

李 杰, 雒雅婧, 张 爽, 等. 杨树木质部特异启动子诱导活性分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 63–67.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.016

# 杨树木质部特异启动子诱导活性分析

李 杰<sup>1</sup>, 雒雅婧<sup>1</sup>, 张 爽<sup>1,2</sup>, 杜克久<sup>1,2</sup>

(1. 河北农业大学林学院, 河北保定 071000; 2. 河北林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北保定 071000)

**摘要:**以融合 pMDCesAP-GUS、pJCesAP-GUS、pDMDCesAP-GUS 的转基因杨树作为试验材料, 分别对其根、茎、叶进行创伤及 ABA (脱落酸) 激素诱导处理, 通过定量检测转基因杨树不同器官的 GUS 酶活性, 分析不同启动子对创伤及 ABA 激素诱导的响应情况。结果表明, 创伤处理转基因杨树 12 h 时, pMDCesAP 杨树根的 GUS 酶活力达到最高点。ABA 激素处理转基因杨树, pBI121 在根、叶中的 GUS 酶活力的趋势是先升高后降低; 处理 3 h 时, GUS 酶活力最高; pBI121 的茎在 ABA 激素处理前 GUS 酶活力是最高的; pMDCesAP 的根、茎在 ABA 激素处理前 GUS 酶活力处于最大值。

**关键词:**杨树; 木质部特异启动子; 创伤诱导; 脱落酸诱导; GUS 活性

**中图分类号:** S718.46 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0063-05

启动子是直接调控基因特异性表达的重要元件, 它驱动基因表达, 并决定基因表达的强度、时间和空间等特异性。由于组成型启动子驱动的基因在植物不同组织器官中均有不同程度的表达, 应用中逐渐暴露出导致转基因植株较野生型植株生长缓慢、植株矮矮、产量下降等问题, 因此研究和利用组织器官特异性启动子和诱导型启动子具有非常重要的意义。

笔者所在实验室前期分别从 3 倍体毛白杨-93 (*Populus tomentosa* Carr. -“93”)、加杨-1 (*Populus canadensis* Moench. -“1”) 中分离了具有木质部组织特异性的 MDCesAP 启动子和 JCesAP 启动子<sup>[1]</sup>。通过生物信息学分析表明, 2 个启动子序列均含有与损伤防御有关的顺式作用元件, 还有大量其他与激素、水分等诱导有关的调控元件<sup>[2]</sup>。本试验以融合 pMDCesAP-GUS、pJCesAP-GUS、pDMDCesAP-GUS 的转基因杨树作为试验材料, 分别对其根、茎、叶进行创伤及 ABA (脱落酸, abscisic acid) 处理, 通过定量检测转基因杨树不同器官的 GUS 酶活性, 分析不同启动子对创伤及 ABA 诱导的响应情况, 从而为进一步分析启动子中决定组织特异性及诱导性的调控元件奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

前期已通过农杆菌介导法将 3 个笔者所在实验室构建的植物表达载体 pMDCesAP-GUS (含 MDCesAP 启动子-GUS 融合基因)、pJCesAP-GUS (含 JCesAP 启动子-GUS 融合基因)、pDMDCesAP-GUS (含 2 个串联 MDCesAP 启动子-GUS

融合基因) 的转基因毛白杨作为试验材料; 同时将转入 pBI121 (含 35S 启动子-GUS 报告基因) 的毛白杨作为阳性对照, 转入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1 的毛白杨作为阴性对照, 未转基因的毛白杨组培苗为 CK。

### 1.2 材料处理

**创伤处理:**无菌水清洗以上杨树组培苗, 用滤纸吸干表面水分, 用剪刀将根剪成长 1.5 cm 的小段 (除尽根部组织培养基); 采用镊子对杨树苗茎段部分造成机械创伤; 用剪刀将叶片剪下, 剪掉叶脉, 留下纯叶片, 剪成 1 cm × 1 cm 的小块。每种样品的不同部位分别称质量 0.1 g, 放入 1.5 mL 的离心管, 25 ℃ 光照条件下分别处理 0、3、6、12、24 h。

