

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01771

水稻基因 *OsASIE1* 抗逆功能分析

吴慧敏 黄立钰 潘雅娇 靳 鹏 傅彬英*

中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源和遗传改良国家重大科学工程, 北京 100081

摘 要: 作为重要的植物转录因子家族, AP2/EREBP 转录因子在植物发育、激素、病原反应及非生物胁迫如干旱、高盐、低温应答方面起重要作用。本研究发现水稻 AP2/EREBP 转录因子家族 EREBP 亚家族成员 *OsASIE1* (abiotic stress induced EREBP gene) 在水稻受到高盐、干旱胁迫时表达量迅速提高, 并且在水稻中超表达 *OsASIE1* 能够改善水稻抵抗盐胁迫的能力。凝胶迁移率检测(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)表明, 该转录因子的 AP2 结构域能够结合干旱应答顺式作用元件 DRE (dehydration-responsive element)和乙烯应答元件 GCC box (ethylene response element), 推测 *OsASIE1* 可能通过结合 DRE 和 GCC box 作用元件调控下游相关基因的表达, 进而调控相关抗逆反应。

关键词: 水稻; AP2/EREBP 转录因子; EMSA; 耐盐; 超表达

Function Analysis of Gene *OsASIE1* Responding to Abiotic Stresses in Rice

WU Hui-Min, HUANG Li-Yu, PAN Ya-Jiao, JIN Peng, and FU Bin-Ying*

Institute of Crop Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: AP2/EREBP transcription factors play an important role in plant development, hormone response, biotic and abiotic stress responses. We identified that *OsASIE1*, a member of EREBP subfamily of AP2/EREBP transcription factor family in rice, was involved in abiotic stress response. The expression of *OsASIE1* was induced by drought and salt stresses, and over-expression of *OsASIE1* in the transgenic rice plant could improve its tolerance to salt stress. Further electrophoresis mobility shift assay (EMSA) revealed that the AP2 domain of *OsASIE1* protein could bind both DRE (dehydration-responsive element) and GCC box (ethylene response element, ERE) *in vitro*. All these results implicated that *OsASIE1* might be involved in abiotic stress response by regulating the expression of downstream genes with DRE and GCC box binding.

Keywords: Rice; AP2/EREBP transcription factor; EMSA; Salt tolerance; Over-expression

各种生物和非生物胁迫是影响水稻生长和产量的重要因素, 发掘能够改善水稻抵抗逆境胁迫能力的基因将为基因工程改良水稻新品种打下基础。在长期进化过程中, 植物在分子、细胞、生理和生物化学水平上发展出多种机制应对逆境胁迫, 转录因子作为上游调控基因在植物的胁迫应答途径中扮演重要的角色^[1]。植物中参与胁迫应答反应的主要有 AP2/EREBP、bZIP、NAC、MYB 和 WRKY 转录因子家族^[2]。其中 AP2/EREBP 转录因子家族基因广泛参与植物的发育、激素信号转导、病原反应与干旱、

高盐及低温等胁迫应答反应。该家族转录因子的共同特点是含有一个 60 个氨基酸左右的 AP2 结构域, 它在与 DNA 结合中具有重要的作用。根据 AP2 结构域的特点, AP2/EREBP 转录因子家族被分为: AP2、EREBP、RAV 和其他共 4 个亚类。AP2 成员含有 2 个重复的 AP2 结构域, 而 RAV 成员含一个 AP2 结构域和一个类似 B3 结构域; EREBP 亚家族成员含有一个 AP2 结构域, 且有 ERF 和 DREB/CBF^[3-4] 2 个分支。

研究表明, EREBPs 转录因子广泛参与植物的生

本研究由国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX001-003, 2009ZX08009-007B)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 傅彬英, E-mail: fuby@caas.net.cn, Tel: 010-82106698

第一作者联系方式: E-mail: wuhuimin86@126.com, Tel: 010-82105855

Received(收稿日期): 2011-03-14; Accepted(接受日期): 2011-06-25; Published online(网络出版日期): 2011-07-28.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110728.1000.003.html>

物和非生物胁迫应答反应。ERFs类转录因子主要参与植物的生物胁迫应答反应,如病原反应、伤害反应、乙烯信号途径^[1,5]。最早发现的ERF转录因子是从烟草中分离得到的4个乙烯诱导病程相关(pathogenesis-related, PR)蛋白 EREBP1-4,它们通过结合下游基因启动子区域的乙烯应答元件 GCC box 调控下游基因的表达。GCC box 广泛存在于烟草和其他植物 PR 蛋白基因的 5'UTR 区域,核心序列是 AGCCGCC^[6]。1997年, Zhou 等在番茄中发现3个 ERF 蛋白(Pti-4、Pti-5和 Pti-6)能够与疾病防御蛋白 Pto 相互作用^[7-8],进一步验证了 ERFs 转录因子在植物的病原反应中具有重要作用。在植物中超表达一些 ERFs 基因亦能够提高植物的抗病能力,如 *ERF1*、*Pti4*、*ATERF1* 基因^[5]。最近的研究表明水稻中的 ERF 转录因子在乙烯应答^[9]、淹水胁迫应答^[10-11]、干旱胁迫应答^[12]等多种生物途径中起正向调节作用。

