

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01628

水稻双组分系统基因干旱胁迫表达谱分析

潘雅姣¹ 王 迪¹ 朱苓华¹ 傅彬英^{1,*} 黎志康^{1,2,*}

¹ 中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与遗传改良国家重大科学工程, 北京 100081; ² International Rice Research Institute, DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines

摘 要: 利用全基因组表达芯片, 系统分析干旱胁迫条件下水稻双组分信号系统(two component system, TCS)相关基因在其不同发育阶段、不同组织以及抗旱能力不同的株系中的表达谱变化特征。结果表明, 双组分信号系统基因在干旱胁迫环境下的表达具明显的时空特异性, 表现为不同组织的 TCS 基因干旱胁迫表达谱差异较大, 而同一组织内表达谱相似, 其中生殖生长期(幼穗分化期和孕穗期)两个叶片材料中 TCS 基因表达谱最为接近; 与细胞分裂素信号传导负向调控相关的 A 型应答调控器在旱胁迫下表达下调, 而与 CK 信号传导正向调控相关的 B 型应答调控器呈现明显上调趋势, 推测与干旱胁迫下 CK 信号传导增强有关, 同时乙烯受体基因在干旱胁迫环境下的表达下调, 从激素间相互关系的角度更好地印证了上述推测; 与拟南芥细胞分裂素受体基因(AHK2、AHK3 和 AHK5)序列相似的磷酸感应激酶基因 HK5 和 HK3 在干旱胁迫下表达上调, 与拟南芥中不依赖细胞分裂素的 AHK5 序列接近的 HK6 则表达下调, 进一步验证上述推测; 干旱胁迫下抗旱能力不同的水稻株系其 TCS 基因表达谱没有明显差异, 推测 TCS 基因差异表达可能源于对干旱胁迫反应, 而其表达对抗旱能力的增强还有待进一步研究。

关键词: 双组分信号系统; 干旱胁迫; 表达谱; 水稻

Differential Expression of Rice Two-Component Element Genes under Drought Stress

PAN Ya-Jiao¹, WANG Di¹, ZHU Ling-Hua¹, FU Bin-Ying^{1,*}, and LI Zhi-Kang^{1,2,*}

¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China; ² International Rice Research Institute, DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines

Abstract: In order to explore the temporal and spatial expression patterns of two component system (TCS) genes in rice under drought stress and the relationship between expression of TCS genes and drought resistance, a whole rice genome microarray was used to profile of the TCS genes in rice different organs at different developmental stages and among different drought tolerant rice lines under drought stress treatment. Results showed that the expression profiles of the TCS genes in rice were temporal-spatial specific under drought, indicating differential expression among rice organs and quite similar pattern within the same tissues at different stages. The type-A response regulator (RR) genes which may act as negative regulator of cytokinin signaling were mostly repressed by drought, while type-B RR genes which may play a role in positive regulation of cytokinin signaling were mostly induced by drought, these changes were supposed to be related with the enhancement of CK signaling under drought stress, this assumption was confirmed by the down regulation of ethylene receptor genes under drought from cross-talk of different plant hormones signaling; the His Kinase genes (HK5 and HK3) which are homologous to CK receptor genes (AHK2, AHK3, and AHK4) in Arabidopsis were induced by drought, while HK6 which is the homolog of AHK5 was drought repressed. There is no significant difference found among expression patterns of the TCS genes from different drought tolerant lines, showing that the TCS genes were probably only involved in the drought responsiveness, and their effect to the enhancement of drought resistance in rice still need further elucidated.

Keywords: Two component signaling components; Drought; Expression profile; Rice

双组分系统(two-component system, TCS)是原核生物及真核生物细胞响应外界环境刺激的信号系统。该系统由两部分组成, 包括感受器和反应调节元件。感受器位于胞质膜上感应外界环境信号, 而

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2003CB114308)和国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2007AA10Z191)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 傅彬英, E-mail: fuby@caas.net.cn; Tel: 010-62136042; 黎志康, E-mail: lizhk@caas.net.cn; Tel: 010-62136040

Received(收稿日期): 2009-03-02; Accepted(接受日期): 2009-04-21.

调节蛋白位于胞质接受并传递信号以及调节基因的表达。TCS最初在大肠杆菌氮调节蛋白系统中发现^[1], 随后的研究表明, TCS广泛存在于真核生物如酵母、哺乳动物和高等植物中。在多种植物全基因组序列分析完成后, 全基因组范围内发掘TCS基因及其功能研究表明, 高等植物TCS由包括组氨酸蛋白激酶(histidine kinase, HK)、含有组氨酸的磷酸转移蛋白(histidine-containing phosphotransfer, Hpt)以及反应调节蛋白(effector response regulator, RR) 3个部分组成^[2]。水稻全基因组序列分析结果发现在基因组中共有51个TCS基因, 对应编码73个TCS相关功能蛋白, 其中包含14个HK基因、5个Hpt基因和32个RR基因^[3]。

双组分系统参与植物激素的信号转导、光形态建成、生物节律和渗透胁迫反应等一系列复杂的生物学过程。对拟南芥的TCS基因相关功能研究得较为详细, 结果表明, 3个HK基因(*AHK2*、*AHK3*和*AHK4*)为细胞分裂素受体^[4], 两个HK基因(*ETR1*和*ERS1*)参与乙烯信号传导过程^[5]。拟南芥的A型RR基因的表达具有明显的组织特异性, 同时受细胞分裂素诱导上调表达^[4,6]; 而B型RR基因则呈结构性表达, 不受任何外界环境刺激的影响, 同时分子及细胞生物学研究证据表明其多数呈转录因子功能^[7]。另有研究表明, *AHK1*基因参与渗透胁迫反应中的信号感受及传递过程^[8]。

