

胁迫诱导型启动子在植物抗逆基因工程中的应用

于壮, 朱丽萍, 邹翠霞, 李秋莉*

辽宁师范大学生命科学院, 辽宁大连 116029

Application of Stress-Induced Promoter in Plant Genetic Engineering

YU Zhuang, ZHU Li-Ping, ZOU Cui-Xia, LI Qiu-Li*

School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China

摘要:在抗逆基因工程中,大多采用的是组成型表达启动子,组成型表达启动子驱动外源抗逆基因表达虽然可以提高转基因植物的抗逆性,但会导致转基因植株生长迟缓或不育;而胁迫诱导型启动子则可提高转基因植物的抗逆性,不影响其正常生长发育,所以,胁迫诱导型启动子已逐渐用于植物抗逆基因工程。本文介绍不同胁迫诱导型启动子在植物抗逆基因工程中的应用。

关键词:胁迫诱导型启动子;植物抗逆性;基因工程

非生物胁迫包括干旱、高盐及极端温度(低温、高温)等环境因子。它们常通过影响植物叶片气孔开度、细胞壁或细胞膜成分的生理、生化过程对植物造成伤害,影响作物的产量和种植区域(Wang等2003)。随着环境的变化,未来人均的淡水可用性在逐渐减少,大约20%的水田受到高盐的影响(Flowers和Yeo1995)。植物在干旱、高盐及极端温度逆境条件下发生一系列生理生化及发育方面的应答反应来减少逆境对其细胞的损伤,并且某些基因表达也产生相应的变化,激活一系列逆境应答基因的表达,从而提高植物多方面的抗逆性,例如增加胁迫蛋白的产量、提高抗氧化剂基因的表达水平、增加可溶性物质的积累等(杨献光等2006)。

一般来说,大部分作物对逆境都非常敏感,即抗逆性较差。采用植物基因工程技术培育抗逆作物新品种一直是这一领域研究中的热点之一。人们已经用基因表达谱分析、比较基因组学分析和同源克隆等方法发现了一些抗逆基因及其等位基因,而且通过转基因方法有效地提高了作物的抗逆性(Bressan等2009)。Wang等(2007)报道,*CaMV* 35S启动子驱动玉米(*Zea mays*)钙调磷酸酶B类蛋白CBLs (calcineurin B-like proteins)在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中表达,在100~175 mmol·L⁻¹ NaCl处理后,与非转基因植株相比,转基因植株种子萌发和生根状态更好,说明转基因植株能更好地适应高盐逆境。Zhang等(2008)用*CaMV* 35S启动子驱动拟南芥*AtCYSa* (Cystatins)和*AtCYSb*的表达,

转基因拟南芥经过200 mmol·L⁻¹甘露醇处理后,生根明显好于非转基因植株,说明*AtCYSa*和*AtCYSb*在转基因植株中的过量表达可提高拟南芥的抗旱性。Wang等(2008)分析*CaMV* 35S启动子驱动水稻(*Oryza sativa*)脱水响应元件结合蛋白转录因子*OsDREB1F* (dehydration-responsive element-binding protein transcription factor)在拟南芥中表达结果显示,4℃下2d后,转基因拟南芥生长良好,非转基因植株则萎蔫死亡,说明转基因拟南芥中*OsDREB1F*的过量表达可提高拟南芥的抗寒性。

以上的转基因植物大部分采用的是组成型表达启动子(constructive promoter),而这种启动子虽然可以提高植物在逆境条件下的抗逆能力,但是有研究显示,正常条件下,烟草和马铃薯中组成型表达海藻糖-6-磷酸合酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)基因或海藻糖-6-磷酸酯酶(trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)基因对植物有负作用,如影响植株生长和生根等(Goddijn和Vam1999; Romero等1997; Pilon-Smits等1998)。*CaMV* 35S驱动拟南芥转录因子*AtWRKY18*在转基因拟南芥中的高表达是阻碍生长的,而且有些呈畸形发育(Chen和chen2002)。正常环境下,细胞内组成型表达抗逆蛋白是一种能量浪费,而且还可能导致植物的正常

收稿 2009-09-02 修定 2009-11-02
资助 国家自然科学基金(30871389)和辽宁省优秀人才资助项目(2009R36)。

* 通讯作者(E-mail: liqiuli@dl.cn; Tel: 0411-82158681)。

代谢受阻, 以致转基因植物的发育异常(Kasuga 等 1999)。解决此问题的方法一般采用逆境胁迫诱导型启动子(stress-inducible promoter), 用环境胁迫诱导型启动子与抗逆基因融合, 促使植物在逆境胁迫下表达相应的蛋白, 于是转基因植物即可更好地适应逆境胁迫(Kasuga 等 1999)。以下介绍胁迫诱导型启动子及其在植物抗逆基因工程中的应用。

