

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00073

Pib 启动子中茉莉酸和乙烯响应元件的转基因分析

余丽, 杨世湖, 晋玉宽, 万建民, 赵宝泉

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

摘要: 水稻 *Pib* 基因的表达受茉莉酸、乙烯等激素诱导, 为了确定该基因启动子响应茉莉酸和乙烯诱导的必需区域, 进一步阐明茉莉酸和乙烯响应分子元件, 文章用 PCR 制备了 *Pib* 全长启动子-3 572~2 bp 及 3 个 5'端有不同长度缺失的 *Pib* 启动子片段-2 692~2 bp、-1 335~2 bp、-761~2 bp。4 个不同长度 *Pib* 启动子分别置换掉双元质粒中 *gus* 基因上游的 35S 构建为重组质粒, 经农杆菌介导转入水稻获得转基因植株。转基因水稻中 *gus* 活性的蛋白质水平和 mRNA 水平的定性和定量分析结果表明, 全长 *Pib* 启动子(-3 572~2 bp, pNAR901)启动活性最强, 茉莉酸或乙烯诱导 6 h 后, 其驱动 *gus* 基因在转基因植株各部组织中的表达量明显上升。而-3 572~-2 692 bp 区段序列缺失后不但 *Pib* 启动子启动活性显著降低而且也丧失了对茉莉酸和乙烯的诱导活性。pNAR902(-2 692~2 bp), pNAR903(-1 335~2 bp)和 pNAR904(-761~2 bp)中的 *Pib* 启动子序列的缺失长度相差达 2 倍和 3 倍以上, 但其对茉莉酸和乙烯的诱导响应没有区别。这些结果显示 3 个 *Pib* 启动子缺失体构建中, 其共同缺失序列即-3 572~-2 692 bp 区域是 *Pib* 启动子茉莉酸和乙烯诱导响应的必需区域。软件检索证实, *Pib* 启动子序列中只在上述共同缺失区段之内的-2 722 bp 处有一个 GCCGCC 基序。文章报道的转基因实验表明 GCCGCC 基序可能是 *Pib* 基因中有关茉莉酸和乙烯诱导响应的顺式分子元件。

关键词: 水稻; *Pib* 启动子; *Gus*; 茉莉酸; 乙烯

Analysis of the molecular motif for inducing response to jasmonic acid and ethylene in *Pib* promoter via rice transformation

YU Li, YANG Shi-Hu, JIN Yu-Kuan, WAN Jian-Min, ZHAO Bao-Quan

National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural university, Nanjing 210095

Abstract: The expression of *Pib* gene in rice was induced by hormone, such as jasmonic acid and ethylene. In order to determine the necessary regions of sequence or motifs for response to jasmonic acid and ethylene in *Pib* promoter, the full length promoter of *Pib* (-3 572~2 bp) and three different 5' deletion fragments of *Pib* promoter (-2 692~2 bp, -1 335~2 bp, -761~2 bp) were synthesized by PCR and then were substituted for 35S upstream *gus* in a binary plasmid to construct recombined plasmids of *Pib* promoter-*gus* fusions. Transgenic rice plants of the four recombined plasmids were produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. Quality and quantum analysis of *gus* activities in transgenic plants at both protein and mRNA levels were conducted. The promotion activity of the full length promoter of *Pib* (-3 572~2 bp, pNAR901) was the highest in the four recombinants and the *gus* activities in its transgenic plant organs were enhanced obviously at 6 h after

收稿日期: 2009-05-14; 修回日期: 2009-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30571044), 江苏省高科技项目(编号: BG2001305)和长江学者和创新团队发展计划资助

作者简介: 余丽(1984-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 植物基因工程。E-mail: yuli514605@163.com

通讯作者: 杨世湖(1945-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物基因工程。Tel: 025-84396516; E-mail: shyang@njau.edu.cn

致谢: 日本国立农业生物资源研究所 Masahiro Yano 教授惠赠含 *Pib* 基因的 10.3 kb 克隆和 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101。江苏太湖地区农科所惠赠苏香梗 R109 种子。本室仪器中心贺平清老师指导荧光定量分析。一并致谢!

treatment with jasmonic acid or ethylene. The promotion activity of the deleted *Pib* promoters was significantly decreased and the response to jasmonic acid or ethylene treatment was not present when the -3 572~-2 692 bp sequence was knocked out from the *Pib* promoter. Although the disparity in the lengths of the deleted *Pib* promoter of pNAR902 (-2 692~2 bp), pNAR903 (-1 335~2 bp), and pNAR904 (-761~2 bp) was more than 2 or 3 times, the response to jasmonic acid or ethylene treatment was not different among their transgenic plants. All these results indicated that the common deleted sequences (-3 572~-2 692 bp) in the three deleted *Pib* promoter constructs were the essential region to the response to jasmonic acid and ethylene treatment. The result of *pib* promoter sequence searching indicated that there was only one GCCGCC motif at -2 722 bp of this common deleted segment in the *Pib* promoter sequence. Our rice transgenic results showed that the GCCGCC may be a cis-motif for *Pib* gene conferring response to jasmonic acid and ethylene for *Pib* gene.