**ABA 激素诱导处理:**将以上杨树苗按照创伤处理的方法进行处理, 于 1.5 mL 离心管中加入 3 倍体积的 1 mmol/L 的 ABA 将其浸泡。

### 1.3 转基因杨树 GUS 报告基因荧光定量检测

取转基因植株根、茎、叶, 每份样品取 0.1 g, 加入 3 倍体积的 GUS 提取缓冲液, 研磨成粉末, 于 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min, 取上清液, 加入 2 mmol/L 的 GUS 反应底物 4-MUG, 迅速充分混匀后, 用 0.2 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应。利用 RF-5301PC 荧光仪, 激发波长 365 nm, 发射波长 455 nm, 测定蛋白含量, 以 1 min 水解 4-MUG 生成 1 nmol/L 4-MU 的酶量为 1 个酶活力单位 (U), 以每 mg 蛋白的酶活力表示 GUS 活性 (U/mg), 各试验重复 3 次, 取平均值<sup>[3-5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 创伤诱导处理转基因杨树的特异性表达分析

**2.1.1 同一启动子在相同处理时间不同组织器官的酶活性变化** 由图 1-A 可知, 创伤处理 0 h 时, 在根中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 70.9%、48.7% 和 0.7%, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。在茎中, pJCesAP 的 GUS 活性很强, 比阳性对照 pBI121 增加了 52.2%; pMDCesAP、pDMDCesAP 的 GUS 活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的

收稿日期: 2015-01-26

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31000305)。

作者简介: 李 杰 (1989—), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 研究方向为森林有害生物综合治理。E-mail: ljljiej8436@163.com。

通信作者: 张 爽, 博士, 副教授, 研究方向为林木抗虫基因工程, E-mail: zhshsuqq@126.com; 杜克久, 博士, 教授, 研究方向为植物抗逆生理与生物修复, E-mail: dukejiu@yahoo.com.cn。

64.1% 和 59.0%, 且 pJCesAP 与 pMDCesAP 和 pDMDCesAP 有显著差异, pMDCesAP 和 pDMDCesAP 之间的差异不显著。在叶中, pMDCesAP 和 pDMDCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 1.78 倍和 2.43 倍; pJCesAP 的 GUS 活性很

弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 57.9%; pMDCesAP 与 pDMDCesAP 和 pJCesAP 有显著差异, pJCesAP 与阳性对照 pBI121 之间没有显著差异。

