

LEA蛋白与植物抗逆性

李剑, 赵常玉, 张富生, 王锁民, 包爱科, 张金林*

兰州大学草地农业科技学院, 农业部草地农业生态系统重点开放实验室, 兰州 730020

摘要: 植物受到逆境胁迫后, LEA蛋白大量表达, 可以减轻逆境引起的伤害。本文对LEA蛋白的种类、特性和功能, LEA蛋白基因结构及其表达调控, 以及LEA基因表达和LEA蛋白积累与植物抗逆性的关系等方面的研究进展作了简要综述。

关键词: LEA蛋白; 基因表达; 逆境胁迫; 抗逆性

LEA Protein and Plant Stress Tolerance

LI Jian, ZHAO Chang-Yu, ZHANG Fu-Sheng, WANG Suo-Min, BAO Ai-Ke, ZHANG Jin-Lin*

Key Laboratory of Grassland Agro-Ecosystem, Ministry of Agriculture, College of Pastoral Agricultural Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: LEA (late embryogenesis abundant) proteins will be induced in plants under stress conditions. The overexpression of LEA proteins can reduced plant injure by stress. In current paper, the types, features and functions, gene structure, expression and regulation of LEA proteins, and the relationship among *LEA* gene expression, LEA protein accumulation and plant stress tolerance were summarized.

Key words: LEA proteins; gene expression; stress conditions; stress tolerance

植物赖以生存的环境并不总是适宜的, 干旱、高温、低温、土壤盐碱化和矿质元素过多或过少等都会制约植物生长, 降低产量。为了适应各种胁迫, 植物在长期的进化过程中, 发展了各种不同的生理生化机制, 以抵抗和适应各种胁迫(山仑和陈培元 1998)。当植物受到逆境胁迫后, 自身会合成一系列的功能蛋白来减轻对其造成的伤害, 在受非生物胁迫诱导的植物细胞保护蛋白中, 关于LEA蛋白(late-embryogenesis-abundant protein)的研究备受关注(Shinozaki 和 Yamaguchi-Shinozaki 2007; 王静英等 2008; Hundertmark 和 Hinch 2008)。LEA蛋白是胚胎发生后种子中大量积累的一系列蛋白质, Dure等(1981)最早在胚胎发育后期的棉花(*Gossypium hirsutum*)子叶中分离到了一组丰富的mRNA, 命名为LEA mRNA, 它翻译的产物即为LEA蛋白。LEA蛋白是在种子发育过程中逐渐形成的, 通常在胚胎发育晚期的特定阶段表达, 一般到萌芽期时, LEA mRNA和LEA蛋白就会逐渐降解(张林生和赵文明 2003; Swire-Clark 和 Marcotle 1999)。继棉花之后, 在小麦(*Triticum aestivum*) (Ried和Walker-Simmons 1993)、大豆(*Glycine max*) (Hsing 等 1995)、番茄(*Lycopersicon esculentum*) (Zegzouti 等 1997)、玉米(*Zea mays*) (Campbell 等 1998)等几十

种高等植物, 以及苔藓(*Physcomitrella patens*) (Minami 等 2005)和蛭形轮虫(*Philodina roseola*) (Tunnacliffe 等 2005)中都检测到LEA蛋白。多数LEA蛋白相对分子量较小, 为10~30 kDa (Dure 等 1989), 但LEA蛋白是一个大的家族, 仅拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中就有50多种(Bies-Etheve等 2008)。LEA蛋白除了在种子中表达外, 花粉管和营养组织中都能积累(Battaglia 等 2008)。在水分胁迫下, 豆类幼苗各组织均可产生此类蛋白, Ried和Walker-Simmons (1993)发现, 小麦失水90%后, 其幼苗、嫩茎和盾片中均能检测到第3族LEA基因转录。用外源ABA胁迫或低温处理番茄离体胚和根、茎、叶等营养组织, 都能诱导出特异LEA mRNAs和LEA蛋白(Bray 1993), 因此LEA蛋白诱导表达无组织特异性(张林生和赵文明 2003)。一般认为, LEA蛋白主要存在于细胞质、细胞核、内质网、线粒体和叶绿体中(刘昀等 2010)。如

收稿 2010-07-26 修定 2010-08-25

资助 国家自然科学基金(30700562, 30770347)、教育部“春晖计划”合作科研项目(Z2008-1-62004)和中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2010-2)。

* 通讯作者(E-mail: jlzhang@lzu.edu.cn; Tel: 0931-8913447)。

Colmenero-Flores 等(1999)在单子叶和双子叶植物幼苗中检测到的 Pvlea-18 基因编码的 14 kDa 蛋白和玉米胚中的 Rab17 蛋白存在于细胞质和细胞核中 (Goday 等 1994); 桑树 (*Morus bombycis*) 的 WAP27 蛋白位于内质网上 (Ukaji 等 2001); 豌豆 (*Pisum sativum*) 的 LEAM (LEA3) 蛋白存在于种子细胞的线粒体基质中 (Grelet 等 2005); 拟南芥的 Cor15 蛋白和小麦的 Wcs19 蛋白都位于叶绿体内 (Nakayama 等 2007; Dong 等 2002)。LEA 蛋白富含甘氨酸、赖氨酸等亲水氨基酸, 疏水氨基酸含量很少, 它最显著的理化性质是高亲水性和热稳定性, 在煮沸的条件下也能保持水溶状态 (Close 等 1989; Battaglia 等 2008)。

