

基因芯片技术在植物抗逆机理研究中的应用

郭继娜, 张富春* (新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830046)

摘要 概述基因芯片技术的原理、特点及其在植物抗冻、耐盐、耐旱等方面的应用前景。

关键词 基因芯片; 植物抗逆; 胁迫; 应用

中图分类号 S311 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)27-12915-02

Application of Gene Chip Technology in the Mechanism Study of Plant Resistance

GUO Ji-na et al (Xinjinag Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract The principles and characteristics of gene chip technology, and the application foregrounds in the cold (freezing), salt and drought tolerance of plants were briefly reviewed.

Key words Gene chip; Plant resistance; Stress; Applications

基因芯片技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一门新型技术, 其汇集了分子生物学、微电子技术、高分子化学合成技术和计算机科学技术。1991 年, Affymatrix 公司运用半导体照相平板技术, 对原位合成制备的 DNA 芯片做了首次报道, 这是世界上的第 1 块基因芯片^[1]。1995 年, Stanford 大学 Brown 实验室发明了第 1 块以玻璃为载体的基因微矩阵芯片, 标志着基因芯片技术进入了广泛的生物医学研究领域^[2]。目前基因芯片技术已广泛应用于医药开发与研究^[3]、疾病诊断治疗^[4]、农作物良种选育及环境保护等多个领域^[5]。近年来, 随着植物抗逆机理研究的深入, 研究植物抗逆的方法也趋于完善, 基因芯片因其信息量大、操作简单、可靠性好、重复性强以及可以反复利用等诸多特点^[6], 在植物抗逆过程中发挥了重要的作用。笔者就基因芯片在植物抗冻、耐盐及耐旱等方面研究的应用进行综述。

1 基因芯片技术概述

基因芯片是生物芯片的一种类型, 又称 DNA 芯片、DNA 微阵列等。基因芯片的工作原理与经典的核酸分子杂交方法 (Southern blot、Northern blot) 是相同的, 是以许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 样品 DNA/RNA 通过 PCR 扩增、体外转录等技术掺入荧光标记分子, 然后按碱基配对原理进行杂交, 再通过荧光检测系统等对芯片进行扫描, 并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作出比较和检测, 可以快速地鉴定靶基因的存在、含量及单核苷酸的变化。基因芯片利用其高通量、微型化和自动化的特点, 可以在同一时间内平行分析大量的基因, 进行大信息量的筛选与检测分析^[7]。

目前检测基因表达的方法主要有 Northern blot、RT-PCR、mRNA 差异显示、cDNA 代表性差异分析等。这些方法都只能对少数几个基因的表达进行分析。但生物体是一个复杂的网络, 任何一个刺激都会牵动网络的许多环节, 只对少数几个基因的表达进行研究显然是不够的。生物芯片技术恰好能够从整个基因组水平上对某一刺激或疾病进行检

测^[8], 并利用多种分析手段得到直观的基因表达图谱和聚类分析图^[9]。

2 在植物抗冻方面的研究

2.1 植物抗冻研究现状 低温环境是影响植物生长的重要因素之一, 植物为抵抗低温环境, 在生长习性、生理生化、遗传表达等方面有各种特殊的适应特性, 即植物抗冻性。研究植物的抗冻性有助于人们了解植物抗冻机制并使之服务于生产实践, 尽可能地减少因冻害引发的生产损害。

植物抗寒性是由多基因控制的性状, 往往需要一系列相关基因的共同表达才能表现高抗寒特性, 仅靠转移单个基因而获得抗冻性强的植物有一定的难度。在进行植物抗寒性基因工程研究时, 应综合考虑各种环境胁迫之间的相互作用以及基因的转入对植物抵抗外界逆境综合适应性的影响, 进一步拓宽抗寒基因的来源, 才能为今后植物抗寒性分子改良开辟新的途径, 为培育抗寒新品种奠定基础。研究植物抗冻性一般是通过基因工程方法导入外源性的抗冻相关基因、如抗寒调控基因、抗渗透胁迫相关基因、抗冻蛋白基因、脂肪酸去饱和代谢关键酶基因及 SOD 基因等^[10]。

