

曹 薇,杨志民,庄黎丽,等. 高羊茅 *FaHsfC1b* 启动子克隆及外源激素处理下 *FaHsfC1b* 的表达分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):38–44.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.03.009

高羊茅 *FaHsfC1b* 启动子克隆及外源激素处理下 *FaHsfC1b* 的表达分析

曹 薇,杨志民,庄黎丽,王 剑,孙 岩

(南京农业大学草业学院,江苏南京 210095)

摘要:从高羊茅品种凌志中克隆得到 *FaHsfC1b* 启动子序列 1 657 bp。通过生物信息学分析软件对其顺式作用元件进行了初步分析,结果显示启动子序列中不仅包含启动子必备的核心元件:多个 TATA – box 以及多个 CAAT – box,还包含多种防御胁迫元件(冷、盐、干旱、病虫害相关元件)、激素响应元件、光信号元件、组织特异性元件、特殊物质响应元件等。根据启动子中激素响应元件,使用外源激素 ABA (100 $\mu\text{mol/L}$)、GA (90 mg/L)、IAA (60 mg/L)、SA (0.5 mmol/L)、ZT(0.5 mg/L)处理高羊茅,在 24 h 内 *FaHsfC1b* 表达量都有上调。推测该启动子序列调控 *FaHsfC1b* 表达并通过激素介导对高羊茅抗逆性产生影响。

关键词:高羊茅;*FaHsfC1b* 基因;启动子;序列分析;激素处理;基因表达

中图分类号:S688.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2018)03–0038–06

作为一种多年生冷季型草坪草,高羊茅 (*Festuca arundinacea*)具有抗病虫害、成坪快、耐修剪等多种优点,因此在我国温带南部和亚热带地区得到了广泛的种植。在温带以北,如北京地区,高羊茅在越冬时遭受冷胁迫,导致其通常活

不过 2 年,被称为“短命草”,而在亚热带地区,夏季高温以及高温带来的缺水也严重影响着高羊茅的生长,提高高羊茅对非生物胁迫的抵抗能力有益于节约草坪管理成本,进一步扩大高羊茅草坪草在我国的使用范围。

植物热激转录因子(heat stress transcription factors, Hsfs)是存在于植物细胞内调节热激蛋白表达的一类转录调节基因,在植物热胁迫信号转导和耐热性的产生过程中具有重要作用^[1]。热激转录因子在结构上可以分为 3 类:A 类、B 类、C 类。A 类热激转录因子是热激基因表达的激活剂,在不同的植物中具有不同的应激反应^[1],多项研究表明,此类热激转

收稿日期:2017–05–31

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31672480)。

作者简介:曹 薇(1991—),女,山西临汾人,硕士研究生,主要从事草坪草分子生物学育种研究。E-mail: baihe.909@foxmail.com。

通信作者:杨志民,教授,主要从事草坪草生理与分子生物学育种研究。Tel: (025)84399712; E-mail: nauymz@njau.edu.cn。

矮化程度越大^[14]。

3.2 GA_3 与 α -淀粉酶的关系

GA_3 是诱导多种植物一些组织中 α -淀粉酶的必要条件, α -淀粉酶为淀粉水解过程重要的水解酶,现已用 α -淀粉酶来检测植物组织中 GA 的响应状态^[15]。本研究发现外源 GA_3 能促进柱型苹果富士 \times 特拉蒙和普通型苹果嘎啦 α -淀粉酶的活性,但在测定过程中,柱型苹果和普通型苹果组培苗内 α -淀粉酶不太稳定,很可能因为酶的性质不稳定导致的。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京:中国统计出版社,2013:451–455.
- [2] 孟艳玲,汪景彦,康国栋,等. 我国苹果生产现状分析[J]. 中国果树,2007(1):43–44.
- [3] 王金政,薛晓敏,路 超. 我国苹果生产现状与发展对策[J]. 山东农业科学,2010(6):117–119.
- [4] 刘国娟,刘殿红,王 闯,等. 柱型和普通型苹果枝条木质部导管分子观察[J]. 江苏农业科学,2016,45(5):214–216.
- [5] 王彩虹,田义柯,戴洪义. 柱型苹果的研究和利用现状[J]. 河北

林果研究,2000,15(2):197–200.

- [6] 高国训,李光晨,袁丽慧. 柱型苹果茎尖培养中嫩茎增殖与植物激素的关系[J]. 天津农业科学,1999,5(2):20–24.
- [7] 刘林德,姚敦义. 植物激素的概念及其新成员[J]. 生物学通报,2002,37(8):18–20.
- [8] 鲜开梅,张永华. GA 的应用研究进展[J]. 北方园艺,2007(6):74–75.
- [9] 张石城,刘祖祺. 植物化学调控与原理[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [10] 张兴春,高峰. 赤霉素对紫心甘薯花青素积累及相关酶基因表达的影响[D]. 广州:华南师范大学,2009.
- [11] 梁美霞,邓子牛,戴洪义. 柱型苹果生长特性的细胞学与分子生物学研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2010:36–38.
- [12] 张志华,刘新彩,王红霞,等. 核桃 IOD 和 POD 酶活性与生长势的关系[J]. 园艺学报,2006,33(2):229–232.
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [14] 张维强,唐秀芝. 矮生型苹果苗的预选指标[J]. 植物学报,1997,29(4):377–400.
- [15] 王 忠. 植物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,1999:227–278.

