

高等植物胁迫诱导型启动子的研究进展

文添龙, 刘雪梅, 冀亚萍, 俞嘉宁*

(陕西师范大学 生命科学学院, 西安 710119)

摘要: 逆境胁迫严重影响植物生长发育, 降低作物产量。目前在植物抗逆基因工程中, 大多使用组成型启动子驱动目的基因表达, 组成型启动子的表达虽然能提高转基因植株的抗逆性, 但持续过量地表达转化的外源基因有时会阻碍植物的生长且降低其产量。因此, 诱导型启动子的研究具有重要的应用价值。该文对近年来植物在逆境胁迫处理下, 一些诱导型启动子的种类和功能, 可能具有的顺式作用元件, 反式作用因子及其研究方法进行了综述。

关键词: 启动子; 诱导型启动子; 胁迫诱导; 转基因植物

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Research Progress of Stress-induced Promoter in Higher Plant

WEN Tianlong, LIU Xuemei, JI Yaping, YU Jianing*

(Shaanxi Normal University, College of Life Science, Xi'an 710119, China)

Abstract: Adversity stress seriously affect growth and development of plant, even reduce crop yields. In most transgenic engineering, constitutive promoters are being used to drive the expression of exogenous genes. Recent years, constitutive promoters have been identified to improve the resistance of transgenic plants to abiotic stress, but over-expression of exogenous genes driven by constitutive promoters could cause growth stunted and yield reduction of transgenic plants. Inducible promoters only drive exogenous genes to express in special conditions, such as abiotic stress and environment inducible. This paper reviews the types and functions of inducible promoters. The prospect of stress-induced promoters was also discussed.

Key words: promoter; inducible promoter; stress-induced; transgenic plants

启动子是提供 RNA 聚合酶识别和结合的一段 DNA 序列和相关的调控元件, 通常位于基因的上游, 驱动基因转录。根据启动子的作用方式, 可分为组成型启动子、组织特异型启动子和诱导型启动子。组织特异型启动子驱动基因表达常常只发生在某些特定的器官或组织部位, 表现出发育调节的特性。诱导型启动子通常不启动基因转录或转录活性很低, 在某些特定信号刺激下, 转录活性能够显著提高。在转基因植物中, 组成型启动子持续过量表达外源基因会阻碍植物的生长且降低其产量^[1]。而选

用组织特异型启动子和诱导型启动子, 可使外源基因只在特殊的组织部位或诱导的情况下表达, 而不会因外源蛋白的持续表达影响植物正常生长, 有很好的应用价值。本文就近年来高等植物中一些胁迫诱导型启动子的种类和功能, 可能具有的顺式作用元件, 反式作用因子及其研究方法进行了综述。

1 高等植物胁迫诱导型启动子的类型

高等植物胁迫诱导型启动子根据诱导条件的不同主要分为干旱诱导型启动子、低温诱导型启动子、

收稿日期: 2013-09-09; 修改稿收到日期: 2013-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270368); 陕西省农业公关(2011K02-09)

作者简介: 文添龙(1990—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail: tlwen1020@163.com

* 通信作者: 俞嘉宁, 博士, 副教授, 主要从事植物功能基因的表达调控研究。E-mail: jnyu@snnu.edu.cn

高温诱导型启动子、盐诱导型启动子和植物激素诱导型启动子。它们在胁迫的条件下均有显著的诱导特性,可在植物特定的发育阶段和生长环境下,诱导特定基因的表达,以保证植物正常生长;当胁迫解除后,特定基因则停止表达。这样不仅不会造成植物体内资源的浪费,又可提高植物在胁迫条件下的抗性。

近年来,高等植物中已发现了不少胁迫诱导型启动子(表 1)。其中 P_{SARK} 是一个成熟和干旱诱导的启动子,可驱动衰老相关的受体蛋白激酶表达^[2-3]。P_{SARK} 启动子在农作物中表现出干旱响应的特性^[4-5]。Delatorre 等^[6]检测了 P_{SARK} 驱动的转基因烟草中 GUS 的表达活性,结果显示转 P_{SARK} ::

GUS 的烟草在干旱处理条件下,开花期叶片中 GUS 表达量增加,但在正常生长的幼苗叶片中, GUS 活性没有变化,证明了成熟和早衰的叶片中 P_{SARK} 启动子在干旱胁迫下的活性更高。OsABA2 是编码玉米黄质环氧化酶的基因,Rai 等^[7]用 OsA-BA2 基因启动子融合 GUS 报告基因构建表达载体转化玉米,在没有胁迫的条件下,转 OsABA2::GUS 株系中 OsABA2 基因启动子驱动的 GUS 活性比对照组低得多,而缺水处理后,含有 OsABA2::GUS 的转基因植物叶片在干旱处理 6 d 后 GUS 表达量显著增加,可达对照组的 5 倍,在第 8 天 GUS 表达量轻微下降;而在转基因植物的根部 GUS 活性在第 8 天仍然增加,是对照的 8 倍,表明 OsABA2 基

表 1 高等植物中诱导型启动子的类型、具有的顺式作用元件及应用

Table 1 The types of inducible promoters in higher plant with *cis*-elements and their application