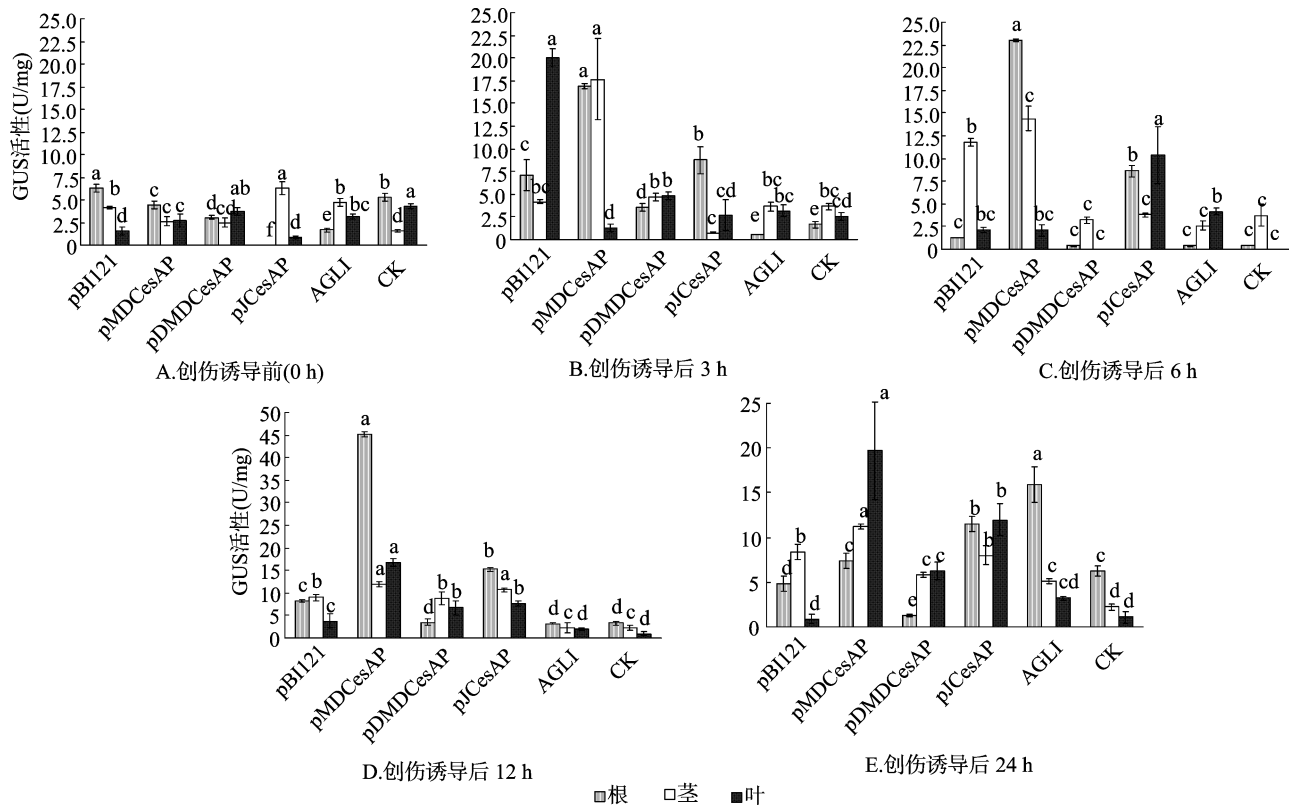


图1 创伤诱导下不同启动子在转基因植株中各器官的 GUS 活性定量分析

由图 1-B 可知, 创伤处理 3 h 时, 在根中, pMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 2.39 倍和 1.24 倍; pDMDCesAP 的活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 50.9%, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。在茎中, pJCesAP 的 GUS 活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 18.5%, pMDCesAP、pDMDCesAP 的活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 4.22 和 1.1 倍, pMDCesAP 与 pDMDCesAP 和 pJCesAP 有显著差异, pDMDCesAP 和 pJCesAP 与阳性对照 pBI121 之间无显著差异。在叶中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性均很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 6.4%、23.9% 和 13.2%, pDMDCesAP 与 pMDCesAP 和 pJCesAP 有显著差异, pMDCesAP 和 pJCesAP 之间没有显著差异。

由图 1-C 可知, 创伤处理 6 h 时, 在根中, pMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 17.70 倍和 6.63 倍; pDMDCesAP 的活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 2.9%, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 之间有显著差异性, pDMDCesAP 与阳性对照 pBI121 没有显著差异。在茎中, pMDCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 1.22 倍, pDMDCesAP 和 pJCesAP 的活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 27.4% 和 32.1%; pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 有显著差异性, pDMDCesAP 和 pJCesAP 没有显著差异。在叶中, pJCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 4.91 倍, pMDCesAP 的 GUS 活性变化不大, pDMDCesAP 的活性很

弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 14.2%; pJCesAP 与 pMDCesAP 和 pDMDCesAP 有显著差异, pMDCesAP 与 pJCesAP 之间有差异性, 与阳性对照 pBI121 之间差异不明显, pDMDCesAP 与 pJCesAP 有显著差异, 与阳性对照 pBI121 和 pMDCesAP 没有显著差异。

由图 1-D 可知, 在根中, 创伤处理 12 h 时, pMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 5.53 倍和 1.86 倍, 而 pDMDCesAP 的活性则为阳性对照 pBI121 的 42.8%; pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性。在茎中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性变化不明显; pMDCesAP 和 pJCesAP 之间没有显著差异, 但与 pDMDCesAP 有显著差异; pDMDCesAP 与阳性对照 pBI121 也没有显著差异。在叶中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性均在增加, 为阳性对照 pBI121 的 4.42 倍、1.78 倍和 2.04 倍; pDMDCesAP 和 pJCesAP 之间没有显著差异, 但均与 pMDCesAP 有显著差异。

由图 1-E 可知, 在根中, 创伤处理 24 h 时, pMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性在增加, 是阳性对照 pBI121 的 1.52 倍和 2.37 倍; pDMDCesAP 的活性在减少, 为阳性对照 pBI121 的 26.3%, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。在茎中, pMDCesAP 的 GUS 活性比阳性对照 pBI121 增加了 33.4%; pDMDCesAP 和 pJCesAP 的活性在减少, 为阳性对照 pBI121 的 69.0% 和 95.3%; pMDCesAP、

pMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性, pJCesAP 与阳性对照 pBI121 没有显著差异。在叶中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很强, 是阳性对照 pBI121 的 21.9 倍、6.9 倍和 13.3 倍; pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性。

