

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01030

全基因组分析 PEG 胁迫下水稻根系转录因子表达变化

马廷臣^{1,2} 陈荣军² 余蓉蓉² 曾汉来¹ 张端品^{1,*}

¹ 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070; ² 中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙 410125

摘要: 转录因子在植物抗逆境中起重要的调节作用。本文使用 Affymetrix 水稻 60K 芯片全基因组研究 PEG 胁迫时 2 个耐旱性不同的水稻品种的转录因子及转录因子家族的变化, 结果表明, 在 PEG 胁迫下, 耐旱品种湘丰早 119 根系共有 95 个转录因子转录本与对照处理比较表达发生变化(24 个为转录水平下调表达, 71 个为转录水平上调表达); 干旱敏感品种爱华 5 号根系有 129 个转录因子转录本表达发生变化(转录水平上调的转录因子转录本 60 个, 转录水平下调的转录因子转录本 69 个); 2 个品种 PEG 胁迫响应转录因子隶属的转录因子家族都为 30 个, 但各转录因子所属的 30 个家族并不完全相同; PEG 胁迫逆境中, PEG 胁迫响应转录因子转录本表现出品种特异性, 湘丰早 119 有 72 个为特异响应转录本, 爱华 5 号有 106 个特异响应的转录因子转录本; 2 个品种在干旱胁迫下响应的转录因子有 23 个为重叠转录本, 其中有 16 个在转录水平上调表达, 7 个在转录水平下调表达; 2 个品种的 PEG 胁迫响应转录因子基因在染色体上的分布不同, 重叠转录因子基因主要位于第 2 染色体 0.432~26.139 Mb 和第 5 染色体 0.076~20.597 Mb 之间。
关键词: 水稻; 根系; 基因芯片; 转录因子; 耐旱性差异

Global Genome Expression Analysis of Transcription Factors under PEG Osmotic Stress in Rice Root System

MA Ting-Chen^{1,2}, CHEN Rong-Jun², YU Rong-Rong², ZENG Han-Lai¹, and ZHANG Duan-Pin^{1,*}

¹ National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ² Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China

Abstract: Transcription factors play an important role in plant stress tolerance. The Affymetrix rice genome arrays were used to study the expression change of transcription factors and their families in two rice cultivars with different levels of drought tolerance under PEG osmotic stress. A total of 95 transcripts encoding transcription factors (24 transcripts were down-regulated and 71 transcripts were up-regulated at the transcription level) in Xiangfengzao 119 and 129 transcripts (69 transcripts were down-regulated and 60 transcripts were up-regulated at the transcription level) in Aihua 5 were affected by PEG osmotic stress. Transcription factors transcripts in response to PEG osmotic stresses belonged to 30 transcription factors families for each of two cultivars, but there was a difference between the two 30 families. The transcription factors transcripts for expressed cultivar specific-response to PEG osmotic stress, with 72 transcripts for Xiangfengzao 119 and 106 for Aihua 5. There was an overlap of transcripts in response to PEG osmotic stress between Xiangfengzao 119 and Aihua 5, with the 16 and 7 up-regulated and the down-regulated at the transcription level, respectively. Distribution of PEG osmotic stress regulating genes of two cultivars on rice chromosome was different and their overlapped transcripts were located in 0.432 to 26.139 Mb of chromosome 2 and 0.076 to 20.597 Mb of chromosome 5.

Keywords: Rice; Root system; Microarray; Transcription factor; Different drought tolerance

近年来, 水资源的矛盾日益尖锐, 缺水是我国面临的最严重问题之一。在农业生产中, 经常会出现频繁的干旱, 对粮食生产造成巨大的损失。全世

界每年因干旱而造成的粮食生产的损失几乎等于其他所有环境因子造成损失的总和。因此作物对干旱的研究一直是热点, 但是长期以来, 人们过多关注

本研究由中国科学院知识创新工程领域前沿项目(0551033)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张端品, E-mail: tingchenm@163.com

Received(收稿日期): 2008-12-10; Accepted(接受日期): 2009-02-17.

植物地上部对干旱的应答^[1-6], 而对根系的了解却相对较少。

另外水稻抗旱性是也是近来的研究热点^[1-12], 但对干旱的研究侧重于生理方面, 分子水平研究相对落后, 根系是对干旱胁迫承受的主要部位, 是研究抗旱的根本, 因此, 加强抗旱水稻的根系分子水平研究, 将具有重要的基础和应用价值。

植物转录因子在植物生命活动中起着重要的作用, 自1987年首次在玉米中发现以来, 已发现的植物转录因子有数百种, 在水稻中至少有2 300个转录因子, 在水稻生长发育中起着重要的作用。目前研究得知, 植物转录因子通过转录调控来调控一系列与逆境相关基因的表达, 从而提高植物对逆境的耐受能力。现在已报道转录因子与抗寒、抗旱、耐盐和抗病等一系列抗逆性密切相关^[13-23]。