Keywords: rice; *Pib* promoter; *Gus*; jasmonic acid; ethylene.

启动子是转录调控的中心,作为一种重要的顺式调控因子,一直是转录水平调控研究的热点。通过制备启动子部分序列缺失并将得到的缺失片段与报告基因连接,构建植物表达载体,转化后比较转基因植株中报告基因表达模式来研究启动子一些分子元件的功能,是启动子结构和功能研究的重要方法^[1]。现今已克隆鉴定了许多与植物激素诱导表达相关的启动子,这些启动子存在一些重要的顺式作用元件,它们通过与特定的转录因子特异的结合来调控基因表达,使植物能够对某些化学信号产生响应,以抵御不良的环境影响。

茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 和乙烯(Ethylene, ET)是植物防御反应的信号分子,在涉及植物对生物性和非生物性因素的抗性以及植物生长发育过程中的基因调控上发挥着重要的作用。而且,茉莉酸和乙烯可以协同诱导许多防御相关基因的表达和调节植物的抗性^[2-4]。

*Pib*基因属于NBS-LRR抗病基因家族,是目前为数不多已克隆的抗稻瘟病主效基因之一^[5]。前人报道指出,*Pib*基因供体品种植株的抗稻瘟性表达受到乙烯、茉莉酸、水杨酸、氯化钠和黑暗等因素的诱导而不受病原菌接种的诱导^[5,6]。有关水杨酸、氯化钠和黑暗等诱导因素与*Pib*启动子中分子元件的关系已有了转基因分析报道^[7,8]。但是*Pib*基因启动区茉莉酸和乙烯诱导响应的作用机制还未涉及研究,本研究通过 5'端系列缺失法构建了含不同长度的*Pib*启动子区段的缺失载体,并转入水稻R109中。经茉莉酸和乙烯诱导,对转基因水稻中*gus*报告基因的表达量进行分析,旨在鉴定*Pib*启动子响应茉莉酸和

乙烯诱导的必需序列区域,初步明确该必需区域内存在的茉莉酸和乙烯响应元件。这对于探讨不同的因素诱导下*Pib*抗性基因表达的分子调控机制有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

含 *Pib* 基因的 10.3 kb 克隆片段(GenBank AccessionAB013448)、*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 由日本国立农业生物资源研究所 Masahiro Yano 教授惠赠。水稻苏香粳 R109 由太湖地区农科所惠赠。大肠杆菌 DH5 α , 双元质粒 pCAMBIA1301 为本室保存。DNA Marker、内切酶, pMD18-T(T 载体), dNTPs, Taq DNA 聚合酶, RNA 酶抑制剂 RNase inhibitor, RNase-free DNase I 购自大连 TaKaRa 公司。X-gluc 和 MUG 购自上海生工公司。4-MU 购自 Sigma 公司。SYBR Green I 荧光染料, DEPC 购于生兴公司。RNA Trigol 提取试剂购自北京鼎国昌盛生物技术公司。反转录酶 AMV Reverse Transcriptase 购自博飞生物公司。常规试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *Pib* 启动子及其 5'端缺失体片段的合成

根据 GenBank 中 *Pib* 基因序列设计了 PCR 引物, 见表 1。

PCR 反应程序为: 95 5 min; 94 30 s, 56 1 min, 72 3 min, 35 个循环; 最后 72 10 min。PCR 反应体积 20 μ L, 含 *Pib* 克隆质粒 DNA 1 μ g,

表 1 实验所应用的 CR 引物名称和序列

引物名称	引物序列(5' - 3')	作用	产物长度(bp)
p-F3575 p-R1	ATCGAGCTCCGCGCCGATAATACGACTCA CGAGGATCCCATTTGCTCTGTTCTATTTTGA	扩增 <i>Pib</i> 全长启动子 901	3 575
p-F2695 p-R1	CGCGAGCTCCATAGTTGTCTTTCTCGA CGAGGATCCCATTTGCTCTGTTCTATTTTGA	扩增 <i>Pib</i> 启动子片段 902	2 695
p-F1338 p-R2	ATCGGATCCTTACCACATGGGCTATGT CTACCATGGCATTGCTCTGTTCTATTTTGA	扩增 <i>Pib</i> 启动子片段 903	1 338
p-F764 p-R2	CGCGGATCCCAAGATTTTATATTTATGG CTACCATGGCATTGCTCTGTTCTATTTTGA	扩增 <i>Pib</i> 启动子片段 904	764
<i>hpt</i> F <i>hpt</i> R	GAAGAAGATGTTGGCGACCTC AAGATCGTTATGTTTATCGGCACT	扩增转基因水稻 <i>hpt</i> 基因	527
<i>gus</i> 1F <i>gus</i> 1R	CTGCGACGCTCACACCGATACC TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG	扩增转基因水稻 <i>gus</i> 基因	441
<i>gus</i> 2F <i>gus</i> 2R	CACAGCCAAAAGCCAGACAG ATGACGACCAAAGCCAGTAAAGTAG	目的基因 <i>gus</i> 的定量 PCR 引物	127
18S rRNAF 18S rRNAR	ATGGTGGTGACGGGTGAC CAGACACTAAAGCGCCCGGTA	内参基因 18SrRNA 的定量 PCR 引物	138

