

文章编号: 1005-0906(2007)02-0026-05

玉米抗寒基因的克隆与表达研究

刘汉梅¹, 张怀渝¹, 谭振波², 黄玉碧³

(1.四川农业大学生命科学学院, 四川 雅安 625014; 2.北京大北农农业科技学院, 北京 100085;

3.四川农业大学农学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 用 DDRT-PCR 技术研究玉米自交系承 18 在常温和不同低温处理下基因表达的变化, 分离了 10 条差异表达的 cDNA。序列分析结果表明: 其中部分与前人克隆的抗逆 cDNA 同源, 部分与信号传导相关基因同源, 部分与功能未知的 cDNA 同源。用 Northern 杂交方法对差异片段 *MCII6* 做了进一步鉴定, 同时还对玉米 *Cat3*、拟南芥 *CBF1* 和 *FAD3* 基因在不同低温处理的玉米幼苗中的表达特性进行了研究, 结果表明: *MCII6*、*Cat3* 等基因受低温的诱导表达, 对提高玉米的抗寒力起积极作用。

关键词: 玉米; mRNA; 抗寒基因; 差异表达

中图分类号: S513.024; Q78

文献标识码: A

Isolation and Expression of the Genes Involved in Tolerance to Low Temperature in Maize

LIU Han-mei¹, ZHANG Huai-yu¹, TAN Zhen-bo², HUANG Yu-bi³

(1. Life Science College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014;

2. Beijing DBN Agricultural Sci & Tech Research Institute, Beijing 100085;

3. Agronomy college, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: This article was the study of differential gene expression in maize inbred Cheng18 treated with different low temperature by mRNA differential display technique. Total 10 differentially expressed cDNA fragments were isolated in the study. The results of sequence analysis showed that the differentially expressed cDNA fragments were homologous with cloned cDNA fragments of adversity resistant genes, signal transduction related genes and partial unknown function cDNA fragments. The changes in gene expression of *MCII6* (chilling induced cDNA fragment of maize) was further confirmed by the northern hybridization analysis. At the same time the northern hybridization analysis of *Cat3* in maize, *CBF1* and *FAD3* in Arabidopsis with maize materials treated by different temperature were made. The results showed that *MCII6* and *Cat3* were chilling resistant related genes, the expression of them were enhanced under the conditions of chilling acclimation and chilling stress. They played positive roles in chilling resistant.

Key words: Maize; mRNA; Chilling resistant genes; Differential expression

低温是限制玉米等冷敏植物(Plant chilling-sensitive species)分布及其生长最重要的环境因素。在我国及世界的很多玉米种植地区, 早期低温、中期干旱

是影响其生产的重要气候条件。提高玉米苗期的抗寒性, 在春季适期早播, 就能使玉米在授粉期避开夏季高温、干旱的不利气候, 提高产量, 同时也便于安排后茬作物和进行耕作改制。玉米在正常温度条件下生长抗寒能力很弱, 但若经过冷锻炼抗寒能力会大大提高, 因为许多抗寒相关基因不是组成型表达的, 而受 10℃ 以上的冷锻炼低温的诱导表达。玉米经冷锻炼, 启动抗寒防御系统, 基因表达谱也会发生改变。

差异显示技术于 1992 年由 Liang 和 Pardee 等首次报道以来, 主要应用于抗逆、发育及疾病等相关

收稿日期: 2006-08-08; 修回日期: 2006-12-17

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5022004)

作者简介: 刘汉梅(1978-), 女, 重庆人, 助教, 硕士, 研究方向为植物分子生物学。

张怀渝为本文通讯作者。Tel: 0835-2885081

E-mail: zhyu@sicau.edu.cn

谭振波为本文通讯作者。Tel: 010-62964044

E-mail: znbotan@sina.com

基因的分离与克隆。目前对玉米抗逆性的研究主要集中在抗旱、抗病虫等方面,而对抗寒报道较少。Hodges D. M.等对玉米抗寒性进行了遗传分析,结果表明,玉米抗寒性是多基因控制的数量性状;Jompuk C.和 Pimentel C.等通过研究玉米在低温环境中的光合效率,鉴定了一些与玉米低温光合作用相关的 QTLs;Kaniuga Z.等研究了膜脂中不饱和脂肪酸的含量与抗寒的关系;Prasad T. K.等研究了玉米经冷锻炼后与氧化胁迫有关酶类的表达及活性变化,并用差减杂交(Subtraction and Differential Screening)方法克隆了 3 个受低温诱导表达的基因。本文用 mRNA 差异显示技术分离玉米幼苗在不同低温处理下差异表达的基因,克隆玉米抗寒相关基因,为探明玉米抗寒机制、选育抗寒品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及抗寒处理

