

小麦拔节过程中基部茎节的基因差异表达

李永春¹, 王潇¹, 王创云², 王美霞², 李磊¹, 尹钧^{1,*}

¹河南农业大学国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002; ²山西腾达种业有限公司, 太原 030031

摘要: 采用差异显示逆转录 PCR (DD-RT-PCR) 技术分析小麦基部茎节伸长过程中基因表达差异的结果表明, 小麦拔节前和拔节后基部茎节中存在明显的基因表达差异(包括质和量的差异)。从具有质的差异表达基因中挑选了4个基因进行cDNA片段(编号为 *WSR1-4*)的克隆、测序和 GenBank 数据库序列同源性比对分析, 结果显示, *WSR1* 与大麦中编码 Ser/Thr 蛋白激酶的序列具有很高的同源性, *WSR2* 的功能未知, *WSR3* 高度同源玉米中编码 Ty3/gypsy 类反转座子反转录酶的序列, *WSR4* 高度同源小麦的端粒关联 DNA。半定量 RT-PCR 技术分析拔节过程中克隆基因 *WSR1-4* 表达特性显示, 除了 *WSR4* 以外, 其余 3 个基因的表达模式和通过 DD-RT-PCR 分析所展示的差异表达趋势基本一致。

关键词: 小麦; 茎节伸长; 基因差异表达

Differential Gene Expression in the Basal Stems of Wheat at the Jointing Stage

LI Yong-Chun¹, WANG Xiao¹, WANG Chuang-Yun², WANG Mei-Xia², LI Lei¹, YIN Jun^{1,*}

¹National Engineering Research Center for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²Shanxi Tengda Seed Company Limited, Taiyuan 030031, China

Abstract: In order to study the molecular mechanism of wheat stem elongation, the differential display reverse transcription PCR (DD-RT-PCR) was used to identify the gene expression pattern during the basal stem elongation in wheat plant. The results showed that obvious differential gene expression was observed during the stem elongation, including qualitative and quantitative differences. From those qualitatively differentially expressed genes, four of them, designated as *WSR1-4*, were selected for cDNA fragment cloning and sequencing. Sequence homology search in GenBank database showed that the *WSR1* was highly similar to a barley sequence encoding the serine/threonine protein kinase, *WSR2* had no homology hits, *WSR3* showed high similarity to a maize sequence encoding the Ty3/gypsy-type retrotransposon reverse transcriptase, while *WSR4* showed high similarity to wheat telomere-associated DNA. The expression patterns of these four cDNAs were analyzed via semi-quantitative RT-PCR in the elongating wheat stem, the results showed that the expression patterns of three cloned cDNAs, except the *WSR4*, were basically agree with the expression trends displayed in DD-RT-PCR analysis.

Key words: wheat; stem elongation; gene differential expression

倒伏是影响小麦持续高产稳产的重要限制因素, 特别是随着我国小麦高产栽培技术的大力推广和应用, 高产与倒伏的矛盾日益突出。基部节间过长是造成小麦倒伏的主要原因之一, 适当控制小麦基部 1、2 节间的长度可以有效提高小麦的抗倒性。目前, 有关调控小麦茎节伸长的研究主要集中在植物生长延缓剂的使用和栽培生理调控(李金才等 2005; 朱新开等 2006), 而对其茎节伸长的分子调控机制研究较少(Zhang 等 2007)。本文采用 DD-RT-PCR 技术分析小麦拔节过程中基部茎节组织的基因差异表达特性, 这对探讨小麦茎节伸长的分子调控机制和小麦抗倒伏分子育种来说都是有意义的。

材料与方法

温室种植小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘郑麦 9023’, 选取生长一致的植株用于取材。拔节期分别剥取拔节前及拔节过程中的基部茎节组织, 迅速在液氮中速冻后, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。用于进行基因差异表达分析的组织材料包括: 拔节前的基部茎节组织、第一节长度为 2 mm 的茎节