研究表明PEG模拟干旱与土壤干旱的效果非常相似^[25-26], 且由于根系和转录因子的重要性, 本文利用基因芯片技术全基因组研究PEG模拟干旱下2个耐旱性不同的水稻根系转录因子表达变化, 以期更好地理解干旱的作用过程和机理, 以提高植物抗旱性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为湘丰早 119 (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* Kato, 籼型水稻, 湖南省水稻研究所选育, 全生育期 108 d 左右, 耐旱)和爱华 5 号(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* Kato, 籼型水稻, 湖南省水稻研究所选育, 全生育期 109 d 左右, 干旱敏感)。

PEG-6000 为北京双环化学试剂厂进口分装, 粉末状, 易溶于水, 化学式为 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, $n=158\sim 204$, 浓度为质量体积百分比。

1.2 材 料 培 养

选择籽粒饱满, 健康的种子, 使用 10% 次氯酸钠消毒 30 min, 清水冲洗 4~5 次, 33℃ 催芽露白, 播种于以铁丝固定的纱布上, 将纱布置 30 cm × 20 cm × 15 cm (长×宽×高)的聚乙烯塑料方盘中, 距盘底 10 cm, 每盘播 1 个品种, 500 粒。培养于人工气候箱, 光照强度 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 温度 25℃, 湿度 70%~80%, 每天照光 16 h。使用木村营养液进行培养(pH 6.5), 每 7 d 更换一次培养液, 至 20 d (三叶一心期)开始使用不同浓度 PEG 处理, $T_0=0\%$ (对照)、 $T_1=20\%$ (干旱胁迫), 处理 6 d 后取样。

1.3 根系总 RNA 的提取、纯化及 RT-PCR

用 Invitrogen 的 TRIzol 提取根系总 RNA, 用 QIAGEN 的 RNeasy Mini Kit 纯化, 据魏敏等^[12]的方法进行反转录 cDNA 和产物的 Real-time PCR 扩增。

通过标准曲线获得未知样品基因相对表达的 Ct 值:

$$X_{\text{处理}}/X_{\text{对照}}=2^{(\text{Ct}_{\text{处理}}-\text{Ct}_{\text{对照}})}(X \text{ 为表达变化})$$

计算出的相对表达含量在上调 2 倍和下调 2 倍之间的被认为其活性未变化。

1.4 生物芯片

使用 Affymetrix 生物芯片, 按照其培训手册 2005 年版进行(<http://www.Affymetrix.com>) cDNA 合成、芯片杂交、冲洗扫描。使用 Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 完成后杂化反应冲洗和双链切割, 使用 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 完成芯片扫描。

使用 GeneChip Operating Software (GCOS 1.2) (Affymetrix)统计分析芯片数据。由 GeneChip Operating Software (GCOS 1.2) (Affymetrix)分析探针检测信号(表达、不表达或边缘化表达)。由 dChip (Affymetrix)进一步分析表达的探针数据, 以 2 个品种无 PEG 的处理作为对照, 20% 的 PEG 作为干旱处理的数据与对照比较表达水平, 变化倍数大于 2 倍认为是基因表达活性发生变化。

Affymetrix 水稻芯片有 58 000 多个寡聚核苷酸探针, 涵盖 46 000 个基因, 约是水稻基因组基因数目的 80%。在芯片上共包含约 2 300 个编码转录因子的基因, 涉及水稻 66 个转录因子家族, 几乎包含了所有水稻转录因子。因此, 基于水稻芯片的全基因组分析, 可以全面反映水稻对 PEG 模拟干旱胁迫响应的转录因子及家族。

2 结果与分析

2.1 两品种水稻根系响应 PEG 胁迫的转录因子家族及转录因子表达模式

在 PEG 胁迫下, 耐旱品种湘丰早 119 根系共有 95 个转录因子转录本与对照比较表达发生变化, 占水稻转录因子总数的 4% 左右。在这 95 个 PEG 胁迫响应的转录本中, 有 24 个为转录水平下调表达, 71 个为转录水平上调表达。转录水平的下调表达平均下调的倍数为 3.35 倍, 转录水平最大下调是编码 WRKY 转录因子的转录本(Os.48082.1.S1_at), 下调

倍数为 8 倍(表 1), 转录水平最小下调的转录本是编码 PLATZ 子(OsAffx.11944.1.S1_at)、GRAS(Os.

表 1 湘丰早 119 与爱华 5 号 PEG 胁迫响应变化倍数超过 4 倍的转录因子基因

Table 1 The transcription factors transcripts in response to PEG osmotic stress over 4-folds in Xiangfengzao 119 and Aihua 5

