

· 研究论文 ·

水稻非生物胁迫响应基因*OsMIP1*的表达与进化分析

王玲^{1,2}, 郭长奎^{1,2,3}, 任丁^{1,2*}, 马红^{1,2*}

¹复旦大学生命科学学院, 上海 200438; ²复旦大学植物科学研究所, 上海 200438

³浙江农林大学农业与食品科学学院, 杭州 311300

摘要 *MID1*编码R-R型的MYB转录因子, 对不同的非生物胁迫均有响应, 特别是在水稻(*Oryza sativa*)生殖期会受到干旱胁迫的诱导, 进而在一定程度上可以保持花粉的育性并稳定水稻产量。为进一步研究水稻*MID1*对非生物胁迫的响应网络, 利用酵母双杂交系统筛选出与其互作的蛋白因子*OsMIP1*, 并利用双分子荧光互补系统在本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)细胞中得到验证。结果表明, *OsMIP1*编码1个预测含有ENTH/ANTH/VHS结构域的跨膜转运蛋白。*OsMIP1*在根、茎、叶、小穗和胚乳中均有表达。干旱胁迫下, *OsMIP1*在叶片和生殖器官中表达, 特别是在减数分裂后的小花中表达显著上调。这些结果暗示, *OsMIP1*在花器官抵抗干旱胁迫中起一定的作用。在水稻营养生长阶段, *OsMIP1*表达还受到包括NaCl和甘露醇在内的其它非生物胁迫的影响, 暗示其可能在其它非生物胁迫调节中也具有一定的作用。植物中关于编码ENTH/ANTH/VHS结构域蛋白的研究很少。通过对*MIP1*亚家族进化关系进行分析, 结果表明, 在被子植物中, *MIP1*可分为6大类, 这6大类分别来自被子植物祖先中原本就存在的6个拷贝, 在被子植物的进化过程中又经历了多次基因重复和拷贝丢失等事件。*MIP1*家族成员广泛分布于被子植物中并可能具有抗胁迫等功能。

关键词 非生物胁迫, 干旱, 分子进化, 水稻, 酵母双杂交

王玲, 郭长奎, 任丁, 马红 (2017). 水稻非生物胁迫响应基因*OsMIP1*的表达与进化分析. 植物学报 52, 43–53.

非生物胁迫, 如干旱、盐、渗透、高温和低温胁迫是植物生长发育的主要限制因素, 它们是导致水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)和玉米(*Zea mays*)等主要作物产量下降的重要原因(Shinozaki et al., 2003; Barnabas et al., 2008)。植物体感受外界环境刺激信号后, 通过调控相关基因的转录表达进而合成不同的蛋白, 以实现其生理生化活动的调控, 并最终引发自身复杂的生理反应来抵御逆境(Li et al., 2011)。

水稻是世界上重要的粮食作物之一, 同时也是分子生物学的模式植物(Cantrell and Reeves, 2002)。目前, 对水稻抗旱方面的研究主要集中在营养生长阶段的抗旱能力(Xiong et al., 2012), 关于生殖时期对干旱抵抗能力的分子水平的研究很少。Jin等(2013)观察并分析了水稻生殖发育时期干旱胁迫下花发育的表型及转录组变化, 发现干旱胁迫会引起大量基因的表达改变, 其中包括编码转录因子、酶类和分子伴侣等的基因。

转录因子在非生物胁迫信号转导途径中起重要的调节作用, 它通过与下游基因的启动子结合来调节基因的表达从而响应逆境胁迫(Wang et al., 2011)。AP2、bZIP、Zinc-finger、MYB和NAC等转录因子在抗逆途径中起调节干旱响应的作用(Shinozaki et al., 2003; Zhu et al., 2004; Fang et al., 2010)。基因*MID1* (*MYB Important for Drought Response 1*)编码R-R类型的MYB-like转录因子, 蛋白定位于细胞核中, 能改善水稻营养期和生殖期的抗旱能力, 当生殖期遭遇干旱, 过表达*MID1*的转基因水稻能保持花粉育性和水稻产量稳定(Guo et al., 2016)。

非生物胁迫条件下, 细胞膜蛋白对于稳定细胞结构、调节细胞渗透压和细胞内外蛋白物质的运输有重要作用(Lee et al., 2009)。细胞膜系统在细胞生命活动中不可或缺, 它不仅使细胞具有一个相对稳定的内环境, 而且有利于细胞与环境之间的物质运输、能量交换和信息传递。细胞内的生物膜将细胞分隔成多个小室(如细胞器), 各个细胞器蛋白的正确运输和定位

收稿日期: 2016-04-16; 接受日期: 2016-05-26

基金项目: 转基因生物新品种培育(No.2014ZX08009-014B)

* 通讯作者。E-mail: rending2013@163.com; hongma@fudan.edu.cn

对于其执行相应的生物学功能至关重要(Baisa et al., 2013)。动物中含有ENTH/ANTH/VHS结构域的一类蛋白可以通过肌醇和磷脂类蛋白包裹成一个超螺旋结构,该结构域蛋白能介导生成网络蛋白包裹的小泡,从而增加膜的通透性(Marchler-Bauer et al., 2007)。目前,植物中关于ENTH/ANTH/VHS结构域蛋白的研究较少,其具体的生物学功能尚不清楚(Zouhar and Sauer, 2014)。

