

# 导入 *Prd29A:DREB1A* 融合基因获得抗逆性小麦的探索与实践

押辉远, 谷运红, 秦广雍, 霍裕平

(郑州大学离子束诱变育种及生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052)

**摘要:** 介绍了来自拟南芥的 DREB 转录因子在植物抗逆性中的作用, 提出了通过导入 *Prd29A:DREB1A* 融合基因获得抗逆性小麦的策略。

**关键词:** DREB 转录因子; 小麦; 转基因; 植物抗逆性

**中图分类号:** S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2004)02-0012-04

## Academic Base of Tactic to Obtain Tolerance Wheat by Transferring *Prd29A:DREB1A* Fusion Gene into Wheat

YA Hui-yuan, GU Yun-hong, QIN Guang-yong, HUO Yu-ping

(Ion Beam Mutation Breeding and Biotechnology Key Lab, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** DREBs transcription factors make important roles in tolerance of drouht, hight-salt, cold stress in plants. So transgenic wheat to tolerance of drouht, hight-salt, frezzing stress can be obtained by introducing *Prd29A:DREB1A* into wheat.

**Key words:** DREB-transcription factors; Wheat; Transgenic; Plants tolerance

随着分子育种的飞速发展, 转基因技术在小麦育种上的应用研究也逐渐增多。自从 1992 年第 1 株转基因小麦问世以来, 转基因小麦研究取得了长足的发展。以基因枪法为代表的转基因小

麦技术已经成熟, 农杆菌介导法基因转化小麦获得突破。近年来, 利用花粉管通道法获得转基因小麦的技术也已成熟。目前已经获得了基因工程雄性不育小麦, 抗病转基因小麦, 品质改良的转

收稿日期: 2003-10-10

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目资助课题(2001BA302B-03)

作者简介: 押辉远(1977-), 男, 河南禹州人, 在读博士, 主要从事生物化学和分子生物学的研究。

同对包衣种子发芽率的影响而有所差异, 适乐时、立克秀常量和倍量包衣对种子发芽率影响较小, 而微粉、卫福、克多酮药剂常量包衣对种子发芽率影响不显著, 但其倍量包衣则发芽率极显著降低。因此, 适乐时对发芽率影响最小, 安全性高, 立克秀的安全性次之, 卫福、克多酮常量包衣则对发芽率影响较小, 包衣时应注意严格按照要求进行。

2) 在一般贮藏条件下(室内), 包衣种子的贮藏期在 1 个月以内对发芽率影响较小, 安全性最高。因此, 种子包衣的时间不应太早, 原则上在播

种前 1 个月内进行为宜, 并且包衣处理后应及时晾干或烘干, 使含水量在安全的范围内以确保种子的安全性。

### 参考文献:

- [1] 杨金朝. 种衣剂实用技术问答[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 36-37.
- [2] 中华人民共和国国家标准——农作物种子检验规程[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995. 34-35.
- [3] 崔党群. 生物统计学[M]. 北京: 中国科技出版社, 1994.

