

水稻品种长白9号的耐盐碱机理分析

宋广树¹, 朱秀侠¹, 孙 蕾¹, 吕庆雪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耐盐碱品种长白9号转录组测序分析, 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, 并对盐碱处理下上调表达的基因进行功能注释。结果表明长白9号在盐碱胁迫下, 一些渗透调节蛋白和酶类均表现出上调趋势, 这些基因可能参与了长白9号的耐盐碱过程。

关键词:水稻; 盐碱; 转录组

中图分类号: S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)02-0005-04

Analysis of Saline-alkali Tolerance Mechanism of Rice ‘Changbai 9’

SONG Guangshu¹, ZHU Xiuxia¹, SUN Lei¹, LYU Qingxue², ZHOU Guangchun¹, LIU Zhiquan¹, LI Qiyun^{1*}

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

Abstract: Through the transcriptome sequencing analysis of saline alkali tolerant ‘Changbai 9’ under different saline alkali stress, differences of expression gene and expression patterns under different saline alkali stress were preliminary studied in the paper. At the same time, all the up-regulated genes under two saline alkali treatment were annotated. The results showed that when ‘Changbai 9’ was under saline alkali stress, some proteins and enzymes of osmotic adjustment showed upward trend, these genes may be involved in the ‘Changbai 9’ salt tolerance process.

Key words: Rice; Saline alkali; Transcriptome

水稻一般对盐碱比较敏感^[1], 水稻的整个生育期均可以受到盐碱的影响^[2-7], 特别是盐碱对水稻幼苗期影响比较明显, 同时可以影响水稻的很多农艺性状^[8-9]。目前对与水稻耐盐碱相关的基因研究比较多, 大部分是通过QTL定位和关联分析, 确定与水稻耐盐碱相关的位点^[10-17], 工作量大, 并且性状定位结果很容易受到环境因素的影响, 进而影响相关基因位点定位的准确性。转录组测序分析能够对特定的组织/细胞中的基因表达标签高通量测序, 得到大量的Tag序列信息。可以直接对任何物种包括未知基因在内的全基因组表达谱分析, 从而对基因、基因表达水平以及样品间基因表达差异等进行研究, 更为高效地对

植物的耐盐碱机理进行探讨和深入研究。水稻品种长白9号是吉林省农业科学院于1994年审定的耐盐碱水稻品种, 在吉林省西部盐碱地稻区种植20余年, 为吉林省水稻生产做出了突出贡献, 研究其耐盐碱机理, 对于指导耐盐碱新品种选育具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

长白9号(CB9)是由吉林省农业科学院水稻所于1994年审定的水稻品种, 耐盐碱性强, 在pH=8.5、土壤含盐量0.3%条件下秧苗仍能正常生长, 在pH=10的土壤环境下仍能保持生长, 本文中缩写为CB9。

1.2 处理方法

1.2.1 幼苗培养

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, 生长至一叶一心, 选择整齐一致的幼苗移栽到避光塑料培养盒中, 通过蒸馏水培养至两叶

收稿日期: 2015-11-24

基金项目: 吉林省博士后基金(0010404); 国家水稻产业技术体系项目(CARS-01-15); 吉林省科技攻关重点项目(20130206001NY); 国家粮食丰产科技工程项目(2012BAD04B02, 2013BAD07B02)

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

一心期后,对其进行盐碱胁迫处理。

1.2.2 盐碱处理

试验设1个对照,2个处理,对照(CK)用蒸馏水培养(CB9_1),处理分别用0.2%NaHCO₃(24 mmol/L, CB9_2)(低浓度处理),0.4%NaHCO₃(48 mmol/L, CB9_3)(高浓度处理),各培养7 d。分别取处理的根系并迅速置于液氮中快速冷冻,样品保存于-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,计算出每个基因的RPKM值。

$$RPKM = \frac{10^6 C}{NL/10^3}$$

RPKM值为1.00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,则认为该基因在盐碱处理下表达,以蒸馏水培养的表达值为对照,若差异倍数≥2时,且P≤0.01,则认为该基因发生差异表达。

