文章编号:2095-6134(2022)02-0154-11

综述

脱水诱导基因 *RD* 特性及功能*

龚束芳,初明洋,杨雅涵,乔坤,王金刚†

(东北农业大学园艺园林学院, 哈尔滨 150030)

(2020 年 8 月 28 日收稿; 2020 年 12 月 7 日收修改稿)

Gong S F, Chu M Y, Yang Y H, et al. Research of dehydration-inducible gene *RD* in characterization and function [J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2022,39(2):154-164. DOI:10.7523/j.ucas.2020.0054.

摘 要 脱水诱导基因(*Responsive to Dehydration*,*RD*)是一类能够调节植物脱水的基因,对植物脱水胁迫具有一定耐受性,有些成员还对低温、高盐等非生物胁迫具有不同程度的响应。*RD* 成员分属于不同家族,在结构和功能方面存在差异。归纳不同 *RD* 的结构组成、蛋白保守基序、调控机理以及应对生物以及非生物胁迫时的功能,以及 *RD* 基因启动子区域中不同的顺式作用元件在基因应对非生物胁迫时发挥的作用,可为今后对 *RD* 基因的研究提供相关参考。

关键词 脱水诱导;*RD*;结构特点;基因功能

中图分类号:Q943 **文献标志码**:A **DOI**:10.7523/j.ucas.2020.0054

Research of dehydration-inducible gene *RD* in characterization and function

GONG Shufang, CHU Mingyang, YANG Yahan, QIAO Kun, WANG Jin'gang

(*College of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin* 150030, *China*)

Abstract *Responsive to dehydration* (*RD*) is a class of genes that regulates dehydration in plants. They are functionally tolerant to plant dehydration, some of which are responsive to abiotic stresses such as low temperature and high salinity. However, they belong to different families, respectively, and have discrepancy in the structure and function. In this paper, the structural composition, conserved motif, regulatory mechanism, and the function in response to biotic and abiotic stress were summarized in different *RD*s, as well as the different cis-acting elements in the promoter region played a role in response to abiotic stress so as to provide relevant basis for future researches on *RD*.

Keywords dehydration induction; *RD*; structural characteristics; gene function

RD2、*RD17*、*RD19*、*RD20*、*RD21*、*RD22*、*RD26*、*RD28* 和 *RD29* 最初是在脱水处理 10 h 的模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中筛选到的 15 个 cDNA 片段,依其特性将其分为 9 个 *RD*[1]。经研究发现这类基因受脱水胁迫诱导,但是每个 *RD* 还有各自不同的特点,其中包括脱水胁迫诱导基

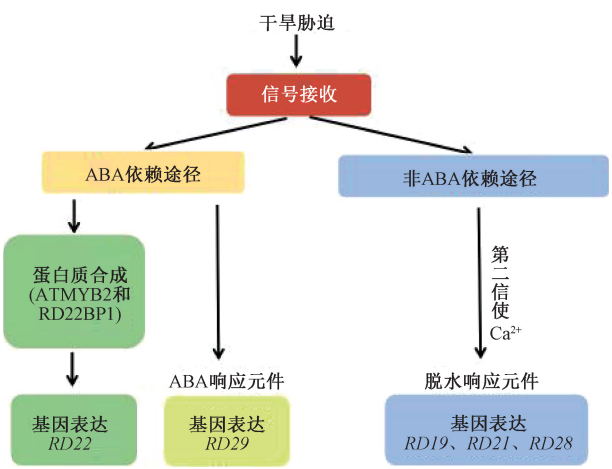
* 国家自然科学基金(31972450)、黑龙江省自然科学基金(C2018021)和黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(YQ2020C002)资助

† 通信作者,E-mail: wangjingang99@neau.edu.cn

因表达量响应的时间不同,以及受到诱导后的表达量不同等,初步认为 *RD* 基因的表达是由不同的信号转导途径诱导。植物的脱水响应可能导致激素水平的改变,促使脱落酸(abscisic acid,ABA)的合成,ABA 在气孔关闭、种子成熟和休眠中起作用[2]。在这些 *RD* 基因中,*RD22* 和 *RD29* 基因明显被 ABA 诱导,而 *RD19*、*RD21*、*RD28* 没有显著的诱导效应[1]。*RD* 的功能虽然都与调节植物脱水有关,是一类均对植物脱水胁迫有响应的基因,但它们来自不同家族。从 1992 年发现至今,陆续有人对 *RD* 基因的功能进行研究和报道,其中,对 *RD22* 和 *RD29* 这 2 个基因在植物应对干旱、高盐及低温胁迫时发挥功能的研究相对较多[1-14]。

脱水胁迫信号与基因表达之间存在着依赖于 ABA 和不依赖于 ABA 的逆境胁迫信号转导途径:ABA 依赖途径和非 ABA 依赖途径[2]。另外从基因在植物应对逆境胁迫时发挥的功能角度出发,*RD* 基因分为功能基因和转录因子 2 种类型[3-14]。

ABA 信号转导途径下对 9 个 *RD* 基因分类,发现 *RD2*、*RD17*、*RD20*、*RD22*、*RD26* 和 *RD29* 可被 ABA 诱导,而 *RD19*、*RD21* 及 *RD28* 则不能被 ABA 诱导,推测在干旱胁迫下这些基因的表达,至少存在 3 种独立的信号转导途径[3-14]。如图 1 所示,其中 2 条 ABA 依赖途径,1 条非 ABA 依赖途径,并且在 ABA 依赖的 2 条途径中有 1 条途径需要



干旱胁迫下,植物接收信号后分为 3 种信号转导途径:2 条 ABA 依赖途径;1 条非 ABA 依赖途径

图 1　脱水胁迫与基因表达之间的 3 种信号转导途径[2]

Fig. 1　Three signaling pathways between dehydration stress and gene expression[2]

