中心/小麦玉米作物学科国家重点实验室/
河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

摘要 为探明 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 在玉米中的表达调控及功能的差异, 克隆了 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 的启动子区域。PlantCARE 分析显示, 2 个启动子中含有多个响应干旱、光照、ABA 等的顺式调控元件; GUS 活性分析显示 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 不受低温胁迫的诱导, 而受甘露醇、黑暗和 ABA 处理的诱导, 但其表达强弱稍有不同; *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 对 GA3 和损伤处理的响应也存在差异, 这与它们序列中存在着不同的调控元件有关。除了在某些胁迫诱导下的表达存在差异外, 这 2 个启动子在器官(组织)和发育阶段中的表达也具有差异, 仅 *ZmCBL1* 的启动子在花丝和柱头中表达。本研究结果暗示在不同逆境胁迫及发育阶段, *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 的功能可能存在一定的冗余, 但也存在明显的差异。

关键词 玉米; 钙调磷酸酶 B 类蛋白; 启动子; 转基因拟南芥; 逆境胁迫

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0036-09

近年来, 干旱、盐、极端温度等非生物胁迫严重影响了作物的生长和产量。如何适应多种非生物胁迫是植物生长周期中面临的最重要的问题之一。研究非生物胁迫相关基因的上游调控机制对于明确其调控机制及功能, 从而通过分子育种手段提高作物的抗逆性提供了非常重要的手段。

在植物中, 钙信号介导植物应对外界信号刺激的反应并参与调节多种生理过程^[1-3]。钙调磷酸酶 B 类蛋白(CBL)和 CBL 相互作用蛋白激酶(CIPK)形成的 CBL-CIPK 信号网络是植物中独特的钙依赖信号转导系统^[4-7]。CBL 和 CIPK 都是由多基因家族编码。拟南芥和水稻(*Oryza sativa*)基因组中分别含有 10 个 CBL、26 个 CIPK 和 10 个 CBL、30 个 CIPK^[5,8-9]。越来越多的研究发现 *AtCBL9* 和 *AtCBL1* 之间有着密切的关系, 并且在不同的信号传递过程中起着独特的作用, 包括对 ABA 和渗透压的响应^[10]。*AtCBL1/9* 对于干旱、低温、高盐 and 低钾等各种胁迫具有最为丰富的功能^[11-16]。*CBL1/9* 在调控拟南芥花粉萌发和花粉管生长中也发挥重要作用^[17]。Chen 等^[18]发现 *BnCBL1/CIPK6* 基因参

与 ABA 诱导的反应。*OsCBL1/CIPK23* 复合物可以增强 *OsAKT1* 介导的 K^+ 的摄取^[19]。虽然 *CBL1/9* 在模式植物中的功能研究已经取得了显著的进展, 但关于其调控机制的报道却甚少, *Am-CBL1* 的启动子是一种韧皮部特异性和多胁迫诱导型的启动子^[20]。

前期研究报道 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 的表达受低钾胁迫的影响并具有组织特异性^[21-22]。*ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 基因组序列的同源性为 56.40%, cDNA 为 95.60%, 氨基酸序列同源性高达 96.71%, 然而其在不同胁迫下的表达模式存在一定的差异^[21]。此外, *ZmCBL1/9* 基因的过量表达可提高玉米对于干旱和盐胁迫的耐受性(数据未提供)。本研究从玉米基因组中分离 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 的启动子并对其功能进行分析, 旨在为明确 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 的功能及其调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 启动子的克隆

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 和

收稿日期: 2017-12-26

基金项目: 河南省科技攻关项目(172102110043)

张 丛, 硕士研究生, 研究方向: 植物抗逆分子生物学, E-mail: 763341734@qq.com

通信作者: 郇付菊, 博士, 副教授, 研究方向: 植物逆境生理及分子生物学, E-mail: taifj2008@163.com

PlantGDB 数据库 (<http://www.plantgdb.org>) 搜索 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 启动子序列。使用引物 5.0 软件设计引物 (表 1)。玉米 (郑单 958) 总 DNA 的提取利用 CTAB 法进行。利用设计的引物, 以 gDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 20 μL : 1 μL 模板, 2 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液, 1 μL EX-*Taq* 酶, 各 1 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.5 μL dNTP 混合物和 12.5 μL ddH₂O。PCR 反应: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 共 30 个循环。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带并进行割胶回收。

表 1 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 启动子引物序列

Table 1 The primers sequence of *ZmCBL1* and *ZmCBL9* promoter

名称 Name	序列 Sequence
<i>pro-CBL1</i> -F	<u>CGAATTC</u> GCAGCGACAAAGCAGACC
<i>pro-CBL1</i> -R	CAAGCTT <u>G</u> GACCCAACCACTCAAACC
<i>pro-CBL9</i> -F	<u>GGAATTC</u> CAACCGTGTCCAGCAGTC
<i>pro-CBL9</i> -R	AAGCTT <u>G</u> GCCCCAACCACTCAAAC

注: 下划线部分为酶切位点。Note: Underlined sequences is cleavage sites.

