

盐胁迫下小麦耐盐突变体后代 差异 cDNA 的分离和鉴定

陈桂平^{1,2}, 黄占景¹, 马闻师¹, 沈银柱¹

(¹ 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; ² 唐山师范学院生物科学技术系, 唐山 063000)

摘要: 采用 cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism) 技术分析了遗传背景相近的小麦后代突变体中, 耐盐性较强的 RH8706-49 (salt resistant, SR) 和盐敏感的 H8706-34 (salt sensitive, SS) 在盐胁迫和非胁迫情况下基因表达的差异。结果表明, 其中 88.1% 的条带在 4 个样品中是一致的, 只有 11.9% 的条带在 4 个样品中表现出差异。选取其中的 68 个差异条带进行克隆, 测序 35 个, 经 Internet 进行 Blast 比较, 发现 11 个片段 (31.4%) 与已知基因具有较高的同源性, 主要涉及与离子转运有关的蛋白、与信号转导有关的蛋白以及与氧化胁迫有关的蛋白; 另外 24 个片段 (68.6%) 与已知基因同源性较低或未发现同源性, 可能是一些未知基因。

关键词: 小麦; cDNA-AFLP 技术; 盐胁迫; 突变体

Isolation and Characterization of the cDNA Fragments of Wheat Involved in Salt Stress

CHEN Gui-ping^{1,2}, HUANG Zhan-jing¹, MA Wen-shi¹, SHEN Yin-zhu¹

(¹ College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016;

² Biology and Science Technology Department, Tangshan Teacher College, Tangshan 063000)

Abstract: cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) was used to isolate genes differentially expressed in salt-stressed and unstressed wheat lines RH8706-49 and H8706-34 derived from a single seed. RH 8706-49 is a salt-stress resistant (SR) line and H8706-34 is a salt-stress sensitive (SS) line. About 88.1% of the cDNA fragments were expressed in all the four samples, 11.9% were different among the samples. Sixty-eight cDNA fragments were cloned, 35 of them were subject to sequence analysis. Database searches indicate that 11 cDNA fragments show high homology to known genes, which mainly include proteins related to ion transport, signal transduction and oxidative stress. The remaining 24 cDNA show no detectable homology to known genes, suggesting that they probably represent novel genes.

Key words: Common wheat; cDNA-AFLP; Salt stress; Mutant

土壤盐分的积累严重影响农作物生长。植物体内离子浓度增高, 造成细胞内渗透压变化, 使水分摄入减少, 从而影响植物对矿物质的吸收。关于模式生物酵母、拟南芥和水稻的耐盐性研究主要着重于分析盐胁迫蛋白^[1]及有机物质的积累^[2]、体内 Na⁺ 离子分布^[3]、盐胁迫下基因表达调控^[4]等几个方面, 近年来取得了较大进展, 最为出色的是 Zhu^[5]通过筛选盐敏感突变体建立了 SOS 信号转导途径。目

前, 关于小麦的耐盐机理知之甚少, 其中一个主要原因是缺乏遗传背景相似而耐盐性有差异的遗传材料。

河北师范大学遗传教研室利用小麦花药培养并通过 EMS 诱变, 由遗传背景相近的小麦后代“一粒传”中获得一系列耐盐性差异明显的突变体, 该突变体已稳定遗传 12 代^[6]。本试验利用新近发展起来的 cDNA-AFLP 技术, 对“一粒传”后代中耐盐品系

收稿日期 2002-06-24

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30070471)和河北省自然科学基金资助项目(301103)

作者简介 陈桂平(1972-), 女, 河北泊头人, 讲师, 硕士, 主要从事分子遗传学研究。沈银柱为通讯作者, Tel: 0311-6268230; E-mail: ShenYinzhu@hotmail.com

(SR)和盐敏感品系(SS)进行盐胁迫前后的基因表达分析,为了解小麦SR品系的耐盐机理提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究供试材料为普通小麦(*Triticum aestivum* L.)“一粒传”后代中的耐盐突变体RH8706-49(耐盐指数 ≥ 1.3)和对盐比较敏感的H8706-34(耐盐指数 ≤ 0.5)两个品系。

两个品系的种子经25℃水浸泡24h,待种子吸胀后转至培养皿内,生根发芽后放入光照培养箱内25℃水培,每日光照8h,每天换水1次。长至二叶一心时,移至1/2 Hoagland培养液,每品系各分两个处理,其中一个不加盐的作为对照,另一个加入1%的NaCl。盐胁迫处理72h后,届时分别取4个处理的第二片叶迅速液氮冷冻以备提取RNA。

