

大豆 *GmPR10* 基因启动子的克隆及序列分析

孟凡姗, 范素杰, 徐鹏飞, 张淑珍

(东北农业大学 大豆研究所/大豆生物学教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: *GmPR10* 基因是病程相关蛋白 PR10 (pathogenesis-related proteins 10) 在大豆中的同源基因。为探明大豆 *GmPR10* 基因的表达调控规律,应用 PCR 技术从大豆抗疫霉根腐病品种绥农 10 号中克隆了 *GmPR10* 基因上游 2 235 bp 的启动子序列 p*GmPR10*,定向替换 pBI121 载体的 CaMV35S 组成型启动子,构建植物表达载体 pBI121/p*GmPR10*/GUS,并转化农杆菌侵染烟草叶盘。GUS 染色结果表明,p*GmPR10* 受聚乙二醇(PEG)、低温(4℃)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和脱落酸(ABA)诱导表达,因此推测 *GmPR10* 基因可能参与植物激素调节植物生长发育的过程,以及生物胁迫和非生物胁迫条件下植物对环境响应的过程。此外,利用 PLACE 和 PlantCARE 在线启动子预测工具分析 p*GmPR10* 结果表明:p*GmPR10* 含有启动子的一般结构 TATA-box 和 CAAT-box,光应答元件、生长素和细胞分裂素响应元件、热激元件、低温应答元件、干旱应答元件以及 ABA、SA、JA 应答元件等。

关键词: 大豆; *GmPR10*; 启动子; 克隆; GUS 染色

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0568

Cloning and Sequence Analysis of the *GmPR10* Gene Promoter from Soybean (*Glycine max* L.)

MENG Fan-shan, FAN Su-jie, XU Peng-fei, ZHANG Shu-zhen

(Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, China)

Abstract: *GmPR10* was homology with the PR10 (pathogenesis-related proteins 10) gene in other plants. To investigate the expression and regulation of the *GmPR10* gene in soybean, the 2 235 bp promoter region of 5'-flanking upstream of *GmPR10* gene was isolated from the genomic DNA of soybean cultivars Suinong 10 (with high resistance to *Phytophthora sojae* in Heilongjiang, China) by PCR, defined as p*GmPR10*. It was directionally replaced CaMV35S promoter of the expression vector pBI121. The plant expression vector of pBI121/p*GmPR10*/GUS was used to drive expression of the GUS reporter gene in the pBI121, and the construct was transformed into tobacco leaves by *Agrobacterium-mediated* transformation. GUS staining results showed that, p*GmPR10* activity was highly induced by drought (PEG), low temperature (4℃), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and abscisic acid (ABA). Therefore, it was speculated that *GmPR10* gene may be involved in the process of plant growth and development with the regulation of plant hormones, as well as the process under abiotic and abiotic stresses responses to the environment. In addition, sequence analysis by PLACE and PlantCARE revealed that p*GmPR10* contained promoter general structure TATA-box and CAAT-box, light response element, auxin and cytokinin response element, heat shock element, cold response element, drought responsive element and ABA, SA and JA response elements.

Keywords: Soybean; *GmPR10*; Promoter; Cloning; GUS staining

病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, PRs) 是植物防卫反应中用来响应外界多种生物和非生物胁迫的一类蛋白质的总称^[1-2],系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 是植物抵抗外界生物和非生物胁迫的复杂防御网络之一,因此,PR 蛋白是植物产生 SAR 的重要指标^[3-5]。

目前,根据氨基酸序列的相似程度、血清学关系、生物学活性,PR 蛋白分为 17 个家族^[1,6]。已有报道表明,PR2 (β -1,3-葡聚糖酶类)和 PR3 (几丁质酶类)蛋白能够抑制真菌的生长^[7-8],这种响应并不只局限于病原菌侵染,还包括水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和乙烯(ET)等防御信号传导分子的诱导^[9-10]。PR10 为类核糖核酸酶,被初步认为内源表达的 PR10 在抵抗病毒上是活跃的,可以降解病毒的