本研究通过酵母双杂交系统筛选出与MID1相互作用的蛋白因子OsMIP1 (*Oryza sativa* MID1 Interaction Protein 1)。利用Real-time PCR方法对基因OsMIP1在水稻中的表达模式以及在不同非生物胁迫下的响应水平作了初步研究。干旱胁迫下,OsMIP1在水稻叶片和不同时期花器官中均上调表达,在减数分裂后期花器中的表达上调更为明显。花器官遭受干旱胁迫时,OsMIP1的表达上调可能对抵抗胁迫起一定的作用。此外,OsMIP1的表达还受到甘露醇和NaCl胁迫的诱导,暗示其在抵抗渗透和盐胁迫调节中也发挥一定的生物学作用。另外,我们也分析了OsMIP1相关基因家族的分子进化模式。在被子植物中MIP1基因家族可分为6大类(亚家族),这6大类分别来自被子植物祖先中原本就存在的6个拷贝,它们在被子植物的进化过程中又经历了多次基因重复及拷贝丢失等事件,最终形成现在的MIP1家族。每个亚家族成员在被子植物中的功能可能相对保守。上述研究结果为进一步明确MID1与OsMIP1在植物机体中的作用机理,探索ENTH/ANTH/VHS结构域的蛋白在非生物胁迫应答中的功能奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

水稻材料为日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*),种植于光照培养箱中。培养条件为:白天30°C,夜间22°C;空气相对湿度为65%;光周期为12小时光照/12小时黑暗。田间实验在上海市邯郸路220号复旦大学网室中进行,白天平均最高温度为30°C。

1.2 方 法

1.2.1 水稻营养液配方

大量元素(1 000倍母液): 48.2 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、24.8

g·L⁻¹ KH₂PO₄、18.5 g·L⁻¹ KNO₃和15.9 g·L⁻¹ K₂SO₄。

微量元素(1 000倍母液): 2.86 g·L⁻¹ H₃BO₃、0.08 g·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O、0.22 g·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、1.81 g·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O和0.086 g·L⁻¹ Na₂MOO₄·2H₂O。

86.1 g·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O、65.9 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、4.15 g·L⁻¹ Fe-EDTA和200 g·L⁻¹ Na₂SiO₃·9H₂O。

每10 L水中加入以上母液各10 mL,用稀硫酸调pH至5.6。

1.2.2 非生物胁迫实验

苗期非生物胁迫处理:将生长至四叶期的水稻根分别浸在20% PEG6000、200 mmol·L⁻¹ NaCl和200 mmol·L⁻¹甘露醇中进行胁迫处理。一部分材料分别在处理0、2、6和24小时后,取水稻叶片,检测基因的表达情况;另一部分材料胁迫处理3天后,重新放回水稻水培液中生长,观察其受胁迫后恢复的情况。

温室中干旱处理:将萌发一致的水稻种子移栽于土中,每盆的土质量和水量都相同。待水稻长至五叶期、减数分裂前期、减数分裂后期和受精时开始干旱处理,将水分含量控制在约20%。干旱处理7天后取相应的叶片、小穗和胚乳进行基因表达分析。

1.2.3 酵母双杂交

cDNA文库筛选及阳性克隆的鉴定:用诱饵重组质粒pGBKT7-MID1转化酵母菌株Y₂HGold,筛选转化到酵母菌株Y187的水稻小穗cDNA文库,涂布50个平板,按照Clontech公司酵母双杂交操作手册所述方法检测杂交效率,利用SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade缺陷型培养基筛选表达能与MID1互作的蛋白的菌落,将初筛的阳性克隆重新在培养基上划线,进一步确认是否生长。挑取已经验证为阳性的酵母菌落,使用pGA-DT7引物AD/T7进行PCR扩增,PCR产物用琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收并测序。

1.2.4 表达分析

使用Trizol法提取总RNA,以1 μg总RNA为模板,用反转录试剂盒反转录成cDNA,稀释10倍作为定量PCR模板。设计特异引物:qOsMIP1-F: 5'-ACAACG-GCCGGTAGTCATAC-3'; qOsMIP1-R: 5'-GGGAAC-TGCTTCCTCCCTTC-3'。PCR扩增程序为:95°C 10

秒, 55°C30秒, 72°C30秒, 40个循环。用TIANGEN (2×SYBR Green QPCR Master Mix)进行PCR反应, 反应体系设为20 μL。PCR反应的数据采集在ABI荧光定量PCR仪上进行。

以*Actin1*为内参基因对所有样品进行归一化处理。引物序列如下: F: 5'-CTTCATAGGAATGGAA-GCTGCGGGTA-3'; R: 5'-CGACC ACCTTGATCTT-CATGCTGCTA-3'; 同时设置无模板对照(no template control, NTC)。每个反应的Ct值取3次技术重复的平均数(包括目标基因和内标基因), 计算目标基因平均Ct值与内参基因(*Actin1*)平均Ct值的差(Δ Ct值)。每个模板的Ct值与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct值越小, 因此通过 $2^{-\Delta$ Ct值来确定该基因在不同材料中的相对表达量。

1.2.5 双分子荧光互补和亚细胞定位

构建由CaMV35S启动子驱动表达*OsMIP1*-cYFP和nYFP-MID1两个融合蛋白的载体, 用两质粒分别转化农杆菌, 并以相同的浓度共同转化本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片, 侵染后的第2天用激光共聚焦显微镜观察荧光信号。通过构建*OsMIP1*-EYFP载体, 同样利用农杆菌转化烟草并观察荧光信号, 确定其亚细胞定位。

