

东乡野生稻及其渐渗系应答低磷胁迫的基因差异表达分析

罗向东, 赵俊, 戴亮芳, 温秀芳, 刘李珠, 张帆涛, 谢建坤*

(江西师范大学 生命科学学院, 南昌 330022)

摘要:以东乡野生稻耐低磷渐渗系 IL171 及其双亲(栽培稻‘协青早 B’和东乡野生稻)为试材, 采用 cDNA-AFLP 技术分析其幼苗期应答低磷胁迫的差异表达谱特征, 并采用实时荧光定量 PCR 分析验证差异表达基因的表达特性, 为探究东乡野生稻耐低磷胁迫的分子机制、发掘耐低磷相关的基因奠定基础。结果显示: (1) 基于 17 对扩增效果较好的 cDNA-AFLP 引物分析发现, 不同胁迫时间的参试材料与其对照组(正常磷水平)相比, 具有很多(20~159 个)上调或下调表达的差异片段。(2) 与‘协青早 B’相比, IL171 中特异性上调的差异带有 36 条, 下调表达 61 条, 而东乡野生稻中分别有 79 条和 136 条; IL171 与东乡野生稻共有的上调差异带为 13 条, 下调差异带有 15 条。(3) 回收纯化其中 60 条特异性差异表达条带, 最终克隆测序获得 50 个差异表达基因片段 TDFs; 通过 Blast 比对和功能分析, 可将 TDFs 分为 8 类, 包括能量与代谢、基因表达调控、信号转导和转录因子等。(4) 实时荧光定量 PCR 验证其中 6 个 TDFs 发现, 各差异片段的荧光定量 PCR 表达模式与 cDNA-AFLP 结果一致, 表明该实验的 cDNA-AFLP 差异表达结果可靠, 东乡野生稻的部分耐低磷相关基因已成功导入到渐渗系中, 是发掘利用东乡野生稻耐低磷相关基因、探究其耐低磷分子机制的重要资源。

关键词: 东乡野生稻; 低磷胁迫; cDNA-AFLP; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Analysis of Differential Expression Genes in Dongxiang Wild Rice and Its Introgression Lines under Phosphorus-deficiency Stress

LUO Xiangdong, ZHAO Jun, DAI Liangfang, WEN Xiufang,

LIU Lizhu, ZHANG Fantao, XIE Jiankun*

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: In the present study, the phosphorus-deficiency tolerance introgression line IL171 and its parents (*Oryza sativa* cv. ‘Xieqingzao B’ and Dongxiang wild rice) were used to investigate the differential expression genes at early seedling stage by cDNA-AFLP technique under the phosphorus-deficiency stress condition. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to verify the differentially expressed genes. (1) cDNA-AFLP analysis revealed that numerous cDNA fragments (20–159) were obtained in each material under the phosphorus-deficiency condition compared to the control (normal phosphorus level). (2) Compared with ‘Xieqingzao B’, 36 and 61 cDNA fragments were differentially up- and down-regulated in IL171, respectively. In Dongxiang wild rice line, 79 and 136 cDNA fragments were differentially up- and down-regu-

收稿日期: 2015-09-25; **修改稿收到日期:** 2015-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(31260255); 江西省教育厅科技计划(GJJ12184); 江西省科技支撑计划(20122BBF60064); 江西省青年科学家培养计划(20112BCB23007)

作者简介: 罗向东(1976—), 博士, 教授, 主要从事植物遗传与分子生物学研究。E-mail: xdluolf@163.com

* 通信作者: 谢建坤, 博士, 教授, 主要从事植物遗传与分子生物学研究。E-mail: xiejiankun@yahoo.com

lated, respectively. Further analysis showed that IL171 and Dongxiang wild rice shared the same expression pattern at 13 up-regulated loci and 15 down-regulated loci. (3) Among the 60 recovered and sequenced TDFs (transcript-derived fragments), 50 of them were obtained and their functions were determined through Blast search against the RAP-DB database. The functions of them were grouped into eight classes, including energy and metabolism, regulating genes, signal transduction and transcription factors et al. (4) Six above functional genes were subjected to real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) analysis which was all in agreement with those of the cDNA-AFLP analysis, confirming that cDNA-AFLP was reliable in detecting differentially expressed genes involved in responding to the phosphorus-deficiency stress. The results in this study suggested that partial alien DNA fragments of Dongxiang wild rice related to phosphorus-deficiency tolerance has been transferred into the introgression lines and they could be acted as excellent bridging germplasm in exploring and utilizing the phosphorus-deficiency tolerant genes in rice. In addition, the introgression lines derived from Dongxiang wild rice can be used as a good experimental system for understanding the molecular mechanism to tolerate phosphorus-deficiency stress in wild rice.

Key words: Dongxiang wild rice; phosphorus-deficiency stress; cDNA-AFLP; qRT-PCR

磷是植物体正常生长发育所必需的第二大营养元素,具有多种重要的生理代谢功能^[1]。虽然土壤中全磷含量较高,但有效磷含量却很低^[2]。因此土壤中有效磷含量严重匮乏已成为制约水稻高产、稳产的重要因素之一^[3]。据统计,全世界约 43% 耕地缺磷,中国约 2/3 耕地缺磷,即使施以磷肥,其当季的磷利用率也仅为 20% 左右^[4]。更为严峻的是,磷肥的主要来源磷矿石是一种不可再生资源,预计将在不久耗竭,持续施以磷肥不仅导致磷矿资源的巨大浪费,而且将出现江河湖泊的水体日益富营养化等环境问题^[5-6]。因此,发掘作物自身高效磷的吸收与利用潜力,培育耐低磷新品种,是改善作物缺磷状况的重要发展方向。

