

文章编号:1000-8551(2013)07-0938-08

# 水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 的表达模式及逆境响应特征分析

周玲艳<sup>1</sup> 倪尔冬<sup>2</sup> 朱丽雅<sup>1</sup> 梁红<sup>1</sup> 庄楚雄<sup>2</sup><sup>(1)</sup>仲恺农业工程学院生命科学院,广东 广州 510225;<sup>(2)</sup>华南农业大学生命科学学院,广东 广州 510642)

**摘要:**通过生物信息学方法对水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 启动子序列特点进行分析;并以水稻中花 11 不同组织和发育时期的穗子为材料,通过半定量 RT-PCR 及 mRNA 原位杂交技术分析 *OsGL1-5* 的时空表达特征;同时,分别以 200mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、100μmol·L<sup>-1</sup> ABA 和 1.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理水稻幼苗,通过半定量 RT-PCR 分析逆境胁迫下 *OsGL1-5* 的表达模式。生物信息学分析表明,*OsGL1-5* 启动子中包括大量与干旱、冷、盐等多种逆境胁迫相关的调控序列。时空表达特征分析表明,*OsGL1-5* 主要在不同发育时期的穗子中表达,且表达部位集中在稃片的毛状体和花药绒毡层中,叶中表达量相对较低,而茎和根中没有检测到表达。NaCl、ABA 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等逆境胁迫下,*OsGL1-5* 表达量在不同处理时间有所增加。

**关键词:**水稻;*OsGL1-5*;表达;逆境

全球生态环境恶化和温室效应的影响,引发了一系列环境问题。其中,高温、UV 辐射、水分胁迫等严重影响植物适应性及生产。因此,植物抗逆性已成为各国科学工作者的研究重点。植物抗性机理的揭示,对于提高农业生产力有重要的现实意义。植物表皮蜡质是覆盖在植物表面最外层、不溶解于水而溶解于有机溶剂的一类混合物的总称,主要由 24 到 34 个碳原子构成的超长链脂肪酸 (very-long-chain fatty acids, VLCFAs)、醇类、烷类、醛类、酮类等物质组成<sup>[1]</sup>。一般认为,表皮蜡质具有阻止植物组织内水分的非气孔性散失<sup>[2]</sup>、防止植物被有害光线损伤<sup>[3-4]</sup>、保护植物避免被病菌侵害和防止某些昆虫的蚕食等功能<sup>[5]</sup>。植物表皮蜡质在抵抗逆境胁迫中的作用已成为研究新热点。

水分胁迫是指植物水分散失超过水分吸收,使植物组织含水量下降,引起正常代谢失调的现象。植物除因土壤中缺水引起水分胁迫外,冰冻、高温和高盐等不良环境也可能引起水分胁迫。拟南芥中,多个蜡质基因的表达被确定与水分胁迫相关。其中,*WXP* 基因能提高拟南芥蜡质成分中 n-烷的表达量,*WXP* 的转基因植株表现出耐旱性增强<sup>[6-7]</sup>; *LACS1* 被认为在角

质层蜡质合成中起作用,而 *LACS2* 是角质合成必须的,这两个基因发生突变的植株表现为对干旱的高度敏感性<sup>[8]</sup>;烷类合成相关的蜡质基因 *CER1* 在干旱胁迫条件下表达量显著增加<sup>[9]</sup>,而过表达 *CER1* 提高了植株抗逆性<sup>[10]</sup>。

水稻是重要的禾谷类作物,也是功能基因组研究的模式植物。目前,水稻蜡质合成有关基因研究的报道较少。对水稻基因组中的 *CER1* 同源基因进行系统分析发现,水稻基因组中存在 11 个蜡质合成相关基因,分别命名为 *OsGL1-1* ~ *OsGL1-11*,其中,*osgl1-1* 突变体的角质层蜡质减少,提高了干旱敏感性<sup>[11]</sup>; *osgl1-2* (又命名为 *usl2*) 突变体的叶表面蜡质明显减少,而过表达植株叶表面蜡质覆盖量增加,因而其抗干旱能力增强<sup>[12-13]</sup>。Jung 等<sup>[14]</sup> 利用 T-DNA 插入突变体克隆了一个花药蜡质缺陷基因 *Wda1* (又名 *OsGL1-5*)。GUS 活性分析表明,*Wda1* 主要在花药的表皮细胞中表达,而在绒毡层表达量非常弱;但表型分析表明,该基因的缺失突变体绒毡层退化较早,花粉粒和花药壁形态异常。且 *Wda1* 与逆境胁迫的关系研究甚少。