品种 Cultivar	探针 ID Probe ID	转录因子家族 Transcription factors family	转录本 Transcripts assignments	表达变化 ¹⁾ Expressing change ¹⁾
爱华 5 号 Aihua 5	Os.50593.1.S1_at	ABI3VP1	LOC_Os02g38470.1	-3.5
	Os.38278.2.S1_at	ABI3VP1	LOC_Os03g06850.1	-3.0
	OsAffx.30718.1.S1_x_at	ABI3VP1	LOC_Os10g39190.1	-2.5
	OsAffx.18596.1.S1_x_at	AP2-EREBP	LOC_Os10g41130.1	-2.3
	Os.51078.1.S1_at	AP2-EREBP	LOC_Os02g45450.1	2.3
	OsAffx.27377.1.S1_at	AP2-EREBP	LOC_Os05g49010.1	2.5
	Os.5816.1.S1_at	AP2-EREBP	LOC_Os09g35010.1	3.2
	OsAffx.17392.2.S1_at	bHLH	LOC_Os08g38080.1	-2.3
	OsAffx.1884.1.S1_x_at	bHLH	LOC_Os01g01840.1	-2.1
	Os.52592.1.S1_at	bHLH	LOC_Os02g49480.1	-2.0
	Os.16025.1.S1_s_at	bZIP	LOC_Os06g39960.1	-2.3
	OsAffx.28017.1.S1_at	bZIP	LOC_Os06g39960.1	-2.0
	Os.46836.1.S1_at	bZIP	LOC_Os10g38820.1	2.0
	Os.5736.2.S1_x_at	C2C2-Dof	LOC_Os10g26620.1	-3.2
	OsAffx.24890.1.S1_at	C2C2-GATA	LOC_Os02g56250.1	-2.4
	Os.50970.1.S1_at	C2H2	LOC_Os03g32230.1	-4.6
	Os.55921.1.S1_at	C2H2	LOC_Os03g32220.1	-2.7
	Os.8410.1.S1_at	C2H2	LOC_Os09g38790.1	-2.4
	Os.5217.1.S1_at	C3H	LOC_Os01g14870.1	2.0
	Os.53020.1.S1_at	GRAS	LOC_Os05g42130.1	2.1
	Os.21068.2.S1_x_at	HB	LOC_Os03g06930.1	-3.0
	Os.35681.1.S1_at	HSF	LOC_Os01g53220.1	2.9
	OsAffx.12463.1.S1_at	LIM	LOC_Os02g42820.1	4.4
	Os.45888.1.S1_at	MYB	LOC_Os01g45090.1	-4.3
	OsAffx.16082.1.S1_at	NAC	LOC_Os07g04560.1	-3.7
	OsAffx.14163.1.S1_at	NAC	LOC_Os04g35660.1	2.2
	OsAffx.27015.2.S1_at	Orphans	LOC_Os05g25800.1	3.7
	OsAffx.15035.1.S1_at	WRKY	LOC_Os05g40070.1	-2.9
	Os.55259.1.S1_at	ZIM	LOC_Os04g32480.1	-3.0
	湘丰早 119 Xiangfengzao 119	OsAffx.30708.1.S1_x_at	AP2-EREBP	LOC_Os10g38000.1
Os.26512.1.S1_at		AUX/IAA	LOC_Os03g58350.1	2.3
Os.18169.1.S1_at		AUX/IAA	LOC_Os01g18360.1	3.4
Os.51063.1.S1_at		bHLH	LOC_Os09g28210.1	2.2
OsAffx.6446.1.S1_at		C2C2-Dof	LOC_Os09g29960.1	2.1
Os.50594.1.S1_at		C2H2	LOC_Os04g46680.1	4.2
Os.9495.1.S1_at		CCAAT_HAP3	LOC_Os06g17480.1	3.9
Os.29819.2.S1_x_at		G2-like	LOC_Os01g08160.1	2.7
Os.12134.1.S1_at		HB	LOC_Os04g45810.1	2.4
OsAffx.5195.1.A1_at		HB	LOC_Os07g03770.1	3.8
Os.56210.1.S1_at		MYB	LOC_Os04g42950.1	2.7
OsAffx.28697.1.S1_at		MYB	LOC_Os07g31470.1	3.0
Os.623.3.S1_x_at		MYB-related	LOC_Os01g09640.1	2.0
OsAffx.29407.3.S1_at		Orphans	LOC_Os08g26990.1	4.3
OsAffx.21236.1.S1_at		RWP-RK	LOC_Os01g37100.1	4.8
Os.51204.1.S1_at		TCP	LOC_Os02g42380.1	2.1
OsAffx.3034.1.S1_at		NAC	LOC_Os02g51120.1	-4.0

¹⁾ 正值表示上调, 负值表示下调。

¹⁾ Up-regulation and down-regulation are denoted with positive and negative values, respectively.

31950.1.S1_at)和 DDT(Os.24275.1.S2_at)的转录本, 下调倍数都为 2 倍。上调的 71 个转录因子转录水平平均上调 5.05 倍, 最大上调的转录本为 RWP-RK 转录本(OsAffx.21236.1.S1_at), 变化倍数达到 27.86 倍(表 1), 最小上调的是 MYB(Os.9336.1.S1_at)、Orphans (Os.8117.1.S1_at)、AP2-EREBP(Os.5599.1.S1_at)和 GRAS(Os.11843.1.S1_at)转录本, 均比对照在转录水平上调 2 倍。

进一步分析湘丰早 119 的 95 个转录因子转录本, 发现它们隶属于 30 个转录因子家族, 占水稻转录因子家族的 45.5%, 其中转录水平上调的分别属于 20 个家族, 转录水平下调的属于 19 个家族。有 9 个家族变化比较复杂, 既有转录水平上调的转录因子, 也有转录水平下调的转录因子, 如 WRKY 家族、MYB 家族和 NAC 家族等。