A. thaliana myeloblastosis 2(AtMYB2)和 RD22 binding protein1(RD22BP1)2 个蛋白质的合成,共同激活 *RD22* 基因的表达[2]。

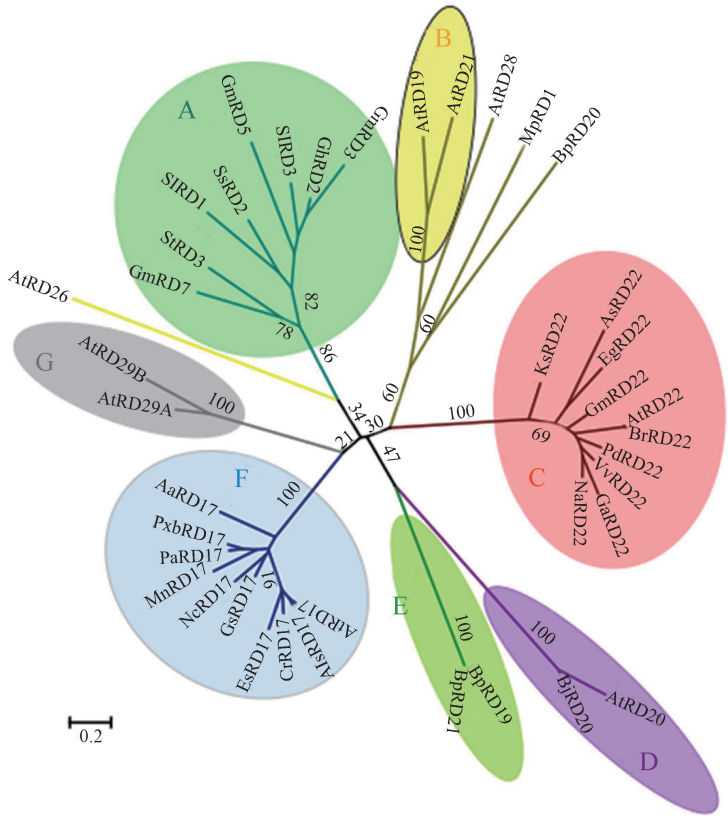
目前对 *RD* 基因的研究,发现其中 *RD17*、*RD20*、*RD22*、*RD28* 和 *RD29* 作为功能基因在植物应对一些干旱、高盐和低温等非生物胁迫时使植物具有一定的耐受性;而 *RD19*、*RD21* 和 *RD26* 则作为转录因子,一方面也具有耐受一些干旱和高盐等非生物胁迫的能力,另一方面还对其下游的其他基因起到调控的作用[3-28]。

1　RD 蛋白结构特性

每个 RD 都具有调节植物脱水的作用,但其结构组成不同。对 9 个 RD 蛋白序列进行比对,发现 RD19、RD21 与硫醇蛋白酶(cysteine proteinase,CysP)具有显著的序列相似性,且在同一物种中 RD19 与 RD21 的相似性要高于不同物种中 RD19 之间或 RD21 之间的相似性,这或许与 RD19 和 RD21 这 2 个蛋白来自同一家族有关[3]。RD22 与豆科植物种子蛋白(unidentified seed protein,USP)具有一定相似性;RD28 编码一种膜蛋白,与大豆结节蛋白 26 具有局部相似性;RD17 编码的蛋白质与 ABA 诱导相关蛋白(responsive to ABA,RAB)具有同源性[1]。RD20 是 Caleosin 家族编码 Ca^{2+} 的结合蛋白[12];RD26 是 No Apical Meristem,ATAF1,2,和 Cup-Shaped Cotyledon 2(NAC)蛋白家族的成员[21];而 RD29 与胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant,LEA)具有一定的相似性[8]。

如图 2 所示,进化树分析发现每个 RD 蛋白序列之间的相似性不高。但不同物种中的同一蛋白彼此之间具有较高的相似性,说明每种蛋白特性显著。未发现与 RD1、RD2、RD3、RD5 和 RD7 相关的研究报道,而从 RD 蛋白进化关系也发现它们之间的特性可能没有明显的规律(图 2A);同一物种拟南芥中 RD19 和 RD21 的相似性较高(图 2B);不同物种的 RD22 和 RD17 表现出较高相似性(图 2C 和 2F);同样地,不同物种的 RD20 亲缘关系较近(图 2D);同一物种的 2 个蛋白 RD19 和 RD21 以及 RD29A 和 RD29B 之间的相似性较高(图 2C 和 2F)。

为进一步分析 RD 的蛋白序列组成,使用 Multiple EM for Motif Elicitation(MEME)软件进行在线预测(http://meme-suite.org/)。9 个 RD 的



A 表示未报道的 RD 蛋白:Sl, *Solanum lycopersicum*; Ss, *Saccharum spontaneum*; Gh, *Gossypium hirsutum*; St, *Solanum tuberosum*; Gm, *Glycine max*;B 为同一物种中 RD19 和 RD21 蛋白:At, *Arabidopsis thaliana*;C 为不同物种中的 RD22 蛋白:Ks, *Knorringia sibirica*; As, *Apostasia shenzhenica*; Eg, *Elaeis guineensis*; Br, *Brassica rapa*; Pd, *Prunus dulcis*; Vv, *Vitis vinifera*; Ga, *Gossypium arboreum*; Na, *Nicotiana attenuata*;D 为 2 个物种中的 RD20 蛋白:Bj, *Brassica juncea*;E 表示同一物种中的 RD19 和 RD21:Bp, *Bordetella pertussis*;F 不同物种中的 RD17 蛋白:Aa, *Anthurium amnicola*; Pxb, *Pyrus x bretschneideri*; Pa, *Prunus avium*; Mn, *Morus notabilis*; Nc, *Nymphaea colorata*; Gs, *Glycine soja*; Es, *Eutrema salsugineum*; Cr, *Capsella rubella*; Als, *Arabidopsis lyrata subsp.* lyrata;G:RD29A 和 RD29B 组成的 RD29 蛋白;黄线是一个单独的 RD26 蛋白