1 LEA 蛋白的种类、特性和功能

随着 LEA 蛋白研究的深入, 植物材料的增多, 家族成员的不断扩充, 其分类标准有所不同。Dure 等(1989)根据 LEA 蛋白序列保守结构将 LEA 蛋白分成三类: 第一类是小麦和玉米的 *Em* 基因产物; 第二类是 RAB (responsive to ABA) 和脱水素 (dehydrin) 基因的产物 (脱水素等); 第三类是其他 LEA 基因产物, 如胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 的 DC3 和 DC8、大麦 (*Hordeum vulgare*) 的 PHVal 以及玉米的 MLG3 基因的表达产物 (Dure 等 1989; Robertson 和 Chandler 1992; Thomann 等 1992)。Ingram 和 Bartels (1996) 根据氨基酸序列的同源性和一些特殊的基元序列, 将 LEA 蛋白分为 6 族, 即 D19 LEA (1 族)、D11 LEA (2 族)、D7 LEA (3 族)、D113 LEA (4 族)、D29 LEA (5 族) 和 D95 LEA (6 族)。

第 1 族 LEA 蛋白具有多拷贝串联的 20 个亲水性氨基酸残基组成的保守序列 GGETRKEQLGEE-GYREMGRK, 该序列富含高比例的带电荷氨基酸, 这些氨基酸占全序列的 20%~40%, 采用紫外吸收和圆二色谱 (CD) 分析, 证明在生理条件下, 70% 的多肽可形成随机螺旋, 比大多数球蛋白亲水性更强 (Wise 和 Tunnacliffe 2004; Espelund 等 1992)。该族蛋白质的大量无规则卷曲有利于与水分子结合, 有较高的水合能力, 可以作为水分结合蛋白防止细胞内水分子的丧失和高浓度的钠离子和氯离子对细胞的毒害 (Hollung 等 1994; Stacy 和 Aalen 1998)。另外, 此族蛋白对胚乳发育和植物生长器官的渗透胁迫有保护作用 (Swire-Clark 和 Marcotle 1999)。

棉花的 LEA D19、小麦的 *Em* 和拟南芥的 ALE 等都属于第 1 族蛋白。

第 2 族 LEA 蛋白也称为脱水素, 也是一类亲水性蛋白质, 它们在胚胎发生后期阶段产生, 对低温、外源 ABA、干旱、盐渍以及脱水胁迫反应迅速, 进而在植株中积累。其一级结构特征是在 C2 末端或附近具有富含赖氨酸的高度保守基元序列, 也称 K2 片段, 大约由 15 个氨基酸残基 (EKKGIMDKI-KEKLPG) 组成, 不同的脱水素包含 1~11 个拷贝 K-片段。Y-片段是 N-末端的一些保守序列, 通常含有 1~3 个串联拷贝。许多脱水素还含有成串的丝氨酸区, 称 S 片段 (S segment), 共有序列为 SSSSSS (SS) (Close 1997)。该族蛋白的作用可能有两个: (1) 在植物受到干旱胁迫时, 可部分代替水分子, 多羟基能保持细胞液处于溶解状态, 从而避免细胞结构的塌陷, 稳定细胞结构, 尤其是膜结构 (Danyluk 等 1998)。(2) 分子伴侣和亲水性溶质的作用, 遇到水分胁迫时能稳定和保护蛋白质的结构, 这些都与植物抗旱性密切相关 (Ingram 和 Bartels 1996; Close 1997)。大豆的 ZLDE-2 和棉花的 LEA D11 属于第 2 族蛋白。

第 3 族 LEA 蛋白通常含有多个拷贝的 11 个氨基酸组成的基元序列 (TAQAAKEKAGE) (Baker 等 1988)。在植物脱水时提供一个具有疏水条区的亲水表面, 螺旋的疏水面可形成同型二聚体, 同型二聚体随着外部离子浓度增强而改变方向, 处在亲水表面的带电基团可螯合细胞脱水过程中浓缩的离子, 如 Na^+ 和 PO_4^{3-} (Dure 1993)。这一族 LEA 蛋白大小差异较大, 所含基元序列的拷贝数少的只有 5 个, 像棉花 LEA D7 蛋白 (Dure 等 1989), 多则几十个, 像油菜 LEA 76 蛋白有 13 个重复基元数 (Dure 1993), 大豆 cDNA pGmPM8 和 pGmPM10 编码蛋白含有 30 个相连的基元序列 (Hsing 等 1995)。该族蛋白可依其基元序列的羧基端有无特定的氨基酸延伸区段, 分为两种类型, 一类是 11 个氨基酸组成的重复基元序列被与之相似的序列所分离, 称第 3 族 LEA 蛋白 I, 另一类是在羧基末端被特定氨基酸延伸区段的出现而分隔, 称第 3 族 LEA 蛋白 II (Curry 和 Walker-Simmons 1993)。组成该族蛋白的大多数氨基酸残基为碱性和亲水性氨基酸, 无半胱氨酸和色氨酸, 这些高电荷的氨基酸残基可以重