10×buffer 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 1.6 μL, 5 U/μL *Taq*酶 0.2 μL, 上下游引物 (10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 11.2 μL。

1.2.2 水稻的转基因

R109 干种子去壳后用“84 消毒液”表面灭菌^[9], 在含 2, 4-D 2 mg/L 的 N6 培养基上诱导愈伤组织。农杆菌介导转化、培养和植株再生方法等见文献^[10]。

1.2.3 转基因水稻的 PCR 检测

SDS微量法^[11]从植株叶片提取DNA进行*hpt*和*gus*基因PCR检测, 引物见表 1。扩增*hpt*和*gus*基因预期产物长度分别为 527 bp和 441 bp。反应程序: 95 5 min; 94 30 s, 56 (*hpt*)或 61 (*gus*) 30 s, 72 1 min, 35 个循环; 最后 72 10 min。

1.2.4 转基因植株的 Southern blotting 检测

CTAB法^[12]提取PCR鉴定为阳性的T₀代转基因植株叶片总DNA, 每株 20 μg用*Hind* 酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳分离后转移至正电荷尼龙膜^[13], 烘膜后用地高辛标记的*hpt*探针杂交。标记、杂交及显色按 Roche公司试剂盒说明书进行。

1.2.5 茉莉酸和乙烯诱导处理

各个构建的转基因抗性愈伤和转基因植株, 在 27 ℃, 16 h 光照/8 h 黑暗条件下分别进行茉莉酸和乙烯诱导处理, 茉莉酸诱导喷施 0.1 mmol/L 的茉莉酸溶液 (pH=7.0, 0.1% Tween20), 乙烯诱导喷施 0.1 mmol/L 的乙烯利溶液 (pH=5.5, 0.1% Tween20), 对照用蒸馏水 (含有 0.1% Tween20) 喷雾, 非转基因

愈伤和植株进行相同的诱导处理。诱导处理 6 h 后取愈伤及植株根、茎、叶检测 GUS 活性变化, 重复 3 次。

1.2.6 GUS 组织化学分析

各个构建的转基因抗性愈伤、根、叶片、叶鞘、茎秆、颖壳、花药、种子, 和非转基因对照, 分别经 0.1 mmol/L 的茉莉酸或乙烯利溶液或蒸馏水处理 6 h 后, 浸入适量的GUS显色液(50 mmol/L磷酸缓冲液, pH=7.0; 10 mmol/L Na₂EDTA; 0.1% TritonX-100; 0.85 mg/mL 亚铁氰化钾; 0.65 mg/mL 铁氰化钾; 1 mg/mL X-gluc)中, 37 ℃ 过夜。随后用 75%酒精脱色, 观察, 照相^[12]。

1.2.7 GUS 荧光定量分析

根、叶鞘 (茎) 和叶片样品在液氮中研磨成粉, 每样品取 0.1 g, 加入 400 μL 酶提缓冲液在冰浴中混匀, 4 ℃, 13 400 g 离心 15 min 后取上清液即GUS粗酶液。加入 5 mmol/L 的GUS反应底物 4-MUG, 37 ℃ 保温 1 h 后用 0.2 mol/L Na₂CO₃ 终止反应^[14,15]。日立 850 型荧光仪, 激发光 365 nm, 发射光 455 nm。按Bradford方法测定蛋白含量, 以 1 min 水解 4-MUG 生成 1 nmol/L 4-MU 的酶量为一个酶活力单位。以每毫克蛋白的酶活力表示GUS活性^[16]。各实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.8 Real-time PCR 检测 *gus* 基因的 mRNA 水平

经 0.1 mmol/L 茉莉酸或乙烯利溶液处理 6 h 后, 剪取转基因植株和对照植株叶片, 用 Trizol 试剂提取植物叶片的总 RNA。随后用 RNase-free DNase I

处理, 消除可能的基因组 DNA 污染, 反应体积为 20 μL , 含 1 μg 总 RNA, 2 μL 的 10 \times DNAase I buffer 缓冲液, 1 μL RNase-free DNase I (5 U)。37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min 后, 75 $^{\circ}\text{C}$ 5min 使酶失活。

每样品取纯化后的 RNA 2 μL , 加入 DEPC 处理的水补足 10 μL , 75 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后冰浴急冷, 然后加入预混液 10 μL [10 \times RT buffer 2 μL , 10 mmol/L dNTPs 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ Random Primer 2 μL , 40 U/ μL Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL , 10 U/ μL AMV Reverse Transcriptase 0.6 μL , H₂O 2.9 μL], 42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 1 h, 反转录产物-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

