

高羊茅 *FaChit1* 基因启动子的功能分析

王仕英¹, 王浩如¹, 王健^{1,2*}

(1. 教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062; 2. 安康学院农学与生命科学学院, 陕西安康 725000)

摘要: 用含有不同长度 *FaChit1* 基因启动子区域与 *GUS* 基因融合构建植物表达载体 pFaChit1P-I、pFaChit1P-II 以及 pFaChit1P-III 并分别对烟草进行转化, 经真菌激发子、干旱、机械损伤以及乙烯等多种胁迫处理后测定 *GUS* 活性。启动子缺失分析实验结果显示, 真菌激发子对 *FaChit1* 基因启动子所介导的 *GUS* 诱导表达效果最强, 而机械损伤只能微弱地诱导 *GUS* 基因表达; *FaChit1* 基因启动子-651 bp 以内的序列均能介导 *GUS* 基因的诱导表达, 同时-935 bp 与-233 bp 之间的区域是该启动子响应真菌激发子、乙烯以及机械损伤胁迫所必需的。表明 *FaChit1* 启动子是一个多胁迫诱导型启动子。

关键词: 高羊茅; *FaChit1* 基因; 启动子缺失分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)06-0562-08

Functional Deletion Analysis of *FaChit1* Promoter Region from *Festuca arundinacea*

WANG Shi-Ying¹, WANG Hao-Ru¹, WANG Jian^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Agriculture and Life Science, Ankang University, Ankang, Shaanxi 725000, China)

Abstract: Activation of different promoter fragments by fungal elicitors, dehydration, mechanical wounding, and ethylene were analyzed in transgenic tobacco using transcriptional fusions of *FaChit1* 5' upstream sequences to the *GUS* reporter gene (promoter-GUS expression vectors were designated as pFaChit1P-I, pFaChit1P-II and pFaChit1P-III, respectively). Analysis of promoter deletion showed that the *FaChit1* promoter conferred the strongest induction of *GUS* activity in response to treatment with fungal elicitors, but the least induction in response to mechanical wounding; *GUS* activity could be induced in response to four stress treatments in leaves containing the 651 bp upstream of the *FaChit1* start codon, and the fragment between 935 bp and 233 bp upstream of the *FaChit1* start codon was sufficient to direct gene expression in response to fungal elicitors, ethylene, dehydration, and mechanical wounding. Results indicated that the *FaChit1* promoter was a multiple stress inducible promoter.

Key words: Tall fescue (*Festuca arundinacea*); *FaChit1* gene; Promoter deletion analysis

收稿日期: 2013-04-24, 修回日期: 2013-10-08。

基金项目: 国家自然科学基金(31170281); 陕西省自然科学基金(2011K-16-02-01); 陕西省教育厅自然科学专项基金(11JK0610); 安康学院高层次人才专项基金(AYQDZR200926)。

作者简介: 王仕英(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物基因工程及转基因植物研究。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wangjianswj@163.com)。

在植物应答病原菌及相关环境胁迫时, 防御基因的转录调控起着非常重要的作用。植物识别病原体后, 通过一系列信号转导最终诱导相关植物防卫反应基因的表达^[1]。在众多植物防御基因的启动子序列中, 存在大量能够快速应答多种环境胁迫因子的顺式作用元件且在功能上已被鉴定。

为了深入了解植物在其防御反应过程中几丁质酶基因表达的转录调控机制, 已有多种植物几丁质酶基因的启动子序列被分离克隆^[2,3]。例如, 烟草几丁质酶基因 *CH48* 和马铃薯几丁质酶基因 *ChtC2* 的启动子均含有典型的 GCC 盒; 皱叶欧芹 *PR-10* 基因、烟草 *CHN50* 基因以及拟南芥 *NPR1* 基因的启动子中都含有不同数量及存在形式的 W 盒^[4-6]。WRKY 类转录因子通过与抗病基因启动子中的 W 盒结合, 激活下游基因的表达, 从而介导植物对病原菌来源的激发子 (Pathogen-derived elicitors)、机械损伤及衰老等胁迫因子的防御性应答。此外, 在很多胁迫诱导基因中存在一种顺式作用元件 G-Box (CACGTGGC), 这是一类 MYB 和 MYC 类转录因子识别序列 (MYBRS, MYCRS)^[7]。通过与报告基因的融合并转化至相应受体植物后分析报告基因的表达情况, 可进一步鉴定启动子中与该基因表达相关的各种顺式作用元件 (*Cis*-acting elements)。