前人研究表明,不同基因型间对低磷胁迫的耐性存在明显的基因型差异^[7],表明通过遗传改良培育水稻耐低磷新品种具有重要的现实意义。然而由于栽培稻在长期驯化栽培过程中,其等位基因的数量比野生稻减少了 50%~60%^[8],而且数十年来商业杂交种的广泛应用使得许多优良的地方品种流失严重,致使栽培稻的遗传基础越来越狭窄^[9]。因此,通过种间杂交,拓宽栽培稻的遗传基础,创制具有耐低磷相关基因的杂种后代,是解决耐低磷育种瓶颈的重要课题。

东乡野生稻是迄今全世界分布最北的普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.),被列为国家二级保护野生植物。由于长期处于野生状态,经受了各种灾害和不良环境的选择,东乡野生稻比栽培稻具有更加丰富的基因多样性,蕴藏大量栽培稻所没有或已丢失的优异基因,如耐冷、抗旱、耐低磷等^[10-12]。通过种间杂交,东乡野生稻耐低磷优异基因也已成功导入到栽培种中,是水稻耐低磷基因挖掘与利用的

宝贵资源,具有重要的实践应用价值^[12]。然而,水稻耐低磷性状是多基因控制的数量性状,其遗传机理及分子调控网络机制非常复杂,通过传统育种手段挖掘和利用近缘野生种耐低磷基因的效率非常低,并且目前有关东乡野生稻耐低磷相关基因的遗传与分子机制还很缺乏。为此,本研究以耐低磷渐渗系 IL171 及其双亲(东乡野生稻和栽培稻‘协青早 B’)为试材,采用 cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism) 技术,分析东乡野生稻及其耐低磷渐渗系幼苗期应答低磷胁迫的差异表达谱特征,用实时荧光定量 PCR 分析验证差异表达基因的表达特性,为探究东乡野生稻耐低磷胁迫的分子机制、发掘耐低磷相关的基因提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与胁迫处理

以江西东乡野生稻(*O. rufipogon* Griff.)为供体亲本,栽培稻‘协青早 B’(*O. sativa* sp. *indica* Kato, cv. ‘Xieqingzao B’)为受体亲本,杂交获得 F₁ 代,再与‘协青早 B’回交获得 BC₁F₁ 群体,经单粒传加代获得 BC₁F₉ BILs 群体^[9]。本课题组前期耐低磷鉴定发现,东乡野生稻和 IL171 具有较强耐低磷能力。本研究以耐低磷渐渗系 IL171 及其双亲为试材,在 28 °C 下进行种子催芽,选择发芽整齐一致的种子,采用 Yoshida 培养液配方进行石英砂培养^[13]。待幼苗长至两叶一心时进行低磷胁迫处理,设置正常 P 浓度(1.29 mmol·L⁻¹)为对照,低磷处理为对照浓度的 1/30(43.07 μmol·L⁻¹)。每 3 d 更换 1 次营养液,pH 5.5。低磷胁迫处理 3、6 和 9 d 后,分别取对照组和处理组的根和叶,液氮速冻后置于-80 °C 冰箱备用。

表 1 实时荧光定量 PCR 使用引物
Table 1 Sequences of qRT-PCR primer

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'→3')	
	正向 Forward	反向 Reverse
<i>Actin</i>	ACATCGCCCTGGACTATGACCA	GTCGTACTCAGCCTTGGCAAT
TDF8	CCTCCAGTTAGAATTATCGTTGCT	ATCCAGCCATAGTTACTCCTTCAC
TDF15	CTCGTCGCCTACATTCAAGAAG	GAAGCTTGATGATGGTCTCCTC
TDF18	AAAGAACGAGCCATCCATACTAAG	CATAACCGACACCTGAAACAGTAG
TDF23	GCTAGAGATGTACGAACAACGAAA	ACTAGCGTATGGACCTAAAAGTGC
TDF26	ATCTATTTCGAGGATCGTTTCACTC	ATCTCAAGCTCCACATAGACATCA
TDF61	TGGAATACACCTGCAGAACTCTAA	ACAGTAACATTGGAGACACATGCT

1.2 cDNA-AFLP 分析

采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取对照和各处理时间点根和叶的总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和浓度,并最终将总 RNA 浓度调整为 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,参照 First-Strand Synthesis of cDNA 试剂盒 (Promega) 的说明书合成 cDNA,并存于一 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

参照 Vos 等^[14] 和 娄群峰等^[15] 所述的方法进行 cDNA-AFLP 酶切、连接、预扩及选择性扩增。预扩产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测浓度,根据预扩增产物的浓度将其稀释 10~20 倍后作为选择性扩增的模板。以 8 条 *Eco*R I 选择性扩增引物 (*Eco*R I 接头+2 个随机碱基) 和 8 条 *Mse* I 选择性扩增引物 (*Mse* I 接头+3 个随机碱基) 进行两两组合,共组成 64 对选择性扩增引物,分别对 IL171 及其双亲的对照组和处理组的各时间点根和叶的 cDNA 进行 cDNA-AFLP 分析。选择性 PCR 扩增产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺胶 (PAGE) 垂直电泳分离,电泳结束后,参照 Sanguinetti 等^[16] 所述的方法进行固定、染色及显色。

1.3 差异片段的回收、扩增及测序

用灭菌的一次性手术刀从 PAGE 胶上切取与对照处理有差异性的条带,置于 $100\text{ }\mu\text{L}$ 灭菌超纯水中, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 min 后冷却至室温, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min,吸取上清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 回收的上清液作为再次选择性扩增的模板,体系中其它试剂、浓度及扩增程序与之前的选择性扩增一致,再次用 6% PAGE 电泳鉴定,与对照处理在同一位置有稳定差异的条带经琼脂糖凝胶回收并连接到 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 上,之后用连接产物转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a 感受态细胞,进行蓝白斑筛选。序列测定由北京鼎国生物技术有限公司完成。获得的序列在 RAP-DB 和 Rice Genome