**2.1.2 不同启动子的相同器官随处理时间不同的酶活性变化** 将各转基因杨树的根部做创伤诱导处理, 结果见图 2 - A。pBI121 随处理时间的增加, GUS 酶活力在创伤处理 6 h 时处于低谷; pMDCesAP 随处理时间的增加, GUS 酶活力呈先增加后降低的趋势, 在创伤处理 12 h 时, GUS 酶活力最高, 是处理 0 h 时最低酶活力的 10.15 倍; pDMDCesAP 随处理时间的增加, GUS 酶活力总体变化不大, 在创伤处理 6 h 时达到低谷; pJCesAP 随处理时间的增加, GUS 酶活力整体呈增加趋势, 处理 12 h 时的 GUS 酶活力达到峰值; AGLI 随处理时间的增加, GUS 酶活在创伤处理 24 h 达到峰值; CK 随处理时间的增加, GUS 酶活力增长不明显, 在创伤处理 6 h 时达到低谷。

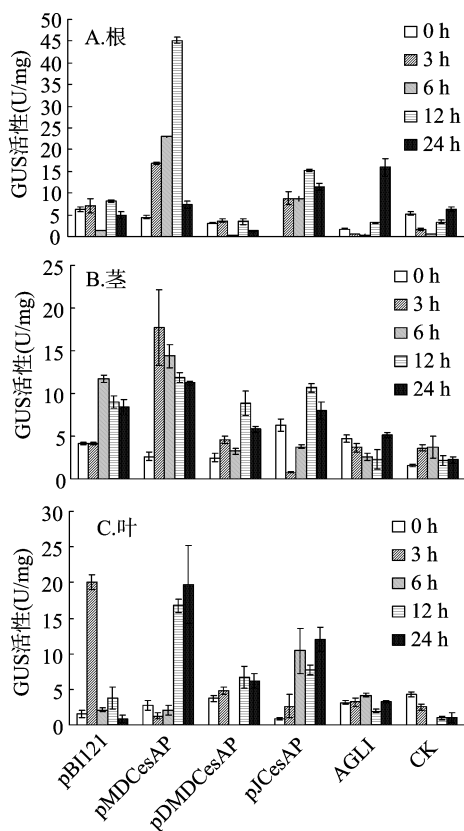


图2 创伤诱导下不同启动子在转基因植株同一器官中的GUS活性定量分析

将各转基因杨树的茎部做创伤诱导处理, 结果见图 2 - B。pBI121 随处理时间的增加, GUS 酶活力呈先增加后降低的趋势, 在创伤处理 3 h 时处于峰值, 是处理 0 h 时最低酶活力的 2.85 倍; pMDCesAP 随处理时间的增加, GUS 酶活力呈先增加后降低的趋势, 在创伤处理 6 h 时 GUS 酶活力最高, 是处理 0 h 时最低酶活力的 6.7 倍; pDMDCesAP 随处理时间的增加, 在创伤处理 12 h 时达到峰值; pJCesAP 随处理时间的增加, GUS 酶活力基本呈先降低后增加的趋势, 创伤处理 12 h 时的 GUS 酶活力达到峰值; AGLI 随处理时间的增加, GUS 酶

活力呈先降低后增加的趋势, 在创伤处理 24 h 时达到峰值; CK 随处理时间的增加, GUS 酶活力整体增长不明显, 在处理 0 h 时达到低谷。

将各转基因杨树的叶部做创伤诱导处理, 结果见图 2 - C。pBI121 随处理时间的增加, GUS 酶活力总体呈先增加后降低的趋势, 在创伤处理 3 h 时达到峰值, 是处理 24 h 时最低酶活力的 22.3 倍; pMDCesAP 随处理时间的增加, GUS 酶活力呈先降低后增加的趋势, 在创伤处理 24 h 时 GUS 酶活力最高, 是处理 3 h 时最低酶活力的 15.4 倍; pDMDCesAP 随处理时间的增加, 创伤处理 6 h 时达到低谷; pJCesAP 随处理时间的增加, GUS 酶活力基本呈增加趋势, 处理 24 h 时的 GUS 酶活力达到峰值; AGLI 随处理时间的增加, GUS 酶活力增长不明显; CK 随处理时间的增加, 在处理 6 h 时基因基本处于沉默状态。