玉米自交系承 18 (由北京市农林科学院作物所提供)的种子分为 4 份(编号 1、2、3、4),温水浸泡 12 h,种于沙子里,沙子湿度为饱和含水量的 70%。24℃发芽 3 d 后在人工气候箱中分别按以下温度进行暗培养:①将编号 1 处理在 24℃继续生长 3 d;②将编号 2 处理在 14℃冷锻炼 3 d;③将编号 3 处理在 5℃冷处理 3 d;④将编号 4 处理先在 14℃冷锻炼 3 d 后再 5℃冷处理 3 d。收获 4 种不同低温处理的幼苗,在液氮中速冻后保存于 -80℃冰箱备用。

1.2 引物

差异显示引物来自 GENOMYX 公司提供的配套试剂盒(HIEROGLYPH Profile Kit),仅 6 条随机引物(ARP5-ARP10)经自行设计后由上海博亚公司合成。引物序列如下:

3' 端锚定引物(AP, anchor primer):5'T₇dT₁₂MN3'(M=A/C/G, N=A/T/C/G)12 条,由 17 bp 的 T₇启动子序列(ACGACTCACTATAGGGC),12bp 的 polyT 和两个可变碱基组成。AP₁T₇(dT12)GA AP₂T₇(dT12)GC AP₃T₇(dT12)GG AP₄T₇(dT12)GT AP₅T₇(dT12)CA AP₆T₇(dT12)CC AP₇T₇(dT12)CG AP₈T₇(dT12)AA AP₉T₇(dT12)AC AP₁₀T₇(dT12)AG AP₁₁T₇(dT12)AT AP₁₂T₇(dT12)CT

5' 端随机引物(ARP, arbitrary primer):由 16bp 的 M₁₃ 反向序列(ACAATTTTCACACAGGA)和 10bp 的随机序列组成。

ARP1(5'M13r-CGACTCCAAG3')

ARP2(5'M13r-GCTAGCATGG3')

ARP3(5'M13r-GACCATTGCA3')

ARP4(5'M13r-GCTAGCAGAC3')

ARP5(5'M13r-GTTGCGATCC3')

ARP6(5'M13r-AGCCAGCGAA3')

ARP7(5'M13r-GGATGCCACT3')

ARP8(5'M13r-CTTTGGCTCC3')

ARP9(5'M13r-TACAACGAGG3')

ARP10(5'M13r-TCGGTCATAG3')

1.3 总 RNA 的提取与纯化

样品在液氮中研磨后用 Trizol™ Reagent(INVITROGEN)提取,经 DNase 消化去除 DNA,并经 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度、纯度和完整性。

1.4 mRNA 差异显示及差异片段的回收、克隆

对 4 种不同温度处理材料的总 RNA 分别进行反转录和 PCR,反应体系和程序按试剂盒说明书操作。将 4 种不同温度处理材料的同一对引物 RT-PCR 产物并排在 6% 的变性聚丙烯酰胺胶上电泳分离,银染显色。本实验中对出现差异条带的引物组合进行 3 次重复 PCR 扩增,回收稳定扩增的差异条带,并用相同引物和扩增条件进行二次 PCR。扩增产物克隆到 pGEM-T Easy 载体上,并测序(上海博亚生物技术有限公司测定)。

1.5 序列分析

将测序结果在核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)[blastn]和蛋白质数据库[blastx]中进行相似性搜索,初步推测差异表达基因的功能。

1.6 Northern 杂交分析

4 种不同温度处理材料的总 RNA (20 μg/泳道)在甲醛变性琼脂糖凝胶上分离,毛细管洗脱法转印 RNA 到尼龙膜(Hybond-N⁺ Amersham)上。用 32P-dCTP 标记探针,按常规方法杂交。中强度洗膜后压片或磷屏扫描。