1.2 载体构建、拟南芥转化和转基因植株的获得

将目的片段 *pro-CBL1/9* 与线性 pMD19-T 载体连接成环状 *pro-CBL1/9* + pMD19-T 重组质粒, 选择阳性克隆进行测序, 然后插入到 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性位点之间的 pCambia1391 载体中。随后, 将获得的重组融合质粒导入农杆菌菌株 LBA4404 中。制备得到含有目的基因的 pCambia1391-*proZmCBL1-GUS* 及 pCambia1391-*proZmCBL9-GUS* 农杆菌菌株, 然后进行植物转化。

将野生型拟南芥种子平铺在 MS 培养基上。生长 1 周后, 将幼苗盆栽并置于温室中生长。在盛花期时, 利用花序侵染法将分别含有重组载体的根癌农杆菌菌株 LBA4404 (pCambia1391-*proZmCBL1-GUS* 和 pCambia1391-*proZmCBL9-GUS*) 转化拟南芥^[23]。

在含有 50 mg/L 潮霉素的 MS 培养基上筛选上述转化的种子。T₃代的纯合系种子用于 GUS 分析。将 *pro-CBL1/9* 转基因 T₃纯合种子表面灭菌并在 MS 培养基上铺板 7 d, 然后转移到土壤中。1 个月后, 对花、茎、嫩豆荚、莲座叶和茎生叶进行采

样, GUS 染色。其他植物正常栽培, 当豆荚的颜色变黄时, 取老荚用于 GUS 染色。

1.3 激素和非生物逆境胁迫处理

将获得的 *pro-CBL1/9* 转基因 T₃纯合种子用体积分数 70% 乙醇表面灭菌 1 min, NaClO 处理 6 min, 用无菌水洗涤 6 次, 并涂布在用 0.8% 琼脂固化的 MS 培养基上, 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 的组织培养室中以 16 h/8 h 的昼/夜周期进行培养。待幼苗在 MS 培养基上生长至 4 叶期后, 转移到含 375 mmol/L 甘露醇的 MS 培养基处理 24 h; 在含 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 的 MS 培养基和含有 10 mmol/L GA3 的 MS 培养基上分别处理 12 h 和 16 h; 同时, 对未处理 MS 培养基上生长的幼苗进行黑暗处理 10 h 或 24 h; 用解剖剪将生长至 4 叶期的拟南芥幼苗子叶剪两下, 进行损伤处理 10 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温下处理 2 h。

1.4 GUS 染色

GUS 组织化学染色方法主要参考 Jefferson^[24]方法。取上述采样的植物组织包括小苗、花、果荚等置于 GUS 染色液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜, 室温下 70% 乙醇脱色, 期间更换乙醇数次, 显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 *ZmCBL1/9* 启动子的克隆和序列分析

PCR 扩增分别获得了 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 的 ATG 上游 (假定的启动子片段和 5'非翻译区) 的 1 592 bp 和 1 486 bp 片段, 连接至 T 载体, 测序, 获得了 *ZmCBL9* 启动子序列 (图 1A) 和 *ZmCBL1* 启动子序列 (图 1B)。通过 PlantCARE 分析发现, *ZmCBL1/9* 启动子序列中存在多个环境应激反应和植物激素应答顺式作用元件。其包括 2 个 MYB 结合位点 (MBS; 位置 -739~-745 和 -905~-914), 响应干旱胁迫; 4 个 ABA 响应元件 (ABRE; 位置 -93~-103、-448~-458、-517~-527 和 -296~-306); 2 个响应低温的顺式作用元件 (LTR; 位置 -224~-230 和 -216~-222); 在 2 个启动子中存在许多光响应顺式作用元件, 其中包括 3 个 G-box (-575~-581 bp、-759~-765 bp 和 -1 267~-1 273 bp); 3 个 SP1 (-606~-612 bp、-67~-73 bp 和 -462~-468 bp); 1 个 TCT-motif (-1 296~-1 302 bp); 1 个 AE-box (-953 bp); 2 个 GAG-motif (-1 004~-1 011 bp、-1 276~-1 283 bp); 1 个