收稿 2008-06-20 修定 2008-09-11

资助 山西省科技厅项目(2008081007)和太原市科技项目(0801009)。

* 通讯作者(E-mail: xmzxyj@126.com; Tel: 0371-63558203)。

组织、第一节长度为5 mm的茎节组织和第一节长度为10 mm的茎节组织。

用热酚法(Liang和Pardee 1995)提取各样品的总RNA,用DNA酶(RNase-free) 37 °C消化1 h后,分别用等体积的苯酚:氯仿(1:1)和氯仿各抽提一次,经乙醇沉淀后溶解到DEPC处理的双蒸水中备用。

cDNA的合成反应采用20 μL体系,其中包括2 μg总RNA、5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3)、75 mmol·L⁻¹ KCl、3 mmol·L⁻¹ MgCl₂、10 mmol·L⁻¹ DTT、50 mmol·L⁻¹ dNTPs、Oligo d(T)₁₈ 锚定引物50 pmol、M-MLV反转录酶200 U。上述反应体系置于37 °C中温育2 h后,取2 μL反应液作为RT-PCR扩增的模板。

RT-PCR反应采用20 μL体系,其中包括反转录产物2 μL、2 μL 10×PCR缓冲液、200 mmol·L⁻¹的dNTPs, 3'端锚定引物和5'端随机引物各10 pmol, 1 U Taq DNA聚合酶。反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 40 °C 4 min, 72 °C 1 min, 1个循环; 94 °C 45 s, 60 °C 2 min, 72 °C 1 min, 40个循环; 最后, 72 °C 延伸10 min。3'端锚定引物包括: R1 (5'-AAG CTT TTT TTT TTT A-3'), R2 (5'-AAG CTT TTT TTT TTT C-3')和R3 (5'-AAG CTT TTT TTT TTT G-3'); 5'端随机引物包括: L1 (5'-TGC CGA AGC TTT GGT CAC-3'), L2 (5'-TGC CGA AGC TTT GGT CAG-3'), L3 (5'-TGC CGA AGC TTT GGT CAT-3'), L4 (5'-TGC CGA AGC TTG GAG CTT-3'), L5 (5'-TGC CGA AGC TTG ATT CCG -3')和L6 (5'-TGC CGA AGC TTC GAC TGT-3')。

扩增产物中加入5 μL 98% 甲酰胺(含100 mmol·L⁻¹的EDTA和0.1%的二甲苯青)混匀,经沸水变性10 min后取其中6 μL进行电泳分析。凝胶采用经7 mol·L⁻¹脲变性的4%的聚丙烯酰胺测序胶,电泳结束后将凝胶用硝酸银染色,并统计差异表达条带的结果。

采用煮沸法回收差异片段:将差异表达片段用解剖刀挖出,放入离心管中,加入20 μL超纯水,在100 °C水浴中煮10 min。取回收产物2 μL作为再扩增模板,其他试剂同RT-PCR。PCR扩增程序为94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 40个循环; 72 °C 10 min。将二次扩增产品在1%琼脂糖凝胶上检测,如是一条带并且和在变性聚丙

烯酰胺凝胶上的分子量一样,则可用于克隆和测序。将二次PCR扩增产物连接到pGEM-T Easy Vector上进行转化,通过蓝白斑筛选,再进行PCR鉴定,挑选阳性克隆进行测序。将获得的DNA序列在NCBI数据库中进行BLASTX比对分析,推断克隆cDNA片段对应基因的可能生物学功能。

