

研究
简报

铝胁迫条件下小麦根系特异表达基因的研究

谷俊涛^{1,2} 韩胜芳^{1,2} 柏贵华³ 肖凯^{1,*}

(¹河北农业大学农学院; ²河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001; ³USDA/ARS and Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA)

摘要: 利用尼龙膜点阵杂交技术,由耐铝胁迫小麦品系 OK91G106 根系构建的 cDNA 差减杂交文库中,鉴定出 29 个铝胁迫特异诱导基因,包括 20 个已知生物学功能的基因和 9 个功能未知基因。这 20 个已知功能基因归属于植物体内细胞信号转导、活性氧清除、维持膜结构稳定、苹果酸分泌和细胞保护等类别。表明在铝胁迫下,植株体内在短时间内发生了感受铝胁迫逆境信号并进行了信号转导,调控了植株对铝胁迫逆境响应的复杂分子生物学过程。Northern 印迹对 5 个铝诱导基因转录本的检测结果与尼龙膜点阵技术获得的结果相一致。本研究鉴定出的铝诱导基因中含有 1 个苹果酸转运蛋白基因,表明苹果酸分泌量的增加可能是供试小麦响应和抵御铝胁迫逆境的重要机制之一。

关键词: 小麦 (*Triticum aestivum* L.); 铝胁迫; 抑制差减杂交; 诱导基因

Identification of Differential Genes in Wheat Roots under Aluminum Stress

GU Jun-Tao^{1,2}, HAN Sheng-Fang^{1,2}, BAI Gui-Hua³, and XIAO Kai^{1,*}

(¹ College of Agronomy; ² College of Life Science; Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; ³ USDA/ARS and Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA)

Abstract: Twenty-nine aluminum-induced genes were identified on the base of nylon filter arrays, which contained all clones from a suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library constructed from roots of OK91G106 (the wheat line with high ability of aluminum tolerance). The induced genes included 20 known biological functions and 9 functions unknown by BLAST_x analysis in international biological website NCBI. We found that the induced genes under aluminum stress could be classified into different groups according to the deduced biological function, including signal transduction, active oxygen scavenging, sustaining stability of membrane structure, secretion of malate, and protection of cellular function. It suggested that the wheat plants involved the perception and transduction of the signal of aluminum stress, by which to induce the expression of some genes response to aluminum stress in short time under aluminum stress condition. The results from Northern blot analysis for five induced genes were all similar to those from the nylon filter arrays. There was one malate transporter gene among the 29 aluminum-induced genes, indicating that the increase of malate secretion under aluminum stress condition is possibly an important mechanism for the tested wheat line to response and withstand the aluminum toxicity.

Keywords: Wheat (*Triticum aestivum* L.); Aluminum stress; Suppression subtractive hybridization(SSH); Induced genes

铝毒害是酸性土壤中作物的主要逆境之一。在世界范围内,30%左右耕地上作物受到铝离子过多的危害^[1,2]。铝改变细胞阳离子的交换能力,减少 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的吸收、诱导活性氧的产生和膜质过氧化,以及直接与 DNA 和 RNA 等遗传物质结合,使细胞的正常代谢和生理过程发生改变^[3,4]。过多的铝离子使根系形态发生改变、根系伸长速率和植株生长减慢^[1]。植株通过分泌苹果酸和柠檬酸等有机物质,与介质中的铝离子络合,是植物抵御铝毒害的重要机制之一^[5,6]。

近年来,植物在铝胁迫下的分子过程的研究日益受到重

视。迄今为止,在植物种属中已有 20 多个铝胁迫诱导基因被鉴定^[9]。其中,以 cDNA 文库筛查和差异显示技术鉴定出小麦的几个铝胁迫诱导和耐铝的相关特异表达基因^[10-11]。研究表明,植株对铝胁迫的响应和抵御涉及复杂的信号转导途径,铝胁迫处理使植物体内的许多生化代谢过程发生改变^[12]。常规方法在小范围内难以全面阐明植物对铝胁迫适应的分子过程。

