



低磷胁迫水稻根部基因表达谱研究

李利华, 邱旭华, 李香花, 王石平, 练兴明*

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 国家植物基因研究中心, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: xmlian@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2009-01-06; 接受日期: 2009-04-30

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB120905)资助项目

摘要 磷是植物体内重要的营养元素. 土壤中含磷总量丰富, 但能被植物直接吸收利用的可溶性磷含量却很低, 这成为制约农作物产量的重要因素. 本研究利用水稻寡核苷酸芯片分析了水稻根部在正常营养条件和低磷胁迫 6, 24, 72 h 3 个时间点的全基因组表达谱. 和正常营养条件下相比, 低磷胁迫水稻根部共发现 795 个差异表达基因. 差异表达基因功能分析发现: (1) 磷酸盐转运蛋白、酸性磷酸酶、RNA 酶等基因上升表达; (2) 糖酵解等与能量代谢相关基因先上升后下降表达; (3) 氮吸收和脂代谢相关基因改变其表达; (4) 蛋白质降解、细胞衰老相关基因上升表达; (5) 部分跨膜转运蛋白基因表达上调. 研究结果为进一步揭示植物低磷胁迫反应机制, 改善作物对磷吸收利用效率提供了有用的信息.

关键词

磷
水稻
芯片
表达谱

磷是植物体内一系列重要物质的组成成分, 核酸、蛋白质、磷脂、植酸、ATP 和含磷酶等都离不开磷的存在. 磷矿是一种不可再生的自然资源, 据估计按目前的开采速度, 60~90 年以后, 世界上的磷矿资源将会枯竭^[1].

植物体在低磷胁迫下, 根构型会发生改变^[2-5], 有机酸分泌增加^[6,7], 同时一些基因, 如磷酸盐转运蛋白^[8-10]、酸性磷酸酶^[11,12]、RNA 酶^[13,14]等的基因的表达表达都加强. 低磷胁迫还会诱导体内代谢副通路的形成^[15,16].

真核生物酵母中磷调节元件可以调节一系列低磷反应基因的表达^[17,18]. 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中一个对低磷信号传导起重要作用的 *PHR1* 基因, 属于 MYB 类转录因子, 它能够控制下游几个低磷反应基因的表达^[19]. *PHO3*, *PSR1*, *PDR2* 等基因在低磷信号传导过程中也发挥着重要作用, 因为这些基因的突变都能不同程度地损害磷酸盐饥饿信号的传导^[20-22]. 在高等植物中, 植物体如何传导低磷信

号以及植物体适应低磷的具体调节机制, 目前尚不十分清楚.

随着功能基因组学研究的不断深入, 基因表达谱研究在植物抗病^[23]、非生物胁迫^[24,25]、低氮营养^[26,27]、低磷营养^[28-31]等方面取得了一定的进展.

本研究所用水稻(*Oryza sativa*)寡核苷酸芯片由北京华大基因研究中心提供. 该芯片 BGI-Rice-Chip30K 由 6 万个基因特异的寡核苷酸片段(70 mer)点在两张玻片上. 本实验研究了水稻根部在低磷胁迫和正常营养条件下表达谱的差异, 希望能够更进一步揭示水稻适应低磷环境的生物学机制.

1 材料和方法

1.1 实验材料

以水稻品种中早 18(indica)为材料. 中早 18 种子浸种、催芽后, 转入营养液水培, 营养液中各营养元素含量分别为: 1.44 mmol/L NH_4NO_3 , 0.3 mmol/L NaH_2PO_4 , 0.5 mmol/L K_2SO_4 , 1.0 mmol/L CaCl_2 , 1.6

mmol/L MgSO₄, 0.17 mmol/L NaSiO₃, 50 μmol/L Fe-EDTA, 0.06 μmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 15 μmol/L H₃BO₃, 8 μmol/L MnCl₂, 0.12 μmol/L CuSO₄, 0.12 μmol/L ZnSO₄, 29 μmol/L FeCl₃, 40.5 μmol/L Citric acid, pH 5.5^[32]. 3天换一次营养液. 水培至四叶一心时进行低磷胁迫处理(低磷营养液中磷的浓度为上述营养液浓度的 1/30, 其他成分不变), 对照材料营养液不变. 设置 3 次生物学重复, 即种植 3 批材料, 每批材料种植时间间隔 5 天.

1.2 样品采集和 RNA 分离

分别在低磷胁迫 6, 24, 72 h 对水稻中早 18 低磷胁迫处理和对照材料根部取样. 样品置于-70℃冰箱中保存. 水稻中早 18 根在液氮中研磨后, 利用 Trizol 试剂(GIBCOL/BRL)抽提总 RNA(<http://www.invitrogen.com>). 利用 Oligo dT₍₂₅₎ magnetic Dynal beads 从总 RNA 中分离 mRNA(<http://www.dynalbiotech.com>) (Oslo, Norway). 处理和对照材料的总 RNA 抽提、mRNA 分离同步进行.