录因子在植物抗逆境尤其是抗热方面起到重要作用^[2-4]。B 类热激转录因子本身没有转录激活功能,在番茄抗热性形成的不同阶段中,HsfB1 和 HsfA1a 可以形成一个增效的共激活因子^[5]。另外,在热胁迫下 HsfB1 可以跟其他热激转录因子结合控制或抑制看家基因的表达^[6]。与 A 类 Hsfs 相类似,热胁迫下的转录组分析显示,C 类热激转录因子 HsfCs 在水稻 (*Oryza sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、白菜 (*Brassica pekinensis*)、椪柑 (*Citrus reticulata* Blanco)、胡萝卜 (*Daucus carota*)、豌豆 (*Pisum sativum*)、簸箕柳 (*Salix suchowensis*) 中普遍上调表达,在其中某些物种中,HsfCs 也响应渗透胁迫、冷胁迫、ABA^[7-13]。到现在为止,对于 C 类热激转录因子的研究较少,仅发现水稻缺失 *OsHsfC1b* 后,对盐胁迫、干旱胁迫及 ABA 敏感,在非胁迫条件下,*OsHsfC1b* 对水稻的生长是不可缺少的^[14]。目前对多年生草坪草尤其是高羊茅中 C 类热激转录因子的功能及其上游调控因子缺乏研究。

启动子是 DNA 分子与 RNA 聚合酶特异结合的部位,负责下游基因的转录激活,对于基因的表达非常重要。伊淑莹^[15]等研究获得了番茄线粒体小分子热激蛋白基因 *LeMTsHSP* 起始密码子上 1 915 bp 的调控序列,可能对该基因的表达具有增强作用。高温下小麦 (*Triticum aestivum*) *Hvhsf17* 启动子能驱动 *Hvhsf17* 在小麦中表达^[16]。在不同类型的启动子中,有一类被称为激素诱导型启动子,激素首先与植物体内的特定受体相结合,受体蛋白被激活后与启动子结合,从而激活下游基因的表达,使植物发生一系列生理反应。如果植物缺少相应的受体基因或启动子,就不会对激素起反应^[17]。目前研究较多的有水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)、生长素(IAA、NAA 等)等激素响应启动子。不同激素诱导型启动子需要具有相应的激素响应元件,比如在拟南芥 RD29B 启动子中存在 2 个 ABA 响应元件 ABRE,只有这 2 个元件相互作用形成 ABA 应答复合体,才能使其所在的启动子表现出 ABA 诱导活性^[18]。

植物激素在植物抗逆性中发挥着重要的作用,ABA 含量在大豆热激恢复阶段会明显快速升高^[19-20],而 ABA 不敏感型突变体 *abi1* 和 *abi2* 则表现为耐热性变差^[21]。水稻中的 *OsHsfC1b* 被证实依赖 ABA 提高水稻对盐胁迫的抗性^[14],并且已经在 A 类的热激转录因子中发现了富集 ABA 应答原件(ABRE)的顺式调控模块,这表明了 ABA 在一些热激转录因子转录调控中的介导作用^[22]。SA 能够在植物遭受逆境及时清除 ROS,维持抗氧化酶的活性,从而保护胁迫下细胞膜的稳定性^[23]。生长素和赤霉素作为植物激素普遍参与了植物在正常条件和胁迫条件下的各种生理机制^[24-27]。研究发现,大麦和拟南芥在热胁迫下,伴随着内源生长素含量的降低,编码生长素合成的关键基因表达量也出现下调,并导致雄性不育,这些性状可以通过外施生长素得到恢复^[28]。赤霉素还参与调解生长素/细胞分裂素的拮抗作用^[29]。

基于已有高羊茅品种凌志的全长序列,我们设计 5'RACE 引物,通过染色体步移法分离 *FaHsfC1b* 上游启动子并克隆,随后利用启动子分析网站对该基因启动子区域的顺式作用调控元件及其功能进行分析,并根据启动子中出现的激素响应元件,对激素处理下 *FaHsfC1b* 的表达量进行了测定,从而为高羊茅 C 类热激转录因子的分子调控机制研究提

