

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01597

## 利用 cDNA-AFLP 技术分析小麦应答低磷胁迫的特异表达基因

谷俊涛<sup>2</sup> 鲍金香<sup>1</sup> 王效颖<sup>1</sup> 郭程瑾<sup>1</sup> 李小娟<sup>2</sup> 路文静<sup>2</sup> 肖凯<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 河北农业大学农学院, 河北保定 071001; <sup>2</sup> 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001

**摘要:** 以磷高效小麦品种石新 828 为材料, 采用 cDNA-AFLP 技术, 鉴定了短期(1~6 h)、中期(12~48 h)和长期(72~144 h)低磷胁迫根系特异上、下调表达基因的表达序列标签(EST)。共有非重复的上调 ESTs 142 个, 下调 ESTs 94 个。胁迫下的前者分别含短、中和长期 23、53 和 66 个; 后者分别含短、中和长期 17、39 和 38 个。对其功能比对发现, 上调 ESTs 在功能上归属于信号转导、转录调控、代谢、逆境响应、发育、物质运输、脂类代谢和功能未知等类别, 下调 EST 除上述类别外, 还含有蛋白质合成和降解等类别。部分转录因子基因(如水稻 *OsPTF1* 和拟南芥 *ZAT10* 高度同源的转录因子基因)、促分裂原激酶基因 *MAPK1a*、钙依赖蛋白激酶基因 *CPK1A* 和蛋白激酶基因(如 serine/threonine kinase)、高亲和磷转运蛋白基因(*PHT3* 和 *PT2*)、过氧化物酶基因(如 peroxidase 73)和谷胱甘肽-S-转移酶基因(glutathione S-transferase), 受到低磷胁迫的特异增强诱导, 在改善小麦植株对低磷胁迫的适应能力中可能具有重要作用。研究表明, 小麦对低磷胁迫的响应, 在分子水平上存在着植株感受低磷胁迫信号和信号转导、进一步在生理生化方面对胁迫信号产生应答等复杂的过程。

**关键词:** 小麦; 低磷胁迫; cDNA-AFLP; 特异表达基因; 基因功能类别

## Investigation Based on cDNA-AFLP Approach for Differential Expressed Genes Responding to Deficient-Pi in Wheat

GU Jun-Tao<sup>2</sup>, BAO Jin-Xiang<sup>1</sup>, WANG Xiao-Ying<sup>1</sup>, GUO Cheng-Jin<sup>1</sup>, LI Xiao-Juan<sup>2</sup>, LU Wen-Jing<sup>2</sup>, and XIAO Kai<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China, <sup>2</sup> College of Life Science; Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

**Abstract:** To date, differential expression genes in response to deficient-Pi stress have been identified and well studied in *Arabidopsis thaliana*, and totally 612 up-regulated and 254 down-regulated genes with various functions were reported. However, there is no similar report in wheat (*Triticum aestivum* L.). In this study, seedlings of wheat cultivar Shixin 828 with high phosphorus use efficiency were treated with 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Pi for 1 to 144 h, and the differential expressed sequence tags (ESTs) with up-regulated and down-regulated patterns were investigated based on cDNA-AFLP approach after deficient-Pi treatment for short term (1–6 h), medium term (12–48 h), and long term (72–144 h). A total of 142 nonredundant ESTs with up-regulated pattern were identified, in which 23, 53, and 66 ESTs expressed in treatments of short, medium, and long term, respectively. Simultaneously, 94 nonredundant ESTs with down-regulated pattern were detected in treatments of short (17), medium (39), and long term (38). These ESTs were classified into several functional groups with Blast in GenBank. Except for 44 function-unknown ESTs with the up-regulated pattern, the remained up-regulated ESTs conferred functions of signal transduction, transcription regulation, metabolism, stress response, development, transport, and lipid metabolism. Besides the above functions, protein synthesis and protein degradation were also observed in the down-regulated ESTs. Some genes of transcription factors (such as the transcription factor genes with high homologous to rice *OsPTF1* and *Arabidopsis ZAT10*), mitogen activated protein kinase (*MAPK1a*), calcium-dependent protein kinase (*CPK1A*), and protein kinase (such as *serine/threonine kinase*), high-affinity phosphate transporter (*PHT3* and *PT2*), peroxidase (such as *peroxidase 73*) and glutathione (*glutathione S-transferase*) were specifically up-regulated under deficient-Pi condition. This suggested that they might play important roles in promoting adaptation to deficient-Pi environment.

**Keywords:** Wheat (*Triticum aestivum* L.); Low-Pi stress; cDNA-AFLP approach; Expressed sequence tags (ESTs); Functional classification of genes

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)前期项目(2007CB116209), 河北省重点基础研究项目(08965525D), 河北省自然科学基金(C2007000476)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 肖凯, E-mail: xiaokai@hebau.edu.cn

Received(收稿日期): 2009-01-07; Accepted(接受日期): 2009-03-15.