DREBs 转录因子在植物的冷、干旱、高盐、过氧化物等胁迫应答途径中具有重要的作用,参与不依赖于 ABA 的胁迫应答反应。DREBs 转录因子通过结合下游基因启动子区的干旱应答顺式作用元件 DRE/CRT 而调控下游基因的表达。干旱应答顺式作用元件 DRE (dehydration-responsive element)最早在逆境胁迫诱导基因 *rd29A* 的启动子区域被发现,核心序列为 A/GCCGAC^[13]。与 DRE 相似的顺式作用元件 CRT (C-repeat)则是在一个冷诱导基因 *cor15a* 的启动子区被发现,其核心序列是 TGGCCGA^[14-15]。DRE/CRT 被发现存在于多个受干旱和低温诱导的基因的启动子区域^[16]。在拟南芥、水稻等植物中超表达 DREB 家族的基因大多能提高植株应对非生物胁迫的能力^[13,17-18]。迄今为止,越来越多的 DREBs 基因从不同植物中被克隆^[19]。在水稻中发现的 DREB 基因有 *OsDREB1A-G*、*OsDREB2A*、*OsDREB2B*, 其中 *OsDREB1A*、*OsDREB1E*、*OsDREB1G*、*OsDREB2A*、*OsDREB2B* 能够特异性地结合 DRE^[17-18]。研究发现在拟南芥中超表达 *OsDREB1A* 能够提高拟南芥植株耐受低温、高盐和干旱的能力^[17]; 在水稻中超表达 *OsDREB1G* 和 *OsDREB2B* 也能够明显地提高转基因水稻的抗旱性,而超表达 *OsDREB1E* 仅仅能够轻微地提高水稻抵抗干旱的能力^[18]。

ERFs 和 DREBs 转录因子功能的差异主要体现在它们能够结合的顺式作用元件和调节的下游基因不同。有些 EREBPs 转录因子既能结合 DRE, 也能结合 GCCbox, 如 TINY^[20]、TINY2^[21]、BnDREB

III^[22]、AtERF1、AtERF4、AtEBP 和 CBF1^[23]; 而部分只能结合 DRE, 如 CBF2/DREB1C 和 CBF3/DREB1A 等。ERFs 转录因子倾向于结合 GCC box, DREBs 转录因子则倾向于结合 DRE。为了发掘影响两类转录因子结合的关键氨基酸, Sakuma 等^[3]通过多序列比对分析发现拟南芥中的 DREBs 转录因子的 AP2 结构域第 15 和第 20 个氨基酸分别是缬氨酸(Val, V)和谷氨酸(Glu, E), 而 ERFs 转录因子的 AP2 结构域第 15 和 20 个氨基酸是丙氨酸(Ala, A)和天冬氨酸(Asp, D), 进一步研究表明, Val-15 和 Glu-20 特别是 Val-15 对于结合 DRE 有重要的作用, 但不影响对 GCC box 的结合, 这可能是造成 ERFs 和 DREBs 转录因子功能不同的原因。为了发掘影响 GCC box 结合的关键氨基酸, 孙山等^[20]比较能够结合 2 种顺式作用元件的蛋白序列和只能结合 DRE 的蛋白序列发现 2 类蛋白的 AP2 保守区的第 16 个氨基酸不同, 进一步研究表明 Ser-16 对于拟南芥中的 DREB 转录因子 TINY 结合 GCC box 是必不可少的。TINY 既参与生物胁迫反应途径, 也参与非生物胁迫途径, 说明 DRE 介导的调控途径和 GCC box 介导的调控途径存在一定的重叠。

水稻中有些 AP2/EREBP 转录因子基因在受到非生物胁迫时表达量明显升高^[24], 其中大部分基因为 DREBs 和 ERFs, 这些基因很有可能与水稻的非生物胁迫应答反应相关。虽然近年来对于 EREBPs 转录因子参与非生物胁迫应答反应的机制有了较全面的研究, 但是水稻中还有很多的 EREBPs 基因的功能未知。为了发掘与水稻非生物胁迫应答反应相关的 EREBPs 基因, 本研究选择本课题组前期芯片分析发现的受非生物胁迫诱导表达的 EREBPs 基因 *OsASIE1* (Os08g0408500)进行研究。通过干旱、高盐、低温胁迫下上述基因在不同水稻品种中的表达差异, 结合凝胶阻滞实验中对顺式元件 GCC box 和 DRE 的结合情况, 以及超表达水稻植株的表型变化, 分析候选基因与水稻非生物胁迫应答的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

日本晴(Nipponbare, *Oryza sativa* ssp. *japonica*)及典型耐旱早稻品种 IRAT109、耐盐水稻品种 FL478、耐冷水稻云南地方品种丽江新团黑谷(LTH)。

1.2 胁迫处理

1.2.1 水稻品种日本晴的低温、高盐和干旱胁迫

水稻日本晴种子经消毒处理, 37 °C 催芽 3 d, 萌

发后选发芽一致的种子播于塑料盒泡沫架上, 每孔 2 粒, 二叶前水培, 二叶后用 Yoshida 营养液培养。于五叶期开始低温(4 ℃)、高盐(150 mmol L⁻¹ NaCl)和渗透胁迫(20% PEG)处理, 并于胁迫处理 0 h、0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h 后取叶片, 液氮速冻, -70 ℃ 低温保存。