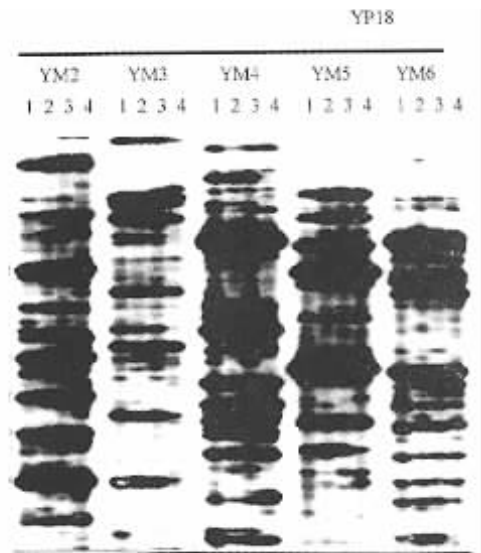
1.2 cDNA-AFLP

cDNA-AFLP按照Bachem等^[7]的方法进行。分别提取4个处理小麦样品叶片的总RNA(Qiagen Plant RNeasy Kit, Germany)而后用等量的总RNA反转录成cDNA第1条链(Gibco/BRL SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase)利用SMART cDNA Library Construction Kit(Clontech, USA)合成cDNA第2条链。将其产物沉淀浓缩后,经PstI/MseI酶切并加接头进行预扩增,扩增产物稀释后作为cDNA-AFLP的模板。用 γ -³²P-dATP标记PstI引物,经各种不同引物组合(PstI+3/MseI+2)选择性扩增后,测序胶分离其产物,X光片曝光,从胶上切取差异表达的基因片段,回收并以其为模板,用相同的引物进行2次扩增,其产物克隆到T载体上,序列测定用CEQ1000-DNA序列测定仪完成。所得测序结果通过Internet进行Blast检索。

2 结果与分析

2.1 小麦耐盐突变体盐胁迫前后差异表达基因的cDNA-AFLP分析

为了分离与小麦耐盐有关的基因,对“一粒传”后代小麦耐盐突变体中耐盐性较强的SR品系和对盐敏感的SS品系在盐胁迫前后的基因表达情况进行了分析,试验中先后用90对引物组合进行选择性的扩增,共获得长度在100~600bp之间的cDNA扩增条带4860条(图1)。随机选取6对引物组合的扩增结果,对基因表达的异同进行统计(表1),结果表明,88.1%的条带在4个样品中均有表达,在盐胁迫



泳道1~4分别为SR-0NaCl、SR-1%NaCl、SS-0NaCl和SS-1%NaCl;引物组合为YP18和YM2、3、4、5、6

Lane 1-4 indicate that SR-0NaCl, SR-1%NaCl, SS-0NaCl and SS-1%NaCl. The primers are combinations of YP18 and YM2, 3, 4, 5, 6

图1 一个典型的cDNA-AFLP扩增结果

Fig.1 A classical selective amplification results

表1 cDNA-AFLP片段差异表达分析¹⁾

Table 1 Analysis of the differentially expressed fragments from cDNA-AFLP

引物组合 Primer combination	SNI	SIN	SAS	SIR	SIS	总计 Total
P14M4	36	4	2	1	0	43
P18M2	50	1	4	0	0	55
P12M8	40	3	3	2	1	49
P20M5	55	2	2	1	1	61
P18M5	45	2	3	0	2	52
P7M7	48	0	2	0	1	51
Total	274	12	16	4	5	311
Rate(%)	88.10	3.86	5.14	1.29	1.61	100

¹⁾ SNI:与盐胁迫无关的基因;SIN:盐诱导基因;SAS:盐抑制基因;SIR:在耐盐材料中特异表达的基因;SIS:在盐敏感材料中特异表达的基因。下同

SNI: salt-stress non-inducible; SIN: salt-stress inducible; SAS: salt-stress suppressible; SIR: salt-stress inducible in SR; SIS: salt-stress inducible in SS. The same as below

前后的表达量没有明显变化,初步认为其可能代表了小麦中的house-keeping基因;另外的11.9%的条带在4个样品中有差异,其中在两个品系盐胁迫后表达量均明显增强的条带,属盐诱导基因(salt-stress inducible, SIN)占3.86%;在两个品系中盐胁迫后表达量明显减弱的条带,属盐抑制基因(salt-stress suppressible, SAS)占5.14%。初步认为,它们与各自的遗传背景无关,可能代表了小麦中共有的与盐胁迫