将反转录的 cDNA 稀释 10 倍, 每一 Real-time PCR 反应加此稀释液 1 μL , 25 μL 反应体系。含 10 \times buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL , 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL , 5 U/ μL Taq 酶 0.2 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , SYBR Green I 染料 1 μL , ddH₂O 16.3 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 复性 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 40 个循环。同一样品的内参和目的基因在同一个 96 孔板中分两管同时扩增, 并分别设置 3 个重复。其中检测目的基因 *gus* 和内参基因 18S rRNA 的定量 PCR 引物见表 1, 扩增产物长度分别为 127 bp 和 138 bp。

以不同诱导处理的转基因材料为样品, 非转基因材料和未经诱导的转基因材料为对照, 不同样品的内参基因 18S rRNA 和目的基因 *gus* 分别进行实时荧光 PCR 检测, 测定 Ct 值。采用相对定量解析的比较 Ct 法处理实验结果。每个样品的目的基因 Ct 值与内参基因 Ct 值之差即为 ΔCt , 用公式 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ [17] 计算出各个样品相对于内参基因的目的基因相对表达量, 然后再进行样品间相对表达量的比较。

2 结果与分析

2.1 *Pib* 启动子 5'端缺失体载体的构建和鉴定

为了分析 *Pib* 启动子中应答茉莉酸和乙烯的分子机制, 确定茉莉酸和乙烯诱导的必需序列区域。用 PCR 方法获得了 *Pib* 全长启动子 901 (3575 bp) 和不同长度的 5'端缺失体 *Pib* 启动子 902 (2695 bp)、903 (1338 bp)、904 (764 bp), 这些缺失体片段均将软件检索中显示的乙烯和茉莉酸响应基序敲除。目标产物回收后, 先克隆到 pMD18-T 载体上送商业公司测序, 经确证该 PCR 产物序列与预期一致后再与切除了

35S 启动子的双元质粒 pCambia1301 连接。重组质粒与上述插入片段序号对应分别命名为 pNAR901、pNAR902、pNAR903、pNAR904 (图 1)。

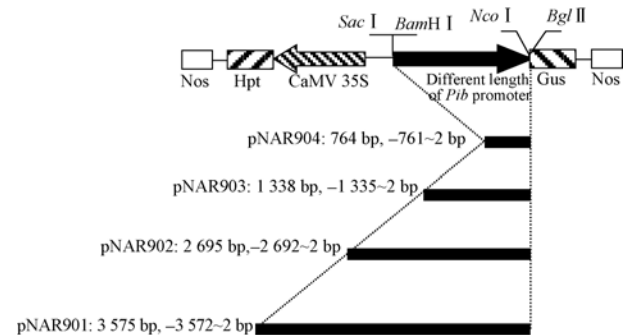


图 1 *Pib* 启动子 5'端缺失体示意图

2.2 转基因植株的分子生物学鉴定

用农杆菌介导法转化 R109 成熟胚愈伤组织, 分别获得了 pNAR901、pNAR902、pNAR903、pNAR904 的 T₀ 代抗性再生植株 36、32、29、35 株。

用 PCR 检测上述 132 株再生植株, 有 99 株能扩增出 *hpt* 基因 (527 bp) 和 *gus* 基因 (441 bp) 两条带, 总的转基因阳性率为 75%。其中, 有 22 株 pNAR901, 27 株 pNAR902, 20 株 pNAR903, 30 株 pNAR904。非转基因对照植株和空白对照没有 PCR 产物。

对上述 PCR 检测为阳性的转基因植株用 *hpt* 为探针进行 Southern 杂交, 所有参检的转基因植株均有杂交条带, 且绝大部分为单拷贝, 而对照非转基因植株没有杂交信号, 说明转基因构建均整合进水稻基因组 (图 2)。

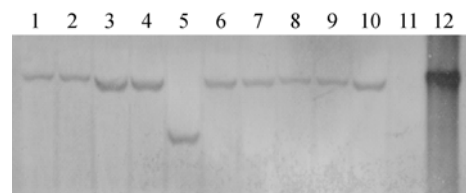


图 2 转基因植株的 Southern blotting 检测

1~10: 不同的转基因植株; 11: 对照 R109; 12: 质粒对照 pNAR904。

2.3 *Pib* 全长启动子-*gus* 构建转基因愈伤的组织化学检测

全长 *Pib* 启动子 pNAR901 的转基因抗性愈伤, 经茉莉酸或乙烯诱导处理 6 h 后均显现大量的深蓝色 GUS 斑点 (区), 水处理后的转基因愈伤也有零星