RNA^[11-12]。许多研究者分别在生物胁迫(主要指病原菌的侵染)和非生物胁迫条件下(干旱、高盐、植物激素等)开展对植物 PR10 蛋白功能的研究,如利用病原物侵染水稻后,*OsPR10* 基因的表达量明显增加;茉莉酸、水杨酸、脱落酸、激动素等植物激素和防御信号分子等作用水稻后,*OsPR10* 基因的表达明显受到调控^[13-15]。为了研究植物防御信号传导网络,多种植物 PR 蛋白启动子序列被克隆,如拟南芥、番茄、水稻等^[16-18]。

目前,关于大豆 PR10 蛋白功能的研究报道较少。本课题组从高抗大豆品种绥农 10 号中克隆了受疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 诱导后高上调表达的抗病相关基因 *GmPR10*^[19],并对其功能进行了分析。*GmPR10* 是 PR10 在大豆中的同源基因,而有关

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(31171577, 31101167); 黑龙江省杰出青年基金(JC201308); 长江后备支持计划; 龙江学者基金; 哈尔滨市科技创新项目(2012RFQXN011, 2012RFXXN019)。

第一作者简介: 孟凡姗(1991-),女,硕士,主要从事大豆抗病遗传育种研究。

通讯作者: 张淑珍(1972-),女,博士,博导,主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: zhangshuzhen@neau.edu.cn。

大豆 *GmPR10* 基因启动子的研究尚未见报道。

本研究克隆了大豆 *GmPR10* 基因启动子序列, 将启动子/*GUS* 融合表达载体转化烟草叶盘, 并进行植物激素和防御信号分子的诱导, 通过组织化学显色, 揭示启动子参与生物和非生物胁迫反应的功能和启动表达规律, 并利用 PLACE 和 PlantCARE 在线启动子预测工具分析该启动子潜在的顺式作用元件, 为进一步阐明该基因的功能奠定理论基础, 为 *GmPR10* 基因应用于大豆种子的品质改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆 (*Glycine max*) 品种为绥农 10 号(高抗大豆疫霉根腐病品种), 由黑龙江省农业科学院提供; 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 品种为 Havana 425, 由大豆生物学教育部重点实验室提供; 试验用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、植物表达载体 pBI121、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 均由大豆生物学教育部重点实验室保存; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、*Ex-Taq*、TA 克隆载体 pMDTM18-T Vector、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; PCR 引物合成和 DNA 测序均由金唯智公司完成; 其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大豆叶片总 DNA 提取 选取籽粒饱满、无病斑的绥农 10 号种子, 种植于塑料钵中(草炭土: 蛭石 = 2:1), 每钵 5 粒, 放入人工气候箱中进行常规培养(25~27 $^{\circ}$ C, 光照 16 h, 黑暗 8 h)。当幼苗长至第一簇三出复叶完全展开时, 参照张伟等^[20]的方法进行大豆叶片总 DNA 的提取, 提取的 DNA 样品保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 *GmPR10* 基因启动子序列的获得 下载已登录的大豆 *GmPR10* 基因核苷酸序列(登录号: FJ960440) 在已公布的大豆基因组数据库 Phytozone (<http://www.Phytozone.net/soybean>) 中搜索其对应区域, 查找 *GmPR10* 基因 5'UTR 上游 2 000 bp 的序列, 并将这部分序列加上 235 bp 的 5'UTR 区域作为本试验研究的启动子序列, 标记为 pGmPR10。

1.2.3 *GmPR10* 基因启动子序列的克隆及分析 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 pGmPR10 的 DNA 克隆引物, 分别在 5'和 3'端引入 *Hind* III 和 *Bam*H I 限制性酶切位点。pGmPR10 正义引物 P1: 5'-CCCAAGCTTGCAATATGGACAGCAGGAAGT-3'; pGmPR10 反义引物 P2: 5'-CGGGATCCATTAATGGAAGATGGAAAATAAAC-3'。取 1 μ g 绥农 10 号 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 25 μ L: 10 \times *Ex Taq* Buffer 2.5 μ L、10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 0.5 μ L、10 μ mol \cdot L⁻¹

引物 P1 1 μ L、10 μ mol \cdot L⁻¹ 引物 P2 1 μ L、DNA 1 μ g、*Ex-Taq* 0.13 μ L、ddH₂O 定容至 25 μ L。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。取 8 μ L PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并将纯化回收后的 PCR 产物连接 pMDTM18-T 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 转化重组质粒进行 PCR 检测、双酶切鉴定, 并测序。实验操作方法均参照《分子克隆实验指南》^[21]。

