

植物高温抗性转录因子基因工程研究进展

赵 迪,刘仁泽,郭长虹,郭东林

(黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室/哈尔滨师范大学 生命科学与技术科学学院,
黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:高温胁迫是影响植物生长代谢和产量的重要因素之一,通过基因工程方法能提高植物抵御热胁迫的能力。现对近年来发现的与植物高温抗性有关的转录因子进行综述,并阐述了通过基因工程方法利用已知转录因子提高植物抗热性的研究进展,以期为利用基因工程方法培育抗热植物提供参考。

关键词:植物;高温抗性;热胁迫;转录因子;基因工程

中图分类号:Q943.2 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2014)06-0130-05

近年来,全球变暖日益加剧对作物的生长造成了极大的影响。温度瞬时升高并超过植物生长最适温度10~15℃即产生热激或热胁迫^[1],会对植物生长发育造成不可逆的伤害。热胁迫影响植物生长发育的整个过程,如减缓或完全抑制种子萌发,影响光合作用、呼吸作用、水分关系和质膜稳定性等,产生氧化胁迫和渗透胁迫等次生危害,使植物激素代谢紊乱。热胁迫可延缓或阻碍植物生长发育,严重时甚至使植物死亡,导致作物减产或绝产。为了对抗全球变暖的不利环境,研究植物耐热分子机理对于培育抗热植株具有重大意义。基因工程培育抗热植物的前提是发现有效的抗热基因并阐明其抗热机理,目前对植物热胁迫应答调控机制的研究中,已经在热胁迫应答上、下游发现了一些抗热基因,利用其培育抗热植株已成为可能。

转录因子是一类能够与基因上游的特异核苷酸序列结合以调控基因转录的蛋白质,转录因子不仅可以与基因上游的启动子区域结合,也可以和其它转录因子形成转录因子复合体来影响基因的转录。植物体内存在大量的转录因子,在生长发育过程中,植物感受高温等环境胁迫信号,并通过

一系列的信号转导途径激发转录因子,使转录因子与顺式作用元件结合后,启动基因的表达,通过产生抗氧化剂和渗透调节物质对外界胁迫信号在生理生化等方面的调节反应,保证植物的生长发育。该文对近年来通过基因工程方法利用高温抗性转录因子转化植物,提高植物高温抗性的研究进展进行综述,为基因工程方法培育抗热植物提供参考。

1 植物高温抗性转录因子

目前已经发现的植物高温抗性转录因子有热激转录因子、脱水应答元件结合蛋白、MYB类转录因子、WRKY转录因子以及其它转录因子。

1.1 热激转录因子

热胁迫下热激基因表达迅速增加,热激蛋白(heat shock protein, HSPs)迅速积累,作为分子伴侣帮助相关受损蛋白重新折叠、稳定、组装、胞内运输和降解,使植物在逆境中生存。热激蛋白的表达是受一类专门的转录因子-热激转录因子(Heat stress transcription factor, HSFs)调控的。热胁迫下热激转录因子特异结合到高温调节基因上游的热激蛋白启动子区的热激元件(Heat shock protein promoter region components element, HSE)回文序列上,对多数热激蛋白基因及热胁迫调节基因,非热激蛋白基因的转录激活起到调节作用。最近的研究表明,HSFs与HSPs一同组成了HSF-HSP环路,作为调节网调节热胁迫应答基因的转录激活^[2]。高温胁迫应答时HSFs经历了同寡聚化或异寡聚化状态的改变,使HSFs在细胞中的位置发生了变化,也对高温相关基因的转录调节起重要作用,HSFs的不同结合类型和HSF与蛋白的互作也会影响不同环

收稿日期:2014-02-19

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2013AA102607);国家转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2011ZX08004-002);哈尔滨师范大学研发专项资助项目(YF201201);黑龙江省自然科学基金研究资助项目(C201308C0601);哈尔滨师范大学遗传学大学生实践创新团队

第一作者简介:赵迪(1987-),女,黑龙江省大兴安岭人,在读硕士,从事遗传学研究。E-mail:bishui_zhaodi@126.com。

通讯作者:郭东林(1973-),女,吉林省白城市人,博士,教授。E-mail:gdl1225@163.com。

境下的细胞功能^[3-4]。

1.2 脱水应答元件结合蛋白

脱水应答元件结合蛋白(Dehydration response element binding protein, DREB)最初作为对干旱胁迫、盐胁迫和冷胁迫应答的转录调节因子为人们所了解。DREB类基因的过表达能够激活热激相关基因的表达,提高植物对高温的耐受力。预测调节高温的遗传学级联放大反应时,DREBs和HSFs可能产生了互作。