2 结果与分析

2.1 mRNA 差异显示结果

利用锚定引物和随机引物不同组合对 4 种不同温度处理材料进行 DDRT-PCR,电泳结果展示于 6% 变性聚丙烯酰胺胶上(图 1)。本研究采用重复 RT-PCR 的方法对差异片段进行假阳性的初步鉴定,最后共获得 10 条表现稳定的差异片段。将这些冷诱导表达的差异片段命名为 MCI(chilling induced cDNA fragment of maize)。其中 *MCI6* 在冷锻炼和冷处理时的表达减弱,*MCI4* 在直接冷处理时表达减弱,

其余片段在冷锻炼和冷处理时均表达增强。

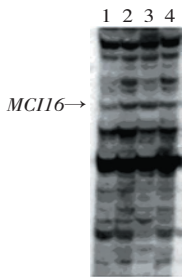


图 1 差异显示的部分结果

Fig.1 Partial-results of the differential display

表 1 差异片段序列对核酸数据库的相似性搜索结果

Table 1 Alignment of differential expression cDNA fragments nucleotide sequence in nucleic acid database

编 号	引物组合	产物长度	不同处理下的表达特性	相似序列及其编号(gb)	E 值
Clone No.	Primer combination	Product length	Expression trait	Accession number	E-value
MCI 4	AP1 ARP4	275 bp	3↘	Zea mays cDNA clone QBE4f11 CD997867	5e-100
MCI 6	AP1 ARP7	296 bp	2.3.4↘	Zea mays roo t water stress cDNA CF632200	1e-147
MCI 9	AP7 ARP10	515 bp	2↗	Iron-deficient seedlings Sorghum bicolor cDNA CF073952	0.0
MCI 12	AP1 ARP9	310 bp	2.3.4↗	Zea mays root water stress cDNA CK347819	3e-124
MCI 15	AP2 ARP7	385 bp	2.3.4↗	Maize Shoot Apical Meristems cDNA DN222127	0.0
MCI 16	AP2 ARP4	412 bp	2.3.4↗	Oryza sativa receptor-like protein kinase ARK1 mRNA AY327041	1e-56
MCI 17	AP3 ARP3	484 bp	2↗	Zea mays cDNA clone QCG37b09 CF036810	0.0
MCI 19	AP7 ARP7	396 bp	2.4↗	Zea mays cDNA 3', mRNA sequence DR955787	1e-120
MCI 20	AP3 ARP1	319 bp	2.3.4↗	Zea mays cDNA clone MEST167-H02 BM332374	8e-174
MCI 21	AP2 ARP7	300 bp	2.3.4↗	Zea mays malate dehydrogenase mRNA AF379609	2e-109

注:↗为上调表达;↘为下调表达。

Notes: The expression of gene up-regulated denoted with↗; The expression of gene down-regulated denoted with↘.

2.3 Northern 杂交结果

2.3.1 差异片段 *MCI16* 的 Northern 分析

对差异片段 *MCI16* 进行了 Northern 杂交分析,结果显示,这个片段所代表的基因在常温和低温处理下的表达不同(图 2),但在 2、3、4 这 3 种不同低温处理时表达水平相当,且均较常温对照 1 处理的表达量高,这与 RT-PCR 结果一致(图 1)。

2.3.2 *Cat3*、*CBF1* 和 *FAD3* 基因的 Northern 分析

对前人已报道的抗寒相关基因玉米过氧化氢酶 3 基因 (*Cat3*, catalase 3)、拟南芥脂肪酸去饱和酶 3 基因(*FAD3*, fatty acid desaturase 3)及拟南芥 *CBF1* 基因 (the c-repeat/dehydration responsive element binding

2.2 序列分析结果

差异片段经克隆测序及序列分析的结果见表 1。其中部分与近年提交到数据库的未知功能的 cDNA 有较高的相似性, *MCI16* (Accession Number: AY647239)与一推测的水稻受体激酶核酸序列相似性达 85%, 而推测的氨基酸序列相似性更高为 97%。通过保守结构域预测分析发现, *MCI16* 的部分氨基酸处于激酶磷酸化结构域内,而在该保守结构域内的氨基酸一致性则更高。

factors 1)进行了 Northern 杂交分析,分析这些基因在本文所研究材料和低温处理条件下的表达特性。结果表明, *Cat3* 的表达受低温诱导(图 3); *FAD3* 在各个温度处理下转录水平丰度相当(图 4),没有差异;而 *CBF1* 却没有杂交信号(结果未列出)。