利用 Neural Network Promoter Prediction 在线软件预测 *GmPR10* 基因基础启动子; 利用 softberry 网站 (<http://www.softberry.com>) 中的 TSSP 软件, 并结合真核生物启动子序列基本特征, 推测可能的转录起始位点; 利用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 在线启动子预测工具分析 pGmPR10 序列内部顺式调控元件^[22-23]。

1.2.4 pBI121/pGmPR10/*GUS* 融合表达载体的构建 将测序序列正确的 pMDTM18-T/pGmPR10 重组质粒和 pBI121 植物表达载体分别用 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行双酶切, 胶回收 pGmPR10 片段和 pBI121 载体片段, 经 T4 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 转化重组质粒进行 PCR 检测、双酶切鉴定。

1.2.5 烟草遗传转化 将构建好的 pBI121/pGmPR10/*GUS* 融合表达载体利用冻融法转入根癌农杆菌 LBA4404 中, 并参照 Jefferson 等^[24]的方法进行烟草遗传转化。

1.2.6 *GUS* 组织化学染色 农杆菌侵染的烟草叶盘暗培养 3 d 后, 分别用 SA (0.5 mmol \cdot L⁻¹)、JA (100 μ mol \cdot L⁻¹)、ET (0.2% 的乙烯利)、ABA (100 mmol \cdot L⁻¹)、GA₃ (2 mmol \cdot L⁻¹)、NaCl (150 mmol \cdot L⁻¹)、PEG (8%)、IAA (10 μ mol \cdot L⁻¹) 和 4 $^{\circ}$ C 处理 4 h。用 H₂O 处理 4 h 的烟草叶盘为对照试验组。将处理后的烟草叶盘浸于含有 X-Gluc 的 *GUS* 染色液中, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中温育过夜, 然后取出并转入 95% 乙醇中脱色 3 次(除去叶绿素), 至未进行农杆菌侵染的烟草叶盘呈白色为止。*GUS* 组织化学染色试验设置 3 次重复, 每种处理染色 5 片叶盘, 用尼康 D700 相机对染色结果进行拍照, 并做记录。

2 结果与分析

2.1 *GmPR10* 基因启动子片段的克隆

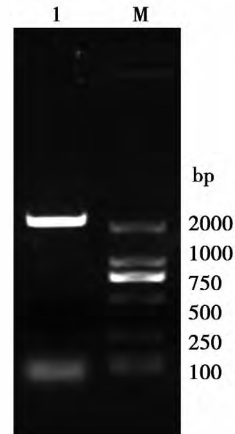
以绥农 10 号大豆叶片总 DNA 为模板, 结合设计好的 pGmPR10 引物 P1 和 P2, 经 PCR 扩增后得到长度稍大于 2 000 bp 的特异性目的片段, 与预期片段 2 235 bp 吻合(图 1)。胶回收特异性片段后, 构

建克隆载体 pMDTM18-T/pGmPR10 并测序,测序结果用来进行启动子顺式作用元件分析。

2.2 GmPR10 基因启动子顺式作用元件分析

测序结果表明,本试验利用 PCR 技术获得了大豆 GmPR10 基因翻译起始密码子 ATG 上游 2 235 bp 的启动子序列,并记录起始密码子 ATG 中的 A 为 +1 位。利用 Neural Network Promoter Prediction 在线软件预测 GmPR10 基因基础启动子,发现在 -397 ~ -446 bp 和 -81 ~ -130 bp(图 2) 存在基础启动子序列的可能性分别为 0.86 和 0.96(值越接近 1 可能性越大);利用 Softberry 网站(http://www.softberry.com) 中的 TSSP 软件,并结合真核生物启动子序列基本特征,推测出可能的转录起始位点是 -90 bp 处的 A。上游 -115 ~ -120 bp 位置含有 1 个 TATA-box^[25],即 RNA 聚合酶结合位点,它能够保证转录起始的准确性;-235 ~ -238 bp 位置含有 1 个 CAAT-box^[26],主要调控转录起始的频率(图 2)。以上结果表明,GmPR10 基因翻译起始密码子 ATG

上游 -90 ~ -238 bp 区段为核心启动子区域。



M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: PCR 产物。

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product.