1.3 MYB类转录因子

MYB类转录因子是植物中最大的转录因子家族之一^[5],它参与了植物激素和环境因子的应答反应、细胞分化与细胞周期调控^[6],对植物次生代谢与花色素形成过程^[7]以及叶片等器官的形态建成^[8]等都具有重要的调节作用。MYB能够使植物对高温、低温、干旱及盐碱等胁迫环境应答。

1.4 WRKY转录因子

WRKY转录因子是近年来在植物中发现的N-端含有WRKYGQK高度保守氨基酸序列的新型转录调控因子,它能够与(T)(T)TGAC(C/T)序列(W-box)发生特异性作用^[9],调节启动子中含W-box元件的调节基因和/或功能基因的表达,从而参与植物的各种防卫反应,调节植物的生长发育等。WRKY转录因子广泛参与植物对生物与非生物胁迫反应,例如参与盐、干旱、低温、新陈代谢、果实成熟、种皮和毛状体发育以及植物衰老^[10]等一系列生理活动。WRKY基因也广泛参与植物对高温的应答。WRKY转录因子在基因表达过程中既是抑制物也是激活物。

1.5 其它转录因子

一些其它转录因子也广泛参与了植物对高温等逆境胁迫的应答。核转录因子X-盒结合基因1(Nuclear transcription factor X-box binding 1 gene)促进获得抗热性的产生。锌指蛋白、碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)以及多蛋白结合因子(Multiprotein-bridging factor 1c, MBF1c)等转录因子也积极地参与了植物对高温胁迫的响应。

2 高温抗性转录因子提高植物抗热性

植物高温抗性转录因子在转化模式植物的研究中,往往表现为能够提高植物耐高温胁迫的能力,并可作为提高植物抗热性的备选基因。

2.1 热激转录因子

晁旭等^[11]研究表明过量表达拟南芥热激转

录因子(AtHsfA6a)的植株高温处理后的存活率远高于野生型植株,而反义转基因植株存活率则显著低于野生型,基因表达分析证明,AtHsfA6a受热胁迫诱导表达,并且调控下游靶基因Hsp70的表达,进而提高植物耐高温胁迫的能力。陈晓军研究表明,在转GmHsfA1基因大豆中GmHsfA1的过量表达激活了小分子量热激蛋白Gm-Hsp22的转录,促进了高温诱导下2个内源热激蛋白基因GmHsp23和GmHsp70的表达,显著提高了转基因大豆的耐热性^[12]。热激转录因子可以作为改良植物耐热性的主要候选基因之一。

2.2 脱水应答元件结合蛋白

过表达DREB2ACA(有持续活力的突变体形式)蛋白的植株抗热性增强,而敲除了DREB2A的植株抗热性降低。DREB2A启动子含有一个DREB2A基因热胁迫诱导表达重要的HSE序列。HSFA1a/b/d三元突变体和HSFA1a/b/d/e四元突变体中,DREB2A的热胁迫诱导表达难以实现^[13]。Qin等^[14]对转Zm-DREB2A的拟南芥进行芯片分析,发现Zm-DREB2A过量表达能够增强Hsfα3等下游热激相关基因的表达,从而提高转基因植株的耐热性。转基因实验中,DREB基因已通过遗传转化方法转移到不同植物物种之中。过表达玉米(Zea mays)DREB2A基因的拟南芥(Arabidopsis thaliana)的抗热性得到了加强^[14]。过表达At-DREB1A蛋白的菊花(Chrysanthemum morifolium)维持较高的光合活性,提高了高温胁迫下的RUBISCO和蔗糖磷酸合成酶活力^[15]。过表达OsDREB2B蛋白的拟南芥植株中,DREB2B蛋白使靶基因DREB2A的表达得到了增强,提高了植物的抗热性^[16]。拟南芥中AtDREB2C蛋白水平的提高增强了拟南芥植株的抗热性^[17]。高温胁迫下DREB2C和HSFA3的相互作用诱导了信号的转导^[18]。过表达DREB2C的拟南芥植株生长阶段的抗热性得到了增强,但发芽阶段的抗热性没有增强。编码CBF/DREB1超家族AP2转录因子的DDF1基因的激活使拟南芥突变体产生了温度胁迫抗性和干旱胁迫抗性^[19]。