2 结果与分析

2.1 盐碱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CB9_1(CK),共检测到31 229个基因表达,处理1(CB9_2)中检测到32 854个基因表达,处理2(CB9_3)中检测到32 096个基因表达,3种处理中共检测到36 047个基因表达(图1)。其中,处理1和对照中共同表达基因有29 561个,处理2和对照中共同表达基因有29 148个,处理1和处理2中共同表达基因有29 929个,3种处理中共同表达的基因有28 506个(图2)。由此可以看出低浓度盐碱处理可能诱导了部分基

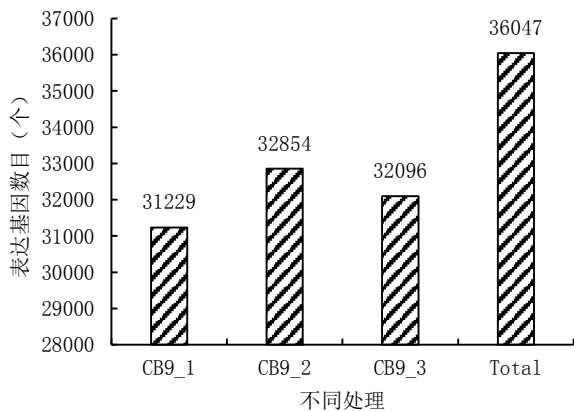


图1 基因表达数目分布

因的表达,随着盐碱浓度的提高表达基因有所下降,可能是抑制了部分与耐盐碱相关基因的表达。

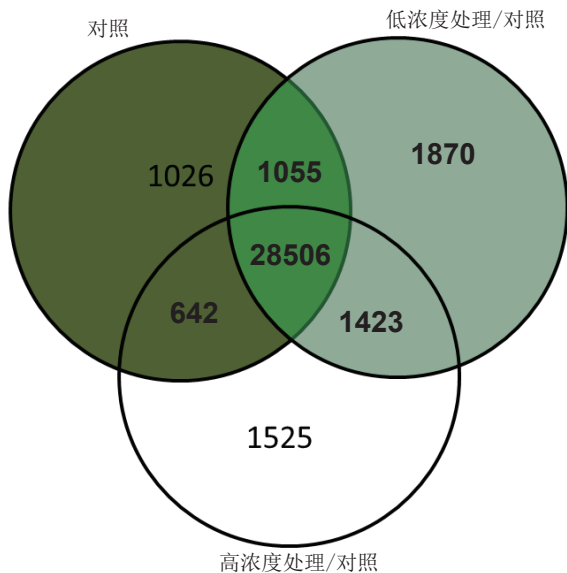


图2 不同处理下差异表达的基因

2.2 盐碱胁迫差异表达基因分析

本试验CB9中分别检测到36 047个基因表达,以差异表达变化倍数≥2, P≤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不同盐碱浓度处理下的可能模式,将基因表达模式分为三种类型(表1)。表达模式1中,由低浓度盐碱

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	↑	↑	3 479
	↑	→	364
	↑	↓	9
2	→	↑	1 952
	→	→	463
	→	↓	1 840
3	↓	↑	4
	↓	→	409
	↓	↓	2 997

注: ↑表示上调表达, ↓表示下调表达, →无差异表达

处理下上调表达的基因,在高浓度盐碱处理下上调表达的基因有3 479个,该部分基因可能参与了盐碱代谢途径;没有差异的364个,该部分基因可能在高浓度盐碱处理下表达受到了抑制;下调表达的为9个,说明低浓度盐碱处理下上调表达的大量基因参与了盐碱代谢过程,随着盐碱浓度的升高大量基因仍呈表达上升趋势。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1 952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过程;高浓度盐碱胁迫下调表达的基因1 840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,表达量上升的为4个,没有差异的409个,可能在高浓度盐碱诱导下,该部分基因被诱导激活,表达量有所上升;下降的有2 997个,该部分基因可能对盐碱比较敏感,在高浓度盐碱环境下受到了盐碱胁迫的抑制。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。