爱华 5 号根系在 PEG 胁迫下与对照相比, 共有 129 个转录因子转录本转录水平表达发生变化, 为水稻转录因子总数的 5.61%。其中转录水平上调的 60 个, 转录水平下调的 69 个。转录水平下调的转录本平均下调倍数为 4.96 倍, 转录水平最大下调的转录本是 WRKY(Os.48082.1.S1_at), 下调倍数高达 51.98 倍(表 1), 编码 AP2-EREBP (Os.21563.1.S1_at)、WRKY(Os.37565.2.S1_at)、NAC(Os.49206.1.S1_at)、bHLH (Os.5093.1.S1_at)等的转录本仅下调 2 倍, 为转录水平最小下调倍数。转录水平表达上调的 60 个转录本平均上调倍数为 3.79 倍, LIM 转录本(OsAffx.12463.1.S1_at)为转录水平最大上调(21.11 倍)(表 1), HB 转录本(Os.2365.1.S1_at、Os.17301.1.S1_at 和 Os.26397.1.S1_at)、Sigma70-like 转录本(Os.3407.1.S1_at)以及 bHLH 转录本(Os.34549.1.S1_at)是转录水平上调的最小倍数, 均上调 2 倍。

进一步分析爱华 5 号表达发生变化的转录因子转录本, 可知其隶属于 30 个转录因子家族, 爱华 5 号 PEG 逆境抑制表达的转录因子有 25 个家族, PEG 逆境诱导表达的转录因子有 20 家族, PEG 逆境抑制和诱导的转录因子家族中 14 个家族重叠, 它们在湘丰早 119 中和爱华 5 号中表达都发生变化, 如 WRKY、MYB-related、NAC、MYB 家族等。

2.2 不同品种水稻对 PEG 胁迫响应的品种特异转录因子

在 PEG 逆境中, 两品种的大部分 PEG 胁迫响应转录因子转录表达水平变化表现出品种特异性。湘丰早 119 的 95 个 PEG 胁迫响应转录因子转录本中

有 72 个表现出品种特异性, 占总数的 75.79%。其中转录水平上调的转录本为 55 个, 转录水平下调转录本为 17 个。上调的特异响应转录本平均变化倍数为 2.99 倍, 上调最大的转录因子是 RWP-RK(OsAffx.21236.1.S1_at)(表 1), 变化了 27.86 倍。下调的特异响应转录本平均下调 5.00 倍, NAC 家族转录本(OsAffx.3034.1.S1_at)为最大下调, 下调了 16 倍(表 1)。有 8 个转录因子家族的转录本存在既有转录水平上调的转录因子又有转录水平下调的转录因子, 这些家族分别为 AP2-EREBP、bZIP、C3H、GRAS、MYB、Orphans 和 WRKY 家族(表 1 和表 2)。

爱华 5 号在 PEG 逆境下有 106 个特异响应的转录因子转录本, 代表了其全部响应转录本的 80.3%。PEG 逆境诱导的特异转录本有 44 个, 干旱抑制的特异转录本有 62 个。诱导的特异转录本转录水平平均上调 3.66 倍, LIM 家族转录本(OsAffx.12463.1.S1_at)为干旱诱导反应最强烈的转录本, 表达活性上调 21.11 倍(表 1)。PEG 逆境抑制的特异转录本转录水平平均变化的倍数是-4.30 倍, 其中编码 C2H2 家族转录因子转录本(Os.50970.1.S1_at)受到抑制的程度最大, 活性下降 24.25 倍(表 1)。13 个转录因子家族中的转录因子转录本在 PEG 逆境下转录水平表达上升和下降同时存在, 这些家族分别为 AP2-EREBP、AUX/IAA、bHLH、bZIP、C2H2、C3H、HB、HMG、HSF、MYB、MYB-related、NAC 和 WRKY 家族(表 1 和表 2)。

2.3 PEG 逆境下两品种重叠的转录因子

耐旱品种湘丰早 119 和敏感品种爱华 5 号在 PEG 逆境下响应的转录因子存在着一个交集即在 2 个品种中转录水平都表达, 且其上调或下调表达一致。这样的转录因子转录本共有 23 个, 为湘丰早 119PEG 逆境响应转录本的 24.21%和爱华 5 号 PEG 逆境响应转录本的 17.83%。重叠的转录本有 16 个转录水平上调表达, 7 个转录水平下调表达(表 2)。转录水平上调表达的转录本分别属于 bHLH、C2C2-CO-like、C3H、HB、HSF、MYB、NAC 和 Orphans 家族(表 2), 其在湘丰早 119 中的平均变化 3.29 倍, 在爱华 5 号中的平均变化 3.97 倍。有 5 个转录水平上调的转录因子转录本在两品种中表达的倍数相差较大, 涉及到 HB (OsAffx.29958.1.S1_at、Os.49245.1.S1_at)、HSF(Os.51916.1.S1_at)、C2C2-CO-like (Os.13999.1.S1_at)、Orphans (Os.8117.1.S1_at)家族。转录水平下调表达转录本包括 5 个转录因子家族