本研究通过生物信息学方法对水稻蜡质合成相关

收稿日期:2013-01-21 接受日期:2013-05-03

基金项目:广东省自然科学基金(S2011040001653)

作者简介:周玲艳,女,副教授,主要从事植物生物技术研究。E-mail:lingyanzh@163.com

通讯作者:庄楚雄,男,研究员,主要从事植物分子生物学及植物基因工程研究。E-mail:zhuangex@scau.edu.cn

基因 *OsGL1-5* 启动子序列特点进行分析,并通过半定量 RT-PCR 和 mRNA 原位杂交等技术对水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 的时空表达特征进行进一步确认和精细定位。同时,对逆境胁迫下 *OsGL1-5* 的表达模式进行研究,为阐明 *OsGL1-5* 基因在逆境胁迫下的功能与分子作用机制提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料、载体和菌株 水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种中花 11,由华南农业大学遗传工程实验室提供。PCR 产物克隆测序载体为 pGEM-Teasy,购自 promega 公司;大肠杆菌 DH10B,为华南农业大学遗传工程实验室保存。

1.1.2 试剂 RNA 抽提试剂盒 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;反转录酶 (AMV RTase)、RNase inhibitor、Taq DNA 聚合酶和 dNTP 等购自 TaKaRa 公司;石蜡等购自 Sigma 公司;无水乙醇、二甲苯等为国产分析纯。

1.1.3 引物 *OsAct1* 扩增引物为 *OsAct1-R* (5'-TCTGGGTCATCTTCTCACGA-3') 和 *OsAct1-F* (5'-CGTCTGCCGATAATGGAACTG-3'); *OsGL1-5* 扩增引物为 *OsGL1-5-R* (5'-GATTGGATTGGGAGAAGGAA-3') 和 *OsGL1-5-F* (5'-TACAGCCATTGCAGGACTTG-3')。

### 1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 应用 RIFGP (<http://plantbiol.genetics.ac.cn/rice-Affy>) 对 *OsGL1-5* 表达的组织器官特异性进行分析;应用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 对启动子顺式调控元件进行预测。

1.2.2 材料种植 水稻品种中花 11 的种子在室温下浸种,37℃ 恒温催芽,4~5 叶期移栽于大田,取不同组织和不同发育时期小穗用于 RT-PCR 分析;以中花 11 幼苗用于逆境处理分析。

1.2.3 逆境处理 参照周玲艳等<sup>[15]</sup>方法进行。

1.2.4 RT-PCR 分析 总 RNA 抽提参照 Li 等<sup>[16]</sup>方法,逆转录反应参照方结红等<sup>[17]</sup>。在 *OsAct1* 为内参的基础上,以反转录得到的 cDNA 为模板,以 *OsGL1-5-R* 和 *OsGL1-5-F* 为引物进行 PCR 扩增,分析蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 的表达情况。扩增反应体系含 cDNA 1μL、10×buffer 2.5μL、dNTPs (10mmol·L<sup>-1</sup>) 0.25μL、上游引物 (10μmol·L<sup>-1</sup>) 1μL、下游引物 (10μmol·L<sup>-1</sup>) 1μL、Taq DNA 聚合酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.2μL、dH<sub>2</sub>O 19.05μL。扩增反应程序为:预变性 94℃ 5min;94℃

30s,58℃ 30s,72℃ 30s;72℃ 延伸 10min,扩增循环数为 27。

1.2.5 mRNA 原位杂交 原位杂交参照 Jiang 等<sup>[18]</sup>方法进行。将不同时期新鲜的幼穗浸泡于 4% 多聚甲醛中固定过夜,以不同浓度梯度 (30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100%) 乙醇进行脱水,以不同比例的无水乙醇和二甲苯混合液进行渗透处理,按常规石蜡包埋程序包埋。材料切片厚度为 8~10μm,将切片置于展片机上,42℃ 展片并干燥 24 h 以上以固定切片。

以水稻幼苗为材料抽提 RNA,并反转录合成第一链,以 *OsGL1-5* 基因 (基因位点号 Os10g0471100,全长 cDNA 克隆号 AK100751) 设计特异引物进行特异片段扩增,并连接在载体 pGEM-Teasy 上,然后转化大肠杆菌 DH10B。以重组质粒 DNA 为模板,以 RNA 聚合酶进行体外转录,制备探针,备用于原位杂交。