目前, 转基因技术中所使用的启动子大多数为组成型启动子。抗逆基因在其启动下的表达虽然可以提高植物的相关抗逆能力, 但其持续的表达对植物来说是一种物质及能量的浪费, 存在可能妨碍转化植株正常代谢从而导致其异常发育的情况^[8]。如果使用组织特异性启动子或病原诱导型启动子, 使外源基因能定时、定点、定量地在植物中表达, 则可以克服使用组成型启动子所引起的负面问题。高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 又称苇状羊茅, 具有抗病性强、抗旱、耐瘠薄、适应性广等优良性状, 若能从中分离出其内源抗性基因启动子序列并对其进行功能验证, 则能为其它相关草坪草的抗病及抗逆基因工程提供优良的病原诱导型启动子, 使外源转移基因能在胁迫诱导型启动子的控制下进行有选择的诱导表达从而更好的适应逆境。基于此, 本实验从高羊茅植株中分离了抗病原菌性能较强的

I 类几丁质酶基因 *FaChit1* 的启动子序列并对其功能进行了初步鉴定, 以期为进一步深入开展植物抗病相关启动子的研究和应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

将‘秦烟 95’号烟草种子用 70% 乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 置于 MS 基本培养基中萌发生长至幼苗。转化烟草幼苗经卡那霉素筛选后于 25℃ 室温中培育 3~4 周, 分别进行真菌激发子 (100 μg/mL) (壳聚糖经过氧化氢水解后干燥而成)、甘露醇 (300 mmol/L)、乙烯 (1 mg/mL) 胁迫处理, 同时以清水处理作为阴性对照。将幼嫩叶片剪切成约 5×5 cm 左右, 然后置于用清水浸泡的滤纸上作为机械损伤胁迫。以上处理时间均为 24 h, 温度为 25℃。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体的农杆菌转化

以 *FaChit1* 基因启动子为模板扩增 -935 bp ~ +1 bp; -651 bp ~ +1 bp; -233 bp ~ +1 bp 区域。PCR 回收产物经 *Hind* III 和 *BamH* I 双酶切后连接至植物表达载体 pBI121, 分别命名为 pFaChit1P-I、pFaChit1P-II 和 pFaChit1P-III。农杆菌感受态细胞的制备以及采用冻融法转化农杆菌等具体步骤均按照分子克隆指南^[9] 进行。向农杆菌感受态细胞中加入 0.1 μg 质粒 DNA, 混匀; 冰上放置 10 min, 迅速置于液氮中速冻 8 min, 然后立即置于 28℃ 水浴中热激 5 min。加入 500 μL YEB 液体培养基, 28℃、缓慢振荡培养 (小于 200 r/min) 2~3 h; 取 100 μL 菌液分别涂布于含链霉素 (100 μg/mL) 和卡那霉素 (50 μg/mL) 的 YEB 固体培养基上。28℃ 放置约 48 h 左右。

1.2.2 农杆菌介导的烟草遗传转化

取生长至 5~6 片真叶期的烟草无菌幼苗, 将叶片剪成大小均一的小块, 转入 MS 预培养基 (30 g/L 蔗糖、2 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA) 上, 25℃、光照 16 h/d, 预培养 2~3 d。将预培养后的材料取出, 放在无菌的培养皿中。向皿中倒入稀释好的农杆菌菌液, 浸泡 15 min, 然后用无菌滤纸吸干多余菌液, 接入 MS 预培养基上, 暗

处、25℃共培养 2~3 d。将共培养的叶片外植体转入含有 200 mg/L Cef(羧卞青霉素)的 MS 脱菌培养基上, 25℃、光照 16 h/d, 预培养 2~3 d。将脱菌处理的外植体转入 MS 筛选培养基(30 g/L 蔗糖、2 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA、100 mg/L Kan、200 mg/L Cef)上进行选择培养, 25℃、光照 16 h/d, 每 2~3 周更换一次新鲜的筛选培养基。待绿芽长至 1 cm 左右时, 切下并插入 MS 生根培养基(30 g/L 蔗糖、0.2 mg/L NAA、50 mg/L Kan、200 mg/L Cef)上进行生根培养。待根系形成后取出小苗, 洗净根上的琼脂, 移入花盆中, 室温常规培养。