(WRKY、C2H2、NAC、ZIM、ABI3VP1 家族), 在湘丰早 119 中平均下调 5.02 倍, 而在爱华 5 号中仅下调 3.92 倍。WRKY 家族转录本(Os.48082.1.S1_at)和 C2H2 转录本(Os.55911.1.S1_at、Os.51307.1.S1_at)变化倍数相差较大, 其中 WRKY 家族转录本(Os.48082.1.S1_at) 2 个品种之间表达相差最悬殊, 相差了近 44 倍(湘丰早 119, 51.98 倍; 爱华 5 号, 8 倍)(表 2)。

2.4 两品种 PEG 逆境响应转录因子基因在染色体上的分布

湘丰早 119 的 PEG 逆境响应转录因子基因主要分布在第 1、第 2、第 4、第 6 和第 9 染色体, 其中分布在第 2 染色体上的最多, 分布的范围在 0.432~3.280 Mb 之间, 其次是第 1 染色体, 位于 0.600~37.389 Mb 之间。PEG 逆境诱导的转录因子基因主要位于第 1、第 2 和第 4 染色体上, 其中第 1、第 2 染色体上最多(各 12 个), 分布范围分别在 0.600~37.389 Mb 和 7.464~32.795 Mb 之间, 其次是第 4 染色体, 分布于 21.555~29.056 Mb 之间。第 3 和第 7 染色体上没有 PEG 逆境抑制的转录因子基因存在, 有转录因子基因分布的其他染色体, 其上分

布的基因数目相差不大(图 1-A)。

爱华 5 号在 PEG 逆境下的响应转录因子基因主要位于第 1 染色体~第 6 染色体及第 9 染色体上, 以第 1 染色体 0.452~43.500 Mb 之间分布最多, 其次是第 9 染色体的 5.187~22.912 Mb 之间。PEG 逆境诱导的基因主要分布在第 1、第 2 染色体及第 5 染色体上, 其分布基因数目最多的染色体是第 5 染色体, 位于其 1.640~28.763 Mb 之间。第 1 和第 2 染色体上分布基因数目略小于第 5 染色体, 分别分布在 8.331~41.044 Mb 和 4.315~35.685 Mb 之间。PEG 逆境抑制表达的转录因子基因主要分布在第 1 染色体~4 染色体及第 9 染色体上, 以第 9 染色体 5.187~22.291 Mb 之间最多, 其次是第 1 染色体的 21.991~43.400 Mb 之间(图 1-B)。

湘丰早 119 与爱华 5 号的重叠转录因子基因分布在第 2 和第 5 染色体上数目较多, 分布的范围分别是 0.432~26.139 Mb 和 0.076~20.597 Mb 之间。其中转录水平上调表达的基因在第 8、第 11、第 12 染色体上。转录水平下调表达的基因位于第 5、8、9、11 和 12 染色体, 其中第 5、第 9 染色体上各有 2 个, 其他 3 个染色体上各有 1 个(表 2)。

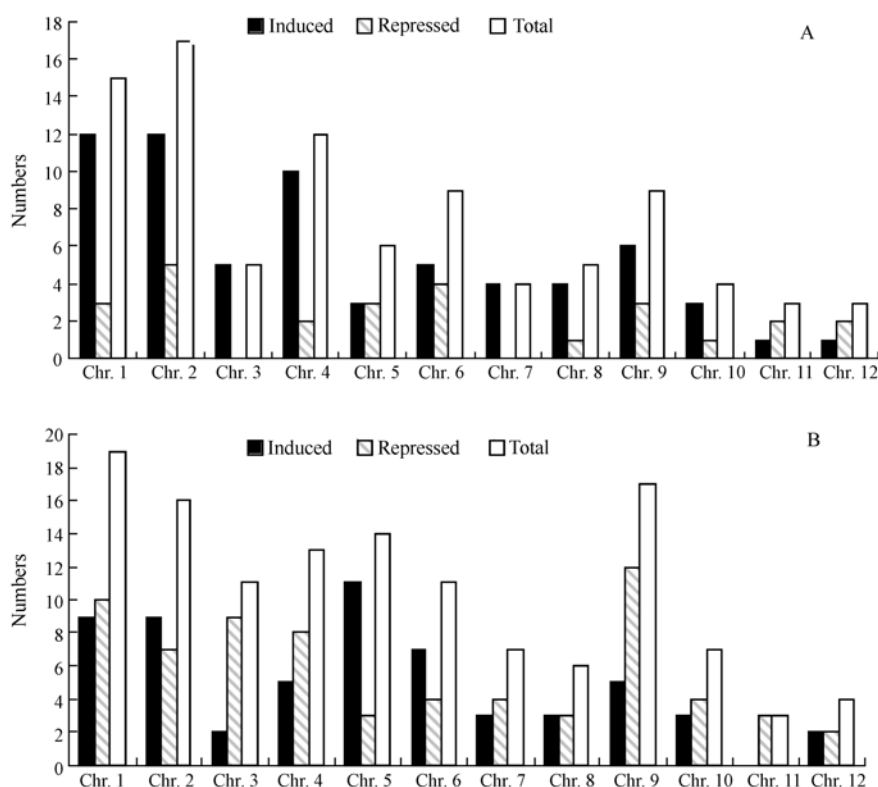


图 1 干旱响应转录因子在染色体上的分布

Fig. 1 Distribution of the PEG osmotic stress regulating genes in rice chromosome

A: 湘丰早 119 PEG 逆境响应基因; B: 爱华 5 号 PEG 逆境响应基因。

A: Xiangfengzao 119 drought-response genes; B: Aihua 5 drought-response genes.