新定向细胞内的水分子, 束缚盐离子, 从而避免干旱胁迫时细胞内高浓度离子的累积所引起的损伤, 同时也可防止组织过度脱水(Dure 1993; Ingram 和 Bartels 1996)。但是对于第3族LEA蛋白的详细功能及其在细胞中的生理作用说法不一, 还有待进一步的研究。

第4族LEA蛋白缺乏重复的基元序列, 但它们都含有一个比较保守的N2末端区域, 该区域可形成兼性 α -螺旋, 这种螺旋可起束缚离子的作用或形成一种保护结构, 在干燥脱水时, 保护膜稳定性, 以代替水的作用(Ingram 和 Bartels 1996; Bray 1993)。其中棉花LEA14、D113和玄参科植物(*Craterostigma plantagineum*) CpC2 (Ditzer 和 Bartels 2006)属于该族LEA蛋白。

第5族LEA蛋白包括拟南芥AtECP31、胡萝卜DcEC31、柑橘(*Citrus unshiu*) CuLEA5和棉花LEA D34等(俞嘉宁和山仑 2002)。该族蛋白与第3族D7的序列相比, 每个氨基酸化学性质类似, 但缺乏高度的残基专一性, 该族LEA蛋白在结合细胞脱水过程中有浓缩离子的作用(Ingram 和 Bartels 1996; Bray 1993)。例如D29的每个蛋白质分子具有62个负电荷位点和57个正电荷位点, 具有较强的离子束缚能力(Baker 等 1988)。

第6族LEA蛋白包括棉花的LEA D95和辣椒的CaLEA6 (Kim 等 2005), 此族为附加族, 研究较少。

2 LEA 基因结构及其表达调控

LEA基因作为ABA应答基因的一种, 在结构上同其他ABA应答基因类似, 含有真核生物基因的特征, 启动子区域有TATA Box和CAAT Box, Poly(A)端含1个至多个内含子。分子生物学研究表明, LEA基因的表达需要在基因结构上存在一个(或多个)激素感应区, 称为顺式作用元件, 位于基因的上游, 反式作用因子与之结合, 从而促进基因的转录(孙立平和李德全 2003)。通常胁迫诱导基因表达有3个基本步骤: (1)刺激感应; (2)信号放大和结合过程; (3)对某些基因表达形成响应(张林生和赵文明 2003)。许多研究表明, LEA基因在组织和器官水平上的表达没有特异性, 因为该基因可以在种子的子叶和花序中表达, 也可以在根、茎和叶等营养体中表达(Shao 等 2005; Federspiel 2000; Bent

2000)。高等植物在应对不断变化的外界环境过程中, 在不同水平上形成许多适应机制, 非常重要的机制之一就是在长期自然选择和人工选择的进化过程中形成的LEA基因的表达调控机制(Shao 等 2005)。以干旱胁迫为例, 它能导致特异基因表达水平的显著变化, 即增加和减少, 这些量变是由许多不同的, 可能是交叉的信号转导途径调节的(Rock 2000; Hsiao 1973)。柽柳(*Tamarix*) LEA基因在酵母细胞中的表达受半乳糖诱导, 其表达量在诱导12~24 h后达到最高水平; 转基因酵母细胞在高温、NaHCO₃、紫外线辐射、NaCl、干旱和冷冻胁迫下较对照具有更高的成活率(Wang 等 2008)。Yamaguchi-Shinozaki等(1995)提出了一个不同信号途径激发干旱诱导基因表达的模式, 即干旱基因表达至少存在3种不同的诱导方式: ABA依赖型、ABA诱导型和非ABA应答型, Shao等(2005)的研究结果进一步支持了这种分类方式。

2.1 ABA依赖型的基因表达 ABA依赖型的基因表达取决于内源ABA积累或者外源ABA水平(Shao 等 2005)。在依赖ABA的途径中, 水分胁迫诱导基因的表达必须有ABA的参与, 但不需要特殊蛋白质的合成(Ingram 和 Bartels 1996; Bray 1993; Shinozaki 和 Yamaguchi-Shinozaki 1997), 这些渗透胁迫诱导基因的启动子区域含有潜在的ABA应答元件(ABA-responsive element, ABRE), 其保守序列为PyACGTGGC, ABRE在ABA调节的基因表达中起顺式作用DNA元件的功能, 调节在各种条件下的基因表达(俞嘉宁和山仑 2002)。植物遭受干旱和高盐胁迫时, 内源ABA水平增加, 如干旱胁迫诱导黎豆积累的ABA比未受胁迫的植株高160倍(Skriver 和 Mundy 1990)。