供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌株

试验于 2015 年 9—12 月在南京农业大学草业科学学院草坪分子生物学实验室完成。高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 品种凌志材料为笔者所在实验室草坪种质资源圃自有品种。选取实验室资源圃高羊茅植株,洗去根部泥土并去掉枯叶后将植株分蘖从整株上分离下来,剪去根部,将分蘖种植于霍格兰营养液^[30]中,营养液上置泡沫板以海绵包裹分蘖节支撑植株,按照 1/3 原则修剪叶片,培养条件为白天、夜晚各 12 h,白天温度 25 ℃,夜晚温度 20 ℃。其后每周换 1 次营养液,待 2~3 周后,分蘖节发育成较大植株,侧根也长出 10~15 cm,即可更换营养液并对高羊茅进行处理。

pMD19SimpleT 载体购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌菌株 DH5 α 为笔者所在实验室冻存。引物合成及 DNA 测序均在南京思普金生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 高羊茅 *FaHsfC1b* 启动子的克隆 高羊茅 *FaHsfC1b* 启动子的克隆采用染色体步行法,具体步骤参考李广平等的方法^[31]和 BD Genome Walker™ Universal Kit User Manual 说明书。2 条基因特异反向引物分别为:NGSP1:5' - TCGT-GCTCTGCTCGCGTGGT - 3'; NGSP2:5' - TACCTCGCTCTGT-GCGTGCCG - 3'。重新验证启动子所设计的引物序列为:F:5' - CAGAGCAGAAAGTGGTGATGGT - 3'; R:5' - GAGGAG-GAAGTCGGAGAAGGC - 3'。

1.2.2 *FaHsfC1b* 启动子序列分析 采用 GenBank 在线比对工具 BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[32]进行了序列同源性分析,启动子序列调控元件分析利用植物顺势调控元件数据库 PANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[33]和 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>)^[34]完成。

1.2.3 外源激素处理 将水培 2 周左右的高羊茅植株转移到分别含有 ABA (100 μ mol/L)、GA (90 mg/L)、IAA (60 mg/L)、SA (0.5 mmol/L)、ZT (0.5 mg/L) 的营养液中处理 24 h,在 0、4、12、24 h 取根部和叶片,每个处理取 3 个重复,培养条件与处理前相同。

1.2.4 高羊茅总 RNA 的提取与基因表达分析 总 RNA 提取采用试剂盒 Plant RNA Kit (50) (Omega Bio - Tec, American),用于荧光定量 PCR 的 cDNA 采用试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa, Otsu, Japan) 合成,通过 qRT - PCR 检测 *FaHsfC1b* 在不同激素处理下的表达情况。采用 SYBR Green I Master 反应体系 (Roche Diagnostic, Rotkreuz, Switzerland),在 LightCycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Switzerland) 仪器中进行。以 *FaTublin* 作为内参基因,使用如下引物:RT - *FaHsfC1b* - F: ACTTCAAGCACCGCAACTTT; RT - *FaHsfC1b* - R: TGAACCGGCTTCTTCTTCT; RT - *FaTublin* - F: ATGCTTT-CGTCTTATGCCC; RT - *FaTublin* - R: CTCTTGTTTGTATGG-TTGC。

2 结果与分析

2.1 *FaHsfC1b* 启动子克隆

构建的获得克隆经测序后与已有序列进行拼接和比对,以构建的高羊茅叶片基因组酶解 DNA 片段文库为模板,经过 2 轮 PCR 后,从高羊茅的 *EcoR* I 酶切体系中扩增到 1 条 1 562 bp 左右的片段(图 1)。将该片段进行克隆,连接到 pMD19SimpleT 并测序,结果显示,获得的片段实际长度为 1 514 bp。与已有的高羊茅 *FaHsfC1b* 基因(登录号: KY475613)序列比对后发现所得到的序列与高羊茅 *FaHsfC1b* 序列有 95 bp 的重叠区,表明所得到的序列是其上游的 DNA 序列。进一步设计 1 对验证引物,克隆分析整理后,共得到高羊茅 *FaHsfC1b* 基因上游长度为 1 657 bp 的 DNA 序列。

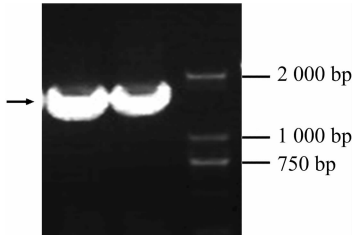


图1 *FaHsfC1b* 启动子的克隆

2.2 *FaHsfC1b* 启动子序列生物信息学分析

通过顺式作用元件数据库 PLACE 和 PANTCARE 对 *FaHsfC1b* 启动子的分析,结果发现 *FaHsfC1b* 启动子很多个位点上都有启动子核心元件 TATA - box,即 RNA 聚合酶结合位点,确保了转录起始位点的高度灵活性,多个 CAAT - box 则控制着转录起始的频率(表 1)。