1.2.6 进化树的构建

同源序列的获取: 使用水稻*OsMIP1*蛋白质序列搜寻NCBI数据库, 获得黄瓜(*Cucumis sativus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆、杨树(*Populus trichocarpa*)、可可(*Theobroma cacao*)、番木瓜(*Carica papaya*)、桉树(*Eucalyptus grandis*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、猴面花(*Mimulus luteus*)、洛矶山耧斗菜(*Aquilegia coerulea*)、水稻、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、玉米、粟(*Setaria italica*)和柳枝稷(*Panicum virgatum*)的同源蛋白序列; 采用同样方法获得无油樟(*Amborella trichopoda*)的同源序列(<http://www.amborella.org>)。另外, 青冈栎(*Cyclobalanopsis glauca*)、肉花卫矛(*Euonymus carnosus*)、酢浆草(*Oxalis corniculata*)、忍冬(*Lonicera japonica*)、常春藤(*Hedera nepalensis*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、冬青(*Ilex chinensis*)、蔓长春(*Vinca*

major)、洒金桃叶珊瑚(*Aucuba japonica*)、山茶(*Camellia japonica*)、光皮树(*Swida wilsoniana*)、黄杨(*Buxus sinica*)、悬铃木(*Platanus occidentalis*)、细花泡花树(*Meliosma arviolora*)、美人蕉(*Canna indica*)、露兜树(*Pandanus tectorius*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)、芦笋(*Asparagus officinalis*)、薯蓣(*Dioscorea opposita*)、丝兰(*Yucca smalliana*)和菖蒲(*Acorus calamus*)的同源序列来自实验室转录组数据(Zeng et al., 2014)。同源搜索中Expect threshold设置为 10^{-5} 。利用MEGA软件, 对序列进行对位排, 删除重复或者明显错误的序列, 用软件设定的参数分别构建邻接(neighbor joining, NJ)树和最大似然(maximum likelihood, ML)树。

进化树的调整 and 解释: 去除明显有大片段缺失的蛋白序列, 对有小部分缺失的序列使用全基因组寻找的方法补齐, 转录组数据质量较差的物种未包括在内。

2 结果与分析

2.1 筛选与MID1蛋白相互作用的蛋白因子

水稻MID1编码R-R类型的MYB-like转录因子, 能够改善水稻营养期和生殖期的抗旱能力。在生殖期进行干旱胁迫, 过表达MID1的水稻能在一定程度上保持花粉的育性和水稻产量稳定。为了分析MID1在水稻营养生长阶段和生殖阶段的调控功能, 并找到与其相互作用的蛋白, 我们构建了截短的MID1诱饵载体, 利用酵母双杂交系统, 筛选到与其互作的蛋白因子*OsMIP1*, 预测该蛋白基因编码1个含ENTH/ANTH/VHS结构域的跨膜转运蛋白(图1), 全长1 176 bp, 编码392个氨基酸。

2.2 *OsMIP1*与MID1相互作用的验证

为了验证筛选到的*OsMIP1*是否真正可与MID1相互作用, 我们将全长的*OsMIP1*与MID1分别连接在酵母双杂交系统的BD (pGBKT7)和AD (pGADT7)载体上, 表达分别与GAL4蛋白的DNA结合域和转录激活域的融合蛋白。实验结果表明, 转化的阴性对照以及*OsMIP1*-BD与MID1-AD的酵母在SD/-Trp -Leu的二缺培养基上都可生长, 而在SD/-Trp -Leu -His -Ade的四缺培养基上只有共转化*OsMIP1*-BD与MID1-AD

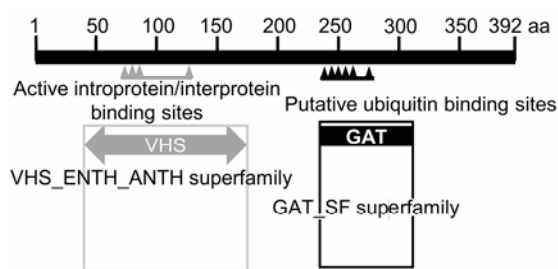


图1 OsMIP1蛋白质的保守结构域预测

Figure 1 Analysis of conserved domains of OsMIP1 protein

的酵母可以生长,说明全长的OsMIP1与MID1在酵母中可以发生相互作用(图2A)。

为了再次验证筛选得到的蛋白因子OsMIP1与MID1互作的真实性,我们利用双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)技术在烟草系统中进一步确定两者的相互作用。通过构建由CaMV35S启动子驱动的OsMIP1-cYFP与nYFP-MID1载体,利用农杆菌转化烟草叶片进行瞬时表达,农杆菌侵染后的第2天在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。实验结果表明,在植物烟草系统中OsMIP1与MID1可以相互作用,其相互作用的荧光信号在细胞膜上或细胞质中(图2B)。同时,通过构建OsMIP1-EYFP的瞬时表达载体来观察其蛋白的亚细胞定位,推测该蛋白定位于细胞膜或细胞质中(图3)。

2.3 OsMIP1表达对干旱胁迫的响应

探究OsMIP1的组织特异性表达和不同发育时期的表达模式,有助于我们更好地了解其时空表达的调控机制。利用Real-time PCR方法,我们检测了OsMIP1在不同组织器官中的表达模式,发现在正常生长条件下其在各个组织(尤其是处于营养生长时期的叶片)中均有表达,但在根和茎中表达量较低;在生殖发育时期,OsMIP1在减数分裂前后的颖花和受精后的胚乳中表达量最低(图4)。

