

文章编号: 1003-8701(2015)06-0009-04

水稻品种特优 12 在苏打盐碱处理下数字表达谱分析

宋广树¹, 朱秀侠¹, 孙 蕾¹, 吕庆雪²,
孟令聪², 周广春¹, 刘志全¹, 李启云^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 吉林吉农高新技术发展股份有限公司, 吉林 公主岭 136100)

摘 要: 通过不同盐碱处理下水稻品种特优 12 转录组测序分析, 初步研究了该品种盐碱胁迫下的差异表达基因和基因表达模式。并对差异表达的基因进行了功能分类和注释。结果表明特优 12 在盐碱胁迫下, 差异表达基因主要参与了氧化还原反应, 渗透逆境响应, 逆境胁迫响应, 氧化胁迫响应, 次生代谢途径, 刺激响应, 盐胁迫响应, 化学刺激响应, 非生物刺激响应等途径。

关键词: 水稻; 转录组; 盐碱; 胁迫

中图分类号: S511

文献标识码: A

Analysis of Digital Gene Expression of Rice Variety 'Teyou 12' under Saline Alkali Treatment

SONG Guang-shu¹, ZHU Xiu-xia¹, SUN Lei¹, LYU Qing-xue²,
MENG Ling-cong², ZHOU Guang-chun¹, LIU Zhi-quan¹, LI Qi-yun^{1*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130033;
2. Jilin JiNong Hi-Tech Development Corporation, Ltd, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The differential expression gene and gene expression pattern of the rice cultivar with different saline and alkaline treatments were studied by sequencing analysis of 'Teyou 12'. At the same time, the functional classification and annotation of the differentially expressed genes were classified by biological process. The results showed that the differential expression gene was mainly involved in the oxidation reduction, response to osmotic stress, response to stress, response to oxidative stress, secondary metabolic process, response to stimulus, response to salt stress, response to chemical stimulus, and response to abiotic stimulus, etc.

Key words: Rice; Transcriptome; Saline; Alkaline; Stress

盐碱地种稻是盐碱地改良的一种方式。吉林省西部苏打盐碱地的土壤特殊性严重制约水稻产业的发展, 导致盐碱地水稻产量较低, 苏打盐碱地由于盐碱含量高, pH 高, 土壤团粒结构差, 土壤的透水透气性差, 保水保肥性差, 秧苗素质低, 土壤肥力低, 施肥不合理, 耕作不合理等因素, 致使盐碱地水稻返青慢, 生根少, 根系短小, 分蘖少,

容易形成僵苗、小苗和老苗, 直至死苗。同时影响水稻的光合作用效率及一系列生理生化代谢途径^[1-2]。盐碱地水稻返青快, 生根多, 分蘖多, 是盐碱地改良取得成功的关键环节之一。

根系是重要的吸收器官, 植物通过根系获取养分和水分进而为其生长提供能源。根系不仅是植物从外界获取水分和矿质营养的主要吸收器官, 同时又是植物体重要生命物质如氨基酸、激素等物质合成、同化、转化的器官, 因此根系的生长情况和活动能力对植物的生长具有至关重要的作用^[3]。而植物最先感受逆境胁迫的器官也是根系, 逆境胁迫下根系形态上的变化是最为直观的, 但根系恰恰又是最不被人们直接观察的植物

收稿日期: 2015-07-11

基金项目: 吉林省博士后基金(010104); 国家水稻产业技术体系(CARS-01-15)

作者简介: 宋广树(1981-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 作物遗传育种。

通讯作者: 李启云, 男, 博士, 研究员, E-mail: qyli1225@126.com

器官^[4]。研究表明,植物抗盐中最初和最重要的过程存在于植物的根系系统^[5]。另外,盐胁迫下植物根系在吸收矿质营养的过程中盐离子与各种营养元素相互竞争而造成矿质营养胁迫,打破了植物体内的离子平衡,进而导致植物体内养分失衡,这是盐胁迫影响植物正常生长的一个重要原因。所以,研究盐胁迫对植物根系的影响具有重要的意义。盐碱胁迫会不同程度地降低水稻产量^[6-10]。目前已经对与水稻耐盐相关的基因进行了广泛的研究^[11-16],但是针对盐碱共同胁迫下基因的差异表达模式研究比较少。因此,深入研究盐碱胁迫下水稻基因表达模式,探究水稻的耐盐机理,选育耐盐碱水稻品种具有重要意义。