2.2 基因芯片技术在植物抗冻中的应用 Dong 等利用 Affymetrix 芯片对冷胁迫突变种的拟南芥 AtNUP160 进行分析, 发现这种突变体在冷胁迫下除了降低 CBF3-LUC 报告基因的表达, 还有许多与植物抗冻有关的其他基因也受到影响, 如冷诱导的 LEA 基因、糖代谢及氧化胁迫相关基因, 进而推断出拟南芥核孔蛋白 AtNUP160 在植物冷胁迫耐受过程中发挥着重要的作用^[11]。Mantri 等利用微阵列芯片分别对鹰嘴豆进行抗逆基因筛选, 通过寒冻敏感型及耐受型鹰嘴豆分别进行寒冻胁迫试验, 最后芯片分析结果成功筛选出 15 个寒冻胁迫相关基因, 进而推断出这些基因可能在植物抗寒过程中起到关键作用^[12]。Sasaki 等对拟南芥悬浮培养的细胞进行冷处理, 芯片分析结果显示所有冷调控基因中, 在短暂冷处理 1 d 表达上调的基因只出现在延滞期的细胞中, 而作用在上游信号转导的激酶和转录因子则表达大多下调。这表明在延滞期的细胞中这些基因可能与冷处理诱导的抗寒性有关^[13]。

3 在植物耐盐方面的研究

3.1 植物耐盐研究现状 土壤盐渍化是影响植物生长的又

基金项目 新疆维吾尔自治区科技重大专项 (200731138-3); 国家自然科学基金项目 (30460015)。

作者简介 郭继娜 (1983-), 女, 山东胶州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2009-05-11

一重要因素,当植物处于外界高盐浓度时,植物很容易丧失水分而变得干旱,此时只有当细胞的水势低于外界溶液时,才能保持吸水并存活下来,此时细胞常常通过在细胞内累积溶质的途径来降低其渗透势,增强根细胞的吸水能力,这种调节作用称为渗透调节。为了减少盐胁迫造成的伤害,植物在长期进化过程中,形成了一套耐盐的机制,或增加 Na^+ 的外排,或限制 Na^+ 的吸收,或将 Na^+ 束缚在液泡中^[14]。

高通量、大规模的基因表达分析丰富了人们对盐胁迫下植物基因表达调控机理的认识。研究发现,与盐胁迫应答有关的基因主要包括:参与离子转运和重建离子平衡有关的基因、参与渗透保护物质生物合成的基因、与水分胁迫相关的基因及与细胞排毒、抗氧化相关的酶基因等,它们涉及生理代谢、细胞防御、能量产生和运输、离子转运和平衡、细胞生长和分裂等诸多方面,这些基因以某种协调的机制发挥作用,维持盐胁迫下植物正常的生长发育^[15]。

3.2 基因芯片技术在植物耐盐中的应用 2006年,Wong等通过cDNA芯片对冷胁迫、盐胁迫、模拟干旱胁迫及干旱恢复试验后的小盐芥进行基因表达分析,得出共有154个基因表达发生变化,其中6个基因在3种胁迫条件下表达均发生变化,与干旱胁迫相关的基因在水分不足的条件下表达下调。另外,与冷胁迫相关的基因表达变化涉及到茉莉酸的存在,这说明小盐芥具有精确应对环境胁迫的能力^[16]。Sotomanto等利用Affymetrix ATH1基因芯片对盐处理不同时间的野生型拟南芥、*AtNHX1* T-DNA插入突变拟南芥和恢复系拟南芥进行基因表达谱分析,发现有57个基因在盐胁迫时对*AtNHX1*产生影响^[17]。而用基因芯片技术,分析耐盐小麦RH8706-49在不同盐胁迫时间下小麦根部基因的表达情况,获得了61 215个小麦基因的差异表达图谱。在不同盐胁迫时间下大量根部基因的表达发生很大变化,即有盐诱导表达的基因,也有盐抑制表达的基因,同时对杂交数据进行多种聚类分析,其中盐诱导表达基因的作用显得非常重要^[18]。