启动子 Promoter	典型顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element	物种来源 Origin of species	应用 Application
P _{SARK}	CAAT-box,GT1-box,MYC	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	受干旱等诱导响应 ^[6] Response to drought and other stress factors
OsABA2	MYBR,MYCR,ABRE	梗稻 <i>Oryza sativa Japonica</i>	受到 ABA、盐和干旱诱导响应 ^[7] Response to ABA, salt and drought
cor15	TATA-box,ABREs,DRE/CRT	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	对低温等诱导响应 ^[11] Response to hypothermia and other stress factors
RFP1	TATA-box,CAAT-box,TCA,HSE	中国野生葡萄 <i>Vitis pseudoreticulata</i>	对高温等诱导响应 ^[14] Response to high temperature and other stress factors
BADH	TATA-box,CAAT-box,CAAAAA、CANNTG	辽宁碱蓬 <i>Suaeda liaotungensis</i> K.	受 NaCl 诱导 ^[16-17] Response to NaCl
Rab16A	ABRE,CE-like	籼稻 Indica rice Pokkali	对盐等诱导响应 ^[19] Response to salt and other stress factors
GhCesA4	AuxRE	陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	受 NAA 强诱导,但受 ABA、干旱和 GA 轻微诱导 ^[21] Strongly induced by NAA,but slightly induced by the ABA,drought and GA
PsPR10	TATA-box,CAAT-box,Dof,E-box	美国白松 <i>Pinus strobus</i>	受 NaCl、甘露醇、PEG-6000SA、ABA 和 JA 诱导 ^[25] Induced by NaCl,mannitol,PEG-6000SA,ABA and JA
RD29	DRE,MYB	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	受干旱、高盐等诱导 ^[26-27] Induced by drought,salt and other stress factors
GHSP26	CAAT-box,HSEs,CBF,ABRE	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	受干旱等诱导 ^[28] Induced by drought and other stress factors
SWPA2	GCN-4,AP-1,HSTF,SP-1,G-box	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	具有氧化特性,对干旱、低温等诱导响应 ^[29-30] Have oxidation characteristics and induced by drought,hypothermia and other stress factors
CBF	CRT/DRE,MYC	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	对低温等诱导响应 ^[31-33] Response to hypothermia and other stress factors
RcHSP17.8	TATA-box,HSE,LTR,ERE	月季 <i>Rosa chinensis</i>	对高温等诱导响应 ^[34] Response to high temperature and other stress factors
HAHB4	ABRE,W-box	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	对 ABA、NaCl 和干旱等胁迫诱导响应 ^[35-36] Response to ABA, NaCl,drought and other stress factors
DREB1B	DRE/C-repeat	水稻 <i>Oryza sativa</i>	受甘露醇、盐、PEG、甲基紫精、寒冷、水杨酸和 ABA 的强烈诱导 ^[37-38] Strongly induced by mannitol,salt,PEG,methyl viologen,hypothermia,salicylic acid and ABA
RGA1(D)	ABRE	水稻 <i>Oryza sativa</i>	在 NaCl、低温、干旱胁迫条件下上调;在高温胁迫下下调 ^[39] Up-regulated by NaCl,hypothermia and drought stress;Down-regulated by high temperature
AdGPP	TATA-box,CAAT-box	猕猴桃 <i>Actinidia deliciosa</i>	受非生物胁迫诱导上调 ^[40] Up-regulated by abiotic stress
TsVP1	G-box,box-Ⅲ、TC-rich	盐芥 <i>Thellungiella halophila</i>	盐胁迫诱导 ^[41] Induced by salt
OsLEA3-1	ABRE	早稻 <i>Oryza sativa</i>	受高盐和干旱诱导 ^[42] Induced by high salt and drought

因启动子是很好的干旱诱导型启动子,且在根部的诱导效果更持久。

cor15a 基因启动子是从拟南芥中分离出来,在低温适应过程中能特异表达的一个典型的诱导型启动子^[8]。植物对不同程度低温逆境的生理响应是不同的^[9],*cor15a* 启动子区域(−305~+78 bp)包含了低温响应元件^[10]。Wang 等^[11]分析了 *GUS* 融合 *COR15a* 启动子的转基因株系分别在低温(22 ℃~4 ℃)和冷却(28 ℃~22 ℃或 22 ℃~16 ℃)条件下 *GUS* 的表达情况,结果显示 28 ℃~22 ℃的处理比低温处理时 *GUS* 基因的表达更快,而 22 ℃~16 ℃的冷却处理比低温处理时 *GUS* 基因的表达慢且弱。

此外,植物为了抵御高温胁迫,一些基因可被高温诱导表达。RFP(RING FINGER PROTEIN)具有泛素连接酶的功能^[12],在植物响应非生物胁迫中扮演了重要角色^[13]。Yu 等^[14]研究了中国野生葡萄(*Vitis pseudoreticulata*)*VpRFP1* 启动子对温度的响应,将含有转 *VpRFP1-GUS* 融合基因的葡萄叶片分别进行低温(4 ℃)和高温(40 ℃)处理。低温处理时,*VpRFP1* 启动子驱动的 *GUS* 活性与内参比较没有差异,而高温处理时,*VpRFP1* 启动子驱动的 *GUS* 活性比内参高 8 倍。