抑制差减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术是富集特异表达 ESTs 的有效途径,具有在基因组水平

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划粮食丰产科技工程项目(2004BA520A07-04); 河北省自然科学基金项目(C2006000434)。

作者简介: 谷俊涛(1967-),男,河北宁晋县人,博士,副教授,主要从事植物分子生物学研究。

* 通讯作者(Corresponding author): 肖凯。E-mail: xiaokai3@yahoo.com

Received (收稿日期): 2006-07-11; Accepted (接受日期): 2006-12-18.

上对特异表达基因高效率富集且通量高等特点^[13-14]。作者在以前的工作中,以两个小麦耐铝性不同的近等基因系(铝敏感 Century 和耐铝性强 OK91G106)为材料,采用 SSH 和尼龙膜点阵杂交技术,鉴定了与 Century 相比 OK91G106 中特异表达的耐铝相关基因 25 个^[15]。但迄今,与非铝胁迫的正常生长条件(CK)相比,铝胁迫诱导的小麦转录谱所发生的变化尚不清楚。本研究继续进行了耐铝相关基因的鉴定工作。

1 材料和方法

1.1 试验材料培养

导入 Atlas 耐铝基因的 Century 近等基因系 OK91G106 种子由美国 Oklahoma State University 的 Carver 博士提供。将其播于装有蛭石和营养土(1:1)的塑料钵中,在温度 20℃/16℃、光周期 16 h 的光照培养箱中培养。播种后,每天浇灌一次 Hoagland 培养液。当植株株高达 10 cm 时,将植株分为对照(CK)和处理组两组。对照组仍每天浇灌 Hoagland 培养液;处理组则在每天浇灌的 Hoagland 培养液中,加入 0.3 mmol L⁻¹ AlK(SO₄)₂ (pH 4.1)。在处理 6 h、24 h 和 48 h 后,分别对对照和铝处理根系进行取样,液氮速冻后于 -80℃ 下贮存,待用于总 RNA 的提取和文库构建等。

1.2 cDNA 抑制差减杂交(SSH)文库构建

采用 Trizol 试剂(GIBCO, USA)提取对照和铝处理 6 h、24 h 和 48 h 后根系混合样本的总 RNA,采用 mRNA 分离试剂盒(MessengerMaker kit, GIBCO, USA)分离对照和处理的 mRNA。用 cDNA 差减试剂盒(The PCR-select cDNA Subtraction Kit, Clontech, USA),构建含有不同处理时间点 mRNA 的 OK91G106 铝胁迫处理与对照的抑制差减杂交(SSH)文库。文库构建时,用 5 倍量的无铝胁迫正常生长(CK)的根系 cDNA,变性为单链,作为扣除铝处理相同表达基因的 Driver,与铝胁迫处理[0.3 mmol L⁻¹ AlK(SO₄)₂ (pH 4.1)处理 24 h]根系已变性为单链的 cDNA 杂交,再用锚定引物对富集铝胁迫处理根系中的铝诱导基因进行特异扩增。依据 TA 克隆技术,建立富集特异铝诱导基因的根系 cDNA 差减杂交文库。

1.3 Macroarray 尼龙膜点阵的建立

在构建的差减文库中共得到 693 个克隆。采用常规碱裂解法提取所有克隆的质粒。参照 Xiao 等的方法建立尼龙膜点阵^[15]。以质粒载体含有的 M13 通用引物,扩增载体中的插入片段,共扩增出高纯度产物 655 个。扩增产物用乙醇纯化、沉淀后,用灭菌蒸馏水溶解,浓度调整为 0.3 μg μL⁻¹,转移至 384 孔盘中。100℃ 下变性 10 min,于冰上用 384-pin 复制器(V & P scientific, San Diego, USA)转印在尼龙膜上。在膜的两侧,分别点印 Actin 基因 PCR 产物和空载体 DNA,作为阳性和阴性对照。