图 2 不同物种 RD 蛋白系统进化关系

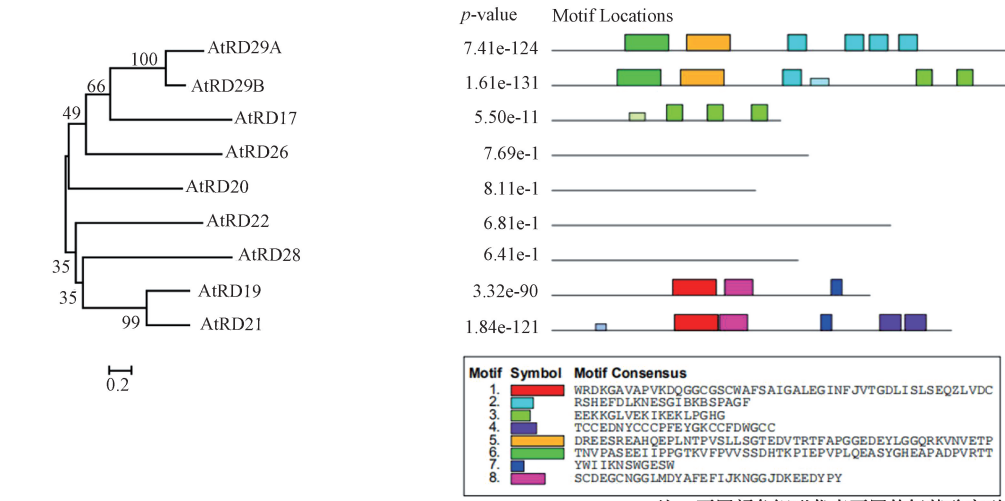
Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic relationships among RD1, RD2, RD3, RD5, RD7, RD17, RD19, RD20, RD21, RD22, RD26, RD28, and RD29 from some plant species

保守基序预测结果主要表现为 3 种类型(图 3):1)由 2 个相似蛋白 RD19 和 RD21 组成,且含有 3 个共同的基序 motif1、motif7 和 motif8;2)3 个含有保守基序 motif3 的蛋白 RD17、RD29A 和 RD29B;3)不含有保守基序的 4 个 RD 蛋白 RD20、RD22、RD26 以及 RD28。我们以 RD 蛋白保守基序的这 3 种类型为主体,对 RD 蛋白的结构特征进行介绍。

1.1 相似结构蛋白

Koizumi 等[3]预测转录因子 RD19 和 RD21 分别含有 368 和 462 个氨基酸,二者序列相似性较高,且均与 CysP 蛋白具有同源性,分别具有表现为 Cys^{161}-His^{297}-Asn^{317} 和 Cys^{158}-His^{302}-Asn^{329} 的催化三元组,这 2 个催化三元组是 CysP 家族的典型特征,也是 RD19 和 RD21 蛋白各自的催化位点。另外,发现 *RD19* 基因序列中含 111 bp 和 281 bp 的 2 个内含子;与 *RD19* 不同,*RD21* 则含有 4 个内含子(表 1)。*RD19* 和 *RD21* 所包含的内含子数目不同,且对应的位置也有差异,推测它们可能是 CysP 家族中不同类型的 2 个成员[3]。观察 RD19 和 RD21 2 个蛋白的基序组成也发现,预测的 2 个蛋白结构域相似性很高。如图 3 所示,motif1、motif7 和 motif8 均存在于 RD19 和 RD21 蛋白中。

进一步研究发现,拟南芥 RD21 由 5 个结构域组成:信号肽、自抑制前体蛋白、蛋白酶结构域、富含脯氨酸结构域和颗粒蛋白结构域[4]。而 CysP 家族的其他成员结构不含有 2 个结构域组成的 C 末端延伸序列、富含脯氨酸的结构域和颗粒蛋白结构域[5]。



(a) 拟南芥9个RD蛋白系统发育进化树分析

注：不同颜色矩形代表不同的氨基酸序列
(b) 拟南芥9个RD蛋白保守结构域预测

图 3　RD 系统发育树分析及蛋白保守域预测

Fig. 3　RD phylogenetic tree analysis and protein conserved domain prediction

表 1　RD 蛋白家族功能特点及结构示意图

Table 1　Functional characteristics and structural diagram of RD protein family

蛋白	功能特点	蛋白结构示意图
RD17	脱水;抗低温	NH_2 —— COOH 谷氨酸：赖氨酸
RD19	脱水	NH_2 —— COOH
RD20	脱水;结合钙离子	NH_2 —— COOH EF-hand 结构域;酪蛋白激酶磷酸化位点
RD21	脱水	NH_2 —— COOH 信号肽;自抑制前体蛋白;蛋白酶结构域;富含脯氨酸结构域;颗粒蛋白结构域
RD22	脱水	NH_2 —— COOH 疏水区;保守区;重复序列;BURP 结构域
RD26	脱水	NH_2 ←→ COOH 保守区域;核定位信号(NLS);NAC 结构域
RD28	脱水	NH_2 —— COOH 保守片段;MIP 结构域
RD29	脱水;抗低温	NH_2 —— COOH RD29B　RD29A

注:RD19 和 RD29 蛋白结构示意图中的灰色方框代表外显子、银色方块代表内含子。

1.2　亲水性蛋白

脱水诱导蛋白 RD17 也被叫做冷调节蛋白 cold-regulated 47(COR47),含有 1 073 个核苷酸,编码一个 47 kDa 的亲水性多肽(亲水指数为 -1.1),富含谷氨酸(占 20%)和赖氨酸(占 14%)(表 1)。其多肽不仅与 RAB 具有较高的同源性,同时还与 LEA 蛋白序列相近:它具有丝氨酸簇(称为 S 段)和富含赖氨酸(称为 K 段)的重复序列,但不含半胱氨酸和色氨酸,RD17 是一种酸性蛋白质[6-7]。

Yamaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki[8] 通过基因组结构分析发现,在 RD29 上 8 kb 区域存在 2 个串联的蛋白,将其分别命名为 RD29A 和 RD29B(表 1)。RD29A 也称为脱水素(low-temperature-induced,LTI78)蛋白或 COR78[9],而 RD29B 被称为 LTI65[10],且 2 个基因均含有 3 个相近位置的内含子。RD29A 由 711 个氨基酸组成,RD29B 含 604 个氨基酸,在 RD29A 中有一个 112 个氨基酸组成的 2 个重复序列(GFGDESGAELE KDFPTRSHD…GNFPVRSHELDLKNESDIDK),而 RD29B 中未发现这段序列[8]。RD29A 和 RD29B 蛋白都具有极强的亲水性,并且 2 个蛋白结构均与 LEA 蛋白具有一定的相似性,说明 RD29 的 2 个蛋白可能参与低温胁迫诱导[8]。

RD29B 对低温胁迫的耐受性低于 *RD29A*[10]，而 *RD17* 对植物类囊体膜具有低温保护作用[23]。如图 3 所示，RD17、RD29A 和 RD29B 均含有 motif3。此外，2 个 RD29 还含有 motif2、motif5 和 motif6，且 2 个 RD29 蛋白的主要区别是 motif2 基序的数量不同，而 RD17 蛋白仅含有 motif3 基序。