基因小麦<sup>[1]</sup>。然而,转基因技术在小麦抗逆育种上的应用还比较少。

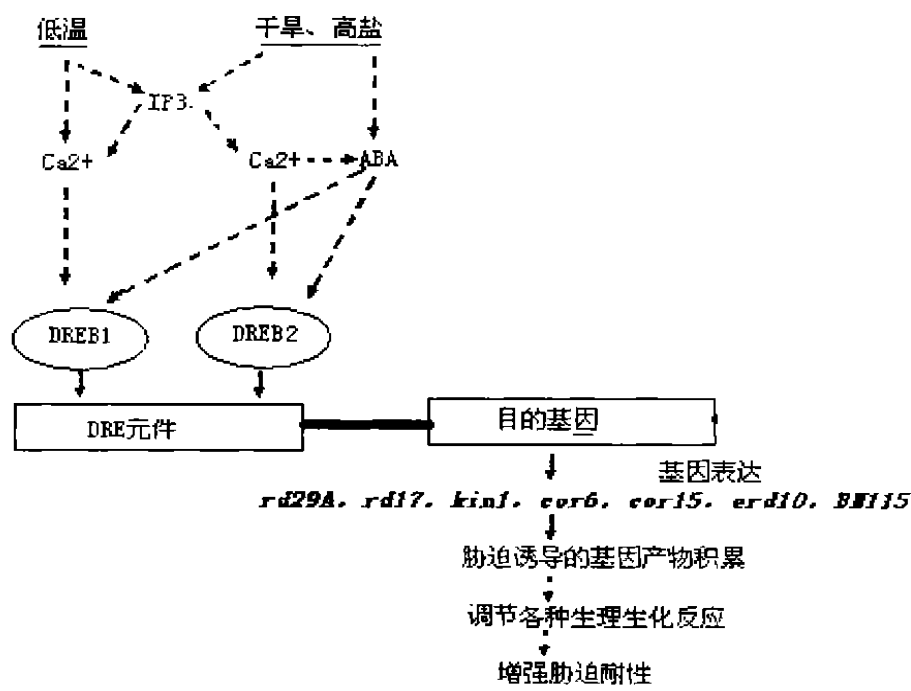
作者拟运用转基因技术向小麦中导入 *Prd29A*; *DREB1A* 融合基因获得抗逆性强的小麦新品种。并对这一理论、实验基础和可能性进行阐述。

运用转基因技术培育抗逆性强的农作物新品种是一种有效的育种途径,目前已通过转化单一基因(如 *tps*, *P5CS*, *BADH*, *Ath-ALDH3*, *ImtI*, *mtLD*, *gutD*, *otsBA*, *bets*)获得了较为抗干旱、高盐的转基因农作物,但不能使转基因植物获得综合性状较为理想的农艺改良<sup>[2~4]</sup>。植物的抗逆性是很复杂的基因相互作用的过程,对干旱、盐碱、低温的耐性的强弱往往不是取决于单一基因的作用<sup>[5,6]</sup>,而是多个基因相互作用的结果。因此,要提高植物综合的抗逆性,重要的还是要从一些关键的转录因子着手<sup>[7]</sup>。

DREB(dehydration responsive element binding protein)转录因子(含 AP2/EREBP 结构域)是与 DRE(dehydration responsive element)顺式作用元件相结合,调控对干旱、高盐、低温逆境应答相

关基因表达的蛋白质<sup>[8,9]</sup>。有很多干旱、高盐、低温诱导的基因的启动子调控区域有 DRE 核心元件(GCCGAC/ACCGAC),如 *rd29A*, *rd17*, *kin1*, *cor6*, *cor15*, *erd10*, *BN115* 等基因的启动子调控区域<sup>[7,10]</sup>。现在,已经从拟南芥中克隆到 5 个具有高度同源性水分胁迫诱导的转录因子基因(*DREB1A*, *DREB1B*, *DREB1C*, *DREB2A*, *DREB2B*),它们编码的蛋白质激活含有 DRE 元件的启动子所驱动基因转录<sup>[7,10]</sup>。许多科学工作者的实验结果表明,它们可能是控制对干旱、高盐、低温等逆境应答基因表达的主要转录因子<sup>[7,10]</sup>。实验证明, *DREB1* 由低温诱导表达,而不被干旱、高盐所诱导<sup>[11]</sup>,与之相反的 *DREB2* 是由干旱、高盐所诱导,而不是被低温诱导表达<sup>[11,12]</sup>。附图是植物细胞感应干旱、低温、高盐胁迫开始,通过各级信号传递, *DREB* 转录因子与 DRE 核心元件相互作用,调控目的基因的表达,从而提高植物对逆境耐性的示意图<sup>[7,10,15]</sup>。

在转 *DREB1B* 的拟南芥中,在 35S 启动子的驱动下, *DREB1B* 能够强烈表达,转基因拟南芥获得了很强的耐低温性状,因此, *DREB1B* 很可能是



附图 植物细胞感应干旱、低温、高盐胁迫信号传递途径

应答低温的基因的调控因子<sup>[13]</sup>。DREB1A 在 35S 启动子驱动下在转基因拟南芥中能够强烈表达,转基因拟南芥获得了很强的抗旱、耐高盐、耐低温的性状<sup>[14]</sup>。35S 启动子驱动 DREB2A 的转基因植物中,虽然 DREB2A 能够强烈表达,但转基因植物并没有获得对干旱、高盐、低温很强的耐性<sup>[15]</sup>。