已有研究结果表明,编码与MID1相互作用蛋白OsMIP1的基因表达对于干旱胁迫有所响应,因此我们检测了OsMIP1在水稻营养生长和生殖生长阶段对于干旱胁迫的响应水平。利用Real-time PCR方法检测OsMIP1的表达,发现在干旱胁迫下OsMIP1在水稻

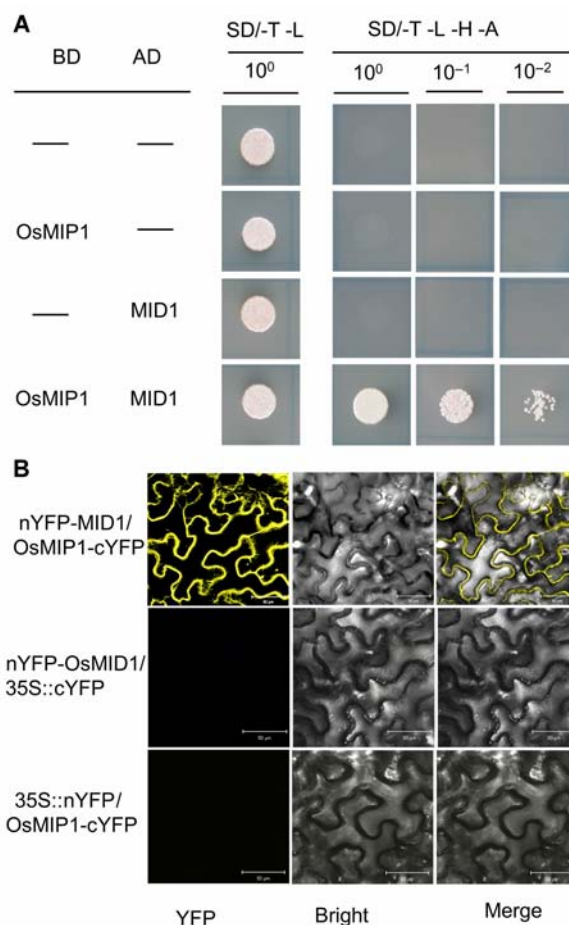


图2 OsMIP1与MID1相互作用

(A) 在酵母中OsMIP1与MID1相互作用; (B) 在烟草叶片中,利用双分子荧光互补验证OsMIP1与MID1相互作用(YFP: 黄色荧光蛋白; Merge: YFP和亮场2个图像的合并图像)。

Figure 2 OsMIP1 interacts with MID1

(A) OsMIP1 interacts with MID1 in yeast; (B) BiFC (bimolecular fluorescence complementation) analysis of OsMIP1-MID1 interaction in tobacco leaf (YFP: Yellow fluorescent protein; Merge: Merged image)

叶片和不同时期花器官中的表达均上调,特别是在减数分裂后期花器官发育过程中上调表达更为明显(图5A)。由此我们推测,花器官遭受干旱胁迫时OsMIP1的表达上调对抵抗胁迫起一定的作用。

2.4 不同胁迫条件下OsMIP1的表达量

OsMIP1在水稻营养器官中的表达量较高,推测其可能在营养生长阶段有重要作用。通过检测其对不同胁迫处理的响应水平,可为了解OsMIP1在营养期遭受

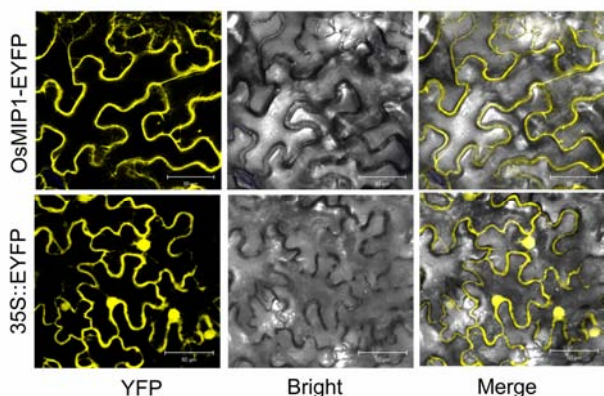


图3 *OsMIP1*的亚细胞定位
YFP: 黄色荧光蛋白; Merge: YFP和亮场2个图像的合并图像

Figure 3 Subcellular localization of *OsMIP1*
YFP: Yellow fluorescent protein; Merge: Merged image

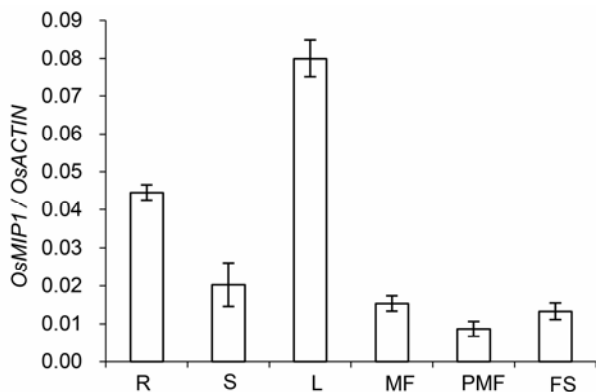


图4 *OsMIP1*在不同组织中的表达模式
R: 根; S: 茎; L: 叶; MF: 减数分裂时期的小花; PMF: 减数分裂后的小花; DS: 灌浆5天的种子

Figure 4 Expression patterns of *OsMIP1* in different tissues
R: Root; S: Stem; L: Leaf; MF: Meiotic floret; PMF: Post-meiotic floret; FS: 5-day-filling seeds