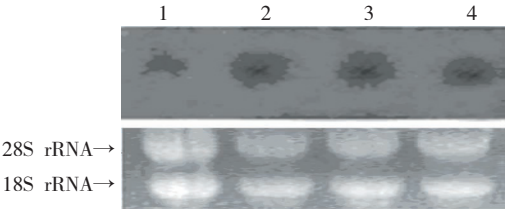


图 2 *MCI16* Northern 杂交

Fig.2 The northern hybridization analysis of *MCI16*

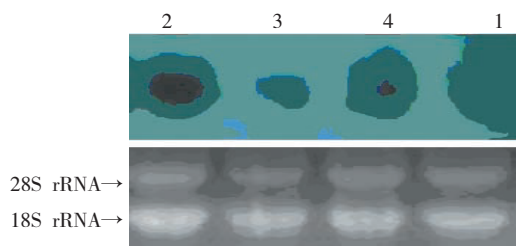


图3 *Cat3* Northern 杂交

Fig.3 The northern hybridization analysis of maize *Cat3*

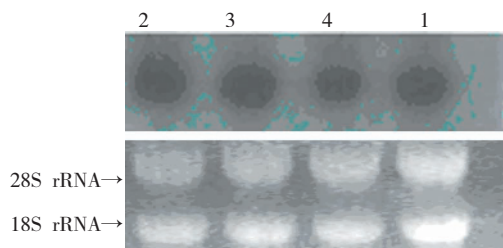


图4 *FAD3* 与玉米不同温度处理材料杂交分析

Fig.4 The northern hybridization analysis of Arabidopsis *FAD3* with maize materials treated by different temperature

注:1~4 为材料处理编号,1 为常温对照 24℃ 6 d;2 为冷锻炼处理 24℃ 3 d→14℃ 3 d;3 为直接冷处理 24℃ 3 d→5℃ 3 d;4 为冷锻炼后冷处理 24℃ 3 d→14℃ 3 d→5℃ 3 d;图 1 箭头所示为差异条带 *MCH16*;图 2、3 和 4 箭头所示分别为 28S rRNA 和 18S rRNA。

Note: 1 - 4 were the number of different temperature dealt with maize seedlings. lane1, six-day-old seedling grown at 24℃, lane2, three-day-old seedlings acclimated for 3 days at 14℃, lane3, three-day-old seedlings chilled for 3 days at 5℃, lane4, three-day-old seedlings acclimated for 3 days at 14℃ then chilled for 3 days at 5℃. Differentially expressed cDNA of *MCH16* was denoted with arrow in figure 1. Arrowheads indicate 28S rRNA and 18S rRNA respectively in fig.2, fig.3 and fig.4.

玉米 *Cat3* 在 2、4 处理下的表达量明显高于 1、3 处理,这一结果表明,*Cat3* 在 14℃ 冷锻炼时表达增强,且经冷锻炼后能提高其在 5℃ 低温处理时的表达,而不经冷锻炼直接 5℃ 冷处理时,该基因的表达却受抑制。

FAD3 能降低膜脂的饱和度,从而提高膜在低温时的稳定性,增强抗寒力。本研究在 mRNA 转录水平未能检测到该基因随温度处理发生表达量的改变,推测 *FAD3* 受低温诱导表达可能发生在转录后水平。

CBF1 是受冷诱导表达的一种低温反应转录因子,它对许多抗寒基因的表达起调节作用,在本文的实验条件下未能得到杂交信号。玉米中是否存在这类转录因子,它的表达特性及与抗寒的关系等还有待进一步研究。

3 讨论

DDRT-PCR 结果表明:玉米处于低温环境时基因表达发生了改变,尤其在冷锻炼时,基因表达变化较大,推测可能是玉米在 10℃ 以上低温冷锻炼时诱导了抗寒相关基因的表达,启动了抗寒防御系统。差异片段的表达是否受低温的调节经 Northern 杂交得以进一步验证。经序列对数据库的相似性搜索发现其中 8 个片段与数据库中未知功能的 cDNAs 序列具有较高相似性,它们很可能是受低温诱导表达的抗寒基因,但这些基因的确切功能如何,参与哪些抗寒生理代谢过程或信号传导途径等还有待进一步的研究。