除了核心元件,*FaHsfC1b* 启动子中包含的元件按照功能大致可以分为 6 类(表 1)。第一类为光信号相关元件,在启动子中数量最多、范围最广,多达 16 种,有 - 10PEHVPSBD、

box II、chs - Unit 1 ml、G - box、GAG - motif、GBOXLERBCS、I - box、INRNTPSADB、MNF1、MRE、PRECONSCRHSP70A、REBETALGLHCB21、SORLIP2AT、SORLIP1AT、Sp1、TBOXATGAPB。第二类是与抵抗逆境相关的元件,集中在干旱、冷/寒、盐及病害方面,包括综合性防御元件(同时具备抵抗 2 种或 2 种以上逆境相关元件):DOFCOREZM(多种胁迫防御)、DPBFCOREDCDC3(病原与高盐胁迫)、GT1GMSCAM4(病害与盐胁迫)包括脱水响应元件:DRECRCOREAT、MYCATRD22;低温响应元件:LTRECOREATCOR15、LTRE1HVBLT49;抗病相关元件:GT1CONSENSUS、SEBFCONSSTPR10A、WBOXATNPRI。还有一种缺氧相关的缺氧特异性诱导增强元件:GC - motif,猜测可能与涝害相关。第三类是组织特异性元件,它们参与调控基因在不同植物组织中的表达,包括分生组织:CAT - box;叶肉细胞:CACTFTPPCA1;花粉:GTGANTG10、POLLEN1LELAT52;根瘤组织:OSE1ROOTNODULE、OSE2ROOTNODULE;根毛:RHERPATEXPA7;种子:RYREPEATBNNAPA;胚乳:Skn - 1 motif。第四类为特殊物质响应元件,有蔗糖应答元件:RAV1AAT、SREATMSD;铜应答元件:CURECORECR;硫应答元件:SURECOREATSULTRI1。第五类是一些与基因、酶及蛋白结合的位点。

此次研究重点观察到的第六类是激素响应元件,包括细胞分裂素调节基因 *ARR1* 结合位点:ARR1AT;脱落酸响应元件:ABRE、MYB2CONSENSUSAT;生长素响应元件:CATATGGMSAUR;乙烯响应元件:GCCCORE、WBOXNTERF3;水杨酸响应元件:TCA - element;赤霉素响应元件:PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A、WRKY710S,另外 WRKY710S 元件也与创伤有关;调节类黄酮生物合成元件:MYBCORE。

综合上述分析,可知克隆到的启动子序列可能与光照周期、光照度有关,并且可能通过响应激素诱导,调控下游基因表达,在植物生长、抗病、抗逆方面发挥作用。

表 1 应用 PLANTCARE 预测 *FaHsfC1b* 启动子顺式作用元件

位点名称	位置	信号序列	位点功能
- 10PEHVPSBD	+ 1081	TATTCT	光响应元件
ABRE	- 1357、- 1577	CACGTG	脱落酸响应元件
AMYBOX1	+ 39	TAACARA	淀粉酶元件
ARR1AT	- 51、- 208、- 892、+ 909、+ 1128、- 1385、- 1396、- 1419、+ 1524	NGATT	细胞分裂素调节基因 <i>ARR1</i> 结合位点
Box - W1	- 164	TTGACC	真菌诱导子响应元件
box II	+ 1200	TCCACGTGGC	光响应元件
CAATBOX1	+ 50、- 130、+ 207、+ 1261、+ 734、- 1277	CAAT	启动子和增强子区调控元件
CACTFTPPCA1	+ 164、- 231、- 331、- 337、- 389、+ 405、- 444、- 480、+ 577、+ 931、+ 984、- 991、- 1039、- 1096、- 1103、- 1226、- 1234、- 1266、+ 1516、+ 1528、	YACT	C ₄ 植物中涉及叶肉特异基因表达的顺式元件
CAT - box	+ 6	GCCACT	分生组织表达顺式作用调控元件
CATATGGMSAUR	- 104、- 155	CATATG	生长素响应元件
chs - Unit 1 ml	- 524	ACCTAACCCGC	光响应元件
CGCGBOXAT	- 1317	VCGCGB	和钙离子结合蛋白结合的顺式作用元件
CGACGOSAMY3	- 114、- 603、- 727、- 776、- 800、+ 1315、+ 1554	CGACG	G - box 伴侣元件
CURECORECR	- 111、- 118、- 122、- 137、- 136、- 390、- 930、- 1235、1267	GTAC	铜应答元件