1.2.2 抗逆水稻品种的低温、高盐和干旱胁迫

种子经消毒处理和催芽后, 旱处理材料(IRAT109)移入装土的盆中种植, 冷处理(LTH)和盐处理(FL478)材料播种于塑料盒泡沫架上。五叶期分别进行干旱(断水至叶片全卷)、高盐(150 mmol L⁻¹ NaCl, 48 h)和低温处理(4 ℃, 48 h)处理, 并分别于处理前和处理后取叶片和根, 液氮速冻, -70 ℃ 低温保存。

1.3 实时定量 PCR 分析

采用 TRIZOL 试剂提取实验样品总 RNA。参照文献[24]进行定量 PCR 实验, 所用 *OsASIE1* 的 PCR 引物为 F: 5'-TGGTCTGATTGTTGGTAGCC-3'; R: 5'-TCCAA GAACTGGCAGACGA-3'; 内参基因 *Actin1* 引物序列为 F: 5'-GACTCTGGTGATGGTGTTCAGC-3'; R: 5'-GG CTGGAAGAGGACCTCAGG-3'。

1.4 凝胶迁移率实验(EMSA)

1.4.1 原核表达蛋白的制备 以 PCR 扩增出 *OsASIE1* 的 AP2 保守域(67~193 aa)的基因编码序列并构建到质粒 pET-32a (Novagen, USA, 69015-3)中, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS (TransGen Biotech, China, Cat. No: DR101)中进行蛋白表达, 产物经 His-trap 柱子纯化(GE), Milipore 超滤管浓缩和脱盐后, 采用 Bradford 法^[31]测定蛋白浓度。

1.4.2 目的 DNA 序列及突变序列的制备 将顺式作用元件 GCC box (CATAAGAGCCGCCACT)和突变序列(CATAAGATCCTCCACT), DRE 序列(ATACT ACCGACATGAG)和突变序列(ATACTACTGATATG AG)串联重复 3 次。以化学合成法分别合成双链后, 将其等量混合(单链浓度 100 nmol L⁻¹), 95 ℃ 温育 10 min 后慢慢冷却, 复性为双链。

1.4.3 EMSA 实验 采用 Invitrogen 的 EMSA 试剂盒标准操作步骤。

1.5 多序列比对和系统发育树分析

利用 BioEdit7.0 软件对 *OsASIE1* 和所选的 EREBP 转录因子进行多序列比对。用 MEGA4 软件构建 *OsASIE1* 和所选的 EREBP 转录因子的系统发育树, 采用邻接法(Neighbor-Joining Method)^[25]的 Complete Deletion 模式建树, 用 Bootstrap 检验。

1.6 *OsASIE1* 超表达水稻植株获得及表型鉴定

1.6.1 载体构建和遗传转化 根据日本晴序列全

长设计引物, 通过反转录从 IRAT109 中扩增获得 *OsASIE1* 的基因全长 cDNA, 同时在 5'和 3'端加上 *Pst* I、*Bam*HI 酶切位点, 扩增引物为 F: 5'-GCACTG CAGATGGCAGCTGCTATAGAAGG-3'; R: 5'-TAAG GATCCTTATTGTTGTTGAGCAGC-3', 扩增产物经酶切纯化后连接到超表达载体 pCUBi1390 (含有 Ubi quitin 1 启动子)中。参照陈惠等^[26]建立的高效基因转化系统, 用农杆菌(*EHA105*)介导的遗传转化法, 以日本晴为受体材料, 进行遗传转化。

1.6.2 转基因植株表型鉴定 选用 T₁ 代转基因超量表达植株各家系的种子在加潮霉素(100 mg L⁻¹)的 1/2 MS 培养基上发芽, 去除阴性种子。将发芽的种子播到 96 孔 PCR 板中, 以 Yoshida 营养液水培, 4 周后用 150 mmol L⁻¹ NaCl 处理。设 3 次重复试验, 以野生型日本晴作为对照。

2 结果与分析

2.1 对 *OsASIE1* 水稻植株受到低温、高盐和干旱胁迫时的表达分析

2.1.1 日本晴中 *OsASIE1* 在低温、高盐和 PEG 胁迫下的表达量变化谱 为精确了解 *OsASIE1* 在各种非生物胁迫下的表达模式, 采用实时定量 PCR 分析该基因在水稻幼苗持续受到低温、高盐和干旱胁迫后的表达变化趋势。结果表明在 3 种胁迫下 *OsASIE1* 表达量均有增高, 但是表达模式存在差异(图 1)。在低温和 PEG 胁迫下, *OsASIE1* 表达量均呈逐渐上升趋势, 并在胁迫处理 3 h 达最高水平。然而相比于低温胁迫, 在 PEG 胁迫下 *OsASIE1* 表达量增加幅度较大, 并且在胁迫后期仍能保持较高水平。在盐胁迫下 *OsASIE1* 呈逐步升高的趋势, 并且表达量变化幅度较大, 最高点到达 20 倍以上。以上结果表明 *OsASIE1* 参与水稻对低温、盐和干旱胁迫的早期应答, 并在应答模式上存在差别。