Annotaion Project 网站上进行 Blast 比对,分析其基因的同源性及推测其功能。

1.4 实时荧光定量 PCR 验证

特异表达差异 DNA 片段 (transcript-derived fragments, TDFs) 经克隆测序及生物信息学分析归类后,从每一类中随机选择 1~2 个 TDFs 进行荧光定量 PCR 分析。根据 TDFs 同源基因的 CDs 序列,利用 Primer 3.0 在线设计荧光定量 PCR 引物。以水稻肌动蛋白 *Actin* 基因作为内标检测基因,检测 TDFs 序列同源基因的表达量。*Actin* 基因及荧光定量 PCR 引物序列见表 1。反应体系及扩增程序参照 Fast SYBR Green Master Mix (2×) (ABI, USA) 说明书设定,每样品 3 重复。荧光定量 PCR 反应在实时定量 PCR 分析系统 (ABI, USA) 上进行。荧光定量 PCR 程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 共 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 低磷胁迫下基因差异表达的 cDNA-AFLP 分析

耐低磷渐渗系 IL171 及其双亲各时间点 (3、6 和 9 d) 的总 RNA 检测结果见图 1, A, 用 *Actin* 引物对总 RNA 反转录产物 (cDNA) 的 PCR 扩增检测结果见图 1, B, 表明提取的总 RNA 和反转录产物良好,可用于后续的 cDNA-AFLP 分析。通过 cDNA-AFLP 引物筛选,本文获得 17 对多态性较好且条带清晰的引物组合用于进一步的选择性 PCR 扩增。扩增产物经 PAGE 凝胶电泳检测,共获得 100~800 bp 之间 cDNA 片段 17 600 条,平均每对引物扩增条带数约 40 条 (图 2)。各参试材料根和叶在低磷胁迫下的基因表达谱与对照组相比具有明显差异,各处理时间点均具有大量 (20~159 个) 上调或下调表达的差异片段,并且各材料低磷胁迫下根中上调或下调差异表达片段多于叶 (表 2),表明水稻地下

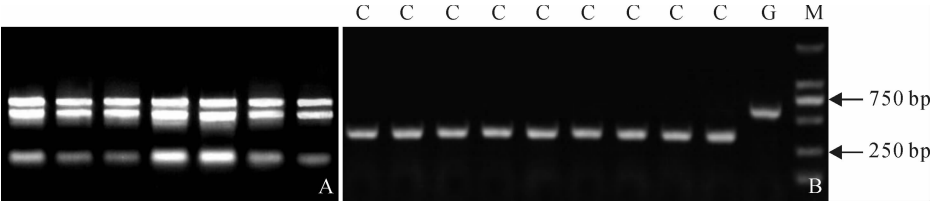


图 1 RNA 电泳检测(A)和 cDNA *Actin* 引物扩增电泳检测(B)

M. Marker;G. 基因组 DNA;C. cDNA

Fig.1 The electrophoresis results of total RNA(A) and PCR products amplified by *Actin* primer form cDNA(B)

M. Marker;G. Genomic DNA;C. cDNA

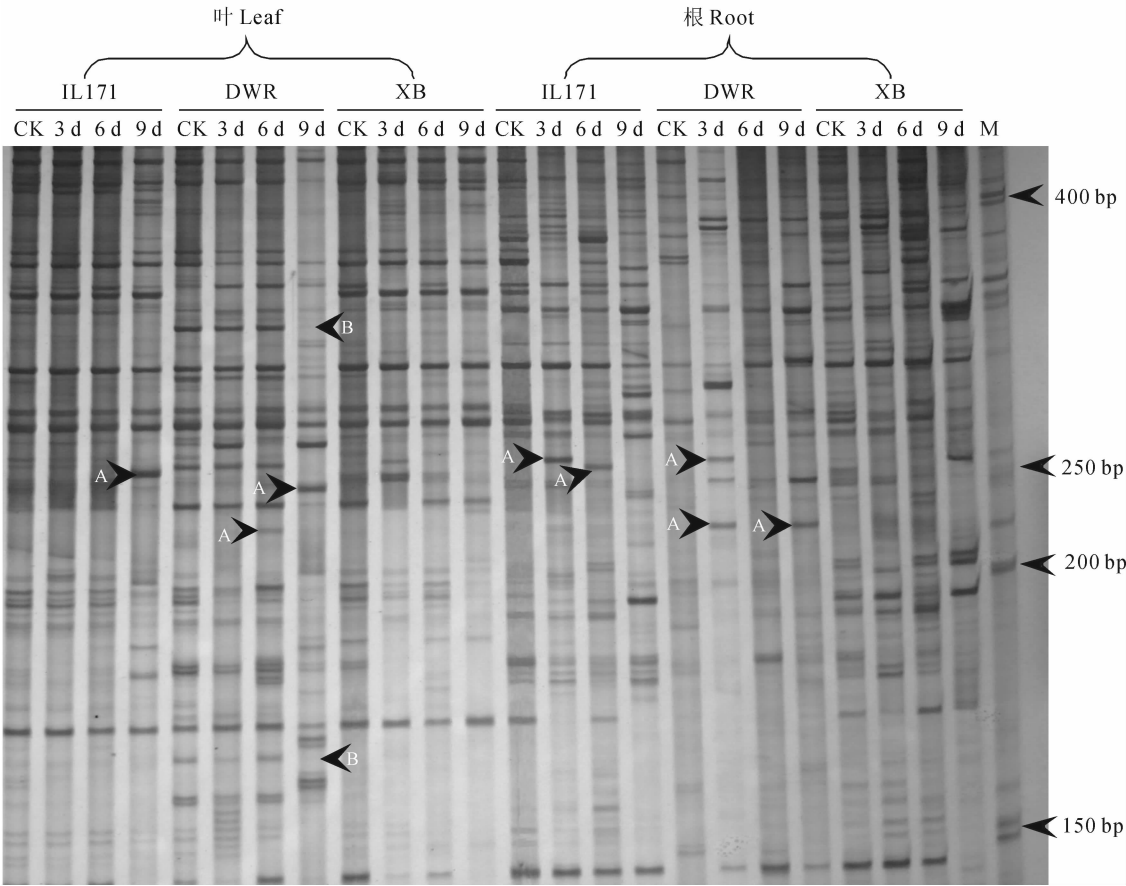


图 2 耐低磷渐渗系及其双亲的部分 cDNA-AFLP 扩增检测结果

CK 为对照;M. Marker;A 为特异性上调差异表达片段;B 为特异性下调差异表达片段

Fig.2 Parts of cDNA-AFLP amplification and electrophoresis for phosphorus-deficiency

tolerance introgression line and its parents

CK was control at normal concentration of phosphorus;M. Marker;A and B was special up-regulated and down-regulated bands (arrow showed), respectively