1.4 特异表达基因的鉴定

用差减文库筛查试剂盒(Subtracted Library Screen Kit, Clontech, USA),按照试剂盒说明书筛查铝胁迫诱导的基因。参照 Xiao 等^[15]的方法采用 Trizol reagent (GIBCO, USA)分别提取正常生长(CK)和铝胁迫处理幼苗根系的总 RNA,再用反转录试剂盒(TaKaRa)将总 RNA 中的 mRNA 反转录为

cDNA。然后采用文库筛查试剂盒对 cDNA 进行化学荧光标记。最后进行杂交和信号检测,通过比较尼龙膜点阵中 655 个克隆基因在 CK 和铝胁迫处理中的表达程度,鉴定铝胁迫特异诱导基因。每个杂交处理均重复 3 次。将铝胁迫处理中表达高于 CK 中表达 1.5 倍以上的基因,确定为铝诱导特异表达基因。

1.5 序列测定和 BLAST 分析

对铝胁迫诱导基因进行序列测定(上海 Sangon)。通过 NCBI 网站 BLAST⁺ 生物信息学工具,检索铝胁迫诱导基因的可能生物学功能。

1.6 Northern 印迹分析

从 29 个铝胁迫诱导表达的基因中,选出超氧化物歧化酶基因(Superoxide dismutase-Fe)、锌指蛋白基因(Zinc finger protein)、小麦 wali5 基因(Triticum aestivum wali5)、谷胱甘肽 S 转移酶基因(Glutathion-S-transferase Clo47)和苹果酸转运蛋白基因(Malate transporter),通过 Northern 印迹分析上述基因在对照和铝胁迫 6 h、24 h 和 48 h 处理根系中的转录本。将对照和不同时间点铝处理的根系样本总 RNA 等量上样,甲醛琼脂糖电泳后转移至尼龙膜上,参照 Xiao 等的方法进行 Northern 印迹分析^[16]。其中,用 M13 通用引物,从候选基因克隆的质粒中扩增 PCR 产物,采用³²P-dCTP 标记的随机引物标记法(Invitrogen),获得 Northern 印迹分析的探针。

2 结果与分析

2.1 cDNA 抑制差减文库的检测

建立的文库共含有 693 个克隆。提取所有克隆的质粒,用 M13 通用引物进行检测,发现 655 个克隆含有插入片段,其中多数长度变化在 200~600 bp 之间,与预期结果一致。部分克隆的 PCR 结果如图 1 所示。

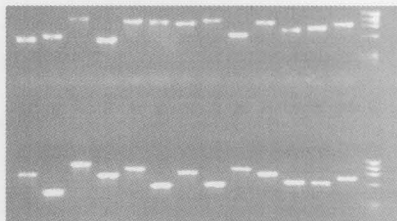


图 1 cDNA 差减杂交文库中部分克隆插入片段的 PCR 扩增结果
Fig. 1 The PCR results of inserted fragments of random selected clones in constructed cDNA SSH library

2.2 铝胁迫诱导表达谱分析

CK 和铝胁迫标记探针与 cDNA 尼龙膜点阵的杂交结果如图 2 所示。将每次杂交处理信号的三次重复,通过阳性对照 Actin 的表达水平进行均一化(normalized)后平均,再将所有克隆基因在铝胁迫处理中的表达数值与在 CK 中的表达数值相比,获得结果示于图 3。可见,在 cutoff 值为 1.5 的条件下,多数文库中的克隆基因在对照和铝胁迫(24 h)不同处

理下的表达水平差异较小。在所有克隆中,共鉴定出 31 个在铝胁迫下表达较 CK 高 1.5 倍以上的诱导基因。

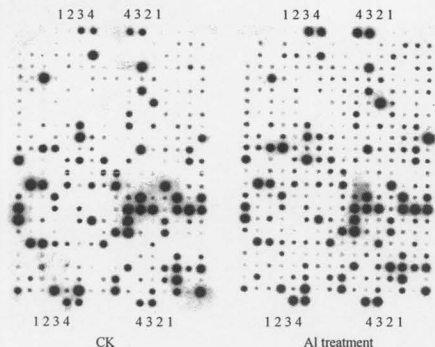


图 2 尼龙膜点阵对 cDNA 抑制差减文库基因表达水平的鉴定
Fig.2 Identification of the expression levels for genes from the SSH library based on macroarray blotting analysis

1,2:阴性对照;3,4:阳性对照。

1, 2: negative control; 3, 4: positive control.