1 *rd29A* 启动子

rd29A 启动子是一种干旱、盐碱、低温诱导表达的启动子, 其序列中含有 2 个与逆境胁迫应答有关的顺式作用元件 DRE (dehydration-responsive element), 是植物抗逆基因工程中理想的逆境诱导型启动子(Narusaka 等 2003)。Zhao 等(2007)报道, *rd29A* 驱动拟南芥 *DREB1A/CBF3* (C-repeat-binding factor) 在高羊茅(*Festuca arundinacea*)中表达, 干旱下 30 d 后, 非转基因植株全部萎蔫, 而转基因植株只有少部分萎蔫。重新补充水分后, 转基因植株可恢复正常生长, 而非转基因植株则不能恢复。这表明, 胁迫诱导型启动子 *rd29A* 可有效驱动 *DREB1A/CBF3* 的表达, 从而提高转基因植株的抗旱性。

赵恢武等(2000)研究 *rd29A* 驱动酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) *TPS* 在烟草中表达的结果表明, 植株生长到 4 个月左右后, 于干旱下处理 10 d, 非转基因植株明显萎蔫, 许多叶子枯黄, 而转基因植株受到的影响明显轻一些。这显示, 转基因烟草的耐旱性有所增强。

Roy 等(2008)用 *rd29A* 驱动芥菜(*Brassica juncea*)的 *gly I* (Glyoxalase I)表达后, 在 150 mmol·L⁻¹ NaCl 条件下, 转基因拟南芥的种子萌发率达到 75%, 而非转基因拟南芥的种子萌发率只有 15%。这表明, 转基因植株耐盐性有提高。

Zhuo 等(2007)研究拟南芥 *rd29A* 启动子驱动外源甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, *BADH*)基因在枫香(*Liquidambar formosana*)中的表达结果表明, 在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫条件下, 转基因植株与非转基因植株相比, *BADH* 表达明显上调。这显示, *rd29A* 启动子可驱动外源 *BADH* 在枫香中表达, 因而其抗盐能力增强。

Behnam 等(2007)报道, *rd29A* 启动子驱动拟南芥 *DREB1* 在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中表达后, 其抗寒性提高。Northern 杂交分析表明, 4 °C 条件下, 前 30 min 转基因马铃薯与非转基因马铃薯

DREB1 均没有表达, 30 min 后转基因马铃薯 *DREB1* 表达, 而非转基因马铃薯则没有表达。-20 °C 条件下, 1 min 内转基因马铃薯的 *DREB1* 表达, 而非转基因马铃薯没有表达。这表明, *rd29A* 启动子驱动 *DREB1* 在植物中的表达受低温诱导。

Gao 等(2005)分析拟南芥 *rd29A* 启动子与玉米 *Ubi* 启动子驱动大豆(*Glycine max*)脱水响应元件结合蛋白 *GmDREB* 在小麦中表达的结果表明, 10% 聚乙二醇处理 2 个星期后, 94% 的非转基因植株的叶子开始卷曲, 根系不发达, 而转基因植株则很少有此现象; 以 0.6% NaCl 处理后, 非转基因植株萎蔫, 而转基因植株则能存活。这说明 *rd29A* 启动子和 *Ubi* 启动子都能有效驱动 *GmDREB* 的表达, 从而提高转基因植株的抗盐与抗旱能力。

Kasuga 等(1999)将 *rd29A* 与 *CaMV 35S* 启动子驱动 *DREB1A* 在拟南芥中的表达进行对比的结果表明, 正常生长条件下, 转基因植株的抗逆性都提高, 但 *CaMV 35S* 启动子驱动的转基因拟南芥表现为生长延迟; 在胁迫条件下, 转 *rd29A* 启动子的拟南芥的生长受到的影响很小, 而且抗逆性更强于 *CaMV 35S* 启动子。Kasuga 等(2004)研究 *rd29A* 驱动 *DREB1A/CBF3* 在烟草中的表达显示, 正常条件下, *rd29A* 转基因烟草生长发育受到的影响极微, 而非转基因烟草则生长延迟。这些表明, 诱导型启动子驱动抗逆基因较小影响转基因植株的生长, 且能提高转基因植株的抗逆性。