## 2.2 ABA 激素诱导各转基因杨树的特异性表达分析

**2.2.1 同一启动子相同处理时间在不同组织器官的酶活性变化** 由图 3 - A 可知, ABA 诱导处理 0 h 时, 在根中, pMDCesAP、pDMDCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 4.75 倍和 2.75 倍; pJCesAP 的 GUS 活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 15.2%, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。在茎中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的活性均很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 14.0%、16.1% 和 9.0%, pMDCesAP 与 pJCesAP 有显著差异, pMDCesAP 与 pDMDCesAP、pJCesAP 之间没有显著差异。在叶中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的活性均很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 0.2%、55.5% 和 21.3%, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性。

由图 3 - B 可知, ABA 诱导处理 3 h 时, 在根中, pMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 1.20 倍和 2.12 倍; pDMDCesAP 的活性很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 13.1%, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 有显著差异性 ( $P < 0.05$ ), pMDCesAP 与阳性对照 pBI121 无显著差异。在茎中, pMDCesAP 的 GUS 活性与阳性对照 pBI121 的变化不大, pDMDCesAP、pJCesAP 的活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 4.68 倍和 6.57 倍, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异 ( $P < 0.05$ ), pMDCesAP 与阳性对照 pBI121 之间无显著差异。在叶中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性均很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 10.3%、9.9% 和 11.7%, pDMDCesAP、pMDCesAP 和 pJCesAP 之间没有显著差异。

由图 3 - C 可知, ABA 诱导处理 6 h 时, 在根中, pMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很强, 为阳性对照 pBI121 的 1.22 倍和 2.23 倍; pDMDCesAP 的活性与阳性对照 pBI121 的活性相差不大, pJCesAP 与 pMDCesAP、pDMDCesAP 之间有显著差异性 ( $P < 0.05$ ), pMDCesAP 与 pDMDCesAP 没有显著差异。在茎中, pMDCesAP 的 GUS 活性在减少, 为阳性对照 pBI121 的 51.8%, pDMDCesAP 和 pJCesAP 的活性在增加, 是阳性对照 pBI121 的 1.43 倍和 3.51 倍, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性 ( $P < 0.05$ ), pMDCesAP、pDMDCesAP 与 pJCesAP 没有显著差异。在叶中, pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP GUS 活性均很弱, 仅为阳性对照 pBI121 的 15.2%、18.1% 和 19.7%, pMDCesAP、pDMDCesAP

sAP、pJCesAP 与阳性对照 pBI121 有显著差异 ( $P < 0.05$ )；pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间差异不显著。

由图 3-D 可知,ABA 诱导处理 12 h 时,在根中,pMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性很强,为阳性对照 pBI121 的 3.52 倍和 5.91 倍,而 pDMDCesAP 的活性仅为阳性对照 pBI121 的 49.8%,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著性差异 ( $P < 0.05$ )；pDMDCesAP 和 pJCesAP 之间没有显著差异。在茎中,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性均减少,为阳性对照 pBI121 的 14.0%、31.7% 和 57.8%,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异。在叶中,pJCesAP 的活性在增加,是阳性对照 pBI121 的 1.33 倍;pMDCesAP 和 pDMDCesAP 的 GUS 活性在减少,为阳性对照 pBI121 的 4.4% 和 81.9%,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。

由图 3-E 可知,ABA 诱导处理 24 h 时,在根中,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性均在增加,是阳性对照 pBI121 的 2.99 倍、3.02 倍和 1.28 倍;pJCesAP 与 pMDCesAP 和 pDMDCesAP 之间有显著差异性,pMDCesAP 和 pDMDCesAP 没有显著差异,pJCesAP 与阳性对照 pBI121 之间也没有显著差异。在茎中,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性均为增加,是阳性对照 pBI121 的 1.21 倍、1.75 倍和 2.12 倍;pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性,pMDCesAP 与阳性对照 pBI121 之间没有显著差异。在叶中,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 的 GUS 活性均很强,是阳性对照 pBI121 的 6.19 倍、3.41 倍和 1.91 倍,pMDCesAP、pDMDCesAP 和 pJCesAP 相互间有显著差异性。

