

德達松乾旱誘導基因 *lp3* 之所在位置 與生理機制分析

王昭泰*

興國管理學院資訊管理系專任助理教授

摘 要

LP3 是一種與 ASR(離層酸 ABA, 逆境 Stress 與果實成熟 Ripening)蛋白類似的乾旱誘導的蛋白質。它與 ASR 假設性蛋白的相似度, C 端比 N 端來得高。本研究的目的是在研究 LP3 蛋白質的功能及 *lp3* 啟動子對水分逆境及其他逆境所產生的反應。 β -葡糖醛酸糖酶基因(*uidA*, GUS)在繼代的轉基因煙草(T_0)的表現上, 以 *lp3* 啟動子-GUS 基因的質體構築下, 使用聚乙二醇(PEG)、離層酸(ABA)、甲基茉莉酸鹽(MeJa)及離層酸的抑制劑 fluridione(Flu)進行檢測。GUS 基因表現實驗中發現激勃素(GA_3)、二氯苯氧乙酸(2,4-D)、硝酸銀、益收生長素(ethephon; 乙烯釋放劑)等, 處理後發現, GUS 基因沒有反應。含有 *lp3* 啟動子-GUS 基因的質體構築的 T_1 幼苗, 在種子發芽後, 約表現 40 天的 GUS 活性(40 天後就失去活性)。當 5-azacytidine (DNA 甲基化抑制劑)加入培養基內, GUS 基因活性又會恢復, 顯示煙草發育性的調節機制與基因的靜默, 包含基因的甲基化。在轉基因煙草的研究中, LP3 蛋白位於細胞核內, 受到乾旱的誘導, 並且顯示受到植物發育的影響調節。

關鍵字：煙草；乾旱逆境 (WDS)；離層酸(ABA)；聚乙二醇(PEG)；離層酸的抑制劑 fluridione；*lp3* 基因；甲基化；ASR(離層酸 ABA, 逆境 Stress 與果實成熟 Ripening)。

*通訊作者. Tel: 04-22299889

E-mail: jautay.wang@msa.hinet.net

壹、緒論：

乾旱逆境是影響木本植物生存的主要因素。*lp3* 基因 (Padamanabhan 等, 1997), 是從德達松根部中分離出這個基因, 並確認此基因是一個小基因家族的一員 (Padamanabhan, 1996)。在信息 RNA 改變的層次上, *lp3* 基因反應了基因轉錄上的活化, 這在大部分的乾旱誘導基因上是很常見的現象 (Bray, 1996; Ingram 及 Bartels, 1996)。*lp3* 基因在自身基因表現最多的地方在根部, 莖部較少, 針葉上非常少, 甚至沒有表現 (Padamanabhan, 1996)。*lp3* 基因的編碼區與 *Asr* 基因(離層酸 ABA, 逆境 Stress 與果實成熟 Ripening, Isuem 等, 1993) 在 C 端有 85% 的相似度, 但是在 N 端較低。LP3 與 *Asr* 蛋白的蛋白質排序上顯示, 兩者有很高的相似度(在胺基酸層次上有 60-72% 的相似度), 說明 *lp3* 基因可能是 *Asr* 基因家族的一員。而且在 LP3 蛋白假設性序列的 C 端上, 含有雙邊的細胞核標靶信號, KKESKEEEKEAEGKKHHH (Varagona 等, 1992)。

lp3 啟動子區已經被定序了 (Padamanabhan, 1996), 數個反應單元已被發現, 例如離層酸反應單元 (Bray, 1996), CaMV 根反應單元 (Katagiri 等, 1989), 激勃素反應單元 (Gubler 與 Jabocsen, 1992), 甲基茉莉酸鹽反應單元 (Rouster 等, 1997), Opaque-2 反應單元 (Varagona 等, 1992), 及 *rd22* 反應單元 (Iwasaki 等, 1995) 等。離層酸是一種與調節果實成熟及乾旱狀況的植物荷爾蒙 (Rossi 等, 1996), 同是植物荷爾蒙的乙