4 在植物耐旱方面的研究

4.1 植物耐旱研究现状 水是影响作物产量最重要的环境因素,全球干旱和半干旱面积占全球土地面积的1/3,而在我国这个比例更大,达到1/2,即使湿润地区短期不寻常的干旱也会影响作物的产量。进行植物的抗旱基因工程的研究,对于揭示植物的抗旱机理以及通过基因工程技术改善植物的抗旱性来减少水资源的压力具有重要的理论意义和现实意义。

近年来,随着植物功能基因组学、蛋白质组学研究的深入,从拟南芥以及其他植物中克隆到许多与抗旱相关的基因,一类是与信号传递和转录调控相关的调控蛋白,另一类是与保护细胞膜功能相关的一些蛋白^[19]。而利用基因芯片技术开张抗旱基因筛选与调控机制的研究,已经逐渐成为植物抗旱基因工程新方向。

4.2 基因芯片技术在植物耐旱中的应用 在植物抗旱胁迫方面,首都师范大学用基因芯片技术分析了正常情况下生长的抗一氧化氮的拟南芥突变体t387突变体的mRNA表达谱。芯片结果分析发现有405个基因发生明显上调,269个基因发生明显下调。并发现突变体在正常情况下,就表现出

明显的抗性相关基因上调现象。干旱处理后,突变体确有较强的抗旱能力,与野生型相比,t387突变体失水速率快、气孔孔径大、蒸腾速率快、光合速率慢,但t387突变体根系统特别发达,推测其抗旱的机理与其发达的根系是密不可分的^[20]。Giraud等利用基因芯片技术对选择性氧化酶1a(AOX1a)缺失型突变体拟南芥进行研究,发现在AOX1a缺失的情况下,拟南芥对干旱胁迫有极大的敏感性,进而说明AOX1a在细胞正常的氧化还原平衡中发挥着重要的作用^[21]。Huang等利用全基因组寡核苷酸芯片对土壤干旱胁迫下的拟南芥进行鉴定,发现大约2 000个干旱应答基因,其中大多数干旱调控基因在再浇水后3 h恢复到正常表达水平。分析表明,有2/3的干旱应答基因是通过ABA和/或ABA的类似物PBI425调控的^[22]。

5 展望

抗性基因的研究逐渐已由抗生物逆性(如抗病、抗虫)向抗非生物逆性(如抗寒、抗旱、抗盐等)领域转移,而非生物逆性的研究又由编码某种特定产物的功能基因向信号传导和基因表达调控等开关基因的方向发展。基因芯片作为一种生物技术平台,也已经应用到植物研究各个领域。利用基因芯片研究可以获得关于植物发育调节、代谢机理和作物分子育种等多方面的信息。虽然现在基因芯片技术还存在一些弊端,如假阳性高、成本大等,但随着研究技术的不断改良,基因芯片将在植物抗逆研究方面发挥更大作用。利用基因芯片大规模分析基因的表达特性,有助于未来解决植物抗逆机理的研究难题。