## 2 结果与分析

### 2.1 *OsGL1-5* 基因启动子的顺式作用元件分析

应用植物启动子及其反式作用因子在线数据库 PLACE 对 *OsGL1-5* 启动子顺式作用元件进行了预测,结果见表 1。分析结果显示,*OsGL1-5* 启动子存在典型的 TATA-box 和启动子的基本元件 CAAT-box 以及大量的组织特异表达核苷酸位点:27 个叶肉特异表达的 CACTFTPPCAI 位点,10 个保卫细胞特异表达基因的 TAAAGmotif 位点,11 个花粉特异表达基因的 GTGAmotif 位点,9 个茎特异表达的位点 NODCON,9 个根特异表达的 ROOTmotif;*OsGL1-5* 启动子也包括大量的与逆境相关的顺式作用元件:早期应答脱水胁迫和 ABA 应答有关的顺式作用元件 ABRELATERD1、ACGTATERD1、ACGTABREMOTIFA2OSEM、CBFHV、DRE2COREZMRAB17、DPBFCOREDCDC3、MYCATRD22 和 MYBCORE 以及响应高盐、冷、伤害、病原菌等生物和非生物胁迫的顺式元件 GT1GMSCAM4、MYBPZM、LTRE1HVBLT49、MYCCONSENSUSAT、WBOXNTERF3、ELRECOREPCRPI、MYBST1 和 OSE2ROOTNODULE 等;还有响应 Ca<sup>2+</sup> 信号、氧化胁迫以及铜离子胁迫相关的顺式作用元件 ABRERATCAL、ASF1MOTIFCAMV 和 CURECORECR。同时,还存在外源激素信号分子水杨酸、生长素、细胞分裂素相关顺式作用元件 WBOXATNPRI、ARR1AT 和 SURECOREATSULTR11 等。除了胁迫相关顺式作用元件,还发现与胚、胚乳及种子发育相关的调控元件 CANBNNAPA、EBOXBNNAPA 以

表 1 水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 启动子顺式作用元件预测分析Table 1 Prediction of cis-acting elements of the wax biosynthesis related gene *OsGL1-5* promoter in rice

位点名称 Site name	核心序列 Core sequence	作用 Function
TATA-box	TAATA	核心启动子 Core promoter
CAATBOX1/300ELEMENT	TGHAAARK	增强子 Enhancer elements
CACTFTPPCA1	YACT	叶肉特异表达的元件 Elements for mesophyll specific gene expression in the C4 plant
TAAAGSTKST1	TAAAG	保卫细胞特异表达基因结构域 Regulate guard cell-specific gene expression
POLLEN1LELAT52	AGAAA	激活花粉特异表达的调节元件 Pollen-specific elements
NODCON	CTCTT	茎特异表达的调节元件 Stem-specific elements
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	根特异表达的调节元件 Root-specific elements
ABRELATERD1/ ACGTATERD1	ACGTG/ ACGT	应答早期脱水干旱元件 Early response to dehydration elements
ACGTABREMOTIFA2OSEM	ACGTGKC	应答脱水和盐胁迫元件 Response to dehydration and high-salinity stresses elements
CBFHV	RYCGAC	应答脱水干旱元件 Dehydration responsive elements
DRE2COREZMRAB17	ACCGAC	脱落酸和干旱应答元件 ABA and drought responsive elements
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	脱落酸应答元件, 胚特异元件 ABA responsive and embryo specification elements
MYCATRD22	CACATG	脱水响应元件 Dehydration responsive elements
MYBCORE	CNGTTR	脱水响应元件 Dehydration responsive elements
GT1GMSCAM4	GAAAAA	盐响应元件 Response to salinity stresses elements
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	冷特异表达元件 Cold-specific elements
MYBPZM	CCWACC	病原菌和盐诱导表达元件 Pathogen and salt induced elements
MYCONSENSUSAT	CANNTG	低温诱导响应元件 Response to cold stresses elements
ELRECOREPCRPI	TTGACC	伤害特异响应元件 Wound-specific elements
MYBST1(3)	GGATA	病原菌诱导子反应元件 Pathogen and salt induced elements
OSE2ROOTNODE	CTCTT	病原菌诱导响应元件 Pathogen and salt induced elements
ABRERATCAL	MACGYGB	结合钙离子的元件 Ca-responsive cis elements
ASF1MOTIFCAMV	TGACC	生长素、水杨酸以及光胁迫相关的顺式作用元件 Relevant to regulation auxin, salicylic acid, and light
CURECORECR	GTAC	铜离子和氧化胁迫应答元件 Copper and oxygen responsive elements
WBOXATNPR1	TTGAC	水杨酸胁迫应答元件 Response to SA signal
ARR1AT	NGATT	细胞分裂素调控的转录因子结合位点 Cytokinin-regulated transcription factor binding sites
SURECOREATSULTR11	GAGAC	生长素响应元件 Auxin-responsive elements
CANBNNAPA/EBOXBNNAPA	CNAACAC/ CANNTG	储藏蛋白表达相关的顺式元件 Elements for embryo and endosperm specific transcription of storage protein gene, seed specificity
CIACADIANLELHC	CAANNNTATC	昼夜节奏相关表达 Relevant to circadian expression