1.3 不含有保守基序的蛋白

RD 蛋白结构域预测结果显示，RD20、RD22、RD26 和 RD28 这 4 个蛋白中未发现保守结构域。拟南芥 RD20 是能与 Ca^{2+} 结合的蛋白，其 cDNA 包含一个 708 bp 的开放阅读框，并编码一个由 236 个氨基酸残基组成的蛋白质，预测分子量为 26.6 kDa[11]。尽管暂时未有报道与 RD20 同源的其他蛋白，但是如表 1 所示，Takahashi 等发现它的氨基酸序列包含一个与钙结合域（EF-hand motif）高度同源的序列[11]，并有研究发现 RD20 编码的蛋白质属于钙蛋白（Caleosin）家族，是油脂体（oil body，OB）相关蛋白[12]。RD20 也被叫做钙依赖（*A. thaliana* caleosin 3，AtCLO3）蛋白，具有作为过氧化酶所需的所有生化特性[13]。

RD22 蛋白在很多物种中均被研究，如：拟南芥[14]、西伯利亚蓼（*Polygonum sibiricum* Laxm）[15]、柽柳（*Tamarix chinensis* Lour）[16]、秋茄（*Kandelia candel*（Linn.）Druce）[17] 以及玉米（*Zea mays* L.）等[18]。RD22 的氨基酸序列数目大约为 375~455[14-18]。其结构主要包括 4 个区域（表 1）：1）N 端疏水区；2）简短的保守区域；3）重复序列区域；4）保守的 BURP（BNM2、USP、RD22 和 PG1β）结构域，即 C 端含有一个由 200 多个氨基酸组成的保守区域 X5-CH-X10-CH-X23-27-CH-X8-W[8,18]。RD22 的 N 端疏水区序列（前 20 个左右的氨基酸）因不同物种而存在较大差异，接下来约 20 个氨基酸序列较保守，其下游一般存在 3~5 个长度约 19 个氨基酸的重复序列（T-V-VG-GGV--）[15]。虽然这个重复序列因物种的不同而有所差异，但这 7 个固定的氨基酸残基可能在维持 BURP 类蛋白质的结构和功能上起重要作用[19]。

转录因子 RD26 是植物特异性 NAC 家族成员，又名 ANAC072，编码 297 个氨基酸，分子质量为 32.7 kDa，如表 1 所示，其 N-末端 NAC 结构域分别包含一 12 个氨基酸和一 66 个氨基酸的预测核定位信号（nuclear localization signals，NLS）序列[20-21]。

拟南芥 RD28 编码质膜水通道蛋白（aquaporin），最初是在拟南芥中发现的一种脱水胁迫诱导蛋白，其氨基酸序列包含 2 段高度保守的膜间序列[1]。如表 1 所示，该基因编码主要内源性蛋白（major intrinsic protein，MIP）家族成员，其成员在促进小分子在膜上的扩散方面具有一定功能[22]。

RD 蛋白保守结构域的预测结果显示，RD20、RD22、RD26 和 RD28 这 4 个蛋白中不含保守基序，且其他 5 个 RD 蛋白的保守基序也存在差异，这可能与 *RD* 基因功能的差异性有关。

2 基因功能研究

目前对 *RD* 基因研究，发现其主要受干旱、高盐以及低温等非生物胁迫的影响；除非生物胁迫，*RD* 基因还受到一些生物胁迫的影响，包括参与植物的免疫、衰老等。

2.1 非生物胁迫

2.1.1 干旱、高盐、低温诱导响应基因

9 个 *RD* 基因中，*RD17*、*RD29A* 和 *RD29B* 受干旱、高盐和低温胁迫诱导，但其表达和信号转导途径不同。有研究发现 *RD17* 受 ABA 和干旱胁迫诱导[7]，且对低温胁迫也有一定的响应[6]。随后的研究发现，*RD17* 对类囊体膜具有低温保护作用[23]，且能提高植物的抗冻性，推测 *RD17* 可能在低温胁迫下作为一种膜稳定剂发挥功能[24]。

Msanne 等[25]研究证实低温能够诱导 *RD29A* 基因的表达，此外，在干旱和高盐胁迫下，*RD29A* 也受到较强的诱导。其启动子中包含的顺势作用元件，在植物应对干旱、高盐或低温条件时能够调控 *RD29A* 的表达，其中一个脱水反应元件 dehydration-responsive element（DRE）在 *RD29A* 对环境信号的第一次快速响应中起作用[26]。Nakashima 等[27]发现，当去除 *RD29A* 启动子中的 ABA 应答元件 ABA-responsive element（ABRE）而只保留 DRE 元件，在干旱、高盐或低温胁迫条件下同样也能诱导 *RD29A* 基因的表达，表明这一过程不受 ABA 的调控。随后进一步发现 ABRE 结合蛋白 acid-responsive element binding 1（AREB1）和 AREB2 能与 *RD29A* 启动子中的 ABRE 结合，而 2 个独立的 DRE 结合蛋白 DER-biding 1（DREB1）和 DREB2 在 2 种不同的信号转导途径中起着不同作用：DREB1 受低温胁迫诱导，而 DREB2 对干旱和高盐胁迫有响应[28]。此外，

DRE 在 ABA 诱导途径中也作为 ABRE 的偶联因子发挥作用,即 DREB 蛋白可能与 AREB 蛋白在 *RD29A* 的 ABA 依赖性基因表达中起协同作用[28]。这表明,*RD29A* 的上游启动子序列中 DRE 和 ABRE 元件可以通过分别驱动调控胁迫转录因子 *DREB1A*、*DREB2A* 以及 *AREB1*、*AREB2* 的表达,在植物应对非生物胁迫时发挥重要作用[25]。也有研究将 *RD29A* 的启动子与 *GUS* 基因融合后转入拟南芥,发现与对照相比,脱水和冷处理后 *GUS* 基因在拟南芥的所有器官中表达[9,26]。