参考文献

- [1] FODOR S P, READ J L, PIRRUNG M C, et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis[J]. Science, 1991, 251: 767 - 773.
- [2] SCHENA M, SHALON D, DAVIS R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 368 - 371.
- [3] TREVINO V, FALCIANI F, BARRERA-SALDAÑA H A. DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research[J]. Molecular Medicine, 2007, 13(9/10): 527 - 541.
- [4] TARCA A L, ROMERO R, DRAGHICI S. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 195(2): 373 - 388.
- [5] AHARONI A, VORST O. DNA microarrays for functional plant genomics[J]. Plant Mol Biol, 2002, 48(1/2): 99 - 118.
- [6] LENOIR T, GIANNELLA E. The emergence and diffusion of DNA microarray technology[J]. Journal of Biomedical Discovery and Collaboration, 2006, 1: 11.
- [7] GRECO D, LEO D, DI PORZIO U, et al. Pre-filtering improves reliability of Affymetrix GeneChips results when used to analyze gene expression in complex tissues[J]. Molecular and Cellular Probes, 2008, 22(2): 115 - 121.
- [8] MOCKLER T C, ECKER J R. Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis[J]. Genomics, 2005, 85: 1 - 15.
- [9] WERNER T. Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19: 50 - 54.
- [10] LEE B, HENDERSON D A, ZHU J K. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1[J]. The Plant Cell, 2005, 17: 3155 - 3175.
- [11] DONG C H, HU X Y, TANG W P, et al. A putative *Arabidopsis* nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(24): 9533 - 9543.
- [12] MANTRI N L, FORD R, CORAM T E, et al. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 303.

用永宝牌有机-无机复混肥后春油菜增产效果显著。

表 2 各处理产量

Table 2 Yield of each treatment of experiment

处理 Treatment	各小区平均产量//kg Average yield of each plot	折合产量 kg/hm ² Converted yield	较对照增产//% Increment compared than CK
1	4.71	3 141.57	-
2	5.16	3 441.72	9.60
3	5.59	3 728.53	18.60
4	5.69	3 795.23	20.50
5	5.84	3 895.28	24.10

2.2 各处理间农艺性状分析 在春油菜收获期,每个处理

表 3 各处理农艺性状

Table 3 Agronomy characters of each treatment of the experiment

处理 Treatment	株高//cm Plant height	每株分枝数//个 Branches per plant	每株角果数//个 Silique number per plant	角粒数//粒 Seed number per silique	单株粒重//g Grain weight per plant	千粒重//g 1 000-grain weight
1	152.2	6.8	176.6	20.8	35.0	3.19
2	157.1	7.1	243.5	22.9	37.5	3.97
3	164.5	7.2	257.0	24.6	45.6	4.06
4	169.8	7.3	285.2	26.3	49.2	4.23
5	172.7	7.5	283.4	30.4	52.9	4.35

物营养、促进养分平衡的作用,有利于春油菜生长。

(2)施用有机-无机复混肥后各处理的春油菜产量均增产显著,最优处理的施用量为 1 500 kg/hm²,产量为 3 895.28 kg/hm²,较对照增产 24.10%。

(3)施用有机-无机复混肥后,以田间观察来看,春油菜长势健壮,茎秆较粗,分枝数多,叶色墨绿。施用有机-无机复混肥后春油菜农艺性状的各项指标均有提高。

(4)该试验结果表明,施用该有机-无机复混肥,能有效提高春油菜产量及主要农艺性状的各项指标,在青海省大面积推广该复混肥是可行的。

参考文献

- [1] 周少奇,肖锦. 城市污泥处理处置与资源化[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002.
- [2] 何晶晶,顾国维,李笃中. 城市污泥处理与利用[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [3] 邓佳卉,彭盘英. 污泥处置与资源化研究现状[J]. 南京师范大学学报,2004,4(3):20-23.
- [4] 邱琴,徐益章,黄忆红. 城市污泥对环境质量的影响[J]. 上海农业科

采集 20 株考种样品,带回室内进行农艺性状的调查考种。考种结果见表 3。考种指标主要有:株高、每株分枝数、每株角果数、角粒数、单株粒重、千粒重,以单株为测算单位,最后以 20 株的平均值进行分析。

从表 3 可以看出,春油菜处理 3~5 的 6 个考种指标的数值均高于空白对照和施用油菜专用肥的处理 2。说明施用永宝牌有机-无机复混肥后,春油菜的各项农艺性状指标数值均有提高。

3 结论与讨论

(1)污泥有机-无机复混肥含有大量的有机质和氮、磷、钾等营养成分,在春油菜上施用后,能起到培肥土壤、改善作

技,2004(4):8-9.