盐胁迫诱导型启动子可以帮助植物改善生长条件并提高产量。对盐胁迫诱导型启动子的研究发现其中一些启动子可显著提高转基因植物对盐胁迫的响应。从辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis* K.)中分离的编码甜菜碱醛脱氢酶的 *BADH* 基因,受盐胁迫的诱导表达^[15-16]。Zhang 等^[17]设计了 5 个 *BADH* 基因启动子的截短体(−1 993 bp、−1 466 bp、−1 084 bp、−573 bp 和 −300 bp),融合报告基因 *GUS* 后转入烟草。用不同浓度 NaCl 处理转基因烟草叶片 48 h 后,通过 *GUS* 组织化学染色分析和荧光定量分析检测,显示叶片中 *GUS* 活性与 NaCl 的浓度成正比。与对照比较,融合 −300 bp 启动子截短体的转基因植物在 400 mmol/L 的 NaCl 处理下,*GUS* 活性增强 6.3 倍。最短的启动子截短体(−300~+62 bp)拥有重要的顺式作用元件,是强 NaCl 诱导的启动子。*Rab* 基因最早是从水稻中分离出来的^[18],其中 *Rab16A* 编码脱水蛋白,属于第二组 *LEA* 基因家族,受 ABA 诱导,拥有典型的 ABA 响应元件(ABRE)和耦合元件 CE-like 序列,对盐胁迫具有一定的耐性^[19]。RoyChoudhury 等^[20]通过土壤农杆菌转化法将 *Rab16A* 启动子驱动的 *Rab16A* 转到烟草中获得了 T₂ 代转基因植

株,在高盐、ABA 和 PEG 诱导的条件下,转基因植物叶片中 *Rab16A* 蛋白质积累,渗透产物,如:还原糖、脯氨酸和多聚胺等也增加,与野生型植株相比对盐的耐受性明显增加。

除此之外,还有些受激素诱导的启动子,如:纤维素合成酶基因启动子(*GhCesA4*)是从陆地棉(*Gossypium hirsutum*)中分离出的一个全长为 1 482 bp 的启动子。转基因烟草中 *GhCesA4* 启动子可被植物激素诱导表达^[21]。有证据表明许多植物激素响应元件(AuxRE)是由 TGTCTC 序列和它的反向序列 GAGACA 组成^[22]。Wu 等^[21]把 *GhCesA4* 启动子连到烟草的报告基因 *GUS* 上,形成了转基因烟草(p*GhCesA4::GUS*)。然后对生长 3 周的 T₁ 代转基因烟草进行各种胁迫处理,发现 NAA 处理的 *GUS* 活性比对照处理的高 1.86 倍,然而 ABA、干旱和 GA 处理仅表现出轻微的 *GUS* 活性。对 NAA 处理的时间和剂量研究发现,*GUS* 活性在 1 μmol/L NAA 处理后逐渐增加,在 9 h 达到最高水平,并可以维持到 24 h,但是在没有 NAA 处理的培养期间不显示任何改变。*PsPR10* 启动子是从白松(*Pinus strobus*)中分离出的,该基因可在根中诱导表达^[23-24],Xu 等^[25]构建了一系列 *PsPR10*(1 681 bp)启动子 5'端截短体融合 *GUS* 报告基因,转入烟草后分析了非生物逆境胁迫下 P796(−796~+69)对根特异性的调控。结果显示,用 NaCl、甘露醇和 PEG-6000 处理转 P796-*GUS* 植株的根部,*GUS* 活性比空白对照高 3 倍,用 SA、ABA 和 JA 处理 *GUS* 活性更高。

上述研究结果表明,胁迫诱导型启动子都可通过胁迫诱导改善植物生长条件的功能,且其诱导条件和不同诱导型启动子的诱导效果均会有所差异。大多数研究是通过融合报告基因 *GUS* 或 *eGFP* 后构建成植物表达载体,用农杆菌介导的方法转到其他植物中形成转基因植物,在转基因植株中进行一系列的胁迫处理,研究对各个胁迫的响应情况。一般情况下,胁迫诱导型启动子可以响应多种胁迫,但是,诱导型启动子通常只对特定的胁迫有强的诱导效果。这可能与不同启动子作用在不同植物和其自身上游所含的顺式作用元件有密切关系,不同顺式作用元件可结合不同的反式作用因子来改善胁迫的影响,因此研究各类胁迫诱导型顺式作用元件及其互作的反式作用因子,有助于更好地解析胁迫诱导型启动子的作用机制。

2 顺式作用元件和反式作用因子

2.1 顺式作用元件

除核心启动子外,诱导型启动子上游还有很多响应不同胁迫的顺式作用元件。目前常见的胁迫响应顺式作用元件主要有 DRE、MYB、MYC、ABREs、HSEs、LTR 和 GCC-box 等(表 2)。DRE 元件是 1994 年 Yamaguchi-Shinozaki 等^[43]首次发现,其核心序列为 TACCGACAT,在干旱、高盐和低温处理条件下能驱动下游基因的表达。ABREs 是 1989 年 Marcotte 等^[44]鉴定得到,核心序列是 ACGT,只有在依赖 ABA 的基因表达中起作用,可与 bZIP 类转录因子结合,调控下游基因的表达,提高植物的抗盐性。HSE 一般位于 TATA-box 上游,参与基因的表达调控。其余的胁迫响应元件均可与相应的转录因子结合,共同调控基因的表达。鉴于胁迫响应元件的重要功能,从基因中确定特定响应元件的数量和位置显得尤为重要。如:胁迫处理条件下,小的热激蛋白(sHSPs)在保护新合成的蛋白质中具有重要的作用。在 sHSP26 启动子中 CAAT-box 连着热激元件(HSEs),CAAT-box 元件在转录中起着协同 HSEs 的作用^[28]。Zahur 等^[45]从棉花(*Gossypium arboreum*)基因组 DNA 5' 编码区分离了 GHSP26 启动子序列(PGHSP26, -2 813 bp),通过 PLACE 软件分析了 PGHSP26 启动子响应各种环境信号的顺式作用元件,显示出位于 -76 bp 处的 MYB 结合位点与干旱胁迫有关,两个 ABA 响应元件类似基序(ACGTG)与干旱胁迫时的基因表达有关,两个干旱响应元件 CBF 和 ABRE 分别位于 -898 bp 和 -736 bp,位于 -582 bp MRE-like 序列(TGCAGGC)可被重金属诱导。