转录因子在植物的非生物胁迫应答中有很重要的作用, 并且通常在胁迫的早期表达量迅速升高, 进而调控下游相关基因的表达。研究表明, 水稻幼苗经干旱和盐处理后, *OsASIE1* 的表达量明显升高, 但在低温处理后表达量只是略有增高^[12], 这与本文的研究结果一致。

2.1.2 *OsASIE1* 在典型抗逆水稻品种中胁迫前后的表达差异 为了进一步明确 *OsASIE1* 与水稻抗逆性的关系, 分析了各种胁迫条件下 *OsASIE1* 在典型抗逆水稻品种和日本晴中的表达情况。结果表明无论是在叶片中还是在根系中, *OsASIE1* 在典型抗逆

水稻品种中的表达模式与日本晴基本相同,而且在胁迫前后的表达量和日本晴相比差异也不太显著(图 2)。然而,在胁迫前后 *OsASIE1* 在叶和根中的表达量变化稍有差异,在低温和干旱胁迫下, *OsASIE1* 在根中的表达量增幅高于叶片;在盐胁迫下, *OsASIE1* 在叶片中的表达量增幅高于根系。

2.2 *OsASIE1* 的 AP2 结构域对 GCC box 和 DRE 的结合分析

EREBPs 转录因子通过与下游基因启动子区 GCC box 和 DRE 顺式元件结合,调控下游基因的表达,参与相关生物及非生物胁迫应答反应^[6,13]。本研究采用凝胶迁移率实验(EMSA)分析了 *OsASIE1* 的 AP2 结构域与 GCC box 和 DRE 的结合情况。结果表明, *OsASIE1* 蛋白的 AP2 结构域能够结合 GCC box 和 DRE 序列,但是无法结合其突变序列(图 3)。推测 *OsASIE1* 通过特异结合 GCC box 和 DRE 顺式元件以调节下游基因的表达,参与相关生物胁迫和非生物胁迫反应。

2.3 水稻和拟南芥中 *OsASIE1* 同源 EREBP 转录因子的系统比较分析

为了分析 *OsASIE1* 的 AP2 结构域能结合 GCC box 和 DRE 的原因,选择水稻和拟南芥中已知的 EREBP 转录因子与 *OsASIE1* 进行多序列比对和系统发育树分析(图 4)。结果表明, *OsASIE1* 与 DREBs 转录因子的亲缘关系较近。*OsASIE1* 的第 15 个氨基酸是缬氨酸(Val),这与 DREB 转录因子相同,而第 20 个氨基酸不是谷氨酸(Glu)而是亮氨酸(Leu), *OsDREB1A* 和 *OsDREB1B* 的 20 位氨基酸也都不是谷氨酸(Glu)而是缬氨酸(Val), *OsASIE1* 与其他既能结合 GCC box 又能结合 DRE 的 *AtERF1*、*AtERF4*、*AtEBP* 的第 16 个氨基酸也不是丝氨酸(Ser, S),这说明不同植物中 AP2/EREBP 转录因子结合机制和所需要的关键氨基酸具有差异性。

2.4 *OsASIE1* 超表达对水稻耐盐胁迫能力的改善

为进一步分析 *OsASIE1* 在水稻胁迫应答反应中

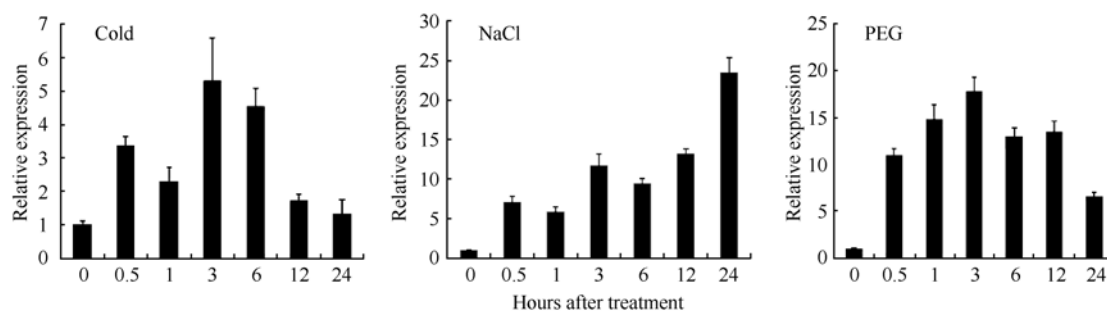


图 1 以实时定量 PCR 分析 *OsASIE1* 在非生物胁迫下的表达量差异

Fig. 1 Real-time PCR analysis of relative expression of *OsASIE1* under abiotic stresses

低温胁迫: 4 处理; 盐胁迫: 150 mmol L⁻¹ NaCl 处理; 渗透胁迫: 20% PEG 处理。分别于胁迫处理的 0、0.5、1、3、6、12、24 h 取叶片样品进行定量 PCR 分析。

Cold stress is treated at 4 , salt stress is treated under 150 mmol L⁻¹ NaCl, osmotic stress is treated in 20% PEG. Leaf samples were collected at 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, and 24 h of treatment for RT-PCR analysis, respectively.