1.2.3 转基因烟草植株基因组 DNA 及 RNA 的提取

取新鲜幼嫩叶片约 1~2 g, 迅速放入 2 mL Eppendorf 管中, 置于液氮罐中快速冷冻。然后采用植物 DNA 大量提取试剂盒(宝泰克生物有限公司, 北京)提取基因组 DNA, 具体提取方法及步骤按试剂盒说明进行, 通过紫外分光光度计将 DNA 浓度调至 1 μ g/ μ L, 置于-20℃保存备用。对于转基因烟草植株总 RNA 的提取采用盐酸胍法, 具体步骤参照分子克隆指南^[9]进行。

1.2.4 转基因烟草的 PCR 检测及 Southern 杂交鉴定

使用引物 VF₁ (5'-ACAGAGCAACCGAATTGACTT-3') 和 VR (5'-CACTTCCTGATTATTGACCCACA-3') 对转 pFaChit1P-I 或 pFaChit1P-II 的烟草植株进行 PCR 检测, 使用引物 VF₂ (5'-ACCGATGGCCATGGCCTG-3') 和 VR 对转 pFaChit1P-III 的烟草植株进行 PCR 检测。PCR 反应程序分别为: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 60℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环, 72℃延伸 10 min 和 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 30 个循环, 72℃延伸 10 min。对于 Southern 杂交, 将启动子中 560 bp 的 DNA 片段用地高辛标记成探针, 探针制备过程以及合适浓度的确定主要参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 中的标准程序进行。将约 40 μ g 转基因烟草基因组 DNA、10 μ L 10×缓冲液、10 μ L 乙酰化 BSA 与 100 U 内切酶(BamH I、Hind III 或 EcoR I)

加 dd H₂O 至总体积为 100 μ L, 均匀混合, 37℃酶切过夜。次日于 0.7% 琼脂糖凝胶中以 1 V/cm 恒压电泳, 待 DNA 迁移至凝胶全长的 2/3 至 3/4 处停止电泳。DNA 向尼龙膜的转移、杂交以及杂交信号的检测等具体步骤严格参照分子克隆指南^[9]和试剂说明书进行。

1.2.5 转基因烟草的 GUS 荧光活性测定

新鲜转基因烟草叶片组织 GUS 蛋白的提取、GUS 酶反应及荧光测定等步骤均按照 Jefferson 等^[10]的方法进行。对于 GUS 提取液蛋白含量的测定以及酶活力的计算, 则采用 Bradford 的方法^[11]。

1.2.6 转基因烟草中 GUS 基因 mRNA 表达水平的 Northern 杂交

以 pBI121 中 GUS 编码区内一段 400 bp 的 DNA 序列为模板将其用地高辛标记成探针。探针的制备及其合适浓度的确定均同 1.2.4 所述; RNA 变性凝胶电泳、碱性条件下 RNA 向尼龙膜的转移、杂交以及杂交信号的检测等过程均严格参照分子克隆指南^[9]进行。

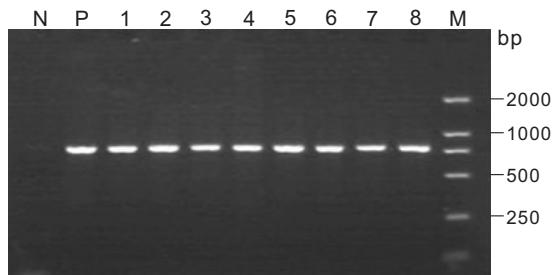
2 结果与分析

2.1 含不同 FaChit1 启动子区域转基因烟草植株的 PCR 鉴定

使用农杆菌介导法转化烟草, 获得了含不同长度的 FaChit1 基因启动子驱动 GUS 表达 (pFaChit1P-I、pFaChit1P-II 和 pFaChit1P-III) 的转化植株, 其中转 pFaChit1P-I 载体获得了来自独立转化事件的卡那霉素抗性植株 20 株, 转 pFaChit1P-II 和 pFaChit1P-III 载体分别获得了来自独立转化事件的卡那霉素抗性植株 3 株及 2 株。使用 VF₁/VR 及 VF₂/VR 分别对上述转基因植株进行 PCR 鉴定, 结果见图 1 和图 2。转化株均能扩增出相应大小的特异性条带(780 bp、485 bp), 而非转化株没有扩增出条带, 结果初步证明外源基因已经整合到烟草基因组中。