磷素是植物必需的大量营养元素之一。由于磷素在土壤中的有效性低、移动性差,磷素供应不足经常造成植株生长发育和产量的限制。在缺磷条件下,植株的生化过程和形态发生明显的适应性变化<sup>[1]</sup>。

目前,在拟南芥中已开展了较全面的植株应答磷胁迫的特异表达基因鉴定研究<sup>[2-4]</sup>。如在短期(1~6 h)、中期(12~48 h)和长期(72~144 h)低磷胁迫条件下,在拟南芥中分别鉴定了 612 个上调表达基因和 254 个下调表达基因<sup>[4]</sup>。其中,鉴定的上下调特异表达基因在功能上分别归属于信号感受、转导、转录调控、代谢、物质运输、发育和逆境抵御等不同类别。表明植物对低磷胁迫的响应,在分子水平上是植株对低磷逆境信号感受、信号在植株体内转导和下游相关响应基因特异表达综合作用的结果<sup>[5]</sup>。

cDNA-AFLP 是将 RT-PCR(逆转录聚合酶链式反应)和 AFLP(扩增片段长度多态性)两种技术组合进而建立的系统分析基因差异表达的有效方法<sup>[6]</sup>,具有反应条件严谨、退火温度高、重复性好等特点。目前已被广泛用于许多植物种属基因的差异表达研究<sup>[7-9]</sup>,为全面揭示植株应答环境信号和非生物逆境基因,进而阐明植株应答特定外部逆境的基因调控网络提供了有效的技术途径。

迄今,有关小麦应答低磷胁迫的转录谱特征尚少见报道。本研究采用 cDNA-AFLP 技术,鉴定了小麦不同低磷胁迫时间点的特异表达基因,并用基因比对方法鉴定其可能的生物学功能及其类别,进一步探讨部分小麦应答低磷胁迫基因的生物学功能。旨在为进一步揭示小麦应答低磷胁迫响应的调控网络奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及处理

以磷高效小麦品种石新 828 为材料<sup>[10]</sup>,在生长室内用水培法培养小麦幼苗。在 25 ℃ 下进行种子催芽,选择发芽整齐一致的种子,摆放在与培养液面接触、孔径为 0.3 mm 的不锈钢网上,生长至三叶期。其间选用的培养液为正常含磷量(2 mmol L<sup>-1</sup> Pi)的 MS 营养液。培养期间每 3 d 更换一次培养液,用气泵供气。从三叶期开始,进行植株低磷处理。将培养液中的 Pi 由 2 mmol L<sup>-1</sup> 调整为 20 μmol L<sup>-1</sup>,在处理 1、3、6、12、24、48、72 和 144 h 后收获根系样本,以低磷处理前的同一批小麦根系为对照。

### 1.2 样品总 RNA 提取和双链 cDNA 的合成

参照产品说明书,用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen)

提取对照和各处理时间点的总 RNA。经过琼脂糖变性胶进行总 RNA 浓度和质量检测后,利用双链 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa 产品)合成双链 cDNA。

### 1.3 双链 cDNA 纯化浓缩、限制性双酶切和接头连接

采用苯酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)溶液纯化双链 cDNA,无水乙醇沉淀后浓缩,加适量的灭菌蒸馏水,依据 A<sub>260</sub> 值将对照和各种低磷处理的双链 cDNA 含量调整至相同浓度。常规方法进行 *Mse* I 和 *Pst* I 限制性双酶切。其后,在反应体系中加入 0.5 μL 的 T4 DNA 连接酶, *Mse* I 接头和 *Pst* I 接头各 1 μL,以及 2.5 μL 10×T4 连接酶缓冲液,进行接头连接。其中, *Mse* I 接头序列为 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'(正向)和 5'-TACTCAGGACTCAT-3'(反向); *Pst* I 接头序列为 5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'(正向)和 5'-TGTACGCACTCTAC-3'(反向)。

### 1.4 cDNA-AFLP 预扩增和选择性扩增

参照 Bachem 等<sup>[6]</sup>的方法,将完成限制性双酶切和连接接头的产物进行 10×稀释,进行预扩增。预扩增反应的热循环程序为 95 ℃ 下 2 min,随后为 30 个循环过程,每个循环中包括 95 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s 和 72 ℃ 延伸 1 min。完成后将预扩增产物于 4 ℃ 保存。其中,用于预扩增反应的引物为 M00 (5'-GATGAGTCCTGAGTA-3')和 P00(5'-AGACTGCGTACATGCA-3'),分别与 *Mse* I 和 *Pst* I 的接头序列相匹配。选用 16 条 M 引物和 16 条 P 引物进行选择性的扩增。其中,16 条 M 引物分别与 *Mse* I 的预扩增引物匹配,16 条 P 引物分别与 *Pst* I 的预扩增引物匹配。但上述引物的 3'-端较预扩增引物均增加 2~3 个随机碱基。每条 M 引物分别与 P 引物进行组合,共有 256 个引物对组合。用于选择性的 M 引物和 P 引物如表 1 所示。cDNA-AFLP 的选择性扩增程序为 95 ℃ 下 2 min 后进行 13 个下述热反应循环; 95 ℃ 变性 50 s, 65 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 60 s; 95 ℃ 变性 50 s, 56 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 31 个循环; 72 ℃ 保温 10 min。对照和不同低磷处理时间点的各引物组合均重复 3 次。

### 1.5 cDNA-AFLP 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染显影

采用常规技术进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、染色和显影。室温下自然干燥胶板,用扫描仪进行凝胶上条扫描和数据保存。