综合序列分析和 Northern 杂交结果,可推测 *MCH16* 代表的基因可能是一种受体激酶,受低温的诱导表达,在玉米抗寒信号传导中扮演着重要角色。当植株处于低温逆境中时,可能产生一定的配体信号分子,通过膜上的受体激酶将冷信号由胞外传到胞内,并使胞内的蛋白质磷酸化,通过信号级联放大,启动一系列生理生化反应,在体内形成有效的抗寒反应途径,提高玉米的抗寒力。

Prasad 和 Anderson 等对 *CAT3* 与玉米抗寒力的关系进行了研究,结果表明:*CAT3* 是清除 H_2O_2 的关键酶之一,同时也是提高玉米抗寒力的重要酶,*Cat3* 的表达受低浓度的 H_2O_2 的诱导。本文对 *Cat3* 在不同低温处理下的表达研究结果显示在 2、4 处理下表达丰度最高。推测在 14℃ 冷锻炼时玉米体内 H_2O_2 开始产生,此时低浓度的 H_2O_2 可诱导 *Cat3* 的大量表达;5℃ 冷处理时 H_2O_2 含量增多,为了及时清除 H_2O_2 ,避免对植株造成伤害,*Cat3* 的表达维持在较高水平。而在 3 号直接冷处理时植株体内 H_2O_2 迅速积累,高浓度的 H_2O_2 却不能诱导 *Cat3* 的表达,对细胞造成氧化胁迫。

本实验中 *FAD3* 在各个温度处理下转录丰度相当,没有差异,可能是因为该酶受低温的诱导表达发生在转录后水平,这一结果与 Dyer JM 等的结果一致。

拟南芥的抗寒基因 *CBF1* 为一转录因子,能识别启动子区的 CRT/DRE 元件,该元件的核心序列为 CCGAC,*CBF1* 可调节启动子区含有这类核心序列的基因的表达。研究发现玉米 *Cat3* 的启动子区含有这类核心序列,推测在玉米中可能也存在这类转录因子(目前还未被克隆)。本文经 Northern 杂交却未能得到阳性结果,推测可能是玉米中的相关转录因子

与拟南芥的 *CBF1* 序列相似性不够高,因此,在本实验的杂交反应条件下未获得阳性信号。但玉米中是否真正存在这类转录因子,又如何调控其它相应基因的表达等还有待更深入的研究。

本研究通过 DDRT-PCR 的方法分离得到 10 条差异条带,有的是未知功能的基因序列,也有的基因序列通过同源比较可推测其功能,这些基因有的可能直接参与玉米的抗寒信号传导,有的可能参与后续的生理生化反应过程,对这些基因的克隆和功能分析及对前人克隆的抗寒相关基因的表达特性研究将有助于了解玉米抗寒的分子机制,为通过生物技术手段进行品种改良,培育高产优质抗逆的玉米新品种奠定基础。

参考文献:

- [1] 谭振波,刘 昕,曹鸣庆. 玉米抗寒性的研究进展[J]. 玉米科学, 2002, 10(2): 56-60.
- [2] Prasad T K, Anderson M D, Stewart C R. Acclimation, Hydrogen Peroxide, and Absciscic Acid Protect Mitochondria against Irreversible Chilling Injury in Maize Seedlings[J]. Plant Physiol, 1994, 105(2): 619-627.
- [3] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992(257): 967-971.
- [4] Hodges D M, Andrews C J, Johnson D A, Hamilton R I. Sensitivity of maize hybrids to chilling and their combining abilities at two developmental stages[J]. Crop Science, 1997(37): 850-856.
- [5] Hodges D M, Andrews C J, Johnson D A, Hamilton R I. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids[J]. Crop Science, 1997 (37): 857-863.
- [6] Kaniuga Z, Saezyska V, Miskiewicz E. The fatty acid composition of phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol of *Zea mays* genotypes differing in chilling susceptibility [J]. Plant Physiology, 1999 (154): 256-263.
- [7] Prasad T K, Anderson M D, Martin B A, Stewart C R. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide[J]. The Plant Cell, 1994, 6(1): 65-74.
- [8] Eckey C, Korell M, Leib K, et al. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase[J]. Plant Mol. Biol., 2004, 55(1): 1-15.
- [9] Eva V, Dirk I, Frank V B. Singal transduction during oxidative stress [J]. journal of experimental botany, 2002, 53(372): 1227-1236.
- [10] Prasad T K. Role of Catalase in Inducing Chilling Tolerance in Pre-Emergent Maize Seedlings[J]. Plant Physiology, 1997, 114(4): 1369-1376.