RcHSP17.8 是 sHSPs 家族的启动子,从蔷薇属植物月季中分离得到的,包含 2 个 sHSP 保守结构域^[46],在植物中 sHSPs 过表达可以增强对非生物胁迫的耐受性^[34]。Zhang 等^[47]用 PlantCARE 软件分析了 *RcHSP17.8* 启动子区的顺式作用元件,*RcHSP17.8* 启动子在 -26 bp 到 -32 bp 上游片段之间含有 TATA-box (TATAAAT),有对热激(HSE)、低温(LTR)和乙烯(ERE)响应的顺式作用元件,3 个 HSE 位于 -41 bp、-87 bp 和 -821 bp 处,2 个 LTR 位于 -127 bp 和 -692 bp 处。将 *RcHSP17.8* 翻译起始密码子上游 1 910 bp 的序列和 5 个启动子截短体结合到 GUS 报告基因上,转到拟南芥中,结果显示 GUS 染色出现在植物所有的器官中,尤其是热处理后的维管组织中。在转基因

拟南芥中,热休克状态下的全长启动子驱动的 GUS 表达量更高,但是在其他非生物胁迫中没有检测到 GUS 活性。截短体分析表明 *RcHSP17.8* 的 -178 bp 到 -771 bp 区域是启动子响应高温所必需的。

2.2 反式作用因子

植物基因启动子序列包含多种重要的顺式作用元件,而其在转录水平的调控是与反式作用因子相互作用实现的(表 2),通过调控下游相应基因的表达,使植物能够适应复杂多变的生长环境。因此转录因子与植物抗逆性密切相关,其编码产物参与信号传递途径和基因表达调控过程,主要分为 APZ/EREBP、MYB、bZIP、WRKY 和 NAC 类 5 个家族。其中,碱性亮氨酸拉链(bZIP)转录因子参与种子贮藏基因表达、植物生长发育、光信号转导、病害防御、生物和非生物胁迫响应以及 ABA 敏感性等各种信号的反应;干旱响应元件结合转录因子(DREB)可特异地识别并结合干旱响应元件(DRE),进而参与逆境信号的传递,调控下游逆境响应基因的表达,提高植物在逆境条件下的适应性和耐受能力。

DREB 是可特异性识别并结合 DRE 顺式作用元件的反式作用因子。DREB1A/B/C 和 DREB2 类转录因子参与不依赖于 ABA 的低温、干旱或高盐等胁迫响应途径;而 DREB1D/CBF4 则参与依赖 ABA 的干旱或高盐等响应途径。

CBF 是低温快速诱导的转录因子。拟南芥中 *RD29A* 启动子可被干旱、高盐和低温诱导^[48]。*RD29A* 启动子含有 2 个干旱响应元件(DRE),在调控基因表达中起到重要的作用^[49]。转录因子 DREB1A 可与 DRE 相互作用诱导耐胁迫基因表达^[1]。在 *RD29A* 控制下,为了降低非生物胁迫的影响,植物体可靶向运输干旱响应调节因子^[26]。Yamaguchi-Shinozaki 等^[43]发现 *RD29A* 包含 1 个 9 bp 的 DRE(TACCGACAT),与干旱和高盐的胁迫有关,这个元件称为同向重复序列 1(DR1),DR1 是 *RD29A* 驱动的干旱诱导表达中的调控元件。Li 等^[27]用组成型的 *CaMV* 35S 启动子和 *RD29* 启动子分别驱动 *TaEXPB23* 基因转化烟草。35S::*TaEXPB23* 转基因烟草在正常生长状况下,其生长与发育发生改变,例如,苗期的生长速度快、开花和成熟早、株高比野生型短等。然而,*RD29::TaEXPB23* 转基因烟草比野生型对于干旱胁迫的耐受性强。表明胁迫诱导型启动子 *RD29* 可以提高植物对于干旱胁迫的耐性。Stockinger 等^[50]通过酵母单杂技术,从拟南芥 cDNA 文库中首次分离得到转录

表 2 高等植物诱导型启动子具有的顺式作用元件及其互作的反式作用因子

Table 2 *Cis*-acting elements and their interacting *trans*-acting factors of inducible promoter in higher plant

顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element	序列 Sequence	反式作用因子 <i>Trans</i> -acting factor	胁迫响应 Stress condition
G-box	CACGTG	HY5, GBF2, PIF3	光 Light
I-box	GATAA	LeMYBI	光 Light
GAATTC element	GAATTC	HSF	高温 High temperature
HSE	AAGAATTTTC	Hsfs	高温 High temperature
W-box	(T)(T)TGAC(C/T)	WRKY	干旱/ABA Drought/ABA
LTRE	GGCCGACGT	ERF/AP2	低温/干旱 Hypothermia/drought
CRT	TGGCCGAC	CBF	低温/干旱 Hypothermia/drought
MYC-like	CATGTG	NAC	干旱/高盐/低温/ABA Drought/salt/hypothermia/ABA
DRE	TACCGACAT	ERF/AP2, DREB	低温/干旱 Hypothermia/drought
MYBR	TGGTTAG	MYB	干旱/高盐/低温/ABA Drought/salt/hypothermia/ABA
ABRE	ACGTGGC	bZIP	ABA/高盐/干旱 ABA/salt/drought
CE1	TGCCACCGG	ERF/AP2	ABA
CE3	ACGCGTGCCTC	ERF/AP2	ABA
MYCR	CACATG	bHLH	ABA/干旱/低温 ABA/drought/hypothermia
GCC-box	TAGAAGCCGCC	ERF	乙烯 Ethylene