Bhatnagar-Mathur 等(2007)报道, *rd29A* 驱动拟南芥转录因子 *DREB1A* 在花生(*Arachis hypogaea*)中的表达。*rd29A* 驱动的转基因植株与 *CaMV 35S* 驱动的转基因植株相比, 其长势良好(图 1), 致死率低。*rd29A* 驱动的转基因植株比非转基因植株的蒸腾效率高, 蒸腾作用弱。这表明, 诱导型启动子可驱动 *DREB1A* 在转基因植株中适时表达, 不影响其生长, 且可提高其抗旱性。

2 *SWPA2* 启动子

SWPA2 (sweetpotato peroxidase)启动子是具有氧化特性的干旱胁迫启动子。在多种胁迫条件下, *SWPA2* 启动子驱动的外源基因表达比 *CaMV 35S* 启动子更明显(Kim 等 2003)。Ahmad 等(2008)用 *SWPA2* 启动子驱动细菌中的胆碱氧化酶A (cholineoxidase A, *codA*)基因转化马铃薯的结果表明, 干旱处理后, 转基因马铃薯的水含量与干重比非转基因马铃薯高,

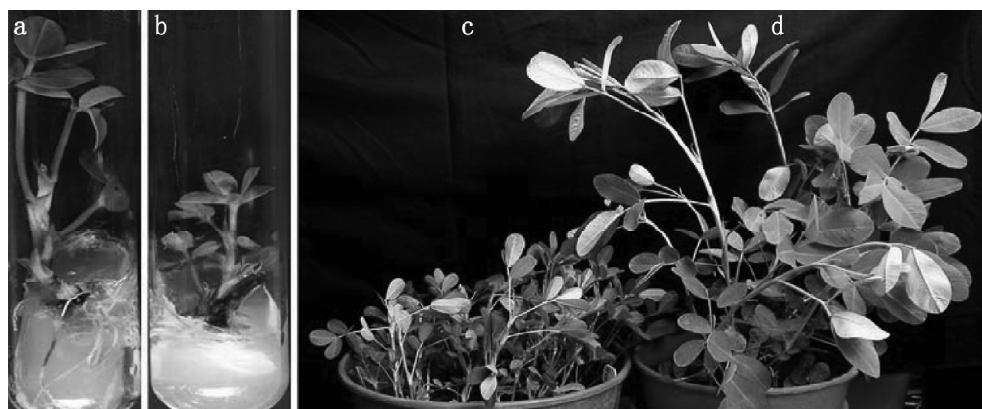


图1 试管培养和温室培养条件下的转 *CaMV 35S:DREB1A* 和 *rd29A:DREB1A* 基因植株的表型(Bhatnagar-Mathur 等 2007)。

a: 试管培养条件下转 *rd29A:DREB1A* 植株开始生根; b: 试管培养条件下转 *CaMV 35S:DREB1A* 植株不能生根, 株型矮小; c: 温室培养条件下含有 *CaMV 35S:DREB1A* 的转基因植株表现株型矮小; d: 温室培养条件下含有 *rd29A:DREB1A* 的转基因植株生长正常。

恢复浇水 7 d 后, 转基因植株可恢复生长, 而非转基因植株则不能恢复。Tang 等(2006)研究 *SWPA2* 启动子驱动 *Cu/Zn* 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)基因和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)基因在马铃薯中表达的结果显示, 42 °C 处理 10 h 后, 非转基因马铃薯已经萎蔫, 而转基因马铃薯植株仍然正常生长; 20 h 后, 转基因马铃薯的光合作用活性只下降了 6%, 而非转基因植株则下降了 29%。这些表明, *SWPA2* 可驱动外源基因在转基因植株中的表达, 提高转基因植株的抗寒性。

3 诱导型启动子 IND (6xABRE+2mini *CaMV 35S*) 和 *Pabp9*

陈铮等(2008)研究 *IND* (6xABRE+2mini *CaMV 35S*) 和 *Pabp9* 启动子分别驱动 *ABP9* 在拟南芥中表达的结果显示, 正常生长条件下, 两种诱导型启动子驱动 *ABP9* 表达的转基因拟南芥比组成型启动子驱动 *ABP9* 表达的转基因拟南芥根系生长良好(图 2), 这表明诱导表达可在一定程度上解除组成型表达所导致的生长延迟。

4 ABA 诱导启动子

ABA 诱导启动子来源于 ABA 响应复合物(ABA-response complex, ABRC3)。Fu 等(2007)报道, 玉米 *Ubi-1* 启动子和 ABA 诱导启动子驱动大麦(*Hordeum vulgare*)抗旱基因 *HVA1* 在匍匐型剪股颖(*Agrostis stolonifera* var. *palustris*)中表达, 在干旱条件下, ABA 诱导启动子和 *Ubi-1* 启动子驱动 *HVA1* 的转基因植株的相对含水量均高于非转基因植株, 转