水稻TCS相关基因功能研究起步较晚。Jain等^[9]采用定量PCR的方法系统研究了A型RR基因在不同器官中、不同外源激素处理以及不同环境胁迫下的表达情况, 结果显示大部分RR基因受细胞分裂素(cytokinin, CK)诱导表达, 同时*OsRR6*在受到高盐、缺水及低温胁迫时表达水平明显提高。而*OsRR6*基因的超表达研究发现其在CK的信号传导过程中起负调控作用, 影响水稻植株的形态建成^[10]。采用全基因组表达谱分析策略研究水稻TCS所有基因在种子发育不同时期的表达情况, 结果显示少量TCS基因在胚及胚乳发育过程中特异性调控表达^[11]。所有这些研究结果表明, TCS基因广泛参与水稻发育生长调控以及应对外界环境变化过程中的信号传导过程, 但全面系统地分析TCS基因在水稻应对干旱胁迫的时空表达情况至今未见报道。本研究采用全基因组表达谱分析方法, 对水稻抗旱基因导入系的TCS基因在干旱胁迫环境下的时空表达情况进行详细分析,

试图全面了解不同TCS基因在水稻应对干旱缺水环境的作用机制。

1 材料与方法

1.1 水稻材料及胁迫处理

以本课题组培育的高世代抗旱回交导入系 DK系系列(DK151, DK106, DK135, DK124, DK177, DK143, DK184, DK98, DK164)及其旱敏感轮回亲本IR64为研究材料, 导入系供体亲本为伊朗的粳稻农家品种 Binam。连续两年田间试验结果表明(2004—2005年, IRRI), 在正常灌溉条件下DK系产量略低于IR64(65%~80%); 但在严重干旱胁迫条件下, IR64几乎绝产(减产90%以上), 而DK系产量仍保持在正常灌溉条件下30%的产量。

经消毒处理的水稻种子于室温在蒸馏水中萌发2 d后, 转移至人工气候室苗圃培育, 待水稻苗生长至四叶期, 移栽至旱棚装满Turface的PVC管中(直径20 cm, 高100 cm, 下部离地面20 cm处留排水孔), 采用0.5倍Yoshida营养液^[12]和蒸馏水交替浇灌至抽穗。划分水稻胁迫处理的生育时期参照国际水稻所0~9时期标准(<http://www.knowledgebank.irri.org/growthStages>)。所有DK系与IR64生育期长短基本一致(105~110 d), 分蘖期处理在播种后35 d(4~5个分蘖, 主茎叶龄5~6); 幼穗分化期处理在播种后55 d, 此时肉眼可见白色羽毛状花序, 约为丁颖穗分化8个时期划分标准中的二次枝梗分化期; 孕穗期处理在播种后70 d(主茎稻穗从旗叶鞘抽出1~5 cm)。

DK151用于分析不同生育期(分蘖期、幼穗分化期、孕穗期)和不同组织(叶片、根部、幼穗)中TCS相关基因在旱胁迫条件下的表达谱变化。当DK151生长至分蘖期(tillering stage)、幼穗分化期(panicle initiation stage)和孕穗期(booting stage)时, 打开PVC管下部排水孔塞子, 排尽孔上部营养液, 进行模拟干旱胁迫处理, 以同期正常浇灌材料为对照。其余8个导入系和IR64用于比较分析不同抗旱株系干旱胁迫下表达谱, 胁迫时期为孕穗期, 取样部位为叶片。当被胁迫处理的水稻植株叶片全部卷曲、且叶片相对含水量为65%~75%时取样, 分蘖期和幼穗分化期处理及对照材料取叶片和根, 孕穗期处理及对照材料取幼穗和剑叶, 每处理及对照样品3个生物学重复, 将样品以液氮快速冷冻。

1.2 RNA 样品制备及基因芯片分析

RNA样品准备参照Affymetrix芯片分析要求(Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix)进行。液氮速冻样品被研磨成粉状后,采用TRIZOL试剂提取总RNA,然后用RNA纯化试剂盒(RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen)进行纯化。后续实验步骤由博奥生物有限公司协助完成,包括采用20 μg 总RNA合成双链cDNA,以cDNA为模板由aRNA扩增试剂盒(MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit, Ambion)合成带生物素标记的cRNA,根据Affymetrix的方法将cRNA片段化为35~200个碱基小片段。将纯化后的cRNA与Affymetrix公司水稻全基因组芯片(该芯片含有48 564个针对粳稻和1 260个针对籼稻基因设计的探针组)45 杂交16 h,使用GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix)进行杂交,然后在芯片工作站Fluidics Station 450 (Affymetrix)进行芯片洗脱,采用芯片扫描仪Gene Chip Scanner 3000 (Affymetrix)进行扫描。

1.3 芯片数据处理

采用芯片数据分析软件(GeneChip Operating Software, GCOS1.4)对杂交数据进行分析,先用肉眼进行初步判断,然后使用GCOS1.4提取原始数据,保存为CGL格式;用dChip对芯片数据进行校正。使用芯片分析软件(Significant Analysis of Microarray, SAM)对每种样品旱处理前后的数据进行分析,差异表达基因筛选标准为表达值1.5倍变化率(处理/对照)和 q 值(FDR adjusted P value) 0.05。对于芯片上探针所对应的双组分元件基因注释,根据参考文献[3]所发表相关基因信息以及Affymetrix公司附注进行定位。用Cluster 3.0软件对各样品检测信号值进行聚类分析,采用类平均数法(average linkage)进行层次聚类(hierarchical clustering)。