1.3 microarray 荧光探针的标记、杂交、洗脱和扫描

中早 18 处理和对照材料 mRNA 各取 2.0 μg 作为模板, 在 400 U Superscript 反转录酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)催化下加入 6.0 μg Oligo dT(18)(Takara, Japan), 40 μL 反应体系中包含 10 mmol/L DTT, 40 U RNase 抑制剂(Promega, Madison, Wisconsin, USA), dATP, dCTP 和 dGTP 各 500 μmol/L, dTTP 和 aa-dUTP 各 200 μmol/L(Sigma, St. Louis, Missouri, USA)以及 1×第一链合成缓冲液. 在 42℃反应 3 h 合成 cDNA 第一链, 随后 94℃变性 3 min 终止反应, 加入 RNase H(Promega, Madison, WI), 37℃反应 15 min 去除 mRNA, 酚/氯仿抽提反应混合物, YM-30 柱(Millipore, USA)纯化产物. 荧光染料 Cy3-dye 和 Cy5-dye(Amersham Pharmacia, USA)与 cDNA 在室温下黑暗交联 1.5 h, 交联产物经过 YM-30 柱纯化, 用去离子水将终体积调整到 23.0 μL, 依次加入 46.0 μL 杂交液, 1.0 μL 封阻液, 2.0 μL poly dA(5 μg/μL)和 3.0 μL 20×SSPE 缓冲液. 将探针混合物在 90℃变性 3 min, 冷却至 4℃避光保存待用.

预杂交、杂交和洗脱过程见 protocol(<http://redb.ncpgr.cn/protocols/>), 预杂交时将预杂交液体积改为 75 μL.

采用 GMS 418 扫描仪(Genetic MicroSystems, Woburn, MA)在两种波长下扫描 Cy5-dye 和 Cy3-dye, 适当调整扫描参数, 使同一芯片内 Cy5-dye 和 Cy3-dye 扣除本底后的杂交信号总和相近, 保存图像.

每次生物学重复都有荧光染料正、反向标记技术重复. 在正向标记中, 低磷胁迫探针用 Cy3-dye、对照探针用 Cy5-dye 标记, 对照和处理探针等量混合后与预杂交处理过的芯片杂交. 在反向标记中, 低磷胁迫探针用 Cy5-dye 标记, 而对照探针用 Cy3-dye 标记.

1.4 microarray 数据分析

用 Imagen 4.2 软件(BioDiscovery, Genetic MicroSystems, Woburn, MA)解析扫描图像的杂交信号强度^[27]. 芯片上序列作如下筛选: 首先去掉软件自动标记为坏点的序列, 再选出至少在一个扫描通道下杂交信号值大于 2 倍背景值的序列. 通过调整 Cy3 和 Cy5 信号总值一致来平衡芯片数据.

差异表达上升和下降的阈值分别设定为 1.5 和 0.67^[27]. 本实验设 3 次生物学重复, 每次生物学重复实验又设有正、反向探针标记 2 次技术重复, 即每个时间点的样品进行 6 次芯片杂交分析. 平衡化后的 Cy5/Cy3 信号比值至少在 5 次杂交实验中大于 1.5 或者小于 0.67, 判定该基因为上升表达或下降表达. 以 6 次实验中 Cy5/Cy3 信号比值的平均值表示该基因上升或下降表达的倍数.

1.5 Northern 杂交

总 RNA 进行 Northern 杂交分析, 验证芯片杂交结果的可靠性. 取 15.0 μg 总 RNA 与含 0.05%溴酚蓝和 0.01%的甲酰胺等体积混合变性, 在 1.5%的甲醛琼脂糖凝胶、1× MOPS 缓冲液中电泳, 将总 RNA 转移到 Hybond-N⁺膜(Amersham Pharmacia, USA), 紫外交联. Hybond-N⁺膜与 ³²P-dCTP 标记的探针在 Church 缓冲液(7% SDS, 1% bovine serum albumin, 1.0 mmol/L EDTA, 0.25 mol/L Na₂HPO₄, pH 7.2)中 65℃杂交过夜. 依次用 2×SSC+0.1%SDS 和 0.1×SSC+0.1%SDS 洗膜液在 65℃洗膜.

2 结果

2.1 芯片数据的有效性

本实验共种植 3 批中早 18 水稻材料, 即 3 次生物学重复. 每个生物学重复实验中, 设计了正、反向标记 2 次技术重复, 芯片杂交技术重复间杂交信号值相关系数为 0.891 和 0.989 之间, 平均相关系数为 0.961(表 1).