表 2 湘丰早 119 与爱华 5 号重叠转录因子基因在染色体上的分布

Table 2 Distribution of the PEG osmotic stress regulating genes overlapped between Xiangfengzao 119 and Aihua 5

探针 ID Probe ID	转录因子家族 Transcription factors family	Gene ID	染色体位置 Distribution in rice chromosome	A-5-T1 处理 A-5-T1 treatment	X-119-T1 处理 X-119-T1 treatment
OsAffx.29062.1.S1_at	ABI3VP1	9636.m00543	chr08 3371124–3371988 (+)	-1.4	-1.3
OsAffx.28832.1.S1_at	bHLH	9635.m03987	chr07 23955320–23956573 (-)	1.8	1.9
Os.13999.1.S1_at	C2C2-CO-like	AK109630.1	chr02 4315279–4316958 (+)	2.0	1.2
Os.17487.1.S1_at	C2C2-CO-like	CB670993	chr03 28636131–28638888 (+)	1.3	1.6
Os.55911.1.S1_at	C2H2	AY305865.1	chr05 761237–762121 (-)	-2.3	-1.2
Os.51307.1.S1_at	C2H2	AY305866.1	chr11 28208090–28208933 (-)	-2.0	-2.9
Os.11534.1.S1_at	C3H	AK063896.1	chr05 5825355–5826152 (-)	1.5	1.8
Os.31975.1.S1_x_at	C3H	AK106392.1	chr05 5825683–5827497 (-)	1.3	1.3
Os.49245.1.S1_at	HB	AK063685.1	chr02 26137449–26138780 (+)	2.4	3.4
OsAffx.29958.1.S1_at	HB	9637.m01821	chr09 12779661–12782079 (-)	1.2	3.0
Os.17301.1.S1_at	HB	AK068029.1	chr10 20472064–20476769 (-)	1.0	1.1
Os.51916.1.S1_at	HSF	AK064271.1	chr01 22265711–22268644 (+)	1.1	2.1
Os.10570.1.S1_at	HSF	AU165045	chr06 20995272–20995546 (-)	1.5	1.8
Os.47854.1.S1_at	MYB	AK111720.1	chr02 28552394–28554151 (-)	1.4	1.5
Os.7051.1.S1_at	MYB	AK108709.1	chr02 30533909–30535244 (-)	4.2	4.6
OsAffx.14163.1.S1_at	NAC	9632.m03435	chr04 21546242–21547257 (+)	2.2	2.1
Os.15708.1.S1_a_at	NAC	AB028181.1	chr04 22775497–22777537 (+)	1.2	1.7
Os.37548.1.S1_at	NAC	AK107746.1	chr05 20594823–20597005 (+)	1.2	1.7
OsAffx.31559.1.S1_at	NAC	9640.m00213	chr12 1146147–1147454 (+)	-1.9	-1.9
Os.8117.1.S1_at	Orphans	AK072736.1	chr04 21836450–21840299 (-)	2.2	1.0
Os.37565.2.S1_at	WRKY	AK066255.1	chr05 14913494–14915716 (+)	-1.3	-1.8
Os.48082.1.S1_at	WRKY	AK067834.1	chr09 14991941–14993887 (-)	-5.7	-3.0
Os.48064.1.S1_at	ZIM	AK108738.1	chr09 16272520–16274267 (-)	-1.7	-1.7

2.5 使用实时 PCR 验证基因芯片

为了验证芯片数据的准确性, 选取 9 个芯片结果中的基因, 其中 4 个为本研究中表达变化的转录因子基因 [AK072736.1 (Orphans)、AK066255.1

(WRKY)、AK067834.1 (WRKY) 和 AK108738.1 (ZIM)]。图 2 表明, 基因芯片中的数据结果与实时 PCR 结果都表现出表达的上调或下降且变化倍数基本相同, 说明芯片结果和实时 PCR 结果可靠。