2.2 转基因烟草的 Southern 杂交鉴定

为了进一步确定外源基因整合的拷贝数, 将从转 pFaChit1P-I 基因烟草 PCR 鉴定中呈阳性结果的植株分别随机选择 3 个独立转化系提取基因组 DNA, 用 EcoR I (1、3、5 泳道) 和 BamH I (2、

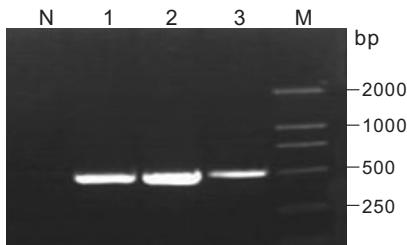


M: DNA Marker; 1~5: pFaChit1P-I 转化株的 PCR 扩增结果; 6~8: pFaChit1P-II 转化株的 PCR 扩增结果; P: pFaChit1P-I 载体的 PCR 扩增结果; N: 野生型烟草植株的 PCR 扩增结果。

M: DNA Marker; 1~5: PCR amplification products of pFaChit1P-I transformed tobacco; 6~8: PCR amplification products of pFaChit1P-II transformed tobacco; P: PCR amplification products of pFaChit1P-I vector; N: PCR amplification products of wild tobacco.

图 1 转 pFaChit1P-I 或 pFaChit1P-II 载体转基因烟草的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR analysis of eight transgenic tobacco lines containing pFaChit1P-I or pFaChit1P-II



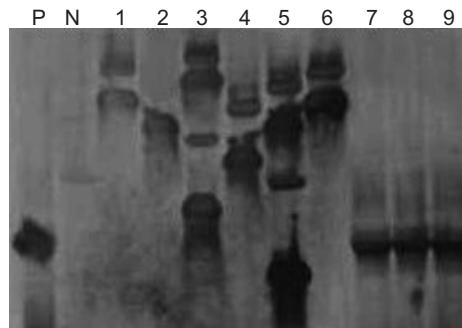
M: DNA Marker; N: 野生型烟草植株的 PCR 扩增结果; 1: pFaChit1P-III 载体的 PCR 扩增结果; 2, 3: pFaChit1P-III 转化的 2 株烟草植株的 PCR 扩增结果。

M: DNA Marker; N: PCR amplification products of wild tobacco; 1: PCR amplification products of pFaChit1P-III vector; 2, 3: PCR amplification products of two pFaChit1P-III transformed tobacco plants.

图 2 转 pFaChit1P-III 载体转基因烟草的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR analysis of eight transgenic tobacco line containing pFaChit1P-III

4、6 洼道)各自进行单酶切,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切(7、8、9 洼道)(图 3 中 1、3、5 洼道和 2、4、6 洼道以及 7、8、9 洼道所对应的样品相一致),酶切后的基因组 DNA 分别与来自启动子中 560 bp 的 DNA 探针(探针制备见方法 1.2.4)杂交。杂交结果表明,在所检测的 pFaChit1P-I 转化系中,融合基因已整合到烟草基因组中,2 个转化系整合了 2 个拷贝,1 个转化系整合了 1 个拷贝(图 3)。其中,由于在标记的杂交探针内部有一个 *Eco*R I 酶切位点,所以 1、3、5 洼道所对应的样品分别有 1 个和 2 个拷贝,与 2、4、6 洼道和 7、8、9 洼道杂交结果一致。



P: 质粒 pFaChit1P-I 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切; N: 未转化烟草基因组 DNA 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切; 1、3、5: 基因组 DNA 用 *Eco*R I 单酶切; 2、4、6: 基因组 DNA 用 *Bam*H I 单酶切; 7~9: 基因组 DNA 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切。

P: Plasmid pFaChit1P-I digested with *Bam*H I and *Hind* III; N: Non-transgenic tobacco genomic DNA digested with *Bam*H I and *Hind* III; 1, 3, 5: Genomic DNA digested with *Eco*R I from transformed tobacco plants; 2, 4, 6: Genomic DNA digested with *Bam*H I from transformed tobacco plants; 7~9: Genomic DNA digested with *Bam*H I and *Hind* III from transformed tobacco plants.