从芯片杂交结果中挑出 6 个差异表达基因进行 Northern 杂交, 验证芯片杂交结果可靠性. 结果表明, 芯片杂交和 Northern 杂交能够相互验证(图 1).

2.2 差异表达基因总体特征

和正常营养条件比较, 水稻根部低磷胁迫 3 个时

间点共鉴定出差异表达基因 795 个. 136 个基因在低磷胁迫 6 h 诱导表达, 38 个基因在低磷胁迫 24 h 诱导表达, 419 个基因在低磷胁迫 72 h 诱导表达. 3 个时间点抑制表达的基因数分别为 126, 28, 93. 4 个基因 *Os000979_01*, *Os024536_01*, *Os052077_01* 和 *Os054906_01* 在 3 个时间点都表现为诱导表达, 其中只有基因 *Os024536_01* 能找到功能注释, 其可能参与叶酸的合成, 其他 3 个基因没有找到任何功能注释(图 2). 实验中没有发现在 3 个时间点均表现抑制表达的基因.

2.3 差异表达基因功能分类

将低磷胁迫差异表达的 795 条序列在 NCBI 非冗余数据库和 Gene Ontology 数据库中进行 BLASTn (scor100)和 BLASTx($E\text{-value} \leq 10^{-5}$)分析, 参照

表 1 芯片杂交技术重复间杂交信号值相关系数 (A)

	6 h			24 h			72 h		
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
低磷胁迫	0.979	0.969	0.988	0.975	0.972	0.97	0.968	0.968	0.984
对照	0.969	0.98	0.95	0.979	0.968	0.985	0.892	0.961	0.989

BGI-rice chip 30 k-A 技术重复杂交信号值相关系数

(B)

	6 h			24 h			72 h		
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
低磷胁迫	0.981	0.872	0.982	0.965	0.969	0.96	0.983	0.904	0.952
对照	0.974	0.935	0.977	0.961	0.961	0.967	0.966	0.894	0.976

BGI-rice chip 30 k-B 技术重复杂交信号值相关系数

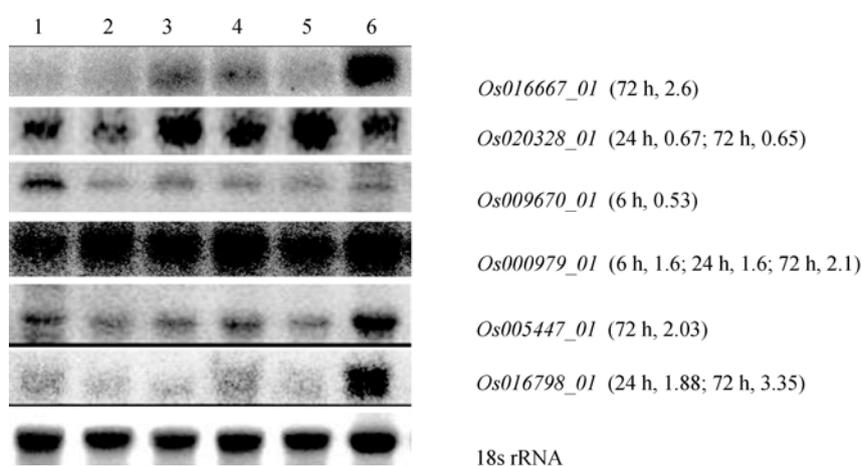


图 1 Northern 杂交图片与芯片杂交结果比较

泳道 1, 3, 5 分别示正常营养条件 6, 24, 72 h 中早 18 根部; 泳道 2, 4, 6 分别示低磷胁迫 6, 24, 72 h 中早 18 根部. 右边显示基因序列号及出现差异表达时间和差异表达倍数

KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对差异表达序列的生理和生化功能进行分类. 795 个基因中, 有 355 个没有找到任何功能注释, 15 个基因预测为未知功能蛋白和假想蛋白, 将这 370 个基因都归为未知功能一类, 其余依次分为能量相关基因、物质代谢相关基因、细胞生长分裂相关基因、转录相关基因、蛋白质合成相关基因、蛋白质降解和贮存相关基因、运输相关基因等(表 2).