相关的基因。而在 SR 品系中受盐胁迫诱导特异表达基因(salt-stress inducible in SR ,SIR)的扩增产物占 1.29% ;在 SS 品系中受盐胁迫诱导(salt-stress inducible in SS ,SIS)特异表达基因的扩增产物占 1.61%。这些扩增产物与各自遗传背景密切相关,代表了耐盐或对盐敏感的小麦叶片中盐诱导表达的基因,可能与耐盐或对盐敏感的机制有关。

2.2 差异片段的分离和鉴定

从 700 多条差异表达的条带中,选取片段稍大 (> 100 bp)且表达量较高的 87 个片段,从胶上切下,溶解回收后,利用相应的 PstI 和 MseI 引物进行普通 PCR 扩增,通过 1.1%的琼脂糖凝胶电泳检测。图 2 显示部分差异片段的 2 次扩增结果。把其中的 68 个片段与 T 载体连接,转化 E. coli DH5α 菌株,经蓝白斑筛选以及 PCR 鉴定,确定的阳性克隆见图 3,随机选取其中的一部分进行 DNA 序列测定。

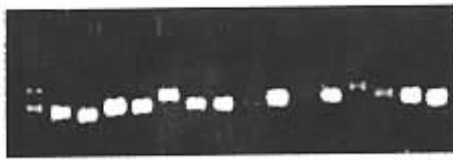


图 2 部分差异片段的 2 次扩增产物的凝胶电泳

Fig.2 Aagrose gel analysis of second amplification products from part differential fragments

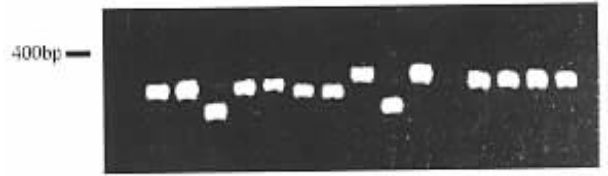


图 3 部分差异片段的阳性克隆 PCR 鉴定

Fig.3 PCR Identification of positive clone part differential fragments

2.3 差异片段的序列分析和比较

从 68 个阳性克隆中选取 35 个进行 DNA 序列测定,并对测序结果进行 Internet 联机检索,发现有 11 个片段(占测序部分的 31.4%)与已知基因具有较高的同源性。主要包括编码与离子转运有关的蛋白,如 SIR38 为阳离子转运 ATP 酶;与信号转导有关的蛋白,如 SIN25、SAS30 和 SAS88 片段均为蛋白激酶,SAS100 为受体类的蛋白激酶;与氧化胁迫有关的蛋白或酶类,如 SIR12 与半胱氨酸合酶同源,SIN23 与细胞色素 P₄₅₀同源(表 2)。这些基因均与耐盐性有很密切的关系。24 个基因片段(占测序部分的 68.6%)与已知基因同源性很低或没有同源性,可能代表部分尚未报道的新基因。这些结果表明,利用 cDNA-AFLP 技术,分析小麦单粒传后代的耐盐和盐敏感突变体,在盐胁迫前后基因表达的变化,可分离到与盐胁迫密切相关的基因。

表 2 部分 cDNA-AFLP 差异片段在 GenBank 的 Blast 结果¹⁾

Table 2 Blast results of the differential fragments from cDNA-AFLP in GenBank

类型 Group	cDNA-AFLP 差异片段的编号 No. of cDNA-AFLP differential fragments	长度 (bp) Length	表达类型 Expression type	GenBank 中的基因编号 Number in Genbank	同源基因 Homologous gene	P 值 P value
与离子转运有关的蛋白 Ion transportaion related protein	38	244	SIR	BAA97238	阳离子转运 ATP 酶 Cation-transporting ATP	1.6e-28
与信号转导有关的蛋白 Signal transduction related protein	25	181	SIN	O81230	表面激酶 SHAGGY Kinase homolog	5.5e-09
	88	299	SAS	CAC05444	蛋白激酶类 Protein kinase-like	1.4e-18
	100	479	SAS	Q91LN5	感受器类蛋白激酶 Receptor-like protein kinase	1.4e-46
与氧化胁迫有关的蛋白 Oxidation stress related protein	12	406	SIR	Q9XEA7	半胱氨酸合酶 Cysteine synthase	4.1e-43
	23	363	SIN	O04980	细胞色素 P ₄₅₀ (Cytochrome P ₄₅₀)	4.7e-26
其它 Others	3	153	SIR	Q9SDC3	类似 DNA 旋转酶亚单位 Similar to DNA gyrase subunit B	2.0e-17
	42	207	SIR	BAB08320	类似 GTP 酶激活蛋白 Similarity to GTP ase activating	1.1e-15
	73	271	SIR	Q13887	人类转录因子 Human tamscription factor	0.011
	95	269	SIR	O04504	类似烟草盐诱导蛋白 Similar to N. tabacum salt-inducible	0.020