烯在果實成熟上同樣也扮演了重要的角色 (Agar 等, 2000)。Fluridione 是離層酸合成的抑制劑 (Sprecher 等, 1998), 而硝酸銀是乙烯反應的抑制劑 (Kong 與 Yeung, 1995)。茉莉酸鹽 (JA) 與它的甲基酯, 甲基茉莉酸鹽 (MeJa) 受到離層酸的影響, 進而影響許多生理與發育上的過程, 包含乾旱反應, 果實成熟與植物防禦 (Harms 等, 1995) 及許多離層酸傳導通道內中間物質的功能 (Chao 等, 1999)。基因轉殖的煙草含有 *lp3* 啟動子及 β -葡糖醛酸糖酶基因 (*uidA*, GUS) 構築, 在組織培養的情況下, 以離層酸、fluridione、乙烯、硝酸銀、甲基茉莉酸鹽、激勃素、細胞分裂激素 (kinetin) 及二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 等, 處理後觀察基因的表現。在此研究中, 基因的靜默現象也有可能是影響基因表現的因子之一 (Prakash 與 Kumar, 1997)。

貳、材料與方法：

(一) 啟動子及 β -葡糖醛酸糖酶基因的構築

lp3 啟動子 (1 kb) 連接上質體 pBI221 之內 (Clontech, Palo Alto, CA)。構築後的質體 pBI221LP3GUS 以酵素 *Hind*III 與 *Xba*I 再克隆到複合載體之質體 pBI101.3 (Clontech, Palo Alto, CA) 的 *Hind*III 與 *Xba*I 切位中, 其中包含大腸桿菌基因, β -葡糖醛酸糖酶基因 (*uidA*, GUS) (Jefferson, 1987) 及 *nptII* 卡那黴素抵抗基因。最後的質體 pGILP3(P), 包含 *lp3* 啟動子的序

列，在轉錄調控的研究上，接上 GUS 基因，用來檢測 *lp3* 基因的表現。在 LP3 蛋白的定位上，質體 pBI121(I)包含了 CAMV35S 啟動子及 GUS 基因，並以酵素 *HindIII* 消化。*uidA* 基因再克隆進入質體 pBI221LP3GUS 的 *HindIII* 切位中，此質體包含之前研究的 cDNA 及 CAMV35S 啟動子 (Padamanabhan, 1996)。最終質體 pGILP3 包含了 CAMV35S 啟動子、*lp3* 的 cDNA、GUS 基因以及可篩選的標示基因 *nptII*。農桿菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 LBA4404 (Horsh 等, 1985) 將用來作植物基因轉殖。

(二) 植物材料與組織培養環境

煙草 (*Nicotiana tabacum* L. "Havana") 種子經過表面消毒後，在 MS 培養基 (Murashige 與 Skoog, 1962)，一天 16 小時光照，27°C 室溫下經過 2 週。當幼苗兩週大，把它們轉移到內含有 MS 培養基的 400ml 的大廣口瓶中。當幼苗長到約 20 公分高，葉片被採收，葉子切成小片，與含有質體 pGILP3(P) 的農桿菌菌株 LBA4404，於 MS 培養基中共同培養 48 小時 (Horsh 等, 1985)。葉子切片轉移到再生培養基，內含有 MS 鹽類、維他命、30g/l 蔗糖、8 g/l 洋菜、0.1 mg/l 2,4-D、0.1 mg/l 苯基氨基嘌呤 (BA, benzyl aminopurine) 及 Clavamox (amoxicillin + clavunate Smith Cline Beecham Veterinary)，pH 值 5.7，以除去農桿菌的感染 (Gould 與 Magalanes-Cedeno, 1999)。組織培養的植物每週轉移到新的培養基直到新的芽長出來，然後轉移到不含荷爾蒙的

