

文章编号: 1674-7054(2010)04-0376-04

植物抗旱基因工程研究进展

王树昌

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101)

摘要: 综述了植物耐旱的生理机制、调控途径、耐旱相关调控蛋白和基因等方面的研究成果, 提出抗旱育种工作中抗旱评价指标的选择可根据植物的特点、研究目的来确定, 也可采用单因素与多因素进行对比综合分析来确定, 指出今后抗旱育种工作重点仍为探索植物抗旱机制方面。

关键词: 植物耐旱; 作用机制; 耐旱基因

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

干旱和旱灾从古至今都是人类面临的主要自然灾害, 世界上有 1/3 以上的土地属于干旱或半干旱地区^[1], 其他地区也常常出现周期性或难以预料的干旱。随着人类的经济发展和人口膨胀, 水资源短缺现象日趋严重, 这直接导致了干旱地区的扩大与干旱化程度的加重。干旱严重影响作物的分布、生长发育、产量及品质的形成, 在众多的非生物胁迫因素中, 干旱对农作物造成的损失占首位。因此, 抗旱物种选育已成为干旱半干旱地区育种工作者的中心任务。

植物抵御干旱的反应机制是复杂多样的, 不同的时空条件下, 植物具有不同的抗旱能力和方式, 作物抗旱机理的研究是抗旱育种的基础, 也是决定育种成败的关键因素之一。经历了几十年的努力, 国内外学者对植物抗旱性的研究已从抗旱指标的独立因素分析测试, 进入到分子及基因水平等微观领域的探索。笔者就植物耐旱的生理机制、调控途径、耐旱相关调控蛋白和基因进行了综述。

1 干旱胁迫下的植株生理学反应

植物对干旱胁迫产生反应的时间可在几秒钟内发生(如蛋白质磷酸化、甲基化状态的变化), 也可在几分钟或者几小时内(如基因表达种类及其水平的变化), 甚至若干天之后(如抗旱相关的功能蛋白的翻译)发生, 这种抗旱特性的差异主要取决于植物的物种和基因型以及植株所处的发育阶段、干旱发生器官和细胞以及亚细胞类型等和干旱发生的强度以及持续的时间^[2]。为了适应干旱反应, 植株通过形态结构的改变来维持植物的正常生长发育, 如叶片表皮外壁发达的角质层的产生、表皮毛的发生、叶片卷缩和萎蔫、气孔关闭; 减小表面积/体积比; 茎木质化程度的提高; 根系木栓化和木质化程度的加强、根系变细变长; 根冠比增高; 株形变小等, 都有利于植物减少蒸腾面积和增加植物的防脱水能力^[3]。此外, 植物为抵御环境干旱胁迫还可以通过细胞内的生理生化变化来实现, 如产生渗透调节物质脯氨酸、甜菜碱、甘露醇、海藻糖、果聚糖、肌醇、多胺等小分子化合物; 增加活性氧清除系统的抗氧化酶类的抗氧化能力等^[4-5]。但所有这些植株在整体水平上、组织细胞水平上及生理生化水平上的抗旱性, 都是体内相关基因表达的结果。因此, 植物抗旱基因表达的调控机理才是植物抗旱性的内在根源。

2 植物耐旱的调控途径^[2]

2.1 ABA 完全不依赖型 水分胁迫被细胞膜上的特异受体感知后, 不需 ABA 介导, 直接引发第二信使系统, 最终激活下游与顺式作用元件 CRT/DRE (dehydration responsive element binding protein) 结合的

收稿日期: 2010-09-16

作者简介: 王树昌(1976-), 男, 山东滨州人, 助理研究员, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所助理研究员。

E-mail: wangshuchang2001@163.com

CBF1, CBF2, CBF3, 和 DREB1a, DREB1b, DREB1e, DREB2 等与植物抗旱相关的转录因子^[6], 从而导致特异基因被诱导表达。

2.2 ABA 完全依赖型 植物在干旱胁迫条件下, 激发 ABA 合成酶的作用, 使植物体内源 ABA 水平显著增加。通过与顺式作用元件 ABRE (ABA-responsive element-binding protein) 特异结合的植物抗旱相关的转录因子 ABF (ABA-binding factor) 和 Bzip (basic-region Leu-zipper), 以及与 MYBR 和 MYCR 相结合的 MYB 和 MYC 类转录因子, 此类基因可由外源 ABA 诱导表达, 从而指导诱导基因的表达。