2.2 ABA诱导型的基因表达 多数干旱诱导基因是由ABA诱导的(Shinozaki 和 Yamaguchi-Shinozaki 1997), 如拟南芥干旱诱导基因RD22 (responsive to dehydration), 它的一个67 bp区域对于基因的表达是必需的, 并且这个启动子包含有编码几个保守的DNA-结合蛋白的DNA序列: 类-MYC和类-MYB, 它们与ABA诱导基因的表达调控有关(Shinozaki 和 Yamaguchi-Shinozaki 1996; Yamaguchi-Shinozaki 等 1995)。此外, 小麦EmPB21蛋白(Tarczynski 等 1993)、拟南芥ABA不敏感基因ABI1 (ABA insen-

sitive 1)编码的一个蛋白磷酸酶(Leung等1994)和转录因子VP1 (viviparous 1) (McCarty等1991)等都可能是参与ABA调节作用的蛋白质。

2.3 非ABA应答型 在*aba* (ABA-缺乏)或*abi* (ABA-不敏感)的拟南芥突变体中,许多基因受干旱、高盐和冷胁迫诱导,表明这些基因在胁迫条件下的表达不需要ABA,但却对外源ABA产生应答(Bray 1993; Shinozaki和Yamaguchi-Shinozaki 1997; Ingram和Bartels 1996; Thomashow 1998)。其中*rd29A* (*lfi78*和*cor78*)基因的表达,不仅受干旱和高盐胁迫的诱导,也受低温胁迫的诱导(俞嘉宁和山仑 2002)。脱水应答元件(dehydration responsive element, DRE)是一个96 bp的保守序列TACCG-ACAT,它对于*rd29A*的诱导是必需的,但作用和ARBE不同(兰英 2004)。目前在干旱、低温和高盐胁迫下诱导表达的基因如*Kin1*、*cor6.6* (*Kin2*)和*cor47* (*rd17*)的启动子中也发现了与DRE有关的单元(Shinozaki和Yamaguchi-Shinozaki 1996; 娄成后和王学臣 2000)。有一些干旱诱导基因(*rd19*、*rd21*和*erd1*)对冷和ABA处理都不应答,表明在脱水胁迫应答中可能存在第4条途径(兰英 2004)。

*LEA*基因的表达除了受ABA的调控外,还受到胚胎发育阶段、脱水信号、光照等的调控(宋松泉等 1999; 俞嘉宁和山仑 2002)。像*LEA*基因在种子、胚胎(包括体细胞胚胎)成熟与干燥过程中的表达(崔凯荣等 2001),植物的营养组织在受到脱水胁迫时也会诱导*LEA*基因的表达(Ried和Walker-Simmons 1993), Dunaeva和Adamska (2001)报道拟南芥叶片*LEA*蛋白的表达在光胁迫下也会增强。

3 LEA蛋白与植物抗逆性

由于*LEA*蛋白存在多种功能,与植物的抗逆性有密切关系。如未发育成熟的小麦胚在体外培养时并不积累*LEA*蛋白,但若在培养基中加入ABA或施加渗透胁迫条件,则可诱导*LEA*蛋白的产生(Baker等 1988);在高温条件下, Mtwisha等(1998)从酿酒酵母提取物中发现了*LEA*类蛋白。目前,人们已经通过各种分子生物学手段,发现植物营养组织遭受逆境胁迫后,会产生许多新的mRNA和蛋白质,其中相当大的一部分与*LEA*蛋白有同源性(张林生和赵文明 2003)。

3.1 与植物抗旱性 高等植物在复杂多变的环境中

生长,阵发性和短暂性干旱经常发生,影响其正常的生长与发育(张林生和赵文明 2003)。*LEA*蛋白有较高的亲水性,能够把足够的水分捕捉到细胞内,保护细胞免受水分胁迫的伤害(Ingram和Bartels 1996)。在水分缺乏时,此种蛋白在细胞中像可溶性糖一样,有增强束缚水的作用,植物严重脱水受害是由于水分损失导致细胞结构凝结,细胞膜结构受到伤害之故,而*LEA*蛋白则能削弱这种伤害(张林生和赵文明 2003)。Baker等(1988)认为D29 *LEA*蛋白(也存在于D7 *LEA*中)含有由11个氨基酸组成的重复基元序列,此种序列可形成氨基酸盐桥,可充实蛋白质结构,提高细胞液中的离子强度,从而可抵抗或减轻干旱引起的伤害。在缺水条件下, D13 *LEA*蛋白能“溶解”在细胞质的结构中,这些结构能与水产生结合力,有增强束缚水的作用。Gal等(2004)采用RNA干扰技术敲除线虫*Ce-lea-1*基因后,发现它的耐脱水胁迫能力显著下降。Xiao等(2007)将*OsLEA3-1*在水稻中超表达后,植株在大田中表现出抗旱性。Wang等(2009)将小麦*LEA*蛋白基因*TaLEA3*在中华羊草(*Leymus chinensis*)中超表达后,发现其抗旱性显著提高。刘祥久等(2005)用开苞导入法将抗旱耐盐基因*HVA1*和碱蓬、芦苇的DNA导入到稳定的玉米自交系中,通过对其后代进行抗旱性鉴定,发现各自交系的抗旱能力有所提高。Sivamani等(2000)将*HVA1*基因cDNA导入到春小麦中,获得了在缺水条件下生物量和水分利用效率俱佳的转基因小麦。王健萱(2006)用基因枪将含有*HVA1*的质粒pBY520转化玉米愈伤组织,经研究发现外源基因的转化提高了玉米植株的抗旱性。此外,耐脱水复活植物在脱水状态下,*LEA*有关的蛋白家族被诱导产生,使其能够较长时间存活,重新复水后几个小时内可完全恢复生理活性(Ingram和Bartels 1996)。但也有相反的报道,如从耐脱水复活植物分离出一个第3族*LEA*基因*PcC3-06*,将其转到烟草中过表达,但转基因烟草的抗旱性并没有得到提高(Iturriaga等 1992)。