图 3 pFaChit1P-I 烟草转化株系的 Southern 杂交鉴定

Fig. 3 Southern blotting analysis of transgenic tobacco plants transformed with pFaChit1P-I

2.3 *FaChit1* 启动子不同区域对多种胁迫的应答特征

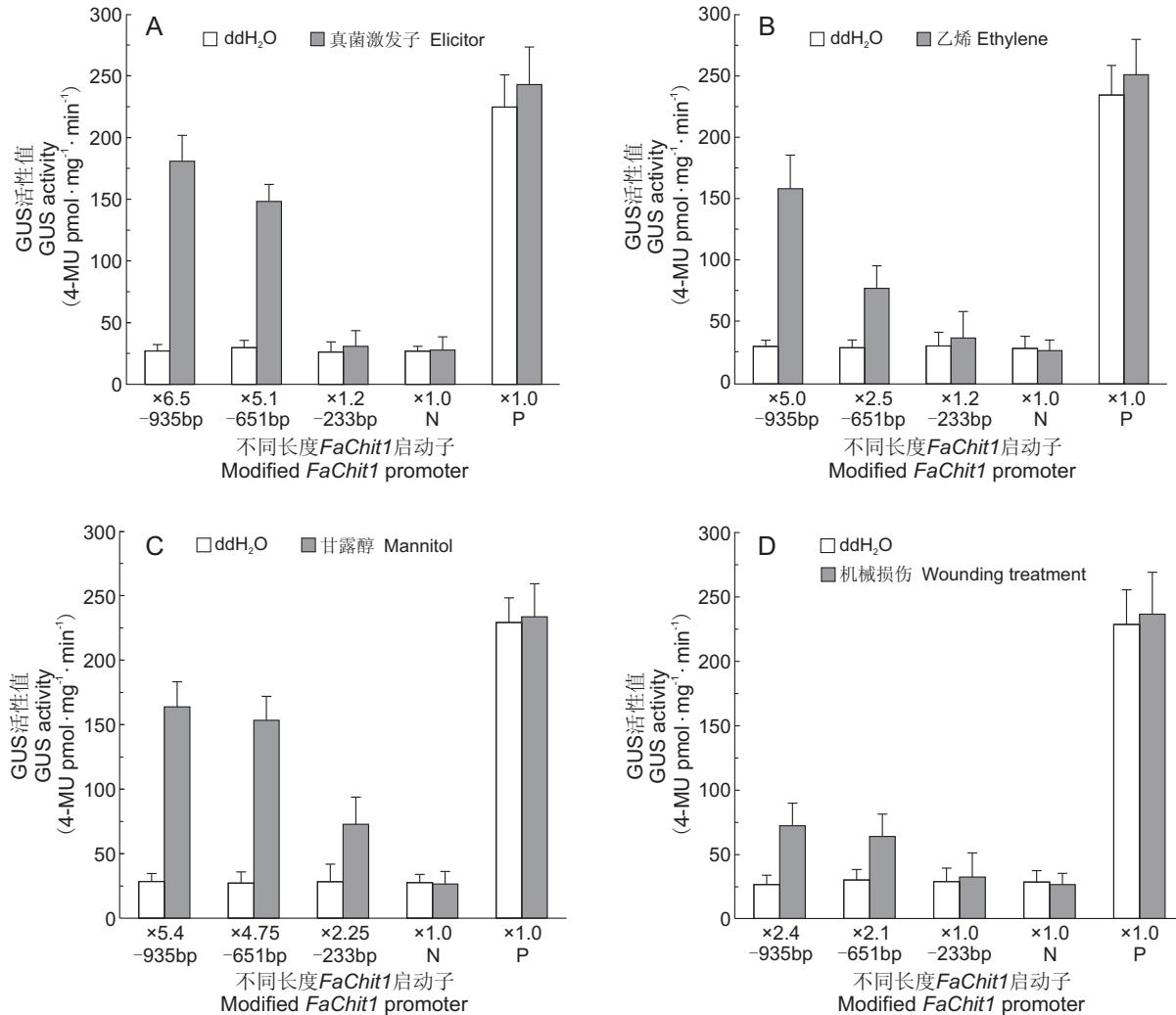
为了进一步研究 *FaChit1* 基因启动子不同区段所起的转录调控作用,本实验对不同长度启动子转化烟草株系在几种胁迫条件下的 GUS 荧光活性进行了测定。首先,用 100 μ g/mL 真菌激发子对含不同长度启动子转化烟草株处理 24 h,然后检测转基因烟草叶片组织中的 GUS 酶活性。从图 4: A 可看出, -935 bp 和 -651 bp 的 *FaChit1* 启动子介导的 GUS 诱导表达活性分别约为对照组的 6.5 倍和 5.1 倍,略低于阳性对照 35S 启动子介导的 GUS 表达,然而, -233 bp 的 *FaChit1* 启动子几乎未检测到 GUS 活性。这一结果表明 *FaChit1* 启动子 -935 bp 与 -233 bp 之间的片段中存在的 W-Box 可能是该启动子响应真菌激发子所需要的,但是是否在该区域内还存在其它真菌激发子协同响应元件,还有待后续实验进一步证实。1.0 mg/mL 乙烯溶液喷洒处理 24 h 后检测结果显示(图 4: B),与清水处理组对照相比, -935 bp、-651 bp *FaChit1* 启动子介导的 GUS 活性值分别为对照组的 5.0、2.5 倍,而 -233 bp *FaChit1* 启动子的转化烟草株没有检测到 GUS 活性。在乙烯处理条件下,不同长度的 *FaChit1* 启动子介导的 GUS 活性