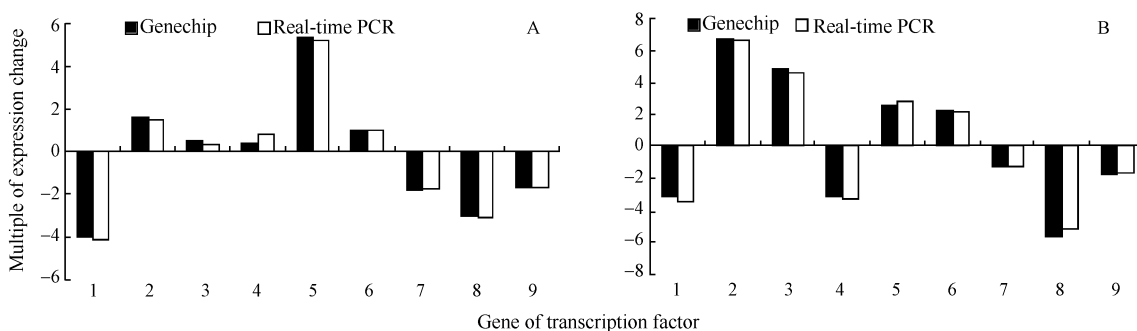


图 2 实时 PCR 结果与芯片数据比较

Fig. 2 Comparison of gene chip data with Real time PCR result

A: 湘丰早 119; B: 爱华 5 号。1~9 (GEN BANK ID)分别为 AB026998.1 (Acidic endochitinase precursor)、AJ490370.1 (SnoRNA Z274)、AJ532520.1 (SnoRNA Z134a)、AK060350.1 (Ribosomal protein)、AK060564.1 (Alcohol dehydrogenase)、AK072736.1 (Orphans)、AK066255.1 (WRKY)、AK067834.1 (WRKY)和 AK108738.1 (ZIM)。变化倍数均取 2 为底的对数。

A: Xiangfengzao 119; B: Aihua 5. 1-9 (GEN BANK ID) indicate AB026998.1 (Acidic endochitinase precursor), AJ490370.1 (SnoRNA Z274), AJ532520.1 (SnoRNA Z134a), AK060350.1 (Ribosomal protein), AK060564.1 (Alcohol dehydrogenase), AK072736.1 (Orphans), AK066255.1 (WRKY), AK067834.1 (WRKY), and AK108738.1 (ZIM), respectively. The changed fold was represented by a log₂ of intensity ratio.

3 讨论

转录因子在植物生长和发育期间起着重要的转录水平调控作用, 指导 DNA 和蛋白质相互作用, 从而调控基因的表达。另外, 转录因子在植物耐逆境中也发挥着重要的作用^[13-23], 如 Yamaguchi 等^[13]发现 RD29A 受到干旱、高盐、低温等逆境的诱导而表达; HSF 与高温诱导相关^[13]; bZIP 家族的 TGA/ORF 与非生物逆境密切相关^[19-20]; WRKY 家族也对植物抗逆性起着重要的作用^[15]; MYB 类转录因子在植物抗病等方面相关^[17]。本文的试验结果也表明, 干旱逆境可以诱导或抑制转录因子表达, 如 2 个耐旱性不同的品种中都有 MYB 类转录因子在转录水平表达变化(表 2), MYB 类转录因子对植物抗胁迫起重要的调控作用, 是对植物胁迫应答反应的转录因子家族中数量最多, 功能最多样化的家族之一。如水稻的 *Osm4* 基因的过量表达能显著提高植物对干旱的耐受性^[24]。再如 HSF 为高温诱导相关的转录因子^[13], 在湘丰早 119 和爱华 5 号中也都发现有 HSF 家族的转录因子转录水平上调表达, 这说明 HSF 家族的转录因子在干旱逆境中也有相关性。NAC 家族也是一个重要的干旱逆境相应的转录因子家族^[23], 在本文中 2 个品种的根系在干旱胁迫下都有 NAC 家族的转录因子表达变化, 也证明 NAC 家族在干旱胁迫中的重要性。另外干旱逆境还可以诱导和抑制很多转录因子的表达, 表明转录因子在干旱胁迫环境下其调控方式的复杂性, 同时也说明了干旱逆境的复杂性。

转录因子在其转录水平表达的品种特异性, 湘丰早 119 有 75.79% 的转录因子是干旱特异响应转录因子, 爱华 5 号中有 80.3% 的干旱逆境响应转录因子为特异响应因子。这 2 种耐旱性不同的品种转录水平表达特异响应差异, 表明耐旱品种和敏感品种在干旱逆境时转录水平调控方式存在差异, 其对干旱逆境的忍受机理不相同, 这可能是他们耐旱性不同的根本原因。

由于转录因子数目众多, 其调控方式表现丰富的多样性, 这也就不难理解为什么 2 个品种在干旱逆境下, 有的转录因子家族种存在既有转录水平上调表达的, 也有转录水平下调表达的转录本, 这种表达的差异可能是植物重新组织和调节生理生化活动, 提高某些生命活动物质的数量, 抑制另一些物质的表达, 来适应干旱逆境胁迫, 减少其所受到的

伤害。

敏感品种和耐旱品种在干旱逆境条件下所表达的转录因子转录本有部分重叠, 表明不同耐旱性的品种在干旱逆境时有某种相同的反应机制, 这种机制应该与基础抗性有关。但这些重叠基因在 2 个品种中的诱导和抑制程度不同, 涉及 HB、HSF、C2C2-CO-like、Orphans、WRKY、C2H2 转录本, 这种表达程度不同表明这些家族的转录因子在 2 品种中干旱逆境时所起的调控作用不同, 存在品种差异。

4 结论

在 PEG 胁迫下, 耐旱品种湘丰早 119 和敏感品种爱华 5 号根系分别有 95 个和 129 个转录因子转录本与对照处理比较在转录水平表达发生变化; 其表达表现品种特异性; 2 个品种在 PEG 胁迫响应转录因子转录水平表达存在重叠转录本, 数目为 23 个; 2 个品种的 PEG 逆境响应转录因子基因在染色体上的分布存在差异, 重叠转录因子基因主要位于第 2 染色体和第 5 染色体。

