

植物逆境胁迫耐受性启动子的研究进展

张晶红, 那杰*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116081

摘要: 逆境胁迫如干旱、极端温度、损伤等非生物胁迫和病虫害等生物胁迫严重影响植物的生长发育及产量。逆境胁迫耐受性启动子能够接受逆境条件下的诱导信号, 激活植物体内胁迫应答基因的表达, 使植物感知并适应逆境。本文对逆境胁迫耐受性启动子的克隆及功能研究情况进行综合分析, 主要包括抗旱、耐盐、耐高温、抗冻、耐损伤、抗病和抗虫基因启动子。

关键词: 胁迫; 抗逆启动子; 植物

Progress on Stress Tolerance Promoters in Plants

ZHANG Jing-Hong, NA Jie*

College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Liaoning, Dalian 116081, China

Abstract: Abiotic and biotic stresses, including drought, extreme temperature, damage and many diseases, seriously affected plants growth and yield. Stress-tolerance promoter could accept signals induced by stress conditions, and activate the expression of stress responsive gene in plants, enabling plants to perceive and adapt to adversity. In this article, current research on cloning and function of stress-tolerance promoters were reviewed, including drought-resistant, salt-tolerance, high-temperature-resistant, damage-tolerance, cold-resistant, disease-resistant and insect-resistant promoters.

Key words: stress; stress-tolerance promoters; plant

启动子(promoter)是DNA链上一段能与RNA聚合酶结合并能起始mRNA合成的序列, 主要由核心启动子区及其上游调控区组成。核心启动子区包含转录起始位点和TATA盒结构(RNA聚合酶的结合位点处之一, 决定转录起始的精确性)。上游调控区包括增强转录效率的CAAT盒及应答元件; 应答元件结合转录因子, 调控下游基因表达。

启动子分为组成型启动子(constitutive promoter)和特异性启动子(specific promoter), 组成型启动子在个体的任何细胞中都有表达, 如花椰菜花叶病毒CaMV35S启动子。特异性启动子又分为组织特异性和诱导特异性启动子。组织特异性启动子可调控基因只在某些特定的部位或器官中表达, 常表现出发育调节特性。诱导特异性启动子能够接受逆境条件下的诱导信号, 特异启动应答基因表达, 在植物体内产生大量的特异蛋白, 从而做出调节反应, 抵抗外界环境。

逆境胁迫如干旱、高温、低温、损伤等非生物胁迫和病虫害等生物胁迫严重影响植物的生长发育及产量, 甚至死亡。植物体内多种基因受逆境胁迫诱导, 而抗逆基因的表达受启动子所调

控。因此, 在抗逆基因工程中, 选择响应逆境胁迫的诱导性启动子(即胁迫耐受性启动子)构建植物表达载体, 用以驱动胁迫应答基因在植物体内定时、定位、定量表达, 是解决植物逆境胁迫问题的一个重要策略, 对于研究植物抗逆能力调控具有重要意义。

1 植物非生物胁迫耐受性启动子

1.1 抗旱基因启动子

干旱胁迫下, 细胞感知、转导水分胁迫信号, 诱导水分胁迫相关基因的表达。启动子控制的基因表达主要通过启动子顺式作用元件进行调控。存在于一种抗旱基因启动子中的顺式作用元件也可能存在于抗其他胁迫的启动子中, 可能这些顺式作用元件的特殊组合方式调控抗旱基因的表达。研究发现, 在抗旱基因启动子中可能含有若干干旱响应元件, 如DRE元件(dehydration-responsive element)、ABRE元件(ABA-responsive ele-

收稿 2014-02-12 修定 2014-04-29

资助 国家自然科学基金(30170488)。

* 通讯作者(E-mail: jienalnu@126.com; Tel: 0411-85827079)。

ment)、MYB1AT元件等(Lee等2013; 阴霞等2014; Fang等2014)。Yamaguchi等(1992)首次从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离克隆的逆境诱导型启动子rd29, 在脱水情况下, rd29A和rd29B基因启动子活性被明显激活(Bihmidine等2013), 推测rd29X启动子可作为抗旱型启动子。

研究发现, 干旱胁迫下近10个GRAS家族(植物所特有的调节植物生长发育的一类蛋白家族)基因表达量上升(郭华军等2009)。刘习文等(2013)克隆的海马齿(*Sesuvium portulacastrum*) *SpSCL1*基因启动子含有CBFHV及MYB2CONSENSUSAT两个脱水响应元件。丁雪峰等(2010)发现水稻(*Oryza sativa*)抗旱相关基因*OsGRAS1*上游1 332 bp启动子序列含有多个与干旱胁迫相关的调控元件, 且其顺式作用元件的缺失和增加可以直接影响内源基因的表达。Kim等(2011)将柑橘(*Citrus unshiu*) *Cu-Lea5*基因启动子导入拟南芥, 干旱胁迫后维管束鞘部位*GUS*基因表达增强。Xiao等(2007)分离获得的水稻LEA蛋白基因*OsLEA3-1*启动子, 干旱条件下表现出很强的*GUS*活性。

