

# 桃 *PpPGIP1* 启动子的分离与功能分析

王秀云<sup>1,\*</sup>, 张计育<sup>1,3,\*</sup>, 古咸彬<sup>1</sup>, 高志红<sup>1,\*\*</sup>, 章 镇<sup>1</sup>, 俞明亮<sup>2</sup>, 张好艳<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学园艺学院, 南京 210095; <sup>2</sup>江苏省农业科学院园艺研究所, 南京 210014; <sup>3</sup>江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014)

**摘 要:** 通过染色体步移法分离桃 [*Prunus persica* (L.) Batch] *PpPGIP1* 上游启动子序列, 利用生物信息学方法对其功能进行初步预测; 构建该启动子植物表达载体并通过农杆菌介导法转化烟草, 研究不同激素诱导条件下 GUS 蛋白瞬时表达情况; 并利用实时荧光定量 RT-PCR 技术分析了 *PpPGIP1* 在水杨酸 (SA)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、脱落酸 (ABA) 和 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 诱导下的表达特性, 获得了长度为 1 018 bp 的桃 *PpPGIP1* 启动子序列。该序列与梅和中国李 *PGIP* 启动子序列的同源性分别为 90% 和 89%; 该启动子序列含有 SA、MeJA、ABA 和 ETH 诱导调控相关的抗病与胁迫顺式作用元件; ABA 和 ACC 可以诱导 *PpPGIP1* 启动子调控 *GUS* 基因的表达; 实时荧光定量 RT-PCR 分析结果表明: SA、MeJA、ABA 和 ACC 都可以诱导桃叶片中 *PpPGIP1* 的表达。*PpPGIP1* 可能参与 SA、MeJA、ABA 和 ETH 的信号转导, 在桃抵抗病原菌和逆境胁迫方面起着非常重要的作用。

**关键词:** 桃; *PpPGIP1* 启动子; 调控元件; 表达特性; 表达载体构建

**中图分类号:** S 662.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 07-1263-08

## Isolation and Functional Analysis of *PpPGIP1* Promoter in Peach

WANG Xiu-yun<sup>1,\*</sup>, ZHANG Ji-yu<sup>1,3,\*</sup>, GU Xian-bin<sup>1</sup>, GAO Zhi-hong<sup>1,\*\*</sup>, ZHANG Zhen<sup>1</sup>, YU Ming-liang<sup>2</sup>, and ZHANG Yu-yan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; <sup>2</sup>Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; <sup>3</sup>Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Promoter sequence of *PpPGIP1* gene in peach [*Prunus persica* (L.) Batch] was isolated through the chromosome walking method, and its function was preliminary forecasted by means of bioinformatics method. The plant expression vector of the promoter was constructed and transformed into tobacco through the *Agrobacterium*-mediated technique. Expression characteristics of *PpPGIP1* gene induced by salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) were also analyzed using real-time RT-PCR. The promoter sequence of *PpPGIP1* gene with 1 018 bp length was obtained and its homology with that of *Prunus mume* and *Prunus salicina* were 90% and 89%, respectively. The promoter contains important cis-acting elements related to resisting pathogens and adversity stress and induced by SA, MeJA, ABA and ETH. The expression of *GUS* gene

收稿日期: 2012-01-11; 修回日期: 2012-05-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871681, 31101526); 江苏省科技基础设施建设计划项目 (BM2008008)

\* 共同第一作者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gaozhong@njau.edu.cn)

could be regulated by *PpPGIP1* promoter with the induction of ABA and ACC. The results of real-time RT-PCR indicate that the expression of *PpPGIP1* gene could be induced by SA, MeJA, ABA and ACC in the leaves of peach. Thus, *PpPGIP1* gene may be involved in the signal transduction pathway of SA, MeJA, ABA and ETH, and play an important role in the condition of resisting pathogens and adversity stress in peach.