在低浓度盐碱处理下上调表达的基因有3 852个,下调表达的基因有3 410个,高浓度盐碱处理下上调表达的基因有5 435个,下调表达的基因有4 846个,高浓度盐碱处理下,基因呈现被诱导激活的趋势。高浓度处理相对于低浓度处理上调表达的基因有295个,下调表达的基因有451个(图3),说明只有少部分基因同时参与了高低浓度盐碱处理下盐碱代谢途径。

2.3 盐碱胁迫差异表达基因的功能注释分析

在低浓度和高浓度盐碱处理下均表现上调的基因进行筛选和功能注释发现一些酶类显现出相似的表达模式,并且这些基因在逆境胁迫中均有较好的调节作用。例如,含蛋白质EGF型天冬氨

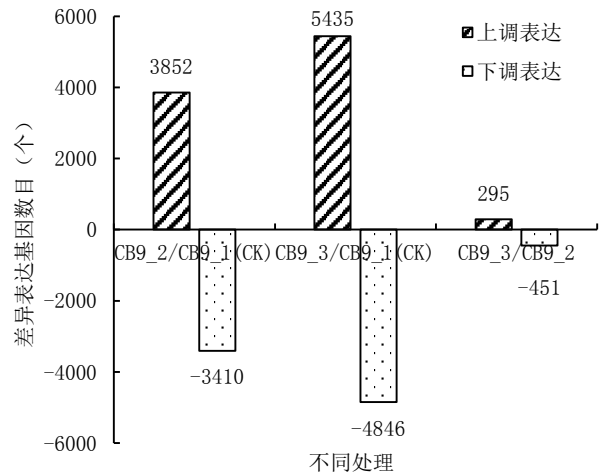


图3 不同盐碱处理下基因差异表达模式分析

酸/天冬酰胺羟基化蛋白结构域(EGF-type aspartate/asparagine hydroxylation site domain containing protein),植物中广泛存在,参与植物体内众多代谢反应的调控,如花的发育、开花、花青素的生物合成、激素响应、渗透胁迫等。血红素过氧化物酶(Haem peroxidase family protein)可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物,具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用。类似细胞色素P450样蛋白(Similar to Cytochrome P450-like protein),具有两种功能,参与生物合成和解毒功能。本试验结果表明,长白9号在盐碱胁迫下自身可能有很好的氧化抑制机制和解毒机制,这样可能是其适合盐碱地种植的一个主要原因。

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	8.208 7	1.27	Hypothetical conserved gene
2	OS02G0113200	6.302 4	7.808 5	1.24	Similar to Cytochrome P450-like protein
3	OS08G0188900	6.388 7	7.626 8	1.19	Similar to Germin-like protein precursor
4	OS09G0561450	6.433 7	7.282 8	1.13	EGF-type aspartate/asparagine hydroxylation site domain containing protein
5	OS08G0477100	6.393 1	7.191 6	1.13	Similar to Latex allergen
6	OS02G0824100	5.957	6.687 7	1.12	Cytochrome P450 family protein
7	OS04G0121300	6.331	7.066 9	1.12	Similar to OSIGBa0115D20.4 protein
8	OS09G0561482	6.106 9	6.602 7	1.08	Similar to Wall-associated kinase-like 2
9	OS01G0389200	6.192 4	6.584 4	1.06	Protein of unknown function DUF679 family protein
10	OS07G0127600	5.884 1	6.229 2	1.06	Allergen V5/Tpx-1 related family protein
11	OS06G0521500	6.289 1	6.644 5	1.06	Haem peroxidase family protein
12	OS09G0543900	6.340 1	6.668	1.05	Transferase family protein
13	OS01G0963000	6.105 6	6.410 2	1.05	Similar to Peroxidase BP 1 precursor
14	OS07G0127500	6.231	6.471 6	1.04	Similar to PR-1a pathogenesis related protein (Hv-1a) precursor
15	OS06G0210900	5.832 2	6.019 1	1.03	Lipase, class 3 family protein