实验发现,DREB1A 在 35S 启动子的驱动下强烈表达,会产生转基因植物比野生型生长缓慢、株型变小等不良农艺性状<sup>[10,13,14]</sup>,这是因为 35S 启动子是植物组成型强启动子,它所驱动的基因在植物不需要的情况下仍能强烈表达,这对转基因植物来说是一个很大的消耗,还改变植物正常的基因调控和代谢途径。因此,需要用逆境诱导型启动子来驱动 DREB1A 在转基因小麦中的表达,这样可以最低量的减小 DREB1A 过量表达给转基因植株带来的不利影响。

RD29A 是 DREB1 调控的目的基因,在植物细胞缺水时能够大量表达,RD29A 的启动子区域含有 DRE 核心序列和 ABRE (ABA—responsive element,保守序列: CACGTGGC/ACACGTGGC) 顺式作用元件。植物细胞缺水时,植物产生的内源 ABA 通过信号传导产生与 RD29A 启动子的 ABRE 序列结合的转录因子(含 bZIP 结构域的蛋白质),可以启动 RD29A 的表达,DREB1 转录因子与 RD29A 启动子 DRE 核心序列结合也可以诱导该基因的表达。但,RD29A 在细胞不缺水的时候并不表达<sup>[3,15]</sup>,它是一个干旱诱导型启动子。以 RD29A 启动子驱动 DREB1A 转录因子在转基因小麦中的表达,可以大大减小因基因组型表达给转基因植株带来的不利影响。因此构建 *Prd29A:DREB1A* 融合基因进行基因转移是较为理想的方案。

近年来,分子生物学家们从水稻中也发现了与拟南芥 DREBs 类似的转录因子蛋白质 OsDREBs,其功能是提高水稻对高盐、干旱、低温等逆境胁迫的适应性<sup>[9]</sup>。中科院遗传与发育研究所的科学工作者在一种盐生植物 *Atriplex Hortensis* 中也发现了与拟南芥 DREBs 功能、结构类似的转录因子(AhDREBs)。这些说明,在许多植

物中对高盐、干旱、低温等逆境胁迫适应具有相似的分子机制<sup>[19]</sup>。

在小麦中也发现了与拟南芥 DREBs 类似的转录因子(TaDREB1),这种转录因子是小麦对高盐、干旱、低温等逆境胁迫适应的相关转录因子,它无论是在氨基酸序列上,还是二级结构都与拟南芥 DREBs 转录因子极其相似。实验发现 TaDREB1 能够结合在含有 DRE 顺式作用元件的启动子上,并能够启动启动子下游基因的表达。在不同的小麦培养中发现, TaDREB1 由高盐、干旱、低温等逆境胁迫诱导表达,并引起一系列的基因表达。而且,在组成型启动子驱动下, TaDREB1 在小麦中过量表达使小麦的抗旱性能大大增强,但同样造成了小麦的生长延迟和矮化现象。通过差异显示表达发现,小麦缺水时,一大部分特异表达基因的启动子中含有 DRE 顺式作用元件的保守序列(如: Wcs120)<sup>[18]</sup>。这说明,小麦对高盐、干旱、低温等逆境胁迫的反应与拟南芥有相似的分子机制。因此,来自拟南芥的 DREBs 转录因子如果在小麦中表达的话,可以通过与含有 DRE 顺式作用元件的启动子结合,从而启动相关基因的表达来增强小麦对高盐、干旱、低温等逆境胁迫的适应性。但是,来自拟南芥的 DREBs 转录因子在小麦中过量表达的话,也可能造成生长延迟和矮化等不利的农艺性状,因此,需要用逆境诱导型的启动子来驱动来自拟南芥的 DREBs 转录因子在小麦中适时表达。

小麦在水分胁迫下,内源 ABA(脱落酸)水平升高,并能够提高小麦的抗旱性能,说明 ABA 在小麦对水分胁迫的适应中起很重要的作用。在给小麦施外源 ABA 时发现了一些特异的基因表达,一部分基因的启动子中含有 ABRE 顺式作用元件保守序列。说明小麦中也有能与 ABRE 顺式作用元件作用的转录因子(bZIP)。鉴于 *rd29A* 基因的启动子能够被 ABA 启动,因此, *rd29A* 基因的启动子在小麦中也能被小麦内源 ABA 启动。同时,由于 *rd29A* 基因的启动子中还有 DER 顺式作用元件,它可以被小麦中的 TaDREBs 转录因子所启动。因此, *rd29A* 基因的启动子在小麦中是有功能的,可以驱动外源基因在小麦中表达。