转录组测序的研究对象为特定细胞在某一功能状态下所能转录出来的所有RNA的总和,是研究基因功能及结构研究的基础,通过新一代高通量测序,能够全面快速地获得某一物种特定组织或器官在某一状态下的几乎所有转录本序列信息,是研究盐碱胁迫下水稻根系差异基因表达模式的最佳方法之一。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

特优12(TY12)是由吉林省农业科学院水稻研究所选育的水稻品种,本文中缩写为TY12。

1.2 处理方法

将各供试材料的种子经1%次氯酸钠溶液消毒15 min后,用蒸馏水冲洗5次,25℃条件下在湿润的滤纸上萌动2 d后,转至人工气候箱中光照培养,待秧苗生长至一叶一心期,选择整齐一致的幼苗移栽到避光塑料培养盒中,蒸馏水培养至两叶一心期后,对其进行盐碱胁迫处理,用0.2%(24 mmol/L, TY12_2)和0.4%NaHCO₃(48 mmol/L, TY12_3)各培养一周,对照(CK)用蒸馏水培养(TY12_1)。分别取处理的根系并迅速置于液氮中,样本保存于-80℃冰箱中备用,并将样品送至北京诺禾致源生物技术有限公司进行RNA-Seq测序。

1.3 差异表达基因的筛选

基因表达量以RPKM(Reads Per KB of Million reads)值表示,通过公式 $RPKM = 10^6 C / (NL / 10^3)$ 计算出每个基因的RPKM值。

RPKM值为1时,对于长为1 Kb的基因,每100万个reads中就有1个read能对上该基因。基因在盐碱处理的两个梯度下RPKM值 ≥ 1.00 ,我

们则认为该基因在盐碱处理下表达,以蒸馏水培养的表达式为对照,若差异表达变化倍数 ≥ 2 且 $P \leq 0.01$ 时,则认为该基因发生差异表达。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫响应基因的筛选

本试验中水稻具有参考基因组,首先以RPKM值=1为阈值来衡量,对照TY12_1(CK),共检测到33 579个基因表达,处理1(TY12_2)中检测到31 693个基因表达,处理2(TY12_3)中检测到32 879个基因表达,3个处理中共检测到36 993个基因表达(图1)。其中,处理1和对照中共同表达基因有

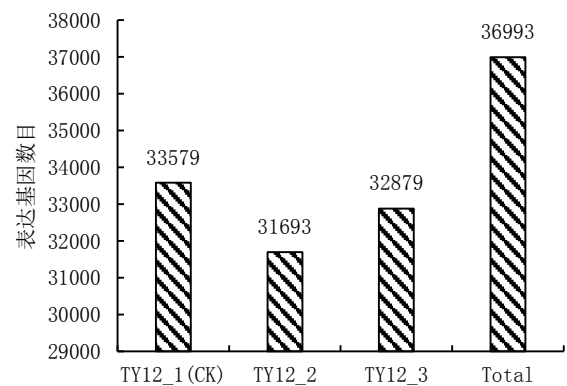


图1 基因表达数目分布

29 937个,处理2和对照中共同表达基因有30 434个,处理1和处理2中共同表达基因有29 852个,3种处理中共同表达的基因有29 065个(图2)。由此可以看出盐碱处理可能抑制了部分基因的表达,随着盐碱浓度的提高表达基因有所上调,可能是诱导部分与耐盐碱相关基因的表达。

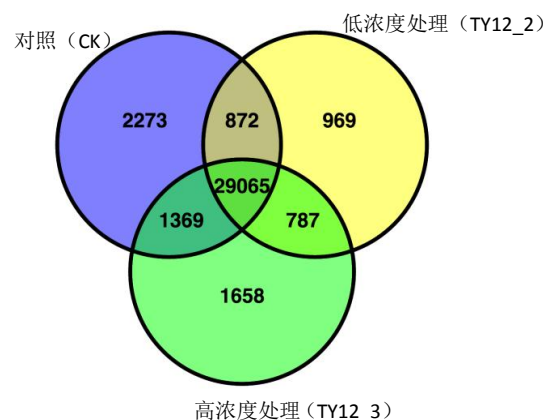


图2 不同处理下差异表达的基因

2.2 盐碱胁迫差异表达基因分析

TY12中检测到36 993个基因表达,以差异表达变化倍数 ≥ 2 , $P \leq 0.01$ 为标准进行了差异表达基

因筛选,根据差异表达基因在高低浓度中表达的不同模式,将差异表达基因分为3种表达模式(表1),表达模式1中,由低浓度盐碱处理下上调表达

表1 不同盐碱处理下基因差异表达模式分析			
表达模式	处理 1/对照(CK)	处理 2/对照(CK)	基因数
1	↑	↑	3479
	↑	→	364
	↑	↓	9
2	→	↑	1952
	→	→	463
	→	↓	1840
3	↓	↑	4
	↓	→	409
	↓	↓	2997