1.4 PCR 分析验证 TCS 基因芯片表达谱结果

采用两步法RT-PCR,即先以1 μg 总RNA反转录生成单链cDNA(Promega),将产物稀释5倍后备用。后续扩增反应体系20 μL ,含反转录产物稀释液2 μL ,1 \times PCR buffer,10 mmol L^{-1} dNTPs 2 μL ,上下游引物各10 μmol ,0.5 U Taq DNA Polymerase。以94 30 s,56 1 min,72 1 min循环30次。由Primer 3.0软件完成引物设计,以Actin1为对照。

2 结果与分析

2.1 芯片数据可靠性评价

基因芯片扫描图像清晰,平均背景值与噪音值

较低;阳性率(present percent)数值正常;Poly-A对照(lys, phe, thr, dap)和杂交对照(bioB, bioC, bioD, cre)均为阳性,并且信号值差异符合它们的相对浓度;内参基因 β -actin和GAPDH探针组3'/5'的比值小于3;阳性对照B2 Oligo均匀分布在芯片的四周,各质控指标符合要求。同时各处理3个生物学重复间杂交信号的相关系数均大于0.95,说明试验重复性较好。

2.2 TCS 基因在干旱胁迫环境下的时空表达特征

采用水稻Affymetrix基因芯片对水稻双组分元件相关基因的干旱胁迫时空表达谱进行系统分析。DK151是以干旱敏感的IR64为轮回亲本,以伊朗粳稻农家品种Binam为供体亲本,经回交选择的高世代抗旱导入系,对其分蘖期和幼穗分化期叶片、根以及孕穗期叶片和幼穗的51个TCS基因在干旱胁迫及对照条件下的表达谱变化进行对比分析表明,共有38个TCS基因至少在一个组织中受干旱胁迫差异表达(表1),其中上调基因11个,下调基因20个,另外7个基因表达谱在不同样品中的变化趋势各异。

Scheller等^[13]对水稻中已经鉴定的52个TCS组分进行了标准化命名,包括11种感应激酶(包括细胞分裂素受体和乙烯受体),5种磷酸转移蛋白和36种应答调控器。根据N-端和C-端延伸区长短和Asp结构域有无,可将应答调控器划分为A型、B型、C型和假应答调控器。其中A型应答调控器和B型应答调控器是CK信号传导中重要调控因子,二者作用相反并表现为相互调控和制约^[2,9,15]。本实验中受干旱胁迫诱导上调基因包括组氨酸蛋白激酶基因(HK3、HK5),组氨酸磷酸转移蛋白基因Ahp1,以及8个应答调节器基因(其中A型1个、B型5个、C型1个、假应答调节器1个)。受干旱胁迫抑制下调基因包括6个组氨酸激酶基因(乙烯受体基因Ers2、Etr2、Etr3和细胞分裂素受体基因HK1、HK2、HK6),以及14个应答调节器基因(其中A型13个、B型1个、C型1个、假应答调节器1个)。这些结果表明:上调应答调节器以B型为主,而下调应答调节器主要为A型。细胞分裂素受体同时具有上调和下调两种情况,而乙烯受体则仅在下调基因中出现。具有生物钟功能的假应答调控器基因大部分在不同样品中的变化趋势各异。

根据TCS基因表达谱对不同组织不同时期样品进行聚类分析,结果表明该类基因在干旱胁迫环境下的表达具明显的时空特异性。如图1所示,3个时

表 1 DK151 株系在干旱胁迫下差异表达的 TCS 基因表达谱
Table 1 TCS genes differentially expressed under drought stress condition in DK151