MNF1(−1 114~−1 120 bp),除了上述元件外,*ZmCBL9* 启动子还包含另一个 GA3 响应元件 GAREAT (TATC -box;位置 −1 355~−1 362 bp),发现可能的 TATA -box(TTTTAA\TTTTA)分别位于 −285 和 −84 bp 位置,CAAT-box 位于 −318 和 −50 bp 位置(图 1 和表 2)。

2.2 *pro-ZmCBL 1/9* 在拟南芥幼苗中的 GUS 活性

将 T_3 代种子种植在正常 MS 培养基上,4 ℃ 春

化 3 d 后置于 22 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗、80%湿度的环境中正常生长。在 2、4、6、8、10、11 d 时分别取样进行 GUS 染色。结果表明,在种子萌发的前 4 d, *pro-ZmCBL1/9* GUS 染色均无活性。直到第 6 天子叶变绿以后才显现蓝色,第 8 天和第 10 天染色变深,而到第 11 天 GUS 染色明显变浅(图 2)。结果表明,*ZmCBL1/9* 启动子在萌发期不表达,但在幼苗生长初期表达开始增加,在第 8 天表达量上升到



A: *ZmCBL9* 启动子分析结果; B: *ZmCBL1* 启动子分析结果。A: *ZmCBL9* promoter; B: *ZmCBL1* promoter. 浅灰色区域为 TATA-box, 下划线区域为 CAAT-box, 下划曲线区域为 ABRE, 深灰色区域为 G-box, 下划点区域为 MBS, 字体加黑加粗区域为 LTR, 字体加黑加粗斜体区域为 HSE, 双下划线区域为 TATC-box. 箭头表示碱基翻译的方向, ATG 起始密码子以粗体显示。The light gray area is TATA-box. The underlined area is CAAT-box. The next curve area is ABRE. The dark gray is G-box. The lower point area is MBS. The font plus the black thickening area is LTR. The font plus the black and rough italic area is HSE. Double underlined area is TATC-box. Arrows indicate the direction of base translation. The ATG start codon is in bold.

图 1 *ZmCBL9* 和 *ZmCBL1* 的启动子在线预测分析

Fig.1 *ZmCBL9* and *ZmCBL1* promoter online predicting analysis

表 2 *ZmCBL1/9* 启动子中存在的顺式作用元件

Table 2 Putative *cis*-regulatory elements involved in the promoter of *ZmCBL1/9*

顺式作用元件 <i>Cis</i> -regulatory element	模式 Motif	<i>ZmCBL1</i>	<i>ZmCBL9</i>	说明 Description
TATA-box	TATA\TTTA	11	9	RNA 聚合酶的相互作用 Interaction of RNA polymerase
CAAT-box	CAAT\CAAAT	6	6	转录效率 Transcription efficiency
MBS	CAACTG	1	0	响应干旱信号 Response to drought signals
MBS	GGATAAGAT	0	1	响应干旱信号 Response to drought signals
ABRE	AGCGGGGCGG	1	0	响应 ABA 信号 Response to ABA signals
ABRE	CCCGCGTGGC	1	0	响应 ABA 信号 Response to ABA signals
ABRE	GCCGCGTCGC	1	1	响应 ABA 信号 Response to ABA signals
LTR	CCGAAA	1	1	响应低温信号 Response to low temperature signals
G-box	CACGTC\CACGTT	2	1	响应光信号 Response to light signal
SP1	GGGCGG\CCGCC	1	2	响应光信号 Response to light signal
GAG-motif	GGAGATG	0	2	响应光信号 Response to light signal
TCT-motif	TCTTAC	1	0	响应光信号 Response to light signal
AE-box	AGAAACAA	1	0	响应光信号 Response to light signal
MNF1	GTGCCC	0	1	响应光信号 Response to light signal
TATC-box	TGGGATA	0	1	响应 GA 信号 Response to GA signal

最高峰,随后逐渐下降。比较两者在组织中的表达发现无明显差异,都主要在子叶的叶脉部位及真叶的叶尖部位表达,但在相同的发育阶段及组织中,*pro-ZmCBL9* 的表达水平稍高于 *pro-ZmCBL1*。