及光诱导、昼夜节律调节的典型顺式作用元件 CIACADIANLELHC 等。通过启动子顺式元件预测网站的分析预测, 水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 启动子具有组织特异表达的特性, 且存在多个逆境胁迫响应元件。这暗示 *OsGL1-5* 在特定的组织发育以及抵抗逆境胁迫中起关键的作用。

## 2.2 *OsGL1-5* 表达模式的 RT-PCR 分析

通过水稻基因组芯片表达数据库 (<http://>

plantbiol. genetics. ac. cn/rice-Affy) 分析表明, *OsGL1-5* 主要在花药和柱头中表达 (表 2)。本研究进一步采用半定量 RT-PCR 技术对 *OsGL1-5* 在不同组织和不同发育时期的小穗中表达情况进行了分析。结果表明, *OsGL1-5* 在不同发育时期的小穗中有较高水平的表达, 在叶中也有少量的表达, 而在愈伤组织、根、茎中没有检测到其表达 (图 1)。结果暗示, *OsGL1-5* 主要在生殖器官发育中起作用。

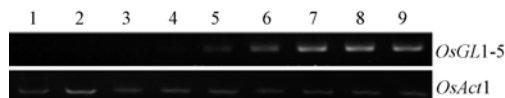
表 2 *OsGL1-5* 表达模式的水稻基因组  
芯片表达数据库分析

Table 2 Analysis of *OsGL1-5* expression by  
rice genome genechip expression data

样品名称 Sample name	表达水平 Expression level
水稻-悬浮细胞 Rice-suspension-cell	48.1
水稻-幼苗 Rice-seedling	35.8
水稻-根 Rice-root	9.7
水稻-2 周幼苗的叶 Rice-2-week-leaf	2.2
水稻-花药 Rice-anther	5291.7
水稻-柱头 Rice-stigma	23690.2
水稻-子房 Rice-ovary	375.2
水稻-胚 Rice-embryo	8.2
水稻-胚乳 Rice-endosperm	7.1
水稻-授粉 5d 后的种子 Rice-5d-seed	67

注:通过探针 Os.2322.1.S1 分析得到的组织表达数据。

Note: The tissue experiment data for probe set Os.2322.1.S1.



注:1:愈伤组织;2:根;3:茎;4:叶;5:花粉母细胞时期穗子;6:减数分裂时期穗子;7:单核时期穗子;8:二核时期穗子;9:成熟花粉时期穗子。  
Note:1: calli; 2: roots; 3: stems; 4: leaves; 5: spikelets at the pollen mother cell stage; 6: spikelets at the meiosis stage; 7: spikelets at the uninucleate stage; 8: spikelets at the binucleate stage; 9: spikelets at the mature pollen stage.

图 1 *OsGL1-5* 表达模式的 RT-PCR 分析  
Fig. 1 The expression pattern of *OsGL1-5*  
analyzed by RT-PCR

### 2.3 *OsGL1-5* 表达模式的原位杂交分析

为了进一步对水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 的时空表达模式进行更精细的定位,本试验以 *OsGL1-5* 基因 cDNA 的反义 RNA 为探针进行原位杂交分析,结果如图 2。mRNA 原位杂交结果表明,*OsGL1-5* 在颖壳毛状体(图 2b)和花药绒毡层(图 2e, 2f, 2g, 2h)中大量表达。而以待测基因的正义 RNA 为探针进行对照试验,结果显示组织切片上无明显的显色反应(图 2a, 2c, 2d),证明了试验结果的可靠性。这个结果暗示 *OsGL1-5* 在水稻绒毡层的发育中起重要作用。