基因 Gene	基因编号 OsGI	探针编号 Probe set ID	孕穗期 幼穗 BP	分蘖期 叶片 TL	穗分化期 叶片 PL	孕穗期 叶片 BL	分蘖期 根部 TR	穗分化期 根部 PR
<i>Ers2</i>	Os05g06320	Os.7454.1.S1_a_at	0.83	1.14	0.37	0.94	0.87	0.82
<i>Etr2</i>	Os04g08740	Os.14934.1.S1_at	0.63	0.87	1.05	0.69	0.38	0.53
<i>Etr3</i>	Os02g57530	Os.8423.1.S1_a_at	0.80	0.82	0.10	0.59	0.55	0.48
<i>HK1</i>	Os06g44410	OsAffx.28099.1.S1_at	0.85	0.55	0.53	0.55	0.84	0.73
<i>HK2</i>	Os06g08450	OsAffx.15311.1.S1_at	0.93	0.46	0.62	0.82	0.97	0.81
<i>HK6</i>	Os02g50480	Os.51036.1.A1_at	0.52	0.78	0.52	0.48	0.83	1.02
<i>Prr10</i>	Os05g32890	OsAffx.27127.1.S1_at	1.07	0.63	0.84	0.86	0.95	0.96
<i>Rr1</i>	Os04g36070	Os.8117.1.S1_at	0.18	0.19	0.08	0.16	0.50	0.72
<i>Rr10</i>	Os12g04500	Os.37430.1.S1_at	0.37	0.32	0.03	0.05	0.69	0.61
<i>Rr11</i>	Os02g42060	OsAffx.12448.1.S1_at	0.54	1.06	0.91	0.82	0.64	0.62
<i>Rr12</i>	Os08g28950	OsAffx.29407.2.S1_at	0.98	0.47	1.15	0.89	1.04	1.16
<i>Rr13</i>	Os08g26990	OsAffx.29407.3.S1_at	1.15	0.74	0.50	0.75	0.96	0.92
<i>Rr2</i>	Os02g35180	Os.23942.1.A1_at	0.54	0.28	0.02	0.05	0.63	0.51
<i>Rr3</i>	Os02g58350	OsAffx.24922.1.S1_at	1.01	0.85	0.92	0.86	0.56	0.80
<i>Rr32</i>	Os08g17760	OsAffx.5861.1.S1_at	0.79	0.60	0.38	0.47	1.23	0.93
<i>Rr4</i>	Os01g72330	Os.15908.1.S1_s_at	0.86	0.59	0.21	0.09	0.68	0.58
<i>Rr41</i>	Os03g53100	Os.47324.1.S1_s_at	1.39	0.75	0.61	0.76	1.18	0.87
<i>Rr5</i>	Os04g44280	Os.54667.1.S1_at	0.81	0.75	0.67	0.60	0.86	0.94
<i>Rr6</i>	Os04g57720	Os.24952.1.S1_at	0.49	0.48	1.03	0.43	0.97	1.36
<i>Rr7</i>	Os07g26720	OsAffx.22367.1.S1_at	0.59	0.74	1.35	0.70	0.96	1.17
<i>HK3</i>	Os01g69920	Os.12312.1.S1_at	1.91	1.47	2.56	1.82	1.14	1.42
<i>HK5</i>	Os10g21810	Os.8454.1.S1_s_at	0.90	1.74	2.26	2.91	1.44	1.60
<i>Prr59</i>	Os11g05930	Os.12795.1.S1_at	2.04	1.15	1.38	1.68	1.10	0.87
<i>Rr21</i>	Os03g12350	Os.11949.1.S1_at	2.09	1.22	2.77	2.14	0.97	1.04
<i>Rr22</i>	Os06g08440	Os.19406.1.S1_at	1.32	1.04	1.51	1.28	1.44	1.60
<i>Rr23</i>	Os02g55320	Os.5243.1.S1_at	1.45	1.93	3.60	1.17	1.35	1.21
<i>Rr25</i>	Os06g43910	OsAffx.28091.1.S1_at	1.53	1.08	1.41	1.04	1.47	1.53
<i>Rr28</i>	Os04g28160	OsAffx.3927.1.S1_at	1.16	1.14	1.89	1.48	1.38	1.50
<i>Rr42</i>	Os04g13480	OsAffx.13803.1.S1_s_at	1.07	1.57	1.03	1.20	0.99	0.89
<i>Rr8</i>	Os08g28900	OsAffx.29407.1.S1_at	0.95	1.49	1.54	0.96	0.96	1.09
<i>HK4</i>	Os03g50860	Os.51112.1.S1_at	0.48	1.96	0.34	0.69	0.93	1.31
<i>Ahp1</i>	Os08g44350	Os.16444.1.S1_at	1.42	1.47	3.02	1.66	0.72	0.79
<i>Php1</i>	Os01g54050	OsAffx.21635.2.S1_at	2.63	0.52	0.49	0.57	1.36	1.27
<i>Prr1</i>	Os02g40510	Os.26572.1.S1_at	1.61	1.54	0.62	1.45	1.03	0.86
<i>Prr37</i>	Os07g49460	Os.14563.1.S1_at	1.40	0.78	0.27	0.49	2.07	2.26
<i>Prr95</i>	Os09g36220	Os.8142.1.S1_a_at	1.51	1.09	0.59	1.23	1.45	0.91
<i>Prr73</i>	Os03g17570	Os.8104.1.S1_a_at	1.21	0.47	0.29	0.89	1.27	1.58
<i>Rr24</i>	Os02g08500	Os.27847.1.S1_at	1.13	1.50	0.52	0.67	0.85	0.78
<i>Rr26</i>	Os01g67770	Os.49428.1.S1_at	2.17	1.54	0.43	1.11	1.43	0.80

表中数值为胁迫及对照条件下基因表达比值。

The values in this table are the ratio of expression level between drought stress and control.

BP: young panicle at booting stage; TL: leaf at tillering stage; PL: leaf at panicle initiation stage; BL: leaf at booting stage; TR: root at tillering stage; PR: root at panicle initiation stage.

期的叶片材料聚为一类后与孕穗期幼穗材料聚在一起,而且两个生殖生长期(幼穗分化期和孕穗期)的叶片关系较近,分蘖期和穗分化期根部样品聚为一类,表现出明显的组织特异性,尤其在叶片中特异性表达最为明显。如图 2 所示,共有 7 个 TCS 基因在叶片中特异表达:组氨酸蛋白激酶 *HK1*、组氨酸磷酸转移蛋白 *Php1* 和应答调控器 *Rr32* 的表达在所有 3 个时期叶片材料中表现为干旱胁迫抑制,应答调控器基因 *Rr5*、*Rr24*、*Prr37* 仅在幼穗分化期和孕穗期叶片中表达下调,而 *Rr24* 在分蘖期叶片中为表达上调,表现出该基因在干旱胁迫下表达的时期特异性,同时 *Prr37* 在根部为上调表达,表现为一定的组织特异性。应答调控器 *Rr21* 在生殖生长期(幼穗分化期和孕穗期)叶片及穗部表达上调,而在根部材料和分蘖期叶片中无表达差异,具有明显的时空表达特异性。

进一步分析同期材料中的 TCS 基因表达谱,发现在干旱胁迫下绝大多数 TCS 基因在同一时期不同组织中差异表达方向一致,只有少数基因方向相反且主要为假应答调控器和磷酸转移蛋白, *Php1* 基因在孕穗期幼穗和叶片中分别为显著上调和下调表达;而 *Prr37* 和 *Prr83* 两个基因在幼穗分化期叶片中明显下调,而在根中却为上调表达。以上结果表明 TCS 基因的干旱胁迫反应与水稻的发育进程以及组织器官功能紧密相关。