3.2 与植物抗盐性 大量转基因实验表明,*LEA*蛋白对植物抵抗盐胁迫具有重要作用。强耐盐作物黎豆(*Vigna unguiculate*)受高盐胁迫、水分胁迫和外源ABA处理都能诱导出与第2族*LEA*蛋白相关的cPRD22 (Luchi等 1996; Xu等 1996; Thomas和

Eamus 1999; 谭云等 2001)。郑易之研究小组首次使用大肠杆菌表达体系鉴定了 LEA 蛋白的耐盐功能, 将大豆 *PM2*、*PM11* 和 *PM30* 基因分别转化大肠杆菌, 重组菌在高盐下的存活率明显高于对照菌 (Liu 和 Zheng 2005; Lan 等 2005)。陈火英等(2004)利用自花授粉形成的花粉通道, 分别将番茄耐盐野生近缘种的总DNA及含HVA1基因的pBY520质粒DNA导入栽培番茄‘鲜丰’和‘矮黄’, 获得了一批农艺性状优良的耐盐新品种。Xu等(1996)将 *HVA1* cDNA 全序列导入水稻, 结果表明 *HVA1* 基因在转基因水稻的根和叶中都有很高的表达量, 同时转基因植株对盐胁迫的耐受性明显增强, 从而证明了 LEA3 蛋白在植物抵御盐胁迫中的作用。Zhang 等(2000)证明转化酵母细胞中 *HVA1* 基因的超表达可提高其对高盐及低温胁迫的耐受性。赵咏梅等(2006)将小麦的第3族基因 *TaLEA2* 在拟南芥中表达后, 转基因植株在 0.8% NaCl 上表现出显著增强的抗逆性。Cheng 等(2002)将小麦的 *PMA1959* 和 *PMA80* 导入水稻, 刘甜甜等(2006)将怪柳 *LEA* 基因转入烟草, 都获得了具有明显耐盐性的转基因植株。兰英(2004)分别将大豆的 *LEA1*、*LEA2* 和 *LEA3* 基因转化烟草, 转基因植株抗盐性显著提高。蔡丹等(2006)将大豆 *Em* 基因转化大肠杆菌, 证明了大豆 *Em* 蛋白的过量表达可提高重组菌耐盐性有直接的贡献; 再利用根癌农杆菌介导法将此基因转入烟草, 转基因植株在 NaCl 培养基上的生长状况好于对照植株。Park 等(2005)将甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 的 *LEA* 基因 *ME-LEA N4* 转到生菜 (*Lactuca sativa* L.) 中, 在盐胁迫下表现出比野生型生菜更强的抗性。张妍等(2005)对转 *LEA3* 基因水稻植株进行了抗渗透胁迫能力分析, 结果显示, 在相同的胁迫条件下, 转基因植株的苗高、根长、离体叶片保水率、叶绿素含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量和 SOD 活性均高于未转化的对照植株, 表明转 *LEA* 基因水稻对高盐和干旱胁迫有较强的抗性。

3.3 与植物抗寒性 在受到冷胁迫时, 第2族酸性 LEA 蛋白 CO410_WHEAT (WCOR410) 在原生质膜和冻害植物组织中大量积累 (Danyluk 等 1998), 小麦中的 LEA-D11 蛋白 (Ohno 等 2003)、拟南芥中的 COR47 (Hundertmark 和 Hinch 2008) 和大麦的