值与真菌激发子的胁迫诱导相似, 只是相应的数值略低, 表明 *FaChit1* 启动子 -935 bp 与 -233 bp 之间的片段是该启动子响应乙烯胁迫所需要的。甘露醇干旱胁迫处理 24 h 后, 检测结果显示(图 4: C), -935 bp、-651 bp、-233 bp 的 *FaChit1* 基因启动子介导的 GUS 活性分别为对照组的 5.4、4.75 及 2.25 倍, 表明 GUS 诱导表达随着 *FaChit1* 基因启动子片段的不断缺失逐渐变弱。为了确定 *FaChit1* 基因启动子能否响应损伤胁迫, 将上述烟草转化株系机械损伤处理, 从图 4: D 可见,

-935 bp、-651 bp 的 *FaChit1* 基因启动子只能轻微诱导 GUS 表达, 与清水处理组对照相比, GUS 诱导表达活性分别约为对照组的 2.4 及 2.1 倍, 而且 -233 bp 的 *FaChit1* 基因启动子不能再诱导 GUS 表达。

2.4 pFaChit1P-I 转化系烟草中 GUS 基因的 mRNA 表达水平

鉴于 GUS 基因的 mRNA 表达水平比 GUS 酶活性更能直接反映 GUS 基因的转录调控, 本实验对在同样胁迫条件下处理的 pFaChit1P-I 烟草转化



A: 真菌激发子胁迫; B: 乙烯胁迫; C: 甘露醇胁迫; D: 机械损伤胁迫。横坐标上的数字为不同 *FaChit1* 启动子区域与对照处理的 GUS 诱导表达倍数。N: 未转化烟草; P: pBI121 质粒。

A: Elicitor induction; B: Ethylene induction; C: Mannitol treatment; D: Wounding treatment. Numbers under bar indicate fold-increases of GUS activity after treatment versus control. N: Untransformed wild tobacco plant; P: pBI121 vector.