**Key words:** peach; *PpPGIP1* promoter; regulatory element; expression characteristic; construction of expression vector

多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (polygalacturonase inhibiting protein, PGIP) 是存在于多种植物中的一种富含亮氨酸的细胞壁结合蛋白, 它能与病原真菌入侵过程中分泌的第一个细胞壁降解酶——内切多聚半乳糖醛酸酶 (endo-PG) 专一性地结合, 形成一种复合物, 从而降低了 endo-PG 的活性。PGIP 与 endo-PG 结合的同时会造成大量寡聚半乳糖醛酸的积累, 该物质的积累能有效激活植物体内相关防御基因的表达, 增强植物的抗病性 (Gomathi & Gnanamanickam, 2004; Liang et al., 2005; 李钊 等, 2011)。因此, PGIP 是植物发病早期的重要抗病蛋白, 研究其表达调控机制对 PGIP 在分子抗病育种上的应用具有重要意义。

启动子是 DNA 分子与 RNA 聚合酶特异结合的部位, 是最重要的一种转录调节因子, 对于基因的表达非常重要。PGIP 是诱导表达型基因, 受病原菌 (Alida, 2010; Zhang et al., 2010)、创伤 (Devoto et al., 1998)、水杨酸 (Liang et al., 2005) 等诱导表达。Hu 等 (2012) 研究表明在水杨酸和脱落酸的诱导下, 桑树 PGIP 的 mRNA 表达水平显著升高。在外源激素 (水杨酸、茉莉酸甲酯和脱落酸) 的刺激下, 辣椒 PGIP 的表达量均有不同程度升高, 且在不同的时间点达到高峰, 随之表达量下降 (王秀菊, 2011)。目前研究认为, 在植物体内存在两个主要的植物防卫反应信号途径: 水杨酸依赖途径和茉莉酸乙烯途径, 不同的 PGIP, 其表达可能受不同的信号传递途径调节, 或者存在信号交叉调节 (李广平, 2006)。

国内外关于 PGIP 克隆的报道很多 (Devoto et al., 1998; Liang et al., 2005; 李广平, 2006; 古英洪 等, 2008; 湛悦 等, 2009), 但关于该基因上游启动子区的克隆却很少, 迄今仅局限于菜豆 (Devoto et al., 1998)、中国李 (李广平 等, 2009) 和梅 (李广平 等, 2010) PGIP 启动子的克隆与研究。

‘南京白沙’桃是重要的抗流胶病种质, 多年的流胶病田间抗性调查均表现为高抗。本试验中通过对 ‘南京白沙’桃 *PpPGIP1* 启动子的克隆及其顺式作用元件分析, 揭示 *PpPGIP1* 的转录调控机制, 构建了该启动子的双元表达载体, 通过农杆菌介导法转化模式植物烟草, 进一步研究 *PpPGIP1* 的调控模式。为了检测 *PpPGIP1* 启动子中顺式作用元件在 *PpPGIP1* 调控中的作用, 选取几个与顺式作用元件相关的激素进行 *PpPGIP1* 的诱导表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与菌株

试验于 2010 年 5 月至 2011 年 9 月在南京农业大学园艺学院果树生物技术实验室完成。桃 [*Prunus persica* (L.) Batch] 品种 ‘南京白沙’材料由江苏省农业科学院园艺研究所提供。烟草 (*Nicotiana tabacum*) ‘K326’ 无菌组培苗由南京农业大学果树生物技术实验室保存。pMD19SimpleT 载体购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105

和植物双元表达载体 YH4215 由本实验室保存。

## 1.2 方法

### 1.2.1 桃 *PpPGIP1* 启动子的克隆

桃 *PpPGIP1* 启动子的克隆采用染色体步行法, 具体步骤参考李广平等 (2009) 的方法和 BD Genome Walker™ Universal Kit User Manual 说明书。两条基因特异引物分别为 NGSP1: 5'-CTCAAGT GTTTCAAGATACGGCAAGTCAC-3'; NGSP2: 5'-CTCTGGGTTCATGAGGACAAGACGTAG-3'。

### 1.2.2 *PpPGIP1* 启动子序列分析

序列同源性分析采用 GenBank 在线比对工具 BLASTn (Altschul et al., 1997. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 完成, 启动子序列调控元件分析利用植物顺势调控元件数据库 PlantCare (Lescot et al., 2002. <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PLACE (Higo et al., 1999. <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 完成。