注: ↑表示上调表达, ↓表示下调表达, →无差异表达

的基因,在高浓度盐碱处理下上调表达的基因有3479个,没有差异的364个,下调表达的9个,说明低浓度盐碱处理下上调表达的基因主要参与了耐盐碱过程,随着盐碱浓度的升高大部分基因表达量升高,部分基因对盐碱呈现不敏感。表达模式2中,低浓度盐碱处理下,表达差异不显著的基因在高浓度盐碱处理下,表达量上升的有1952个,这些基因可能在高浓度盐碱处理下才对胁迫有响应;高浓度处理下同样没有差异表达的基因

有463个,该部分基因可能对盐碱胁迫不敏感,没有参与到盐碱代谢途径;高浓度盐碱胁迫下调表达的基因1840个,该部分基因的表达可能在高浓度盐碱中受到了抑制。表达模式3中,低浓度盐碱处理下下调表达的基因,在高浓度盐碱处理下表达量上升的4个,没有差异的409个,下调的2997个,说明低浓度盐碱处理下下调表达的基因在高浓度盐碱处理下表达呈现被抑制趋势。

2.3 盐胁迫差异表达基因的功能注释和分类

对差异表达基因进行了注释,其中在高浓度和低浓度盐碱处理中相对于对照均上调表达和均下调表达的基因1007个,通过AGRigo软件分析,以参考基因组基因为对照,将1007个ID进行GO分类和显著性分析。生物学路径(Biological process)显著性的GO类别的有80个(表2),主要包括氧化还原反应(Oxidation reduction),渗透逆境响应(Response to osmotic stress),逆境胁迫响应(Response to stress),氧化胁迫响应(Response to oxidative stress),次生代谢途径(Secondary metabolic process),刺激响应(Response to stimulus),盐胁迫响应(Response to salt stress),化学刺激响应(Response to chemical stimulus),非生物刺激响应(response to abiotic stimulus)。由此可以推断盐胁迫下水稻根系可能伴随发生了多个路径的胁迫反应。

表2 不同盐碱处理下部分上调差异基因功能注释

Gene_id		log2 (处理 1/CK)	log2 (处理 2/CK)	上调幅度	功能注释
1	OS12G0465000	6.484	8.2087	1.27	Hypothetical conserved gene
2	OS02G0113200	6.3024	7.8085	1.24	Similar to Cytochrome P450-like protein
3	OS08G0188900	6.3887	7.6268	1.19	Similar to Germin-like protein precursor
4	OS09G0561450	6.4337	7.2828	1.13	EGF-type aspartate/asparagine hydroxylation site domain containing protein
5	OS08G0477100	6.3931	7.1916	1.13	Similar to Latex allergen
6	OS02G0824100	5.957	6.6877	1.12	Cytochrome P450 family protein
7	OS04G0121300	6.331	7.0669	1.12	Similar to OSIGBa0115D20.4 protein
8	OS09G0561482	6.1069	6.6027	1.08	Similar to Wall-associated kinase-like 2
9	OS01G0389200	6.1924	6.5844	1.06	Protein of unknown function DUF679 family protein
10	OS07G0127600	5.8841	6.2292	1.06	Allergen V5/Tpx-1 related family protein
11	OS06G0521500	6.2891	6.6445	1.06	Haem peroxidase family protein
12	OS09G0543900	6.3401	6.668	1.05	Transferase family protein
13	OS01G0963000	6.1056	6.4102	1.05	Similar to Peroxidase BP 1 precursor
14	OS07G0127500	6.231	6.4716	1.04	Similar to PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a) precursor
15	OS06G0210900	5.8322	6.0191	1.03	Lipase, class 3 family protein

3 讨 论

通过不同盐碱处理下水稻品种特优 12 转录组测序分析,初步研究了该品种盐碱胁迫下的差异表达基因和基因表达模式。研究发现,低浓度盐碱处理后基因表达数量呈现下降趋势,随着盐碱浓度的升高,表达基因数目有所上升。可能由于高低浓度盐碱处理下,参与特优 12 体内盐碱代谢的基因有所不同。

对差异表达基因进行了功能分类和注释。结果表明特优 12 在盐碱胁迫下差异表达基因主要参与了氧化还原反应,渗透逆境响应,逆境胁迫响应,氧化胁迫响应,次生代谢途径,刺激响应,盐胁迫响应,化学刺激响应,非生物刺激响应等途径。