### 2.4 逆境胁迫下 *OsGL1-5* 的表达特征分析

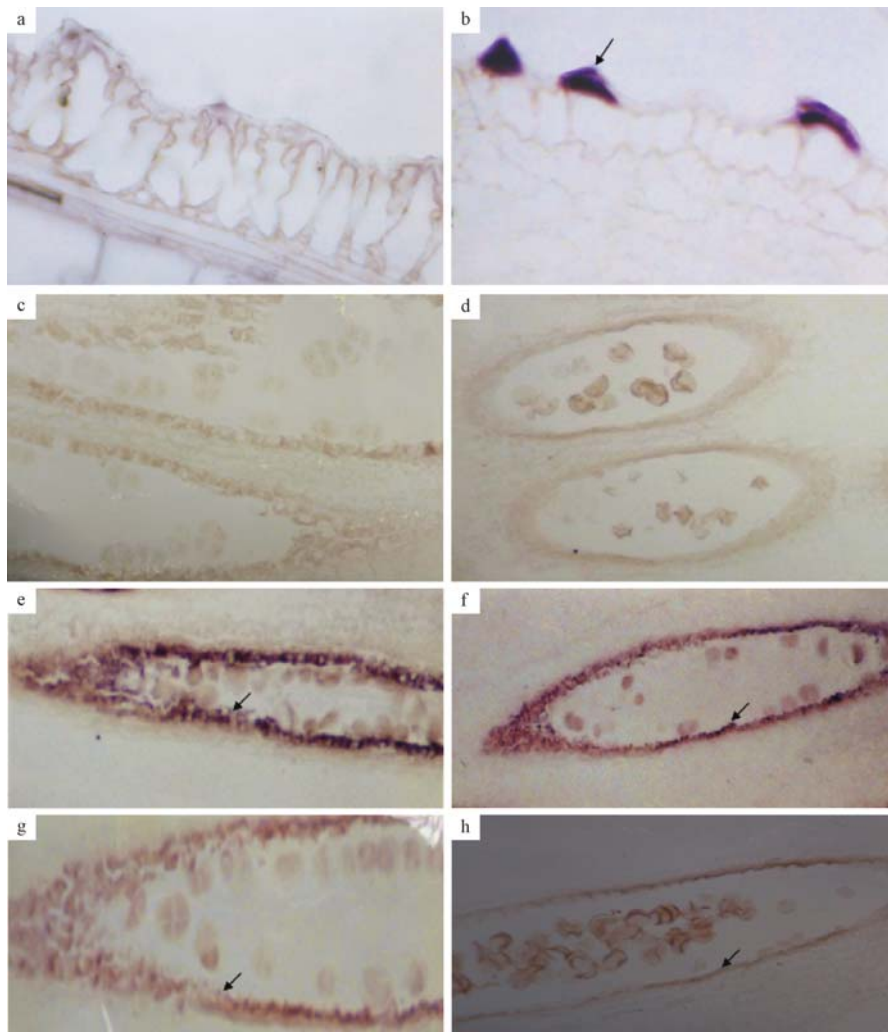
为考察水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 对逆境的

响应,本研究采用半定量 RT-PCR 分析不同逆境处理下幼苗中 *OsGL1-5* 的表达变化(图 3)。结果表明,NaCl 处理下,*OsGL1-5* 表达量在处理 12 h 时即开始有所增加,直至处理 60 h 均维持在较高水平;ABA 处理下,*OsGL1-5* 表达量在处理 30min 后开始有所增加,36 h 达到最高水平,60 h 仍维持在较高水平; $H_2O_2$  处理时,*OsGL1-5* 表达量在处理 30min 时即开始有所增加,12h 时增加量较大,36h 达到最高水平,60h 时有所下降,但仍高于对照。这些结果暗示,*OsGL1-5* 与逆境胁迫存在相关性。

## 3 讨论

一般来说,特定的植物基因所表现的时空特异性都受到该基因启动子区域内各种顺式作用元件与不同反式作用因子之间相互作用的协调控制。植物组织特异表达的启动子中存在着不同的结构域,通过这些结构域的协同作用调节着启动子不同的表达模式。启动子序列分析表明(表 1),*OsGL1-5* 启动子具有启动子常有的相应调控元件以及下游组织特异性表达必需的核苷酸序列,包括 TATA-box、CAAT-box 等。启动子还含有大量的组织特异表达顺式作用元件:花粉、叶肉、保卫细胞、根、茎特异顺式表达元件。同时,*OsGL1-5* 启动子序列中还有大量含有干旱、高盐、低温等逆境胁迫应答及激素调节和光周期调控相关顺式作用元件,说明 *OsGL1-5* 启动子调控的下游基因与植物逆境应答反应相关。*OsGL1-5* 启动子序列分析结果表明 *OsGL1-5* 的表达调控是复杂的,启动子序列上一系列的顺式元件决定了 *OsGL1-5* 的组织器官表达,对生物和非生物胁迫的应答以及对光的响应和自身反馈调节等。

植物基因的时空表达模式研究是探索基因功能的一个重要环节。花药蜡质缺陷基因 *Wda1* (*OsGL1-5*) 是水稻中第一个克隆的蜡质合成相关基因,*wda1* 缺失突变体在花粉粒和花药壁形态以及蜡质合成方面均发生了改变<sup>[14]</sup>。Jung 等<sup>[14]</sup> 通过表达数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) 分析表明,*Wda1* 主要在穗子中表达;通过 RT-PCR 分析表明,*Wda1* 在各发育时期的穗子中高度表达,且所有花器官中均有表达,在旗叶中有较低的表达量,而根中表达量极弱。本研究通过水稻基因组芯片表达数据库 (<http://plantbiol.genetics.ac.cn/rice-Affy>) 分析表明(表 2),*OsGL1-5* 在花药和柱头中表达量极高,在幼苗中也有一定表达,而根中表达量极低。通过 RT-PCR 分析结果表明(图 1),*OsGL1-5* 主要在不同发育时期的小穗