MS 培養基 (MS 鹽類、30 g/l 蔗糖、8 g/l 洋菜、pH 值 5.7 加上卡那黴素及 Clavamox 如上述)，再生出有根的植物。

溼地松 (*Pinus elliottii* Engelm) 胚發育的癒傷組織，是從合子胚誘導的 (種子取得自德州農業部)，培養於 DCR 培養基中 (Gupta 與 Durzan, 1987)，內含 10 μ M BA、10 μ M 2,4-D 及 8 g/l 洋菜，pH 值 5.7 (Sarjala 等, 1997)。胚發育的癒傷組織培養於液體懸浮 DCR 培養基的錐形瓶中，以 50 rpm (Lab-Line Shaker) (Gupta 等, 1985) 搖晃。在 DCR 培養基裡連續培養 2 週，將細胞懸浮液分成數等份，倒入消毒後的濾紙中，濾紙置於接上真空幫浦的漏斗中。在微粒子轟炸的前一天，將留在濾紙上的懸浮細胞及濾紙，轉移到 MS 培養基上。

將洋蔥球莖切成 2 吋大小見方，放入 20% 的漂白水消毒 10 分鐘，然後以無菌水漂洗三次。在微粒子轟炸前一天，取下內表皮，置於 MS 培養基上一個晚上。

(三) 發育分析

含有質體 pGILP3(P) 的 T₀ 與 T₁ 世代的轉基因煙草 (Wang 等, 2004)，在 MS/卡那黴素培養基裡發芽，在發芽後 10 天，20 天，30 天，40 天，60 天，80 天，100 天加以收穫。T₀ 後代讓它開花結子。幼苗即植物組織收穫後，立即以 GUS 組織化學染色法 (Jefferson, 1987) 檢測 GUS 活性。

(四) 逆境與荷爾蒙處理

帶有質體 pGILP3(P) 的 T₀ 與 T₁ 世代的轉基因煙草 (Wang 等, 2004)，具有 *lp3* 啟動子及 GUS 基因，置於含有 50 mg/l 卡那黴素的 MS 培養基中培養。再生後代讓

它開花結子 (T_1)。存活下來的幼苗 (T_1) 在 5 公分高的時候，轉移到含有 MS/卡那黴素培養基的 400ml 廣口瓶中。3 週後，幼苗約 15-20 公分高，轉移到 MS/卡那黴素培養基中，並以下列方式處理：10%聚乙二醇 (分子量 6000) 在高溫滅菌前加入培養基；5 μ M 離層酸；100 μ g/l fluridone 及 30 μ M 的激勃素，細胞分裂激素與 2,4-D。硝酸銀則使用 100 μ M 的濃度 (Kong 與 Yeung, 1995)。煙草從培養基轉移到土壤，先在溫室中進行 2 週的適應。益收生長素 (ethephon；乙烯釋放劑) 處理的植物以 35 μ M 加以噴灑 (Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC) (Shatter 等, 1998)。控制組則以水噴灑 (總容量=250ml)。每天噴灑，持續 2 個星期，然後採收進行 GUS 活性檢測。

(五) 5-azacytidine (5azaC) 處理

5-azacytidine (DNA 甲基化抑制劑) 是模擬胞嘧啶 (cytidine)，用於在動物及植物中減少甲基化酶的活性 (McInerney 等, 2000)，及抑制 DNA 甲基化 (Prakash 與 Kumar, 1997)。將 5azaC 消毒在 MS 培養基加熱消毒後讓未完全冷卻時加入。轉基因煙草的 T_1 種子具有 *lp3* 啟動子：GUS 之構築 pGILP3(P)，在 MS/卡那黴素培養基或是 MS/卡那黴素培養基含有 25 μ M 5azaC。一個月後，幼苗栽培於，有/無 5azaC 的 400ml 廣口瓶中，沒有添加卡那黴素。再一個月後 (發芽後 80 天)，採收植物，分析其 GUS 活性。