2.3 MYB类转录因子

研究表明,与野生型拟南芥相比,转MYB44拟南芥对高温的抗性显著增强,而缺失突变体atmyb44对高温的抗性减弱。野生型拟南芥和atmyb44的H₂O₂含量及脂类氧化损伤均高于过

表达 MYB44 拟南芥。但转 MYB44 植株拥有较高的抗氧化酶(如 SOD, CAT, APX)活力和较高的耐热基因 *Hsp20,60,70,90* 和 101 表达量。表明转录因子 AtMYB44 能够通过上调 *HSP* 基因的表达并且产生高活力的抗氧化酶体系来增强植株的抗高温能力^[20]。在根中柱鞘细胞中特异表达的 AtMYB68 受高温诱导表达, 高温胁迫下, 根中 MYB68 活性增强, 而 MYB68 突变体的生长活力比野生型低^[21], 也说明 MYB 参与高温应答反应。

2.4 WRKY 转录因子

对 WRKY25、WRKY26 和 WRKY33 基因在热胁迫应答中表达水平的微阵列分析发现, 热处理的野生型拟南芥的 WRKY25, WRKY26 转录本丰富。42℃热处理 1 h 后, WRKY25 的转录水平比对照增加了 4.9 倍, WRKY26 的转录本上调, 与对照相比增加了 2 倍。与此相反, WRKY33 的转录水平下调表达近 2.3 倍^[22]。研究表明, 转 AtWRKY25 基因的拟南芥植株 At-WRKY25 表达的增加使 HSFA2、HSFB1、HS-FB2A 和 HSP100 蛋白的含量升高, 最终使植物具有抗热性^[23]。OsWRKY11 基因也能够对高温胁迫做出响应, 对提高逆境耐性起作用。Wu 等将带有 HSP101 启动子的 OsWRKY11 cDNA 转入水稻(*Oryza sativa* L.)中, 热胁迫后, 高温胁迫诱导基因过量表达, 转基因株系表现出明显的耐热抗旱性状^[24]。AtWRKY39^[25] 参与植物对热诱导的响应。WRKY68 在高温条件下诱导表达, 推测 WRKY68 可能参与植物对高温的调控^[26]。

2.5 其它转录因子

过表达水稻锌指蛋白基因 ZFP177 的转基因烟草的抗热性增加^[27]。拟南芥中过表达含有 At-SAP10 蛋白的锌指结构域赋予了拟南芥对重金属和热胁迫的抗性^[28]。敲除锌指结构蛋白家族成员 Zat12 的拟南芥表现为对热胁迫敏感, 同时过表达会提高植物的氧化胁迫和渗透胁迫的耐受性^[29-31]。Zat10 的过量表达可以提高植物抗干旱胁迫、渗透胁迫和高温胁迫的能力^[32-33]。Gao 等^[34] 研究表明, 在拟南芥中, 转录因子 AtbZIP28 与内质网膜相结合对抗热起重要的作用。暴露在高温胁迫时, 锚定在内质网膜上的 bZIP28 向细胞核移动, 启动抗热相关基因的表达, 抵御高温伤害。喻旭等^[35] 研究表明与 AtbZIP28 高度同源的转录因子 OsbZIP60 在水稻中过表达能够增强水

稻的抗热性和抗旱性。

近期的研究表明, 多蛋白结合因子(MBF1c)是拟南芥中高温抗性的关键调节者。高温胁迫下其在水杨酸、海藻糖和乙烯基因的上游起作用。MBF1c 在转录水平上调控高温胁迫下 DREB2A、HSFs 和锌指蛋白的表达。

3 培育抗热植株面临的挑战及对策

随着对植物耐高温机制研究的不断深入, 已发现多种转录因子在植物适应高温等逆境胁迫中发挥重要作用, 但植物对高温胁迫响应是一个复杂的过程, 植物通过温度感受、信号传导、调控核内元件、基因表达调节和蛋白翻译几个阶段对胁迫应答, 在热胁迫应答基因上游发现了 Ca²⁺、NO 等信号分子参与热胁迫信号级联放大, 将胁迫信号通过 CDPK 等途径传导到细胞核中, 增强抗热基因表达, 合成渗透保护剂和抗氧化物来抵御热胁迫对细胞造成的伤害。虽然对植物耐高温的机制有了认识, 但很多问题仍需探索, 如调节高温表型的 LEA 蛋白、脱水素、甘氨酸丰富的 RNA 结合蛋白、FK506 结合蛋白和伸长因子等影响高温抗性的详细机制仍不清楚。一些热胁迫相关基因已经被鉴定出来, 但植物的高温抗性是由多基因控制的复杂性状。仍需对热胁迫下基因表达的转录组、表观基因组、代谢组和表型组进行印迹分析, 以帮助鉴定热胁迫相关的有效性状(在伴侣蛋白、保护性因子、活性氧、膜的改变和上游因子), 进而用来产生高温耐受性植株。另外, 不同发育阶段高温诱导基因的表达差异很少有分析, 需要进一步的研究。对多个物种的高温抗性应答特异的数量性状位点的研究也很有必要。最近, 在小麦中鉴定了 3 个主要的数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)提高了小麦的抗热性^[36]。曹立勇等^[37] 在水稻中检测到了 20 个耐热性 QTL, 这些 QTL 可用于分子标记辅助选择, 以改良作物的耐热性, 从而解决热害问题。