### 1.6 差异条带 DNA 再次 PCR 扩增和克隆

从聚丙烯酰胺凝胶上切下重复间稳定一致的差

异条带, 以 96 处理 20 min。12 000×g 离心 5 min 后, 吸取上清液 1 μL 作为再次 PCR 扩增反应的模板。PCR 反应体系及程序与前述选择性扩增相同, 其中, 各 EST 再次扩增时选用的引物, 与 cDNA-AFLP 中鉴定该特异表达 EST 的引物一致。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 与 pUCm-T 载体 (上海 Sangon) 连接, 转化感受态大肠杆菌菌株 DH5α。采用常规碱裂解法, 提取单菌落克隆质粒。进一步用载体上含有的限制性切点 *Eco* RI 和 *Hin* dIII 对质粒进行双酶切鉴定和 PCR 检测。无误后测序 (上海 Sangon), 获得 EST 序列。

### 1.7 EST 生物信息学分析和短、中和长期应答低磷基因的划分

利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的 BLAST 工具与 GenBank 的 dbEST 数据库和蛋白数据库, 进行特异表达基因同源性比较和功能分析。参照网站 [http://mips.gsf.de/proj/funecatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.gsf.de/proj/funecatDB/search_main_frame.html) 的分类方法进行。参照 Misson 等<sup>[4]</sup> 的方法, 将低磷处理后 1~6、12~48 和 72~144 h 内特异表达的基因划分为短、中和长期特异表达基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 获得的应答低磷胁迫 EST 数量

在短期、中期和长期不同低磷胁迫时间处理中, 分别鉴定了 142 个特异上调表达的基因 (EST) 和 94 个

特异下调表达的基因 (EST)。其中, 在 142 个上调基因 (EST) 中, 短期、中期和长期低磷处理下的数量分别为 23、53 和 66 个; 在 94 个下调表达的基因 (ESTs) 中, 短、中和长期低磷处理下的数量分别为 17、39 和 38 个。各时间区段鉴定的特异表达基因 (EST) 数量, 均为上调多于下调。

### 2.2 应答低磷胁迫根系 EST 生物学功能及分组

上调表达基因具有信号转导、转录调控、代谢、逆境响应、发育、物质运输、脂类代谢和功能未知等类别功能 (图 1-A); 下调表达基因除具有与上调表达基因相同的功能外, 还有蛋白质合成和蛋白质降解等功能 (图 1-B)。表明小麦植株对低磷胁迫的响应, 在分子水平上, 存在着植株感受低磷胁迫信号和信号转导、进一步在生化代谢、生理过程和植株形态多层次对胁迫信号应答的复杂分子生物学过程。

各时期鉴定的上、下调 EST 的可能生物学功能及分组如表 2 和表 3 所示。前人在拟南芥、水稻中鉴定的应答低磷胁迫、维持植株磷素内稳态和改善植株在低磷胁迫中具有重要作用的转录因子基因<sup>[4]</sup>, 如 bHLH 型转录因子基因 PH85-16 PTF 转录因子 (USF4) 和 C2H2 型锌指蛋白型转录因子 ZAT10 (USF5)、参与磷素吸收的磷转运蛋白基因 PHT3 (ULF14) 和 PT2 (ULF15), 在本研究中也得到了鉴定。表明上述基因在小麦应答低磷胁迫和改善植株的磷素吸收能力中可能具有重要作用。

表 1 用于小麦应答低磷胁迫基因鉴定的 cDNA-AFLP 引物

Table 1 Primers used in cDNA-AFLP for identification of differential expressed genes under deficient-Pi condition

M 引物 M primer	P 引物 P primer
M22: GAT GAG TCC TGA GTA GT	P19: AGA CTG CGT ACA TGC AGG A
M24: GAT GAG TCC TGA GTA TC	P25: AGA CTG CGT ACA TGC AGT G
M31: GAT GAG TCC TGA GTA AAA	P31: AGA CTG CGT ACA TGC AGA AA
M33: GAT GAG TCC TGA GTA AAG	P33: AGA CTG CGT ACA TGC AGA AG
M42: GAT GAG TCC TGA GTA AGT	P34: AGA CTG CGT ACA TGC AGA AT
M43: GAT GAG TCC TGA GTA ATA	P39: AGA CTG CGT ACA TGC AGA GA
M44: GAT GAG TCC TGA GTA ATC	P43: AGA CTG CGT ACA TGC AGA TA
M45: GAT GAG TCC TGA GTA ATG	P47: AGA CTG CGT ACA TGC AGC AA
M50: GAT GAG TCC TGA GTACAT	P11: AGA CTG CGT ACA TGC AGAA
M60: GAT GAG TCC TGA GTACTC	P44: AGA CTG CGT ACA TGC AGATC
M67: GAT GAG TCC TGA GTAGCA	P49: AGA CTG CGT ACA TGC AGCAG
M76: GAT GAG TCC TGA GTAGTC	P50: AGA CTG CGT ACA TGC AGCAT
M78: GAT GAG TCC TGA GTAGTT	P52: AGA CTG CGT ACA TGC AGCCC
M83: GAT GAG TCC TGA GTATCA	P54: AGA CTG CGT ACA TGC AGCCT
M84: GAT GAG TCC TGA GTATCC	P59: AGA CTG CGT ACA TGC AGCTA
M85: GAT GAG TCC TGA GTATCG	P62: AGA CTG CGT ACA TGC AGCTT