因子 CBF1 (即 *DREB1B* 基因), CBF1 是单拷贝或低拷贝基因, 它编码 1 个 DRE 结合因子, 含有 1 个 APZ 区, 此区域是一个由 60 个氨基酸组成的 DNA 结合域, 其保守的结合域序列是 A/GCCGAC, APZ 区包含特异的残基, 能够决定它们结合 DRE/C-repeat 元件的能力^[51]。Gutha 等^[37] 研究了水稻 (*Oryza sativa* ssp. *indica*) *OsDREB1B* 基因启动子在渗透胁迫、氧化胁迫、水杨酸、ABA 和低温胁迫下 *DREB1B* 产物的作用, 结果显示转基因烟草在甘露醇作用的条件下可以改善种子萌发、根的生长、膜的稳定性和 2,2-二苯基-1-三硝基苯肼 (DPPH) 的抗自由基活性。DRE 和 CRT 元件都包含了核心序列 CCGAC, 它们普遍存在于低温、高盐或干旱胁迫响应基因的启动子中, 统称 CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element) 元件, DREB 转录因子在胁迫条件下可与启动子中的 CRT/DRE 顺式作用元件特异结合, 可以激活许多逆境诱导基因的表达, 从而增强植物对逆境胁迫的耐受能力。

近年来的研究表明, 顺式作用元件两端的侧翼序列对启动子的诱导活性有重要影响, 如: Li 等^[52] 通过生物信息学分析了从拟南芥分离出的 *cor15a* 和 *cor15b* 启动子, 显示出含有 2 个 CRT/DRE 的 *cor15b* 启动子比含有 1 个的 *cor15a* 启动子活性强; 进一步通过构建启动子截短体和交换顺式作用元件两端侧翼序列, 结果显示侧翼序列严重影响启动子的强度。因此诱导型启动子的诱导活性不仅与启动子上的顺式作用元件的类型有关, 还与顺式作用元

件的数量、元件之间的侧翼序列有关; 除此而外还与与其互作的反式作用因子有关。反式作用因子与顺式作用元件的结合有强弱之分, 结合强的有助于启动下游基因的表达, 结合弱的, 下游基因的表达水平降低^[53], 而且顺式作用元件上下游的侧翼序列, 甲基化修饰也影响反式作用因子与其结合^[54], 影响下游基因的表达。也有文献报道, 转录因子保守结构域的序列组成直接影响到蛋白的亲/疏水性、亚细胞定位、二级结构和三级结构的形成等, 进而决定其生理功能的发挥。因此, 应用生物信息学方法可以对已知蛋白序列进行比对、分析, 推断和预测其结构和功能, 可为选择合适的试验方法提供理论参考, 为胁迫诱导型基因启动子的功能研究提供理论依据^[55]。

3 高等植物胁迫诱导型启动子的研究方法

高等植物胁迫诱导型启动子常用的研究方法主要有生物信息学分析与预测、瞬时转化分析、缺失突变分析、点突变、凝胶阻滞技术 (EMSA)、酵母单杂交技术等。近年来, 一些新的研究方法也用于启动子研究。

3.1 生物信息学分析与预测

生物信息学分析与预测是目前研究启动子最常用的方法。获得启动子序列后, 首先通过生物信息学方法对启动子序列进行初步的预测和分析, 分析序列中可能含有的顺式作用元件。目前常用的植物启动子预测的相关数据库和软件资源有 EPD (eu-

karyotic promoter database)^[56]、TRRD(transcription regulatory regions database)^[57]、TRANSFAC(transcriptional regulation from patterns to profiles)^[58]、PLACE(plant *cis*-acting regulatory DNA elements)^[59]和 PlantCARE(plant *cis*-acting regulatory elements)^[60] 5 种。其中 PLACE 和 PlantCARE 为分析植物 DNA 序列上顺式作用元件常用的数据库,可预测并提供顺式作用元件的位置、序列和在特异启动子上的独立位点等信息。

近年来,计算机预测法也开始用于推测基因组 DNA 序列的调控基序和保守序列。Ma 等^[61]提出了一个不依赖于同源基因启动子序列比对的 Motif Indexer 方法,它是用单个计数的原理,检索每 8-mer 或每 12-mer 寡聚核苷酸的存在,可应用于所有拟南芥基因启动子和胁迫诱导表达的基因中,用于研究基因组 DNA 的调控序列和识别表达基因的保守基序。

3.2 缺失突变和点突变分析

在确定某一段 DNA 序列为启动子之后,通常通过 5'端缺失、3'端缺失和中间缺失构建一系列启动子序列缺失的截短体,然后构建截短体连接报告基因的表达载体,并转化植物,根据转化植株中报告基因的表达情况分析启动子诱导元件的作用。常用的报告基因有 β -葡聚糖酸醛苷酶(β -glucuronidase, GUS)、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)、荧光素酶(luciferase, LUC)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。

点突变分析是研究启动子的特定核苷酸序列常用的方法,一般是利用转座子插入突变或者是限制性酶切除某一特定启动子元件,并通过该插入或缺失启动子转化植物来确定特定序列的功能。此方法是研究启动子最常用的方法,如 TATA 框和 CAAT 框等都是运用此方法分析得到。