培育抗热植株的转基因实验中, 采用遗传转化的方法将鉴定的有效的耐热基因导入植物基因组中, 从而获得具有非生物胁迫抗性的转基因植株, 研究基因功能, 在植物转化中应用诱导型启动子表达目的基因, 能够有效地调控下游基因的表达, 最大限度地减少了由于组成型启动子恒常表达引起的外源蛋白积累对转基因植物造成的伤害。研究表明 35S-DREB1A 转基因烟草比 rd29A-DREB1A 转基因植株表现出明显的生长

滞后现象;rd29A-DREB1A 转基因植株的胁迫耐性明显高于 35S-DREB1A 转基因植株^[38]。Pellegrineschi 等^[39]用胁迫诱导型启动子 rd29A 驱动 DREB1A/CBF3 的表达,提高了转基因小麦的干旱胁迫耐性,而且没有引起明显的畸形。因此,利用逆境诱导型启动子驱动抗逆基因的表达成为改良作物非生物胁迫抗性的热点问题。然而,目前能够用于转基因研究的诱导型启动子仍然很少。为此,对于新的诱导型启动子的克隆、顺式作用元件具体序列的确定、各元件之间的相互作用以及与这些元件互作的转录因子的研究仍然是今后研究的重点。

参考文献:

- [1] Sun W, Motangu MV, Verbruggen. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2002, 1577(1):1-9.
- [2] Singh A, Mittal D, Lavania D, et al. OsHsfA2c and OsHsfb4b are involved in the transcriptional regulation of cytoplasmic *OsClpB* (*Hsp100*) gene in rice (*Oryza sativa L.*) [J]. Cell Stress and Chaperones, 2012, 17(2):243-254.
- [3] Miller G, Mittler R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? [J]. Annals of Botany, 2006, 98(2):279-288.
- [4] Mittal D, Enoki Y, Lavania D, et al. Binding affinities and interactions among different heat shock element types and heat shock factors in rice(*Oryza sativa L.*) [J]. FEBS Journal, 2011, 278(17):3076-3085.
- [5] Romero I, Fuertes A, Benito M, et al. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 1998, 14(3):273-284.
- [6] Kazuko YS, Takeshi U, Kazuo S. Regulation of genes that are induced by drought stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Plant Research, 1995, 108(1089):127-136.
- [7] Llewellyn DJ, Machado A, Ai-Ghazi Y, et al. Expression profiling identifies candidate genes for fiber yield and quality[J]. Cotton Science, 2008(S1):9.
- [8] Zhang Y, Cao G, Qu LJ, et al. Involvement of an R2R3-MYB transcription factor gene *AtMYB118* in embryogenesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28 (3): 337-346.
- [9] Eulgem T, Somssich I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(4):366-371.
- [10] Guo Y, Cai Z, Gan S. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence [J]. Plant Cell Environment, 2004, 27 (5): 521-549.
- [11] 晁旭,王东平,巩振辉,等.拟南芥热激转录因子耐高温功能分析[J].西北植物学报,2007,27(7):1305-1310.
- [12] 陈晓军,叶春江,吕慧颖,等.*GmHSFA1* 基因克隆及其过量表达提高转基因大豆的耐热性[J].遗传,2006,28(11): 1411-1420.
- [13] Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, et al. *Arabidopsis HsfA1* transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression[J]. Molecular and General Genetics, 2011, 286(5-6):321-332.
- [14] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, et al. Regulation and function analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays L.* [J]. Plant Journal, 2007, 50(1):54-69.
- [15] Hong B, Ma C, Yang YJ, et al. Over-expression of At-DREB1A in chrysanthemum enhances tolerance to heat stress[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 70(3): 231-240.
- [16] Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress responsive genes[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2010, 283:185-196.
- [17] Lim C J, Hwang J E, Chen H, et al. Over-expression of the *Arabidopsis* DRE/CRT-binding transcription factor DREB2C enhances thermotolerance[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 362 (2): 431-436.
- [18] Chen H, Hwang J E, Lim C J, et al. *Arabidopsis* DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications 2010, 401(2):238-244.
- [19] Kang H G, Kim J, Jeong H, et al. Overexpression of FTL1/DDF1, an AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought and heat stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Science, 2011, 180(4):634-641.
- [20] 田双梅,董汉松.转录因子 AtMYB44 促进拟南芥抗病耐热及抑制开花的作用[D].南京:南京农业大学,2012.
- [21] Feng C P, Andreasson E, Maslak A, et al. *Arabidopsis* MYB68 in development and responses to environmental cues[J]. Plant Science, 2004, 167(5):1099-1107.
- [22] Li S H J, Fu Q T, Chen L G, et al. *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26 and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance [J]. Planta, 2011, 233 (6): 1237-1252.
- [23] Li S J, Fu Q T, Huang W D, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor WRKY25 in heat stress[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(4):683-693.
- [24] Wu X L, Shiroto Y, Kishitani S, et al. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of HSP101 promoter[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28:21-30.
- [25] Li S J, Zhou X, Chen L G, et al. Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress[J]. Molecules and Cells, 2010, 29(5):475-483.
- [26] 王学兰,林良斌,余迪求.拟南芥 WRKY68 转录调控因子的表达谱分析[J].植物分类与资源学报,2013,35(1): 41-47.