根据克隆的序列设计特异引物进行RT-PCR分析,为防止扩增达到平台期,分别进行了28个、30个和35个循环的扩增分析,最后确定采用30个循环的检测结果;选用小麦*β-actin*基因为对照。引物为WSR1-F: 5'-CCC CAT AAG ATA GCG TAC TTC A-3'; WSR1-R: 5'-AGG AAG GCA GCA AGC AAG G-3'; WSR2-F: 5'-CAT GAG ATG AGA CGC AAG CA-3'; WSR2-R: 5'-TAG GCT GCC ACT GCA CCA C-3'; WSR3-F: 5'-CAT GGG AAG ATA TTA GCA TGG-3'; WSR3-R: 5'-CGC ATA AAG TCT TCC AAA AGT A-3'; WSR4-F: 5'-TGC ATA GAC GCG GTC GAC AT-3'; WSR4-R: 5'-CTT GGC TGA CCT CAG CCC C-3'; *β-actin*引物序列为: 5'-CAG CAA CTG GGA TGA TAT GG-3'; 5'-ATT TCG CTT TCA GCA GTG GT-3'。

结果与讨论

1 小麦茎节伸长过程中的基因差异表达

以拔节前的基部茎节组织(A)、第一节长度为2 mm (B)、5 mm (C)和10 mm (D)时的基部茎节组织的cDNA为模板,用3个3'端锚定引物与6个5'端随机引物(18个引物组合)进行RT-PCR扩增,扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的结果表明:小麦拔节过程中B、C和D 3种基部茎节平均扩增获得的条带数分别为1 529、1 507、1 475条,与拔节前基部茎节(A)相比,B、C和D三种茎节组织中分别有331 (21.7%)、340 (22.6%)和346 (23.5%)条带表现出表达差异(表1);每个引物组合可展示15~38条差异带,平均为22条,这表明在小麦拔节过程中基部茎节存在明显的基因表达差异。

2 小麦拔节过程中基部茎节组织基因差异表达类型

通过DD-RT-PCR产物的电泳分析显示,小麦拔节过程中基部茎节中存在质和量的基因表达差异。质的基因差异表达可分为5种类型。(1)拔节前的基部茎节中检测到扩增条带,在拔节过程中未检测到相应条带(QL1,图1-a);(2)拔节前检测到较

表1 小麦拔节过程中基部茎节差异表达的cDNA片段

Table 1 Differentially expressed cDNA fragments in wheat basal stems at the jointing stage

茎节类型	扩增条带数	差异条带数*	差异条带所占比例 / %
第一节长度为 2 mm 的基部茎节组织	1 529	331	21.7
第一节长度为 5 mm 的基部茎节组织	1 507	340	22.6
第一节长度为 10 mm 的基部茎节组织	1 475	346	23.5

* 与拔节前基部茎节组织相比的差异条带数。

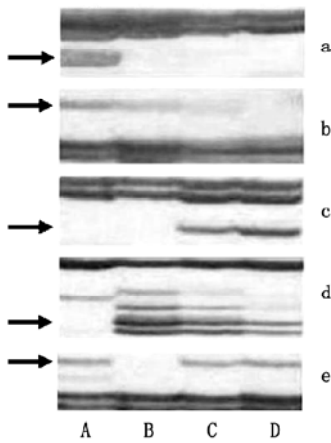


图1 小麦茎节伸长过程中质的基因表达差异类型

Fig.1 Qualitative differential gene expression patterns during the wheat basal stem elongation

A~D 为不同的茎节类型; a~e 分别为质的差异表达类型 QL 1~5; 箭头所指条带为差异表达的条带。

浓的扩增条带, 在拔节开始后扩增条带逐渐减弱至检测不到(QL 2, 图 1-b); (3)拔节前未扩增到条带, 在拔节过程中扩增到条带, 且条带逐渐加浓(QL 3, 图 1-c); (4)拔节前未扩增到条带, 在拔节过程中扩增的条带从浓逐渐变淡(QL 4, 图 1-d); (5)在拔节前和拔节过程中的不同阶段, 扩增条带时有时无, 呈波动变化(QL 5, 图 1-e)。