图 1 pGmPR10 的 PCR 扩增
Fig. 1 Amplification of pGmPR10

```
-820 CTCTATGACGTTGGCTACATCAAATTAGGTGTTACTTGTATCTTTTCTCACTTTTCTTA
-760 TAGTACCAAATTTTATATAAATCTAATTCCTCATGGATTACCAGTAAATATGAATGA
      TATA-box   TATA-box
-700 TATGGCTTGGGTTTCTGTAATAAAAAAAAAAGACTCTAAGAAAAGTTAATTAAGGAAC
-640 CGATACAAAAATTTAAGGTCCCTAACATAGAACGCATGGTCACAAAAATTTGGGAAGACGA
-580 TATTTAGGTTTAGGACAAAACCTATCTAGCTAAAGGTTTAGGATAAAAAGTATCTAAAAA
-520 ATTTCTTACGGTAAAAAAGAAGAAGATAATCTAACTATTTTTTTTGGTTGTGAAAA
-460 TAACCTTAACTACTTAAAAACTCTAAAAAACTGTAGCTATACGTAATTAGCATCTCAT
-400 ATAATTTGAATTAATAAATGTTTCGAATGACTCTTGTCCAATATTACAAGTAAAGACAGTCAC
      CAAT-box
-340 ACCAAAAAATCATGAATGCCACGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACGCAAACCTATT
-280 TTCCTATCGAAGAGTATTTTACAAATACTTTTATTCTTCAAAACAATTTTGACGCCACCAA
      CAAT-box
-220 ATAATAATAGTCTATTGAGGAAAAGACCCCGGCAACTCAAATAAGTACTTCTTTACCTAAC
-160 CAGCAGAGTAGACTAGACCAGTGCATGCAGGCCAGTGCCTTATAAAAGCCTACCCTTTTCA
      TATA-box
-100 CATCTTAGAGACACACAACAACAATCAACACTAACATCTTCTCACAAACAGCATCACT
-40  AATCCTTTTCCTTGTGTTTATTTCCATCTTCCATTAATATGGGTGTTGTTACTCAGAT
      +1
+20  TTATGATACCCCTGCTGCTGTGCCTCCTACTAGGCTTTTC
```

斜体为 5'-UTR 区域; 黑体为转录起始位点和翻译起始位点; 阴影为 TATA-box 和 CAAT-box。

Italics region is 5'-UTR region; Bold are transcription initiation site and translation initiation site; Shadow are TATA-box and CAAT-box.

图 2 GmPR10 基因核心启动子区域

Fig. 2 Core promoter sequences of GmPR10

利用 PLACE 和 PlantCARE 在线启动子预测工具进一步分析 GmPR10 基因启动子序列发现,Gm-PR10 基因启动子序列中存在多个顺式作用元件(表 1)其中包括调控 GmPR10 基因组织器官特异性表达的作用元件^[27];光应答元件^[28];响应脱落酸信号的顺式作用元件^[26,29];响应细胞分裂素信号的蛋白结合位点^[30-31];响应生长素的蛋白结合因子^[32-33];响应水杨酸信号的顺式作用元件^[32,34];响应茉莉酸信号的识别序列^[35];低温应答元件^[36];响应干旱的 MYB、MYC 蛋白因子结合位点^[37-39];热激元件^[40]和 Cu²⁺ 应答元件^[41]等。

2.3 融合表达载体 PBI121-pGmPR10-GUS 的构建

将 22℃ 下过夜连接的产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,选取单克隆提取质粒,并进行 pGmPR10 特异引物 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳及双酶切检测后表明 pGmPR10 已成功连入 pBI121 载体中,图 3 为 pBI121-pGmPR10-GUS 重组质粒结构图。