- [5] 李建颖,李树和,杨霞,等. 城市污泥处理处置及资源化研究进展[J]. 天津农学院学报,2007,14(4):42-46.
- [6] 杨丽标,邹国元,张丽娟,等. 城市污泥农用处置研究进展[J]. 中国农学通报,2008,24(1):420-424.
- [7] 邹绍文,张树清,王玉军,等. 中国城市污泥的性质和处置方式及土地利用前景[J]. 中国农学通报,2005,21(3):198-202.
- [8] 黎青慧,徐文华,司纲纪,等. 城市污泥农业利用研究[J]. 陕西农业科学,2001(11):24-26.
- [9] 谭启玲,胡承孝,赵斌,等. 城市污泥的特性及其农业利用现状[J]. 华中农业大学学报,2002,21(6):587-592.
- [10] 戎婷婷,胡瑞芝. 城市生活垃圾污泥有机-无机复混肥对油菜生长的影响[J]. 农业网络信息,2007(1):108-111.
- [11] 闫双堆,卜玉山,刘利军,等. 污泥垃圾复混肥对土壤养分状况和油菜生长及养分利用率的影响[J]. 山西农业大学学报,2006,26(3):273-278.
- [12] 赵莉,李艳霞,陈同斌,等. 城市污泥专用复合肥在草皮生产中的应用[J]. 植物营养与肥料科学,2002,8(4):501-503.
- [13] 丁文,王海勤. 城市污泥有机肥对马铃薯产量和品质及重金属吸收的影响[J]. 中国农学通报,2005,21(12):254-256.
- [14] 王瑞生. 青杂 3 号油菜新品种高产栽培优化技术研究[J]. 青海大学学报:自然科学版,2006,24(3):34-36.

(上接第 12916 页)

- [13] SASAKI Y, TAKAHASHI K, OONO Y, et al. Characterization of growth-phase-specific responses to cold *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells[J]. Plant Cell Environ, 2008, 31(3):354-365.
- [14] CHINNUSAMY V, SCHUMAKER K, ZHU J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55:225-236.
- [15] SHI H, ZHU J K. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid[J]. Plant Mol Biol, 2002, 50(3):543-550.
- [16] WONG C E, LI Y, LABBE A, et al. Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in *thellungiella*, a close relative of *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2006, 140:1437-1450.
- [17] SOTTOSANTO J B, SARANGA Y, BLUMWALD E. Impact of *AtNHX1*, a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter, upon gene expression during short-and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2007, 7:18.
- [18] 赵宝存,赵芊,葛荣朝,等. 利用基因芯片研究小麦耐盐突变体盐胁迫条件下基因的表达图谱[J]. 中国农业科学,2007,40(10):2355-2360.

- [19] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2005, 24:23-58.
- [20] 田丽丽. 拟南芥 t387 突变体的基因芯片分析及其抗旱机理的初步研究[D]. 北京:首都师范大学,2007:5.
- [21] GIRAUD E, HO L H M, CLIFTON R, et al. The absence of alternative oxidase in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress[J]. Plant Physiology, 2008, 147:595-610.
- [22] HUANG D Q, WU W R, ABRAMS S R, et al. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(11):2991-3007.
- [23] MA H Y, GUO R, LI H A, et al. Study on salinity tolerance of tomatoes during seed germination under different salt stress conditions[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4):4-7.
- [24] LIU J H, YU M F, HE D H. Study on biological characteristics and pupa's cold tolerance of *Liriomyza sativae* on *Florists cineraria*[J]. Agricultural Science & Technology, 2007, 8(3-4):29-32.
- [25] 马旭. 基因芯片技术及其研究现状和应用前景[J]. 中国医疗器械信息, 2002, 8(1):4-7.