量的表达差异可分为 3 种类型: (1)增强型, 拔节后表达逐渐增强(QN 1, 图 2-a); (2)减弱型, 拔节

后表达减弱(QN 2, 图 2-b); (3)波动变化型, 拔节后表达量出现波动(QN 3, 图 2-c)。

3 小麦拔节过程中基部茎节组织基因差异表达类型比较

所用 18 个引物组合中, 拔节后不同长度的茎节与拔节前基部茎节相比, 3 个时期差异均以量的差异为主, 变化幅度为 12.6%~13.7%, 各差异表达类型(QN 1~3)的条带数在3种不同长度基部茎节组织差异表达条带中所占的比例也有一定差异(表 2)。质的差异表达条带占总体差异表达条带的 9.1%~9.8% (表3); 各差异表达类型中, 以拔节过程中表达波动类型(QL 5)的条带所占比例最大, 该类

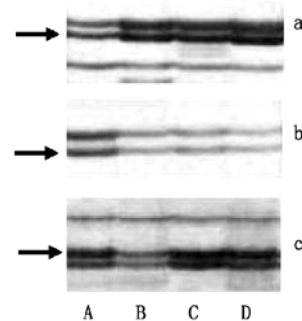


图2 小麦茎节伸长过程中量的基因表达差异类型

Fig.2 Quantitative differential gene expression patterns during the wheat basal stem elongation

A~D 为不同的茎节类型; a~c 分别为量的差异表达类型 QN 1~3; 箭头所指条带为差异表达的条带。

表2 小麦茎节伸长过程中属于量的差异表达 cDNA 片段的比例

Table 2 The percentage of quantitative differentially expressed cDNAs during the wheat basal stems elongation

茎节类型	cDNA 片段的比例 / %			
	QN 1	QN 2	QN 3	总数
第一节长度为 2 mm 的基部茎节组织	4.4	4.3	3.9	12.6
第一节长度为 5 mm 的基部茎节组织	3.7	4.4	5.1	13.2
第一节长度为 10 mm 的基部茎节组织	3.9	6.4	3.4	13.7

表3 小麦茎节伸长过程中属于质的差异表达 cDNA 片段的比例

Table 3 The percentage of qualitative differentially expressed cDNAs during the wheat basal stems elongation

茎节类型	cDNA 片段的比例 / %					总数
	QL 1	QL 2	QL 3	QL 4	QL 5	
第一节长度为 2 mm 的基部茎节组织	1.8	2.1	1.0	0.8	3.4	9.1
第一节长度为 5 mm 的基部茎节组织	1.9	2.0	0.7	1.1	3.8	9.5
第一节长度为 10 mm 的基部茎节组织	2.4	1.9	0.6	1.0	3.9	9.8

型的差异条带在拔节过程中逐渐增多(所占比例从 3.4% 增加到 3.9%)。可见, 小麦在茎节伸长过程中有大量的基因参与了这一生长发育调控过程, 差异表达基因中属于表达量改变的基因要多于特异性表达(质的差异表达类型)基因的数量。推测那些属于质的差异表达类型的基因在整个基因表达谱改变和小麦茎节伸长的分子调控过程中是发挥功能的。

4 差异表达 cDNA 片段的克隆和鉴定

从凝胶中直接回收 4 个小麦拔节过程中差异表达(质的差异)的 cDNA 片段, 分别编号为 *WSR1*~*4*。回收片段经克隆、测序和功能注释分析显示: *WSR1* 和大麦中编码 Ser/Thr 蛋白激酶的序

列具有很高的同源性, *WSR2* 的功能未知, *WSR3* 与玉米中编码 Ty3/gypsy 类反转座子反转录酶的序列同源性很高, *WSR4* 高度同源于小麦的端粒关联 DNA (表 4)。采用半定量 RT-PCR 分析小麦拔节过程中克隆基因的表达特性显示, 除了 *WSR4* 以外, 其余 3 个基因的表达模式和通过 DD-RT-PCR 分析展示的差异表达趋势基本上一致(图 3)。可见, *WSR1*、*WSR2* 和 *WSR3* 对应的基因在小麦拔节过程中存在差异表达现象, 可能在调控小麦茎节伸长过程中发挥某种功能。