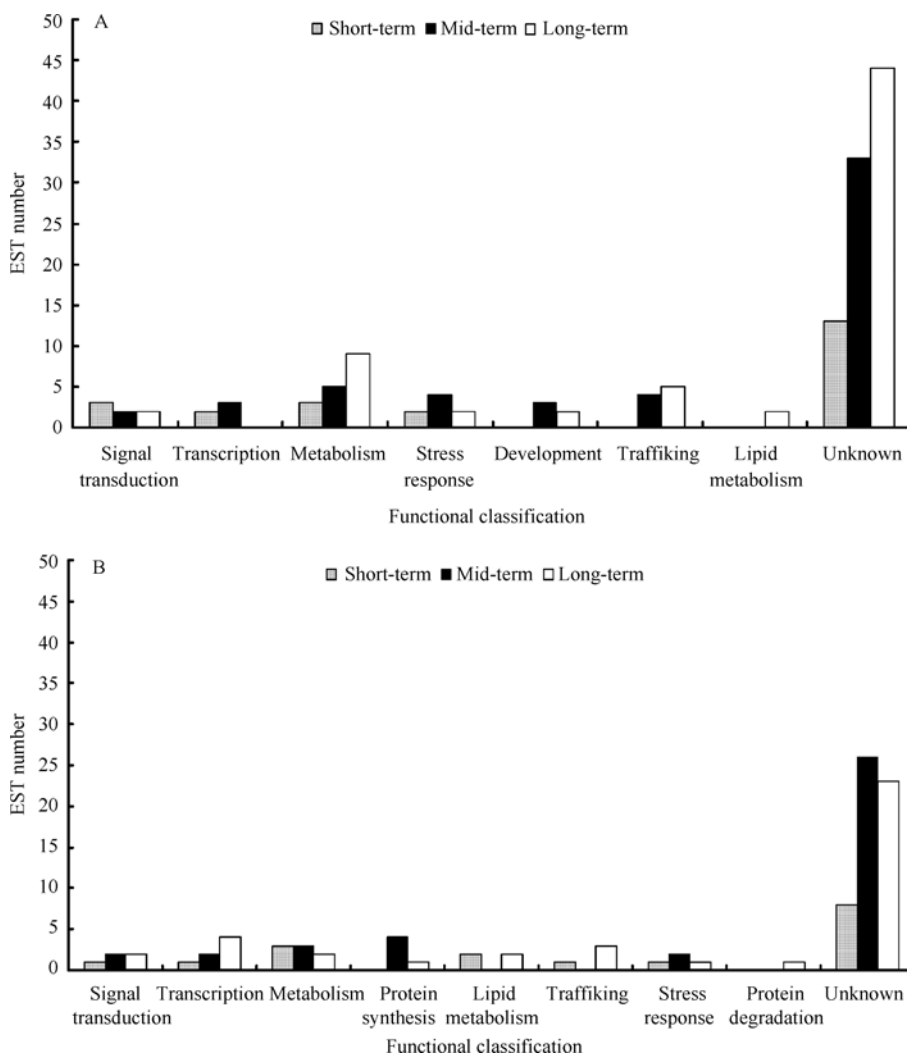


图 1 不同低磷胁迫时间下小麦根系上调(A)和下调(B)的特异表达基因的功能类别

Fig. 1 Functional classification of up-regulated (A) and down-regulated genes (B) under different low-Pi regimes

短、中和长期分别指 20 μmol L<sup>-1</sup> Pi 处理根系 0~6、12~48 和 72~144 h。

Short-, mid-, and long-term denote roots treated with 20 μmol L<sup>-1</sup> Pi with 0–6 h, 12–48 h, and 72–144 h, respectively.

表 2 短期(1~6 h)、中期(12~48 h)和长期(72~144 h)低磷处理上调特异表达 EST 的可能生物学功能

Table 2 Putative biological functions of differentially expressed ESTs with up-regulated pattern in different Pi treatments of short term (1–6 h), medium term (12–48 h) and long term (72–144 h)

EST	基因 Gene	功能 Function	功能分类 Function classification
低磷处理 1~6 h Deficient-Pi treated for 1–6 h			
USF1	mitogen-activated protein kinase <i>MAPK1a</i> <sup>†</sup>	protein amino acid phosphorylation	signal transduction
USF2	protein kinase-like protein <sup>†</sup>	protein amino acid phosphorylation	
USF3	calcium-dependent protein kinase <i>CPK1A</i> <sup>†</sup>	protein amino acid phosphorylation	
USF4	PH85-16 PTF1 mRNA <sup>†</sup>	transcription factor	transcription
USF5	zinc finger (C2H2 type) family protein ( <i>ZAT10</i> ) <sup>†</sup>	transcription factor	
USF6	pyruvate kinase	enzyme	metabolism
USF7	putative glutamate dehydrogenase	enzyme	
USF8	acetohydroxyacid synthase	enzyme	
USF9	dehydrin <i>WZY2</i> mRNA	response to biotic stress	stress response
USF10	myosin heavy chain VIII A2	response to biotic stress	
USF11–USF23	function unknown (13)		

(续表 2)