虽然 *RD29A* 和 *RD29B* 均受到这 3 种非生物胁迫的诱导,但它们对这些刺激的响应和信号转导途径不同。*RD29B* 启动子的-169 到-51 区域是诱导该基因脱水表达的调控区,还发现 2 个 ABRE-like 序列以及 1 个 MYB(PyAACT/GG)序列[26]。随后的研究发现,在植物脱水条件下这 2 个 ABRE 在 *RD29B* 的表达中起正调控作用[29]。*RD29B* 基因的表达同样依赖于 ABA 的诱导,逆境胁迫会促使细胞内 ABA 含量增加,激活 basic leucine zipper(bZIP)转录因子,调控 bZIP 与 ABRE 的相互作用,促进 *RD29B* 基因的表达[30]。与 *RD29A* 基因不同,*RD29B* 主要受干旱和 ABA 诱导,对低温胁迫响应不明显,且这种低温胁迫不是由 ABA 本身诱导完成,而是由 ABA 合成途径中代谢物参与诱导[10,26]。

RD22 是脱水诱导基因 *RD* 中的典型成员。最初,*RD22* 是一个在 ABA 信号通路下受干旱胁迫诱导表达的基因[1]。随着研究的深入,发现 *RD22* 是一种多因子诱导型基因,受低温、高盐、干旱等胁迫的诱导表达[15-19]。拟南芥 *RD22* 基因侧翼区-207 到-141 的 67 bp 区域内包含 2 个 myelocytomatosis(MYC)识别位点和 1 个 myeloblastosis(MYB)识别位点,对位点进行碱基替换,发现第 2 个 MYC 位点可能是 *RD22* 启动子的负调控因子,而第 1 个 MYC 位点和 MYB 位点在 *RD22* 基因的脱水反应表达中都起正调控作用[31]。此外,ABA 响应元件(RYACGTGGYR)也与 *RD22* 基因参与干旱诱导及 ABA 应答有关[32]。由此可知,拟南芥 *RD22* 的诱导表达是由 ABA 介导。*RD22* 对 ABA 依赖性表达需要蛋白质的生物合成[14],其第 1 个 MYC 识别位点特异性结合的转录因子 *RD22BP1* 能被干旱、高盐和 ABA 诱导,并能与 MYB 识别位点结合的 *AtMYB2* 基因协同激活 *RD22* 基因的转录[33]。目前在除拟南芥的其他植物中有研究报道,将柽柳和秋茄的 *RD22* 转入烟草中均提高了烟草的耐盐性[10,17]。大豆 *GmRD22* 的表达在渗透胁迫下能参与植物细胞的防护,并能减少 NaCl 和 PEG 处理对转基因拟南芥根系伸长的负面影响,且提高转基因水稻在 NaCl 和干旱胁迫下的存活率;另外在盐胁迫下,*GmRD22* 转基因植株的木质素含量还会明显高于野生型,推测木质素含量增加,会提高细胞壁对水分的固定,从而提高耐盐胁迫能力[34]。但是研究发现西伯利亚蓼 *RD22* 的过表达并没有提高烟草的耐盐碱性[15]。葡萄中 3 个 *RD22* 基因对不同胁迫的耐受性也不尽相同,*VvRD22b* 和 *VvRD22c* 基因均受 ABA 调控,但是在近期的研究中发现 *VvRD22a* 不受 ABA 诱导表达[35]。3 个葡萄 *VvRD22* 基因在盐处理下均有响应,但表达量不同[36]。这些结果表明 *RD22* 基因在不同物种中对非生物胁迫的耐受性存在一定的差异,且在同一物种的多个 *RD22* 基因对某些胁迫处理也会表现出不同的耐受性。

2.1.2　同一途径 *RD20* 和 *RD26* 的胁迫应答

同样受 ABA 信号诱导的 2 个基因 *RD20* 和 *RD26* 在应对非生物胁迫时也表现不同。研究发现,在拟南芥 *RD20* 的 1-kbp 5′侧翼启动子区,存在 3 个 ABRE 序列,表明 *RD20* 可能受 ABA 依赖的信号转导途径调控,随后还发现有 DRE 的存在,所以推测 *RD20* 是一种由 ABA 诱导的干旱胁迫相关基因[11-12,37]。拟南芥 *RD20* 在植株的角果、茎、花和叶中表达,但在根和成熟种子中未检测到[11]。在脱水条件下,*RD20* 基因在花和叶中被强烈诱导[11]。这些结果表明,*RD20* 可能在拟南芥脱水胁迫下的气生组织中发挥作用,特别是在叶片和花中[11]。

Fujita 等[20]发现 *RD26* 是一个由 4 个 ABREs、1 个 DRE、2 个 MYB 和 1 个 MYC 调节的 ABA 依赖性表达基因。另外在 NaCl 处理的 ABA 突变体中,仍然观察到 *RD26* 受诱导显著,意味着存在一种与 ABA 无关的 NaCl 信号通路涉及 *RD26* 的表达[20]。研究表明干旱、ABA 和高盐均可以诱导 *RD26* 基因的表达。此外,*RD26* 还对茉莉酸甲酯、H_2O_2 和玫瑰红这类能产生活性氧(reactive oxygen species,ROS)的物质敏感;过表达 *RD26* 还诱导许多应激相关基因表达,如对干旱和高盐胁迫有耐受性的 *RAFL06-15-P15*、

RAFL05-02-O17、*RAFL06-13-E03* 以及 *RD20* 等[20-21]。*GUS* 染色后的组织定位结果发现,*RD26* 启动子在脱水后拟南芥植株的所有营养组织中都有表达[20],ABA 处理时,启动子调控 *GUS* 不仅在叶片中表达,而且在转基因植株的根中也有较低水平的作用[21]。

2.1.3 非 ABA 途径响应基因

此外,*RD* 相关基因中有 3 个基因的表达不受 ABA 信号通路的调控,这 3 个基因分别是 *RD19*、*RD21* 和 *RD28*。研究发现 *RD19* 和 *RD21* 受干旱和高盐胁迫诱导后表达量提高,但不受低温、高温和 ABA 诱导[3]。此外,水通道蛋白能够增加细胞膜的渗透性,拟南芥质膜水通道蛋白 *RD28* 的表达可使非洲爪蟾卵母细胞的吸水率提高 10~15 倍[38]。同样,在盘基网柄菌的营养细胞中过表达 *RD28*,当细胞悬浮在蒸馏水中时,蒸馏水能够快速的被营养细胞吸收[39]。Huang 等[40] 发现 RD28 蛋白主要作用在保卫细胞质膜上且与气孔运动有关,在植物受到干旱胁迫时,RD28 能够抑制气孔开放,减少水分散失,保护植物正常生长。综上,当植物处于缺水状态时,RD28 可以通过增加细胞的吸水能力,或者关闭气孔减少水分输出,进一步缓解植物的缺水状况。