可辨的蓝点。对照非转基因愈伤虽经茉莉酸或乙烯诱导处理 6 h, 没有出现 GUS 蓝点(图 3)。

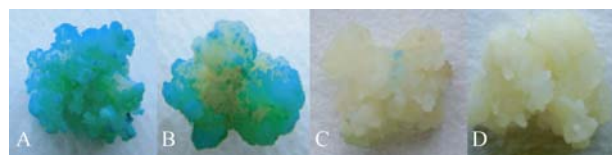


图 3 全长 *Pib* 启动子与 *gus* 融合体的转基因愈伤在茉莉酸或乙烯诱导 6 h 后的 GUS 表达

A: 茉莉酸诱导 6 h; B: 乙烯诱导 6 h; C: 对照 1, 水处理转基因愈伤; D: 对照 2, 茉莉酸/乙烯诱导非转基因愈伤。

pNAR901 转基因植株在抽穗结实期, 经茉莉酸或乙烯诱导 6 h 后, 取根、叶片、叶鞘、茎秆、颖壳、花药、种子进行 GUS 组织化学染色, 结果各个组织中均显示出不同程度的 GUS 蓝, 蒸馏水处理的转基因对照植株也出现很浅的蓝色。对照非转基因植株经茉莉酸或乙烯诱导 6 h 后各个组织均不显色(图 4)。说明全长 *Pib* 启动子在植株水平也表现出与细胞水平相同的、很强的茉莉酸和乙烯诱导响应。

2.4 *Pib* 基因启动子中茉莉酸和乙烯响应区域

2.4.1 未经诱导的 *Pib* 基因启动子 5'端缺失体 GUS 荧光定量检测

为了探索 5'端序列对 *Pib* 基因启动子活性的影响, 本研究将全长 *Pib* 启动子和各缺失体构建的转基因植株及非转基因对照植株的根、叶鞘(茎)、叶片各个组织进行了 GUS 活性荧光定量分析比较。结果表明, 虽然 *Pib* 启动子的启动活性随着 5'端序列缺失的加长而降低, 但一直保持着很强的组织特异性, 即根>叶鞘(茎)>叶。非转基因植株对照只有痕量 GUS 活性。

2.4.2 *Pib* 启动子序列中茉莉酸和乙烯响应区域定位的 GUS 蛋白质活性分析

各个构建的转基因潮霉素抗性愈伤, 经茉莉酸或乙烯诱导 6 h 后进行了 GUS 组织化学定性分析。结果显示经过诱导处理的缺失体 pNAR902、pNAR903、pNAR904 均只有零星的 GUS 蓝点, 其 GUS 水平与