图 4 含有不同长度 *FaChit1* 启动子转基因烟草在不同胁迫处理 24 h 后叶片组织中的 GUS 活性变化

Fig. 4 GUS activity 24 h after different treatments in leaf tissues of transgenic tobacco harboring chimeric constructs of modified *FaChit1* promoter and GUS gene ORF

系中的 *GUS* 基因的 mRNA 表达水平进行了分析。Northern 杂交结果显示(图 5)，pFaChit1P-I 转化系烟草中 *GUS* 基因的 mRNA 表达水平在 4 种不同的胁迫处理下与高羊茅中 *FaChit1* 基因的表达水平保持相对的一致性；然而从整个表达水平上看，转基因烟草中 *GUS* 基因的 mRNA 表达量要低于 *FaChit1* 基因的 mRNA 水平。推测导致这种现象的原因可能有两个，一是外源性融合基因 *pFaChit1P I-GUS* 的不稳定性，二是可能在 *FaChit1* 基因启动子-935 bp 上游还存在相应的增强子序列元件。

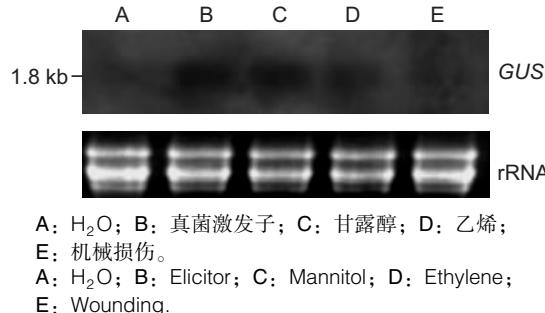


图 5 pFaChit1P-I 转化系烟草叶片中 *GUS* 基因经不同胁迫处理后的 mRNA 表达水平

Fig. 5 RNA gel blot analysis of the *GUS* mRNA induction in leaf tissue of transformed tobacco plants harboring *GUS* driven by the -935 bp region upstream of the *FaChit1* initiation codon constructed after different treatments

3 讨论

植物防卫基因的启动子区域内具有多个能快速响应病原菌侵袭的顺式调控元件，W-Box 就是其中最重要的一类^[1,12-14]。例如，烟草 I 类几丁质酶基因 *CHN50* 启动子中的 W-Box 就能够与相关的 WRKY 转录因子进行特异性结合^[5]。本实验中我们发现，在 *FaChit1P-I* 及 *FaChit1P-II* 转化系烟草植株中，由启动子-935 bp 及 -651 bp 两个片段所介导的 *GUS* 表达活性并没有多大的差别；另一方面，从图 4: A 可以看出，位于 -935 bp 与 -651 bp 之间的 284 bp 的区域的确增强了 *GUS* 表达活性，这一实验结果暗示位于 -651 bp 与 -233 bp 之间的 418 bp 的区域对真菌激发子的胁迫响应是必需的，而且似乎 W-Box 之间存在着一定的协同关系，这种协同关系能进一步增强它们对目的基因的调控表达。Eulgem 等报道，单独的 W-Box 对真菌激发子的胁迫响应是相当低的，然而多

个 W-Box 的共同存在能大大提高其响应程度，显示出一定的协同效应^[15]。可能在植物体内 W-Box 作为一类通用的调控元件不仅需要 W-Box 与之相应的转录因子之间的结合，而且还需要启动子内其它相关 DNA 调控元件与之相应的转录因子之间的结合以及二者之间的相互作用^[16]。

尽管在 *FaChit1* 基因的-935 bp 启动子中没有典型的脱水响应元件 (DREB, dehydration response element binding site)，但是转化烟草对干旱胁迫具有较强的响应。一般而言，在胁迫诱导基因的启动子中常常存在 ABRE (ABA response element) 以及 MYC 或 MYB 识别序列^[17]。*FaChit1* 基因的-935 bp 启动子中也含有这些调控元件，包括 10 个左右的 MYC 或 MYB 识别序列以及 4 个 ABRE，因此，这些调控元件可能参与 *FaChit1* 基因的干旱胁迫应答。

作为一种信号分子，乙烯在植物体响应多种环境胁迫应答的过程中起着重要的作用。病原菌的侵染能导致植物体内乙烯的快速合成，继而通过以乙烯为信号分子的信号转导途径诱导相关防卫基因的表达。本实验中观察到，含有 *FaChit1* 启动子的 3 个片段 (-935 bp、-651 bp 和 -233 bp) 的转基因烟草植株叶片组织都能够响应乙烯并表达产生不同程度的 *GUS* 活性。但是 *FaChit1* 启动子却不含有典型的乙烯响应元件 GCC-Box。这种情况在先前也有过报道，如一些参与果实成熟以及器官衰老有关的基因中，没有 GCC-Box 的存在，但仍然受乙烯诱导^[18-20]，说明除了 GCC-Box 以外，其它一些顺式调控元件以及相关的一些转录因子可能也参与乙烯途径的调控。例如，拟南芥的 *AtERF14* 是一个受乙烯诱导的转录因子，不仅能够调控含有 GCC-Box 的基因表达，也能调控不含 GCC-Box 基因 (*AtERF*) 的表达。*AtERF14* 可能与其它的顺式调控元件结合，或者与其它调控蛋白结合后继而激活 *AtERF* 的表达^[21]。番茄 *Pt14* 转录调控蛋白在拟南芥中过量表达后，能与不含 GCC-Box 的启动子序列结合从而激活目的基因的表达^[19]。这些都暗示着，在 *FaChit1* 基因启动子中，可能存在还没有被特征化的乙烯响应元件。