2.2 生物胁迫

除非生物胁迫外,有些 RD 蛋白还受一些生物胁迫诱导。*RD20* 的表达被某些病原体诱导,过表达 *RD20* 的植株主要还表现在叶片角质层蜡质组分的改变(含有更多的烷烃和醛)和对病菌(油菜链格孢菌和丁香假单胞菌)的抗性增强[41]。它的主要功能是产生调节氧化状态和细胞死亡的脂蛋白[41]。Bernoux 等[42] 发现,拟南芥 *RD19* 能作为阳性转录因子,同时作为效应器青枯菌Ⅲ型无毒效应子蛋白(Pseudomonas outer protein P2, PopP2)引发青枯菌 resistant to ralstonia solanacearum 1-R(RRS1-R)产生抗性的关键宿主因子,从而缓解青枯病对农作物的损害。

CysP 家族的成员 *RD21* 除参与非生物胁迫外,还参与到植物免疫、衰老等各种生物胁迫中。*RD21* 能够促进细胞死亡,AtSerpin1 作为一种拟南芥蛋白酶抑制剂,通过确定控制 *RD21* 活性的位点以及限制细胞死亡过程中所引起的损伤,进一步控制 *RD21* 的活性,从而阻止 *RD21* 的促死亡功能,保护植物正常生长[43-44]。此外,Shindo 等发现 *RD21* 对坏死营养性病原菌产生免疫[45],另有研究者发现 *RD21* 是伏马菌素(fumonisin B1, FB1)诱导细胞死亡的负调控因子[46]。同样地,*RD26* 也被认为在植物的防御和衰老中起关键作用[20]。比如在植物衰老过程中:1) *RD26* 可以直接激活叶绿体囊泡,编码一种对叶绿体蛋白降解至关重要的酪蛋白分解蛋白酶(caseinolytic protease D, ClpD),伴随着 *RD26* 在植物衰老时期的过度表达,导致大量酪蛋白损失;相比较而言,*RD26* 敲除突变体中蛋白质的损失较少[47]。2) *RD26* 还直接激活参与赖氨酸分解代谢的赖氨酸酮戊二酸还原酶/酵母氨酸脱氢酶(lys ketoglutaratereductase/saccharopine dehydrogenase, LKR/SDH)以及对植物降解重要的 pescadillo 1 (PES1)蛋白,通过诱导 LKR/SDH 表达在植物衰老过程中促进赖氨酸降解和加速植物醇分解代谢,帮助植物在衰老过程中维持线粒体呼吸[47];代谢图谱显示 *RD26* 过表达导致 γ-氨基丁酸(Gamma aminobutyric acid, GABA)减少,同时相应的分解代谢基因也被诱导,而 GABA 的降解也有助于维持衰老过程中的线粒体呼吸[47]。3) *RD26* 还能直接参与碳水化合物代谢和增强转运的 *amylase 1*(*AMY1*)、*superfamily protein 1*(*SFP1*)和 *SWEET15* 的表达,促进淀粉降解和衰老过程中单糖和双糖的累积[47]。总之,在衰老过程中,*RD26* 通过调控细胞降解层次谱中基因的表达发挥作用[47]。

3 展望

通过对 *RD* 调查研究,发现 *RD* 相关基因既具有典型的功能特征,又表现多元化的功能特点,了解 *RD* 参与的信号通路,有助于掌握 *RD* 基因的功能,我们将其总结如下(图 4)。*RD19*、*RD21* 和 *RD28* 基因受干旱胁迫下非 ABA 信号通路诱导,它们通过第二信使,如蛋白激酶的作用与脱水响应元件结合,激活基因表达[2],其余 6 个 *RD* 基因均受 ABA 信号的诱导,其中 *RD20*、*RD26* 和 *RD29B* 主要受 ABRE 元件的调控在 ABA 通路下发挥作用[20,29,37],而 *RD20* 和 *RD26* 作为转录因子还与 DRE 元件结合,诱导基因表达[12,21]。在 ABA 信号通路下 *RD22* 基因比较特殊,在干旱和盐胁迫下 MYB 与 AtMYB2 蛋白结合后,同与 RD22BP1 蛋白质结合的 MYC 元件共同激活 *RD22* 发挥作用[31,33]。此外,*RD*17 和 *RD29A* 基因同属于 COR 家族,这是由于冷诱导转录因子

DREB1 与 DRE 元件结合,使它们对冷胁迫产生一定的耐受性[7,26];另一个受干旱和盐胁迫诱导的 DREB2 转录因子与 AREB2 相互作用,使 *RD17* 和 *RD29A* 对低温、干旱和盐胁迫均表现出耐受性[25,27-28]。

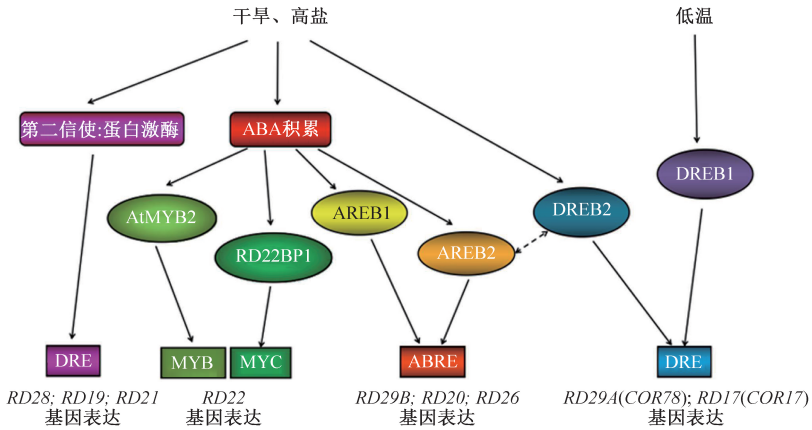


图 4　9 个 *RD* 基因应对非生物胁迫的表达调控网路

Fig. 4　Gene expression regulation network of 9 *RD* in response to abiotic stress