(六) 短暫轉殖：細胞核之標位

洋蔥表皮細胞與溼地松懸浮細胞使用複合的 *lp3* cDNA 及 GUS 基因以 CaMV35S 啟動子驅動，以微粒子轟炸法

進行轉殖 (Oard 等 1990)。在短暫轉殖研究上，依照製造廠商指示來準備黃金粒子 (Biolistic Delivery System, PDS-1000, E.I. du Pont de Nemours & Co. Biotechnology Systems Division, Wilmington, DE)。粒子上包覆 DNA (pBILP3)，以氬氣推動粒子，打入洋蔥表皮與溼地松懸浮細胞內。真空室內氣壓為負 25 汞柱，氬氣壓力為 1000psi，小薄膜承受的壓力為 650psi。在粒子轟炸後，植物細胞被置於室溫培養一個晚上，以供 GUS 分析。GUS 分析使用 5-bromo-4-chloro-3-indoyl glucuronide (X-Gluc)，如 Jefferson (1987) 所述。

參、結果

(一) LP3 蛋白質在細胞內部的位置

從質體 pBILP3 與 GUS 的短暫表現上，包含以 CaMV35S 啟動子驅動的 *lp3* 的 cDNA 與 GUS 基因，被發現 LP3 蛋白位於洋蔥表皮的細胞核上 (圖 1A, 1B)，濕地松懸浮細胞的細胞核上 (圖 1C, 1D)，及煙草幼苗的根毛細胞核上 (圖 1E, 1F)，但是並不在控制組植物的細胞核上。

(二) 乾旱逆境、植物生長控制劑之處理與表現

LP3 基因在 *lp3* 啟動子 pBILP3 在發育上的表現，研究了兩個世代：初代轉殖 (T_0) 及這些植物的第一代後代 (T_1)。再生繁殖了獨立的 5-10 個基因轉殖後代系 (T_0)。*lp3* 啟動子在非逆境下 T_0 的表現，強烈的表現在根部分生組織，芽分生組織，葉柄外的葉片組織，葉部絨毛，根毛，莖及發育中花芽的雌蕊 (圖 2A)，發育中

的子房與胚（種子）（圖 2B），胎座與發育中的種子（圖 2C）。在 T_1 世代，只有在種子發芽與早期幼苗建立的時期，約發芽後 40-60 天以前的時間，可到基因表現。

T_0 世代的轉基因煙草包含了 *lp3* 啟動子與 GUS 基因構築（pBILP3），栽培於生長室組織培養的狀況下。實驗植物均包含實驗組與控制組。聚乙烯甘油用來模擬煙草遭遇乾旱逆境的反應，其他處理，如離層酸、fluridone、甲基茉莉酸鹽、激勃素、paclobutrazol，一種激勃素合成抑制劑、2,4-D、細胞分裂激素及硝酸銀，乙烯合成的抑制劑。同一殖系的植物，在溫室中也受到益收生長素（ethephon，乙烯發生劑）處理。GUS 表現在乾旱逆境處理的情況下觀察（圖 2D），及單獨以 fluridone（圖 2E），離層酸（圖 2F），甲基茉莉酸鹽（圖 2F）等處理。然而，控制組葉片，GUS 表現僅發生於葉部絨毛（圖 2F）。GUS 表現在外源離層酸及甲基茉莉酸鹽比聚乙烯甘油或 fluridone 處理來得弱。離層酸及甲基茉莉酸鹽在葉部絨毛，葉片，根部維管束組織及根尖上，顯示中等到低度的表現。

（三）發育上的表現模式

在發芽後 20 天的試驗中，使用 T_1 煙草種苗群，表現的部位屬於，葉部中肋（圖 3A），葉部絨毛（圖 3B），根部維管束組織系統（圖 3C）及根尖（圖 3D）。在發芽後 10-20 天時表現最強，發芽後 30-40 天有弱化的跡象。GUS 基因表現，在發芽後 60 天完全關閉及消失。花及其他繁殖構造沒有發現 GUS 基因表現。這種基因靜默的現象，只發現在 T_1 世代的煙草上，而沒有在 T_0 世代，整體上來說，在 T_1 世代的 GUS 基因表現，比在 T_0 世代的表現來得弱。*lp3*