1.2 耐盐基因启动子

植物抵御盐胁迫的有效策略之一是利用液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白将细胞质中的 Na^+ 主动运输进入液泡。杨国栋和郑成超(2007)利用TAIL-PCR方法克隆的棉花(*Gossypium hirsutum*)液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运基因*GhNHX1*启动子, 能在转基因棉花中响应盐胁迫信号, 诱导表达强度高于CaMV35S启动子, 能提高植物耐盐性。

DREB类转录因子是与植物耐盐有关的一类调节基因。Chen等(2012)分离了菊花(*Chrysanthemum dichrum*) DREB转录因子的启动子CdDREBa, 将-430 bp至-351 bp的片段与CaMV35S融合, 转化拟南芥在盐胁迫条件下增强了*GUS*基因表达, 提示该启动子对植物体适应高盐可能有重要作用。CdDREBa启动子中含有GT-1元件, 可作为响应盐胁迫的正调控元件。Park等(2004)研究发现AtGT-3b-1-like转录因子可以结合GT-1元件并且促进盐诱导的SCaM-4启动子在大豆(*Glycine max*)和拟南芥中表达。此外, 在拟南芥、辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis*)和辣椒(*Capsicum annuum*)等多种植物的盐胁迫诱导基因启动子中也存在GT-1元件(Yang等2011; Zhang等2008; Hong和Hwang 2009)。

1.3 温度响应基因启动子

1.3.1 高温耐受性启动子 高等植物受到高温胁迫后会大量表达热激蛋白如HSP100、HSP90和HSP70等, 从而减轻胁迫所引起的伤害(Schöffl等1998)。热激蛋白基因的转录活性依赖于热激因子HSF与高度保守的热激元件HSE的相互作用。Liu和Shono (2001)研究发现番茄(*Lycopersicon esculentum*)线粒体小分子热激蛋白(*LeMTshsp*)基因无组成型表达, 但对热激有较强应答, 该基因启动子含有6组典型的HSE元件及多个AT-rich区(伊淑莹等2007); 凝胶阻滞结果表明, 纯化的HsfA2蛋白与HSE元件在体外具有结合活性, 且与近端5组HSE的结合活性比与远端强。该启动子在热激处理条件下*GUS*检测表明其为热诱导强启动子, 活性类似CaMV35S启动子。另有研究表明高温下小麦(*Triticum aestivum*) *Hvhspl7*基因启动子能驱动*Hvhspl7*基因在小麦中表达(Freeman等2011)。

1.3.2 抗冻基因启动子 低温冻害条件下, 植物体内会发生一系列生理生化变化如改变蛋白质、碳水化合物组分或合成一些新的物质。*COR* (*cold-regulated*)基因是含有CRT/DRE顺式作用元件的一类冷响应基因(Cheong等2002)。小麦*Wcor15*基因启动子含有3个CRT/DRE核心序列和2个GTCGAC序列(Takumi等2003)。甘蔗(*Saccharum officinarum*) *ipt*基因启动子ATCOR15a可使*ipt*基因在冷冻胁迫下表达量增加(Belintani等2012), 叶片中总叶绿素含量提高到31%, 转基因植株叶片的衰老程度明显低于非转基因植株, 而转基因植株中丙二醛和电解液释放量的降低显示冻害对植物引起的损伤明显减少。

启动子激活抗逆基因表达的活性不仅与其存在的顺式作用元件种类有关, 还与其数量有关。研究发现拟南芥中*cor15a*和*cor15b*启动子为2个同源的冷胁迫响应基因启动子, 但在转基因番茄和烟草(*Nicotiana tabacum*)中, *cor15a* (含有2个CRT/DRE元件)启动子活性明显高于*cor15b* (含有1个CRT/DRE元件)启动子(Li等2013)。

1.4 耐损伤基因启动子

损伤是植物所面临的最为普遍的非生物胁迫之一, 植物通过体内防御反应信号系统应答外界机械损伤胁迫, 产生防御反应。茉莉酸(jasmonic acid, JA)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)是

植物体中广泛存在的与损伤相关的植物激素和信号分子。杂交三倍体毛白杨(*Populus tomentosa*) TIP特异启动子PtDr102含有响应机械损伤和MeJA的顺式作用元件,能诱导MeJA胁迫下GUS基因表达(Zheng等2010)。甘蔗MYB转录因子基因的启动子PScMYBAS1能够响应机械损伤和MeJA胁迫(Prabu和Prasad 2012)。