2.3 铝胁迫诱导的特异表达基因的序列测定和功能分组

将尼龙膜点阵杂交后鉴定的 31 个铝胁迫特异诱导基因

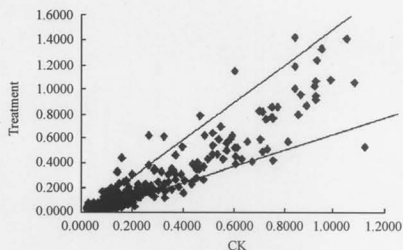


图 3 cDNA 抑制差减文库中各基因在对照和铝处理下表达水平的比值

Fig.3 Ratios of the expression levels for every gene in SSH cDNA library between control and aluminum treatment

进行序列测定表明,其中有 4 个序列两两完全相同,因此,非重复铝诱导基因的数量为 29 个。通过 NCBI 网站的 BLAST₊进行同源性比对,在 29 个铝诱导基因中,20 个在 GenBank 中检索到可能的生物学功能,另外 9 个为未知功能基因。这 20 个基因可划分为细胞信号转导、转录调节因子、活性氧清除系统、膜结构稳定、细胞保护和苹果酸转运等不同类别(表 1),表明小麦植株对铝胁迫的响应涉及到复杂的分子生物学过程。其中,苹果酸转运蛋白基因的存在表明,苹果酸分泌量的增加可能是供试小麦响应和抵御铝胁迫逆境的重要机制之一。

表 1 尼龙膜点阵在 OK91G106 中鉴定的铝诱导基因及功能分类

Table 1 Induced genes under aluminum stress and their classifications identified in OK91G106 based on nylon filter arrays

基因功能 Gene function	克隆号 Clone No.	可能基因 Putative gene	登录号 Accession No.	一致性 Identity (%)	E 值 E-value	种属 Organism
信号转导 Signal transduction	EST100	<i>Serine/threonine protein phosphatase (MOJ9.27)</i>	AY042854.1	87	3e-22	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
	EST101	<i>Protein kinase family</i>	NM-121855.2	94	7e-21	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
	EST102	<i>Putative calcium-dependent protein kinase</i>	NM-192859.1	90	2e-38	水稻 <i>Oryza sativa</i>
	EST103	<i>ABA-regulated gene cluster</i>	AF085279	99	1e-67	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
转录因子 Transcription factor	EST104	<i>Putative transcription factor</i>	AF113521	85	5e-42	玉米 <i>Zea mays</i>
	EST105	<i>Zinc finger protein</i>	VV118471	84	7e-47	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
活性氧清除 ROS scavenging	EST106	<i>Superoxide dismutase-Fe</i>	AB014056.1	90	5e-64	水稻 <i>Oryza sativa</i>
	EST107	<i>Manganese superoxide dismutase (SOD-3)</i>	M33119.1	94	1e-72	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
	EST108	<i>Glutathion-S-transferase Cla47</i>	AY064480.1	99	0	小麦 <i>Triticum aestivum</i>
细胞膜结构 Cell membrane structure	EST109	<i>Putative proline-rich and glycine protein</i>	AJ24280.1	88	3e-15	鼠尾粟属 <i>Sporobolus stapfianus</i>
	EST110	<i>Seven transmembrane protein Mlo8</i>	AY029319.1	87	2e-95	玉米 <i>Zea mays</i>
细胞功能 Cellular function	EST111	<i>ZIL/PNH homologous protein</i>	AB081950.1	90	6e-84	玉米 <i>Zea mays</i>
	EST112	<i>Putative selenium binding protein (SBP)</i>	NM-189943.1	86	1e-35	水稻 <i>Oryza sativa</i>
未知 Unknown	EST113	<i>Tubulin-folding cofactor</i>	HSU61232	99	1e-17	人 <i>Homo sapiens</i>
	EST114	<i>Ribosomal protein S4 (rps4)</i>	AF015522	91	9e-40	人 <i>Homo sapiens</i>
	EST115	<i>Putative magnesium transporter</i>	ATH297817	81	7e-27	玉米 <i>Zea mays</i>
	EST116	<i>Putative high-affinity potassium transporter</i>	AF025292	95	1e-94	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
	EST117	<i>WHTTEFIX TEF1 alpha subunit</i>	M90077.1	99	1e-93	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>
	EST118	<i>Triticum aestivum protein (wali5)</i>	L11882.1	100	1e-53	小麦 <i>Triticum aestivum</i>
	EST119	<i>Malate transporter</i>	AB243164	96	1e-93	小麦 <i>Triticum aestivum</i>
	EST120					
	EST121					
	EST128					