EST	基因 Gene	功能 Function	功能分类 Function classification
低磷处理 12~48 h	Deficient-Pi treated for 12~48 h		
UMF1	phospholipase D	intracellular signaling cascade	signal transduction
UMF1	protein kinase family protein †	protein amino acid phosphorylation	
UMF2	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein †	transcription factor	transcription
UMF3	AP2 domain-containing transcription factor †	transcription factor	
UMF4	myb family transcription factor †	transcription factor	
UMF5	expansin-related protein †	morphegenesis	development
UMF6	proline-rich family protein contains proline-rich region	root morphegenesis	
UMF7	expansin family protein (EXPR3)	DNA methylation	
UMF8	hexose transporter	transport	trafficking
UMF9	amino acid transporter	transport	
UMF10	heavy-metal-associated domain-containing protein	transport	
UMF10	sulfate transporter	transport	
UMF12	peroxidase †	enzyme response to oxidative stress	stress response
UMF13	glutathione S-transferase †	enzyme response to oxidative stress	
UMF14	pathogenesis-related protein	response to biotic stress	
UMF15	senescence-associated protein-related	aging related	
UMF16	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR)	enzyme	metabolism
UMF17	cytochrome P450	electron transport	
UMF18	dihydroflavonol 4-reductase	anthocyanin biosynthesis	
UMF19	AAA-type ATPase family protein similar to zinc dependent protease	enzyme	
UMF20	NADPH oxidase-like	enzyme	
UMF21~UMF53	function unknown (33)		
低磷处理 72~144 h	Deficient-Pi treated for 72~144 h		
ULF1	protein kinase-like protein	protein amino acid phosphorylation	signal transduction
ULF2	protein kinase family protein	protein amino acid phosphorylation	
ULF3	inorganic pyrophosphatase	phosphatase	metabolism
ULF4	galactinol synthase	carbohydrate biosynthesis	
ULF5	tropine dehydrogenase	aging	
ULF6	bisphosphoglycerate mutase family protein	glycolysis	
ULF7	PEP carboxylase	tricarboxylic acid cycle	
ULF8	glutamate decarboxylase	amino acid metabolism	
ULF9	acireductone dioxygenase	enzyme	
ULF10	quinone oxidoreductase - like	NADP-dependent oxidoreductase	
ULF10	S-adenosyl-L-methionine	carboxyl methyltransferase	
ULF12	lipase class 3 family protein	lipid synthesis	lipid metabolism
ULF13	phosphoinositide-specific phospholipase C	DNA methylation	
ULF14	inorganic phosphate transporter (PHT3)	Pi transport	trafficking
ULF15	phosphate transporter (PT2)	Pi transport	
ULF16	lipid transfer protein	lipid transport	
ULF17	cation exchanger, putative (CAX7)	ion transport	
ULF22	putative protein 21K protein precursor	invertase	
ULF18	MtN3-like protein	endomembrane system	development
ULF19	ethylene-forming-enzyme-like dioxygenase	oxidoreductase	
ULF20	protein phosphatase 2C ABI1	response to abscisic acid stimulus	stress response
ULF21	peroxidase 73	response to oxidative stress	
ULF23~ULF66	function unknown (44)		

† 低磷短期处理上调表达的 EST 在中期处理继续上调表达; ‡ 低磷中期处理上调表达的 EST 在长期处理继续上调表达。

† ESTs up-regulated in short term treatments were further up-regulated in medium term treatments. ‡ ESTs up-regulated in mid-term treatments were further up-regulated in long term treatments.

表 3 短期(1~6 h)、中期(12~48 h)和长期(72~144 h)低磷处理下调特异表达 EST 的可能生物学功能

Table 3 Putative biological functions of differentially expressed ESTs with down-regulated pattern in deficient-Pi treatments of short term (1~6 h), medium term (12~48 h), and long term (72~144 h)

EST	基因 Gene	功能 Function	功能分类 Function classification
<b>低磷处理 1~6 h</b> Deficient-Pi treated for 1~6 h			
DSF1	guanine nucleotide-binding family protein <sup>†</sup>	signalling	signal transduction
DSF2	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein <sup>†</sup>	regulation of transcription	transcription
DSF3	PSII D1 protein processing enzyme	proteolysis and peptidolysis	metabolism
DSF4	endo-1,4-beta-glucanase <sup>†</sup>	carbohydrate metabolism	
DSF5	RuBPCase large subunit <sup>†</sup>	carbohydrate metabolism	
DSF6	acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase	fatty acid metabolism	lipid metabolism
DSF7	lipid transfer protein (LTP)	lipid transport	
DSF8	high-affinity nitrate transporter	nutrient transport	trafficking
DSF9	stress-responsive protein <sup>†</sup>	response to abscisic acid stimulus	stress response
DSF10-DSF17	function unknown (8)		
<b>低磷处理 12~48 h</b> Deficient-Pi treated for 12~48 h			
DMF1	two-component responsive regulator	two-component signal transduction	signal transduction
DMF2	thioredoxin family protein <sup>‡</sup>	phosphatase	
DMF3	homeobox-leucine zipper protein <sup>‡</sup>	regulation of transcription	transcription
DMF4	G-box binding factor 1	regulation of transcription	
DMF5	60S ribosomal protein L14 <sup>‡</sup>	protein synthesis	protein synthesis
DMF6	40S ribosomal protein S10	protein synthesis	
DMF7	peptide chain release factor <sup>‡</sup>	chloroplast organization and biogenesis	
DMF8	ribosomal protein S6	protein synthesis	
DMF9	glycosyl hydrolase family 3 protein	carbohydrate metabolism	metabolism
DMF10	endo-1,4-beta-glucanase <sup>‡</sup>	carbohydrate metabolism	
DMF11	RuBPCase large subunit	carbohydrate metabolism	
DMF12	heat shock protein	protein folding	stress response
DMF13	auxin response factor 7b	regulation of abiotic stress responding	
DMF14-DMF39	function unknown (26)		
<b>低磷处理 12~48 h</b> Deficient-Pi treated for 12~48 h			
DLF1	serine/threonine kinase	protein amino acid phosphorylation	signal transduction
DLF2	phosphate-responsive 1 family protein	protein amino acid phosphorylation	
DLF3	myb family transcription factor	regulation of transcription	transcription
DLF4	RNA methyltransferase	RNA processing	
DLF5	RNA polymerase sigma subunit SigF	transcription initiation	
DLF6	protein transcription termination factor nusB	regulation of transcription, DNA-dependent	
DLF7	aspartyl protease family protein	protein degradation	protein degradation
DLF8	40S ribosomal protein S17	protein synthesis	protein synthesis
DLF9	glycosyl hydrolase family	carbohydrate metabolism	metabolism
DLF10	aldose 1-epimerase	galactose metabolism	
DLF11	phosphoethanolamine N-methyltransferase 3	phosphoethanolamine N-methyltransferase	lipid metabolism
DLF12	glutaredoxin family protein	transport	trafficking
DLF13	high-affinity nitrate transporter NRT2	nitrogen transport	
DLF14	trigger factor type chaperone family protein	protein transport	
DLF15	plant defensin protein	response to insect	stress response
DLF16-DLF38	function unknown (23)		