3.3 瞬时转化分析

当外源基因导入植物细胞中以后,在瞬时表达状态的基因转移中,引入细胞的外源 DNA 和宿主细胞染色体 DNA 并不发生整合。这些 DNA 一般随载体进入细胞后 12 h 内就可以表达,并持续约 80 h 左右。瞬时转化技术是将一段启动子序列与报告基因融合构建表达载体,一般通过农杆菌介导法转化植物,并进行报告基因的分析检测^[62]。瞬时转化分析是确定一个启动子是否具有启动活性最常用的方法,并不能说明启动子是否具有诱导性。瞬时转化分析常用于检测缺失突变和点突变。

3.4 凝胶阻滞技术和 DNase I 足迹分析法

凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)是一种简单快速检测蛋白质与特异 DNA 序列结合的技术^[63],可用于体外研究启动子与蛋白质的结合情况,以确定启动子的核心顺式作用元件。其原理为:在凝胶电泳中,由于电场的作用,小分子 DNA 片段比其结合了蛋白质的 DNA 片段向阳极移动的速度快,根据电泳迁移率的变化可以确定蛋白质与核酸分子的结合情况。因此,可以将双链 DNA 片段的一端用同位素或地高辛标记,再与蛋白质提取物混合后电泳,如果目的 DNA 与特异性蛋白质结合,则其向阳极移动的速度受到阻滞,通过放射性自显影技术,就可找到 DNA 结合蛋白的样品。

DNase I 足迹分析法(DNase I foot printing)和凝胶阻滞技术类似,都是用来研究顺式作用元件与蛋白质结合的一种方法^[64],该方法能确定与蛋白质结合的 DNA 长度及序列。其基本原理是用 DNase I 部分水解已用单链末端标记的待测双链 DNA,在聚丙烯酰胺凝胶上形成以相差一个核苷酸为梯度的 DNA 条带;当 DNA 片段与其特异性蛋白结合后,结合蛋白的区域受到蛋白的保护,免受 DNase I 的攻击,因此形成梯度中的空白区域。再结合 DNA 化学测序法,就可知该结合的碱基序列。

3.5 酵母单杂交技术

酵母单杂交(Yeast one-hybrid)技术最早是 1993 年由 Li 等从酵母双杂交技术发展而来^[65],通过对报告基因的表型检测,分析 DNA 与蛋白之间的相互作用,用以研究真核细胞内的基因表达调控。由于酵母单杂交方法检测特定转录因子与顺式作用元件专一性相互作用的敏感性和可靠性,现已被广泛用于克隆细胞中含量微弱的、用生化手段难以纯化的特定转录因子。理论上,在单杂交检测中,任何靶元件都可被用于筛选一种与之有特异结合区域的蛋白。

4 展望

逆境是一个长期存在的世界性难题。植物处于非生物胁迫时各种生理生化过程和营养状况受到不同程度的伤害,严重影响着植物的生长和作物的产量。培育出新的抗逆作物,提高作物的产量已经成为目前研究的热点。用胁迫诱导型启动子与特定基因融合,使植物在诱导条件下表达相应外源蛋白,既节约能量,也不影响植物的正常生长发育,最终可以

避免外源基因对植物的不良效应(如转基因植株的生长延迟和畸形发育),显著提高作物在诱导条件下外源基因的表达能力。Brandalise 等^[66]从咖啡 cDNA 中克隆了编码异黄酮还原酶类似蛋白的启动子 CaIRL,然后转化到烟草中,转基因烟草在机械损伤叶片中 GUS 表达增强;Khurana 等^[28]把高温胁迫启动子 sHSPs 转到拟南芥中,对其在高温胁迫条件下进行组织化学分析,观测所有幼苗 GUS 表达情况,结果显示转基因植物中 GUS 高水平表达。

目前虽然对胁迫诱导型启动子有了较多的研究,但大多还处于实验阶段,相比组成型启动子和组织特异性启动子,诱导型启动子用于生产实践的还很少,其原因,一是对诱导型启动子的研究起步晚;二是诱导型启动子在非诱导条件下不启动转录或转录活性很低,只有受到特定信号的刺激时才能使转

录活性显著提高。一些胁迫诱导型启动子采用基因工程的手段使部分作物的抗逆性有所提高,但对植物的胁迫应答和抗逆性分子机制却完全不清楚。对于新的诱导型启动子的研究仍然是今后研究的热点,将功能明确的胁迫诱导型启动子或人工合成的嵌合型诱导启动子与抗虫、抗病或品质相关基因相连接后转到植物中表达,使转基因植物根据需要在合适的胁迫处理或外界诱导条件下诱导外源基因的定时定量表达,是植物基因工程的研究方向之一。尽管一些诱导型启动子研究取得了一定的进展,但至今仍有部分胁迫诱导转录因子及其大量的下游诱导基因未被发现。因此,胁迫诱导信号是如何传递的,转录因子又是如何调控各种胁迫基因的表达,各种胁迫基因又是如何发挥抗逆境胁迫活性等问题尚需深入研究。

参考文献:

- [1] KASUGA M, LIU Q, MIURA S, *et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**(3): 287—291.
- [2] QIN H, GU Q, ZHANG J L, *et al.* Regulated expression of an *isopentenyltransferase* gene (IPT) in peanut significantly improves drought tolerance and increases yield under field conditions[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, **52**(11): 1 904—1 914.
- [3] RIVERO R M, GIMENO J, DEYNZE A V, *et al.* Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing *P_{SARK}::IPT* prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, **51**(11): 1 929—1 941.
- [4] RIVERO R M, KOJIMA M, GEPSTEIN A, *et al.* Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(49): 19 631—19 636.
- [5] PELEG Z, REGUERA M, TUMIMBANG E, *et al.* Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, **9**(7): 747—758.
- [6] DELATORRE C A, COHEN Y, LIU L, *et al.* The regulation of the SARK promoter activity by hormones and environmental signals[J]. *Plant Science*, 2012, 193—194: 39—47.
- [7] RAI M, HE C K, WU R. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice[J]. *Transgenic Research*, 2009, **18**(5): 787—799.
- [8] HAJELA R K, HORVATH D P, GILMOUR S J, T *et al.* . Molecular cloning and expression of *cor* (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology*, 1990, **93**(3): 1 246—1 252.
- [9] WU H(吴 辉), ZHANG J S(张巨松), SHI J Y(石俊毅), *et al.* Physiological responses of cotton seedlings under low temperature stress [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(1): 74—82(in Chinese).
- [10] BAKER S S, WILHELM K S, THOMASHOW M F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor 15a* has *cis*-acting elements that confer cold, drought and ABA regulated gene expression[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, **24**(5): 701—713.
- [11] WANG Y, HUA J. A moderate decrease in temperature induces *COR15a* expression through the CBF signaling cascade and enhances freezing tolerance[J]. *The Plant Journal*, 2009, **60**(2): 340—349.
- [12] KOSAREV P, MAYER K FX, HARDTKE C S. Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome[J]. *Genome Biology*, 2002, **3**(4): 16. 1—16. 12.
- [13] RAMONELL K, BERROCAL-LOBO M, KOH S, *et al.* Loss of function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*[J]. *Plant Physiology*, 2005, **138**(2): 1 027—1 036.
- [14] YU Y H, XU W R, WANG J, *et al.* A core functional region of the *RFP1* promoter from Chinese wild grapevine is activated by powdery mildew pathogen and heat stress[J]. *Planta*, 2013, **237**(1): 293—303.
- [15] ZHOU S F, CHEN X Y, XUE X N, *et al.* Physiological and growth responses of tomato progenies harboring the betaine aldehyde dehydrogenase gene to salt stress[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, **49**(5): 628—637.

- [16] LI Q L,ZHANG Y,YIN H,LI D. Isolation of *BADH* gene promoter from *Suaeda liaotungensis* and its sequence analysis[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*,2006,**22**(1):77—81.
- [17] ZHANG Y,YIN H,LI D,*et al.* Function analysis of *BADH* gene promoter from *Suaeda liaotungensis* K[J]. *Plant Cell Reports*,2008,**27**(3):585—592.
- [18] MUNDY J,CHUA N H. Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene[J]. *The European Molecular Biology Organization*,1988,**7**(8):2 279—2 286.
- [19] GANGULY M,DATTA K,ROYCHOUDHURY A,*et al.* Overexpression of *Rab16A* gene in indica rice variety for generating enhanced salt tolerance[J]. *Plant Signaling and Behavior*,2012,**7**(4):502—509.
- [20] ROYCHOUDHURY A,ROY C,SENGUPTA D N. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *Rab16A* gene from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress[J]. *Plant Cell Reports*,2007,**26**(10):1 839—1 859.
- [21] WU A M,HU J S,LIU J Y. Functional analysis of a cotton cellulose synthase A4 gene promoter in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Cell Reports*,2009,**28**(10):1 539—1 548.
- [22] GODA H,SAWA S,ASAMI T,*et al.* Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid regulated genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*,2004,**134**(4):1 555—1 573.
- [23] BANTIGNIES B,SEGUIN J,MUZAC I,*et al.* Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots [J]. *Plant Molecular Biology*,2000,**42**(6):871—881.
- [24] LIU J J,EKRAMODDOULLAH A K. Root-specific expression of a western white pine PRI0 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*,2003,**52**(1):103—120.
- [25] XU X B,GUO S,CHEN K,*et al.* A 796 bp *PsPR10* gene promoter fragment increased root-specific expression of the *GUS* reporter gene under the abiotic stresses and signal molecules in tobacco[J]. *Biotechnology Letters*,2010,**32**(10):1 533—1 539.
- [26] BIHMIDINE S,LIN J S,STONE J M,*et al.* Activity of the *Arabidopsis* RD29A and RD29B promoter elements in soybean under water stress[J]. *Planta*,2013,**237**(1):55—64.
- [27] 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.
- [28] KHURANA N,CHAUHAN H,KHURANA P. Wheat chloroplast targeted sHSP26 promoter confers heat and abiotic stress inducible expression in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Plos One*,2013,**8**(1):e54418.
- [29] KIM K Y,KWON S Y,LEE H S,*et al.* A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato;molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells[J]. *Plant Molecular Biology*,2003,**51**(6):831—838.
- [30] AHMAD R,KIM M D,BACK K H,*et al.* Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative,salt,and drought stresses[J]. *Plant Cell Reports*,2008,**27**(4):687—698.
- [31] AGARWAL M,HAO Y J,KAPOOR A,*et al.* A *R₂R₃* type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2006,**281**(49):37 636—37 645.
- [32] FERNANDEZ-CABALLERO C,ROSALES R,ROMERO I,*et al.* Unraveling the roles of *CBF1*,*CBF4* and dehydrin 1 genes in the response of table grapes to high CO₂ levels and low temperature[J]. *Journal of Plant Physiology*,2012,**169**(7):744—748.
- [33] LEE C M,THOMASHOW M F. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2012,**109**(37):15 054—15 059.
- [34] JIANG C H,XU J Y,ZHANG H,*et al.* A cytosolic class I small heat shock protein,RcHSP17. 8,of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*,yeast and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant,Cell and Environment*,2009,**32**(8):1 046—1 059.
- [35] MANAVELLA P A,DEZAR C A,ARIEL F D,*et al.* The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up-regulated in darkness, reducing the transcription of photosynthesis-related genes[J]. *Journal of Experimental Botany*,2008,**59**(11):3 143—3 155.
- [36] MANAVELLA P A,DEZAR C A,ARIEL F D,*et al.* Two ABREs,two redundant root-specific and one W-box *cis*-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2008,**46**(10):860—870.
- [37] GUTHA L R,REDDY A R. Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses,and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance[J]. *Plant Molecular Biology*,2008,**68**(6):533—555.
- [38] SRIVASTA A,MEHTA S,LINDLOF A,BHARGAVA S. Over-represented promoter motifs in abiotic stress-induced DREB genes of rice and sorghum and their probable role in regulation of gene expression[J]. *Plant Signaling and Behavior*,2010,**5**(7):775—784.
- [39] YADAV D K,SHUKLA D,TUTEJA N. Rice heterotrimeric G-protein alpha subunit (RGA1): In silico analysis of the gene and promoter and its up regulation under abiotic stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2013,**63**:262—271.
- [40] LI J,LI M J,LIANG D,*et al.* Expression patterns and promoter characteristics of the gene encoding *Actinidia deliciosa* L-galactose-1-phosphate phosphatase involved in the response to light and abiotic stresses[J]. *Molecular Biology Reports*,2013,**40**(2):1 473—1 485.
- [41] SUN Q H,GAO F,ZHAO L,*et al.* Identification of a new 130 bp *cis*-acting element in the *TsVP1* promoter involved in the salt stress re-