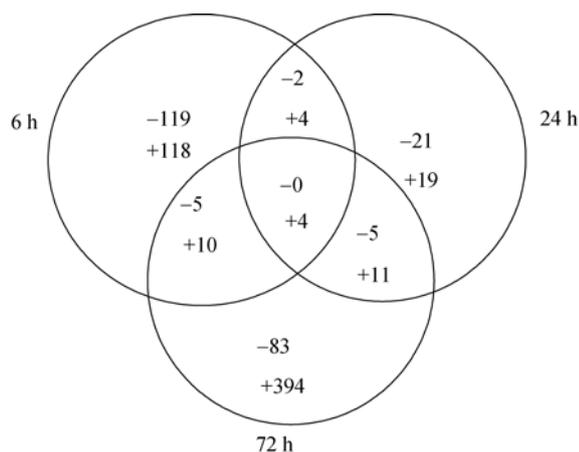


图 2 中早 18 低磷胁迫 3 个时间点根部差异表达基因数
+示上升表达基因; -示下降表达基因

2.4 磷酸盐转运蛋白、酸性磷酸酶、RNA 酶等基因上升表达

植物在长期进化过程中发展了一套复杂系统, 通过调节体内一系列生理和生化反应, 来适应周围环境中的低磷胁迫^[4]. 本实验的芯片数据结果与一些已知低磷反应基因表达情况一致(表 3).

表 2 低磷胁迫差异表达基因功能分类

	数量/个	百分比(%)
代谢相关基因	100	23.9
能量相关基因	53	12.6
细胞生长和分裂相关基因	9	2.1
转录相关基因	12	2.9
蛋白质合成相关基因	19	4.5
蛋白质降解和贮存相关基因	18	4.3
运输相关基因	26	6.2
细胞结构相关基因	20	4.8
信号传导相关基因	19	4.5
抗病及抗逆相关基因	26	6.2
次级代谢相关基因	5	1.2
ATP, DNA, RNA 结合相关基因	51	12.2
其他	61	14.6

表 3 文献已报道的低磷诱导相关基因

	6 h	24 h	72 h	功能注释
<i>Os002628_02</i>	/	/	1.85	拟南芥紫色酸性磷酸酶
<i>Os011801_01</i>	/	/	1.73	二磷酸核苷酸磷酸酶 1
<i>Os017148_01</i>	/	/	2.32	甘薯紫色酸性磷酸酶
<i>Os016540_01</i>	/	/	1.60	紫色酸性磷酸酶
<i>Os012650_01</i>	/	/	1.68	分泌型酸性磷酸酶前体
<i>Os006930_01</i>	/	/	1.64	拟南芥磷酸酶 2C
<i>Os026434_01</i>	/	/	1.70	小家鼠镁依赖磷酸酶 1
<i>Os046463_01</i>	/	/	1.62	无机二磷酸酶
<i>Os008629_01</i>	/	/	1.80	核糖核酸酶
<i>Os009320_01</i>	/	/	1.50	糊核糖核酸酶
<i>Os020207_01</i>	1.99	/	/	液泡质子-焦磷酸酶
<i>Os020948_01</i>	/	1.59	1.90	甘油三磷酸透性酶
<i>Os054748_01</i>	/	/	1.65	磷酸盐转运蛋白
<i>Os022542_01</i>	/	/	1.66	水稻磷酸盐转运蛋白(Pht1-2)
<i>Os032362_01</i>	/	/	1.91	大豆腺苷三磷酸双磷酸酶 GS52

/示该基因在此时间点无差异表达

植物体内各种磷酸酶能将体内和体外有机含磷化合物中的磷释放出来^[33,34]。酸性磷酸酶受低磷诱导^[11,12], 同时还可作为一个植物体内磷酸盐含量是否缺乏的标记^[35], 主要定位于植物细胞液泡和质外体表面^[36]。3 个紫色酸性磷酸酶基因 *Os002628_02*, *Os016540_01*, *Os017148_01* 和 1 个分泌型酸性磷酸酶前体基因 *Os012650_01* 在低磷胁迫 72 h 都上升表达。其他几个磷酸酶类基因也在低磷胁迫 72 h 上升表达。

在高等植物中, 核糖核酸酶能够降解核糖核酸释放出磷, 使其重新参与磷素循环^[13,14,37]。2 个核糖核酸酶基因 *Os008629_01* 和 *Os009320_01* 在低磷胁迫 72 h 上升表达。高亲和力磷酸盐转运蛋白基因在低磷条件下诱导表达, 且多数偏爱在根部表达^[8,9]。2 个磷酸盐转运蛋白基因 *Os022542_01* 和 *Os054748_01* 在低磷胁迫 72 h 上升表达。

质子从胞质到液泡的主动运输可通过液泡膜上的 ATP 依赖的质子泵或 Ppi 依赖的质子泵进行。在胞质 ATP 不足的情况下, 液泡膜两边 pH 梯度的维持可由 ATP 为动力的 H⁺泵转换为 Ppi 为动力的 H⁺泵^[16]。1 个编码液泡 H⁺-焦磷酸酶基因在低磷胁迫 6 h 上升表达。