部参与应答低磷胁迫的基因比地上部更丰富。
分析上调表达的条带发现(表 2),东乡野生稻及其渐渗系中根和叶的差异上调条带数均随处理时间增加而增加(东乡野生稻 6 d 的叶除外),在处理 9 d 时达到最大值;而受体亲本‘协青早 B’中不同时间点的上调表达特征无明显规律。与自身对照相比,IL171 根和叶中各时间点差异上调表达的总条

带数分别为 105 和 75,均低于双亲相应值;东乡野生稻根中差异上调的条带最多(460 条),分别是 IL171 和‘协青早 B’中的 4.4 和 3.4 倍,表明东乡野生稻应答低磷胁迫的基因更加丰富,其调控网络可能更加复杂。与‘协青早 B’相比,IL171 中根和叶各时间点特异上调表达的总条带(即‘协青早 B’中无差异表达的条带)分别为 28 和 34 条,东乡野生稻

表 2 耐低磷渐渗系及其双亲应答低磷胁迫的差异表达特征

Table 2 The differentially expressed characteristics of low phosphorus tolerance introgression lines and their parents under the phosphorus-deficiency stress

处理时间 Treatment time/d	表达类型 Expression type	差异表达条带数 The number of differentially expressed bands						IL171 和东乡野生稻 共有差异条带数 Co-expressed bands in IL171 and DWR	
		XB		DWR		IL171			
		叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root	叶 Leaf	根 Root
3	+	48	43	36 (23)	146 (24)	20 (5)	21 (4)	2	0
	—	67	64	84 (52)	87 (41)	80 (45)	82 (34)	0	2
6	+	32	50	31 (24)	155 (24)	22 (11)	36 (12)	4	3
	—	21	23	20 (10)	71 (60)	17 (6)	30 (19)	0	1
9	+	42	42	69 (48)	159 (35)	33 (18)	48 (12)	2	2
	—	39	124	134 (83)	137 (65)	41 (14)	128 (44)	3	9
总计 Total	+	122	135	109 (95)	460 (83)	75 (34)	105 (28)	8	5
	—	127	211	238 (145)	295 (166)	138 (65)	240 (97)	3	12

注: +表示上调表达;—表示下调表达;XB 为‘协青早 B’;DWR 为东乡野生稻;IL171 为渐渗系 IL171;括号前的数为各参试材料处理与对照的差异条带,括号内为参试材料与‘协青早 B’相比的特异性差异表达条带;下同。

Note: + means up-regulated express;— means down-regulated express. XB, *Oryza sativa* L. cv Xieqingzao B;DWR, Dongxing wild rice;IL171, Introgression line IL171;The data before brackets was the number of differentially expressed bands between treatment and control,and in the brackets was the special differentially expressed bands campared to XB. The same as below.

中分别为 83 和 95 条(表 2)。扣除不同时间点被重复计算的差异条带,IL171 和东乡野生稻中分别有 36 条和 79 条特异上调表达的条带。IL171 的这 36 条特异上调表达的条带中有 13 条是与东乡野生稻共有的差异条带(表 2,图 2)。表明东乡野生稻部分优异基因已转移到 IL171 中,而且通过种间杂交 IL171 获得了一些双亲中所没有的差异表达条带和应答模式。

比较下调表达的条带发现(表 2),各参试材料的下调差异表达的规律基本一致,在处理 6 d 时差异表达的条带数处于最低。与自身对照相比,IL171 根和叶中各处理时间点差异下调表达条带的总和分别为 240 和 138;东乡野生稻下调差异表达条带最多,分别为 295 和 238 条,再次表明东乡野生稻应答低磷胁迫的基因调控网络更加丰富和复杂。与‘协青早 B’相比,IL171 中根和叶各时间点特异下调表达的总条带分别为 97 和 65,东乡野生稻中分别为 166 和 145(表 2,图 2)。扣除不同时间点被重复计算的差异条带,IL171 和东乡野生稻中分别有 61 条和 136 条特异下调表达的条带。IL171 的这 61 条特异下调表达的条带中有 15 条是与东乡野生稻共有的差异条带(根和叶中分别有 12 条和 3 条)。再次暗示种间杂种扩大了栽培种的遗传变异,东乡野生稻部分优异基因已转移到 IL171 中。

2.2 差异表达片段的克隆测序及分析

了解耐低磷渐渗系应答低磷胁迫的分子调控

机制,对部分差异明显的条带进行测序和功能分析。从 IL171 和东乡野生稻中的条特异差异表达的条带中共回收到 60 条带型明亮清晰、差异明显的特异表达条带(即‘协青早 B’中无差异表达的条带)进行二次 PCR 扩增和电泳检测,选择能在同一位置稳定出现差异的条带进行克隆、测序,最终得到 50 条有效序列(叶 33 条,根 17 条)。将这 50 条序列在 RAP-DB 和 Rice Genome Annotation Project 网站上进行 Blast 比对分析,结果有 36 个 TDFs 序列和数据库中已登录的基因具有很高的同源性(表 3),其中有 6 个基因序列是在东乡野生稻和 IL171 中特异性共表达的序列(TDF21、TDF36、TDF41、TDF49、TDF52 和 TDF59),比对的信息完全一致,因此这些重复的基因序列未在表 3 中列出。其余克隆测序的 14 个 TDFs 中有 5 个未能找到同源序列信息,有 9 个与已知序列同源性较低。