本研究通过对水稻品种特优 12 在不同盐碱处理下的差异基因表达模式分析及功能注释,研究了特优 12 在盐碱胁迫处理下的基因表达特点以及差异基因主要参与的代谢途径,初步探究了该品种的盐碱胁迫反应机制,下一步仍需对表达差异显著的基因进行定量及转基因验证,更好地确定其盐碱胁迫响应机理。

参考文献:

- [1] 杨 福,梁正伟,王志春,等.盐碱胁迫下水稻齐穗期剑叶光响应特性的研究[J].吉林农业科学,2005,30(5):7-10.
- [2] 杨 闯,尚丽霞,李淑芳,等.水稻耐盐转基因研究进展[J].吉林农业科学,2010,35(5):21-26.
- [3] 刘 静,王庆祥.NaCl 和 NaHCO₃ 胁迫对玉米幼苗根系的影响[J].杂粮作物,2010,30(1):19-21.
- [4] 刘 莹,盖钧镒,吕慧能.作物根系形态与非生物胁迫耐性关系的研究进展[J].植物遗传资源学报,2003,4(3):265-269.
- [5] Lacan D, Durand M. Na⁺ and K⁺ transport in excised soybean

roots[J]. Physiol Plant, 1995,93(1): 132-138.

- [6] Sultana N, Ikeda T, Itoh R. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains[J]. Environ Exp Bot, 1999, 42(99): 211-220.
- [7] Abdullah Z, Khan M A, Flow ers F J. Causes of sterility in seed set of rice under salinity stress[J]. J Agron & Crop Sci, 2001, 187(1): 25-32.
- [8] Zeng L, Shannon M C. Salinity effects on the seedling growth and yield components of rice[J]. Crop Sci, 2000, 40(4): 996-1003.
- [9] Walia H, Wilson C, Zeng L, et al. Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed japonica and indica rice genotypes during panicle initiation stage[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(5): 609-623.
- [10] Rao P S, Mishra B, Gupta S R, et al. Reproductive stage tolerance to salinity and alkalinity stresses in rice genotypes[J]. Plant Breed, 2008,127(3): 256-261.
- [11] Hu S K, Tao H J, Qian Q, et al. Genetics and molecular breeding for salt-tolerance in rice[J]. Rice Genomics Genet, 2012, 3(7): 39-49.
- [12] Ren Z H, Gao J P, Li L G, et al. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter[J]. Nat Genet, 2005, 37(10): 1141-1146.
- [13] Claes B, Dekeyser R, Villarreal R, et al.Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought[J]. Plant Cell, 1990, 2(1): 19-27.
- [14] Cai H W, Morishima H. QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(8): 1217-1228.
- [15] Yamaguchi S K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress[J]. Plant Cell, 1994, 6(2): 251-264.
- [16] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt and cold-responsive gene expression[J]. Plant J, 2003, 33(4): 751-763.

(责任编辑:姜晓莉)

(上接第 8 页)

参考文献:

- [1] 刘武仁,郑金玉,罗 洋,等.玉米宽窄行种植技术的研究[J].吉林农业科学,2007,32(2):8-10,13.
- [2] 李纪岳,陈 志,杨敏丽,等.基于农机农艺结合的玉米生产机械化系统研究[J].农业机械学报,2012,43(8):83-88.
- [3] 杨粉团,曹庆军,姜晓莉,等.玉米种子定向入土方式与叶片空间分布关系[J].浙江农业学报,2015,27(3):406-411.
- [4] 杨粉团,曹庆军,梁 尧,等.玉米定向栽植模式下冠层结构及光能分布特征研究[J].广东农业科学,2015(12):33-37.
- [5] 王 波,余海兵,支银娟.玉米不同种植模式对田间小气候和产量的影响[J].核农学报,2012,26(3):623-627.

- [6] 齐 华,梁 熠,赵 明,等.栽培方式对玉米群体结构的调控效应[J].华北农学报,2010,25(3):134-139.
- [7] 吕丽华,陶洪斌,夏来坤,等.不同种植密度下的夏玉米冠层结构及光合特性[J].作物学报,2008,34(3):447-455.
- [8] 张邦琨,张 璐,陈 芳,等.不同生态玉米高产群体的小气候效应分析[J].山地农业生物学报,1998,17(5):267-273.
- [9] 宋 伟,赵长星,王月福,等.不同种植方式对花生田间小气候效应和产量的影响[J].生态学报,2011,31(3):7188-7195.

(责任编辑:范杰英)