<sup>†</sup> 低磷短期处理下调表达的 EST 在中期处理继续下调表达; <sup>‡</sup> 低磷中期处理下调表达的 EST 在长期处理继续下调表达。

<sup>†</sup> ESTs down-regulated in short term treatments were further down-regulated in medium term treatments. <sup>‡</sup> ESTs down-regulated in medium term treatments were further down-regulated in long term treatments.

在上、下调应答低磷胁迫的特异表达 EST 中,表现的规律有所不同。如鉴定的上调特异表达 EST 中,表达水平表现为仅在短期特异上调,以后在中、长期保持相对稳定,或在短、中期表达水平不断增强,在长期和中期相近,以及短、中和长期随胁迫时间延长不断增强等不同特征。同样,下调特异表达 EST 在应答低磷逆境的表达规律上与上调相似。

### 3 讨论

在低磷胁迫处理下,拟南芥基因组中的许多基因表达发生特异的上、下调变化<sup>[4]</sup>。本研究发现,有许多功能类别不同的基因,在短期(1~6 h)、中期(12~48 h)和长期(72~144 h)不同处理条件下表达水平明显变化。其中,包括 142 个上调 EST 和 94 个下调表达 EST。在基因功能类别上,分别归属于信号转导、转录调控、代谢、逆境响应、发育、物质运输、脂类代谢、蛋白质合成及降解和功能未知等功能类别。表明小麦对低磷胁迫的响应过程,在分子水平上,是对低磷信号感受、转导和下游功能基因应答等综合作用的结果。

在低磷胁迫下,植株在生理、生化和形态学水平上发生明显的适应性变化。如侧根增多和根体构型改变,以扩大根系对土壤磷素的吸收面积和能力,进而提高植物对磷胁迫的适应能力<sup>[11-12]</sup>。此外,低磷胁迫诱导了植株根系高亲和吸收磷素系统活力增强、有机酸类物质的分泌量增多、植株体内的碳代谢和次生代谢发生变化<sup>[1]</sup>。本研究鉴定的应答低磷胁迫的特异表达基因中,有 1 个调控根系形态特征的基因 proline-rich family protein containing proline-rich region(UMF6),该基因通过上调表达,在调控小麦磷胁迫下的根体适应性变化中具有较重要作用。

植株在生理生化上对低磷胁迫的应答,较大程度上起因于信号转导后转录调控水平的改变。烟草 bZIP 型转录因子 *Phi-2*<sup>[13]</sup>、拟南芥型 Myb 型转录因子 *PHRI*<sup>[14]</sup>、水稻 bHLH 转录因子 *OsPTF1*<sup>[15]</sup> 和拟南芥 WRKY 型转录因子 *WRKY75*<sup>[16]</sup>,低磷胁迫下的表达水平发生较大变化,在维持植株体内的磷素内稳态和增强植株的耐低磷能力中具有较重要作用。本研究中,在低磷胁迫上调表达的 EST 中,与水稻 *OsPTF1* 和拟南芥 *ZAT10* 高度同源的转录因子基因(USF4 和 USF5),在试验短、中和长期胁迫中的表达呈不断增强特征,表明上述转录因子基因在小麦应答低磷逆境和抵御低磷胁迫中具有较大的调控效应。

植物磷转运蛋白参与了植株对生长介质中磷素的吸收和磷素在细胞和组织中的转运,迄今在不同植物种属中已克隆和鉴定了多个磷转运蛋白基因<sup>[17-20]</sup>。在低磷胁迫下,部分磷转运蛋白基因表现明显的诱导增强表达特征,在改善植株对低磷水平下磷素的吸收和加快磷素在植株体内的转运中具有重要作用<sup>[21-22]</sup>。如超表达水稻高亲和磷转运蛋白基因 *OsPT1* 的转基因植株,能显著增加植株的磷素吸收能力,与对照植株相比,低磷条件下植株的长势明显得到改善<sup>[21]</sup>。此外,在烟草的悬浮细胞中超表达拟南芥的高亲和磷转运蛋白基因 *AtPT1*,也具有显著改善烟草遗传转化细胞在磷胁迫下磷素吸收和生长特性的功能<sup>[22]</sup>。本研究中,与磷转运蛋白 *PHT3* 和 *PT2* 高度同源的两个基因(*ULF14* 和 *ULF15*)在低磷逆境下特异增强表达,表明上述基因在应答低磷胁迫和改善植株增强对低磷胁迫的适应能力中具有较重要作用。