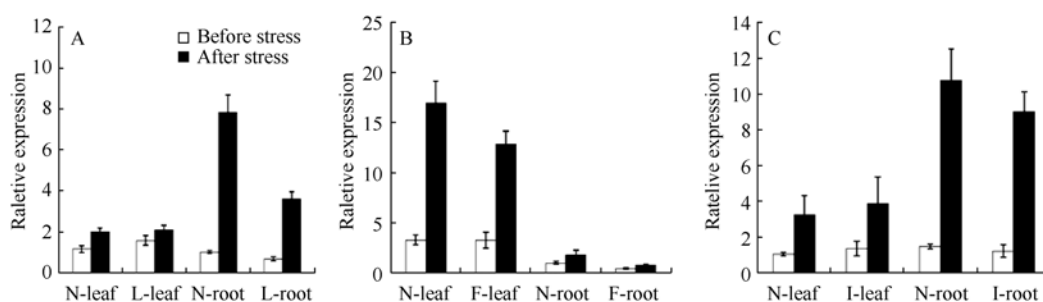


图 2 以实时定量 PCR 分析 *OsASIE1* 在典型抗逆水稻品种中胁迫前后的表达量差异

Fig. 2 Real-time PCR analysis of the expression of *OsASIE1* under stress in rice varieties with different abiotic stress tolerances

A: 冷胁迫下 *OsASIE1* 在日本晴和丽江新团黑谷中的表达量差异; B: 盐胁迫下 *OsASIE1* 在日本晴和 FL478 中的表达量差异; C: 干旱胁迫下 *OsASIE1* 在日本晴和 IRAT109 中的表达量差异。N: 日本晴; L: 丽江新团黑谷; F: FL478; I: IRAT109。

A: Expression changes of *OsASIE1* under cold stress in LTH and Nipponbare; B: Expression changes of *OsASIE1* under salt stress in FL478 and Nipponbare; C: Expression changes of *OsASIE1* under drought stress in IRAT109 and Nipponbare. N, L, I, and F indicate Nipp, LTH, IRAT109 and FL478, respectively.

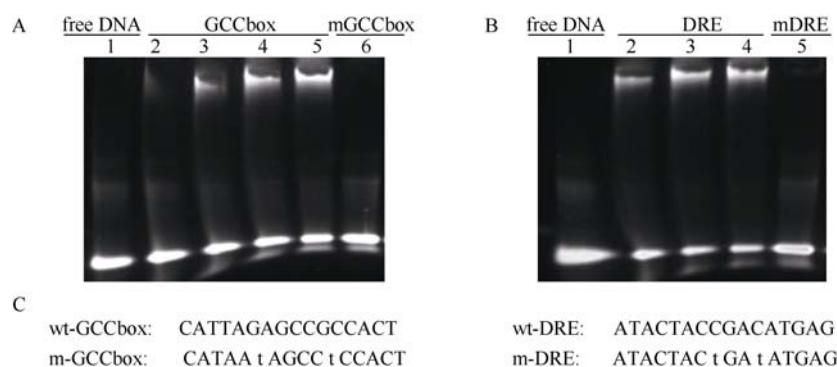


图 3 *OsASIE1* 的 AP2 结构域结合 GCC box 和 DRE 元件的 EMSA 分析图谱

Fig. 3 EMSA analysis of the bindings between the AP2 domain of *OsASIE1* and GCC box and DRE elements

A: *OsASIE1* 的 AP2 结构域结合 GCC box。Lane 1 为自由 DNA; lane 2~5 为 80 ng GCC box 加入 0.25、0.5、1.0、1.5 μg 目的蛋白; lane 6 为 mGCC Box 加入 1.5 μg 目的蛋白。**B:** *OsASIE1* 的 AP2 结构域结合 DRE。Lane 1 为自由 DNA; lane 2~4 为 80 ng DRE 加入 0.5、1.0、1.5 μg 目的蛋白; lane 5 为 mDRE 加入 1.5 μg 目的蛋白。**C:** GCC box 和 DRE 野生型及突变序列信息。

A: EMSA of AP2 domain of *OsASIE1* binding on GCC box. Lane 1: free DNA; lanes 2~5 indicate 80 ng GCC box incubated with 0.25, 0.5, 1.0, and 1.5 μg target protein, respectively; lane 6 indicates 80 ng mGCC box incubated with 1.5 μg target protein. **B:** EMSA of AP2 domain of *OsASIE1* binding on DRE. Lane 1: free DNA, lanes 2~4 indicate 80 ng GCC box incubated with 0.5, 1.0, and 1.5 μg target protein, respectively; lane 5 indicates 80 ng mDRE incubated with 1.5 μg target protein. **C:** Sequence information of GCC box and DRE in wild and mutant types.