2 生物胁迫耐受型启动子

2.1 抗病基因启动子

WRKY类转录因子为植物所特有,几乎所有WRKY蛋白都能结合W盒[TGAC(C/T)],W盒存在于植物防御相关基因启动子中,介导病原菌诱导的转录反应。小米椒(*Capsicum frutescens*)基因启动子CAWRKY5p内含有多种与逆境胁迫相关的顺式作用元件,如应答青枯病菌的核心元件——W盒和S盒(结合AP2转录因子,调节植物对病原菌、低温、干旱及高盐胁迫的应答),瞬时表达分析显示CAWRKY5p-GUS受病原菌诱导(刘志钦等2013; Eulgem等2000; Kirsch等2000)。咖啡(*Coffea arabica*) WRKY转录因子同源基因CaWRKY1a和CaWRKY1b启动子可被真菌等胁迫诱导,提高植物对真菌胁迫的抵抗力(Petitot等2013)。编码细胞溶质水解酶的*AtNUDT5*基因在应答毒性病原菌时迅速增加(Adams-Phillips等2010),其启动子在拟南芥中具有较强的病原菌诱导表达活性,可以提高转基因植株的抗病性(Zhang等2013)。

启动子响应病原菌侵染与元件数量有关,也与元件间的顺序、间距及病原菌类型有关。Rush-ton等(2002)通过人工合成包含一定调控元件(boxes W1、W2、GCC、JERE、S、Gst1和D)的启动子对响应病原菌信号通路进行研究,发现上述因素之间存在的轻微差异,对抗病启动子的活性都有显著的影响。

2.2 抗虫基因启动子

当植物受病虫害侵犯时,受伤部位会立即启动细胞程序性死亡,发生超敏反应(hypersensitive response, HR)。HR启动受伤部位产生次级防御反应,从而对病虫害产生普遍抗性,即系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)。水杨酸(salicylic acid, SA)是SAR信号转导途径中的重要信号分子。植物体感染病虫害后体内SA急剧增加,诱导

病程相关蛋白的表达。烟草病程相关蛋白启动子PR-1a与CaMV35S嵌合导入到棉花中,能驱动*cryIEC*基因在昆虫侵蚀位点表达,且喷施SA使表达量增加,显著提高了棉花的抗虫性(Kumar等2009)。

3 小结与展望

启动子是精确调控基因在植物体内表达的“开关”。利用逆境胁迫耐受性启动子提高植物对逆境的抵抗力是近年来植物基因工程中研究的热点。随着不断完善的分子生物学实验技术及网络在线预测软件的应用,越来越多的植物逆境胁迫耐受性启动子将被克隆,其功能元件信息及各元件之间的相互作用也将被确定,为应用启动子进行植物抗逆基因工程改良提供更全面的理论参考。

参考文献

- 丁雪峰,刘鸿艳,罗利军(2010). 水稻*DsGRAS1*启动子的克隆及多样性分析. 上海农业学报, 26 (4): 8~14
- 郭华军,焦远年,邸超,姚冬霞,张盖华,郑雪,刘岚,张群莲,郭蔼光,苏震(2009). 拟南芥转录因子GRAS家族基因群响应渗透和干旱胁迫的初步探索. 植物学报, 44 (3): 290~299
- 刘习文,畅文军,朱家红,张治礼(2013). 海马齿*SpSCL1*基因启动子克隆及序列分析. 广东农业科学, (4): 124~127
- 刘志钦,杨晟,蔡金森,黄雪盈,马小玲,石兰平,王博,郭吟枫,陈桂信,牟少亮等(2013). 辣椒*CaWRKY5*启动子的分离及其调控元件分析. 应用与环境生物学报, 19 (3): 389~394
- 杨国栋,郑成超(2007). 棉花耐盐性基因*GhNHX1*启动子的克隆及功能分析. 泰安: 山东农业大学, 63~64
- 伊淑莹,孙爱清,赵春梅,刘箭(2007). 番茄多胁迫诱导型*LeMTshsp*启动子的分子克隆及其功能分析. 云南植物研究, 29 (2): 223~230
- 阴霞,陈雯,王磊,杨若韵,薛璟祺,高俊平(2014). 激素和非生物胁迫对月季*RhPIPI1;1*启动子活性的调节作用. 园艺学报, 41 (1): 107~117
- Adams-Phillips L, Briggs AG, Bent AF (2010). Disruption of poly (ADP-ribosyl) ation mechanisms alters responses of *Arabidopsis* to biotic stress. *Plant Physiol*, 152 (1): 267~280
- Belintani NG, Guerzoni JTS, Moreira RMP, Vieira LGE (2012). Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the *ipt* gene under a cold inducible promoter. *Biol Plant*, 56 (1): 71~77
- Bihmidine S, Lin J, Stone JM, Awada T, Specht JE, Clemente TE (2013). Activity of *Arabidopsis* RD29A and RD29B promoter elements in soybean under water stress. *Planta*, 237 (1): 55~64
- Chen Y, Chen S, Chen F, Li P, Chen L, Guan Z, Chang Q (2012). Functional characterization of a *Chrysanthemum dichrum* stress-related promoter. *Mol Biotechnol*, 52 (2): 161~169
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129 (2): 661~677

- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5 (5): 199~206
- Fang H, Liu X, Thorn G, Duan J, Tian L (2014). Expression analysis of his acetyltransferases in rice under drought stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 443 (2): 400~405
- Freeman J, Sparks CA, West J, Shewry PR, Jones HD (2011). Temporal and spatial control of transgene expression using a heat-inducible promoter in transgenic wheat. *Plant Biotechnol J*, 9 (7): 788~796
- Hong JK, Hwang BK (2009). The promoter of the pepper pathogen-induced membrane protein gene *CaPIMP1* mediates environment stress responses in plants. *Planta*, 229 (2): 249~259
- Kim IJ, Lee J, Han JA, Kim CS, Hur YK (2011). Citrus *Lea* promoter confers fruit-preferential and stress-inducible gene expression in *Arabidopsis*. *Can J Plant Sci*, 91 (3): 459~466
- Kirsch C, Wik TM, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE (2000). A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley *ELI7* gene family members by fungal elicitor or pathogen infection. *Mol Plant Pathol*, 1 (4): 243~251
- Kumar M, Shukla AK, Singh H, Tuli R (2009). Development of insect resistant transgenic cotton lines expressing *cryIEC* gene from an insect bite and wound inducible promoter. *J Biotechnol*, 140 (3-4): 143~148
- Lee SC, Kim SH, Kim SR (2013). Drought inducible *OsDhn1* promoter is activated by OsDREB1A and OsDREB1D. *J Plant Biol*, 56 (2): 115~121
- Li M, Wang X, Cao Y, Liu X, Lin Y, Ou Y, Zhang H, Liu J (2013). Strength comparison between cold-induced promoters of *Arabidopsis cor15a* and *cor15b* genes in potato and tobacco. *Plant Physiol Biochem*, 71: 77~86
- Liu J, Shono M (2001). Molecular cloning the gene of small heat shock protein in the mitochondria and endoplasmic reiculum of tomato. *Acta Bot Sin*, 43 (2): 138~145
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH et al (2004). Pathogen-and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 Box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol*, 135 (4): 2150~2161
- Petitot AS, Barsalobres-Cavallari C, Ramiro D, Albuquerque Freire E, Etienne H, Fernandez D (2013). Promoter analysis WRKY transcription factors *CaWRKY1a* and *CaWRKY1b* homologous genes in coffee (*Coffea arabica*). *Plant Cell Rep*, 32 (8): 1263~1276
- Prabu G, Prasad DT (2012). Functional characterization of sugarcane MYB transcription factor gene promoter (*PScMYBAS1*) in response to abiotic stresses and hormones. *Plant Cell Rep*, 31 (4): 661~669
- Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*, 14 (4): 749~762
- Schöfl F, Prändl R, Reindl A (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol*, 117: 1135~1141
- Takumi S, Koike A, Nakata M, Kume S, Ohno R, Nakamura C (2003). Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) *Cor* gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein. *J Exp Bot*, 54 (391): 2265~2274
- 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 (1): 35~46
- Yamaguchi SK, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*, 33: 217~224
- Yang W, Liu XD, Chi XJ, Wu CA, Li YZ, Song LL, Liu XM, Wang YF, Wang FW, Zhang C et al (2011). Dwarf apple MbdRE-B1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Planta*, 233 (2): 219~229
- Zhang XC, Li MY, Ruan MB, Xia YJ, Wu KX, Peng M (2013). Isolation of *AtNUDT5* gene promoter and characterization of its activity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Appl Biochem Biotechnol*, 169: 1557~1565
- Zhang Y, Yin H, Li D, Zhu W, Li Q (2008). Functional analysis of BADH gene promoter from *Suaeda liaotungensis* K.. *Plant Cell Rep*, 27 (3): 585~592
- Zheng H, Lin S, Zhang Q, Lei Y, Hou L, Zhang Z (2010). Functional identification and regulation of the *PtDrl02* gene promoter from triploid white poplar. *Plant Cell Rep*, 29 (5): 449~460