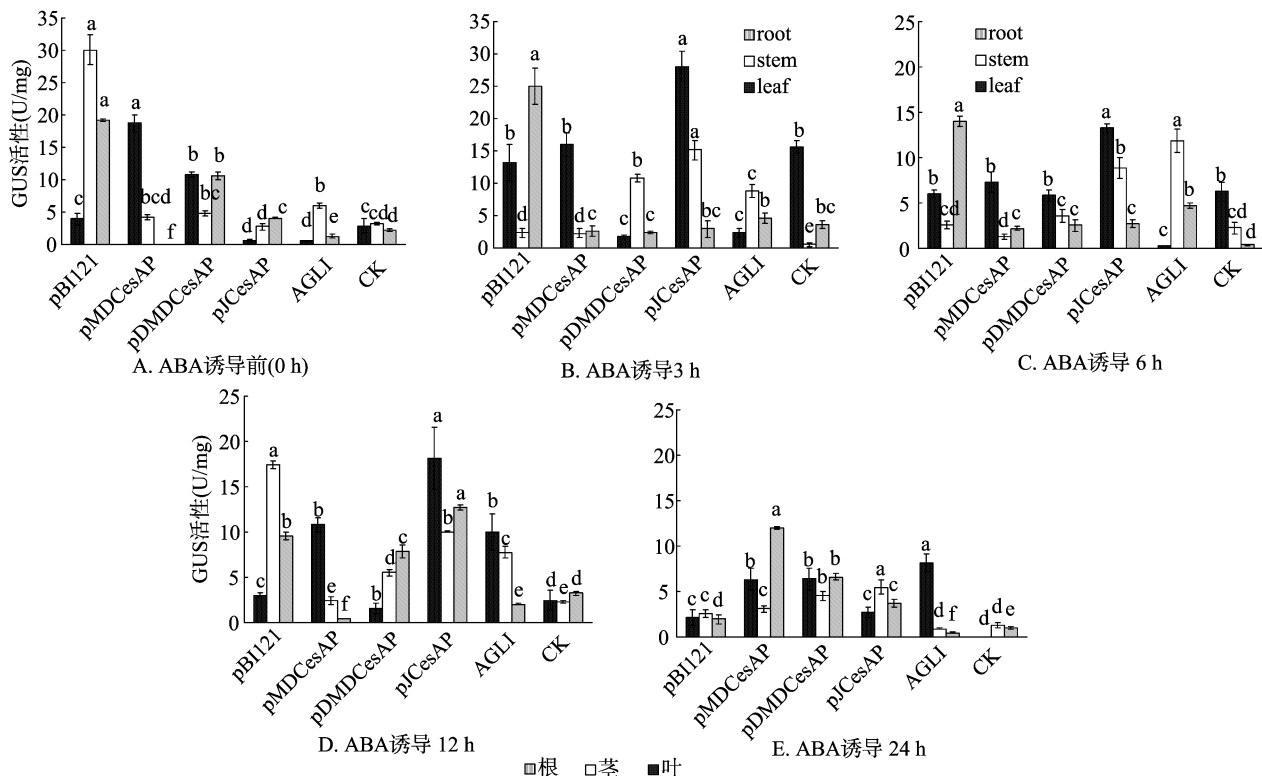


图3 ABA 诱导下不同启动子在转基因植株中各器官的GUS活性定量分析

2.2.2 不同启动子的相同器官随处理时间不同的酶活性变化 将各转基因杨树的根部做 ABA 诱导处理,结果(图 4-A)表明,pBI121 随处理时间的增加,GUS 酶活力呈先增加后降低的趋势,在 ABA 处理 3 h 时 GUS 酶活力达到高峰,是处于低谷的处理 24 h 时的 6.29 倍;pMDCesAP 随处理时间的增加,GUS 酶活力总体上呈降低的趋势,ABA 处理 0 h 时 GUS 酶活力最高,是处理 24 h 时最低酶活力的 2.97 倍;pDMDCesAP 随处理时间的增加,GUS 酶活力在 ABA 处理 0 h 时达到顶峰,处理 12 h 时达到低谷;pJCesAP 随处理时间的增加,GUS 酶活力相对于处理 0 h 时均是增加的,在 ABA 处理 3 h 时,GUS 酶活力达到峰值,是处理 0 h 酶活力的 46.8 倍;AGLI 随处理时间的增加,GUS 酶活力在 ABA 处理 12 h 达到峰值;CK 随处理时间的增加,GUS 酶活力呈先增加后降低的趋势,在