胁迫时的生物学功能提供一定的参考。野生型水稻生长至四叶期, 我们对整株水稻进行了甘露醇(200 mmol·L⁻¹)、PEG (20%)和NaCl (200 mmol·L⁻¹)胁迫处理, 分别持续处理2、6和24小时。利用Real-time PCR方法检测*OsMIP1*的表达水平, 发现该基因受到3种非生物胁迫的诱导, 特别是在甘露醇和NaCl胁迫条件下, 随着处理时间的延长, 其表达量逐渐升高。在PEG胁迫条件下, 处理2小时其表达量达到高峰,

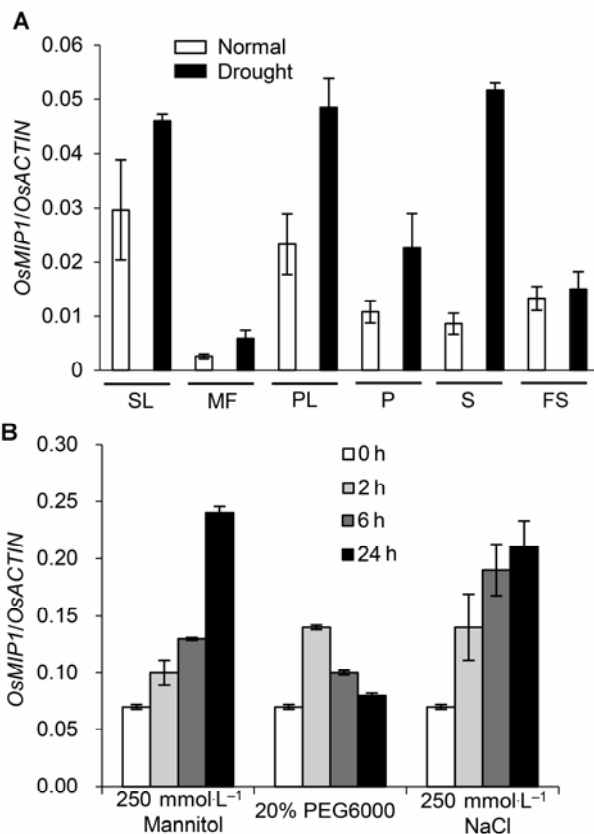


图5 *OsMIP1*在不同非生物胁迫下的表达模式
(A) *OsMIP1*在干旱胁迫下不同组织中的表达模式; (B) *OsMIP1*在200 mmol·L⁻¹甘露醇、20% PEG和200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下的表达模式。SL: 苗期叶片; MF: 减数分裂时期的小花; PL: 内稃和外稃; P: 雌蕊; S: 雄蕊; DS: 灌浆5天的种子

Figure 5 Expression patterns of *OsMIP1* in different abiotic stress

(A) Expression patterns of *OsMIP1* in different tissues under drought; (B) Expression patterns of *OsMIP1* in 200 mmol·L⁻¹ mannitol, 20% PEG and 200 mmol·L⁻¹ NaCl stress. SL: Seedling leaf; MF: Meiotic floret; PL: Palea and lemma; P: Pistil; S: Stamen; FS: 5-day filling seeds

在随后的6小时和24小时, 其表达量逐渐降低。因此, *OsMIP1*基因表达受到甘露醇和NaCl胁迫的诱导更为明显(图5B), 推测其可能在非生物胁迫调节中发挥重要的生物学作用。

2.5 物种的选择与序列比对

为了进一步揭示*OsMIP1*蛋白亚家族在被子植物中的进化关系, 我们从现在已经完成全基因组测序的植物

中选取具有代表性且进化位置较为明确的物种(表1);同时,从实验室完成转录组测序的植物中选取数据较好且进化位置较为明确的物种(表2),通过同源基因搜索获取OsMIP1家族蛋白序列,构建OsMIP1蛋白亚家族在被子植物中的进化树,分析各同源基因的进化关系。在低等植物中也能搜索到OsMIP1蛋白亚家族的成员。

从选取物种所拥有的拷贝数目可以看出,除了茄科的马铃薯只有1个拷贝外,其它选取的物种都搜索到多个拷贝,其中大部分有6个以上的拷贝。这些拷贝可能并不是这些物种中全部的OsMIP1基因家族成员,因为基因组序列需要考虑该物种全基因组测序的深度以及拼接的正确性和完成度。转录组数据也存在多种不确定因素,例如,转录组测序所用材料的所处时期不同及选取组织不同,这些材料中基因的表达程度可能有差异。有些基因没有检测到表达,但在植物中可能确实存在;此外,转录组的拼接结果也会影响转录组数据的准确度。

2.6 基因家族系统发育重建

将同源序列比对,并进行局部调整后,用于构建被子植物中MIP1基因家族的NJ和ML树。根据基因树的拓扑结构,被子植物的MIP1同源基因可分为6大支(图6, I-VI类),每大支的NJ树支持率均至少为99%,而且每一大支中都包含了真双子叶植物、单子叶植物和无油樟等的基因,说明MIP1蛋白在被子植物的祖先中就已经通过基因重复过程拥有至少6个拷贝。后期的演化过程中,多数MIP1同源基因在大部分植物中被保留下来,并且在被子植物的分化过程中,有些MIP1同源基因又经历了不同的进化模式,或者拷贝数增加,或者拷贝丢失。以第I类中的单子叶和真双子叶植物为例,在经过简化的I类进化树(图7)中(只使用了部分基因组的序列,包括所有禾本科植物、拟南芥和杨树),第1个禾本科植物的小分支内的基因大部分属于直系同源基因(除了近期复制而有2个拷贝的柳枝稷外),而禾本科植物的3个小分支之间属于旁系同源基因。在来源于转录组数据的单子叶其它物种中,美人蕉和薯蓣等也有2-3个拷贝,丝兰和芦笋则只有1个拷贝,推测第I类的MIP1同源基因在单子叶植物祖先进行分化前,就可能通过基因重复事件拥有3个重复拷贝,并分别被保留到了各个单子叶植物中。之