3 结 论

前人关于水稻品种长白9号的耐盐碱机理也进行了研究和探讨^[15],主要是通过基因遗传连锁定位,分析了控制与耐盐碱相关性状的基因位点和区段。鉴于遗传分析群体等客观因素的限制,定位区间比较宽泛,很难在性状辅助选择中得以应用,同时,很难确定在长白9号耐盐碱过程中起关键作用的基因。定位性状选择的准确与否也限制了耐盐碱机理研究的准确性。

转录组研究是基因功能及结构研究的基础和出发点,了解转录组是解读基因组功能元件和揭示细胞及组织中分子组成所必需的,并且对理解机体发育和基因功能具有重要作用。转录组测序可以对所有的转录产物进行分类;确定基因的转录结构,剪接模式和其他转录后修饰;并量化各转录本在发育过程中和不同条件下表达水平的变化。

本试验通过高通量检测可能与盐碱胁迫处理相关的候选基因,提高了候选基因选择的准确性和目的性,根据盐碱处理下上调表达的基因进行功能注释,结果发现长白9号在盐碱胁迫下,一些渗透调节蛋白和酶类均表现出上调趋势,进而推测长白9号主要是通过自身解毒的方式在盐碱处理下调整自身的生长,其耐盐碱机理可能不同于一些植物的排盐机制。因此有待进一步对差异表达的基因进行定量分析和转基因验证,进一步明确其耐盐碱机理。

参考文献:

- [1] Shannon M C, Rhoades J D, Draper J H, et al. Assessment of salt tolerance in rice cultivars in response to salinity problems in California[J]. Crop Sci, 1998, 38(2):394-398.
- [2] Flowers T J, Yeo A R. Variability in the resistance of sodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties[J]. New Phytol, 1981, 88(2): 363-373.
- [3] Lutts S, Kinet J M, Bouharmont J. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance[J]. J Exp Bot, 1995, 46(12): 1843-1852.
- [4] Zeng L, Shannon M C. Salinity effects on the seedling growth and yield components of rice[J]. Crop Sci, 2000, 40(4): 996-1003.
- [5] Hoshikawa K. Growing rice plant: an anatomical monograph[M]. Tokyo, Japan: Nosan Gyoson Bunka Kyokai (Nobunkyo), 1989: 30-31, 59-67.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Zeng L, Shannon M C, Grieve C M. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters[J]. Euphytica, 2002, 127(2): 235-245.
- [9] Moradi F, Ismail A M, Gregorio G, et al. Salinity tolerance of rice during reproductive development and association with tolerance at seedling stage[J]. Indian J Plant Physiol, 2003, 8(1): 105-116.
- [10] Ammar M H M, Pandit A, Singh R K, et al. Mapping of QTLs controlling Na⁺, K⁺ and Cl⁻ ion concentrations in salt tolerant indica rice variety CSR27[J]. J Plant Biochem Biotech, 2009, 18(2): 139-150.
- [11] Pandit A, Rai V, Bal S, et al. Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Mol Genet Genomics, 2010, 284(2): 121-136.
- [12] Ahmadi J, Fotokian M H. Identification and mapping of quantitative trait loci associated with salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers[J]. Iran J Biotechnol, 2011, 9(1): 21-30.
- [13] Zhang G Y, Guo Y, Chen S L, et al. RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice[J]. Plant Sci, 1995, 110(2): 227-234.
- [14] Lin H X, Yanagihara S, Zhuang J Y, et al. Identification of QTLs for salt tolerance in rice via molecular markers[J]. Chin J Rice Sci, 1998, 12(2): 72-78.
- [15] Gong J M, He P, Qian Q A, et al. Identification of salt-tolerance QTL in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Chin Sci Bull, 1999, 44(1): 68-71.
- [16] Prasad S R, Bagali P G, Hittalmani S, et al. Molecular mapping of quantitative trait loci associated with seedling tolerance to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Curr Sci, 2000, 78(2): 162-164.
- [17] 祁栋灵, 郭桂珍, 李明哲, 等. 碱胁迫下梗稻幼苗前期耐碱性的数量性状基因座检测[J]. 作物学报, 2009, 35(2): 301-308.

(责任编辑:姜晓莉)