2.3 ABA 部分依赖型 响应干旱的重要标记基因 RD29A (responsive to dehydration), 它的启动区内同时存在 ABA 应答组件和应答干旱的脱水响应组件, 前者参与对脱水处理时反应较慢, 而后者在脱水处理时反应较快^[7-8]。

3 耐旱相关的调控蛋白及基因

3.1 起调节作用的蛋白质因子 抗旱相关基因的表达需经历逆境信号的接受和转导, 诱导基因的转录, 功能基因的转录 3 个不同水平的调节。植物细胞干旱胁迫信号的接受可以通过膨压变化或膜受体的活性变化感知水分胁迫, 从而将胞外信号转为胞内信号, 触发信号传递途径。通常抗旱相关基因表达的 3 个不同水平的调节因子为:

1) 传递信号和调控基因表达的转录因子。与抗旱相关转录因子的主要有 DREB, MYC/MYB, bZIP, WRKY 和 NAC 类等基因^[9]。

2) 感应和转导胁迫信号的蛋白激酶。参与干旱胁迫信号的传递, 主要有促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)^[10], Ca^{2+} 的蛋白激酶 (Calcium-depeodent protein kinase, CDPK)^[11] 和磷酸二脂酶 (phospholipase C, PLC)^[12]。如 CDPK1 和 CDPKd 能激活干旱胁迫诱导的启动子^[11], 进而启动下游的反应。

3) 与第二信使生成有关的酶类。胁迫信号被感知后, 可导致第二信使 (Ca^{2+} , IP3, DAG, PA, 脱落酸 (ABA) 等) 生成, 在此期间有磷脂酶等参与。

3.2 直接起保护作用的蛋白质 处于信号转导及转录因子下游的是对干旱胁迫起直接保护作用的干旱诱导蛋白。干旱诱导蛋白主要有以下几类:

3.2.1 膜蛋白 植物膜蛋白包括水通道蛋白 (aquaporins), 液泡膜嵌入蛋白 (TIP), 胞质膜嵌入蛋白 (PIP), 离子通道蛋白等。当植物遇到干旱时, 膜蛋白能改变膜的水分通透性, 使水分更易于透过质膜或液泡膜进入细胞^[13-14]。水通道蛋白是近年发现的一类专一运输水分的质膜或液泡膜上 $26 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ u 的膜镶嵌蛋白, 与离子通道等功能通道蛋白同属 MIP (Major intrinsic protein) 蛋白家族, 具有高度保守的膜蛋白, 含 6 个跨膜区段。水通道蛋白构成了水分运输的特异性通道, 能增强细胞膜对水分的通透性, 约 70% ~ 90% 的植物体内水分的运动是通过水通道蛋白运送的。水通道蛋白的开关受外界条件的影响, 这种影响是通过水通道蛋白上的多个磷酸化位点的磷酸化和去磷酸化作用调节。水通道蛋白活性受 ABA 和 Ca^{2+} 调节^[15]。

3.2.2 大分子保护因子 植物细胞中保护生物大分子及膜结构的蛋白质主要包括抗冻蛋白 (antifreeze protein, AFP), 胚胎发生后期富集蛋白 (late-embryogenesis-abundant proteins, LEA) 和伴侣蛋白 (chaperone)。其中与植物抗旱关系密切的是 LEA 蛋白和伴侣蛋白。它们具有高度亲水性多肽结构, 在植物受到干旱胁迫失水时, 能够部分替代水分子, 蛋白质的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, 稳定细胞膜结构, 维持细胞膜结构和大分子功能的稳定性。伴侣蛋白中很大部分是脱水蛋白, 具有热稳定性和高溶解性, 其排斥作用促使变性蛋白质复性, 进而保护其他蛋白质^[16-17]。

3.2.3 渗透调节因子合成酶 在干旱胁迫下, 植物为消除伤害, 维持渗透平衡和体内水分, 在细胞中产生和积累一些小分子渗透调节因子, 如脯氨酸、甜菜碱、海藻糖、果聚糖、甘露醇、山梨醇等, 其合成酶如脯氨酸合成酶 (PSCS)、甜菜碱醛脱氢酶 (BADH)、海藻糖 - 6 - 磷酸合酶 (OtsA)^[18]、果聚糖蔗糖酶基因 (sacB)^[19]、1 - 磷酸 - 甘露糖醇脱氢酶基因 (mtlD) 等。这些保护剂可以螯合细胞脱水过程中浓缩的离子, 减少离子毒害的作用; 亦可通过静电相互作用减少或增加液泡膜对某些离子的吸入, 改变该离子在细胞质和液泡的浓度, 能够保护酶和膜免受高盐浓度的伤害, 起到植物自身主动调节细胞渗透势的作用, 此