2.3 孕穗期水稻抗旱株系 TCS 基因干旱胁迫表达谱

为研究双组元元件基因在不同抗旱基因导入系

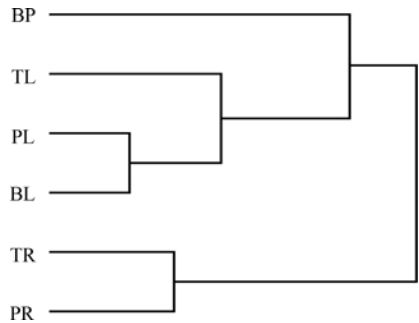


图 1 DK151 不同样品 TCS 基因干旱胁迫表达谱聚类分析结果 (类平均数法)

Fig. 1 Clustering of different samples based on TCS genes expression pattern under drought stress by an average linkage hierarchical clustering method
BP: 孕穗期幼穗; TL: 分蘖期叶片; PL: 幼穗分化期叶片; BL: 孕穗期叶片; TR: 分蘖期根样; PR: 幼穗分化期根样。
BP: young panicle at booting stage; TL: leaf at tillering stage; PL: leave at panicle initiation stage; BL: leaf at booting stage; TR: root at tillering stage; PR: root at panicle initiation stage.

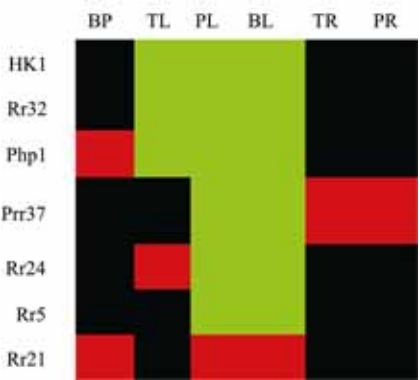


图 2 DK151 叶片特异性表达 TCS 基因表达谱
Fig. 2 Expression pattern of TCS genes differentially expressed specifically in DK151 leaves
绿色代表下调表达,红色代表上调表达,黑色表示没有变化。
TL: 分蘖期叶片; PL: 幼穗分化期叶片; BL: 孕穗期叶片; TR: 分蘖期根; PR: 幼穗分化期根; BP: 孕穗期幼穗。
Green, red, and black spots show repressed, upregulated, and no changed gene expression, respectively.
TL: leaves at tillering stage; PL: leaves at panicle initiation stage; BL: booting stage; TR: roots at tillering stages; PR: roots at panicle initiation stages; BP: young panicle at booting stage.

中的表达情况,选择包括 DK151 在内的 9 个抗旱基因导入系及其轮回亲本 IR64,采用芯片对比分析所有株系 TCS 基因在孕穗期叶片的干旱胁迫表达谱。如表 2 所示,除仅在 DK151 中差异表达的 *HK1*、*HK5*、*Rr24* 和 *Prr59* 外,共 22 个 TCS 基因在至少一个水稻株系中受干旱胁迫差异表达。其中共 14 个基因(如 *Etr3*、*HK6*、*php1* 等)在 DK151 和其他 9 个株系的差异表达类型一致,其余基因也基本与 DK151 在其他组织和发育期整体表现趋势一致。说明在同等胁迫条件下,大部分 TCS 组分基因在所有株系中受干旱胁迫后表达调控方向一致。

进一步分析发现,除两个基因(*Php3* 和 *Prr73*)外,大部分受干旱胁迫差异表达的 TCS 基因在包括 IR64 在内的所有株系中表达谱变化整体趋势相同,其中有几个基因在几乎所有株系中(8 个以上)均检测到受干旱胁迫下调(*Php1*、*Rr10*、*Rr1*、*Rr2*、*Rr4*)或上调(*HK3*)表达。其中 *Rr1* 和 *Rr2* 在所有组织和发育时期样品中均为受干旱胁迫下调表达, *Php1*、*Rr2* 和 *Rr4* 在至少 4 个样品中表达下调,其中包括所有发育时期的叶片材料。而在 7 个以上株系中受干旱胁迫差异表达的 TCS 基因,在轮回亲本 IR64 中均表现为相同的表达差异,表明这些基因可能只参与干旱胁迫反应,而与抗旱导入系的干旱胁迫抗性没有关系。有部分 TCS 基因只在少数导入系中受干旱胁迫

表 2 孕穗期干旱胁迫下 TCS 基因在不同抗旱导入系和 IR64 中差异表达
Table 2 TCS genes differentially expressed in different DK lines and IR64 under drought stress