¹⁾ P blast 值,代表同源性高低
P blast score, indicates the similarity

3 讨论

小麦耐盐性的产生可能与多种不同种类基因差异表达有关。本试验利用 cDNA-AFLP 技术从小麦耐盐突变体中分离了一批与盐胁迫相关的基因,为了解小麦 SR 品系的耐盐机理提供了线索。如 SIR38 基因片段与编码拟南芥阳离子转运 ATP 酶 (cation transporting ATPase) 基因和裂殖酵母的钙离子转运 ATP 酶 (calcium transporting ATPase) 基因有较高的同源性。在番茄、烟草和大豆^[8]中均已发现 NaCl 胁迫导致 Ca^{2+} - ATP 酶表达增强。又如 SIR12 基因片段编码与水稻半胱氨酸合酶 (cysteine synthase) 基因同源的片段。Barroso 发现在拟南芥中有一种编码半胱氨酸合酶的基因 *Atcys-3A* 能被 NaCl 和重金属诱导表达^[9]。以上两个基因片段首次在小麦中分离到,又在耐盐材料中表达较强,因此对上述基因的进一步研究,对于我们了解小麦耐盐机制有非常重要的作用。

另外,本试验共分离到 4 个与蛋白激酶同源的基因片段,包括 SIN25、SAS30、SAS88、SAS100。其中受盐诱导的 SIN25 与编码 GSK-shaggy 激酶基因同源,现已克隆到该基因的全长 cDNA,并经 Northern 杂交进一步证明其表达是受盐胁迫诱导的,而且在耐盐材料中诱导表达更为明显,推测可能在小麦盐胁迫信号转导途径中起作用。有趣的是其它 3 个片段都受盐抑制。因此蛋白激酶在植物信号转导中的作用是广泛的,它们可能在小麦盐胁迫下的信号转导途径中有不同的作用。

总之,通过 cDNA-AFLP 分析从小麦耐盐突变体中获得了大量与耐盐相关的基因片段,对这些同源性较高的片段和未知基因片段的进一步研究,可以加深对小麦耐盐机制的了解,对将来培育耐盐的农作物,利用大面积的盐碱地,提高粮食作物的产量有

深远意义。

致谢:该项研究曾得到中国科学院发育生物学研究所薛勇彪研究员的悉心指导,在此致谢。

References

- [1] DeRocher E J, Bohnert H J. Development and environmental stress employ different mechanisms in the expression of a plant gene family. *The Plant Cell*, 1993, 5: 1 611 - 1 625.
- [2] McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Molecular Biology*, 1992, 40(18): 1 - 11.
- [3] Blumwald E, Aharon G S, Apse M P. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465: 140 - 151.
- [4] Sheen J. Ca^{2+} - dependent protein kinase and stress signal transduction in plant. *Science*, 1996, 274: 1 900 - 1 902.
- [5] Zhu J K. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, 124: 941 - 948.
- [6] 沈银柱, 刘植义, 何聪芬, 黄占景, 孟庆昌, 柏峰, 马闻师, 赵松山, 陆莉, 张焕英. 诱发小麦花药愈伤组织及其再生植株抗盐性变异的研究. 遗传, 1997, 19(6): 7 - 11.
Shen Y Z, Liu Z Y, He C F, Huang Z J, Meng Q C, Bai F, Ma W S, Zhao S S, Lu L, Zhang H Y. A study of salt-resistant variations induced in anther calli and regenerated plants in wheat. *Hereditas*, 1997, 19(6): 7 - 11. (in Chinese)
- [7] Bachem C, van der Hoeven R, de Bruijn S, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 1996, 9(5): 745 - 753.
- [8] Chung W S, Lee S H, Kim J C, Heo W D, Kim M C, Park C Y, Lim, Woon B K, Jeffrey F Harper, Moo J C. Identification of a Calmodulin-regulated soybean Ca^{2+} - ATPase (SCA1) that is located in the plasma membrane. *The Plant Cell*, 2000, 12: 1 393 - 1 408.
- [9] Barroso C, Romero L C, Cejudo F J, Vega J M, Gotor C. Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol) lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 729 - 736.

(责任编辑 孙雷心)