### 1.2.3 *PpPGIP1* 启动子功能分析

根据已克隆的 *PpPGIP1* 启动子序列, 在其两端设计一对含有 *EcoR* I / *Nco* I 酶切位点的引物 pgipF1 (5'-GCCGGAATTCATTATATAAAATGACCCTATTG-3') 和 pgipR1 (5'-CCATGGCATT TTTGT GGGTTTTGGATAAG-3')。经 PCR 扩增, 连接到 pMD19SimpleT 载体内测序, 鉴定正确后, 经 *EcoR* I / *Nco* I 双酶切。酶切后的连接、转化大肠杆菌及鉴定、转化农杆菌及鉴定和农杆菌介导转化烟草等参考王庆菊等 (2010) 的方法。转化 35S 启动子作为阳性对照, 共培养的培养基中分别添加  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA、 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA、 $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA 和  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC 诱导表达。共培养 3 d 后对材料进行 X-Gluc 染色 ( $37^\circ\text{C}$ , 12 h), 再用 80% 的乙醇脱色至叶片透明, 在显微镜下观察共培养的材料有无蓝色出现。

### 1.2.4 表达特性分析

取树体不同部位粗度相近 (约 0.5 cm) 具有饱满芽的 1 年生枝条, 剥除花芽, 留叶芽, 然后剪成 20 cm 的长茎段, 放于培养瓶中加水培养, 每天换水, 直至展叶。分别用  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA (水杨酸)、 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA (脱落酸)、 $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA (茉莉酸甲酯) 和  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC (1-氨基环丙烷-1-羧酸) 喷洒于叶片表面, 喷清水作为对照, 每个处理 4 个茎段, 重复 3 次, 分别于 0、3、6、12 和 24 h 时取叶片迅速置于液氮中冷冻后,  $-70^\circ\text{C}$  保存备用。

叶片总 RNA 的提取参考蔡斌华等 (2008) 的方法, 总 RNA 中 DNA 的消化及 cDNA 第一链的合成根据说明书 (TaKaRa) 的方法进行。将合成的 cDNA 第一链稀释 10 倍后, 于  $-20^\circ\text{C}$  保存。

实时荧光定量 RT-PCR 分析使用 ABI7300 分析仪。以桃 *ACTIN* 基因为内参基因, 内参基因的引物序列与 Tong 等 (2009) 报道的一致。根据已克隆的桃 *PpPGIP1* 序列设计特异引物: Bpgipf1: TCAATAACCTCACAGGCTCCATCC; Bpgipr1: AGAAGTCTACGGTGCTGAAGTCC。为确保扩增产物的唯一性和准确性, 分别进行内参基因和目的基因的普通 PCR 反应, 并对其目的片段进行回收、克隆, 随机挑取 3 个阳性克隆进行测序。实时荧光定量 RT-PCR 反应体系、程序 and 数据分析参考张计育等 (2011) 的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 桃 *PpPGIP1* 上游启动子序列克隆

以构建的核基因组酶解 DNA 片段文库为模板, 经过两轮 PCR 后, 从桃的 *EcoR* V 酶切体系中扩

增到 1 条大于 1 000 bp 的目的片段 (图 1)。将该片段进行克隆、测序, 结果显示, 获得的片段实际长度为 1 216 bp。序列经过分析整理后, 以 ATG 为起始位点, 得到桃 *PpPGIP1* 上游长度为 1 018 bp 的 DNA 序列 (GenBank 登录号: HQ453973)。在 GenBank 数据库中利用在线比对工具 BLASTn 进行同源性比对, 发现所克隆的序列与同为李属的梅的 PGP 基因启动子 (登录号: DQ364056.1) 和中国李的 PGP 基因启动子 (登录号: DQ364055.1) 的一致性分别达到 90% 和 89%, 而且 E 值 (Expect value, 期望值) 都为 0。

## 2.2 *PpPGIP1* 启动子序列分析及顺式元件预测

在顺式作用元件数据库 PLACE 和 PlantCare 中分析所克隆到的启动子序列 (表 1), 发现其中含有大多数高等植物启动子具有的保守元件 (TATA-box 和 CAAT-box) 和一些与抗逆密切相关的诱导

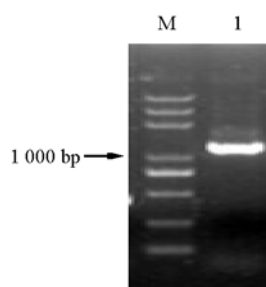


图 1 桃 *PpPGIP1* 启动子的 PCR 扩增

M: DNA 分子量标准; 1: PCR 扩增产物。

Fig.1 PCR production of *PpPGIP1* promoter from *P. persica*

M: DNA marker; 1: PCR production *PpPGIP1*.