2.5 糖酵解等与能量相关基因先上升后下降表达

3-磷酸甘油醛脱氢酶和磷酸甘油酸激酶是糖酵解过程中两个重要的酶, 前者将 3-磷酸甘油醛转变成 1,3-二磷酸甘油酸(1,3-DPGA), 后者将 1,3-DPGA 生成 3-磷酸甘油酸(3-PGA)。2 个 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *Os054468_01*, *Os055294_01* 和 1 个磷酸甘油酸激酶基因 *Os052194_01* 在低磷胁迫 6 h 上升表达, 低磷胁迫 72 h 下降表达。丙酮酸激酶在糖酵解过程中以 ADP 作为底物催化 PEP 生成丙酮酸。1 个丙酮酸激酶基因 *Os054538_01* 在低磷胁迫 24, 72 h 下降表达(表 4)。

2.6 氮吸收和脂代谢相关基因表达的改变

一个氨转运蛋白基因 *Os056518_01* 和一个高亲和力硝酸盐转运蛋白基因 *Os016899_01* 在低磷胁迫 6 h 上升表达。磷是硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的重要组成部分。4 个硝酸还原酶基因 *Os020230_01*, *Os020368_01*, *Os023108_01* 和 *Os027084_01* 均在低磷胁迫 24 或 72 h 下降表达。另一个氨同化重要酶谷氨酸合成酶基因 *Os054728_01* 在低磷胁迫 72 h 下降表达(表 5)。说明低磷胁迫早期, 硝酸根和铵根离子的吸收都加强, 但是在磷胁迫中后期, 对氮的吸收、

表 4 糖酵解相关差异表达基因

	6 h	24 h	72 h	功能注释
<i>Os052194_01</i>	2.21	/	0.52	磷酸甘油酸激酶
<i>Os054468_01</i>	3.93	/	0.39	三磷酸甘油醛脱氢酶亚基 A
<i>Os055294_01</i>	2.37	/	0.58	三磷酸甘油醛脱氢酶
<i>Os054538_01</i>	/	0.62	0.58	丙酮酸激酶

/示该基因在此时间点无差异表达

表 5 氮代谢相关差异表达基因

	6 h	24 h	72 h	功能注释
<i>Os052532_01</i>	/	/	0.64	硝酸盐转运蛋白
<i>Os056518_01</i>	1.54	/	/	铵盐转运蛋白
<i>Os016899_01</i>	1.68	/	/	高亲和性硝酸盐转运蛋白
<i>Os020230_01</i>	/	0.62	/	NAD(P)H-硝酸还原酶
<i>Os020368_01</i>	/	0.67	0.65	水稻硝酸还原酶脱辅基酶蛋白
<i>Os023108_01</i>	/	/	0.59	水稻硝酸还原酶脱辅基酶蛋白
<i>Os027084_01</i>	/	0.55	/	硝酸还原酶(玉米)
<i>Os054728_01</i>	/	/	0.61	谷氨酸合酶

/示该基因在此时间点无差异表达

同化减弱。

磷是脂类物质中重要的成分。在低磷胁迫条件下, 磷脂会降解, 糖脂和硫脂合成增加, 以代替磷脂行使生物学功能^[31,38,39]。基因 *Os014403_01* 参与鞘磷脂生物合成, 在低磷胁迫 72 h 下降表达。2 个参与磷脂降解的基因 *Os016667_01* 和 *Os018760_01* 在低磷胁迫 72 h 上升表达。一个硫酸盐转运蛋白基因 *Os020792_01* 在低磷胁迫 6 h 就上升表达, 可能为以后硫脂的形成提供足够的硫素。基因 *Os009261_01* 参与糖脂代谢, 在低磷胁迫 72 h 上升表达。两个参与甘油脂代谢基因 *Os024280_01* 和 *Os012836_01*, 在 72 h 也上升表达。甘油脂代谢中间产物可以为磷脂向糖脂的转变提供碳骨架(表 6)。

2.7 跨膜转运蛋白基因表达上调

ABC 转运蛋白最早被发现于细菌, 因其成员都

含有两个高度保守的 ATP 结合区(ATP binding cassette)而得名。它利用水解 ATP 的能量对溶质中各种生物分子进行跨膜转运, 其转运的底物包括糖、氨基酸、金属离子、多肽、药物等。易化扩散载体超家族(major facilitator superfamily, MFS)是最大的两个跨膜转运蛋白家族之一, 含有 12 或 14 个跨膜结构域。在真菌对药物的抗药性研究中, 易化扩散载体超家族(MFS)和 ABC 转运蛋白被认为是两种主要外排泵。由于外排的作用增强, 使唑类药物在细胞内达不到有效作用浓度, 使得真菌抗药性增加^[40]。在本实验中, 水稻根部低磷胁迫后 3 个易化扩散载体超家族(MFS)基因和 5 个 ABC 转运蛋白基因上升表达(表 7)。