根据 Blast 分析结果,按照功能分类可将获得的 50 个差异表达基因片段 TDFs 分为 8 类(图 3),分别为:未知基因 14 条(占总数 28%),能量与代谢相关基因 11 条(占总数 22%),基因表达调控相关基因 6 条(占总数 12%),信号转导相关基因 6 条(占总数 12%),未知功能蛋白基因 6 条(占总数 12%),转录因子相关基因 4 条(占总数 8%),物质运输相关基因 2 条(占总数 4%)及防御和抗病相关基因 1 条(占总数 2%)。这些基因中有许多可直接参与调控功能蛋白的表达或者通过信号转导、转录

表 3 部分特异差异表达片段的生物信息学分析及特征

Table 3 The bioinformatics analysis of partial differentially expressed fragments

序列编号 TDF No.	序列来源 * TDF source	基因号 Gene ID	注释 Annotation	相似度 Similarity/%	E 值 E value
TDF8	DWR 的叶(3~9 d) Leaf of DWR (3~9 d)	Os07t0637300-01	类似于丙酮酸脱氢酶激酶 Similar to pyruvate dehydrogenase kinase	88	2.80E-20
TDF15	IL171 的根(9 d) Root of IL171 (9 d)	Os04t0594100-01	类似于 P-type R2R3 型 Myb 蛋白片段 Similar to P-type R2R3 Myb protein (Fragment)	93	7.40E-14
TDF17	IL171 的叶(9 d) Leaf of IL171 (9 d)	Os01t0349800-01	类似于细胞色素 P450 Similar to cytochrome P450	80	0.00016
TDF18	DWR 的叶(9 d) Leaf of DWR (9 d)	Os04t0442000-01	假定的转录因子 B3 Putative transcriptional factor B3	89	7.40E-24
TDF19	DWR 的叶(9 d) Leaf of DWR (9 d)	Os05t0347000-01	TAFII55 保守区域的结构域蛋白 TAFII55 protein conserved region domain containing protein	82	4.60E-16
TDF20	DWR 的叶(6 d) Leaf of DWR (6 d)	Os12t0619700-00	保守假定蛋白 Conserved hypothetical protein	92	1.50E-18
TDF21	IL171 和 DWR 的根(9 d) Root of IL171 and DWR (9 d)	Os02t0720900-04	类似于 nepenthesin-1 天冬氨酸蛋白酶 Similar to Aspartic proteinase nepenthesin-1	99	2.50E-22
TDF25	IL171 的叶(9 d) Leaf of IL171 (9 d)	Os03t0564200-01	功能未知的 DUF952 家族蛋白 Protein of unknown function DUF952 family protein	87	9.60E-02
TDF26	DWR 的叶(6 d) Leaf of DWR (6 d)	Os12t0176800-01	类似于异染色质蛋白片段 Similar to Heterochromatin protein (Fragment)	100	2.00E-38
TDF27	DWR 的叶(9 d) Leaf of DWR (9 d)	Os03t0572900-01	多抗菌挤压蛋白的伴侣家族蛋白 Multi antimicrobial extrusion protein MatE family protein	69	0.018
TDF29	DWR 的叶(9 d) Leaf of DWR (9 d)	Os05t0564300-01	锌指结构, RING/FYVE/PHD 类型结构域蛋白 Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein	97	3.30E-20
TDF33	IL171 的根(9 d) Root of IL171 (9 d)	Os04t0662100-01	类似于 40S 核糖体蛋白 S4 Similar to 40S ribosomal protein S4-like	96	1.90E-22
TDF34	IL171 的叶 Leaf of IL171	Os07t0541900-01	类似于结构域互作激酶 1 Similar to KI domain interacting kinase 1	92	1.60E-13
TDF36	IL171 和 DWR 的叶(9 d) Leaf of IL171 and DWR (9 d)	Os05t0345400-02	类似于螺旋结构的结构域蛋白 Tetratricopeptide-like helical domain containing protein	96	2.70E-09
TDF39	DWR 的根和叶(9 d) Leaf and Root of DWR (9 d)	Os07t0546000-01	类似的异戊烯基焦磷酸:二甲基烯丙基焦磷酸异构酶(EC5.3.3.2)片段 Similar to Isopentenyl pyrophosphate: dimethylallyl pyrophosphate isomerase (EC 5.3.3.2) (Fragment)	92	0.33
TDF41	IL171 和 DWR 的(9 d) Root of IL171 and DWR (9 d)	Os01t0328700-01	吡啶核苷酸 FAD 依赖性, 二硫化还原结构域蛋白 FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain containing protein	97	8.60E-16
TDF42	DWR 的叶(3 d) Leaf of DWR (3 d)	Os11t0544800-01	类似于谷氨酸 ADT 亚基 B Similar to GATB (GLU-ADT SUB-UNIT B); carbon-nitrogen ligase, with glutamine as amido-N-donor/glutaminyI-tRNA synthase(glutamine-hydrolyzing)/ ligase	94	9.90E-10
TDF49	IL171 和 DWR 的叶(9 d) Leaf of IL171 and DWR (9 d)	Os02t0615500-02	假定保守基因 Hypothetical conserved gene	96	0.087
TDF50	DWR 的根(6~9 d) Root of DWR (6 d~9 d)	Os10t0200000-02	类似于蛋白激酶结构域的表达蛋白 Similar to protein kinase domain containing protein, expressed	95	0.039
TDF52	IL171 和 DWR 的根(9 d) Root of IL171 and DWR (9 d)	Os06t0203500-01	类似于 UMP-CMP 激酶家族蛋白 Similar to UMP-CMP kinase family protein	100	1.00E-109
TDF59	IL171 和 DWR 的叶(3~9 d) Leaf of IL171 and DWR (3~9 d)	Os06t0645800-01	类似于转录起始因子 TFIID 亚基 1 Similar to Transcription initiation factor TFIID subunit 1	100	5.00E-42
TDF61	IL171 的叶(6 d) Leaf of IL171 (6 d)	Os01t0636500-01	类似于半乳糖醛缩酶 PG2 Similar to polygalacturonase PG2	91	4E-10
TDF62	DWR 的根(3 d) Root of DWR (3 d)	Os09t0466900-02	类似于丝氨酸, 苏氨酸蛋白激酶 Similar to Serine-threonine protein kinase	88	5.00E-28
TDF64	DWR 的叶(9 d) Leaf of DWR (9 d)	Os12t0209800-01	类似于 NB-ARC 结构域蛋白 Similar to NB-ARC domain containing protein, expressed	88	5.00E-20
TDF65	DWR 的叶(9 d) Leaf of DWR (9 d)	Os07t0147500-01	与光系统II 10 kDa 的多肽, 叶绿体前体类似 Similar to photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplast precursor	100	4.00E-83
TDF66	IL171 的根(6 d) Root of IL171 (6 d)	Os11t0265000-01	尿苷激酶家族蛋白 Uridine kinase family protein	100	1.00E-56
TDF67	DWR 的叶(9 d) Leaf of DWR (9 d)	Os01t0784700-00	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶相关的结构域蛋白 Serine/threonine protein kinase-related domain containing protein	94	1.00E-08
TDF68	DWR 的根和叶(3 d) Leaf and Root of DWR (3 d)	Os03t0690700-00	假定保守蛋白 Conserved hypothetical protein	74	2E-10
TDF75	IL171 的根(9 d) Root of IL171 (9 d)	Os05t0215800-01	功能未知的 DUF250 结构域蛋白 Protein of unknown function DUF250 domain containing protein	100	3.00E-131
TDF79	DWR 的叶(3 d) Leaf of DWR (3 d)	Os08t0240800-01	与肌动蛋白丝束束蛋白 P-115-ABP 类似 Similar to Actin filament bundling protein P-115-ABP	100	1.00E-91