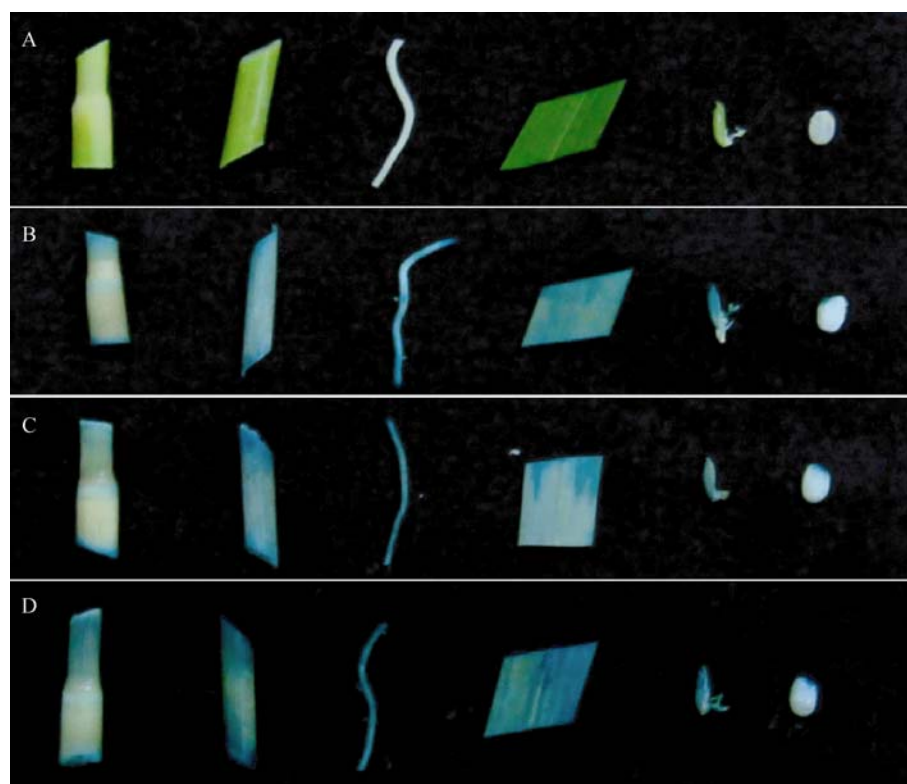


图 4 全长 *Pib* 启动子-*gus* 转基因植株的茉莉酸、乙烯诱导表达

A: 对照 1, 茉莉酸/乙烯诱导后的非转基因植株; B: 对照 2, 水处理后的转基因植株; C: 乙烯诱导后的转基因植株; D: 茉莉酸诱导后的转基因植株。

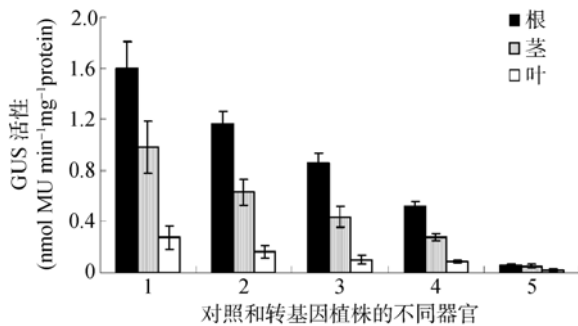


图 5 不同长度 5'端缺失的 *Pib* 启动子在转基因植株中各器官的 GUS 活性定量

1: pNAR901 转基因植株; 2: pNAR902 转基因植株; 3: pNAR903 转基因植株; 4: pNAR904 转基因植株; 5: 非转基因对照植株。

水处理的转基因愈伤对照相似而完全不同于全长 *Pib* 启动子的转基因对照。非转基因对照愈伤经茉莉酸或乙烯诱导后不显色(图 6)。

用上述各构建的转基因植株进行的 GUS 活性荧光定量检测表明, 经茉莉酸或乙烯诱导处理 6 h 后, 全长启动子(-3 572~2 bp, pNAR901)驱动 *gus* 基因表达的 GUS 蛋白活性与喷水对照相比有了很明显的增加, 其中以叶片中 GUS 活性增加幅度最大, 可达喷水对照的 4.64 倍(茉莉酸)和 3.85 倍(乙烯)。而缺失了-3 572~-2 692 bp 序列区域的缺失体启动子(-2 692~2 bp, pNAR902), (-1 335~2 bp, pNAR903), (-761~2 bp, pNAR904)的转基因植株, 在经茉莉酸或乙烯诱导后, 根、茎、叶片的 GUS 活性与喷水对照相比都没有明显的增加, 并且其启动活性与全长

启动子相比有很明显的下降, 又以叶片的降低幅度最大(图 7)。

以上结果可以看出, -3 572~-2 692 bp 区段敲除后, *Pib* 启动子就失去了对茉莉酸或乙烯诱导的响应, 其 3'下游端更长序列的缺失没能改变这一响应而只是使整体的启动活性进一步降低。由此可以推断, *Pib* 启动子序列的-3 572~-2 692 bp 区段是应答茉莉酸和乙烯信号所必需的区域。而 PLACE 软件检索该启动子只在-2 722 bp 至-2 717 bp 有一个定义为茉莉酸、乙烯响应的顺式作用元件 GCCGCC。本文的实验结果证实该分子元件在 *Pib* 启动子中也有同样功能。

2.4.3 *Pib* 启动子序列中茉莉酸和乙烯响应区域定位的 mRNA 定量分析(Real-time PCR)

为了进一步证实上述结果, 采用 Real-time PCR 方法对诱导后转基因植株叶片中 *gus* mRNA 进行了定量分析。结果, 全长 *Pib* 启动子构建(pNAR901)的转基因植株在茉莉酸或乙烯诱导 6 h 后, 叶片中 *gus* mRNA 量可达喷水处理的转基因对照的 4~6 倍左右, 而 3 个缺失体启动子构建(pNAR902、pNAR903、pNAR904)的转基因植株在茉莉酸或乙烯诱导 6 h 后, 叶片中 *gus* mRNA 量与水处理的转基因对照相比没有明显的变化。在 mRNA 水平上也再一次证实了 *Pib* 基因启动子中-3 572~-2 692 bp 区段是响应茉莉酸和乙烯诱导的重要区域, 即 GCCGCC 核心元件(-2 722 bp

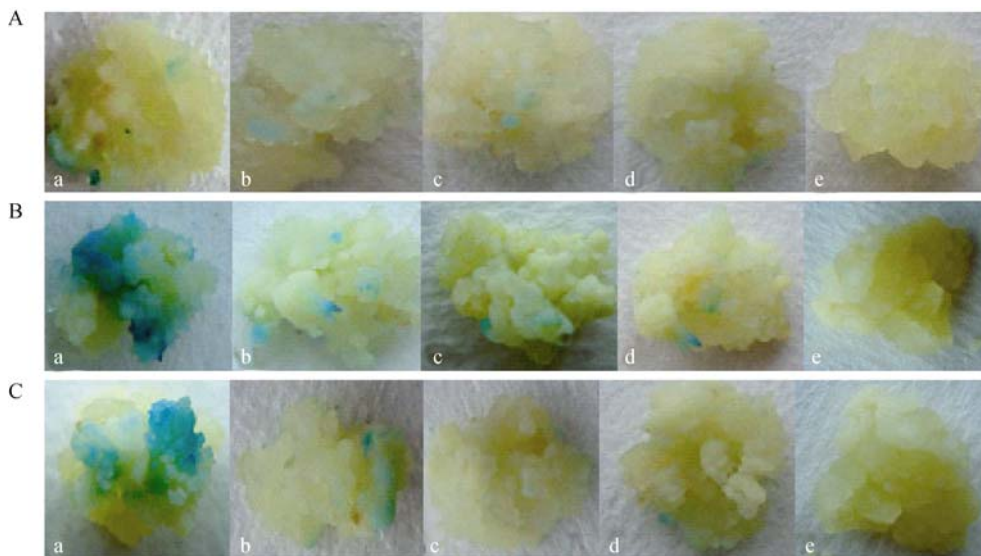


图 6 不同长度 *Pib* 启动子在转基因愈伤中的茉莉酸、乙烯诱导活性

A: 水处理后; B: 茉莉酸诱导处理后; C: 乙烯诱导处理后。a: pNAR901; b: pNAR902; c: pNAR903; d: pNAR904; e: 非转基因愈伤。