蛋白质磷酸化是植物生物和非生物逆境信号转导系统中的重要信号传递元件。其中,钙依赖蛋白激酶(CDPK)和促分裂原激酶(MAPK)信号级联传递途径介导逆境信号转导的分子机制研究已有较多报道。研究表明,小麦 *CPK1~CPK20* 中的部分成员参与了对干旱、盐分胁迫、低温、 $H_2O_2$  逆境等非生物逆境的响应和对激素脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)的应答<sup>[23]</sup>。用离体叶片为试验材料的研究表明,CDPK1 参与了外源蔗糖诱导的信号转导途径的信号磷酸化过程<sup>[24]</sup>。表明小麦中的 CDPK 基因也较广泛参与了非生物逆境和发育信号的调控过程。迄今,对拟南芥、烟草、番茄和水稻的研究发现,MAP 激酶级联途径也广泛参与了病原生物胁迫信号、非生物逆境信号、激素信号和发育信号等多种不同信号的转导过程<sup>[25-28]</sup>。本研究中,不少介导植株体内信号转导的蛋白激酶基因发生特异性增强表达,如促分裂原激酶基因 *MAPK1a(USF1)*、钙依赖蛋白激酶基因 *CPK1A(USF3)* 和部分蛋白激酶基因(*USF2*、*UMF1*、*UMF2*、*ULF1* 和 *ULF2*)。表明小麦植株体内感受低磷胁迫信号的转导通路中,有上述保守蛋白激酶信号转导系统 MAPK 和 CDPK 途径和部分特定蛋白激酶的参与。

磷胁迫等非生物逆境条件下,会导致植物细胞内自由基增加,使自由基代谢平衡遭到破坏,进而使植株生理功能衰退<sup>[29]</sup>。对小麦研究表明,较强的细胞保护酶活性通过减轻低磷逆境下的活性氧伤害,维持植株较强的生理功能,是某些品种具有较强耐

低磷能力的重要生化基础之一<sup>[30]</sup>。本研究鉴定的上、下调特异表达基因中,均含有较多的逆境响应基因,如上调表达中的 USF9-USF10、UMF12-UMF15 和 ULF20-ULF21。其中,2 个过氧化物酶(UMF12 和 ULF21)和 1 个谷胱甘肽-S-转移酶(UMF13)在中、长期低磷胁迫处理中特异上调,表明上述基因在增强植株对低磷胁迫诱发的活性氧清除、进而缓解植株活性氧清除系统的失衡中具有较重要的作用。

本研究在低磷胁迫下调表达的基因中,鉴定了多个与蛋白质合成和分解相关的基因。如 60S 核糖体蛋白 L14(DMF5)、40S 核糖体蛋白 S10(DMF6)、肽链释放因子(DMF7)和核糖体蛋白 S6(DMF8)以及 40S 核糖体蛋白 S17(DLF8)等蛋白质合成相关基因,和天冬氨酸蛋白酶(DLF7)蛋白质降解相关基因。表明在低磷胁迫条件下,除转录调节发生明显的改变外,植株体内蛋白质翻译水平上也发生明显变化。转录和翻译的共同调节作用,进一步引发植株在生化代谢、生理过程和植株形态对低磷胁迫产生应答。

本研究中,已知生物学功能的上调表达 EST 为 51 个,占总数(142)的 35.92%,已知生物学功能的下调表达 EST 为 37 个,占总数(94)的 39.36%。其中,上述未知功能的上、下调 EST GenBank 序列比对其相似性最大对应的多为基因组 DNA 或功能未知的 mRNA。这可能与小麦基因组与已完成基因组测序的拟南芥、水稻差异较大,这与上述模式植物多数基因功能未知,以及迄今有关小麦功能基因组的研究尚少有关。

#### 4 结论

鉴定非重复的 142 个上调和 94 个下调 EST。上调 EST 在功能上归属于信号转导、转录调控、代谢、逆境响应、发育、物质运输、脂类代谢和功能未知等类别,下调 EST 除上述类别外,还含有蛋白质合成和降解等类别。部分转录因子基因(如水稻 *OsPTF1* 和拟南芥 *ZAT10* 高度同源的转录因子基因)、促分裂原激酶基因 *MAPK1a*、钙依赖蛋白激酶基因 *CPK1A* 和蛋白激酶基因(如 serine/threonine kinase)、高亲和磷转运蛋白基因(*PHT3* 和 *PT2*)、过氧化物酶基因(如 peroxidase 73)和谷胱甘肽-S-转移酶基因(glutathione S-transferase),受到低磷胁迫逆境的特异增强诱导,在改善小麦植株对低磷胁迫的适应能力中可能具有重要作用。