注: * 括号中的时间为低磷胁迫取样时间点。
Note: * The time in the brackets was the different treatment under phosphorus-deficiency stress.

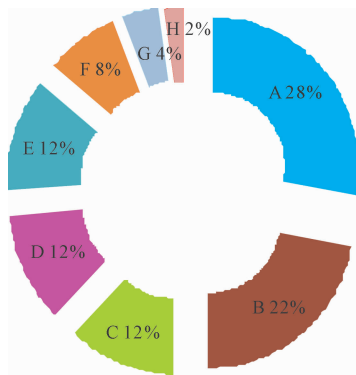


图 3 cDNA-AFLP 特异差异表达片段的功能分类

A. 未知基因;B. 能量与代谢相关基因;C. 基因表达调控相关基因;
D. 信号转导相关基因;E. 未知功能蛋白基因;F. 转录因子
相关基因;G. 物质运输相关基因;H. 防御和抗病相关基因

Fig. 3 Functional distributions of sepecial differential transcriptomes by cDNA-AFLP analysis

A. Unknown genes;B. Energy and metabolism related genes;
C. Regulating gene expression related genes;D. Signal transduction
related genes;E. Genes of unknown functional proteins;
F. Transcription factor related genes;G. Material transportation
related genes;H. Disease resistance related genes

调控途径调节下游基因的表达,另外还有较大比例(28%)差异表达序列是未知功能的基因,表明东乡野生稻及其基因渐渗系应答低磷胁迫的分子机制相当复杂,是挖掘耐低磷相关基因的重要资源(表 3,图 3)。

2.3 差异表达基因的 RT-PCR 分析

为了验证 cDNA-AFLP 结果的可靠,本实验从不同功能类型中各选取 1~2 TDFs 进行 qRT-PCR 分析验证(图 4),包含涉及能量与代谢的 TDF61(编码多聚半乳糖醛酸酶)、基因表达调控的 TDF26(真核翻译起始因子 2 γ)、信号转导的 TDF8(丙酮酸脱氢酶激酶 *OsPDK1*)、转录因子的 TDF15(MYB 家族转录因子)和 TDF18(生长素响应因子 9)以及未知功能的 TDF23。通过检测 TDFs 对应处理时间点的转录表达特性发现,TDF61、TDF26、TDF18和 TDF23 在耐低磷渐渗系 IL171 和供体亲本东乡野生稻低磷处理 6 和 9 d 的叶中同时显著上调表达,TDF15 仅在 IL171 低磷处理 6 和 9 d 的根中显著上调表达,TDF8 仅在东乡野生稻根叶处理 9 d 时显著上调。以上这 6 个基因的不同 qRT-PCR 表达模式符合其 cDNA-AFLP 表达谱特征,表明本研究应答低磷胁迫的 cDNA 差异片段真实可靠,cDNA-AFLP 可用于东乡野生稻耐低磷渐渗系应答低磷胁迫差异表达分析,同时也进一步证实了水稻参与应答低磷胁迫的基因类型丰富。

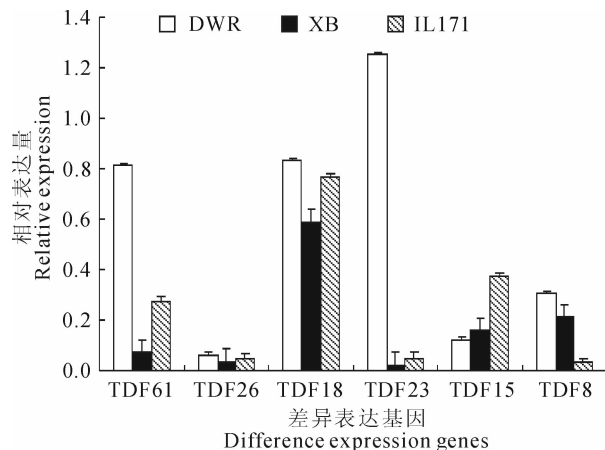


图 4 东乡野生稻与耐低磷渐渗系中特异差异表达基因的实时荧光定量 PCR 分析

Fig. 4 Real-time PCR analysis of the differentially expressed genes in Dongxiang wild rice and introgression line with phosphorus-deficiency tolerance