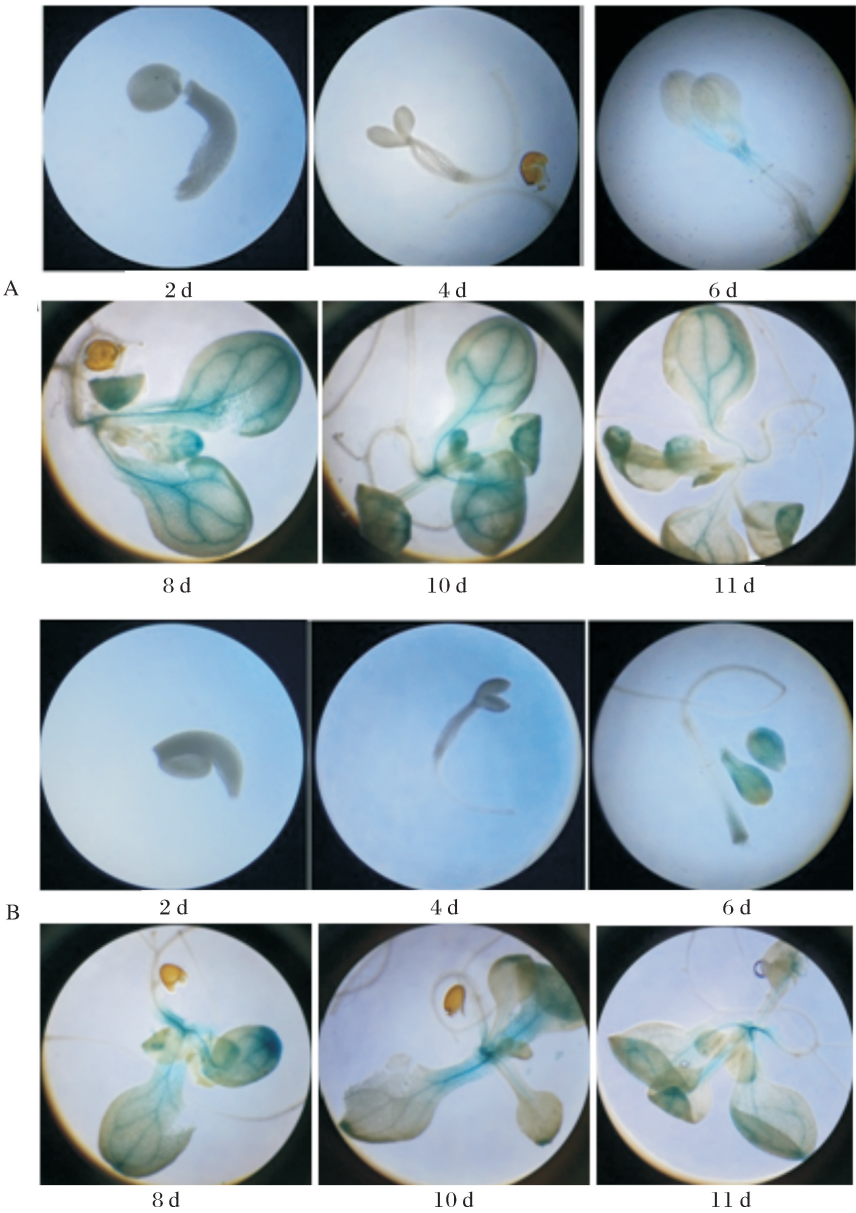
2.3 *pro-ZmCBL1/9* 在拟南芥成熟组织中的 GUS 活性

对盆栽培养植株的成熟组织进行 GUS 活性分析,结果显示:在转基因 *pro-ZmCBL1* 拟南芥植株的莲座叶、茎、幼荚果、花萼和花托、柱头和花丝中观察到 GUS 活性(图 3)。在转基因 *pro-ZmCBL9* 拟南芥植株中,仅在嫩叶、幼荚果、花萼和花托中具有 GUS 活性(图 4)。此外,无论是 *ZmCBL1* 还是

ZmCBL9 的启动子,在老叶和老豆荚中都没有发现任何 GUS 信号(图 3 和图 4)。结果表明:两者在植物成熟期的表达存在一定的差异,特别是在柱头和花丝中,仅 *ZmCBL1* 启动子具有活性。

2.4 逆境胁迫和激素对转基因拟南芥幼苗 *ZmCBL1/9* 启动子活性的影响

前期的研究表明,*ZmCBL1/9* 基因的过表达可提高玉米对干旱和盐胁迫的耐受性(数据未提供)。为研究非生物胁迫对拟南芥中 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9*启动子活性的影响,对转 *pro-ZmCBL1/9* 基因的拟南芥幼苗进行连续黑暗、低温、ABA、GA3、损伤和甘露醇处理。GUS染色分析表明2个



A: *ZmCBL9* 启动子 *pro-ZmCBL9*; B: *ZmCBL1* 启动子 *pro-ZmCBL1*.