续表 1

位点名称	位置	信号序列	位点功能
DOFCOREZM	+ 22、+ 238、- 407、+ 857、- 1078、+ 1101、- 1134、- 1144、+ 1285、- 1296、+ 1460、- 1623、	AAAG	防御与胁迫响应元件
DPBFCOREDCDC3	+ 147、- 875、- 1250、+ 1343、+ 1357、+ 1574	ACACNNG	病原和高盐胁迫响应元件
DRECRTCOREAT	- 801、- 1481	RCCGAC	脱水响应元件
EBOXBNNAPA	- 96、- 104、- 989、- 1242、- 1344、1346、- 1358、- 1432、- 1486、	CANNTG	储藏蛋白 napA 的 E - box
EECCRCAHI	+ 128、+ 340、+ 748、- 1120、- 1521	GANTTNC	Myb 转录因子 LCR 1 结合位点
ELRECOREPCRPI	- 320	TTGACC	激发响应元件
EMBPI1AEM	+ 1358	CACGTGGC	抗旱、耐寒相关的反式作用因子
CCCCORE	- 860、- 882、+ 899	GCCGCC	乙烯响应元件
G - Box	- 1202、+ 1421	CACGTG	光顺式作用调控元件
GATABOX	- 47、- 844、- 1158、+ 1514、- 1563、- 1629	GATA	ASF - 2 结合位点
GAG - motif	+ 310、+ 1149、471	GGAGATG	光响应元件
GBOXLERBCS	+ 1357	MCACGTGGC	光响应基因的上游保守序列
GT1CONSENSUS	- 45、+ 1150、+ 1276、+ 1282、+ 1558	GRWAAW	调控抗病基因 <i>PR - 1a</i> 表达,影响水杨酸诱导的基因表达
GT1GMSCAM4	+ 17、+ 1282	GAAAAA	在病原或盐诱导的 <i>SCaM - 4</i> 基因表达中发挥作用
GTGANTG10	+ 30、+ 68、- 87、+ 99、+ 315、- 328、+ 338、- 412、- 821、- 959、+ 1239、1409	GTGA	花粉晚期基因启动子的元件
GC - motif		CCCCCG	缺氧特异性诱导增强元件
I - box	- 1626、- 46	GATAA	部分光响应元件
INRNTPSADB	+ 355、- 1220、- 1277	YTCANTYY	光响应元件
LECPLEACS2	- 191	TAAAATAT	LeCp 结合的顺式元件
LTRE1HVBLT49	+ 854	CCGAAA	低温响应元件
LTRECOREATCOR15	- 810、- 812、+ 1482、- 1491、+ 1553	CCGAC	低温响应元件
MNF1	+ 56	GTGCCC(A/T)(A/T)	光响应元件
MRE	- 341	AACCTAA	光响应 MYB 结合元件
MYBCORE	- 561、- 1464	CNGTTR	调节类黄酮(一类植保素)生物合成
MYB2CONSENSUSAT	+ 561	YAACKG	脱落酸信号转录激活因子
MYCATRD22	- 96、+ 1344	CACATG	脱水响应元件
OSE1ROOTNODULE	+ 238	AAAGAT	根瘤组织特异性表达元件
OSE2ROOTNODULE	+ 427、+ 1076	CTCTT	根瘤组织特异性表达元件
RAV1AAT	+ 915、- 1116、- 1436	CAACA	蔗糖应答元件
REBETALGLHCB21	- 1629	CGGATA	光敏色素调控元件
RHERPATEXPA7	- 210、- 605、+ 1606	KCACGW	根毛特异元件
POLLEN1LELAT52	+ 16、- 408、- 507、- 674、- 712、- 1071、- 1131、- 1145、- 1642	AGAAA	花粉特异表达的顺式作用元件
ROOTMOTIFTAPOX1	+ 191、- 1561	ATATT	rolD 的启动子元件
PRECONSCRHSP70A	- 758、+ 886、+ 1372、+ 1553	SCGAYNRNNNN NNNNNNNNNNHD	光响应元件
PROLAMINBOXOSGLUB1	+ 1098	TGCAAAG	葡聚糖酶 1 醇溶谷蛋白元件
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	- 1284	CCTTTT	赤霉素响应元件
RYREPEATBNNAPA	+ 1034	CATGCA	在种子特异性表达中发挥作用
SEBFCONSSTPR10A	+ 761、- 1324	YTGTWCW	抗病相关元件
SEF4MOTIFGM7S	+ 263、- 1402	RTTTTTR	SEF4 结合位点
Skn - 1_motif	+ 956	GTCAT	胚乳高水平表达顺式作用调控元件
SORLIP2AT	+ 160、- 863、- 947、+ 1030、+ 1139、- 1363	GGGCC	光响应元件
SORLIP1AT	+ 162、- 272、- 550、- 633、- 689、- 734、- 880、+ 1311、- 1349、- 1361、+ 1538	GCCAC	光响应元件

续表 1

位点名称	位置	信号序列	位点功能
Sp1	- 385、+ 1285、- 587、- 1391、- 389、 - 1386、- 744	CC(G/A)CCC	光响应元件
SREATMSD	+ 1628	TTATCC	蔗糖应答元件
SURECOREATSULTR11	- 8、+ 646、- 763、- 956、+ 1324	GAGAC	硫应答元件
TAAAGSTKST1	- 1078、- 1134	TAAAG	stdofl 蛋白反式作用控制保卫细胞特 异基因表达的靶位点
TATA - box	- 663、+ 33、+ 102、- 39、- 1014、- 37、 + 339、+ 41、- 1375、+ 34、+ 109、- 40、 - 1015、- 38、+ 361、+ 46	ATATAT	转录起始 - 30 核心启动子元件
TBOXATGAPB	- 1100	ACTTTG	涉及基因转录的光诱导激活
TCA - element	- 434	CAGAAAAGGA	水杨酸响应顺式作用元件
WBOXATNPRI	- 321	TTGAC	调控抗病基因 <i>NPRI</i> 表达,影响水杨 酸诱导的基因表达
WBOXNTERF3	+ 31、+ 100、- 152、- 617、- 1111	TGACY	参与乙烯诱导的 <i>ERF3</i> 基因的激活
WRKY710S	+ 75、- 321	TGAC	W - box 核心区,赤霉素信号抑制 因子