处理 6 h 时达到峰值,处理 24 h 时到达低谷。

将各转基因杨树的茎部做 ABA 诱导处理,结果(图 4-B)表明,pBI121 随处理时间的增加,GUS 酶活力呈先降低后增加再降低的趋势,在 ABA 处理 0 h 时 GUS 酶活力达到高峰,处理 3、6、24 h 时 GUS 酶活力相差不大且均很低,在处理 12 h 时 GUS 酶活力却增加了;pMDCesAP 随处理时间的增加,GUS 酶活力总体上没有发生大的变化,ABA 处理 0 h 相对较高;pDMDCesAP 随处理的增加,GUS 酶活力总体上呈先增加后降低的趋势,在 ABA 处理 3 h 时达到高峰,是处理 6 h 的 2.98 倍;pJCesAP 随处理时间的增加,GUS 酶活力总体呈先增加后降低的趋势,在 ABA 处理 3 h 时达到高峰,是处理 0 h 时酶活力低谷的 5.6 倍;AGLI 随处理时间的增加,GUS 酶活力在 ABA 处理 12 h 达到峰值;CK 随处理时间的增加,GUS 酶活力

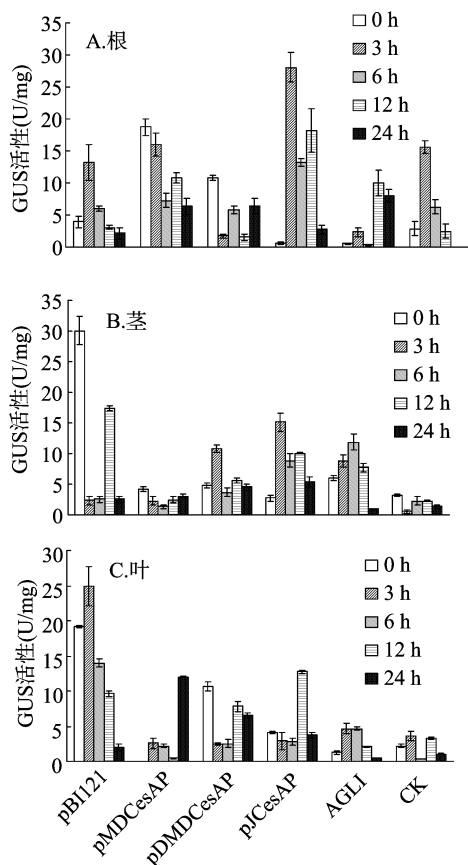


图4 不同启动子在转基因植株同一器官中的 GUS 活性定量分析

总体呈先降低后增加的趋势,在处理 3 h 时达到最低谷。

将各转基因杨树的叶部做 ABA 诱导处理,结果(图 4 - C)表明,pBI121 随处理时间的增加,GUS 酶活力呈先增加再降低的趋势,在 ABA 处理 3 h 时达到高峰,在处理 24 h 时处于低谷;pMDCesAP 随处理时间的增加,GUS 酶活力总体上呈增加的趋势,ABA 处理 24 h 达到高点;pDMDCesAP 随处理的增加,GUS 酶活力总体上呈先降低后增加的趋势,在 ABA 处理 0 h 时达到高峰,是处理 3 h 时活力低谷的 4.3 倍;pJCesAP 随处理时间的增加,在 ABA 处理 12 h 时 GUS 酶活力达到高峰;AGLI 随处理时间的增加,GUS 酶活呈先增加后降低的趋势;CK 随处理时间的增加,ABA 处理 3 h 时 GUS 酶活力处于高峰,处理 6 h 时达到最低谷。

### 3 讨论与结论

笔者所在实验室前期分离的 MDCesAP 启动子、JCesAP 启动子以及经过改造的 DMDCesAP 复合启动子经功能检测均具有木质部组织特异性。通过生物信息学分析表明,3 个启动子序列均含有与损伤防御有关的顺式作用元件,还有大量其他与激素、水分等诱导有关的调控元件。为了研究三者是否同时具有响应伤害及 ABA 处理的诱导启动子特性,进行了相关试验。结果表明:在创伤处理 3 h 后,pMDCesAP 根部的 GUS 酶活力均大于阳性对照 pBI121 根部的 GUS 酶活力,尤其在处理 6 h 时,GUS 酶活力为阳性对照 pBI121 的 17.7 倍;pMDCesAP 茎部的 GUS 酶活力自创伤处理 3 h 后,与阳性对照 pBI121 相比也表现出较高的活性;但在创伤处理 24 h