HAV1 (Dalal 等 2009) 都大量表达。桑树可产生具有 12 个 11-氨基酸重复序列的蛋白质 WAP27, 它可能通过减少内质网的流动性, 参与了薄壁组织细胞的抗寒过程 (Ukaji 等 2001)。菠菜在冷害中容易脱水并产生一种低温诱导蛋白 COR85, 属于第2族 LEA 蛋白 (Kazuoka 和 Oeda 1994)。小球藻 C-27 品系可产生低温诱导蛋白 HiC6, 它与甘蓝型油菜 LEA76 (一种 LEA3 蛋白) 高度相似 (Joh 等 1995)。Imai 等 (1996) 将番茄 LEA25 基因转入酵母中, Zhang 等 (2007) 将高山离子芥 (*Chorispora bungeana*) 的 *LEA* 基因 *CbLEA* 成功转入烟草, Yin 等 (2006) 将马铃薯 (*Solanum soganandinum*) 的第2族 LEA 蛋白 DHN24 转入黄瓜 (*Cucumis sativus*), 转基因株系的抗寒性都显著提高。另外, 林世杰等 (2006) 对转怪柳 *LEA* 基因烟草进行了耐低温分析, 在 0 °C 胁迫条件下, 未转基因对照烟草的相对电导率和丙二醛含量明显高于转基因烟草; 大棚盆栽烟草在 -4 °C 条件下, 各转基因烟草的相对电导率和丙二醛含量与 0 °C 胁迫时变化不大, 但未转基因对照烟草相对电导率高于 0 °C 胁迫的 25.2%, 丙二醛含量高于 0 °C 胁迫的 59.29%, 结果表明, 怪柳 *LEA* 蛋白基因的导入提高了烟草的耐低温能力。

4 结语

LEA 蛋白与植物的抗逆性密切相关, 是一种多功能的逆境蛋白, 可以使高等植物在极端条件下维持正常的生命代谢活动, 但是对其参与植物抗逆的分子机制并不十分清楚, 对其结构和功能的了解尚不完善, 并且存在很多争议。目前主要有两方面的工作: (1) 从模式植物当中选择突变基因。(2) 分析植物 *LEA* 蛋白基因对逆境胁迫的响应。今后工作重点可以放在以下几个方面: (1) 利用分子生物学手段, 进一步确认 *LEA* 蛋白参与植物抗逆的分子机制。(2) 从抗逆性强的植物中筛选更多的 *LEA* 蛋白基因, 通过基因表达模式分析, 异源表达, 突变体检测等方法探究其功能。(3) 利用基因工程技术, 将筛选出的 *LEA* 蛋白基因转入栽培作物中, 培育出新的转基因品种, 这对提高植物的抗逆性和增加逆境下的作物产量均有重要意义。