3 讨论

cDNA-AFLP 具有准确、可靠、多态性丰富等优点,能够用于揭示全基因组功能基因差异表达及相关基因的分离研究,目前已被广泛应用于植物抗病、抗逆等条件下的 mRNA 差异表达分析^[17],包括以此阐明植物响应低磷胁迫的分子机制^[18]。本实验利用 cDNA-AFLP 技术研究东乡野生稻及其渐渗系应答低磷胁迫的特异表达谱特征,结果发现耐低磷渐渗系及其双亲有大量的基因参与了应答低磷胁迫的调控网络,既有大量上调表达的基因,也有很多下调表达的基因,而且东乡野生稻的响应低磷胁迫差异表达的基因最丰富(尤其是根部,上调和下调分别是栽培稻 3.4 倍和 1.4 倍),表明水稻耐低磷性状是受多基因控制的数量性状,调控网络非常复杂,与前人的结果一致^[4]。本结果也暗示东乡野生稻可能蕴藏着更加丰富的耐低磷相关基因,是研究水稻应答低磷胁迫调控网络的重要试材,也是挖掘耐低磷等抗逆基因的宝贵资源。

本研究结果显示,IL171 和东乡野生稻含有多条(13 条上调和 15 条下调)‘协青早 B’所没有的共有差异条带,测序的 50 个 TDFs 中,有 6 个是 IL171 和东乡野生稻共有的特异表达条带,序列完全一致,暗示并证实了东乡野生稻部分优异基因已通过种间杂交渐渗转移到 IL171 中。此外,IL171 中也有部分双亲中所没有的差异表达条带,表明 IL171 可能具有不同于双亲应答低磷胁迫的基因表达模式,说明种间杂交扩大了栽培稻遗传变异基础。然而,种

间杂交后代基因表达模式改变的分子机制非常复杂,既可能包括种间杂交遗传重组及其由此引发的调控网络的改变,也可能包括种间杂交渐渗诱发的表观遗传变异等,如此前发现东乡野生稻基因渐渗系中出现甲基化水平和模式改变、转座子激活,存在落后染色体和双核仁等^[19-20]。这些相关的分子机制都有待于进一步深入研究。尽管如此,东乡野生稻优异渐渗系为挖掘和利用野生稻抗逆性优异基因资源奠定了的基础,本研究结果也可为今后研究水稻耐低磷分子机理提供参考。

本研究东乡野生稻及其耐低磷渐渗系应答低磷胁迫的 50 个 TDFs 涉及能量与代谢、基因表达调控、信号转导、转录因子和物质运输等。这些 TDFs 中有许多与已鉴定的逆境胁迫相关功能基因具有较高的同源性。表明水稻对低磷胁迫的响应过程是对低磷信号感受、转导和下游功能基因应答等综合协调作用的结果,与小麦^[18]、拟南芥^[21]和水稻^[22]等关于响应低磷胁迫的差异表达研究基本一致。进一步分析发现,本研究的 50 个 TDFs 中比重最大是未知基因(28%),还有 12% 未知功能蛋白基因,表明东乡野生稻中可能蕴藏非常丰富的耐低磷相关基因,值得深入挖掘与利用。其他 6 类 TDFs 中,基因表达调控、信号转导以及能量与代谢相关基因比重最大,均为 12%,暗示着东乡野生稻耐低磷可能更多地是通过信号转导和基因表达调控等途径来调节植株的能量与代谢,最终实现磷的高效吸收与利用。

前人的研究表明,植株在生理生化上对低磷胁迫的应答,较大程度上起因于信号转导后转录调控水平的改变^[23]。本研究中,不少介导植株体内信号转导的蛋白激酶基因发生特异性上调表达,如丝氨酸/苏氨酸激酶(TDF34、TDF62 和 TDF67)、蛋白质酪氨酸激酶(TDF49 和 TDF50)、丙酮酸脱氢酶激酶 OsPDK1(TDF8)等受体蛋白激酶,表明东乡野生稻及其渐渗系植株体内应答低磷胁迫信号的转导通路中有特定蛋白激酶的参与,与拟南芥和西红柿

等相关研究一致^[24]。另外,本实验东乡野生稻和耐低磷渐渗系 IL171 中获得 MYB(TDF15)、B3(TDF18)和 TFIIID(TDF59)等差异表达的转录因子,其中 MYB 转录因子已被证实参与了低磷胁迫等非生物逆境,如 MYB62 和 PHR;B3 基因家族在植物逆境胁迫响应和生长发育过程中也起着极其重要的作用。已有的研究显示 B3 主要存在于裸子植物、苔藓和绿藻类植物中,在水稻中尚未见报道^[24]。由于转录因子在不同的环境刺激下可以调控激活一系列与逆境相关功能基因的表达来提高植物整体的抗逆性,因此本研究结果可为水稻耐低磷的复杂调控通路研究可提供有用的信息。