基因 Gene	基因编号 OsGI	探针编号 Probe Set ID	DK151	DK106	DK135	DK124	DK177	DK143	DK184	DK98	DK164	IR64
<i>Ers2</i>	LOC_Os05g06320	Os.7454.1.S1_a_at	N	0.89	0.79	0.86	0.63	0.90	1.23	0.70	0.80	0.82
<i>Etr3</i>	LOC_Os02g57530	Os.8423.1.S1_a_at	0.59	0.57	0.67	0.75	0.57	0.61	0.71	0.92	0.38	0.55
<i>HK1</i>	LOC_Os06g44410	OsAffx.28099.1.S1_at	0.55	0.86	0.97	0.81	0.69	0.82	0.70	0.82	0.83	0.82
<i>HK3</i>	LOC_Os01g69920	Os.12312.1.S1_at	1.82	1.53	1.30	1.54	1.48	1.52	1.51	1.52	1.66	1.57
<i>HK4</i>	LOC_Os03g50860	Os.51112.1.S1_at	N	0.76	0.63	0.86	0.64	0.80	0.84	0.90	0.73	0.66
<i>HK5</i>	LOC_Os10g21810	Os.8454.1.S1_s_at	2.91	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>HK6</i>	LOC_Os02g50480	Os.51036.1.A1_at	0.48	0.83	0.67	0.66	0.63	0.65	0.89	0.73	0.57	0.86
<i>Ahp1</i>	LOC_Os08g44350	Os.16444.1.S1_at	1.66	1.39	1.56	1.32	2.14	1.33	1.10	2.03	1.35	1.65
<i>Php1</i>	LOC_Os01g54050	OsAffx.21635.2.S1_at	0.57	0.62	0.69	0.61	0.38	0.53	0.33	0.75	0.39	0.58
<i>Php3</i>	LOC_Os05g44570	Os.52244.2.S1_x_at	N	0.99	0.61	2.04	0.60	1.87	1.06	0.96	0.80	0.80
<i>Prr37</i>	LOC_Os07g49460	Os.14563.1.S1_at	0.49	0.83	0.60	0.65	0.56	0.78	0.60	0.79	0.39	0.60
<i>Prr59</i>	LOC_Os11g05930	Os.12795.1.S1_at	1.68	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Prr73</i>	LOC_Os03g17570	Os.8104.1.S1_a_at	1.68	0.95	0.82	0.78	0.89	0.87	0.63	1.99	0.50	0.81
<i>Rr1</i>	LOC_Os04g36070	Os.8117.1.S1_at	N	0.73	0.85	0.17	0.25	0.23	0.72	0.35	0.26	0.41
<i>Rr10</i>	LOC_Os12g04500	Os.37430.1.S1_at	0.16	0.66	0.64	0.12	0.19	0.19	0.62	0.29	0.10	0.64
<i>Rr13</i>	LOC_Os08g26990	OsAffx.29407.3.S1_at	0.05	0.86	0.75	0.83	0.77	0.87	0.81	1.06	0.92	0.98
<i>Rr2</i>	LOC_Os02g35180	Os.23942.1.A1_at	0.05	0.44	0.55	0.12	0.15	0.19	0.47	0.25	0.15	0.43
<i>Rr21</i>	LOC_Os03g12350	Os.11949.1.S1_at	2.14	1.52	1.38	1.55	1.48	1.58	1.25	1.58	1.77	1.48
<i>Rr23</i>	LOC_Os02g55320	Os.5243.1.S1_at	N	1.41	1.39	1.30	1.41	1.51	1.26	1.38	1.41	1.81
<i>Rr24</i>	LOC_Os02g08500	Os.27847.1.S1_at	0.67	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Rr25</i>	LOC_Os06g43910	OsAffx.28091.1.S1_at	0.67	1.17	1.28	0.99	0.98	1.16	1.06	0.83	1.90	0.92
<i>Rr30</i>	LOC_Os10g32600	OsAffx.30643.1.S1_at	N	0.98	0.95	1.00	0.42	0.78	1.00	0.64	0.82	1.02
<i>Rr32</i>	LOC_Os08g17760	OsAffx.5861.1.S1_at	0.47	0.98	0.80	0.85	0.49	0.75	0.80	0.37	1.25	0.60
<i>Rr33</i>	LOC_Os08g35670	Os.55050.1.S1_at	N	0.53	0.56	0.54	0.57	0.41	0.71	1.08	0.46	0.50
<i>Rr4</i>	LOC_Os01g72330	Os.15908.1.S1_s_at	0.09	0.37	0.57	0.11	0.04	0.23	0.38	0.17	0.17	0.25
<i>Rr5</i>	LOC_Os04g44280	Os.54667.1.S1_at	0.60	0.79	0.96	0.86	0.81	0.85	0.84	0.64	0.84	0.81
<i>Rr6</i>	LOC_Os04g57720	Os.24952.1.S1_at	0.43	1.01	0.97	0.46	0.37	0.60	1.35	0.48	0.26	0.82

差异基因筛选标准为胁迫与对照信号比值 1.5 以上，假阳性率 0.05. N 表示无表达差异。

FDR 0.05 was used to identify the genes that are up- or down-regulated more than 1.5 folds. N: no changed gene expression.

迫上调或下调差异表达,如 *Rr6* 在除 DK106、DK135 和 DK143 外所有导入系中均表现下调;而超过半数 TCS 基因只在部分株系中检测到差异表达,株系间差异明显,而且与株系抗旱性没有关联,结果表明 TCS 基因的差异表达是源于水稻株系对干旱胁迫的反应。估计是由于株系间遗传差异而导致 TCS 基因表达的差异。

2.4 半定量 PCR 分析验证 TCS 基因的表达谱结果

为了验证芯片数据,我们选择了 10 个 TCS 基因对两套芯片数据分别进行 RT-PCR 验证。如图 3-A 所示,干旱处理条件下 TCS 基因在水稻不同组织和发育时期的表达谱结果与 RT-PCR 结果的符合度为 85%。同时干旱胁迫下 TCS 基因在不同株系内表达谱的 RT-PCR 验证结果(图 3-B)显示,二者的符合度高达 97.5%。芯片结果与 RT-PCR 结果符合程度较好。