低磷胁迫, 1 个毒素转运蛋白基因、2 个单糖转运蛋白基因、1 个脂转运蛋白基因和 2 个阳离子转运蛋白基因上升表达。

表 6 脂代谢相关差异表达基因

	6 h	24 h	72 h	功能注释
<i>Os024280_01</i>	/	/	1.75	甘油脂代谢
<i>Os012836_01</i>	/	/	1.66	甘油脂代谢
<i>Os016667_01</i>	/	/	2.64	磷脂降解
<i>Os018760_01</i>	/	/	1.65	磷脂降解
<i>Os009261_01</i>	/	/	1.93	鞘糖脂代谢

/示该基因在此时间点无差异表达

表 7 跨膜转运蛋白基因

	6 h	24 h	72 h	功能注释
<i>Os005320_01</i>	/	/	1.65	ABC 转运蛋白
<i>Os005939_01</i>	/	/	1.57	ABC 转运蛋白
<i>Os006841_02</i>	/	/	1.57	ABC 转运蛋白
<i>Os008531_01</i>	/	/	1.52	ABC 转运蛋白
<i>Os018089_01</i>	/	/	2.19	ABC 转运蛋白
<i>Os015582_01</i>	1.55	/	/	植物铁载体
<i>Os010480_01</i>	/	1.58	2.51	易化扩散载体超家族
<i>Os006383_01</i>	/	1.64	2.71	易化扩散载体超家族
<i>Os020948_01</i>	/	1.59	1.90	易化扩散载体超家族
<i>Os024302_01</i>	/	/	1.57	毒素转运蛋白
<i>Os014078_01</i>	/	/	1.53	单糖转运蛋白
<i>Os023181_02</i>	1.93	/	/	非特异性脂转运蛋白
<i>Os053987_01</i>	/	/	1.65	单糖转运蛋白
<i>Os053767_01</i>	/	/	1.66	阳离子转运蛋白
<i>Os057042_02</i>	/	/	1.52	阳离子转运蛋白

/示该基因在此时间点无差异表达

2.8 蛋白质降解、细胞衰老相关基因上升表达

泛素/26S 蛋白酶体途径在植物蛋白降解系统中起重要的作用。由 76 个氨基酸组成的泛素分子通过 E1(泛素激活酶)、E2(泛素结合酶)、E3(泛素蛋白连接酶)与靶蛋白结合,结合了泛素的蛋白随后被 26S 蛋白酶体降解,释放的泛素再循环利用^[41]。本实验鉴定了一个 26S 蛋白酶体调节相关基因 *Os007462_01* 和一个泛素特异蛋白酶基因 *Os008723_01* 在低磷胁迫 72 h 的上升表达。另外,在低磷胁迫水稻根部表达谱中还鉴定了一些与细胞凋亡相关基因和蛋白质降解相关基因,这些基因在低磷胁迫后均呈现上升表达(表 8)。

3 讨论

植物在低磷胁迫下侧根长度和密度增加^[2],根冠比增加,己糖从叶到根的转运也增加^[42]。糖酵解中几个重要的酶如磷酸化 3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸激酶等在低磷胁迫 6 h 就上升表达,此时加速的糖酵解途径为对磷吸收起重要作用的侧根和根毛的生长发育提供必需的物质和能量。低磷胁迫中后期,根部磷的减少,糖酵解中 3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸激酶、丙酮酸激酶都下降表达,表明此时糖酵解速度变慢,生物降低其生长速度和体内主要代谢过

程以求度过营养胁迫的逆境环境。

植物体缺磷,一些依赖 ATP 的代谢途径被利用 PPi 作为底物代谢途径所替代^[16]。正常生长条件下,液泡膜两边 pH 梯度由 ATP 为动力的 H⁺泵维持,低磷胁迫时 1 个编码液泡 H⁺-焦磷酸酶基因在低磷胁迫 6 h 就上升表达,PPi 代替 ATP 行使功能,可以节约磷。在低磷胁迫后期,根内磷酸盐进一步的缺乏,各种磷酸酶(*Os002628_02*, *Os012650_01*, *Os026434_01* 等)、RNAase(*Os008629_01*, *Os009320_01*)、磷酸盐转运蛋白(*Os022542_01*, *Os054748_01*)等表达上升的同时,磷脂降解(*Os016667_01*, *Os018760_01*, *Os014403_01*),糖脂合成增加(*Os009261_01*),糖脂代替磷脂行使生物学功能。