图 2 萌发期发育阶段 GUS 染色

Fig.2 GUS staining with development process at germination stage

启动子的活性在一定程度上存在相似的表达模式。比如:在正常条件下,*ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 在叶子和子叶的叶脉中表达(图 5 和图 6)。经黑暗、ABA 和甘露醇处理后,2 个启动子的活性都有一定程度的提高。而黑暗处理 10 h 后 GUS 染色都稍有增强,黑暗处理 24 h 后 GUS 染色明显增强(图 5 和图 6)。低温

胁迫处理后,2 个启动子的活性没有明显的变化。此外,2 个启动子对胁迫处理的响应也存在差异。*ZmCBL9* 启动子经过 GA3 处理后的活性显著增强(图 6),而 *ZmCBL1* 启动子的活性没有变化(图 5)。反之,在损伤处理下,*ZmCBL9* 启动子活性无明显变化(图 6)。而 *ZmCBL1* 启动子的活性被诱导(图 5)。

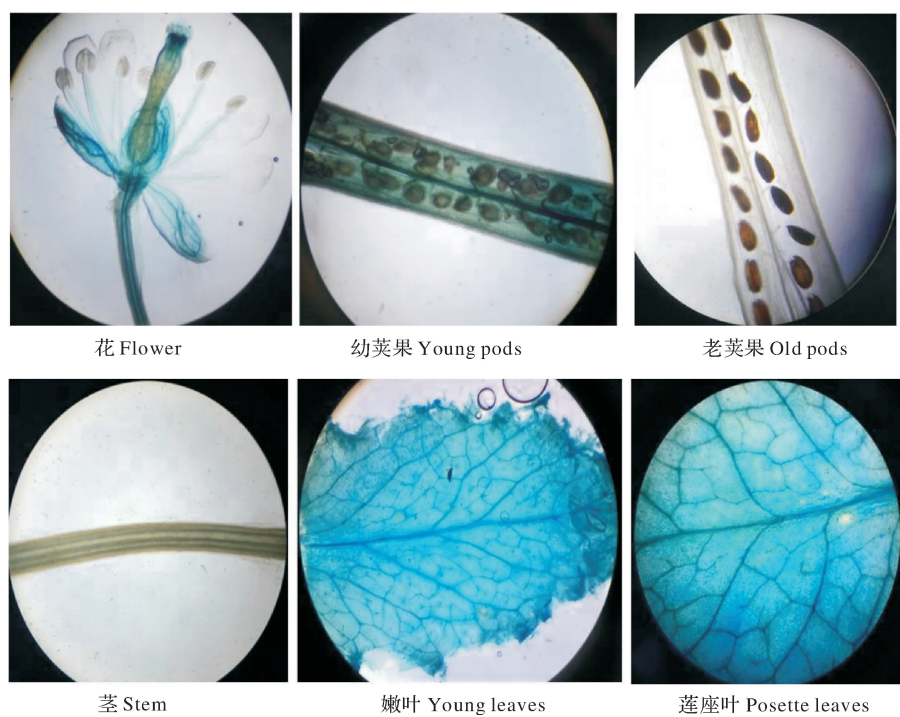


图 3 *pro-ZmCBL1* 在部分成熟组织中的活性

Fig.3 The activity of *pro-ZmCBL1* in different parts mature plant