3 讨论

基因芯片是近年来发展起来的高通量检测全基因组表达谱的技术平台,本实验首次应用 Affymetrix

基因芯片,对水稻全基因组双组分元件相关基因在干旱胁迫下的表达进行系统分析,为全面解析 TCS 基因在水稻植株应对环境胁迫中的分子机制打下基础。

本研究发现 TCS 基因的表达在干旱胁迫环境下具明显的时空特异性,且主要表现为组织特异性。聚类结果显示根部与其他两个组织的干旱胁迫表达谱差异较大,而与生殖生长期叶片中 TCS 基因表达谱最为接近。同时部分具有相似表达谱的基因位于染色体重复区段(如 *Rr1* 与 *Rr2*, *Rr22* 与 *Rr23*),该结果与 Jain 等^[11]的研究结论相符合。这可能是由于同类 TCS 组分基因在遗传结构和功能上是过量重复的^[6,14],这种重复的剂量效应有利于各 TCS 组分间的功能协调,从而应对植物不同发育过程的环境胁迫。

本试验中 A 型和 B 型两类应答调控器受干旱胁迫调控表达方向相反,并且部分基因(*Rr1*、*Rr2*、*Rr5*、*Rr10* 和 *Rr21*)与前人结果相符^[11,15]。关于这两类应答调控器分别作为 CK 信号传导的负向和正向调控因子的报道很多^[9,16-18],同时二者关系表现为相互调控和制约。研究表明, B 型应答调控器作为转录因

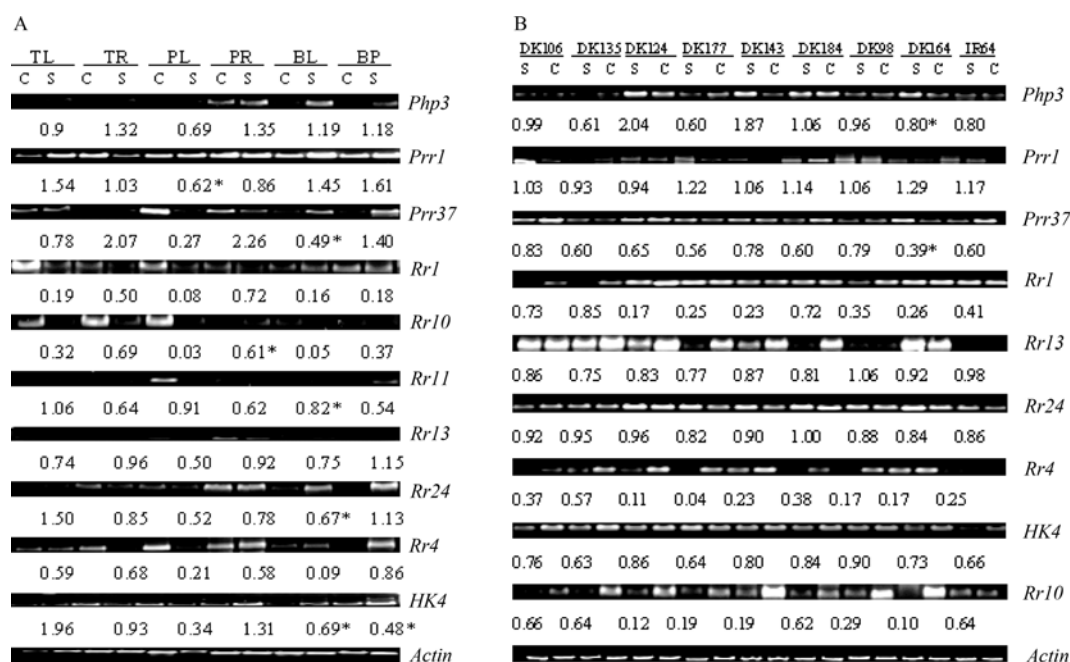


图3 芯片结果的半定量 PCR 验证

Fig. 3 Validation of microarray result with RT-PCR

A: 干旱胁迫下 TCS 基因在不同组织和发育时期差异表达特征的 RT-PCR 验证; B: 干旱胁迫下 TCS 基因在不同株系中差异表达特征的 RT-PCR 验证。芯片结果以干旱胁迫处理与对照信号比值表示,标注于各 mRNA 电泳结果下方。*表示电泳结果与 microarray 结果不一致的情况。C: 对照; S: 旱胁迫处理。

A: RT-PCR analysis of TCS genes differentially expressed among different organs and growth stages under drought stress; B: RT-PCR analysis of TCS genes differentially expressed among different lines under drought stress. The corresponding stress to control signal ratio of microarray data is shown at the bottom of each mRNA blot. The * corresponds to that the microarray data not confirmed by the mRNA blot results. C: control; S: stress.

子可调控 A 型调控器亚族基因的转录, 而 A 型应答调控器可能通过抑制 B 型调控器磷酸化激活, 或者增加 B 型应答调控器负向调控因子活性控制其表达活性^[2]。由此可以推测: A 型应答调控器的干旱胁迫诱导下调表达可能是受 B 型应答调控器的负调控。同时乙烯受体基因在干旱胁迫环境下表达受到抑制, 从激素间相互关系的角度更好地印证了上述推测。

本研究发现, 细胞分裂素受体类 TCS 基因在干旱胁迫环境下的表达分为上调和下调两类, 且部分基因(*HK1*、*HK3*、*HK4* 和 *HK6*)结果与前人研究结果相印证^[11,15], 表明干旱胁迫反应与细胞分裂素信号传导路径部分重叠。序列比对结果显示干旱诱导表达上调的 *HK5* 和 *HK3* 与拟南芥 CK 信号传导系统中受体 *AHK2*、*AHK3*、*AHK4* 相似性最高。而受干旱抑制表达的基因中 *HK6* 与拟南芥 *AHK5* (*cytokinin-independent 2*, *CKI2*)序列接近, *AHK5* 作为负向调控因子参与乙烯与脱落酸协同信号传导途径^[19]。该类基因在干旱胁迫下表达的差异可能是其功能差异造成的。