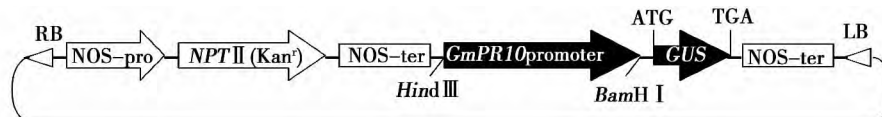
将融合表达载体质粒 pBI121-pGmPR10-GUS 转入农杆菌 LBA4404 感受态细胞中,以转化菌的单克隆质粒 DNA 为模板进行 pGmPR10 特异引物 PCR 检测,未转化农杆菌 LBA4404 为阴性对照。结果显

示 转化菌质粒 DNA 能特异的扩增出约 2 235 bp 大 成功转入农杆菌中。
小的片段 ,说明重组质粒 pBI121-p*GmPR10*-*GUS* 已

表 1 启动子区域顺式作用元件分析

Table 1 Cis-acting regulatory elements analysis of promoter sequences

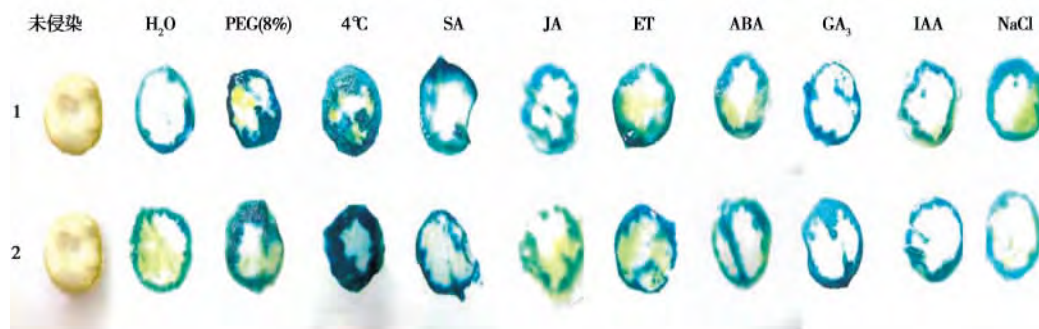
基序名称 Motif name	信号序列 Signal sequence	预测功能 Putative function	数量 Number	参考文献 References
ABRELATERD1	ACGTG	脱落酸顺式应答元件	2	[29]
ARR1AT	NGATT	细胞分裂素调节基因 ARR1 结合位点	11	[30]
ASF1MOTIFCAMV	TGACC	响应生长素或水杨酸信号的蛋白结合位点	1	[32]
CAATBOX1	CAAT	启动子、增强子区域普通顺式作用元件	13	[30]
CATATGGMSAUR	CATATG	生长素响应元件	1	[33]
CCAATBOX1	CCAAT	热激元件	5	[40]
CPBCSPOR	TATTAG	响应细胞分裂素信号的蛋白结合位点	1	[31]
CURECORECR	GTAC	铜应答元件	7	[26]
DPBFCORECDC3	ACACNNG	响应 ABA 的 bZIP 类转录因子结合位点	1	[27]
EBOX	CANNTG	存在于植物种子特异表达基因的启动子中	2	[42]
IBOX	GATAAG	光调控基因上游保守序列	1	[28]
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	低温应答元件	1	[36]
MARTBOX	TTWTWTWT	SAR 中的特殊元件	11	[28]
MYBIAT	WAACCA	与干旱诱导有关的 MYB 结合位点	1	[37]
MYBCOREATCYCBI	AACGG	MYB 核心序列	2	[38]
MYCSENSUSAT	CANNTG	MYC 识别位点或 ICE1 结合位点	2	[39]
T/GBOXATPIN2	AACGTG	受 JA 诱导的 bHLH 特别识别序列	1	[35]
TATABOX	TATA	转录起始 -30 核心启动子元件	7	[43]
WBOXATNPR1	TTGAC	SA 诱导的 WRKY 基因结合序列	3	[34]
WBOXNTERF3	TGACY	创伤诱导的 erf3 基因启动子序列中元件	4	[44]
WRKY7IOS	TGAC	W-box 的核心区域	8	[45]

图 3 pBI121-p*GmPR10*-*GUS* 重组质粒结构图Fig. 3 Construction of plant expression vector pBI121-p*GmPR10*-*GUS*