References

- [1] Xiao Y-S(肖用森), Wang Z-Z(王正直), Guo S-C(郭绍川). The relationships between free praline and membrane lipid peroxidation in rice seedlings under osmotic stress. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物研究), 1996, (4): 16–20 (in Chinese with English abstract)
- [2] Liu E-E(刘娥娥), Zong H(宗会), Guo Z-F(郭振飞), Li Y-C(黎用朝). Effects of drought, salt and chilling stress on praline accumulation in shoot of rice seedlings. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2000, 8(3): 235–238 (in Chinese with English abstract)
- [3] Cai Y-P(蔡永萍), Yang Q-G(杨其光), Huang Y-D(黄义德). Effect of rice cultivated under paddy and upland condition on photosynthesis and senescence of flag leaf and activity of root system after heading. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2000, 14(4): 219–224 (in Chinese with English abstract)
- [4] Lu S-Y(卢少云), Guo Z-F(郭振飞), Peng X-X(彭新湘), Li M-Q(李明启), Li Y-C(黎用朝). The activities of protective enzymes of rice seedlings subjected to drought and their relationship to drought tolerance. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报), 1997, 18(4): 21–25 (in Chinese with English abstract)
- [5] Dai G-X(戴高兴), Peng K-Q(彭克勤), Xiao L-T(萧浪涛), Deng G-F(邓国富). Effect of drought stress simulated by PEG on malonaldehyde, proline contents and superoxide dismutase activity in low potassium tolerant rice seedlings. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2006, 20(5): 557–559 (in Chinese with English ab-

- stract)
- [6] Zhang Y-P(张玉屏), Li J-C(李金才), Huang Y-D(黄义德), Huang W-J(黄文江). Effect of water stress on the growth and some physiological characteristics of root system in rice. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2001, 29(1): 58–59(in Chinese with English abstract)
- [7] Li Z-C(李自超), Liu W-X(刘文欣), Zhao D-L(赵笃乐). Comparison of growing tendency during young seedling between paddy rice and upland rice under PEG water stress. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2001, 6(3): 16–20 (in Chinese with English abstract)
- [8] Li F(李锋), Li M-Y(李木英), Pan X-H(潘晓华), Zhu A-F(朱安繁). Biochemical and physiological characteristics in seedlings roots of different rice cultivars under low-phosphorus stress. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2004, 18(1): 48–52 (in Chinese with English abstract)
- [9] Zhao J-F(赵俊芳), Yang X-G(杨晓光), Chen B(陈斌). Effects of different irrigation treatments on root growth and water use efficiency of upland rice. *Chin J Agrometeorol* (中国农业气象), 2004, 25(4): 44–48 (in Chinese with English abstract)
- [10] Li X-Y(李贤勇), He Y-X(何永歆), Li S-W(李顺武), Wang C-T(王楚桃). Studies on the agricultural regulation to drought in rice. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 2005, 18(3): 244–249 (in Chinese with English abstract)
- [11] Liu Q, Zhao N M, Yamaguchi-Shnozaki K, Shnozaki K. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(11): 970–975
- [12] Wei M(魏敏), Xiong J-H(熊建华), Li Y-S(李阳生), Fu B-Y(傅彬英). Study on glycogen synthase kinase gene expression variation under drought stress in rice by real-time PCR. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2006, 20(6): 567–571 (in Chinese with English abstract)
- [13] Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra S K, Ganguli A, Scharf K D. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6: 177–189
- [14] Singh K B, Foley R C, Oñate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 430–436
- [15] Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton K A, Dangi J L, Dietrich R A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 2000, 26: 403–410
- [16] Aharoni A, Dixita S, Jetterb R, Thoenesa E, Arkela G, Pereira A. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16: 2463–2480
- [17] Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta S L, Tonelli C. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr Biol*, 2005, 15: 1196–1200
- [18] Haake V, Cook D, Riechmann J L, Pineda O, Thomashow M F, Zhang J Z. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 130: 639–648
- [19] Kim S, Kang J Y, Cho D I, Park J H, Kim S Y. ABF2, an ABRE binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J*, 2004, 40: 75–87
- [20] Kim S. The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiol Plant*, 2006, 126: 519–527
- [21] Oh S J, Song S I, Kim Y S, Jang H J, Kim S Y, Kim M, Kim Y K, Nahm B H, Kim J K. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol*, 2005, 138: 341–351
- [22] Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y Q, Shnozaki K, Yamaguchi-Shnozaki K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 1042–1052
- [23] Tran L S, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson S D, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shnozaki K, Yamaguchi-Shnozaki K. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress I promoter. *Plant Cell*, 2004, 16: 2481–2498
- [24] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osinato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I. Overexpression of the rice *Osmby4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J*, 2004, 37: 115–127
- [25] Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert H J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 2001, 13: 889–905
- [26] Gergely I, Korcak R F, Faust M. Polyethylene glycol induced water stress effects on apple seedlings. *Am Soc Hort Sci*, 1980, 105: 854–857