2.4 部分铝诱导基因的 Northern 印迹鉴定

在已知可能生物学功能的 20 个铝诱导特异表达基因中选出 5 个基因,包括 *Superoxide dismutase-Fe*、*Zinc finger protein*、

Triticum aestivum wali5、*Glutathion-S-transferase Cla47* 和 *Malate transporter*, 进行对照(CK)和铝处理不同时间点的 Northern 印迹分析。结果表明,上述基因均表现铝胁迫的诱导特性。且

诱导 24 h 的表达强度与对照表达强度的比值也与尼龙膜点阵取得的结果相似(图 4)。说明本研究中,通过龙膜点阵鉴定的铝诱导表达基因是可信的。

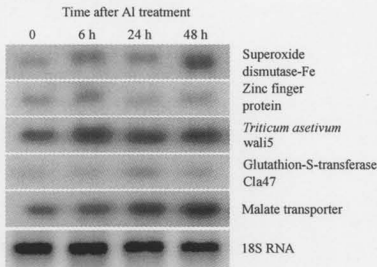


图 4 部分铝诱导基因的 Northern 印迹分析

Fig. 4 Northern blot analysis of some induced genes identified in macroarray analysis

3 讨论

与基因文库筛选技术和差异显示技术相比, cDNA 抑制差减杂交技术(SSH)是在基因组水平上高效率富集特异表达基因的有效方法^[13-14]。本研究中铝诱导特异表达基因占总基因的比例为 4.43%。作者在先前的相关研究中,以 OK91C106 和其铝敏感近等基因系 Century 为材料,通过尼龙膜点阵杂交技术,在富集耐铝相关基因的 cDNA 抑制差减文库(Century 为扣除 OK91C106 表达的相同基因的 Driver)中,鉴定了 25 个耐铝相关基因,占总鉴定基因的 4.07%^[15]。表明 SSH 技术是富集逆境条件下植物特异表达基因的有效方法。

前人在不同的植物种属中,已鉴定了 20 余个铝诱导相关基因^[9],其中在小麦中鉴定的有 *walis5 ubiquitin*、Fe-SOD 超氧化物歧化酶基因和 *glutathione S-transferase* 等^[10-11]。本研究除这部分前人已经鉴定的小麦铝诱导基因外,还鉴定出功能上分别归属于细胞信号转导、转录因子调控、活性氧清除系统、维持膜结构稳定、苹果酸转运和细胞保护等类别的基因,表明在铝胁迫下,植株体内在短时间内发生了感受铝胁迫逆境的信号并在细胞内部和细胞间转导、激活调控下游基因表达的转录因子调控保护功能基因的表达,增强对铝胁迫逆境响应和适应的能力。