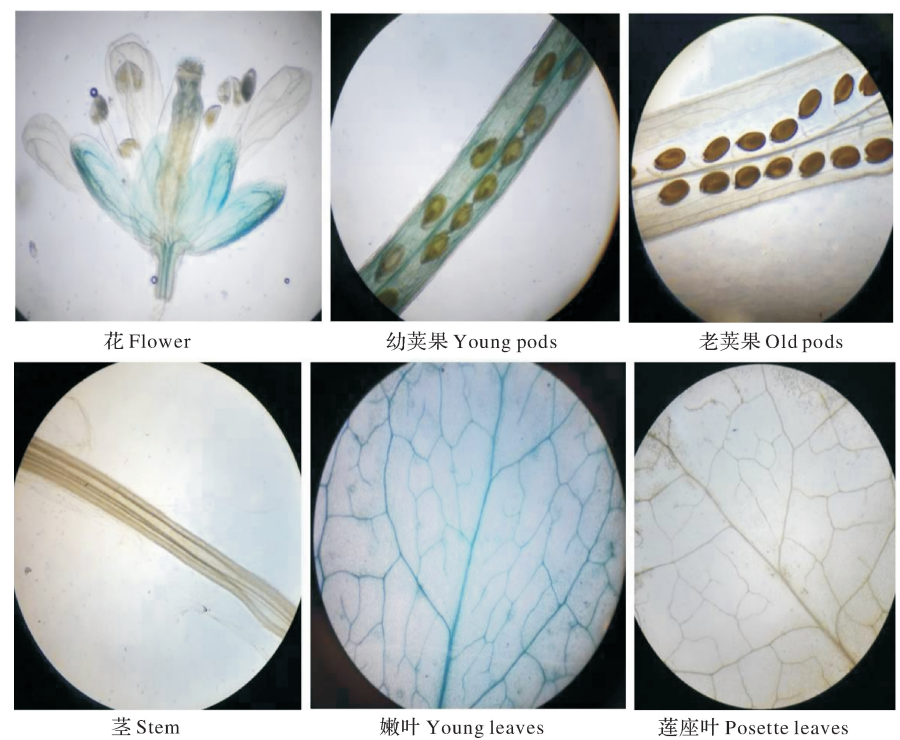


图 4 *pro-ZmCBL9* 在部分成熟组织中的活性分析

Fig.4 The activity of *pro-ZmCBL9* in different parts mature plant

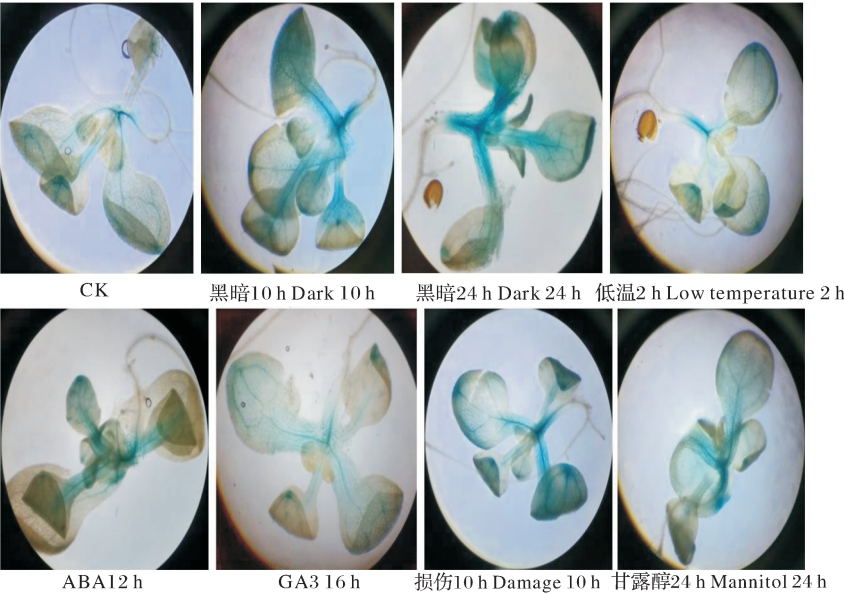


图 5 多种胁迫处理下 *ZmCBL1* 启动子的 GUS 活性分析

Fig.5 The activity of the promoter of *ZmCBL1* under various stresses

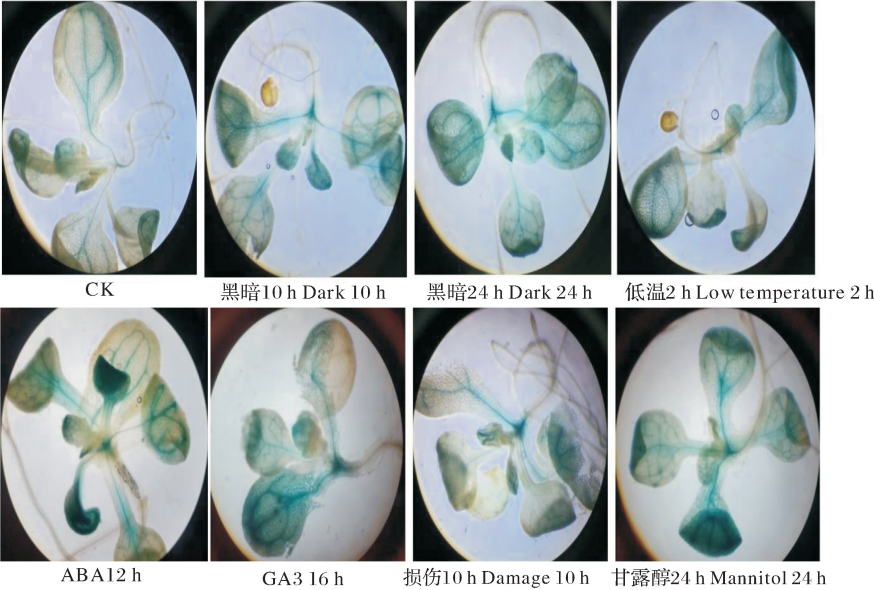


图 6 多种胁迫处理下 *ZmCBL9* 启动子的 GUS 活性分析

Fig.6 The activity of the promoter of *ZmCBL9* under various stresses

3 讨 论

在植物中,CBL-CIPK 能够响应不同的逆境和激素胁迫,如盐、低温、干旱胁迫和 ABA 响应^[9,25-26]。越来越多的研究表明,CIPK 也可以与一个或多个 CBL 相互作用^[12,27-28]。