#### References

- [1] Vance C P, Uhde-Stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol*, 2003, 157: 423–447
- [2] Hammond J P, Bennett M J, Bowen H C, Broadley M R, Eastwood D C, May S T, Rahn C, Swarup R, Woolaway K E, White P J. Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol*, 2003, 132: 578–596
- [3] Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F, Deng X W. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in Arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1260–1271
- [4] Misson J, Raghothama K G, Jain A, Jouhet J, Block M A, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Dumas P, Nacry P, Herrerra-Estrella L, Nussaume L, Thibaud M. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11934–11939
- [5] Hammond J P, Broadley M R, White P J. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann Bot*, 2004, 94: 323–332
- [6] Bachem C W B, Domen R J, Visser R G F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, 16: 157–173
- [7] Jayaraman A, Puranik S, Rai N K, Vidapu S, Sahu P P, Lata C, Prasad M. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *Mol Biotechnol*, 2008, 40: 241–251
- [8] Ritter E, Ruiz de Galarreta J I, van Eck H J, Sánchez I. Construction of a potato transcriptome map based on the cDNA-AFLP technique. *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 1003–1013
- [9] Wu M-S(吴敏生), Gao Z-F(高志环), Dai J-R(戴景瑞). Studies on differential gene expression of maize (*Zea mays* L.) by means of cDNA-AFLP technique. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2001, 27(3): 339–342 (in Chinese with English abstract)
- [10] Guo L(郭丽), Long S-X(龙素霞), Zhao F-H(赵芳华), Bao J-X(鲍金香), Guo C-J(郭程瑾), Xiao K(肖凯). Comparison and evaluation of biochemical criteria for phosphorus efficiency in wheat. *J Plant Genetic Resour* (植物遗传资源学报), 2008, 9(4): 506–510 (in Chinese with English abstract)
- [11] Borch K, Bouma T J, Lynch J P, Brown K M. Ethelene: A regulator of root architectural response to soil phosphorus availability. *Plant, Cell & Environ*, 1999, 22: 425–431
- [12] Williamson L C, Ribrioux S P, Fitter A H, Leyser H M. Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2001, 126: 875–882
- [13] Sano T, Nagata T. The possible involvement of a phosphate-induced transcription factor encoded by *Phi-2* gene from tobacco in ABA signaling pathways. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 12–20
- [14] Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín A C, Iglesias J, Leyva A,



- Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signalling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev*, 2001, 15: 2122–2133
- [15] Yi K K, Wu Z C, Zhou J, Du L M, Guo L B, Wu Y R, Wu P. OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol*, 2005, 138: 2087–2096
- [16] Devaiah B N, Karthikeyan A S, Raghothama K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1789–1801
- [17] Muchhal U S, Pardo J M, Raghothama K G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10519–10523
- [18] Okumura S, Mitsukawa N, Shirano Y, Shibata D. Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res*, 1998, 5: 261–269
- [19] Mudge S R, Rae A L, Diatloff E, Smith F W. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *Plant J*, 2002, 31: 341–353
- [20] Shin H, Shin H S, Chen R, Harrison M J. Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J*, 2006, 45: 712–726
- [21] Seo H M, Jung Y, Song S. Increased expression of *OsPT1*, a high-affinity phosphate transporter, enhances phosphate acquisition in rice. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 1833–1838
- [22] Mitsukawa N, Okutnura S, Shirano Y. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7098–7102
- [23] Li A L, Zhu Y F, Tan X M. Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 429–443
- [24] Martínez-Noë I G, Nagaraj V J, Caló G. Sucrose regulated expression of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase (*TaCDPK1*) gene in excised leaves of wheat. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45: 410–419
- [25] Xu Z S, Xia L Q, Chen M, Cheng X G, Zhang R Y, Li L C, Zhao Y X, Lu Y, Ni Z Y, Liu L, Qiu Z G, Ma Y Z. Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (*TaERF1*) that increases multiple stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 719–732
- [26] Katou S, Yoshioka H, Kawakita K, Rowland O, Jones J D G, Mori H, Doke N. Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1914–1926
- [27] Cheong Y H, Moon B C, Kim J K, Kim C Y, Kim M C, Kim I H, Park C Y, Kim J C, Park B O, Koo S C, Yoon H W, Chung W S, Lim C O, Lee S Y, Cho M J. Bwmk1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1961–1972
- [28] Desikan R, Hancock J T, Ichimura K, Shinozaki K, Neill S J. Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1579–1587
- [29] Wan M-L(万美亮), Kuang Y-H(邝炎华), Chen J-X(陈建勋). Studies on membrane lipid peroxidation and protective enzyme activity of sugarcanes under phosphorus deficiency. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报), 1999, 20(2): 1–6 (in Chinese with English abstract)
- [30] Han S-F(韩胜芳), Deng R-L(邓若磊), Xu H-R(徐海荣), Cao Y-F(曹云飞), Wang X-Y(王笑颖), Xiao K(肖凯). Photosynthesis and active-oxygen-scavenging enzyme activities in rice varieties with different phosphorus efficiency under phosphorus stress. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2007, 18(11): 2462–2467 (in Chinese with English abstract)

## 欢迎订阅 2010 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的我国大豆专业领域学术期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊,反映大豆科学研究的最新成果。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。读者对象为从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

本刊国内外公开发行,双月刊,大16开本,每期180页。国内每期订价:10.00元,全年60.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(含邮资),全年60美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京399信箱。国外代号:Q5587。本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:230103000004。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话:0451-86668735 E-mail: dadoukx@sina.com; ddkexue@126.com