类基因过量表达亦明显提高了植株的抗旱能力^[20-23]。

3.2.4 降解、修复和解毒基因 干旱胁迫可使植物体内的酶代谢紊乱,有毒性的活性氧水平升高,此时,植物会产生抗氧化物质。抗氧化物主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、过氧化物酶(POD)等^[23]。这些抗氧化物可及时清除一些活性氧,避免膜脂的过氧化,维护叶片一定的光合作用^[24]。这些抗氧化物还可起到增强植物耐脱水能力,保护细胞结构,参与渗透调节和水分运输以及调节植株生长等过程,使得植物能够在一定的水分条件下开源节流,度过难关。

3.3 抗旱 miRNA miRNA 主要通过调控靶基因的表达参与生物体生命活动的调控,有实验证据表明,miRNA 在植物与环境间的相互作用的过程中有着十分广泛和深远的影响,miRNA159 受 ABA 诱导过量表达,miRNA393 受干旱胁迫和 ABA 的诱导表达,miR169g 是 14 个 miR169 基因家族中唯一在根和幼苗被干旱诱导后表达变化显著的成员^[25]。ZHANG B H 等^[26]分析了 65 个物种的 EST 序列,从中鉴定了 338 个新的 miRNA,其中 123 个受逆境胁迫诱导,28 个与干旱胁迫有关。

4 抗旱评价方法的研究

抗旱育种的分子基础研究取得了重大的进展,但如要将分子育种应用于作物育种实践工作中,必须做抗旱评价。目前常用的抗旱效果评价方法^[27]如下:

4.1 对比分析法 对比分析法主要是对植物形态结构或解剖结构进行单独的比较分析。例如:角质层厚度、栅栏组织/海绵组织厚度、细胞导管密度等的测试。该方法优点是简单直观,但人为主观影响比较大。

4.2 聚类分析法 是将数学方法应用于育种工作,针对多因素、多水平的综合分析方法。例如:抗旱物种的归类、多种因素对抗旱能力影响的综合整理等。这种方法对筛选物种各种生理指标的变化对抗旱功效的影响,确定抗旱能力的主要指标方面具有重要的意义。

4.3 模糊数学综合评价法 它是一种比较简单的方法,在林木抗旱研究中尤其是对林木抗旱性的研究中被广泛使用。主要应用于物种的综合抗旱性能的分析。

4.4 主成分分析法 主成分分析法对分析影响抗旱能力的主要指标的确定方面具有优越性^[28],可避免指标间功能的重叠对抗旱能力评价产生误差,具有更严格、更客观的科学性分析优点。

5 研究展望

植物抗旱指标多种多样,但不是所有的指标都适合各种不同的抗旱育种目标,因此研究人员可以根据作物的特点、研究的目的来选择评价指标。例如,作物的主要价值体现在根部,这就应该侧重从根长、根/冠比、根生物量等进行分析,重点解决这部分的抗旱能力。另外,抗旱育种工作可以采用单因素与多因素进行对比综合分析,确定植物抗旱的主要指标。

关于植物的抗旱机制的研究,虽然做了大量工作,总结了一些规律性的结论,但其机制并不完全清楚。目前利用基因工程技术培育抗旱品种主要是增加植物渗透性代谢产物的合成能力,使植物在水分胁迫下能合成更多的渗透调节物质以提高植物的渗透调节能力,增强植物对活性氧自由基的清除能力,使植物在水分胁迫下过量表达一些抗氧化酶,以有效地排除有害的活性氧自由基,从而提高细胞耐脱水的能力。植物的抗旱机制具有复杂性,单从某个方面研究还远远不够,因此要求育种工作者们能从更深的层次上搞清楚植物的抗旱机制,增强抗旱育种同分子生物学与基因工程相结合的研究,这有利于推进我国抗旱育种的进程。

参考文献:

- [1] 黎祜琛,印治军. 树木抗旱性及抗旱造林技术研究综述[J]. 世界林业研究, 2003, 16(4): 17-22.
- [2] 宋松泉,王彦荣. 植物对干旱胁迫的分子反应[J]. 应用生态学报, 2002, 13(8): 1037-1044.
- [3] 孙宪芝,郑成淑,王秀峰. 木本植物抗旱机理研究进展[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 629-634.
- [4] 王均华,苏波,马冲,等. 植物抗旱基因工程研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 1: 20-24.
- [5] 陈亚娟,李付广,刘传亮,等. 植物渗透调节研究进展及与棉花耐旱遗传改良[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 149-154.
- [6] 杜洪伟,陈芬,肖国樱. 提高作物耐旱性的 DREB 转录因子研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 6: 1-6.