植物缺磷时,对磷素再利用显得非常重要。低磷胁迫使植物地上部衰老叶片细胞分解,分解的磷和其他物质被运往幼嫩的叶和根部,以供这些部位细胞生长^[43]。低磷胁迫也会使玉米根部部分皮层细胞解体形成通气组织^[44]。在通气组织形成过程中,皮层薄壁细胞逐渐解体,胞内所含的磷素和其他营养元素被运往其他部位,如根尖和其他生长旺盛部位以保证植物生长发育。几个参与细胞衰老或凋亡的基因在低磷胁迫 72 h 上升表达,同时还伴随着一系列蛋白降解基因的上升表达。这说明在低磷胁迫条件

表 8 细胞衰老凋亡相关的差异表达基因

	6 h	24 h	72 h	功能注释
<i>Os007462_01</i>	/	/	1.56	26S 蛋白酶复合体调节子亚基 8
<i>Os008723_01</i>	/	/	1.54	泛素特异性蛋白酶 12(UBP12)
<i>Os025724_01</i>	/	/	1.64	map03050: 蛋白酶体
<i>Os008873_01</i>	/	/	1.97	GO:0006508: 蛋白质和多肽水解
<i>Os021960_01</i>	/	/	1.57	GO:0008237: 金属肽酶
<i>Os020707_01</i>	/	/	1.92	GO:0008237: 金属肽酶
<i>Os011192_01</i>	1.50	/	/	GO:0008235: 金属外肽酶
<i>Os008297_01</i>	/	/	1.50	GO:0004239: 甲氨肽酶
<i>Os029925_01</i>	/	/	1.81	Xaa-脯氨酸氨基肽酶 2(<i>app2</i> 基因)
<i>Os013074_01</i>	/	/	1.51	map04210: 细胞凋亡
<i>Os009866_01</i>	/	/	1.70	衰老相关蛋白
<i>Os009047_01</i>	/	/	1.58	GO:0006308: DNA 降解
<i>Os008629_01</i>	/	/	1.80	核糖核酸酶
<i>Os009320_01</i>	/	/	1.50	糊核糖核酸酶

/示该基因在此时间点无差异表达

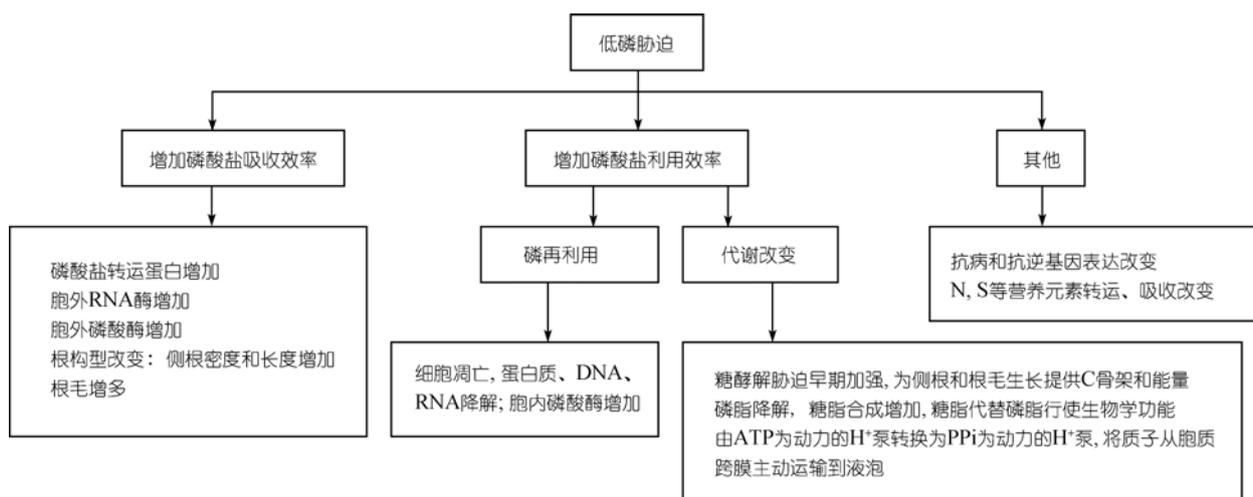


图3 水稻适应低磷胁迫示意图

下,其可能会诱使水稻根部某些细胞解体而形成通气组织,而解体细胞中的磷被运往其他生长急需部位。

在低磷胁迫水稻根部,过氧化物酶、谷胱甘肽 S-转运蛋白、金属硫蛋白等作为氧化胁迫特征产物都上升表达,表明水稻在低磷胁迫的同时伴随着氧化胁迫。氧化胁迫产生一系列对细胞有害物质必须及时运出体外。ABC 转运蛋白和易化扩散载体超家族(MFS)被认为是真菌抗药性起重要作用的两种外排泵。ABC 转运蛋白、易化扩散载体超家族(MFS)两种外排泵和毒素转运蛋白在低胁迫条件下的水稻根部上升表达,它们可能参与了逆境胁迫条件下体内产生的一些有害物质的体外转运过程。