2.3 不同激素处理下 *FaHsfC1b* 的表达水平分析

为了验证 *FaHsfC1b* 启动子序列上存在的激素响应元件是否与 *FaHsfC1b* 在激素下的表达调控有关,我们对高羊茅进行了激素处理试验(图 2),发现在 ABA、GA、IAA、SA、ZT 处理下,24 h 内 *FaHsfC1b* 表达量均呈现上升再下降的趋势。ABA 处理下,高羊茅根部 *FaHsfC1b* 表达量在 4 h 开始上升并在 12 h 达到峰值,为对照的 49 倍,叶片表达水平比根部低,同样在 4 h 开始上升并在 12 h 达到峰值,为对照的 19 倍。GA 处理下根部和叶片中 *FaHsfC1b* 表达量都在 4 h 达到峰值,为对照的 7~8 倍,随后叶片中基因表达量虽有下降但依旧显著高于对照,而根部表达量则下降到处理前水平。IAA 处理下

高羊茅根部 *FaHsfC1b* 表达量明显快于也高于叶片中基因表达量,根部基因表达量在 4 h 达到峰值,并且是对照的 42 倍,而叶片则在 12 h 开始出现基因表达量的上升,与根部相比上升幅度较小,峰值为对照的 11 倍。SA 和 ZT 处理下 *FaHsfC1b* 表达量在根部和叶片中的上升/下降趋势很相似,但 SA 处理下高羊茅根部基因表达量为所有处理中最高水平,在 4 h 达到峰值,为对照的 65 倍,叶片中 *FaHsfC1b* 表达量则在 12 h 开始上升并在 24 h 达到峰值,为对照的 11 倍;在 ZT 处理下,高羊茅根部 *FaHsfC1b* 表达量同样在 4 h 达到峰值,为对照的 15 倍,叶片在 24 h 达到峰值,是对照基因表达量的 24 倍。

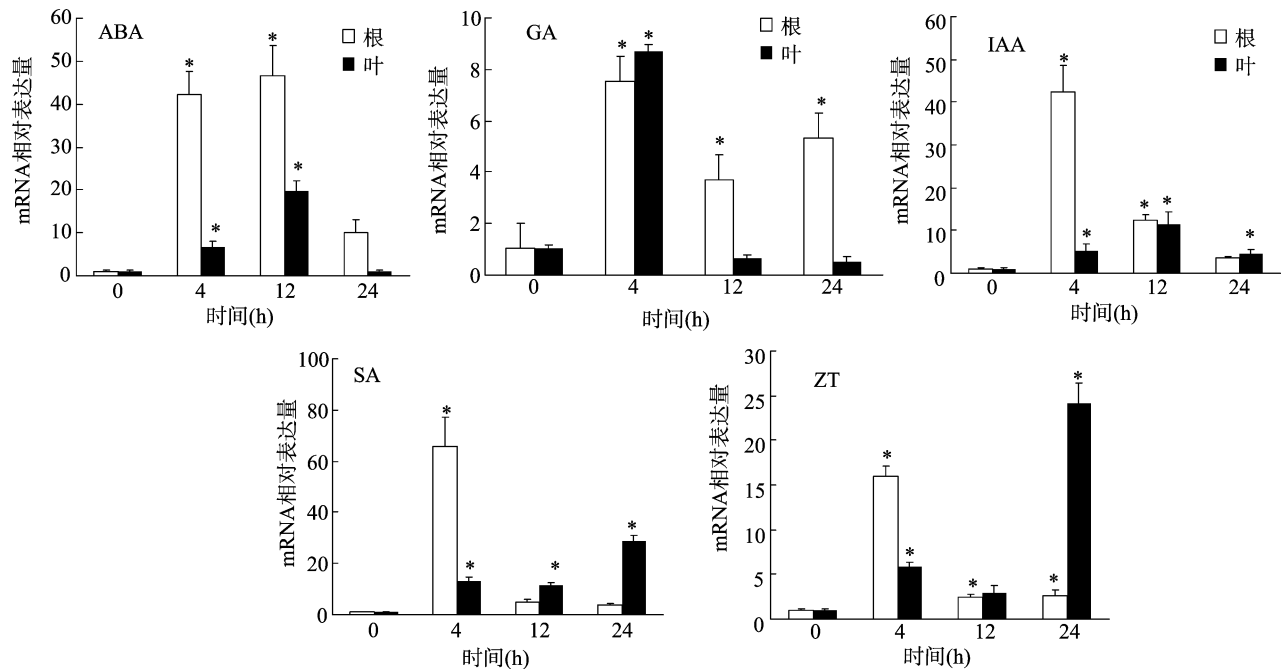


图2 外源激素处理下 *FaHsfC1b* 相对表达量

FaHsfC1b 对以上 5 种激素的响应与启动子元件中 5 种激素响应元件相吻合,证明启动子所包含的响应元件与下游基因的调控表达有一定联系。

3 讨论与结论

FaHsfC1b 启动子分析表明,该启动子序列中含有丰富的

顺势作用元件和其他应答元件。参与低温响应的元件有 6 个,抗旱相关元件有 4 个,盐胁迫相关元件有 8 个,抗病相关元件有 3 个,推测 *FaHsfC1b* 可能与高羊茅抗寒、抗旱及抗盐相关,而已有的研究表明,*HsfC1* 在渗透胁迫、盐胁迫和冷胁迫中的表达都很突出^[35,37],将水稻中的 *OsHsfC1b* 敲除后,转基因水稻对渗透胁迫的抗性明显弱于野生型^[14]。