表 1 应用 PLACE 和 PlantCARE 在线预测的 *PpPGIP1* 启动子区顺式作用元件特性

Table 1 Cis-acting regulatory elements characteristic of *PpPGIP1* promoter sequences by PLACE and PlantCARE

调控序列 Regulatory sequence	序列 Sequence	特性 Characteristic
ABRE	CACGTG	脱落酸反应元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ABRERATCAL	MACGYGB	脱落酸响应、结合钙离子的顺式作用元件 $\text{Ca}^{2+}$ -responsive cis-acting element
ARE	TGGTTT	厌氧诱导所需的顺式调控元件 Cis-acting regulatory element essential for anaerobic induction
Box 4	ATTAAT	光调控元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
Box I	TTTCAAA	光调控元件 Light responsive element
CAAT-box	CAAT	启动子和增强子区调控元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
DOFCOREZM	AAAG	防御与胁迫响应元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
G-Box	CACGT(T/G)	光顺式作用调控元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
GC-motif	CCCCCG	缺氧诱导增强元件 Enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
GT1CONSENSUS	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 Regulate <i>PR-1a</i> , SA-induced
GT1-motif	GGTTAA	光响应元件 Light responsive element
I-box	atGATAAGGTC	部分光响应元件 Part of a light responsive element
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	脱落酸信号转录激活因子 Transcriptional activators in abscisic acid signaling
MYBCORE	CNGTTR	调节类黄酮 (一类植保素) 生物合成 Regulation of flavonoid biosynthesis
O2-site	GATGATGTGG	醇溶蛋白代谢应答元件 Cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation
Sp1	CC(G/A)CCC	光响应元件 Light responsive element
T/GBOXATPIN2	AACGTG	茉莉酸甲酯诱导顺式作用元件 Cis-acting element involved in MeJA induction
TATA-box	TATA	转录起始 - 30 核心启动子元件 Core promoter element around - 30 of transcription start
TC-rich repeats	ATTTTCTCA	防御与胁迫响应元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
WBOXPCWRKY1	TTTGACY	防御与胁迫响应元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
WBOXATNPR1	TTGAC	调控抗病基因 <i>NPR1</i> 表达, 影响水杨酸诱导的基因表达 Regulate <i>NPR1</i> , SA-induced
WBOXNTERF3	TGACY	参与乙烯诱导的 <i>ERF3</i> 基因的激活 Involved in activation of <i>ERF3</i> gene by ethylene
WRKY710S	TGAC	W-box 核心区, 赤霉素信号抑制因子 Core of W-box, transcriptional repressor of GA signal
chs-CMA2b	ATTGCAACTCAA	部分光响应元件 Part of a light responsive element
Circadian	CAANNNNATC	昼夜节律控制元件 Cis-acting regulatory element involved in circadian control

型作用元件, 其中包括影响水杨酸诱导基因表达的调控元件 GT1CONSENSUS 和 WBOXATNPR1; 脱落酸响应元件 ABRE、ABRERATCAL 和 MYB2CONSENSUSAT; 茉莉酸甲酯诱导顺式作用元件 T/GBOXATPIN2; 参与乙烯诱导的 *ERF3* 基因激活元件 WBOXNTERF3 等。说明克隆到的序列符合真核基因启动子的基本结构特征, 并且可能在抗病、防御方面起到一定的作用。

### 2.3 桃 *PpPGIP1* 启动子在烟草中的调控作用分析

通过 *EcoR* I /*Nco* I 双酶切和 T4 DNA 连接酶的连接作用, 将 *PpPGIP1* 启动子成功连接到植物双元表达载体 YH4215 中, 同时用含有 35S 启动子的 YH4215 载体作为阳性对照。农杆菌介导转化烟草叶片, 共培养培养基中分别添加 ABA、SA、MeJA 和 ACC, 以检测这些激素是否能诱导差异调控表达, 共培养 3 d 后进行 *GUS* 基因的瞬时表达检测。检测结果如图 2 所示, 阳性对照以及共培养基中分别添加 ABA 和 ACC 的叶片检测到 *GUS* 表达活性, 而没添加任何激素和添加 SA 和 MeJA 的叶片没有检测到 *GUS* 表达活性。并且, 添加 MeJA 的叶片用 X-Gluc 染色后变褐发黑, 其原因还有待于进一步研究。