注: a: 颖壳与正义 RNA 探针杂交结果; b: 颖壳与反义 RNA 探针杂交结果; c, d: 四分体和小孢子时期花药与正义 RNA 探针杂交结果; e, f, g, h: 小孢子母细胞, 二分体, 四分体和小孢子时期花药与反义 RNA 探针杂交结果。

Note: a: RNA *in situ* hybridization in glume by sense RNA probes; b: RNA *in situ* hybridization in glume by antisense RNA probes.

c, d: RNA *in situ* hybridization in anthers at tetrad and microspore stages by sense RNA probes e, f, g, h: RNA *in situ* hybridization in anthers at microspore mother cell, dyad, tetrad and microspore stages by antisense RNA probes.

图 2 *OsGL1-5* 表达模式的原位杂交分析

Fig. 2 The expression pattern of *OsGL1-5* analyzed by RNA *in situ* hybridization

中表达,在叶中有少量表达,而在愈伤组织、根、茎中没有检测到其表达,该结果与水稻基因组芯片表达数据库分析和 Jung 等<sup>[14]</sup> RT-PCR 研究结果基本一致。但后者通过 GUS 染色分析结果表明,GUS 活性主要在表皮细胞中表达,绒毡层表达量非常弱。而本研究通过原位杂交分析结果表明(图 2),*OsGL1-5* 在花药的绒毡层表达量较高,研究结果不一致的原因可能是:GUS 活性分析是对启动子驱动下的 GUS 报告基因编码的酶活性进行定性和定量检测,有 GUS 染色部位代表的是启动子起作用的部位,而原位杂交是对转录产物即

mRNA 进行检测。因此,可能 *OsGL1-5* 最初在表皮细胞中表达,其转录产物 mRNA 被转运到绒毡层。许多研究发现植物中存在 mRNA 转运的现象<sup>[19-22]</sup>。

植物表皮蜡质层是植物自我防护的第一道屏障,在植物生长发育、适应外界环境作用方面具有重要的作用<sup>[23]</sup>。植物表皮蜡质层的增加常常受环境逆境的诱导<sup>[24]</sup>。*OsGL1-5* 启动子序列分析发现,在该基因启动子序列中含有干旱、高盐、冷等逆境胁迫应答及外源激素调节相关顺式作用元件,因此,本研究应用 RT-PCR 技术研究该基因在外源 ABA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和高盐等处

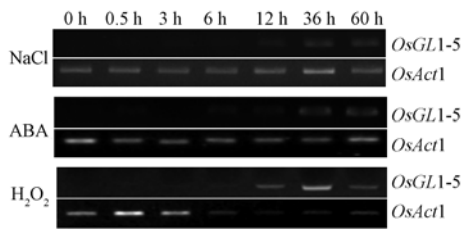


图3 逆境处理下蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 表达模式的 RT-PCR 分析

Fig. 3 The expression of wax biosynthesis related gene *OsGL1-5* under stresses analyzed by RT-PCR

理下的表达模式(图3),结果显示,水稻幼苗在 NaCl、 $H_2O_2$ 、ABA 等逆境胁迫下,*OsGL1-5* 基因表达均受到诱导。ABA 作为一种胁迫激素,在植物对胁迫环境的适应中起重要调节作用。在一些非生物逆境如干旱、高盐、低温等条件下,植物体内源 ABA 含量增加,并通过 ABA 介导调节逆境响应基因和蛋白表达,从而提高植物对逆境因子的抗性<sup>[25-28]</sup>。低浓度的  $H_2O_2$  能模拟冷驯化而导致根系吸水能力下降,从而造成植物体内水分胁迫<sup>[29]</sup>。同时,在一定浓度范围内, $H_2O_2$  作为信号分子通过参与多种信号转导途径调节相关基因的表达。研究表明, $H_2O_2$  正调控干旱、高温及干旱高温复合胁迫诱导的 4 个抗氧化防护酶基因的表达<sup>[30]</sup>。Gattuso 等<sup>[31]</sup>分析了玉米、拟南芥等植物在干旱、冷、盐等逆境胁迫下蜡质合成相关基因在 mRNA 水平上的表达情况,结果表明许多蜡质合成中的关键基因受逆境处理调节。Islam 等<sup>[11]</sup>和高国赋等<sup>[32]</sup>研究发现不同蜡质合成相关基因对不同胁迫响应存在差异。我们前期研究发现 *OsGL1-5* 基因表达诱导受低温和高温的诱导,且水稻叶角质层蜡质积累与蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 表达量变化存在相关性<sup>[15]</sup>。本研究推测 *OsGL1-5* 通过表达量增加而增加水稻叶表面蜡质的覆盖,从而增加抵御逆境胁迫的能力。本试验 RT-PCR 结果还显示,*OsGL1-5* 对不同逆境响应的的时间不一样,其对 ABA 逆境胁迫响应较快,推测其他逆境胁迫可能通过 ABA 信号传递途径调节基因的表达,增强植物抗逆性。