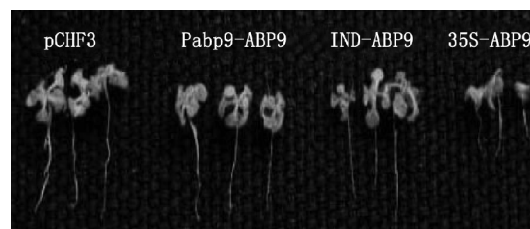


图2 正常条件下各转基因拟南芥株系的根系生长比较(陈铮等 2008)

pCHF3: 转空载体植株; Pabp9-ABP9: 含 *ABP9* 启动子植株; IND-ABP9: 含 *IND* 启动子植株; 35S-ABP9: 含 *CaMV 35S* 启动子植株。

基因植株均受到较小程度的损害, 转 ABA 诱导启动子植株受到的损害最小。这显示, ABA 诱导启动子能更有效地驱动 *HVA1* 在干旱条件下表达, 从而提高转基因植株的抗旱性。

Hsieh 等(2002a, b)分析 *CaMV 35S* 启动子驱动拟南芥 *CBF1* 在番茄(*Lycopersicon esculentum*)中表达的结果表明, 组成型过量表达 *CBF1* 虽然可提高番茄的抗逆性, 但却出现转基因番茄株型矮小、果实与种子数量减少的现象。为了让转基因番茄更优化, 其株型和产量受到的影响小, Lee 等(2003)研究大麦 *HAV22* 的 ABA-响应复合物(ABRC1)启动子驱动拟南芥 *CBF1* 在番茄中的表达, 结果显示, 缺水处理 4 个星期后, 非转基因植株的成活率为零, 而转基因植株的成活率为 83.3%~96.7%; 另外, 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 4 个星期后, 非转基因植株的成活率为零, 而转基因植株的成活率为 83.3%~96.7%。正常条件下, 转基因植株的果实和种子的数量以及

植株鲜重均与非转基因植株基本相同;而在冷、缺水和盐胁迫条件下,转基因植株果实和种子的数量以及植株鲜重均明显高于非转基因植株。这些表明,胁迫诱导启动子驱动胁迫应答基因的表达可提高转基因植株的抗逆性,且不影响植株生长和产量。

5 干旱诱导启动子 *OsLEA3-1*

LEA 是干旱和盐胁迫响应基因,其全长cDNA定义为*OsLEA3-1*,*OsLEA3-1*启动子是从旱稻(*Oryza sativa*) IRAT109中分离出来的。Xiao等(2007)用旱稻干旱诱导*OsLEA3-1*启动子、*CaMV35S*启动子和水稻*Actin1*启动子分别驱动*OsLEA3-1*在水稻中表达的结果显示,3种启动子驱动的转基因植株抗旱性均强于非转基因植株,其中*OsLEA3-1*启动子驱动的转基因植株抗旱性稍强于*CaMV35S*启动子。这表明,采用诱导型启动子驱动干旱响应基因表达更有利于提高转基因植株的抗旱性。

6 结语

干旱、高盐及极端温度导致全球农作物产量的损失巨大,采用基因工程技术改良作物的抗逆性是最为经济,也是最有前景的有效方法。近年来,胁迫诱导启动子的研究日益增多,胁迫诱导启动子可以驱动外源抗逆基因在转基因植物中的表达,并且能提高转基因植物的抗逆性,这与*CaMV35S*启动子的功能相同。胁迫诱导启动子有一个优点,这就是它能调节基因表达的时空性,促使外源基因在逆境胁迫条件下表达相应的蛋白,既节约能量,也不影响植物的正常生长发育,最终可以避免外源基因对植物的不良效应(如转基因植株的生长延迟和畸形发育),于是转基因植物抵抗逆境的能力提高。所以,胁迫诱导启动子驱动外源基因表达可能是未来这一领域研究的一种趋势和热点。总之,随着更多胁迫诱导启动子的发现,胁迫诱导启动子将会更广泛的用于植物抗逆基因工程的研究,进而应用于生产实践。