表1 基因组数据中选择的物种及信息

Table 1 Species from genome database and their information

Class	Order	Species	Numbers
Eudicots	Cucurbitales	<i>Cucumis sativus</i>	5
	Fabales	<i>Glycine max</i>	16
	Malvales	<i>Theobroma cacao</i>	6
	Myrtales	<i>Eucalyptus robusta</i>	8
	Brassicales	<i>Carica papaya</i>	3
	Ranunculales	<i>Aquilegia viridiflora</i>	7
	Vitales	<i>Vitis vinifera</i>	7
	Brassicales	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9
	Malpighiales	<i>Populus trichocarpa</i>	12
	Lamiales	<i>Mimulus luteus</i>	9
	Solanales	<i>Solanum tuberosum</i>	1
Monocots	Poales	<i>Zea mays</i>	14
	Poales	<i>Brachypodium distachyon</i>	10
	Poales	<i>Oryza sativa</i>	10
	Poales	<i>Panicum virgatum</i>	16
	Poales	<i>Setaria italica</i>	9
	Poales	<i>Sorghum bicolor</i>	10
	ANA grade	Amborellales	<i>Amborella trichopoda</i>

表2 转录组数据中选择的物种及信息

Table 2 Species from transcriptome database and their information

Class	Order	Species	Numbers	
Eudicots	Apiales	<i>Hedera nepalensis</i>	9	
	Aquifoliales	<i>Ilex chinensis</i>	8	
	Asterales	<i>Lactuca sativa</i>	7	
	Celastrales	<i>Euonymus carnosus</i>	9	
	Cornales	<i>Swida wilsoniana</i>	9	
	Dipsacales	<i>Lonicera japonica</i>	7	
	Ericales	<i>Camellia japonica</i>	11	
	Fagales	<i>Cyclobalanopsis glauca</i>	6	
	Cornales	<i>Aucuba japonica</i>	8	
	Gentianales	<i>Vinca major</i>	8	
	Proteales	<i>Platanus occidentalis</i>	5	
	Oxalidales	<i>Oxalis corniculata</i>	7	
	Proteales	<i>Meliosma ariflora</i>	12	
	Sapindales	<i>Buxus sinica</i>	6	
	Mono-cots	Alismatales	<i>Acorus calamus</i>	6
		Asparagales	<i>Asparagus officinalis</i>	4
		Asparagales	<i>Phalaenopsis amabilis</i>	6
Liliales		<i>Dioscorea opposita</i>	8	
Liliales		<i>Yucca smalliana</i>	6	
Pandanales		<i>Pandanus tectorius</i>	5	
Zingiberales	<i>Canna indica</i>	8		

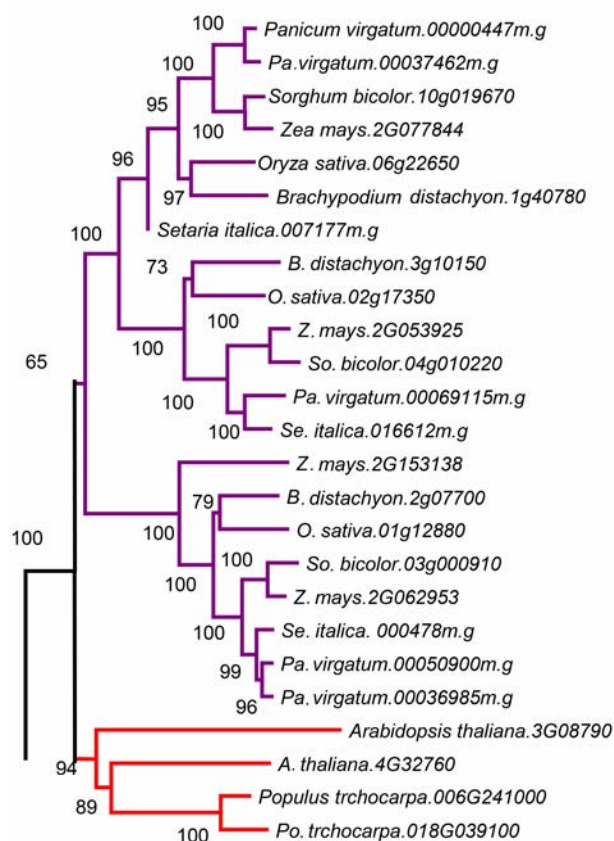


图7 简化的I类MIP1基因进化树

红色: 双子叶植物; 紫色: 单子叶植物

Figure 7 Simplified gene tree of type I MIP1 homologs
Red: Dicotyledons; Purple: Monocotyledons

后, 不同单子叶植物中的拷贝命运并不相同, 有些又经历了重复事件(如柳枝稷); 而有些可能经历了拷贝丢失事件(如丝兰等)。另一种解释则为, 部分物种的转录组数据并未能检测到所有MIP1的同源基因。马铃薯仅有的1个拷贝属于第V类, 可能其在较为近期的进化过程中丢失了绝大部分MIP1大分支的拷贝, 只剩下1个, 如果排除基因组测序可能存在的深度问题, 那么这唯一的拷贝的功能会显得尤为重要。当然, 这一结论尚需分析更多的茄科植物MIP1家族的拷贝数目与进化历史才能得到有效验证。