## 4 结论

本研究分析了水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 启动子序列特点,时空表达特征以及逆境胁迫下 *OsGL1-*

5 的表达模式。*OsGL1-5* 启动子序列中含有干旱、高盐、冷等逆境胁迫应答及外源激素调节相关顺式作用元件。*OsGL1-5* 主要在花药绒毡层和颖壳毛状体中表达,在叶中也有一定量的表达,在根和茎中没有检测到表达。在  $200\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl、 $100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 和 1.0%  $H_2O_2$  处理下,水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 在不同处理时间下表达量增加。说明水稻蜡质合成相关基因 *OsGL1-5* 表达具有组织特异性,且受逆境胁迫诱导表达,可能在抗逆境胁迫中发挥重要作用。

## 参考文献:

- [1] Kunst L, Samuels A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax[J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42: 51-80
- [2] Riederer M, Schreiber L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52:2023-2032
- [3] Kolattukudy P E. Biosynthetic pathways of cutin and waxes and their sensitivity to environmental stresses [M]. // Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach. Edited by Kerstiens G. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1996:83-108
- [4] Krauss P, Markstadter C, Riederer M. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species [J]. Plant, Cell & Environment, 1997,20:1079-1085
- [5] Jenks M A, Joly R J, Peters P J, Rich P J, Axtell J D, Ashworth E N. Chemically Induced Cuticle Mutation Affecting Epidermal Conductance to Water Vapor and Disease Susceptibility in Sorghum bicolor (L.) Moench [J]. Plant Physiology, 1994, 105:1239-1245
- [6] Zhang J Y, Broeckling C D, Blancaflor E B, Sledge M K, Sumner L W, Wang Z Y. Over-expression of *WXP1*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. The Plant Journal, 2005, 42:689-707
- [7] Zhang J Y, Broeckling C D, Sumner L W, Wang Z Y. Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, *WXP1* and *WXP2*, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64:265-278
- [8] Weng H, Molina I, Shockey J, Browse J. Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis* [J]. Planta, 2010, 231: 1089-1100
- [9] Kosma D K, Bourdenx B, Bernard A, Parsons E P, Lü S Y. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2009,151: 1918-1930
- [10] Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Leger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam R P, Napier J A, Lessire R, Joubes J. Overexpression of *Arabidopsis ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic

- and abiotic stresses[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156:29–45
- [11] Islam M A, Du H, Ning J, Ye H Y, Xiong L Z. Characterization of *Glossy1* – homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70:443–456
- [12] Qin B X, Tang D, Huang J, Li M, Wu X R, Lu L L, Wang K J, Yu H X, Chen J M, Gu M H, Cheng Z K. Rice *OsGL1-1* is involved in leaf cuticular wax and cuticle membrane[J]. *Molecular Plant*, 2011, 72:985–995
- [13] Mao B G, Cheng Z J, Lei C L, Xu F H, Gao S W, Ren Y L, Wang J L, Zhang X, Wang J, Wu F Q, Guo X P, Liu X L, Wu C Y, Wang H Y, Wan J M. Wax crystal-sparse leaf2, a rice homologue of *WAX2/GL1*, is involved in synthesis of leaf cuticular wax [J]. *Planta*, 2011, 235:39–52
- [14] Jung K H, Han M J, Lee D Y, Lee Y S, Schreiber L, Franke R, Faust A, Yephremov A, Saedler H, Kim Y W. *Wax-deficient anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development[J]. *Plant Cell*, 2006, 18:3015–3032
- [15] 周玲艳,姜大刚,李静,周海,曹伟炜,庄楚雄. 逆境处理下水稻叶角质层蜡质积累及其与蜡质合成相关基因 *OsGL1*-表达的关系[J]. *作物学报*, 2012, 38(6):1115–1120
- [16] Li J, Jiang D G, Zhou H, Li F, Yang J W, Hong L F, Fu X A, Li Z B, Liu Z L, Li J M, Zhuang C X. Expression of RNA-interference/antisense transgenes by the cognate promoters of target genes is a better gene-silencing strategy to study gene functions in rice[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6:e17444
- [17] 方结红,张明洲,刘军,王雪艳,孙传信. 水稻 *SUSIBA2-like* 基因的克隆与分析[J]. *核农学报*, 2010, 24(3):442–446
- [18] Jiang D G, Li J, Wu P, Liu Z L, Zhuang C X. Isolation and characterization of a microsporocyte-specific gene, *OsMSP*, in rice [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, 27:469–475
- [19] Lin T, Sharma P, Gonzalez D H, Viola L L, Hannapel D J. The impact of the long-distance transport of a BEL1 – like mRNA on development [J]. *Plant Physiology*, 2012, DOI: 10.1104/pp.112.209429
- [20] Li C Y, Gu M, Shi N N, Zhang H, Yang X, Osman T, Liu Y L, Wan H Z, Vatish M, Jackson S, Hong Y G. Mobile FT mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral induction[J]. *Scientific Reports*, 2011, DOI:10.1038/srep00073
- [21] Hannapel D J. A model system of development regulated by the long-distance transport of mRNA [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52:40–52
- [22] Banerjee A K, Lin T, Hannapel D J. Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151:1831–1843
- [23] van Maarseveen C, Han H, Jetter R. Development of the cuticular wax during growth of *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2009, 32:73–81
- [24] Jenks M A, Eigenbrode S D, Lemieux B. Cuticular waxes of *Arabidopsis*. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis book* [M]. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. 2002
- [25] Sanchez F J, Manzanares M, Andres E F, Tenorio J L, Ayerbe L. Residual transpiration rate, epicuticular wax load and leaf colour of pea plants in drought conditions; influence on harvest index and canopy temperature[J]. *European Journal of Agronomy*, 2001, 15:57–70
- [26] Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(s):165–183
- [27] Nambara E, Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56:165–185
- [28] 张哈,信月芝,郭惠明,程红梅. CBF 转录因子及其在植物抗冷反应中的作用[J]. *核农学报*, 2006, 20(5):406–409
- [29] Prasad T K, Anderson M P, Martin B A. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide[J]. *Plant Cell*, 1994, 6:65–74
- [30] 王瑛,杨海荣,张莉,胡秀丽. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 ABA 对干旱高温复合胁迫诱导的玉米叶片抗氧化防护基因表达的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2011, 45(6):634–639
- [31] Gattuso M, Bonomi M, Tateo F, Morandini P, Sturaro M. Stress induced modulation of wax biosynthesis in maize and *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the 51st Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress. Poster Abstract-C. 02. Riva del Garda, Italy. 2007*
- [32] 高国赋,邹杰,周小云,刘爱玲,魏宝阳,陈信波. 3 个水稻 WAX2 同源基因表达的组织特异性及逆境响应特征[J]. *作物学报*, 2010, 36(8):1336–1341

## Expression Pattern and Stress Responses of Wax Biosynthesis Related Gene *OsGL1-5* in rice

ZHOU Ling-yan<sup>1</sup> NI Er-dong<sup>2</sup> ZHU Li-ya<sup>1</sup> LIANG Hong<sup>1</sup> ZHUANG Chu-xiong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of life science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225;

<sup>2</sup>College of life science, South China Agriculture University; Guangzhou, Guangdong 510642)

**Abstract:** In this study, the promoter of wax biosynthesis related gene *OsGL1-5* in rice was analyzed via bioinformatics, and the temporal and spatial expression of *OsGL1-5* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR and mRNA *in situ* hybridization using the different tissues and developmental stage panicles as materials. In addition, the expression of *OsGL1-5* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR when the seedlings were treated with stresses, including 200mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 100μmol·L<sup>-1</sup> ABA and 1.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The bioinformatics analysis showed that the promoter of *OsGL1-5* (about 2 kb upstream of *OsGL1-5*) was predicted to contain important regulatory elements including drought, high salt, coldness, ABA, light regulation, copper, and oxygen responsive elements. The analysis of *OsGL1-5* expression profiles revealed that *OsGL1-5* was expressed highly in panicles at different developmental stages and specifically expressed in the trichomes of glume and the tapetum of anther, low expression of *OsGL1-5* was also detected in the leaves, however, its expression was not detected in the stems and roots. The analysis of *OsGL1-5* in response to stresses showed that the expression of *OsGL1-5* was increased at different time when the seedlings were treated with NaCl, ABA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Key words:** *Oryza sativa* L. ; *OsGL1-5*; Expression; Stress