RD29A 启动子作为一种诱导型启动子,在提高作物抗逆性的基因工程研究中起作用。研究基因的功能,是为了更好地利用基因,在分子或生理水平应对人们不同的需求,调控不同植物在抗逆性上更好地发挥其功能。比如:1)目前 *RD29* 对非生物胁迫的响应已被用作监测植物胁迫响应途径的分子标记,利用 *RD29A* 作为标记基因,用于识别与应激信号转导有关的新分子[48]。Cheong 等[49]检测到钙调神经磷酸酶 B 亚基蛋白(calcineurin B-like 5,CBL5)的过表达能改变胁迫基因的表达(如 *RD29A*,*RD29B* 和 *Kin1*),并证明 *CBL5* 可能是植物盐或干旱响应的调节因子。2) *RD29A* 启动子还可以提高植物的抗逆性,并整合了许多应激信号[48]。例如,有研究发现利用 *RD29A* 启动子,可以最大限度地减少 35 S 启动的膨大蛋白基因(*Tobacco β-expansion 23*, *TaEXPB23*)这种组成性基因表达的负面影响,还能提高植物的抗旱性[50-51]。利用 *RD29A* 启动子具有抗逆性这一特点,可以整合不同基因,丰富基因功能。

过表达 *RD26* 能诱导应激相关基因 *RD20* 表达[21],但有关 2 个基因的诱导路径还不清楚,探究 2 个基因之间的关联对进一步了解 *RD* 基因的调控网络有帮助。*RD19* 和 *RD21* 均来自 CysP 家族[3],如图 2 所示,同一物种中 2 个蛋白的相似性高于同一蛋白在不同物种中,进一步研究 2 个基因在同一物种中的关联,有助于了解 CysP 家族功能。此外,*RD22* 基因在拟南芥[14]、西伯利亚蓼[15]、柽柳[16]、秋茄[17]以及玉米等[18]多个植物中的功能已经有很多研究,发现在每种植物中该基因对非生物胁迫的耐受性不同,研究更多物种中 *RD22* 基因功能有助于分析基因对非生物胁迫耐受性与物种的关系。

RD 相关基因研究开展较早,但由于其基因功能较为显著,后期对 *RD* 基因的研究较少。但是还有很多 *RD* 没有被研究,仍然有很多疑问等待解决。比如 *RD* 基因结构和功能之间的关联,亚细胞定位与时空表达的特性等问题,对于是否存在其他诱导路径下的基因表达,以及每个基因之间的关联都需要进一步的研究来证实。

参考文献

[1] Yamaguchi-shinozaki K, Koizumi M, Urao S, et al. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein [J]. Plant and Cell Physiology, 1992, 33(3): 217-224. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078243.

[2] 向旭,傅家瑞. 脱落酸应答基因的表达调控及其与逆境胁迫的关系[J]. 植物学通报, 1998, 15(3): 11-16. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3466.1998.03.003.

[3] Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, et al. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. Gene, 1993, 129(2): 175-182. DOI:10.1016/0378-1119(93)90266-6.

[4] Andeme Ondzighi C, Christopher D A, Cho E J, et al. *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits Cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds [J]. Plant Cell, 2008, 20(8): 2205-2220. DOI: 10. 1105/tpc. 108. 058339.

[5] Yamada K, Matsushima R, Nishimura M, et al. A slow maturation of a Cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves [J]. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1626-1634. DOI: 10. 1104/pp. 010551.

[6] Nylander M, Svensson J, Palva E T, et al. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 45(3): 263-279. DOI: 10. 1023/a: 1006469128280.

[7] Gilmour S J, Artus N N, Thomashow M F. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18(1): 13-21. DOI: 10. 1007/BF00018452.

[8] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants [J]. Molecilar and General Genetics, 1993, 236(2/3): 331-340. DOI: 10. 1007/BF00277130.

[9] Horvath D P, McLarney B K, Thomashow M F. Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) *cor78* in response to low temperature [J]. Plant Physiology, 1993, 103(4): 1047-1053. DOI: 10. 1104/pp. 103. 4. 1047.

[10] Nordin K, Vahala T, Palva E T. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21: 641-653. DOI: 10. 1007/BF00014547.

[11] Takahashi S, Katagiri T, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. An *Arabidopsis* gene encoding a Ca^{2+}-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration [J]. Plant and Cell Physiology, 2000, 41(7): 898-903. DOI: 10. 1093/pcp/pcd010.

[12] Aubert Y, Vile D, Pervent M, et al. *RD20*, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(12): 1975-1987. DOI: 10. 1093/pcp/pcq155.

[13] Poxleitner M, Rogers S W, Lacey Samuels A L, et al. A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination [J]. The Plant Journal, 2006, 47(6): 917-933. DOI: 10. 1111/j. 1365-313X. 2006. 02845. x.

[14] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular and General Genetics, 1993, 238(1/2): 17-25. DOI: 10. 1007/BF00279525.

[15] 郑磊. 西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum*) *rd22* 基因的克隆、表达与功能验证[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.

[16] 李慧玉, 林士杰, 王珊, 等. 柽柳 *rd22* 基因的序列分析及耐盐性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(6): 95-101. DOI: 10. 13207/j. cnki. jnwafu. 2010. 06. 022.

[17] 黄旭新, 侯佩臣, 丁明全, 等. 秋茄 *KcRD22* 基因的克隆与功能分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(4): 273-280. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-568X. 2011. 04. 003.

[18] Phillips K, Ludidi N. Drought and exogenous abscisic acid alter hydrogen peroxide accumulation and differentially regulate the expression of two maize *RD22*-like genes [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8821. DOI: 10. 1038/s41598-017-08976-x.

[19] 郑磊, 刘关君, 杨传平. 西伯利亚蓼 *rd22* 基因的克隆与序列分析[J]. 植物研究, 2007, 27(2): 212-217. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-5102. 2007. 02. 019.

[20] Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, et al. A dehydration-induced NAC protein, *RD26*, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway [J]. The Plant Journal, 2004, 39(6): 863-876. DOI: 10. 1111/j. 1365-313X. 2004. 02171. x.

[21] Tran L S P, Nakashima K, Sakuma Y, et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter [J]. The Plant Cell, 2004, 16(9): 2481-2498. DOI: 10. 1105/tpc. 104. 022699.

[22] Reizer J, Reizer A, Saier M H. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1993, 28(3): 235-257. DOI: 10. 3109/10409239309086796.