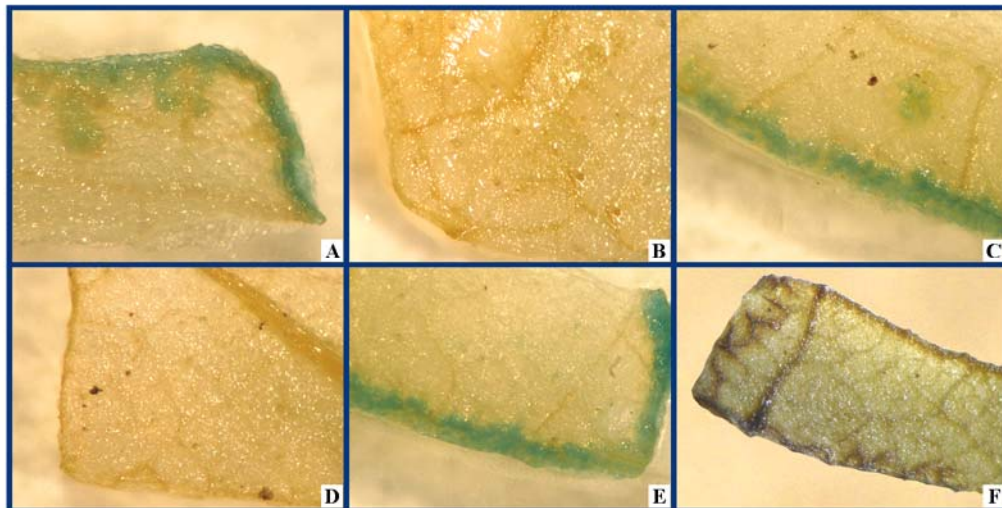


图 2 转 *PpPGIP1* 启动子的烟草叶片 *GUS* 瞬时表达检测

A~F 分别是阳性对照, 不添加激素, 添加 ABA、SA、ACC 和 MeJA。

Fig. 2 Transient expression of *GUS* in tobacco leaf blocks transformed *PpPGIP1* promoter

A - F were positive control, hormone free, ABA, SA, ACC and MeJA, respectively.

### 2.4 桃 *PpPGIP1* 在 SA、MeJA、ACC 和 ABA 诱导条件下表达特性分析

*PpPGIP1* 启动子中含有与 SA、MeJA、ACC 和 ABA 有关的顺式作用元件, 为了研究这些调控元件对 *PpPGIP1* 的调控特性及其在 *PpPGIP1* 信号转导中的作用, 利用实时荧光定量 RT-PCR 分析了 H<sub>2</sub>O (对照)、SA、MeJA、ACC 和 ABA 处理后的桃叶片中 *PpPGIP1* 的表达特性 (图 3)。在 H<sub>2</sub>O 处理后的 24 h 内, *PpPGIP1* 的表达量几乎没有变化; SA 处理 6 h 后表达量达到最大, 为处理前的 2.8 倍, 随后表达量降低; MeJA 处理后 6 h 表达量最大, 为处理前的 3.9 倍, 随后表达量下降; ACC 处理后 3 h 表达量最大, 为处理前的 9.9 倍, 随后表达量下降; 而 ABA 处理后表达量出现上下波动的情况, 3 h 时表达量迅速下降, 6 h 时上升到处理前的 1.5 倍, 但 12 h 时又低于处理前, 24 h 时再次上升, 达到处理前的 1.9 倍, 出现 *PpPGIP1* 表达量上下波动的原因有待进一步研究。

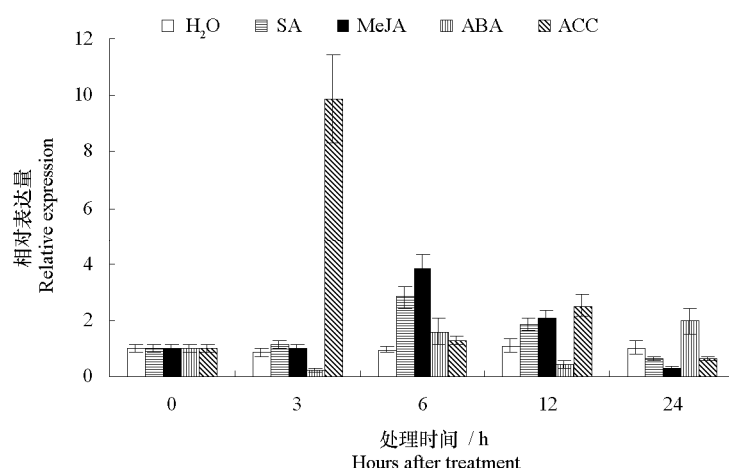


图 3 实时荧光定量 RT-PCR 分析 SA、MeJA、ACC 和 ABA 处理后叶部 *PpPGIP1* 的表达

Fig. 3 Expression of *PpPGIP1* after treated by SA, MeJA, ACC and ABA in leaf using qRT-PCR