本研究根据基因组序列确定了 *ZmCBL1/9* 启动子序列并进行分析,发现它们均含有 ABA 响应元件 ABRE,低温响应元件 LTR、光响应元件

G-box、干旱响应元件 MBS 及 GA3 响应元件 TATCG-box。在对启动子活性进行分析中发现,甘露醇胁迫处理后 GUS 染色明显增强,表明 MBS 干旱响应元件对 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 表达具有正调控作用。之前的研究表明 MYB2 是一个与 MYB 相关的转录因子,它可以在水分胁迫下调控相关基因的表达^[29]。表明 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 可能涉及水分胁迫响应。其次,经过低温处理后,*ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 启动子的表达水平没有改变,表明此序

列包含的 CTR 低温反应元件不能调控 *ZmCBL1/9* 的表达,或许这种调控更为复杂。转基因拟南芥幼苗经过黑暗处理后, *pro-ZmCBL1/9* 的表达均显著增加,表明光胁迫能够促进 *ZmCBL1/9* 启动子在拟南芥中的表达。但是, G-box、GAG motif 和 SP1 等多种光信号元件中哪种发挥更为关键的作用还需要进一步的研究。

ZmCBL9 启动子序列中含有与响应 GA3 有关的 2 个顺式作用元件 TATC-box,但在 *ZmCBL1* 启动子中没有。GUS 染色分析也表明,GA3 能增加 *ZmCBL9* 的启动子活性,而 *ZmCBL1* 启动子的 GUS 染色没有变化。这些结果表明 TATC-box 在调节 *ZmCBL9* 启动子响应 GA3 的表达中起着关键的作用。另外, *ZmCBL1/9* 启动子序列中存在较多的 ABRE 顺式作用元件,ABA 可诱导 *ZmCBL1/9* 基因表达,且对 *ZmCBL9* 有明显的促进作用。然而, *ZmCBL1* 启动子有 3 个 ABRE 元件,但 *ZmCBL9* 只有 1 个。这些结果表明,ABA 响应元件 ABRE 对 *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 启动子的调控作用比较复杂。

上述结果表明,与 *PbCBL10*^[30], *Nsyt-CBL10*^[31] 和 *AtCBL10*^[32] 基因一样, *ZmCBL1* 和 *ZmCBL9* 的启动子表现出一定的组织特异性和发育阶段性。此外,这 2 个启动子的表达还受到激素和环境胁迫的影响,且存在一定的表达差异。这些结果表明 *ZmCBL1/9* 启动子中的这些顺式作用元件可能在玉米响应 ABA、低温胁迫、光照、干旱、GA3 和其他环境刺激中起重要调控作用。

参 考 文 献

- [1] EVANS N H, MCAINSH M R, HETHERINGTON A M. Calcium oscillations in higher plants[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 415-420.
- [2] SANDERS D, PELLOUX J, BROWNLEE C, et al. Calcium at the crossroads of signaling[J]. *Plant cell*, 2002, 14 (Sup): 401-417.
- [3] STEINHORST L, KUDLA J. Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling[J]. *Plant physiology*, 2013, 163: 471-485.
- [4] BATISTIC O, KUDLA J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network[J]. *Planta*, 2004, 219: 915-924.
- [5] KOLUKISA OGLU U, WEINL S, BLAZEVIĆ D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks[J]. *Plant physiology*, 2004, 134: 43-58.
- [6] LUAN S, LAN W, LEE S C. Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL-CIPK network[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 339-346.
- [7] 李玉, 李小方. 植物中解密 Ca^{2+} 信号转导特异性的机制[J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(4): 414-416.
- [8] ALBRECHT V, RITZ O, LINDER S, et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca^{2+} -regulated kinases[J]. *EMBO J*, 2001, 20: 1051-1063.
- [9] BATISTIC O, KUDLA J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793: 985-992.
- [10] PANDEY G K, CHEONG Y H, KIM K N, et al. The calcium sensor calcineurin B-like9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant cell*, 2004, 16: 1912-1924.
- [11] ALBRECHT V, WEINL S, BLAZEVIĆ D D, et al. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses[J]. *Plant J*, 2003, 36: 457-470.
- [12] CHEONG Y H, PANDEY G K, GRANT J J, et al. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2007, 52: 223-239.
- [13] XU J, LI H D, CHEN L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^{+} transporter AKT1 in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2006, 125: 1347-1360.
- [14] HUANG C, DING S, ZHANG H, et al. CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Sci*, 2011, 181: 57-64.
- [15] DRERUP M M, SCHLUCKING K, HASHIMOTO K, et al. The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF[J]. *Mol Plant*, 2013, 6: 559-569.
- [16] RAGEL P, RÓDENAS R, GARCÍA-MARTÍN E. The CBL-Interacting protein kinase CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K^{+} uptake in *Arabidopsis* roots[J]. *Plant physiology*, 2015, 169(4): 2863-2873.
- [17] MÄHS A, STEINHORST L, HAN J P, et al. The calcineurin B-like Ca^{2+} sensors CBL1 and CBL9 function in pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2013, 6: 1149-1162.
- [18] CHEN L, REN F, ZHOU L, et al. The *Brassica napus* calcineurin B-like 1/CBL-interacting protein kinase 6 (CBL1/CIPK6) component is involved in the plant response to abiotic stress and ABA signaling[J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 6211-6222.
- [19] LI J, LONG Y, QI G N, et al. The Os-AKT1 channel is critical for K^{+} uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex[J]. *The plant cell*, 2014, 26: 3387-3402.
- [20] GUO L, YU Y, XIN X, et al. Identification and functional characterisation of the promoter of the calcium sensor gene CBL1