基因工程技术是改良作物抗逆性的最经济、也

是最有前景的方法，胁迫诱导型启动子能调节基因表达的时空性，促使外源基因在逆境胁迫条件下表达相应的蛋白，如增加胁迫蛋白的含量，提高抗氧化剂基因的表达水平，增加可溶性物质的积累等，既可节约细胞内代谢能量，又不影响植物的正常生长发育，避免外源基因对植物的不良效应，同时转基因植株还能更好地适应相应的逆境胁迫^[22]。本实验研究的高羊茅 *FaChit1* 的启动子不但能够响应病原菌的侵染，而且还具有响应相关逆境胁迫的功能，因此将该基因及其启动子作为一个完整抗胁迫基因对其他植物进行遗传改良值得进一步的研究。

参考文献：

- [1] Chen W Q, Provart N J, Glazebrook J. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 559–574.
- [2] Shinshi H, Usami S, Ohme-Takagi M. Identification of an ethylene responsive region in the promoter of a tobacco Class I chitinase gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 923–932.
- [3] Hong J K, Hwang B K. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, *CAChi2*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CAChi2*-overexpressing *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2006, 223: 433–448.
- [4] Rushton P J, Torres J T, Parniske M. Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes [J]. *Embo J*, 1996, 15: 5690–5700.
- [5] Yang P, Wang Z, Fan B, et al. A pathogen-and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene [J]. *Plant J*, 1999, 18: 141–149.
- [6] Yu D Q, Chen C H, Chen Z X. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 1527–1539.
- [7] Menkens A E, Schindler U, Cashmore A R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins [J]. *Trends Biochem*, 1995, 20: 506–510.
- [8] Curr S L, Rushton P J. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it [J]? *Trends Biotech*, 2005, 23 (6): 283–290.
- [9] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 492–499.
- [10] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *Embo J*, 1987, 13: 3901–3907.
- [11] Bradford M M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [12] Rushton P J, Somssich I E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens [J]. *Curr Opin Plan*, 1998, 1: 311–315.
- [13] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(1): 21–37.
- [14] Xu X, Chen C, Fan B, et al. Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 1310–1326.
- [15] Eulgem T, Rushton P J, Schreiber E, et al. Early nuclear events in plant defense signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors [J]. *Embo J*, 1999, 18: 4689–4699.
- [16] Sawant S V, Kiran K, Mehrotra R, et al. A variety of synergistic and antagonistic interactions mediated by cis-acting DNA motifs regulate gene expression in plant cells and modulate stability of the transcription complex formed on a basal promoter [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(419): 2345–2353.
- [17] Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J K, et al. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55: 225–236.

- [18] Raghothama K G, Lawton K A, Goldsbrough PB, *et al.* Characterization of an ethylene-regulated flower senescence-related gene from carnation [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 61–71.
- [19] Chakravarthy S, Tuori R P, D'Ascenzo M D, *et al.* The tomato transcription factor PtI4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC-Box cis-elements [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 3033–3050.
- [20] Pirrello J, Jaimes-Miranda F, Sanchez-Ballesta M T. S1-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination [J]. *Plant Cell Phys*, 2006, 47 (9): 1195–1205.
- [21] Onate-Sánchez L, Anderson J P, Young J. AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a non-redundant role in plant defense [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143: 400–409.
- [22] 于壮, 朱丽萍, 邹翠霞, 李秋莉. 胁迫诱导型启动子在植物抗逆基因工程中的应用 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(11): 1141–1145.

(责任编辑:张平)