### 3 讨论

基因上游启动子的功能分析对于弄清楚基因的作用机制具有非常重要的作用。本研究分离了桃 *PpPGIP1* 上游的启动子序列, 该序列含有多个与激素诱导调控有关顺式作用元件, 说明 *PpPGIP1* 的表达可能受这些激素诱导, 而且这些调控元件多以多拷贝形式存在。研究表明, 多拷贝调控元件可能参与基因的增强表达 (Nishiuchi et al., 2004), 说明桃 *PpPGIP1* 上游调控序列可能具有增强防御响应调控作用。另外 *PpPGIP1* 上游启动子区域还有多个光响应元件、缺氧胁迫响应元件等, 这些植物相关顺式作用元件的存在预示 *PpPGIP1* 启动子区域能够响应多种信号, 其表达可能受多种作用因子共同调节。

植物体内存在两个主要的植物防卫反应信号途径: 水杨酸依赖途径和茉莉酸乙烯途径 (李广平, 2006)。不同的 *PGIP* 基因, 其表达受不同的信号传递途径调节 (Ferrari et al., 2003)。本研究中 *PpPGIP1* 受 SA、MeJA 和 ACC 诱导表达, 说明 *PpPGIP1* 可能参与这两条防卫反应信号途径。另外, 许多研究表明, 水杨酸和茉莉酸乙烯诱导抗病性的信号转导通道之间存在着交叉, *NPR1* 是两种信号传导途径之间的交叉点之一, 与某些 *WRKY* 转录因子及 *NPR4* 一起, 在调节和平衡 SA 和茉莉酸信号传导途径中起关键作用 (张红志和蔡新忠, 2005; 李敏 等, 2007)。而 *PpPGIP1* 启动子顺式作用元件中包含调控 *NPR1* 表达的 *WBOXATNPR1* 以及 *WRKY* 转录因子结合位点 *WBOXPCWRKY1*, 这说明 *PpPGIP1* 可能受这两条防卫反应信号途径交叉调节。

在未添加激素诱导时, *PpPGIP1* 启动子不能启动 *GUS* 基因表达, 而添加 ACC 和 ABA 诱导后出现 *GUS* 表达现象, 说明 *PpPGIP1* 启动子的调控可能受这两种激素诱导。ACC 可以诱导 *PpPGIP1* 表达, 同样可以诱导 *GUS* 表达, 说明乙烯可以直接调控 *PpPGIP1* 表达, 因此 *PpPGIP1* 启动子中乙烯相关调控元件 *WBOXNTERF3* 在 *PpPGIP1* 转录调控功能中可能具有重要的作用。然而, 在启动子区域中含有 SA 作用元件, SA 可以诱导 *PpPGIP1* 表达, 但是 SA 未能诱导 *GUS* 表达, 说明 SA 不能直接诱导 *PpPGIP1*, 可能是通过其它途径来诱导 *PpPGIP1* 表达。研究认为 SA 并不是长距离信号, 要诱导产生系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR), 必须要在信号传下游有一个长距离信号分子协同作用, SA 可能通过与 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的相互交织来形成信号转导网络 (Chen et al., 1993; 李广平, 2006)。