2.4 烟草叶盘遗传转化及 GUS 染色

通过农杆菌介导的方法转化烟草品种 Havana 425 叶盘 ,暗培养 3 d 后 ,进行植物激素和防御信号分子的诱导 ,利用 GUS 组织化学染色法检测 *GUS* 基因的瞬时表达强度 ,观察结果显示 ,作为对照 ,未进行任何胁迫诱导的烟草叶盘(H₂O)在边缘生长点处有较少蓝色;经过 PEG、4℃、SA、JA 和 ABA 处理的烟草叶盘与对照相比染色程度较深;ET 和 GA₃ 处理

的烟草叶盘与 PEG、4℃、SA、JA 和 ABA 处理的烟草叶盘相比染色程度稍浅 ,但与对照相比染色较深;而 IAA 和 NaCl 处理的烟草叶盘与对照相比染色程度无明显差别(图 4)。这些结果表明:本试验中克隆的 *GmPR10* 基因启动子有启动功能 ,且经过 PEG、4℃、SA、JA 和 ABA 处理后启动功能增强。试验设置 3 次重复 ,每种处理染色 5 片叶盘 ,染色结果基本一致。



1 和 2 分别为两次平行试验的结果。

1 and 2 are two replications.

图 4 p*GmPR10* 转基因烟草不同处理 GUS 植株组织化学检测Fig. 4 *GUS* gene expression of p*GmPR10* transgenic tobacco under different treatments

3 结论与讨论

真核生物基因的表达调控分为转录前调控、转录调控和转录后调控等。转录调控依赖于转录因子和顺式作用元件之间的相互作用来实现,是一个复杂的基因调控过程^[45]。当植物受到外界生物或非生物环境条件胁迫时,通过一系列的磷酸化反应等产生信号传递,可以激发转录因子的表达,转录因子能够特异性结合下游基因启动子序列中的顺式作用元件,调控下游相关胁迫响应基因的表达,从而使植物能够适应复杂多变的外界环境^[46]。

PR蛋白是在病原菌侵染后,受病原菌、真菌、病毒和类病毒等诱导生成的一类蛋白质,作为植物自我防御机制中的一个可诱导组分,PR基因不仅可受病原体(包括细菌、真菌、病毒)侵染所诱导表达,也受一些内源信号分子(如水杨酸、乙烯、赤霉素、茉莉酸、 H_2O_2)诱导表达^[47]。本课题组前期研究表明,*GmPR10*基因是在实验室构建的大豆抗病品种绥农10号受疫霉菌诱导后差异表达的cDNA消减文库中获得的,该基因受大豆疫霉菌诱导后高上调表达,同时受 GA_3 、 H_2O_2 、SA和ABA诱导表达^[19]。本研究选取*GmPR10*基因5'UTR上游2000bp的序列,并将这部分序列加上5'UTR的区域作为启动子序列进行了研究。利用生物信息学分析手段,对启动子进行了结构预测,发现*GmPR10*基因启动子序列中存在响应水杨酸、茉莉酸、细胞分裂素和脱落酸等激素的多个顺式作用元件,因此推测,在环境胁迫下,大豆各种内源激素含量的变化可能会通过启动子区域上的这些顺式作用元件影响*GmPR10*基因在转录水平上的表达,进而通过水杨酸和茉莉酸所介导的信号路径调控大豆的防御进程。