参考文献

蔡丹, 郑易之, 兰英 (2006). 大豆 *LEA* 蛋白 *Em* 的表达可提高大肠杆菌和烟草耐盐性. 深圳大学学报, 23 (3): 230~236

- 陈火英, 张建华, 庄天明, 张晓宁(2004). 利用花粉管通道技术培育番茄耐盐新种质. 西北植物学报, 24 (1): 12~16
- 崔凯荣, 刑更生, 周克功, 刘新民, 王亚馥(2001). 体细胞胚发生的生化基础. 生命科学, 13 (1): 28~33
- 兰英(2004). 大豆 *LEA* 基因的克隆及其抗旱、耐盐功能的研究 [博士论文]. 长春: 东北师范大学
- 林世杰, 李俊涛, 姜静, 白爽, 于影, 赵鑫, 王玉成(2006). 转柽柳晚期胚胎富集蛋白基因烟草的耐低温性分析. 生物技术通讯, 17 (4): 563~566
- 刘甜甜, 于影, 赵鑫, 刘桂丰(2006). 转 *LEA* 基因烟草的 NaHCO_3 抗性分析. 分子植物育种, 4 (2): 216~222
- 刘祥久, 姜敏, 张喜华, 杨立国, 郭延玲, 郝楠(2005). 用开苞导入法将抗旱耐盐基因导入玉米自交系的初步研究. 杂粮作物, 25 (3): 134~135
- 刘响, 刘国宝, 李冉辉, 邹永东, 郑易之(2010). 胚胎晚期富集蛋白与生物的干旱胁迫耐受性. 生物工程学报, 26 (5): 569~575
- 娄成后, 王学臣(2000). 植物渗透胁迫调节基因表达的调控. 作物产量形成的生理学基础. 北京: 中国农业出版社, 87~94
- 山仑, 陈培元(1998). 旱地农业生态生理基础. 北京: 科学出版社, 6, 18
- 宋松泉, 陈玲, 傅家瑞(1999). 种子脱水耐性与 *LEA* 蛋白. 植物生理学通讯, 35 (5): 424~431
- 孙立平, 李德全(2003). *LEA* 蛋白的分子生物学研究进展. 生物技术通报, 6: 5~8
- 谭云, 叶庆生, 李玲(2001). 植物抗旱过程中 ABA 生理作用的研究进展. 植物学通报, 18 (2): 197~201
- 王健莹(2006). 用基因枪法将大麦胚胎发生晚期丰富基因 *HVA1* 转化玉米的研究 [硕士论文]. 北京: 中国农业大学
- 王静英, 李永春, 尹钧, 刘昊英, 司志飞(2008). 干旱胁迫下植物的信号转导及基因表达研究进展. 中国农学通报, 24 (1): 271~275
- 俞嘉宁, 山仑(2002). *LEA* 蛋白与植物的抗旱性. 生物工程进展, 22 (2): 10~14
- 张林生, 赵文明(2003). *LEA* 蛋白与植物的抗旱性. 植物生理学通讯, 39 (1): 61~66
- 张妍, 王瑛, 梁玉玲, 朱宝成(2005). 转 *LEA3* 基因水稻的抗性分析. 河北农业大学学报, 28 (5): 33~36
- 赵咏梅, 杨建雄, 俞嘉宁, 原江锋(2006). 小麦耐逆基因 *-TaLEA₂* 转化拟南芥的研究. 西北植物学报, 26 (1): 1~6
- Baker J, Steele C, Dure III L (1988). Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol*, 11: 277~291
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008). The enigmatic *LEA* proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*, 148 (1): 6~24
- Bent AF (2000). *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol*, 124: 1540~1547
- Bies-Etheve N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the *LEA* (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 67 (1-2): 107~124
- Bray EA (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol*, 103: 1035~1040
- Campbell SA, Crone DE, Ceccardi TL, Close TJ (1998). A ca. 40 kDa maize (*Zea mays* L.) embryo dehydrin is encoded by the *dhn2* locus on chromosome 9. *Plant Mol Biol*, 38 (3): 417~423
- Cheng ZQ, Targolli J, Huang XQ, Wu R (2002). Wheat *LEA* genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed*, 10: 71~82
- Close TJ (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 100: 291~296
- Close TJ, Kortt AA, Chandler PM (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol Biol*, 13: 95~108
- Colmenero-Flores JM, Moreno LP, Smith CE, Covarrubias AA (1999). *Pvlea-18*, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol*, 120 (1): 93~104
- Curry J, Walker-Simmons MK (1993). Unusual sequence of group 3 *LEA* (II) mRNA inducible by dehydration stress in wheat. *Plant Mol Biol*, 21 (5): 907~912
- Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, Bansal KC (2009). Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 *LEA* from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *J Biotech*, 139 (2): 137~145
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10: 623~638
- Ditzler A, Bartels D (2006). Identification of a dehydration and ABA-responsive promoter regulon and isolation of corresponding DNA binding proteins for the group 4 *LEA* gene *CpC2* from *C. plantagineum*. *Plant Mol Biol*, 61: 643~663
- Dong CN, Danyluk J, Wilson KE, Pocock T, Huner NPA, Sarhan F (2002). Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol*, 129 (3): 1368~1381
- Dunaeva M, Adamska I (2001). Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur J Biochem*, 268 (21): 5521~5529
- Dure L (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J*, 3 (3): 363~369
- Dure L, Crouch M, Harada J Thd Ho, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR (1989). Common amino acid sequence domains among the *LEA* proteins of higher plants. *Plant Mol Biol*, 12: 475~486
- Dure L, Greenway SC, Galau GA (1981). Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*, 20 (14): 4162~4168
- Espelund M, Sæbøe-Larsen S, Hughes DW, Galau GA, Larsen F,