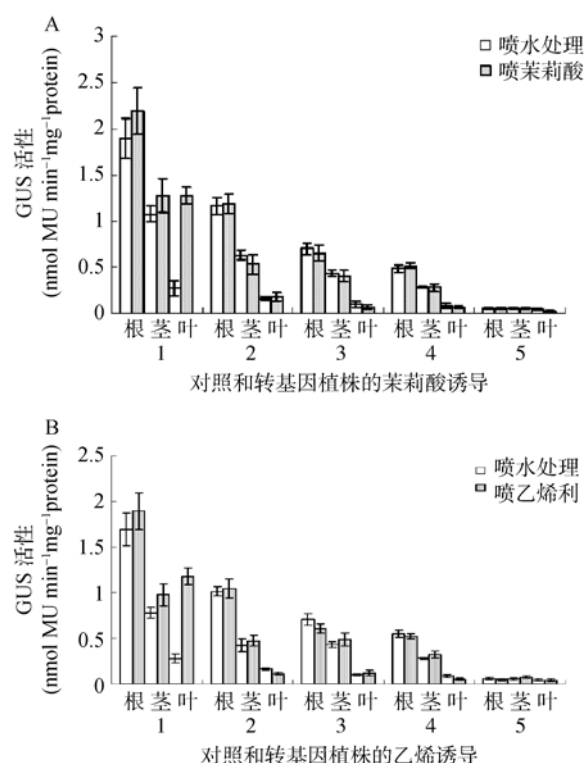


图 7 茉莉酸和乙烯诱导 6 h 前后各构建转基因植株不同器官的 GUS 活性

A: 茉莉酸诱导; B: 乙烯诱导; 1: pNAR901 转基因植株; 2: pNAR902 转基因植株; 3: pNAR903 转基因植株; 4: pNAR904 转基因植株; 5: 非转基因对照植株。

至-2 717 bp)是维持 *Pib* 启动子茉莉酸和乙烯诱导活性必需的信号元件。

3 讨论

稻瘟病(*Pyricularia oryzae* Sacc)是由稻瘟病菌引起的一个多发性病害,严重影响着水稻的产量和品质。利用转基因技术平台鉴定和研究抗病基因的抗性机制是将现代分子遗传技术应用于抗稻瘟病育种的重要基础性工作。*Pib*基因是水稻中第一个通过图位克隆得到的稻瘟病抗性基因, Wang等^[6]曾报道,病原菌不能诱导抗稻瘟病基因*Pib*的表达,而黑暗、温度等环境因素和一些简单的化合物却能高效地诱导*Pib*基因表达。*Pib*基因的这种抗性表达模式是比较特殊的。

李婵娟等^[7]对*Pib*基因启动区进行的转基因分析,发现*Pib*基因启动区受黑暗、SA等因素的诱导且其启动活性具有很强的组织特异性,总是在根中表现最高启动活性,是一个诱导型启动子。邵克强

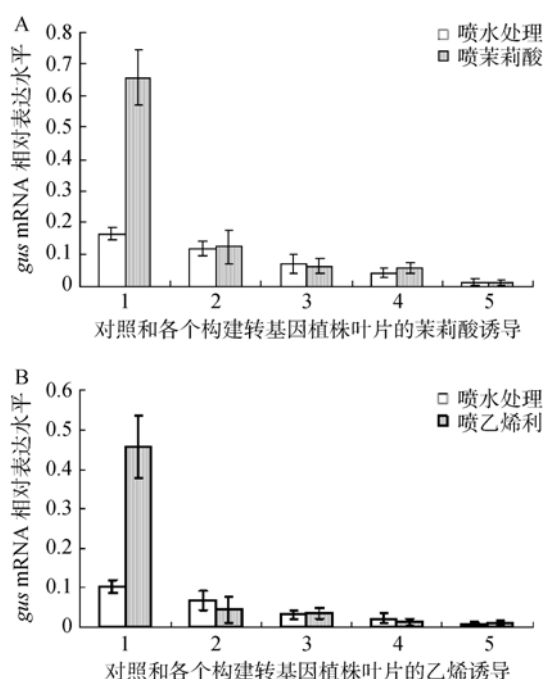


图 8 茉莉酸和乙烯诱导 6 h 后各构建转基因植株叶片中 *gus* mRNA 定量

A: 茉莉酸诱导; B: 乙烯诱导; 1: pNAR901 转基因植株; 2: pNAR902 转基因植株; 3: pNAR903 转基因植株; 4: pNAR904 转基因植株; 5: 非转基因对照植株。