from the xerophyte *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. BMC plant biology, 2010, 10: 18.

[21] WANG C, YUAN Z, LI S, et al. Characterization of eight CBL genes expressions in maize early seeding development[J]. Acta physiology plant, 2014, 36: 3307-3314.

[22] 张凡. 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmSnRK2.11*、*ZmCBL9* 及 *ZmCBL10* 的功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.

[23] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16: 735-743.

[24] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. Plant molecular biology reporter, 1987, 5(1): 387-405.

[25] WEINL S, KUDLA J. The CBL-CIPK Ca^{2+} -decoding signaling network function and perspectives[J]. New Phytol, 2009, 184: 517-528.

[26] HASHIMOTO K, KUDLA J. Calcium decoding mechanisms in plants[J]. Biochimie, 2011, 93: 2054-2059.

[27] LIJAN S, KUDLA J, RODRIGUE Z, et al. Calmodulins and calcineurin-B-like pmteins: calcium sensors for specific signal-re-ponse couplig in plants[J]. The Plant Ceu, 2002, 14(1): 389-400.

[28] KIM K N, CHEONG Y H, GUPTA R, et al. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases[J]. Plant physiology, 2000, 124 (4): 1844-1853.

[29] URAO T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO S, et al. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence[J]. The plant cell, 1993, 5(11): 1529-1539.

[30] 许园园, 蔺经, 李晓刚, 等. *PbCBL10* 基因表达与启动子功能分析[J]. 果树学报, 2014, 31(6): 1024-1031.

[31] DONG L, WANG Q, MANIK S M, et al. Nicotiana sylvestris calcineurin B-like protein NsYL10 enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant cell report, 2015, 34(12): 2053-2063.

[32] MONIHAN S M, MAGNESS C A, YADEGARI R, et al. *Arabidopsis* calcineurin B-like 10 functions independently of the SOS pathway during reproductive development in saline conditions[J]. Plant physiology, 2016, 171(1): 369-379.

Analyzing activity of *ZmCBL1* and *ZmCBL9* promoters in transgenic *Arabidopsis thaliana*

ZHANG Cong LAI Jiajia WANG Tingting TAI Fujun

Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops, State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract The promoter regions of *ZmCBL1* and *ZmCBL9* were cloned to study the differences in expression, regulation, and function of *ZmCBL1* and *ZmCBL9* in maize. Results of PlantCARE analyses showed that the two promoters contained multiple *cis*-regulatory elements in response to drought, light, and ABA. Results of GUS activity analyses showed that *ZmCBL1* and *ZmCBL9* were not induced by cold stress but induced by mannitol, darkness and ABA, but their expression levels were slightly different. Due to the different regulatory elements in their sequences, there is a difference in their response to GA3 and wound stress. In addition to differences in expression under stress-induced conditions, the expression of these two promoters differed in organs (tissue) and developmental stages. Only the *ZmCBL1* promoter was expressed in filaments and stigmas. It is indicated that there may be some redundancy in the functions of *ZmCBL1* and *ZmCBL9* at different stages of stress and development, but there are significant differences as well.

Keywords maize; calcineurin B-like proteins; promoter; transgenic *Arabidopsis thaliana*; stress

(责任编辑: 张志钰)