啟動子與 GUS 基因兩者或其中之一的甲基化，懷疑造成了基因的靜默現象。

（四）基因靜默

為了測試甲基化的假說是造成發育上的靜默現象， T_1 種子在含有 5-azaC 的培養基上發芽，它可防止基因的甲基化。在含有 5-azaC 的培養基中，發芽後 80 天幼苗上，GUS 基因持續的表現在根、莖及葉上，反之，在未處理的幼苗基因表現則下降（圖 4）。結果中暗示 *lp3* 啟動子或是 GUS 基因的甲基化，是造成轉基因植物靜默現象的原因。

肆、討論

（一）LP3 蛋白質在細胞核內的所在位置

將 *lp3* 的 cDNA 排列在基因庫中，假設性 LP3 蛋白是高度親水性的蛋白質，它的 pI 值為 5.88（Padamanabhan，1996）。此蛋白也被認為是細胞核標靶蛋白，因為它有假設性的雙邊細胞核標靶信號，以及在 C 端有 α -螺旋的信號。因為德達松非常難以轉殖及繁殖，*lp3* 啟動子與蛋白質的研究，以短暫表現法與穩定表現法來設計。相似的溼地松懸浮細胞與異質的洋蔥表皮細胞被用來研究基因的短暫表現。異種間的轉基因煙草被用來穩定基因轉殖，整合後，基因的表現。LP3 蛋白質的位置，從洋蔥表皮細胞的短暫表現中觀察到，是位於細胞核的位置（圖 1A，1B），同樣被觀察到，在溼地松合子胚發生癒傷細胞的懸浮培養細胞上（圖 1C，1D），及穩定轉殖的煙草細胞上（圖 1E，1F）。

（二）與 ASR 基因之相似性

在蕃茄上，ASR1 基因與 LP3 基因很

相似，它位於細胞核，受到離層酸、乾旱逆境及果實成熟過程所誘導（Rossi 等，1996）。在此研究中，LP3 蛋白位於細胞核內，*lp3* 啟動子也被離層酸，乾旱逆境，甲基茉莉酸鹽及 fluridone 所誘導。

（三）在 *lp3* 啟動子上假設性的調節性片段

lp3 啟動子區域已經被定序了（Padamanabhan, 1996），其中包含了許多假設性的調節片段，如離層酸（Bray, 1993），CaMV（Katagiri 等，1989），激勃素（Gubler 與 Jacobsen, 1992），Opaque-2（Varagona 等，1992；Vincentz 等，1997），rd22（Iwasaki 等，1995），甲基茉莉酸（Rouster 等，1997）。根據這些資訊，基因表現應該與離層酸、乾旱逆境、激勃素及甲基茉莉酸處理有關；然而，這些假設性片段的功能仍然不清楚。乙烯是一種與逆境有關的植物荷爾蒙。在這研究中，轉基因的煙草幼苗以益收生長素處理，但是並沒有誘導基因表現。以激勃素，2,4-D，細胞分裂激素或硝酸銀處理也同樣沒有反應。結果是可以預期的，因為與生長素或乙烯相關的反應片段並沒有在 *lp3* 啟動子的序列上發現。雖然有發現激勃素的反應片段，但是激勃素並不能誘導 *lp3* 基因表現。

（四）離層酸與甲基茉莉酸鹽

離層酸與甲基茉莉酸鹽處理能夠誘導轉基因煙草 T_0 基因表現。以甲基茉莉酸鹽處理後，基因表現的模式與以離層酸處理的表現很類似。甲基茉莉酸鹽與茉莉酸鹽被認為是參與植物在調節對逆境與抵抗外界環境時，訊息傳導通道中的重要因子。這些荷爾蒙也與植物果實成熟有關