3 讨论

3.1 OsMIP1参与多种非生物胁迫应答

MYB是转录因子中的1个超级家族, 研究表明其在调

节植物发育和抵抗胁迫过程中起重要作用(Chen et al., 2006)。MID1基因编码R-R类型的MYB-like转录因子, 在干旱和盐胁迫条件下其表达上调。蛋白质与蛋白质相互作用是很多生命现象的基础, 细胞中的大多数活动都由蛋白质复合物完成。我们筛选到与MID1相互作用的蛋白OsMIP1, 预测该蛋白基因编码1个含有ENTH/ANTH/VHS结构域的转运蛋白, 并利用双分子荧光互补技术在烟草系统中确定了两者的互作。MID1作为转录因子的作用是调节下游基因的表达, 其蛋白定位于细胞核内, 但在烟草系统中OsMIP1与MID1互作的荧光信号在烟草的细胞膜上或细胞质中。OsMIP1含有典型的ENTH/ANTH/VHS结构域, 推测在MID1蛋白合成过程中, 定位于细胞膜或细胞质的OsMIP1可与其互作, 这种互作可能对MIP1的定位、折叠和泛素化降解有影响。

当水稻受到干旱胁迫时, 为响应干旱和抗旱, 水稻体内会有一系列基因的表达调控和信号转导途径发生变化, 引起部分蛋白的表达上调, 同时也会有某些蛋白的含量降低, 即有些蛋白需要进行泛素化降解, 故推测OsMIP1蛋白可能参与干旱胁迫的响应途径。首先, OsMIP1蛋白可能通过传递转运一些泛素化蛋白, 参与蛋白的降解, 从而作为某些信号转导途径的一个负调节因子行使自身的功能, 故而会受干旱诱导上调表达, 参与干旱胁迫的响应过程; 另外, 干旱响应基因的表达量上调会使细胞中蛋白的合成增加, 这些蛋白要正确行使功能以达到抗旱的目的就必须被正确装配运输到细胞内合适的位置, 在这个过程中OsMIP1蛋白可能行使功能, 通过募集网格蛋白等运输蛋白到内体上, 来调节细胞内膜转运系统的运行。这两种调控都是间接地对干旱进行响应, 而OsMIP1蛋白比较特异的在晚期花中受到干旱调控, 倾向于第1种功能的推测; OsMIP1参与某些生殖发育时期特异表达蛋白的降解, 同时蛋白C端主要与网格蛋白相互作用的区域序列差异较大, 可能功能上有所分化, 这也支持了第1种功能的猜想。

不同的非生物胁迫, 在生物体内可能会涉及相同基因的表达响应(Hadiarto and Tran, 2011)。本研究利用Real-time PCR法检测了干旱胁迫下水稻发育过程中OsMIP1在不同组织的表达情况, 发现其在叶片和减数分裂前后的花中对干旱胁迫的响应明显, 这与OsMIP1的表达模式相似。故可推测, 二者的表达存

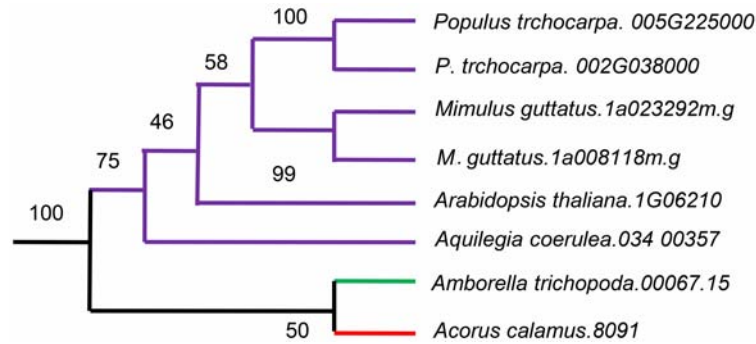


图8 简化的V类MIP1基因进化树

红色: 菖蒲; 紫色: 双子叶植物; 绿色: 无油樟

Figure 8 Simplified gene tree of type V *MIP1* homologs

Red: *Acorus calamus*; Purple: Dicotyledons; Green: *Amborella trichopoda*

在一定的协同性。通过对水稻营养生长阶段进行不同的非生物胁迫处理, 如甘露醇、干旱和NaCl胁迫, 发现*OsMIP1*对3种胁迫均有不同程度的响应, 其可能在非生物胁迫调节中行使重要的生物学功能。

3.2 *OsMIP1*基因家族的进化分析

选用转录组数据的优点不仅在于更多选取代表性物种, 而且在于可以得到更准确的进化关系树。从图8可以看出, 在第V类分支中, 现已完成全基因组测序的禾本科物种都显示丢失了这一拷贝, 最大的可能是禾本科祖先中这一拷贝发生了丢失。但若只采用禾本科的基因组数据, 很可能会将第V大类与第VI大类进行合并, 得出被子植物祖先中原来就已经存在的拷贝数目是5。这相对于现在的结论, 误差会更大, 所以选用转录组数据扩大所选物种的基数有一定的优势。当然, 转录组数据不全也会给构建进化树带来困难, 因为构建的进化树的支持率会变得较低, 每个分支中物种间的进化结构关系也不能很确定。