多数 TCS 基因表达谱在抗旱导入系和干旱敏感轮回亲本 IR64 间无显著差异, 且抗旱株系间表达谱差异与株系抗旱性也没有直接关联。推测 TCS 基因的差异表达是源于水稻株系对干旱胁迫的反应, 而与不同株系抗旱能力的强弱关系不大。

4 结论

大部分 TCS 基因的表达在干旱胁迫环境下具明显的时空特异性, 且主要表现为组织特异性。同类 TCS 组分基因在遗传结构和功能上可能是过量重复的。A 型应答调控器表达下调而 B 型两类应答调控器表达上调, 可能与二者在 CK 信号传导的反向调控相关。推测 TCS 基因的差异表达源于水稻株系对干旱胁迫的反应, 而与抗旱能力的关系不大。

References

- [1] Ninfa A J, Magasanik B. Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 5909–5913
- [2] Grefen C, Harter K. Plant two-component systems: Principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*, 2004, 219: 733–742
- [3] Pareek A, Singh A, Kumar M, Kushwaha H R, Lynn A M, Singla-Pareek S L. Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2006, 142: 380–397
- [4] Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 605–627
- [5] Guo H, Ecker J R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 2003, 115: 667–677
- [6] To J P, Haberer G, Ferreira F J, Deruère J, Mason M G, Schaller G E, Alonso J M, Ecker J R, Kieber J J. Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, 2004, 16: 658–671
- [7] Imamura A, Kiba T, Tajima Y, Yamashino T, Mizuno T. In vivo and in vitro characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 122–131
- [8] Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 1999, 11: 1743–1754
- [9] Jain M, Tyagi A K, Khurana J P. Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 1
- [10] Hirose N, Makita N, Kojima M, Kamada-Nobusada T, Sakakibara H. Overexpression of a type-A response regulator alters rice morphology and cytokinin metabolism. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 523–539
- [11] Jain M, Nijhawan A, Arora R, Agarwal P, Ray S, Sharma P, Kapoor S, Tyagi A K, Khurana J P. F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1467–1483
- [12] Yoshida S, Forna D A, Cock J H, Gomez K A. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, 3rd edn. Manila, Philippines: International Rice Research Institute Press, 1976. p 83
- [13] Schaller G E, Doi K, Hwang I, Kieber J J, Khurana J P, Kurata N, Mizuno T, Pareek A, Shiu S H, Wu P, Yip W K. Nomenclature for two-component signaling elements of rice. *Plant Physiol*, 2007, 143: 555–557
- [14] Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2004, 16: 1365–1377
- [15] Jain M, Tyagi A K, Khurana J P. Differential gene expression of rice two-component signaling elements during reproductive development and regulation by abiotic stress. *Funct Integr Genomics*, 2008, 8: 175–180
- [16] Argyros R D, Mathews D E, Chiang Y H, Palmer C M, Thibault D M, Etheridge N, Argyros D A, Mason M G, Kieber J J, Schaller G E. Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell*, 2008, 20: 2102–2116
- [17] Yokoyama A, Yamashino T, Amano Y I, Tajima Y, Imamura A, Sakakibara H, Mizuno T. Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis*

- thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 84–96
- [18] Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T. Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 47–57
- [19] Iwama A, Yamashino T, Tanaka Y, Sakakibara H, Kakimoto T, Sato S, Kato T, Tabata S, Nagatani A, Mizuno T. AHK5 histidine kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent abscisic acid and ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 375–380

欢迎订阅 2010 年《作物学报》

《作物学报》(ISSN 0496-3490, 月刊) 是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的全国性学术刊物。前身可追溯到 1919 年 1 月中华农学会创办的《中华农学会丛刊》，后相继改名为《中华农林会报》、《中华农学会报》、《中国农业研究》和《农业学报》。1960 年停刊, 1962 年复刊改为现名《作物学报》，卷期另起。主要刊登农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、生态、种质资源、谷物化学、贮藏加工以及与农作物有关的生物技术、生物数学、生物物理、农业气象等领域以第一手资料撰写的学术论文、研究报告、简报以及专题综述、评述等。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从 1999 年起连续 10 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助。从 1997 年起连续 8 年获得中国科协“择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助经费”的资助, 2006—2009 年连续 4 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B 类)”资助。从 2002 年起连续 7 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2005 年获“第三届全国期刊奖提名奖”。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览(2008 年版)》登载,《作物学报》被列在“农学、农作物类核心期刊表”的首位。2008 年被中信所授予“中国精品科技期刊”称号、被授予武汉大学中国科学评价中心“中国权威学术期刊”称号。

《作物学报》被多个国外重要数据库和检索系统收录, 如: 联合国粮农组织(FAO)的 AGRIS 数据库、美国《生物学文摘》(BA)、英国国际农业与生物中心(CABI)的 CAB Abstracts 数据库、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、日本科学技术社(JST)数据库、俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VINITI)和波兰哥白尼索引(Index of Copernicus)等。

《作物学报》为完全开放存取期刊(Open Access Journal), 建有独立网站和全文数据库。向读者免费提供“最新录用”、“下期”、“当期”及自 1962 年创刊号起“过刊”的全文(PDF 格式), 网上全文比印刷版本提前 2 个月。本刊网站具有“作者在线投稿”、“专家在线审稿”、“作者在线查询”等功能, 目前从收稿、审稿到修改稿均在线传送, 大部分编辑流程在网上进行。

2010 年《作物学报》定价 50 元/册, 全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅, 刊号: CN 11-1809/S, 邮发代号: 82-336。也可向编辑部直接订购。

地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农科院作物所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

电话: 010-82108548; 传真: 010-82105793; E-mail: xzbw@chinajournal.net.cn

网址: <http://www.chinacrops.org/zwxb/>