## References

- Alida V. 2010. The functional analysis of *Vitaceae* polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) encoding genes overexpressed in tobacco [M. D. Dissertation]. Stellenbosch: University of Stellenbosch.
- Altschul S F, Madden T L, Sch  ffer A A, Zhang J H, Zhang Zh, Miller W, Lipman D J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389 – 3402.
- Cai Bin-hua, Zhang Ji-yu, Gao Zhi-hong, Qu Shen-chun, Tong Zhao-guo, Mi Lin, Qiao Yu-shan, Zhang Zhen. 2008. An improved method for isolation of total RNA from the leaves of *Fragaria* spp. *Journal of Jiangsu Agriculture Science*, 24: 875 – 877. (in Chinese)
- 蔡斌华, 张计育, 高志红, 渠慎春, 佟兆国, 靡林, 乔玉山, 章镇. 2008. 一种改良的提取草莓属叶片总 RNA 的方法. *江苏农业学报*, 24: 875 – 877.
- Chen Yue, Zhang Jun-ke, Xiong Shuai. 2009. Cloning and sequence analysis of *PGIP* gene and cDNA from *Prunus persica*. *Journal of Anhui Agri Sci*, 37 (32): 15738 – 15740, 15778. (in Chinese)
- 谌悦, 张军科, 熊帅. 2009. 桃 *PGIP* 基因及 cDNA 的克隆及序列分析. *安徽农业科学*, 37 (32): 15738 – 15740, 15778.
- Chen Z, Silva H, Klessing D E. 1993. Involvement of reactive oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid in plants. *Science*, 242: 883 – 886.
- Devoto A, Leckie F, Lupotto E, Cervone F, de Lorenzo G. 1998. The promoter of a gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein of *Phaseolus vulgaris* L. is activated by wounding but not by elicitors or pathogen infection. *Planta*, 205: 165 – 174.
- Ferrari S, Vairo D, Ausubel F M, Cervone F, de Lorenzo G. 2003. Tandemly duplicated arabidopsis genes that encode polygalacturonase inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell*, 15: 93 – 106.
- Gomathi V, Gnanamanickam S S. 2004. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence. *Current Science (Bangalore)*, 87: 1211 – 1217.
- Gu Ying-hong, Tang Hao-ru, Zhang Yi-zheng. 2008. Molecular cloning, sequence analysis of polygalacturonase-inhibiting protein gene from *Prunus persica* and its expression in *E. coli*. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (10): 3191 – 3199. (in Chinese)
- 古英洪, 汤浩茹, 张义正. 2008. 桃 *PGIP* 蛋白基因片段的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达. *中国农业科学*, 41 (10): 3191 – 3199.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) atabase. *Nucleic Acids Research*, 27 (1): 297 – 300.
- Hu D Q, Dai R Q, Wang Y H, Zhang Y H, Liu Z Y, Fang R J, Zhao W G, Li L, Lin Q, Li L. 2012. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene in mulberry. *Plant Mol Biol Rep*, 30: 176 – 186.
- Lescot M, D  hais P, Moreau Y, De Moor B, Rouz   P, Rombauts S. 2002. PlantCARE: A database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 30 (1): 325 – 327.
- Li Guang-ping. 2006. Cloning of *PGIP* genes and their promoters from *Prunus mume* and *Prunus salicina*, and transformation of tobacco with *PGIP* gene from *Prunus mume* [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 李广平. 2006. 梅、中国李 *PGIP* 基因及其启动子的克隆和梅 *PGIP* 基因转化烟草的研究 [博士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Li Guang-ping, Fang Jing-gui, Cai Bin-hua, Zhang Zhen, Zhang Chang-qing. 2006. Cloning and sequencing of *PGIP* gene from *Prunus mume* Sieb. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (1): 125 – 127. (in Chinese)
- 李广平, 房经贵, 蔡斌华, 章镇, 张长青. 2006. 梅 *PGIP* 基因的克隆及全序列分析. *园艺学报*, 33 (1): 125 – 127.
- Li Guang-ping, Zhang Chang-qing, Zhang Zhen. 2010. Cloning and sequence analyzing of *PGIP* promoter from *Prunus mume*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 30 (5): 883 – 887. (in Chinese)
- 李广平, 张长青, 章镇. 2010. 梅 *PGIP* 基因的启动子克隆及生物信息学分析. *西北植物学报*, 30 (5): 883 – 887.
- Li Guang-ping, Zhang Chang-qing, Zhang Zhen, Cao Fu-liang. 2009. Cloning of *PGIP* promoter from *Prunus salicina* and the computational identification of its regulatory element. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (10): 1425 – 1430. (in Chinese)
- 李广平, 张长青, 章镇, 曹福亮. 2009. 中国李 *PGIP* 启动子的克隆及调控元件分析. *园艺学报*, 36 (10): 1425 – 1430.
- Li Min, Li Sheng-jun, Pei Xin-wu. 2007. Cloning *NPRI* fragment from banana and its the early molecular responses to salicylic acid. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15 (2): 352 – 353. (in Chinese)
- 李敏, 李胜军, 裴新梧. 2007. 香蕉 *NPRI* 基因片段的克隆及对水杨酸的早期应答反应. *农业生物技术学报*, 15 (2): 352 – 353.
- Li Zhao, Wang Jin-feng, Zhuang Hong-tao, Jiang Wen, Ye Xing-guo, Li Si-shen, Zhang Zeng-yan. 2011. Cloning of plant defense genes *PvPGIP2*