- Jakobsen KS (1992). Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *Plant J*, 2 (2): 241~252
- Federspiel N (2000). Deciphering a weed. Genomic sequencing of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124: 1456~1459
- Gal TZ, Glazer I, Koltai H (2004). An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Lett*, 577 (1-2): 21~26
- Godoy A, Jensen AB, Culiñez-Macia FA, Alba MM, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pages M (1994). The maize abscisic acid responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell*, 6 (3): 351~360
- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH, Grunwald D, Macherel D (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol*, 137: 157~167
- Hollung K, Espelund M, Jakobsen KS (1994). Another *Lea* B19 gene (Group 1 *Lea*) from barley containing a single 20 amino acid hydrophilic motif. *Plant Mol Biol*, 25: 559~564
- Hsiao TC (1973). Plant responses to water stress. *Annu Rev Plant Physiol*, 24: 519~570
- Hsing YC, Chen ZY, Shih MD, Hsieh JS, Chow TY (1995). Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. *Plant Mol Biol*, 29: 863~868
- Hundermark M, Hinch DK (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9: 118
- Imai R, Chang L, Ohta A, Bray EA, Takagi M (1996). A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170: 243~248
- Ingram J, Bartels D (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 377~403
- Iturriaga G, Schneider K, Salamini F, Bartels D (1992). Expression of desiccation related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 20: 555~558
- Joh T, Honjoh K, Yoshimoto M, Funabashi J, Miyamoto T, Hatano S (1995). Molecular cloning and expression of hardening-induced genes in *Chlorella vulgaris* C-27: the most abundant clone encodes a late embryogenesis abundant protein. *Plant Cell Physiol*, 36 (1): 85~93
- Kazuoka T, Oeda K (1994). Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. *Plant Cell Physiol*, 35 (4): 601~611
- Kim HS, Lee JH, Kim JJ, Kim CH, Jun SS, Hong YN (2005). Molecular and functional characterization of *CaLEA6*, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Gene*, 344: 115~123
- Lan Y, Cai D, Zheng YZ (2005). Expression in *Escherichia coli* of three different soybean late embryogenesis abundant (LEA) genes to investigate enhanced stress tolerance. *J Integr Plant Biol*, 47 (5): 613~621
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chedford F, Giraudat J (1994). *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 264: 1448~1452
- Liu Y, Zheng Y (2005). PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 331: 325~332
- Luchi S, Yamaguchi-shinozaki K, Urao T, Terao T, Shinozaki K (1996). Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNA and analysis of the expression of corresponding genes. *Plant Cell Physiol*, 37 (8): 1073~1082
- McCarty DR, Hattori T, Carson CB, Vasil V, Lazar M, Vasil IK (1991). The *viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell*, 66: 895~905
- Minami A, Nagao M, Ikegami K, Koshiba T, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D (2005). Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta*, 220: 414~423
- Mtwisha L, Brandt W, McCready S, Lindsey GG (1998). HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol*, 37: 513~521
- Nakayama K, Okawa K, Kakizaki T, Honma T, Itoh H, Inaba T (2007). *Arabidopsis* Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant Physiol*, 144: 513~523
- Ohno R, Takumi S, Nakamura C (2003). Kinetics of transcript and protein accumulation of a low-molecular-weight wheat LEA D-11 dehydrin in response to low temperature. *J Plant Physiol*, 160: 193~200
- Park BJ, Liu ZC, Kanno A, Kameya T (2005). Increased tolerance to salt- and water- deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA. *Plant Growth Regul*, 45: 165~171
- Ried JL, Walker-Simmons MK (1993). Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*, 102: 125~131
- Robertson M, Chandler PM (1992). Pea dehydrins: identification, characterisation and expression. *Plant Mol Biol*, 19 (6): 1031~1044
- Rock CD (2000). Pathways to abscisic acid regulated gene expression. *New Phytol*, 148: 357~396
- Shao HB, Liang ZS, Shao MA (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 45: 131~135
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotech*, 7: 161~167
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997). Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol*, 115: 327~334
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene networks

- involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*, 58 (2): 221~227
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho THD, Qu R (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barely *HVA1* gene. *Plant Sci*, 155 (1): 1~9
- Skriver K, Mundy J (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2: 503~512
- Stacy RAP, Aalen RB (1998). Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 206: 476~478
- Swire-Clark GA, Marcotte WR (1999). The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiac*. *Plant Mol Biol*, 39 (1): 117~128
- Tarczyński MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, 259: 508~510
- Thomann EB, Sollinger J, White C, Rivin CJ (1992). Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. *Plant Physiol*, 99: 607~614
- Thomas DS, Eamus D (1999). The influence of predawn leaf water potential on stomatal responses to atmospheric water content at constant C_i and on stem hydraulic conductance and foliar ABA concentrations. *J Exp Bot*, 50: 243~251
- Thomashow MF (1998). Role of cold responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol*, 118: 1~7
- Tunnacliffe A, Lapinski J, McGee B (2005). A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia*, 546: 315~321
- Ukaji N, Kuwabara C, Takezawa D, Arakawa K, Fujikawa S (2001). Cold acclimation-induced WAP27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins. *Plant Physiol*, 126 (4): 1588~1597
- Wang BF, Wang YC, Zhang DW, Li HY, Yang CP (2008). Verification of the resistance of a *LEA* gene from *Tamarix* expression in *Saccharomyces cerevisiae* to abiotic stresses. *J Forestry Res*, 19 (1): 58~62
- Wang LJ, Li XF, Chen SY, Liu GS (2009). Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat *TaLEA3*. *Biotechnol Lett*, 31 (2): 313~319
- Wise MJ, Tunnacliffe A (2004). POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci*, 9 (1): 13~17
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2007). Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet*, 115: 35~46
- Xu DP, Duan XL, Wang BY, Hong BM, David Ho TH, Wu R (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 110 (1): 249~257
- Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Shinozaki K (1995). Regulation of genes that are induced by drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res*, 108: 127~136
- Yin ZM, Rorat T, Szabala BM, Ziolkowska A, Malepszy S (2006). Expression of a *Solanum sogarandinum* SK₃-type dehydrin enhances cold tolerance in transgenic cucumber seedlings. *Plant Sci*, 170: 1164~1172
- Zegzouti H, Jones B, Marty C, Lelievre JM, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (1997). ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Mol Biol*, 35 (6): 847~854
- Zhang H, Zhou RX, Zhang LJ, Wang RY, An LZ (2007). *CbLEA*, a novel LEA gene from *Chorispora Bungeana*, confers cold tolerance in transgenic tobacco. *J Plant Biol*, 50 (3): 336~343
- Zhang L, Ohta A, Takagi M, Imai R (2000). Expression of plant group 2 and group 3 *lea* genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA protein. *J Biochem*, 127 (4): 611~616