（Harms 等，1997；Wang, 1999）。甲基茉莉酸鹽與茉莉酸鹽是植物油脂類合成時的衍生物，是從 α -linoenic acid（ α -亞麻油酸）合成，透過脂氧合成酶而來的。甲基茉莉酸鹽被發現能夠影響改變氧離子捕捉的能力及細胞膜脂類的構成（Wang, 1999），讓植物能忍受水分逆境。

（五）水分逆境與 Fluridone

轉基因煙草的短暫的基因表現，*lp3* 啟動子受到乾旱逆境及外來離層酸的影響。有趣的是，fluridone 也能誘導基因表現。這結果是出乎預期，因為 ABA 誘導的基因尚未有報導會對 fluridone 產生反應。Fluridone 是離層酸反應的抑制劑。聚乙烯甘油處理的煙草，在葉片上產生白化褪色的現象，與 fluridone 處理時產生的白化現象很類似。兩種處理都在白化葉子的區域，誘導了高度的基因表現。為什麼會有這種反應，目前還不清楚原因；然而，葉片產生的光氧化反應產生的信號，可能 *lp3* 基因對此產生反應。可能甲基茉莉酸鹽在此反應中扮演了一個角色。乾旱逆境會誘導植物產生內源性離層酸，然而 fluridone 抑制離層酸的生物合成，同時也影響了胡蘿蔔素生產徑路（Doong 等 1993）。假設離層酸在植物合成有其他替代徑路，那離層酸可能成為在 fluridone 處理植物產生基因表現的原因。然而，fluridone 處理植物並非乾旱逆境，fluridone 也未曾有報告能促進離層酸誘導基因在煙草上表現。

（六）靜默現象

在研究中，煙草具有 *lp3*-啟動子-GUS 構築，基因轉殖的 T_1 世代，表現出靜默的模式是幼苗網成熟階段時，基因表現停

止。事實上，在發芽後 40 天以後，基因表現幾乎趨近於零（圖 4）；然而，如果培養基內含有 5-azaC，在發芽後 80 天，基因仍然有表現，此意味靜默現象是因為 DNA 的甲基化。5-azaC 是與胞嘧啶類似，用來減低動植物系統甲基轉移酶的活性（McInerney 等，2000）及抑制 DNA 的甲基化（Prakash 與 Kumar，1997）。基因靜默現象在轉基因植物上，有許多的原因，但是最常見的型態是轉錄的靜默，轉殖基因啟動子被甲基化所造成的（Fagard 與 Vaucheret，2000）。基因編碼區的甲基化，GUS 也會發生，大部分屬於轉錄後的靜默。不幸地，轉錄的靜默是會遺傳的，然而，轉錄後的靜默可以在下一代扭轉回來（Fagard 與 Vaucheret，2000）。當甲基化是靜默的原因時，5-azaC 這種藥劑可用來防止靜默。Kovarík，等（2000），使用於轉基因煙草觀察到，位於非對稱的 3'，轉基因 *nptII* 的非轉譯區，甲基胞嘧啶減少了 30%。甲基化減少，伴隨著 NPTII 蛋白質總量，增加了 12 倍，意味著基因甲基化可能增加了基因靜默現象的程度。在轉基因的萵苣上，McCabe 等（1999）也發現 GUS 與 NPTII 的不同的 T_0 親代與 T_1 子代之間，蛋白質的含量差異有 50 與 16 倍不等。利用 5-azaC，將部份靜默的轉基因表現再活化，顯示基因表現的低下與基因甲基化有關。