在铝胁迫条件下,根系分泌苹果酸、柠檬酸等有机酸类物质增多,是植物耐铝的重要机制之一^[5-8]。其中,苹果酸等对植物的解毒作用,主要是其与铝离子的络合作用使根际铝离子浓度降低所致^[17-19]。对小麦品种 Atlas 的研究发现,在铝胁迫条件下,苹果酸等有机酸类物质分泌量的增多,是其耐铝性较强的重要生理机制之一^[20-21]。Ma 等对耐铝性较强的小麦和荞麦品种的研究表明,在铝胁迫后的较短时间内,诱导苹果酸的分泌数量即显著增加,其增加与控制苹果酸等转运的膜物质通道密切相关,而与苹果酸的合成等代谢酶类的关系较小^[22]。前人及本研究在已鉴定出的 20 余个植物铝诱导和相关基因中,没有发现有有机酸合成和代谢的相关基因。本研究鉴定出苹果酸转运蛋白基因表明,在铝胁迫条件

下位于细胞膜上的苹果酸转运蛋白基因的表达增强,可能是铝胁迫条件下植株根际苹果酸分泌数量增多、耐铝能力增强的可能原因之一。

References

- [1] Von Uexkull H R, Mutert E. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil*, 1995, 171: 1-15
- [2] Chaffai F, Marzouk B, Ferjani E F. Aluminum mediates compositional alterations of polar lipid classes in maize seedlings. *Phytochemistry*, 2005, 66: 1903-1912
- [3] Meriga B, Reddy B K, Rao K R, Reddy L A, Kishor P B. Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *J Plant Physiol*, 2004, 161: 63-68
- [4] Jones D L and Kochian L V. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Aluminum cytotoxicity. *FFBS Lett*, 1995, 400: 51-57
- [5] Delhaize E, Ryan P R, Randall P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol*, 1993, 103: 695-702
- [6] Delhaize E, Ryan P R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol*, 1995, 107: 315-321
- [7] Pellet D M, Papernik L A, Kochian L V. Multiple aluminum-resistance in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiol*, 1996, 112: 591-597
- [8] Zhang W H, Ryan P R, Tyerman S D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1459-1472
- [9] Milla M A R, Butler E, Huete A R, Wilson C F, Anderson O, Gustafson J P. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1706-1716
- [10] Snowden K C, Gardner R C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol*, 1993, 103: 855-861
- [11] Cruz-Ortega R, Cusman J C, Owenby J. cDNA clones encoding 1,3-β-glucanase and a fibrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiol*, 1997, 114: 1453-1460
- [12] Eakli B, Katsuhara M, Kawamura M, Matsumoto H. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 127: 918-927
- [13] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell P A, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030
- [14] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F C, Siebert D. Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. *Meth Enz*, 1998, 303: 349-380
- [15] Xiao K, Bai G H, Carver B F. Nylon filter arrays reveal differential expression of expressed sequence tags in wheat roots under aluminum stress. *J Integ Plant Biol*, 2005, 47: 839-848
- [16] Xiao K, Harrison M, Wang Z Y. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta*, 2005, 222: 27-36
- [17] Basu U, Goodbold D, Taylor C J. Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J Plant Physiol*, 1994, 144: 747-753
- [18] Li X F, Ma J F, Matsumoto H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1537-1543
- [19] Ryan P R, Delhaize E, Randall P J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, 1995, 196: 103-110
- [20] Carver B F, Whitmore W E, Smith E L, Bona L. Registration of four aluminum-tolerant winter wheat germplasm and two susceptible near-isolines. *Crop Sci*, 1993, 33: 1113-1114
- [21] Tang Y, Garvin D F, Kochian L V, Sorrells M E, Carver B F. Physiological genetics of aluminum tolerance in the wheat cultivar Atlas 66. *Crop Sci*, 2002, 42: 1541-1546
- [22] Ma J F, Taketa S, Yang Z M. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol*, 2000, 122: 687-694