在被子植物MIP1蛋白家族进化树的第VI大类中, *OsMIP1* (*Os02g0697300*)基因在拟南芥中存在直系同源基因*AT5G16880*。相关研究数据显示, *AT5G16880*在拟南芥中受干旱诱导表达上调(Su et al., 2013), 且在成熟花粉中有较为特异性表达, 与*OsMIP1*的表达情况类似。以上说明*OsMIP1*与*AT5G16880*在序列和功能上可能都较为相似, 更进一步从侧面佐证了*OsMIP1*蛋白在水稻中的功能与细胞内膜转运系统相关, 并受到干旱的调节。

参考文献

- Baisa GA, Mayers JR, Bednarek SY (2013). Budding and braking news about clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 718–725.
- Barnabas B, Jager K, Feher A (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* **31**, 11–38.
- Cantrell RP, Reeves TG (2002). The rice genome. The cereal of the world's poor takes center stage. *Science* **296**, 53.
- Chen YH, Yang XY, He K, Liu MH, Li JG, Gao ZF, Lin ZQ, Zhang YF, Wang XX, Qiu XX, Shen YP, Zhang Li, Deng XH, Luo JC, Deng XW, Chen ZL, Gu HY, Qu LJ (2006). The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* **60**, 107–124.
- Fang YJ, Xie KB, Hou X, Hu HH, Xiong LH (2010). Systematic analysis of GT factor family of rice reveals a novel subfamily involved in stress responses. *Mol Genet Genomics* **283**, 157–169.
- Guo CK, You CJ, Wang SS, Cui J, Ge XC, Ma H (2016). *MID1* plays an important role in response to drought stress during reproductive development. *Plant J* **88**, 280–293.
- Hadiarto T, Tran LS (2011). Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Rep* **30**, 297–310.
- Jin Y, Yang H, Wei Z, Ma H, Ge X (2013). Rice male development under drought stress: phenotypic changes and stage-dependent transcriptomic reprogramming. *Mol Plant*

- 6, 1630–1645.
- Lee HK, Cho SK, Son O, Xu ZY, Hwang I, Kim WT** (2009). Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell* **21**, 622–641.
- Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, Yang C, Liang W, Zong J, Wilson ZA, Zhang DB** (2011). *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. *Plant Physiol* **156**, 615–630.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH** (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* **35**, D237–D240.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M** (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 410–417.
- Su Z, Ma X, Guo H, Sukiran NL, Guo B, Assmann SM, Ma H** (2013). Flower development under drought stress: morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 3785–3807.
- Wang D, Pan Y, Zhao X, Zhu L, Fu B, Li Z** (2011). Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *BMC Genomics* **12**, 149.
- Xiong J, Zhang L, Fu GF, Yang YJ, Zhu C, Tao L** (2012). Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. *J Plant Res* **125**, 155–164.
- Zeng L, Zhang Q, Sun R, Kong H, Zhang N, Ma H** (2014). Resolving deep angiosperm phylogenetic relationships using conserved nuclear genes. *Nat Commun* **5**, 4956.
- Zhu QH, Ramm K, Shivakumar R, Dennis ES, Upadhyaya NM** (2004). The *ANTHER INDEHISCENCE1* gene encoding a single MYB domain protein is involved in anther development in rice. *Plant Physiol* **135**, 1514–1525.
- Zouhar J, Sauer M** (2014). Helping hands for budding prospects: ENTH/ANTH/VHS accessory proteins in endocytosis, vacuolar transport, and secretion. *Plant Cell* **26**, 4232–4244.

Molecular Evolution and Expression Analysis of the *OsMIP1* Response to Abiotic Stress

Ling Wang^{1,2}, Changkui Guo^{1,2,3}, Ding Ren^{1,2*}, Hong Ma^{1,2*}

¹School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China; ²Institute of Plant Biology, Fudan University, Shanghai 200438, China; ³School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China

Abstract The gene *MID1* (*MYB IMPORTANT FOR DROUGHT RESPONSE1*) encodes a putative R-R type MYB transcription factor; is induced by abiotic stresses, especially drought in reproductive stage; and can improve pollen fertility and rice production. To understand the role of *MID1* in abiotic stress responses, we used the yeast two-hybrid system to find an interacting protein, *OsMIP1* (*Oryza sativa* MID1 interaction protein 1). The interaction was further confirmed by BiFC (bimolecular fluorescence complementation) analysis in tobacco leaf cells. *OsMIP1* encodes a putative transmembrane protein with an ENTH/ANTH/VHS domain. It is expressed in the root, stem, leaf, panicle and endosperm. Under drought stress, its expression is upregulated in leaf and reproductive organs, especially in post-meiotic flowers. *OsMIP1* may play a role in response to drought stress during reproductive development. *OsMIP1* expression during vegetative development can be induced by other abiotic stress, including NaCl and mannitol, which suggests that *OsMIP1* can respond to other abiotic stresses. There is little analysis of the evolution of genes encoding proteins with the ENTH/ANTH/VHS domain, so we analyzed the molecular evolution of *MIP1* homologs in flowering plants. The evolution analysis of the *MIP1* family in angiosperms showed that *MIP1* homologs can be divided into 6 types, which originated from at least 6 copies of *MIP1* homologous genes in the ancestor of extant angiosperms. After gene-duplication and -loss events, *MIP1* family members widely distributed in the angiosperms and might have various functions, possibly in stress responses.

Key words abiotic stress, drought, molecular evolution, rice, yeast two-hybrid

Wang L, Guo CK, Ren D, Ma H (2017). Molecular evolution and expression analysis of the *OsMIP1* response to abiotic stress. *Chin Bull Bot* **52**, 43–53.

* Authors for correspondence. E-mail: rending2013@163.com; hongma@fudan.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)