- [7] ABE H, YAMAGUEHI-SHINOZAKI K, URAO T, et al. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression[J]. Plant Cell, 1997, 9(10): 1859 – 1868.
- [8] IWASAKI T, YARNAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Identification of a cis-regulatory region of a gene in Arabidopsis thaliana whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis[J]. Mol Gen Genet, 1995, 247: 391 – 398.
- [9] 唐益苗, 赵昌平, 高世庆, 等. 植物抗旱相关基因研究进展[J]. 麦类作物学报, 2009, 9(1): 166 – 173.
- [10] SEGR R, KREBS R, KREBS B G. The mapk signaling cascade[J]. FASEBJ, 1995, 9: 726 – 735.
- [11] SHEEN J. Ca-dependent Protein Kinases and stress signal transduction in plants[J]. Sci, 1996, 274: 1089 – 1092.
- [12] SUE G R, YUN S B. Regulation of Phosphoinositide-specific Phospholipase C Isozymes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 272: 15045 – 15048.
- [13] FORREST K L, BHAVE M. The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features[J]. Funct Integr Genomics. 2008, 8(2): 115 – 133.
- [14] 杨淑慎, 山仑, 郭蔼光, 等. 水通道蛋白与植物的抗旱性[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(6): 214 – 218.
- [15] MAUREL C, CHRISPHEELS M J. Aquaporins molecular entry into plant water relations[J]. Plant Physiol, 2001, 125: 135 – 138.
- [16] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in Plants[J]. Criti Rev Plant Sci, 2005, 24(1): 23 – 58.
- [17] XIAO B, HUANG Y, TANG N X, et al. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions[J]. Theo Appl Genet, 2007, 115(1): 35 – 46.
- [18] LEBO R V, SU Y. Positional cloning and multicolor in situ hybridization. Principles and protocols[J]. Methods Mol Biol, 1994, 33: 409 – 438.
- [19] PILON-SMITS E, EBSKAMP M, PAUL M J, et al. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress[J]. Plant Physiol, 1995, 107(1): 125 – 130.
- [20] YAMADA M, MORISHITA H, URANO K, et al. Effects of free Proline accumulation in petunias under drought stress[J]. J Exp Bot, 2005, 56(417): 1975 – 1981.
- [21] GUO P, BAUM M, GRANDO S, et al. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage[J]. J Exp Bot, 2009, 60(12): 3531 – 3544.
- [22] NIU X, ZHENG W, LU B F, et al. An unusual posttranscriptional processing in two betaine aldehyde dehydrogenase loci of cereal crops directed by short, direct repeats in response to stress conditions[J]. Plant Physiol, 2007, 143(4): 1929 – 1942.
- [23] HOEKSTRA F A, GOLOVINA E A, BUITINK J. Mechanisms of Plant desiccation tolerance[J]. Trends Plant Sci, 2001, 6: 431 – 438.
- [24] NAYA L, LADRERA R, RAMOS J, et al. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of Plants[J]. Plant Physiol, 2007, 144(2): 1104 – 1114.
- [25] 刘运华, 刘灶长, 罗利军. 植物 RNA 及其在植物发育进程和环境胁迫响应中的潜在功能[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(5): 957 – 992.
- [26] ZHANG B H, PAN X P, CANNON C H, et al. Conservation and divergence of Plant micro RNA genes[J]. Plant J, 2006, 46: 243 – 259.
- [27] 黎燕琼, 郑绍伟, 陈泓, 等. 林木抗旱性研究及其进展[J]. 世界林业研究, 2007, 20(1): 10 – 15
- [28] 李慧卿, 马文元. 沙生植物抗旱性比较的主要指标及分析方法[J]. 干旱区研究, 1998, 15(4): 12 – 15.

Progress in the Study on Plant Drought Tolerance Mechanism

WANG Shu-chang

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou 571101, China)

Abstract: In the paper, the physiological mechanism, the regulation pathway and the drought enduring proteins of plant were reviewed, and the opinion that the selection of drought-resistant index could be determined according to the characteristics of crop and research purpose, or according to the analysis of single element or multi-element for drought tolerance breeding were proposed, and the opinion that the breeding in the future should focus on the exploration of plant drought tolerance mechanism was also suggested.

Key words: drought tolerance; mechanism; drought-resistant genes