由蛋白激酶催化的蛋白质可逆磷酸化是生物体中普遍存在的一种蛋白质功能调节机制(Stone 和 Walker 1995)。在真核生物中, Ser/Thr 蛋白激酶

表 4 4 个克隆 cDNA 片段的差异表达类型和功能

Table 4 Differential expression patterns and annotations of 4 cloned cDNA fragments

cDNA 片段	差异表达模式	注释的功能	相似序列的序列号	E 值
<i>WSR1</i>	QL 1	大麦 Ser/Thr 蛋白激酶	DQ469714	6e-14
<i>WSR2</i>	QL 1	未知功能	—	—
<i>WSR3</i>	QL 4	玉米 Ty3/gypsy 类反转座子反转录酶	AF030633	1e-45
<i>WSR4</i>	QL 4	端粒关联 DNA	AF004950	9e-33

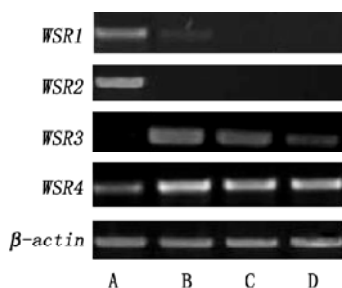


图 3 小麦茎节伸长过程中克隆的 cDNA 片段表达模式
Fig.3 The expression patterns of the cloned cDNAs during the wheat basal stems elongation

A~D 为不同的茎节类型; *WSR1*~*4* 为克隆的差异表达 cDNA 片段。

是一个很大的调控蛋白家族, 它们能从 ATP 上将磷酸转移到目标蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基上, 从而实现对蛋白质的功能调节, 该类蛋白激酶参与的蛋白质功能调节涉及到非常广泛的植物生长发育调控过程(Shimotohno 等 2006)。在本文中发现, 一个和大麦 Ser/Thr 蛋白激酶高度同源的基因 *WSR1* 在拔节过程中存在表达差异现象, 推测此基因编码蛋白可能参与小麦茎节伸长的分子调控过程。反转座子结构在植物基因组中普遍存在, 有研究表明, 它们可以插入基因内部或附近, 改变着基因表达, 在植物基因和基因组的进化中也可能发挥作用(Kumar 和 Bennetzen 1999; Fedoroff 2000; Kashkush

等 2003)。本文中发现的差异表达基因 *WSR3* 和玉米中编码 Ty3/gypsy 类反转座子反转录酶的基因高度同源, 但此种基因是否参与小麦节间伸长的调控过程, 还待进一步研究。

参考文献

- 李金才, 尹钧, 魏凤珍(2005). 播种密度对冬小麦茎秆形态特征和抗倒指数的影响. 作物学报, 31 (5): 662~666
- 朱新开, 王祥菊, 郭凯泉, 郭文善, 封超年, 彭永欣(2006). 小麦倒伏的茎秆特征及对产量与品质的影响. 麦类作物学报, (1): 87~92
- Fedoroff N (2000). Transposons and genome evolution in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 7002~7007
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA (2003). Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. Nat Genet, 33: 102~106
- Kumar A, Bennetzen JL (1999). Plant retrotransposons. Annu Rev Genet, 33: 479~532
- Liang P, Pardee AB (1995). Differential display: a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. Biol Tech, 18: 200~202
- Shimotohno A, Ohno R, Bisova K, Sakaguchi N, Huang J, Koncz C, Uchimiya H, Umeda M (2006). Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. Plant J, 47 (5): 701~710
- Stone JM, Walker JC (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. Plant Physiol, 108: 451~457
- Zhang Y, Ni ZF, Yao YY, Nie XL, Sun QX (2007). Gibberellins and heterosis of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Genet, 29 (8): 40