前人的研究也表明,植物在感应低磷胁迫信号后,植株在生理、生化和形态学水平上发生明显的适应性变化。其中最普遍、最直接的反应就是能量与代谢途径的变化,植物通过调整代谢途径而降低消耗、提高磷利用率也是一种重要的低磷适应性反应^[4]。本研究的特异差异片段中有 11 个是能量与代谢相关的蛋白,如天冬氨酸蛋白酶(TDF21)、异戊烯焦磷酸(TDF39)、二氢硫辛酸脱氢酶(TDF41)、聚半乳糖醛酸酶 PG2(TDF61)、尿苷激酶(TDF66)、细胞色素 P450(TDF17)和谷氨酰胺转移酶(TDF42)等。其中细胞色素 P450 和谷氨酰胺转移酶特异性上调,表明它们在增强植株对低磷胁迫诱发的活性氧清除、进而缓解植株活性氧清除系统的失衡中具有较重要的作用。然而,克隆测序的 TDFs 仅仅是特异差异片段的一部分(东乡野生稻和 IL171 中分别有 227 和 117 个特异表达条带),为了能全面了解东乡野生稻及其渐渗系耐低磷的分子机制,需要进一步克隆和功能验证更多的 TDFs,并揭示这些 TDFs 在低磷响应过程中的具体作用及调控网络。这将为揭示水稻响应低磷胁迫的分子机制提供参考,也可为挖掘野生有利基因和提高水稻磷高效吸收利用研究奠定基础。

参考文献:

- [1] JIA H, REN H, GU M, *et al.* Phosphate transporter gene, *OsPht1*;8, is involved in phosphate homeostasis in rice[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156: 1 164—1 175.
- [2] QIU H B, XIU P M, CHAO X L, *et al.* Fine mapping of quantitative trait loci for acid phosphatase activity in maize leaf under low phosphorus stress[J]. *Mol. Breeding*, 2013, 32: 629—639.
- [3] VANCE C P, UHDE-STONE C, ALLAN D L. Phosphorus acquisition and use critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource[J]. *New Phytologist*, 2003, 157: 423—447.
- [4] LI L H, LIU C, LIAN X M. Gene expression profiles in rice roots under low phosphorus stress[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2010, 72: 423—432.

- [5] CORDELL D, DRANGERT J O, WHITE S. The story of phosphorus: global food security and food for thought[J]. *Global Environmental Chang*, 2009, 19: 292–305.
- [6] LI Y T, GU M, ZHANG X, *et al*. Engineering a sensitive visual-tracking reporter system for real-time monitoring phosphorus deficiency in tobacco[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12: 674–684.
- [7] WISSUWA M, AE N. Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement[J]. *Plant Breeding*, 2001, 120: 43–48.
- [8] SUN C Q, WANG X K, YOSHIMURA A, *et al*. Comparison of the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) using RFLP markers[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 102: 157–162.
- [9] LUO X D, JIAN S R, CAO J F, *et al*. Identification and molecular cytology analysis of cold tolerance introgression lines derived from *Oryza sativa* L. mating with *O. rufipogon* Griff. [J]. *Euphytica*, 2012, 187: 461–469.
- [10] JIAN SH R(简水溶), WAN Y(万 勇), LUO X D(罗向东), *et al*. Genetic analysis of cold tolerance at the seedling stage in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) [J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学报), 2011, 46(1): 21–27(in Chinese).
- [11] FU X Q(付学琴), HE H H(贺浩华), WEN P(文 飘), *et al.*. Drought resistance evaluation system for backcross lines of Dongxiang common wild rice(*Oryza rufipogon* Griff.) [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*(应用生态学报), 2012, 23(5): 1 277–1 285(in Chinese).
- [12] CHEN X R(陈小荣), CHEN M(陈 明), HE H H(贺浩华), *et al*. Low-phosphorus tolerance and related physiological mechanism of Xieqingzao B//Xieqing-zao B/Dongxiang wild rice BC₁F₉ populations[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*(应用生态学报), 2011, 22(5): 1 169–1 174(in Chinese).
- [13] YOSHIDA S, FORNO D A, COCK J H. Laboratory manual of physiological studies of rice[M]. 3rd, IRRI, 1976: 61–64.
- [14] VOS P, HOGER R, BLEEKER M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23: 4 407–4 414.
- [15] LOU Q F(娄群峰), CHEN J F(陈劲枫), JAHN M, *et al.*. Identification of AFLP and SCAR molecular markers linked to gynocious loci in *Cucumis sativus* L. [J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2005, 32(2): 256–261(in Chinese).
- [16] SANGUINETTI C J, DIAS N E, SIMPSON A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. *Biotechniques*, 1994, 17: 914–921.
- [17] GUO H M, LI Z C, ZHOU M L, *et al*. cDNA-AFLP analysis reveals heat shock proteins play important roles in mediating cold, heat, and drought tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. *Funct Integr Genomics*, 2014, 14: 127–133.
- [18] GU J T(谷俊涛), BAO J X(鲍金香), WANG X Y(王效颖), *et al*. Investigation based on cDNA-AFLP approach for differential expressed genes responding to deficient-Pi in wheat[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2009, 35(9): 1 597–1 605(in Chinese).
- [19] CHEN Y L(陈雅玲), LUO X D(罗向东), ZHANG F T(张帆涛), *et al*. Cloning and expression analysis of retrotransposon reverse transcriptase in introgression lines from Dongxiang wild rice[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学报), 2013, 48(2): 138–144(in Chinese).
- [20] DAI L F, CHEN Y L, LUO X D, *et al*. Level and pattern of DNA methylation changes in rice cold tolerance introgression lines derived from *Oryza rufipogon* Griff [J]. *Euphytica*, 2015, 205: 73–83.
- [21] MORCUENDE R, BARI R, GIBON Y, *et al*. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus[J]. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 85–112.
- [22] WASAKI J, YONETAN R, KURODA S. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots[J]. *Plant Cell Environ*, 2003, 26: 1 515–1 523.
- [23] LIU F, WANG Z Y, REN H Y, *et al*. OsSPX1 suppresses the function of OsPHR2 in the regulation of expression of OsPT2 and phosphate homeostasis in shoots of rice[J]. *Plant Journal*, 2010, 62: 508–517.
- [24] ZHANG Z L, LIAO H, LUCAS W J. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56: 192–220.

(编辑:宋亚珍)