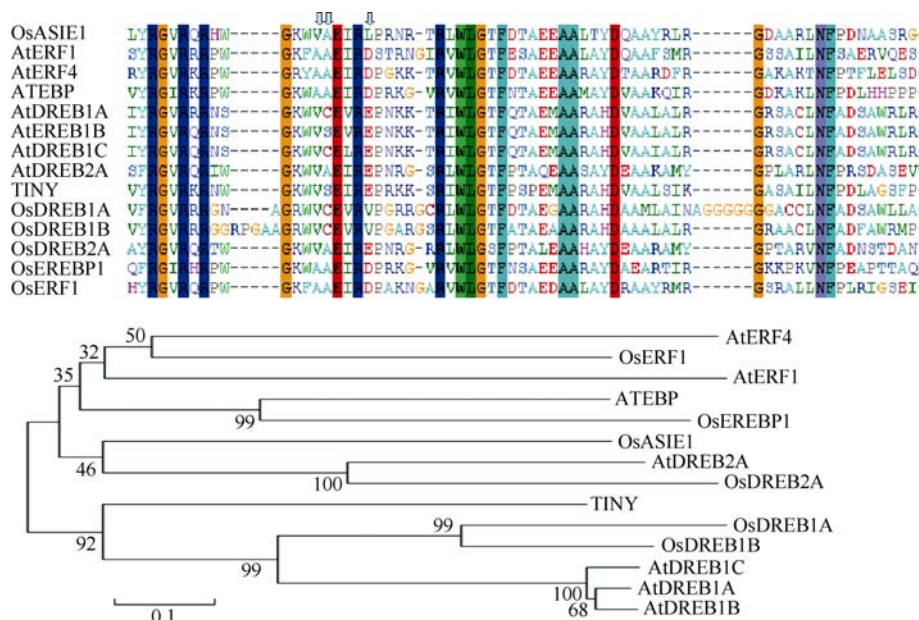


图 4 *OsASIE1* 的 AP2 结构域与 EREBP 转录因子的 AP2 结构域多序列比对及 *OsASIE1* 与 AP2/EREBP 转录因子的系统发育树分析

Fig. 4 Multiple alignment and phylogenetic analysis of AP2 domains of *OsASIE1* and EREBP transcription factors

箭头所指分别为 AP2 结构域的第 15、第 16 和第 20 个氨基酸。

Arrows indicate the 15th, 16th, and 20th amino acid of AP2 domain, respectively.

的作用, 构建了超表达载体进行转基因分析, 共获得 14 个转基因株系。与野生型植株相比, *OsASIE1* 超表达转基因植株较矮小(图 5-A); 实时定量 PCR 检验结果显示超表达植株中 *OsASIE1* 的表达量明显高于野生型(图 5-B)。进一步对 *OsASIE1* 超表达植株的耐盐性进行分析, 根据 T_0 代初步结果, 选择株系 1、2、5、10、17 生长 4 周的 T_1 幼苗进行 150 mmol L^{-1} NaCl 处理, 野生型作为对照。处理 2 d 后野生型植株的叶片大部分

萎焉, 而转基因植株的生长状态好于野生型(图 5-C), 并且恢复 3 d 后转基因植株大都生长出新叶, 而野生型植株较少有新叶的生长(图 5-D, E)。

3 讨论

植物应答非生物胁迫反应是一个非常复杂的过程, 有很多基因参与其中。近年来, 各种表达分析实验检测到大量受胁迫诱导表达的基因, 而外源 ABA

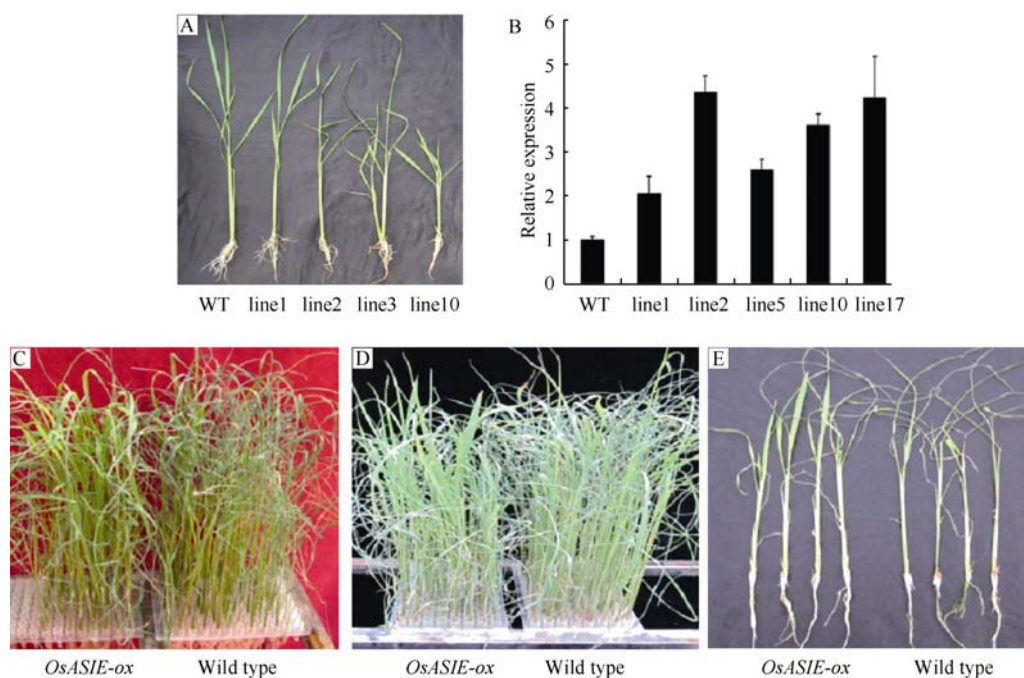


图 5 超表达 *OsASIE1* 提高了水稻抵抗盐胁迫的能力

Fig. 5 Over-expression of *OsASIE1* enhanced salt tolerance of rice

A: 转基因和野生型植株的表型。B: 超表达转基因植株中 *OsASIE1* 的表达量明显提高。WT 为野生型; line 1、2、3、5、10、17 为转基因株系。C: 150 mmol L⁻¹ NaCl 处理 2 d 植株表型。D, E: 150 mmol L⁻¹ NaCl 处理后恢复 3 d 植株表型。