- [27] Huang J,Wang M M,Jiang Y,et al. Expression analysis of rice A20/AN1-type zinc finger genes and characterization of ZFP177 that contributes to temperature stress tolerance[J]. Gene,2008,420(2):135-144.
- [28] Dixit A R,Dhankher O P. A novel stress-associated protein‘AtSAP10’from Arabidopsis thaliana confers tolerance to nickel, manganese, zinc, and high temperature stress [J/OL]. 2011-6-9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.e20921>.
- [29] Davletova S,Schlauch K,Couto J,et al. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis[J]. Plant Physiology,2005,139(2):847-856.
- [30] Rizhsky L,Davletova S,Liang H,et al. The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279 (12): 11736-11743.
- [31] Vogel J T,Zarka D G, Van Buskirk H A, et al. Roles of the CBF2 and ZAT 12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis[J]. Plant Journal,2005,41(2):195-211.
- [32] Mittler R,Kim Y,Song L,et al. Gain-and loss-of function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress [J]. FEBS Letters, 2006, 580 (28-29): 6537-6542.
- [33] Sakamoto H,Maruyama K,Sakuma Y,et al. Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought,cold and high-salinity stress conditions[J]. Plant Physiology,2004,136:2734-2746.
- [34] Gao H,Brandizzi F,Benning C,et al. A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in Arabidopsis thaliana[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,2008,105(42):16398-16403.
- [35] 喻旭,牛向丽,杨盛慧,等.过量表达转录因子OsbZIP60对水稻抗热和抗旱能力的研究[J].中国农业科学,2011,44(20):4142-4149.
- [36] Paliwal R,Roder M S,Kumar U,et al. QTL mapping of terminal heat tolerance in hexaploid wheat (*T. aestivum* L.)[J]. Theoretical Applied Genetics, 2012, 125 (3): 561-575.
- [37] 曹立勇,赵建根,占小登,等.水稻耐热性的QTL定位及耐热性与光合速率的相关性[J].中国水稻科学,2003,17(3):223-227.
- [38] Kasuga M,Miura S,Shinozaki K,et al. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress inducible rd29A promoter improved drought-and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer[J]. Plant Cell Physiology,2004,45(3):346-350.
- [39] Pellegrineschi A,Reynolds M,Pacheco M,et al. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions[J]. Genome,2004,47(3):493-500.

Genetic Engineering Advance for Heat Tolerance Transcription Factors of Plants

ZHAO Di, LIU Ren-ze, GUO Chang-hong, GUO Dong-lin

(Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province/
College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang
150025)

Abstract: High temperature(HT) stress is a major environmental stress that limits plant growth, metabolism and crop yield worldwide, generating transgenic plants could improve the tolerance to high temperature. An overview on the found transcription factors of high temperature tolerance recently were reviewed, and the progress of generating heat tolerance plants by genetic engineering was expounded, so as to provide a reference to foster thermal plants by genetic engineering methods.

Key words: heat tolerance;transcription factors;genetic engineering