等^[8]进一步用启动子序列逐段缺失的转基因分析方法得到了软件定义为光响应元件的YTCANTYY基序在*Pib*启动子中决定其暗诱导性,野生型的*Pib*启动子内共有 6 个拷贝的YTCANTYY基序,*Pib*启动子的暗诱导活性与其拷贝数目呈正比等结论。但有关*Pib*启动子中茉莉酸,乙烯等激素诱导性的分子机制尚无实验证据。

本研究中GUS组织化学染色结果表明,外源的茉莉酸和乙烯能有效的诱导全长启动子 pNAR901(-3 572~2 bp)驱动的GUS表达。为了进一步探讨其中应答茉莉酸和乙烯诱导反应的序列区域,利用 5'端缺失法对*Pib*启动子进行了缺失片段分析,结果显示全长pNAR901(-3 572~2 bp)具有较高的诱导活性,而缺失-3 572~-2 692 bp的 pNAR902(-2 692~2 bp), pNAR903(-1 335~2 bp) 和 pNAR904(-761~2 bp)的诱导活性显著下降,且与其对照相比没有实质性差别。因而可以确定*Pib*启动子应答茉莉酸和乙烯的必需区域为-3 572~-2 692 bp区段,因为该区段的缺失会导致*Pib*启动子丧失对茉莉酸和乙烯诱导的响应。而*Pib*启动子序列的-2 722 bp处有一个

GCCGCC分子元件,是由GCC串联重复而成,许多研究表明该元件是与茉莉酸或乙烯诱导相关的调控元件。Brown等^[18]曾报道,含GCCGCC序列的GCC盒,是拟南芥茉莉酸信号途径中的标记基因*PDF1.2*负责应答的主要元件。GCC盒也是乙烯应答的顺式作用元件之一,存在于众多的PR基因(Pathogenesis-related gene)启动子序列中,在植物抗性反应和生长发育中具有重要的调控作用,有研究表明GCC盒可与某些ERF(Ethylene responsive factor)蛋白互作参与乙烯应答的多种防卫反应^[19]。因此我们推断*Pib*启动子-3572~-2692 bp区域中的GCCGCC基序可能是赋予*Pib*启动子茉莉酸和乙烯诱导响应的核心顺式元件。

茉莉酸和乙烯对PR基因的调控转录可能涉及到启动子的多个区域,因此我们将继续深入的通过碱基缺失突变等分子生物学的方法,进一步验证这一重要调控元件在启动子中的作用及其功能机制,这不仅为了解该抗性基因在不同胁迫下的分子调控机制、也为在分子水平上揭示抗病基因在植物中的抗病机制提供重要的实验证据。

参考文献(References):

- [1] 黄海群,林拥军.水稻*rbcS*基因启动子的克隆及结构功能分析.农业生物技术学报,2007,15(3):451-458.
- [2] Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 165-178. [\[DOI\]](#)
- [3] Robert-Seilantiz A, Navarro L, Bari R, Jones JD. Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(4): 372-379. [\[DOI\]](#)
- [4] Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehler C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3460-3479. [\[DOI\]](#)
- [5] Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J*, 1999, 19(1): 55-64. [\[DOI\]](#)
- [6] Wang ZX, Yamanouchi U, Katayose Y, Sasaki T, Yano M. Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favoring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defenses. *Plant Mol Biol*, 2001, 47(5): 653-661. [\[DOI\]](#)
- [7] 李娟娟,杨世湖,武亮,万建民. *Pib* 基因启动子及其诱导启动性初探.遗传,2006,28(6):689-694.
- [8] 邵克强,杨世湖,余丽,万建民. *Pib* 基因启动子内 YTCANTYY 暗诱导分子元件功能的转基因验证.作物学报,2008,34(9):1667-1672.
- [9] 倪丹,杨世湖,徐士清,万建民.非洲菊组培快繁技术的优化.细胞生物学杂志,2002,24(5):316-319.
- [10] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271-282. [\[DOI\]](#)
- [11] Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1(4): 19-21. [\[DOI\]](#)
- [12] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8(19): 4321-4326. [\[DOI\]](#)
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 496-499.
- [14] Jefferson RA. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5(4): 387-405. [\[DOI\]](#)
- [15] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1-2): 248-254. [\[DOI\]](#)
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta C_t}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408. [\[DOI\]](#)
- [18] Brown RL, Kazan K, Mcgrath KC, Maclean DJ, Manners JM. A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 1020-1032. [\[DOI\]](#)
- [19] 张海天,谢丙炎,卢向阳,杨宇红,陈棋,黄荣峰.拟南芥防卫基因*PDF1.2*启动子中GCC盒是应答茉莉素反应必要的顺式作用元件.科学通报,2004,49(23):2444-2448.