- sponse from *Thellungiella halophila*[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, **10**(90): 1 471—2 229.
- [42] XIAO B Z, HUANG Y M, TANG N, *et al.* Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the wild conditions [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, **115**(1): 35—46.
- [43] 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.
- [44] MARCOTTE W R JR, RUSSELL S H, QUATRANO R S. Absciscic acid responsive sequences from the *em* gene of wheat[J]. *The Plant Cell*, 1989, **1**(10): 969—976.
- [45] ZAHUR M, MAQBOOL A, IRFAN M, *et al.* Functional analysis of cotton small heat shock protein promoter region in response to abiotic stresses in tobacco using *Agrobacterium*-mediated transient assay[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, **36**(7): 1 915—1 921.
- [46] SCHARF K D, SIDDIQUE M, VIERLING E. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins)[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2001, **6**(3): 225—237.
- [47] ZHANG X, HU Y H, JIANG C H, *et al.* Isolation of the Chinese rose *sHSP* gene promoter and its differential regulation analysis in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(2): 1 145—1 151.
- [48] 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]. *Molecular General Genetics*, 1993, **236**(2—3): 331—340.
- [49] 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.
- [50] 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[J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 1997, **94**(3): 1 035—1 040.
- [51] AGARWAL P K, AGARWAL R, REDDY M K, SOPORY S K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, **25**(12): 1 263—1 274.
- [52] LI M, WANG X H, CAO Y, *et al.* Strength comparison between cold-inducible promoters of *Arabidopsis cor15a* and *cor15b* genes in potato and tobacco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, **71**: 77—86.
- [53] GEOFFROY V, DUCY P, KARSENTY. A PEBP2a/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific *cis*-acting element[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**(52): 30 973—30 979.
- [54] COMB M, GOODMAN H M. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(13): 3 975—3 982.
- [55] LI W(李伟), HAN L(韩蕾), QIAN Y Q(钱永强), *et al.* Bioinformatics analysis of abiotic stress related NAC transcription factors [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, **32**(3): 454—464 (in Chinese).
- [56] SCHMID C D, PRAZ V, DELORENZI M, *et al.* The eukaryotic promoter database EPD; the impact of *in silico* primer extension[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**(1): D82—D85.
- [57] KOLCHANOV N A, LGNATIEVA E V, ANANKO E A, *et al.* Transcription regulatory regions database (TRRD): its status in 2002 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(1): 312—317.
- [58] MATYS V, FRICKE E, GEFERS R, *et al.* TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(1): 374—378.
- [59] HIGO K, UGAWA Y, LWAMOTO M, KORENAGA T. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database; 1999[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(1): 297—300.
- [60] ROMBAUTS S, DEHAIS P, MONTAGU M V, ROUZE P. PlantCARE: A plant *cis*-acting regulatory element database[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(1): 295—296.
- [61] MA S, BACHAN S, PORTO M, *et al.* Discovery of stress responsive DNA regulatory motifs in *Arabidopsis*[J]. *Plos One*, 2012, **7**(8): e43198.
- [62] JOHANSEN L K, CARRINGTON J C. Silencing on the spot, induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system[J]. *Plant Physiology*, 2001, **126**(3): 930—938.
- [63] MOLLOY P L. Electrophoretic mobility shift assays[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2000, **130**: 235—246.
- [64] GALAS D J, SCHMITZ A. DNAase footprinting a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity[J]. *Nucleic Acids Research*, 1978, **5**(9): 3 157—3 170.
- [65] LI J J, HERSKOWITZ I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system[J]. *Science*, 1993, **262**(5 141): 1 870—1 874.
- [66] BRANDALISE M, SEVERINO F E, MALUF M P, MAIA I G. The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, **28**(11): 1 699—1 708.