目前,大豆中关于诱导型启动子的鉴定和分析的报道还比较少。Chai等^[48]研究发现大豆*GmaP-PO12*基因受大豆疫霉菌诱导表达,进一步分析发现*GmaPPO12*基因启动子区域中含有多个抗病相关的转录因子结合元件,同时,烟草叶片瞬时转化后GUS染色结果表明*GmaPPO12*基因启动子活性强于大豆*GmaPR1a*基因启动子活性。本研究中GUS染色结果进一步表明,经过PEG、4℃、SA、JA和ABA处理的烟草叶盘染色程度较深,ET和 GA_3 处理的烟草叶盘染色程度稍浅,且均比对照染色深,这说明克隆的*GmPR10*基因启动子有启动功能,且经过PEG、4℃、SA、JA和ABA处理后启动功能增强。外源SA和JA可以增强*GmPR10*基因启动子驱动的GUS活性,也说明*GmPR10*基因介导的大豆疫霉根腐病抗性可能依赖于SA和JA信号通路,但具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] van Loon L C, Van Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999, 55: 85-97.
- [2] van Loon L C, Rep M, Pieterse C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 135-162.
- [3] Czermic P, Huang H C, Marco Y. Characterization of *hsr201* and *hsr515*, two tobacco genes preferentially expressed during the hypersensitive reaction provoked by phytopathogenic bacteria[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 31(2): 255-265.
- [4] Lim S, Borza T, Peters R D, et al. Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 93: 207-223.
- [5] Bashir Z, Ahmad A, Shafique S, et al. Hypersensitive response—A biophysical phenomenon of producers[J]. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2013, 3(2): 105-110.
- [6] van Loon L C, Pierpoint W S, Boller T. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1994, 12(3): 245-264.
- [7] Woloshuk C P, Meulenhof V J S, Sela-Buurlage M, et al. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*[J]. *Plant Cell*, 1991, 3: 619-628.
- [8] Sela-Buurlage M B, Ponstein A S, Bres-Vloemans S A, et al. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity[J]. *Plant Physiology*, 1993, 101: 857-863.
- [9] Dempsey D A, Shah J, Klessig D F. Salicylic acid and disease resistance in plants[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1999, 18: 547-575.
- [10] Pieterse C M, van Loon L C. Salicylic acid-independent plant defense pathways[J]. *Trends in Plant Science*, 1999, 4: 52-58.
- [11] Jun-Jun L, Abul K M, Ekramoddoullah. Root-specific expression of a western white pine *PR10* gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52: 103-120.
- [12] Chen Z Y, Brown R L, Rajasekaran K, et al. Identification of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production[J]. *Phytopathology*, 2006, 96(1): 87-95.
- [13] Rakwal R, Agrawal G K, Yonekura M. Light-dependent induction of *OsPR10* in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by the global stress signaling molecule jasmonic acid and protein phosphatase 2A inhibitors[J]. *Plant Science*, 2001, 161: 469-479.
- [14] Ryu H S, Han M, Lee S K, et al. A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 836-847.
- [15] Hwang S, Lee I A, Yie S W, et al. Identification of an *OsPR10a* promoter region responsive to salicylic acid[J]. *Planta*, 2008, 227(5): 1141-1150.
- [16] Malnoy M, Venisse J S, Reynoird J P, et al. Activation of three pathogen-inducible promoters of tobacco in transgenic pear (*Pyrus communis* L.) after abiotic and biotic elicitation[J]. *Planta*,