- and *TaLTP4* and their transformation to wheat. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 25 (5): 871 – 878. (in Chinese)
- 李 钊, 王金凤, 庄洪涛, 蒋 雯, 叶兴国, 李斯深, 张增艳. 2011. 植物防卫基因 *PvPGIP2* 和 *TaLTP4* 的克隆及其对小麦的转化. *核农学报*, 25 (5): 871 – 878.
- Liang F S, Zhang K C, Zhou C J, Kong F N, Li J, Wang B. 2005. Cloning, characterization and expression of the gene encoding poly-galacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) of peach [*Prunus persica* (L.) Batch]. *Plant Science* (Oxford), 168: 481 – 486.
- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 55355 – 55361.
- Tong Z G, Gao Z H, Wang F, Zhou J, Zhang Z. 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 10: 71
- Wang Qing-ju, Zhou Yong, Li Hai, Zhou Jun, Xu Kuan-yong, Zhang Zhen. 2010. Study on transgenic tobacco with *Vaccinium vitis-idaea* *VviDREB1* gene. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 30 (7): 1309 – 1315. (in Chinese)
- 王庆菊, 周 泳, 李 海, 周 军, 许宽勇, 章 镇. 2010. 红豆越桔 *VviDREB1* 基因转化烟草的研究. *西北植物学报*, 30 (7): 1309 – 1315.
- Wang Xiu-ju. 2011. Cloning and functional analysis of polygalacturonase inhibiting protein from *Capsicum annuum* [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 王秀菊. 2011. 辣椒多聚半乳糖醛酶抑制蛋白基因克隆及功能研究[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Zhang F, Wang Z, Huang Q S, Huang L P, Yang Q. 2010. Cloning and characterization of a PGIP-encoding gene from *Solanum torvum*. *Agricultural Sciences in China*, 9: 921 – 927.
- Zhang Hong-zhi, Cai Xin-zhong. 2005. Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (*NPRI*): A key node of plant disease resistance signalling network. *Chinese Journal of Biotechnology*, 21 (4): 511 – 515. (in Chinese)
- 张红志, 蔡新忠. 2005. 病程相关基因非表达子 1 (*NPRI*): 植物抗病信号网络中的关键节点. *生物工程学报*, 21 (4): 511 – 515.
- Zhang Ji-yu, Tong Zhao-guo, Gao Zhi-hong, Luo Chang-guo, Qu Shen-chun, Zhang Zhen. 2011. Expression of *MhWRKY1* gene induced by the elicitors SA, MeJA, ACC and the apple ring spot pathogen. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (5): 990 – 999. (in Chinese)
- 张计育, 佟兆国, 高志红, 罗昌国, 渠慎春, 章 镇. 2011. SA、MeJA、ACC 和苹果轮纹病原菌诱导湖北海棠 *MhWRKY1* 基因的表达. *中国农业科学*, 44 (5): 990 – 999.

## 征 订

## 欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊, 创刊于 1962 年, 刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息, 适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊, 被英国《CAB 文摘数据库》、美国 CA 化学文摘、日本 CBST 科学技术文献速报、俄罗斯 AJ 文摘杂志、CSCD 中国科学引文数据库等多家重要数据库收录。《园艺学报》荣获第三届国家期刊奖及中国科技信息所“中国精品科技期刊”、武汉大学中国科学评价研究中心“中国权威学术期刊”、中国期刊协会和中国出版科学研究所“新中国 60 年有影响力的期刊”等称号。

根据“中国学术期刊影响因子年报(2011 版)”, 《园艺学报》复合总被引频次为 11 630, 期刊综合总被引频次 5 317, 复合影响因子 1.780, 期刊综合影响因子 1.124。

《园艺学报》为月刊, 每月 25 日出版。每期定价 40.00 元, 全年 480.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局办理订阅, 国内邮发代号 82 – 471, 国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 M448。漏订者可直接寄款至本编辑部订购。

编辑部地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部;

邮政编码: 100081; 电话: (010) 82109523. E-mail: [yuanyixuebao@126.com](mailto:yuanyixuebao@126.com). 网址: <http://www.ahs.ac.cn>.