伍、總結

結論上，LP3 蛋白顯然是以細胞核為標靶的蛋白。LP3 蛋白的生理功能，可能是在乾旱的時期，保護細胞核內物質，防

止乾燥，但是也有可能涉及與調控有關。LP3 蛋白質在構造上與 ASR 基因家族很相似，此基因在種子發育，成熟與發芽時很活躍。LP3 基因可以被聚乙二醇、甲基茉莉酸鹽、離層酸與 fluridone 所誘導，但是不會被細胞分裂激素、激勃素、2,4-D、乙烯或硝酸銀所誘導。Fluridone 會誘導 *lp3* 基因表現，但是原因仍然不明。*lp3* 啟動子-GUS 的構築，在煙草 T_1 子代發芽後 40-60 天後，基因表現會完全靜默，也無法再恢復了。 T_1 種子在含有 5-azaC 的培養基中發芽，可以防止基因的靜默，意味著靜默現象可能是 DNA 甲基化所引起的。

陸、參考文獻

- Agar IT, Biasi WV, Mitcham E, (2000) Cold storage duration influences ethylene biosynthesis and ripening of 'Barlett' pears, Hortscience, 35, 687-690.
- Bray EA, (1993) Molecular responses to water deficit, Plant Physiology, 103, 1035-1040.
- Chao WS, Gu Y-Q, Pautot V, Bray EA, Walling LL, (1999) Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid, Plant Physiology, 120, 979-992.
- Doong RL, MacDonald GE, Shilling DG, (1993) Effect of fluridone on chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content of *Hydrilla*., Journal Aquatic Plant Management, 31, 55-59.

- Fagard M, Vaucheret H, (2000) (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms?, Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology, 51, 167-194.
- Gould JH, Magallanes-Cedeno ME, (1999) Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation., Plant Molecular Biology Reporter, 16, 283-293.
- Gubler F, Jacobsen D, (1992) Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-PI alpha amylase gene., Plant Cell 11, 1435-1441.
- Gupta PK, Durzan DJ, (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*), Plant Cell Report, 4, 177-179.
- Harms K, Atzorn R, Brash A, Kuhn H, Wasternack C, Willmitzer L, Pena-Cortes H, (1995) Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes, Plant Cell, 7, 1645-1654.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT, (1985) A simple and general method for transferring genes into plants, Science, 227, 1229-1231.
- Ingram J, Bartels D, (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants, Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology, 47, 377-403.
- Isum ND, Bartholomew DM, Hitz WM, Scolnik PA, (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening, Plant Physiology, 102, 1353-1354.
- Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, (1995) Identification of cis-regulatory region of gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis, Molecular General Genetics, 247, 391-398.
- Jefferson RA, (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system, Plant Molecular Biology Reporter, 5, 387-405.
- Katagiri T, Lam E, Chua NE, (1989) Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB, Nature, 340, 727-730.
- Kong L, Yeung EC, (1995) Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content, Physiology Plant, 93, 298-304.
- Kovarik A, Van Houdt H, Holy A, Depicker A, (2000) Drug-induced hypomethylation of a posttranscriptionally silenced transgene locus of tobacco leads to partial release of silencing, FEBS Letters,