A: phenotypes of transgenic lines and wild type, B: expression identification of *OsASIE1* in transgenic plants. WT: wild type; lines 1, 2, 3, 5, 7, and 17 indicate transgenic lines. C: phenotypes of transgenic lines and wild types treated by 150 mmol L⁻¹ NaCl for two days; D, E: phenotypes of transgenic lines and wild types in 3 d recovery after treatment.

能够诱导大量受干旱和低温胁迫诱导的基因,但是还有些受干旱和低温诱导的基因不受外源 ABA 的诱导。这表明植物中存在 2 种胁迫应答信号传递途径:一类是依赖于 ABA 信号的,另一类是不依赖 ABA 信号的。相应地,参与胁迫应答反应的转录因子也可以分为 2 类,一类是依赖于 ABA 的,以 ABRE 转录因子为代表,另一类不依赖于 ABA 的,以 DREB 转录因子为代表^[1]。已有研究发现 *OsASIE1* 不受 ABA 的诱导,本研究表明 *OsASIE1* 受低温、高盐、干旱诱导表达,说明 *OsASIE1* 可能参与不依赖于 ABA 的胁迫应答反应,可能与 *OsDREBs* 基因的作用机制相似。另外, *OsASIE1* 在典型抗逆水稻品种表达模式与日本晴基本相同,说明 *OsASIE1* 可能在植物的胁迫应答反应中起的是基础调控作用,并不是造成典型抗逆品种 IRAT109 (抗旱)、FL478 (耐盐)和丽江新团黑谷(耐冷)抗性提高的主要原因。

DREBs 类转录因子分为 EREB1 和 DREB2 转录因子,它们都参与植物的非生物胁迫应答反应,但其机制有所不同^[30-31]。二者在受到不同非生物胁迫时表达量变化模式也有差异, *DREB1* 基因受低温诱导而 *DREB2* 基因受干旱和高盐的诱导^[13]。本研究表

明,低温胁迫后 *OsASIE1* 表达量增加幅度较小,而在盐和干旱胁迫后表达量迅速升高且维持在较高水平。系统发育树分析也表明 *OsASIE1* 和 DREB2 转录因子的亲缘关系较近,所以 *OsASIE1* 应该属于类 DREB2 转录因子。

水稻和拟南芥中的 DREB 转录因子都能够结合 DRE,但是在结合机制上具有一定的差异。如 DRE 的核心序列为 A/GCCGAC,拟南芥中的 DREB1A 能够有效地结合 GCCGAC 和 ACCGAC;而水稻中的 *OsDREB1A* 优先结合 GCCGAC,不能有效调控只含有 ACCGAC 序列基因的表达^[17]。本研究通过 EREBP 转录因子的多序列比对表明能够同时结合 GCC box 和 DRE 的转录因子的第 15、第 16 和第 20 位氨基酸并不完全保守,表明不同植物中的 EREBPs 转录因子结合机制及所需关键氨基酸具有差异,这也可能是导致转录因子功能不同的原因,是植物在长期进化过程中建立起来的一种适应性机制。

本研究通过一系列的实验证明 *OsASIE1* 参与水稻的高盐胁迫应答反应。在高盐胁迫的前期, *OsASIE1* 的表达量迅速提高,进而通过调节下游功能基因的表达参与水稻的胁迫应答反应。 *OsASIE1*

超表达转基因植株与野生型相比较矮小, 与前人 *OsDREB* 基因超表达转基因植株的表型类似^[17-18]。在拟南芥中过表达 *ERF1* 和 *OsERF1* 都会增加乙烯应答基因的表达, 并使转基因植株产生乙烯应答表型, 生长和发育受到抑制, 植株矮小^[9]。然而, 转基因植株表型的变化是否由于 *OsASIE1* 超表达引起还需进一步的分子验证。另外 *OsASIE1* 和其他很多 EREBP 转录因子一样既都结合 DRE, 又结合 GCC box, 表明 ERF 转录因子和 DREB 转录因子的功能可能存在重叠, 至于这两类转录因子在功能上的差异还需进一步研究, 这有助于揭示 AP2/EREBP 转录因子参与植物胁迫应答反应的机制。

如前所述, 虽然 EREBPs 转录因子在植物的生物胁迫反应和非生物胁迫应答途径中起重要作用, 在植物中超表达 EREBPs 类基因也能提高植株的抗逆性, 但是往往会使植物的生长发育受到抑制, 因此 EREBPs 转录因子还不能直接用于基因工程改良育种, 需要找到合适方法以消除超表达 *EREBPs* 基因给植物带来的生长发育抑制影响。虽然胁迫诱导型启动子的使用可以消除这种不利的影响, 但是目前鉴定的胁迫诱导型启动子的调控能力和诱导表达的产量或速率还不能满足植物应答逆境条件下的要求, 因此还需要进一步发掘更高效的诱导型启动子以满足育种的需要。