时,pMDCesAP 叶部的 GUS 酶活力明显升高,并高于根及茎中的 GUS 酶活力。由此可见,MDCesAP 在创伤处理后 3 ~ 12 h 之间,表现出明显的木质部组织特异性及创伤诱导活性。创伤处理下 pDMDCesAP 的 GUS 酶活性变化规律不明显。在创伤处理 0 h 时,pJCesAP 在茎中的 GUS 酶活性很强,比阳性对照 pBI121 增加了 52.2%,但随处理时间的增加,GUS 酶活力基本呈先降低后增加的趋势,创伤处理 12 h 时的 GUS 酶活力达到峰值,且仅在处理 0、3 h 表现出木质部组织特异性。另外,3 个启动子在创伤处理 24 h 时,组织特异性表现均不明显,但 pMDCesAP、pJCesAP 在根、茎、叶中的 GUS 酶活力均大于阳性对照 pBI121 相应部位的 GUS 酶活力。

在 ABA 处理试验中,处理 0 ~ 24 h 后,pMDCesAP 根部的 GUS 酶活力均大于阳性对照 pBI121 根部的 GUS 酶活力,尤其在处理 0 h 时,GUS 酶活力为阳性对照 pBI121 的 4.75 倍。由此可见,MDCesAP 在 ABA 处理后,均表现出明显的木质部组织特异性及创伤诱导活性。ABA 处理下,pDMDCesAP 的 GUS 酶活性在 0 h 最强,是阳性对照 pBI121 的 2.75 倍,随后呈现下降、增加、下降、增加的规律性变化。ABA 处理 3 ~ 12 h 时,pJCesAP 在根中的 GUS 酶活力均高于阳性对照 pBI121,在 3、6 h 时,茎中的 GUS 酶活力也高于阳性对照 pBI121,且表现出木质部组织特异性。另外,3 个启动子在创伤处理 24 h 时,组织特异性表现均不明显,但在根、茎、叶中的 GUS 酶活力均大于阳性对照 pBI121 相应部位的 GUS 酶活力。

植物诱导抗性是新兴的抗病虫害策略,在病虫害防治中有着广阔的应用前景,日益受到人们的关注。组织特异性及诱导型启动子调控抗性基因的表达策略已成为植物抗性基因工程育种研究中的一大热点<sup>[6]</sup>。但是天然的特异型启动子大多表达水平不高,不能满足人们的多种需要。因此,对现有的天然启动子进行人工改造,利用不同种类启动子中特异性顺式调控元件及增强子序列去构建高活性的、同时受多种因素调控的复合式启动子将是一个十分重要的解决问题途径。本试验结果说明,在启动子中,决定组织特异性相关的顺式作用元件与决定诱导特性的其他顺式作用元件既可以共同协助,又可以互相抑制,从而调节目的基因在特定的时间、空间及一定环境条件下表达,其具体的作用模式有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 张爽,武会,杜克久,等. 几个杨树木质部特异启动子的分离与序列分析[J]. 蚕业科学,2009,35(2):219-222.
- [2] Wu H,Zhang S,Wang Z G,et al. Cis-acting elements analysis and function detection of xylem specific promoter from populus[J]. Frontiers of Agriculture in China,2010,4(2):226-231.
- [3] 余丽,杨世湖,晋玉宽,等. Pib 启动子中乙烯和茉莉酸响应元件的转基因分析[J]. 遗传,2010,32(1):73-80.
- [4] 李燕. 紫花苜蓿诱导表达启动子 MsZPP 的克隆及功能分析[D]. 北京:中国农业科学院,2012:1-101.
- [5] 阮颖. 黑芥子酶协助蛋白基因启动子功能的缺失分析[D]. 长沙:湖南农业大学,2006:1-98.
- [6] 宋二玲. 三个病原物诱导启动子在转基因柑橘中受溃疡病菌和创伤诱导的表达分析[D]. 重庆:西南大学,2013:1-59.