- 467, 47-51.
- McCabe MS, Mohapatra UB, Debnath SC, Power JB, Davey MR, (1999) Integration, expression and inheritance of two linked T-DNA marker genes in transgenic lettuce, *Molecular Breeding* 5, 329-344.
- McInerney JM, Nawrocki JR, Lowrey CH, Long-term (2000) silencing of retroviral vectors is resistant to reversal by trichostatin A and 5-azacytidine, *Gene Therapy*, 7, 653-663.
- Murashige T, Skoog FA, (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Oard JH, Paigie DF, Simond JA, Gardziei TM, (1990) Transient gene expression in maize, rice and wheat cells using an airgun apparatus, *Plant Physiology*, 92, 334-339.
- Padmanabhan V, (1996) Isolation and expression analysis of genes induced by water deficit stress in loblolly pine (*Pinus taeda* L.), PhD. Dissertation Texas A&M University College Station, 144.
- Padmanabhan V, (1997) Dias DMAL, Newton RJ, Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress, *Plant Mol Biology*, 35, 801-807.
- Prakash AP, Kumar PP, (1997) Inhibition of shoot induction by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in *Petunia* involves DNA hypomethylation, *Plant Cell Reports*, 16, 719-724.
- Rossi M, Lijavetzky D, Bernacchi D, Hopp HE, Iusem N, (1996) *Asr* genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato, *Molecular General Genetics*, 252, 489-492.
- Rossi M, Carrari F, Cabrera-Ponce JL, Vazquez-Rovare C, Herrera-Estella L, Gudesblatt G, Iusem ND, (1998) Analysis of an abscisic (ABA)-responsive gene promoter belonging to *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems, *Molecular General Genetics*, 258, 1-8.
- Rouster J, Leah R, Mundy J, Cameron-Mills V, (1997) Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain, *Plant Journal*, 11, 513-523.
- Sarjala T, Häggman H, Aronen T, (1997) Effect of exogenous polyamines and inhibitors of polyamine biosynthesis on growth and free polyamine contents of embryogenic scots pine callus, *Journal Plant Physiology*, 150, 597-602.
- Shatter RG, Wheeler R, West SH, (1998) Ethephon induced changes in vegetative growth of 'Tifton 85' Bermudagrass, *Crop Science*, 38, 97-103.
- Sprecher SL, Netherland MD, Stewart AB, (1998) Phytoene and carotene re-

- sponse of aquatic plants to fluridone under laboratory conditions, *Journal Aquatic Plant Management*, 36, 111-120.
- Varagona MJ, Schmidt RJ, Raikhel NV, (1992) Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein opaque-2, *Plant Cell*, 4, 1213-1227.
- Vincentz M, Leite A, Neshich G, Vriend G, Mattar C, Barros L, Weinburg D, de Almeida ER, de Carvalho MP, Aragão F, Gander ES, (1997) ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognized by the opaque-2 regulatory protein. *Plant Molecular Biology*, 34, 879-889.
- Wang J-T, Gould HJ, Padmanabhan Veera, and Newton RJ, (2004) Deletion and Characterization of the Water-Deficit-Stress Induced *lp3* Promoter from Loblolly Pine, *Journal of Hsing Kuo University of Management* 3, 69-86.
- Wang SY, (1999) Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry, *Journal Plant Growth Regulation*, 18, 127-134.

Analysis And Localization of the Water-Deficit Stress-Induced Gene (*lp3*)

Jau-Tay Wang

Assistant Professor of Department of Information Management,
Hsing Kuo University of Management

Abstract

LP3 is a water-deficit-induced protein, which is highly homologous to ASR (ABA, stress and ripening) proteins. Homology was found in the C-terminal region of the putative LP3 protein while lower homologies were found in the N-terminal region. The goal of this study was to investigate the function of the LP3 protein and the mechanism of the *lp3* promoter in response to water-deficit stress (WDS) and other stresses. In regenerated transgenic tobacco (T_0), expression of b-glucuronidase (GUS) from the *lp3* promoter-GUS construct was observed in polyethylene glycol (PEG), abscisic acid (ABA), methyl-jasmonate (MeJa), and fluridone (Flu) treatments. GUS expression was not observed following gibberellin (GA_3), 2-methyl-4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), silver nitrate, or ethephon (ethylene releasing agent) treatments. Germinated T_1 seedlings containing the *lp3* promoter-GUS construct exhibited GUS activity up to 40 days postgermination. Expression could be restored when 5-azacytidine was included in the culture media, indicative of a developmentally regulated silencing mechanism involving methylation. In transgenic tobacco, the LP3 protein localized in the cell nucleus was induced by WDS and appeared to be developmentally regulated.

Keywords : Tobacco, Water-deficit stress (WDS), Absciscic acid (ABA), Polyethylene glycol (PEG), Fluridone, *lp3* gene, Methylation, ASR(ABA, Stress and Ripening).