4 结论

OsASIE1 是水稻 AP/EREBP 转录因子家族中的 DREB2 类转录因子。*OsASIE1* 基因在受到高盐和干旱胁迫时表达量迅速增加, 但受到低温胁迫时增加幅度较小。*OsASIE1* 转录因子可以通过结合下游基因启动子区域的 GCC box 和 DRE 来调控下游基因的表达, 参与植物胁迫应答反应。在水稻中超表达 *OsASIE1* 基因能够在一定程度上改善水稻耐盐胁迫的能力。

References

- [1] Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol*, 2009, 149: 88–95
- [2] Hussain S S, Kayani M A, Amjad M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnol Prog*, 2011, 27: 297–306
- [3] Sakuma Y, Liu Q, Joseph G. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREB, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290: 998–1009
- [4] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2006, 140: 411–432
- [5] Gutterson N, Reuber T L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 465–471
- [6] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins, that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 1995, 7: 173–182
- [7] Gu Y Q, Wildermuth M C, Chakravarthy S. Tomato transcription factors Pti4, Pti5 and Pti6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2002, 14: 817–831
- [8] Zhou J M, Tang X Y, Martin G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J*, 1997, 16: 3207–3218
- [9] Hu Y B, Zhao L F, Chong K, Wang T. Overexpression of *OsERF1*, a novel rice ERF gene, up-regulates ethylene-responsive genes expression besides affects growth and development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 165: 1717–1725
- [10] Xu K N, Xu X, Fukao T, Fukao P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail A M, Bailey-Serres J, Ronald P C, Mackill D J. *Sub1A* is an ethylene response factor gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*, 2006, 442: 705–708
- [11] Hattori Y, Nagai K, Nagai S. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*, 2009, 460: 1026–1031
- [12] Oh S J, Kim Y S, Kwon C W, Park H K, Jeong J S, Kim J K. Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1368–1379
- [13] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K A. Novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* genes involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1996, 6: 251–264
- [14] Baker S S, Wilhelm K S, Thomashow M F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 701–713
- [15] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1035–1040
- [16] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 781–803
- [17] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet E G, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *OsDREB* genes

- in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 2003, 33: 751–763
- [18] Chen J Q, Meng X P, Zhang Y, Xia M, Wang X P. Over expression of *OsDREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 2191–2198
- [19] Zhang M(张梅), Liu W(刘伟), Bi Y-P(毕玉平). Dehydration-responsive element-binding (DREB) transcription factor in plants and its role during abiotic stresses. *Hereditas* (Beijing)(遗传), 2009, 31(3): 236–244 (in Chinese)
- [20] Sun S, Yu J P, Chen F, Zhao T J, Fang X H, Li Y Q, Sui S F. TINY, a dehydration-responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE- and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Biol Chem*, 2006, 283: 6261–6271
- [21] Wei G, Pan Y, Lei J, Zhu Y X. Molecular cloning, phylogenetic analysis, expressional profiling and *in vitro* studies of TINY2 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Mol Biol*, 2005, 38: 440–446
- [22] Liu Y, Zhao T J, Liu J M, Liu W Q, Liu Q, Yan Y B, Zhou H M. The conserved Ala37 in the ERF/AP2 domain is essential for binding with the DRE element and the GCC box. *FEBS Lett*, 2006, 580: 1303–1308
- [23] Yang S, Yang S C, Liu X, Liu Y, Liu L, Wang X, Hao D Y. Four divergent *Arabidopsis* ethylene-responsive element-binding factor domains bind to a target DNA motif with a universal CG step core recognition and different flanking bases preference. *FEBS J*, 2009, 276: 7177–7186
- [24] Jin P(靳鹏), Huang L-Y(黄立钰), Wang D(王迪), Wu H-M(吴慧敏), Zhu L-H(朱苓华), Fu B-Y(傅彬英). Expression profiling of rice AP2/EREBP Genes responsive to abiotic stresses. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2009, 42(11): 3765–3773 (in Chinese with English abstract)
- [25] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406–425
- [26] Chen H(陈惠), Zhao Y(赵原), Chong K(种康). Improved high-efficiency system for rice transformation using mature embryo-derived calli. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2008, 25(3): 322–331 (in Chinese with English abstract)
- [27] Liu Qi, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 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*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391–1406
- [28] Sharoni A M, Nuruzzaman M, Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Sasaya T, Choi I R, Omura T, Kikuchi S. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 344–360
- [29] Qin F, Sakuma Y, Tran L S P, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K I, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* DREB2A interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, 2008, 20: 1693–1707
- [30] Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari Z K, Osakabe Y, Fujita Y, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2009, 151: 2046–2057
- [31] Zhu H-C(朱厚础). Experiment Guide of Protein Purification and Identification (蛋白质纯化与鉴定实验指南). Beijing: Science Press, 1999. pp 158–159 (in Chinese)