[23] Bozovic V, Svensson J, Schmitt J, et al. Dehydrins (LTI29, LTI30, and COR47) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *escherichia coli* protect thylakoid membranes during freezing [J]. Journal of the Serbian Chemical Society, 2013, 78(8): 1149-1160. DOI: 10. 2298/JSC121127017B.

[24] Puhakainen T, Hess M W, Mäkelä P, et al. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(5): 743-753. DOI: 10. 1023/B. PLAN. 0000040903. 66496. a4.

[25] Msanne J, Lin J S, Stone J M, et al. Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes [J]. Planta,

2011, 234(1): 97-107. DOI:10.1007/s00425-011-1387-y.

[26] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress [J]. The Plant Cell, 1994, 6(2): 251-264. DOI:10.1105/tpc.6.2.251.

[27] Nakashima K, Shinwari Z K, Sakuma Y, et al. Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high-salinity-responsive gene expression [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(4): 657-665. DOI: 10.1023/a:1006321900483.

[28] Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z K, et al. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses [J]. The Plant Journal, 2003, 34(2): 137-148. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01708.x.

[29] Uno Y, Furihata T, Abe H, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(21): 11632-11637. DOI:10.1073/pnas.190309197.

[30] Choi H I, Hong J H, Ha J O, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(3): 1723-1730. DOI:10.1074/jbc.275.3.1723.

[31] Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, et al. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression [J]. The Plant Cell, 1997, 9(10): 1859-1868. DOI:10.1105/tpc.9.10.1859.

[32] Iwasaki T, Yamaguchi-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]. Molecular and General Genetics, 1995, 247(4): 391-398. DOI: 10.1007/BF00293139.

[33] Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, et al. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence [J]. The Plant Cell, 1993, 5(11): 1529-1539. DOI:10.1105/tpc.5.11.1529.

[34] Wang H M, Zhou L, Fu Y P, et al. Expression of an apoplast-localized BURP-domain protein from soybean (*GmRD*22) enhances tolerance towards abiotic stress [J]. Plant, Cell & Environment, 2012, 35(11): 1932-1947. DOI:10.1111/j.1365-3040.2012.02526.x.

[35] Hanana M, Deluc L, Fouquet R, et al. Identification et caractérisation d'un gène de réponse à la déshydratation *rd22* chez la vigne (*Vitis vinifera* L.) [J]. Comptes Rendus Biologies, 2008, 331: 569-578. DOI:10.1016/j.crvi.2008.05.002.

[36] Matus J T, Aquea F, Espinoza C, et al. Inspection of the grapevine BURP superfamily highlights an expansion of *RD22* genes with distinctive expression features in berry development and ABA-mediated stress responses [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110372. DOI:10.1371/journal.pone.0110372.

[37] Aubert Y, Leba L J, Cheval C, et al. Involvement of *RD20*, a member of caleosin family, in ABA-mediated regulation of germination in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(4): 538-540. DOI:10.4161/psb.6.4.14836.

[38] Daniels M J, Mirkov T E, Chrispeels M J. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP [J]. Plant Physiology, 1994, 106(4): 1325-1333. DOI:10.1104/pp.106.4.1325.

[39] Chaumont F, Loomis W F, Chrispeels M J. Expression of an *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin in *Dictyostelium* results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(12): 6202-6209. DOI:10.1073/pnas.94.12.6202.

[40] Huang R F, Zhu M J, Kang Y, et al. Identification of plasma membrane aquaporin in guard cells of *Vicia faba* and its role in stomatal movement [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(1): 42-48.

[41] Hanano A, Bessoule J J, Heitz T, et al. Involvement of the caleosin/peroxygenase *RD20* in the control of cell death during *Arabidopsis* responses to pathogens [J]. Plant Signaling & Behavior, 2015, 10(4): e991574. DOI: 10.4161/15592324.2014.991574.

[42] Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, et al. *RD*19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the ralstonia solanacearum PopP2 effector [J]. The Plant Cell, 2008, 20(8): 2252-2264. DOI:10.1105/tpc.108.058685.

[43] Lampl N, Alkan N, Davydov O, et al. Set-point control of *RD*21 protease activity by *AtSerpin1* controls cell death in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2013, 74(3): 498-510. DOI:10.1111/tpj.12141.

[44] Lampl N, Budai-Hadrian O, Davydov O, et al. *Arabidopsis AtSerpin1*, crystal structure and in *Vivo* interaction with its target protease RESPONSIVE TO DESICCATION-21 (*RD21*) [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(18): 13550-13560. DOI:10.1074/jbc.M109.095075.

[45] Shindo T, Misas-Villamil J C, Hörger A C, et al. A role in immunity for *Arabidopsis* cysteine protease *RD21*, the ortholog of the tomato immune protease C14 [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29317. DOI:10.1371/journal.pone.0029317.

[46] Ormancey M, Thuleau P, van der Hoorn R A L, et al. Sphingolipid-induced cell death in *Arabidopsis* is negatively regulated by the papain-like cysteine protease *RD21* [J]. Plant Science, 2019, 280: 12-17. DOI:10.1016/j.plantsci.2018.10.028.

[47] Kamranfar I, Xue G P, Tohge T, et al. Transcription factor *RD26* is a key regulator of metabolic reprogramming during dark-induced senescence [J]. New Phytologist, 2018, 218(4): 1543-1557. DOI:10.1111/nph.15127.

[48] Jia H Y, Zhang S J, Ruan M Y, et al. Analysis and application of *RD29* genes in abiotic stress response [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34(4): 1239-1250. DOI:10.1007/s11738-012-0969-z.

[49] Cheong Y H, Sung S J, Kim B G, et al. Constitutive overexpression of the calcium sensor *CBL5* confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Molecules and Cells, 2010, 29(2): 159-165. DOI:10.1007/s10059-010-0025-z.

[50] Li F, Han Y Y, Feng Y N, et al. Expression of wheat expansin driven by the *RD29* promoter in tobacco confers water-stress tolerance without impacting growth and development [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163(3): 281-291. DOI:10.1016/j.jbiotec.2012.11.008.

[51] 柳娜, 杨文雄, 王世红, 等. 拟南芥 *rd29A* 启动子在不同胁迫下 *GUS* 活性分析 [J]. 甘肃农业科技, 2019(5): 44-50. DOI:10.3969/j.issn.1001-1463.2019.05.010.