- 2003 ,216: 802-814.
- [17] Hong J K , Lee S C , Hwang B K. Activation of pepper basic *PR-1* gene promoter during defense signaling to pathogen , abiotic and environmental stresses[J]. *Gene* ,2005 ,356: 169-180.
- [18] Li Y F , Zhu R , Xu P. Activation of the gene promoter of barley β -1 β -glucanase isoenzyme GHI is salicylic acid (SA)-dependent in transgenic rice plants[J]. *Journal of Plant Research* ,2005 ,118: 215-221.
- [19] Xu P F , Jiang L Y , Wu J J , et al. Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 10 gene (*GmPR10*) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae* [J]. *Molecular Biology Reporter* ,2014 ,41(8) : 4899-4909.
- [20] 张伟 ,谢甫缙 ,曹萍 ,等. 大豆叶片 DNA 提取方法的比较[J]. *大豆科学* ,2007 ,26(1) : 60-65. (Zhang W ,Xie F T ,Cao P. Comparative studies on extraction of genome DNA from soybean leaf[J]. *Soybean Science* ,2007 ,26(1) : 60-65.)
- [21] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*: 2 ed[M]. Beijing: Science Press ,2002.
- [22] Higo K ,Ugawa Y ,Iwamoto M. Plant cis-acting regulatory DNA elements(PLACE) database [J]. *Nucleic Acids Research* ,1999 ,27(1) : 297-300.
- [23] Prestridge D S. Signal scan: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements [J]. *Computer Applications in the Biosciences* ,1997 ,7: 203-206.
- [24] 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 Journal* ,1987 ,6: 3901-3907.
- [25] Grace M L ,Chandrasekharan M B ,Hall T C , et al. Sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation from the beta-phaseolin promoter [J]. *Journal of Biological Chemistry* ,2004 ,279: 8102-8110.
- [26] Shirsat A ,Wilford N ,Croy R , et al. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco [J]. *Molecular and General Genetics* ,1989 ,215: 326-331.
- [27] Hartmann U ,Sagasser M ,Mehrtens F , et al. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB ,BZIP , and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes [J]. *Plant Molecular Biology* ,2005 ,57: 155-171.
- [28] Rose A ,Meier I ,Wienand U. The tamato I-box binding factor Le-MYBI is a member of a novel class of Myb-like proteins [J]. *Plant Journal* ,1999 ,20: 641-652.
- [29] Nakashima K ,Fujita Y ,Katsura K , et al. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds ,germinating embryos , and seedlings of *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology* ,2006 ,60: 51-68.
- [30] Ross E J ,Stone J M ,Elowsky C G , et al. Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor ,ARR1 [J]. *Journal of Experimental Botany* ,2004 ,55: 1721-1731.
- [31] Fusada N ,Masuda T ,Kuroda H , et al. Identification of a novel cis-element exhibiting cytokinin-dependent protein binding *in vitro* in the 5'-region of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase gene in cucumber [J]. *Plant Molecular Biology* ,2005 ,59: 631-645.
- [32] Redman J ,Whitcraft J ,Johnson C , et al. Abiotic and biotic stress differentially stimulate as-1 element activity in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports* ,2002 ,21: 180-185.
- [33] Xu N ,Hagen G ,Guilfoyle T. Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter [J]. *Plant Science* ,1997 ,126: 193-201.
- [34] Yu D ,Chen C ,Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression [J]. *Plant Cell* ,2001 ,13: 1527-1540.
- [35] Boter M ,Ruiz-Rivero O ,Abdeen A , et al. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis* [J]. *Genes & Development* ,2004 ,18: 1577-1591.
- [36] Dunn M A ,White A J ,Vural S , et al. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*bt4.9*) from barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Plant Molecular Biology* ,1998 ,38: 551-564.
- [37] Abe H ,Urao T ,Ito T , et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell* ,2003 ,15: 63-78.
- [38] Planchais S ,Perennes C ,Glab N , et al. Characterization of cis-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arath*; *CycB1*; 1 transcription and identification of putative regulatory proteins [J]. *Plant Molecular Biology* ,2002 ,50: 111-127.
- [39] Ericson M L ,Muren E ,Gustavsson H O , et al. Analysis of the promoter region of napin genes from *Brassica napus* demonstrates binding of nuclear protein *in vitro* to a conserved sequence motif [J]. *European Journal of Biochemistry* ,1991 ,197: 741-746.
- [40] Wenkel S ,Turck F ,Singer K , et al. CONSTANS and the CCAAT Box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell* ,2006 ,18: 2971-2984.
- [41] Kropat J ,Totter S ,Birkenbihl R P , et al. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ,2005 ,102: 18730-18735.
- [42] Hartmann U ,Sagasser M ,Mehrtens F , et al. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB ,BZIP , and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes [J]. *Plant Molecular Biology* ,2005 ,57: 155-171.
- [43] Nishiuchi T ,Shinshi H ,Suzuki K. Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression [J]. *Journal of Biological Chemistry* ,2004 ,279: 55355-55361.
- [44] Zhang Z L ,Xie Z ,Zou X , et al. A rice *WRKY* gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. *Plant Physiology* ,2004 ,134: 1500-1513.
- [45] Valerie R ,Michael K ,Peter O. Transcriptional regulation of gene expression in *C. elegans* [J]. *WormBook* ,2013 ,4(6) : 1-34.
- [46] Lee T I ,Young R A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease [J]. *Cell* ,2013 ,152(6) : 1237-1251.
- [47] Dong X. SA ,JA ,ethylene and disease resistance in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology* ,1998 ,(1) : 316-323.
- [48] Chai C Y ,Lin Y L ,Shen D Y , et al. Identification and functional characterization of the soybean *GmaPPO12* promoter conferring *Phytophthora sojae* induced expression [J]. *PLoS One* ,2013 ,6(8) : e67670.