在所有顺式作用元件中,数量最多的是涉及 C_4 植物叶肉特异表达的顺式元件 CACTFTPPCA1,此元件是维持 C_4 植物叶肉特异性,因而得以更高效率地利用光照和氮资源的关键元件^[38],另一个发现是关于光照的元件,在所有元件中光响应元件无论在种类还是数量上都是最多的,比较前人对其他基因启动子的分析,我们可以推测 *FaHsfC1b* 可能存在复杂的光应激反应表达模式,在植物正常的光合作用中起到重要作用。此外,*FaHsfC1b* 启动子中还包含有多个蔗糖应答元件、铜应答元件、硫应答元件、真菌诱导子元件,推测外源施加营养、金属元素或真菌感染可能会对 *FaHsfC1b* 的转录发生影响。启动子中含有的其他基因、酶及蛋白结合的位点说明植物对外界的应激反应是一个复杂的机制,需要多种物质共同协同作用。

对 *FaHsfC1b* 启动子序列分析的另一结果显示,激素响应元件所响应的激素不仅涵盖了五大类激素:生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯,还包括水杨酸、类黄酮,其中细胞分裂素调节基因 *ARR1* 结合位点多达 8 个,在启动子的末梢还有个分生组织表达顺式作用调控元件 CAT-box,推测 *FaHsfC1b* 的转录表达可能对植物的生长有影响。大多数干旱应答基因都受脱落酸的诱导,已经在 A 类热激转录因子中发现了富集脱落酸应答元件的启动子序列^[39],这表明脱落酸在 C 类热激转录因子转录调控中可能也有一定的介导作用。组织特异性元件的富集可推测 *FaHsfC1b* 的转录调控遍布高羊茅植株的各个部位。

在本试验中,*FaHsfC1b* 响应 IAA、ZT、GA、ABA 和 SA,在 *FaHsfC1b* 启动子中,生长素、赤霉素、脱落酸响应元件都有不止 1 个,而研究表明,启动子中多拷贝应答元件可能参与下游基因的增强表达^[40]。当干旱胁迫应答基因上游启动子序列中含有 ABRE 元件时,该基因的表达调节依赖 ABA 调控途径,本课题组前期对 *FaHsfC1b* 的研究表明 *FaHsfC1b* 响应干旱胁迫、冷胁迫和盐胁迫,而对 *OsHsfC1b* 的研究表明其维持水稻耐旱性依赖于 ABA 调控途径,因此进一步推测 *FaHsfC1b* 可能也具有相同功能^[14]。另外研究指出生长素诱导型启动子往往同时含有干旱胁迫或其他胁迫相关的作用元件,表明启动子下游基因的调控依赖于激素和逆境胁迫的共同作用^[41]。

目前除 ABA 以外,C 类热激转录因子在其他植物外源激素处理下的表达分析尚无报道,因此推测植物激素可能通过启动子来调控 *FaHsfC1b* 的表达,进而在植物抗逆性中发挥作用。由于此类激素尤其是生长素、细胞分裂素和赤霉素和植物生长密切相关,结合水稻中的 *OsHsfC1b* 在水稻生长中所扮演的不可缺少的角色^[14],进一步推测 *FaHsfC1b* 可能也在高羊茅的生长发育中发挥重要作用。

本研究通过对高羊茅 *FaHsfC1b* 启动子序列的分析,推测 *FaHsfC1b* 可能在植物激素介导的抗逆性中发挥重要作用,对

于植物生长发育及正常的光合作用可能也是必不可少的。

参考文献:

- [1] 黄小云,陶 鹏,李必元,等. 植物热激转录因子基因家族的研究进展[J]. 浙江农业科学,2014(9):1323-1332,1336.
- [2] Chen H, Hwang J E, Lim C J, et al. Arabidopsis DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 401(2):238-244.
- [3] Czarneckaverner E, Yuan C X, Fox P C, et al. Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29(1):37-51.
- [4] Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, et al. Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis* [J]. Planta, 2008, 227(5):957-967.
- [5] Bharti K, Koskull - Döring P V, Bharti S, et al. Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1 [J]. The Plant Cell, 2004, 16(6):1521-1535.
- [6] Scharf K D, Berberich T, Ebersberger I, et al. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819(2):104-119.
- [7] Hu W, Hu G, Han B. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice [J]. Plant Science, 2009, 176(4):583-590.
- [8] Xue G P, Sadat S, Drenth J, et al. The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(2):539-557.
- [9] Huang X Y, Tao P, Li B Y, Wang W H, et al. Genome-wide identification, classification, and analysis of heat shock transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa pekinensis*) [J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(1):2189-2204.
- [10] Lin Q, Jiang Q, Lin J, et al. Heat shock transcription factors expression during fruit development and under hot air stress in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) fruit [J]. Gene, 2015, 559(2):129-136.
- [11] Huang Y, Li M Y, Wang F, et al. Heat shock factors in carrot: genome-wide identification, classification, and expression profiles response to abiotic stress [J]. Molecular Biology Reports, 2015, 42(5):893-905.
- [12] Li P S, Yu T F, He G H, et al. Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses [J]. BMC Genomics, 2014, 15:998-1009.
- [13] Zhang J, Li Y, Jia H X, et al. The heat shock factor gene family in *Salix suchowensis*: a genome-wide survey and expression profiling during development and abiotic stresses [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:735-748.
- [14] Schmidt R, Schippers J H, Welker A, et al. Transcription factor OsHsfC1b regulates salt tolerance and development in *Oryza sativa* ssp. *japonica* [J]. AoB Plants, 2012, 2012(1):11-23.

- [15] 伊淑莹, 孙爱清, 赵春梅, 等. 番茄多胁迫诱导型 LeMTshsp 启动子的分子克隆及其功能分析[J]. 云南植物研究, 2007, 29(2): 223 – 230.
- [16] Freeman J, Sparks C A, West J, et al. Temporal and spatial control of transgene expression using a heat – inducible promoter in transgenic wheat [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(7): 775 – 788.
- [17] 孙芳芳, 宋洪元. 植物诱导型启动子研究进展[J]. 南方园艺, 2014(2): 51 – 56.
- [18] Yamaguchi – Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of cis – acting regulatory elements in osmotic – and cold – stress – responsive promoters[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(2): 88 – 94.
- [19] Larkindale J, Huang B. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene [J]. Plant Physiology, 2004, 161(4): 405 – 413.
- [20] Liu N, Ko S, Yeh K C, et al. Isolation and characterization of tomato *Hsa32* encoding a novel heat – shock protein [J]. Plant Science, 2006, 170(5): 976 – 985.
- [21] Larkindale J, Hall J D, Knight M R, et al. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance[J]. Plant Physiology, 2005, 138(2): 882 – 897.
- [22] Jin G H, Gho H J, Jung K H. A systematic view of rice heat shock transcription factor family using phylogenomic analysis[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(3): 321 – 329.
- [23] Sakata T, Oshino T, Miura S, et al. Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(19): 69 – 74.
- [24] Sun T P, Gubler F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55(1): 197 – 223.
- [25] Fleet C M, Sun T P. A delicate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(1): 77 – 85.
- [26] Colebrook E H, Thomas S G, Phillips A L, et al. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress[J]. Journal of Experimental Biology, 2014, 217(1): 67 – 75.
- [27] Branlard T. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat – responsive proteins from non – prolamins[J]. Proteomics, 2004, (4): 505 – 513.
- [28] Oshino T, Abiko M, Saito R, et al. Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high – temperature injury in barley plants[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 278(1): 31 – 42.
- [29] Vanstraelen M, Benková E. Hormonal interactions in the regulation of plant development[J]. Annual Review of Cell & Developmental Biology, 2012, 28(28): 451 – 463.
- [30] Hoagland D R, Arnon D I. The water – culture method for growing plants without soil [J]. Calificagricexpstncirc, 1937, 347(5406): 357 – 359.
- [31] 李广平, 张长青, 章 镇, 等. 中国李 pgip 启动子的克隆及调控元件分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(10): 1425 – 1430.
- [32] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI – BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 389 – 402.
- [33] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis – acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325 – 327.
- [34] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis – acting regulatory DNA elements (PLACE) database[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 297 – 300.
- [35] Kilian J, Whitehead D, Horak J, et al. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV – B light, drought and cold stress responses[J]. Plant Journal, 2007, 50(2): 347 – 363.
- [36] Wang J, Sun N, Deng T, et al. Genome – wide cloning, identification, classification and functional analysis of cotton heat shock transcription factors in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 955 – 961.
- [37] Reddy P S, Kavi Kishor P B, Seiler C, et al. Unraveling regulation of the small heat shock proteins by the heat shock factor HvHsfB2c in barley: its implications in drought stress response and seed development[J]. PloS One, 2014, 9(3): 119 – 125.
- [38] Udo Gowik J B, Meryem A, Ute S, et al. cis – Regulatory elements for Mesophyll – Specific gene expression in the C₄ plant flaveria trinervia, the promoter of the C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene[J]. The Plant Cell, 2004, 16(5): 1077 – 1090.
- [39] Bechtold U, Albihihi W S, Lawson T, et al. *Arabidopsis* HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(11): 3467 – 3481.
- [40] 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, 2005, 279(53): 355 – 361.
- [41] Liu Z B, Hagen G, Guilfoyle T J. A G – Box – Binding protein from soybean binds to the E1 auxin – response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline – rich repression domain[J]. Plant Physiology, 1997, 115(2): 397 – 407.