参考文献

陈铮, 邹维华, 张霞, 唐咏, 范云六, 赵军(2008). 转录因子 *ABP9* 基因在不同启动子驱动下对转基因拟南芥生长发育的影响. 中国农业科技导报, 10 (3): 58~63
杨献光, 梁卫红, 齐志广, 马闻师, 沈银柱(2006). 植物非生物胁迫应答的分子机制. 麦类作物学报, 26 (6): 158~161
赵恢武, 陈杨坚, 胡鸾雷, 高音, 林忠平(2000). 干旱诱导性启动子

驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性. 植物学报, 42 (6): 616~619
Ahmad R, Kim MD, Back KH, Kim HS, Lee HS, Kwon SY, Murata N, Chung WI, Kwak SS (2008). Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt, and drought stresses. *Plant Cell Rep*, 7: 687~698
Behnam B, Kikuchi A, Celebi-Toprak F, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Watanabe KN (2007). *Arabidopsis rd29A::DREB1A* enhances freezing tolerance in transgenic potato. *Plant Cell Rep*, 26: 1275~1282
Bhatnagar-Mathur P, Devi MJ, Reddy DS, Lavanya M, Vadez V, Serraj R, Yamaguchi-Shinozaki K, Sharma KK (2007). Stress-inducible expression of *AtDREB1A* in transgenic peanut increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. *Plant Cell Rep*, 26: 2071~2082
Bressana R, Bohnert H, Zhu JK (2009). Abiotic Stress Tolerance: From Gene Discovery in Model Organisms to Crop Improvement. *Mol Plant*, 2 (1): 1~2
Chen CH, Chen ZX (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY18*, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*, 129: 706~716
Flowers TJ, Yeo AR (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: where Next? *Austra J Plant Physiol*, 22: 875~884
Fu DL, Huang BR, Xiao YM, Muthukrishnan S, Liang GH (2007). Overexpression of barley *hva1* gene in creeping bentgrass for improving drought tolerance. *Plant Cell Rep*, 26: 467~477
Gao SQ, Xu HJ, Cheng XG, Chen M, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Du LP, Hao XY, Ma YZ (2005). Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress inducible transcription factor *GmDREB* of soybean. *Chinese Sci Bul*, 50 (23): 714~723
Goddijn OJM, van DK (1999). Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci*, 4: 315~319
Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002a). Heterology expression of the *Arabidopsis C-Repeat/Dehydration Response Element Binding Factor 1* gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol*, 129: 1086~1094
Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002b). Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol*, 130: 618~626
Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol*, 17 (3): 287~291
Kasuga K, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol*, 45 (3): 346~350
Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur YK, Bang JW, Kwak SS (2003). A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in

- transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol*, 51: 831~838
- Lee JT, Prasad V, Yang P T, Wu JF, David HTH, Charng YY, Chan MT (2003). Expression of *Arabidopsis CBF1* regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. *Plant Cell Environ*, 26: 1181~1190
- Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki k, Yamaguchi- Shinozaki K (2003). Interaction between two cis-acting elements, *ABRE* and *DRE*, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J*, 34 (2): 137~148
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, van DK, Voogd E, Verwoerd TC, Krutwagen RW et al (1998). Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J Plant Physiol*, 152: 525~532
- Romero C, Belles JM, Vaya JL, Serrano R, Cullianez-Macia FA (1997). Expression of the yeast *trehalose-6-phosphate synthase* gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 1: 293~297
- Roy SD, Saxena M, Bhomkar PS, Pooggin I, Hohn T, Bhalla-Sarin N (2008). Generation of marker free salt tolerant transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* using the *gly I* gene and *cre* gene under inducible promoters. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95: 1~11
- Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS (2006). Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Rep*, 25: 1380~1386
- Xiao BZ, Huang YM, Tang N, Xiong LZ (2007). Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the Weld conditions. *Theor Appl Genet*, 115: 35~46
- Wang MY, Gu D, Liu TS, Wang ZQ, Guo XY, Hou W, Bai YF, Chen XP, Wang GY (2007). Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. *Plant Mol Biol*, 65: 733~746
- Wang QY, Guan YC, Wu YR, Chen HL, Chen F, Chu CC (2008). Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol*, 67: 589~602
- Wang WX, Vinocur B, Altman A (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1~14
- Zhang XX, Liu SK, Takano T (2008). Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, *AtCYSa* and *AtCYSb*, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol Biol*, 68: 131~143
- Zhao JS, Ren W, Zhi DY, Wang L, Xia GM (2007). *Arabidopsis REB1A/CBF3* bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep*, 6: 1521~1528
- Zhuo RY, Qiao GR, Sun ZX (2007). Transgene expression in Chinese sweetgum driven by the salt induced expressed promoter. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 88: 101~107