正是基于以上的实验、理论基础和认识, 作者认为可以通过导入 *Prd29A: DREB1A* 到小麦中, 在水分胁迫情况下, 小麦中的 TaDREBs 转录因子表达, 内源 ABA 水平升高, 驱动 *Prd29A: DREB1A* 融合基因的表达, DREB1A 转录因子引起一系列小麦对高盐、干旱、低温等逆境胁迫适应的相关基因表达, 增强小麦对干旱、高盐、低温的耐性, 如此可获得农艺性状好且对干旱、高盐、低温等逆境适应性强的新小麦品种, 以提高河南省中低产田小麦的产量。

参考文献:

[ 1 ] 肖兴国, 张爱民, 聂秀玲. 转基因小麦的研究进展与展望[ J ]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 111—116.

[ 2 ] 赵恢武, 陈杨坚, 胡鸢雷, 等. 干旱诱导性启动子驱动的海藻糖—6—磷酸酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性[ J ]. 植物学报, 2000, 46(6): 616—619.

[ 3 ] 江香梅, 黄敏仁, 王明麻. 植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展[ J ]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2001, 25(5): 57—62.

[ 4 ] 蒯本科, 顾红雅. 渗透胁迫的植物体内信号及相关基因克隆研究[ J ]. 资源科学, 1999, 21(5): 42—45.

[ 5 ] Ramanjulu Sunkar, Dorothea Barteles, Hans-Hubert Kirch. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance[ J ]. *The Plant*, 2003, 35: 452—464.

[ 6 ] 余光辉, 李玲, 曾福华. 水分胁迫的基因表达和信号转导[ J ]. 亚热带植物科学, 2002, 31(1): 57—62.

[ 7 ] 刘强, 赵南明, K. Yamaguchi-Shinozaki, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[ J ]. 科学通报, 2000, 45(1): 11—16.

[ 8 ] Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress[ J ]. *Plant Cell*, 1994, 6: 251—264.

[ 9 ] Joseph G. Dubouzet, Yoh Sakuma, Yusuke Ito, et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression[ J ]. *The*

*Plant*, 2003, 33, 751—763.

[ 10 ] Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Mie Kasugaa, Qiang Liu et al. Biological mechanisms of drought stress response[ R ]. JIRCAS Working Report, 2002. 1—8.

[ 11 ] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression respectively in *Arabidopsis*[ J ]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391—1406.

[ 12 ] Nakashima, K, Shinwari Z. K, Sakuma Y, et al. Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB 2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high-salinity-responsive gene expression[ J ]. *Plant Mol. Biol.*, 2000, 42: 657—665.

[ 13 ] Jaglo-Ottosen K. R, Gilmour S. J, Zarka, D G, et al. *Arabidopsis* CBF1 over-expression induces COR genes and enhances freezing tolerance[ J ]. *Science*, 1998, 280: 104—106.

[ 14 ] Mie Kasuga, Qiang Liu, Setsuko Miura, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[ J ]. *Nature Biotechnology* 1999, 17: 287—291.

[ 15 ] Liming xiong, Karen S Schumaker, and Jian-kang Zhu. Cell signaling during cold, drought and salt stress[ J ]. *The Plant Cell*. 2002, 14: 166—183.

[ 16 ] Ouellet F, Vazquez-Tello A and Sarhan F. The wheat wcs120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species[ J ]. *FEBS Lett*, 1998, 423: 324—328.

[ 17 ] YG Shen, WK Zhang, DQ Yan, et al. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*[ J ]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(1): 155—161.

[ 18 ] YG Shen, WK Zhang, JS Zhang. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress[ J ]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(6): 972—979.

[ 19 ] 五金铃, 张宪政, 苏正淑. 小麦对干旱的生理反应及抗性机理[ J ]. 麦类作物, 1994(5): 44—46.