水稻根部低磷胁迫条件下,一些单糖转运蛋白基因、脂转运蛋白基因、阳离子转运蛋白基因等上调

表达。这些基因的上升表达,可以将一些衰老或凋亡细胞内营养物更快地运输到其他部位以维持生物必需的生长需求。同时某些物质运输加快有可能自身就作为一种低磷信号,使水稻在整体水平上适应低磷环境。另外,低磷胁迫还引起一些抗病、抗逆相关基因表达的改变。

综上所述,低磷胁迫条件下水稻根部在基因表达水平上发生了一系列变化,以增加磷酸盐的吸收和利用(图 3),同时启动了一些抗逆机制,以使其适应低磷环境。这些低磷胁迫差异表达基因的鉴定,为进一步研究植物适应低磷分子机制,提供了有用的信息。同时,这些差异表达基因,可作为作物分子遗传改良候选基因,成为我国水稻磷营养高效的利用研究中的有用的资源。

致谢 感谢华中农业大学张启发教授提出的宝贵意见,贺立源教授提供中早 18 水稻种子。

参考文献

- 1 Raghorthama K G. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 665—693[DOI]
- 2 Lisa C W, Sebastien P C P R, Alastair H F, et al. Phosphate availability regulates root system architecture in arabidopsis. *Plant Physiol*, 2001, 126: 875—882[DOI]
- 3 Fõ hse D, Classen N, Jungk A. Phosphorus efficiency of plants . Significance of root radius, root hairs and cation-anion banlance for phosphorus influx in seven plant species. *Plant Soil*, 1991, 132: 261—272
- 4 Bates T R, Lynch J P. Stimulation of foot hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ*, 1996, 19: 529—539[DOI]

- 5 Keerthisinghe G, Hocking P J, Ryan P R, et al. Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin(*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ*, 1998, 21: 467—478[DOI]
- 6 Grierson P F. Organic acids in the rhizosphere of *banksia interfolia* L.F. *Plant Soil*, 1992, 44: 259—265[DOI]
- 7 Lipton D S, Blancher R W, Blevins D G. Citrate, malate and succinate concentrations in exudates from P-sufficient and P-starved *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol*, 1987, 85: 315—317[DOI]
- 8 Muchhal U S, Pardo J M, Raghothama K G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10519—10523[DOI]
- 9 Muchhal U S, Raghothama K G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5868—5872[DOI]
- 10 Leggewie G, Willmitzer L, Riesmeier J W. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell*, 1997, 9: 381—392[DOI]
- 11 Haran S, Logendra S, Seskar M, et al. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol*, 2000, 124: 615—626[DOI]
- 12 Baldwin J C, Karthikeyan A S, Raghothama K G. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol*, 2001, 125: 728—737[DOI]
- 13 Dodds P N, Clarke A E, Newbiggin E. Molecular characterization of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 227—238[DOI]
- 14 Bariola P A, Howard C J, Taylor C P, et al. The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J*, 1994, 6: 673—685[DOI]
- 15 Stephen M G D, Moorhead G B G, Lefebvre D D. Phosphate starvation inducible ‘Bypasses’ of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol*, 1989, 90: 1272—1278
- 16 Plaxton W C. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 185—214[DOI]
- 17 Bergman L W, McClinton D C, Madden S L, et al. Molecular analysis of the DNA sequences involved in the transcriptional regulation of the phosphate-repressible acid phosphatase(*PHO5*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 6070—6074[DOI]
- 18 Lenburg M E, O’Shea E K. Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 383—387
- 19 Rubio V, Linhares F, Solano R, et al. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes&Dev*, 2001, 15: 2122—2133[DOI]
- 20 Zakhleniuk O V, Raines C A, Lloyd J C. *pho3*: a phosphorus-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh. *Planta*, 2001, 212: 529—534[DOI]
- 21 Chen D L, Delatorre C A, Bakker A, et al. Conditional identification of phosphate starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2000, 211: 13—22[DOI]
- 22 Ticconi C A, Delatorre C A, Lahner B, et al. *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J*, 2004, 37: 801—814[DOI]
- 23 Maleck K, Levine A, Eulgem T, et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 2000, 26: 403—410[DOI]
- 24 Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, et al. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 2001, 13: 889—905[DOI]
- 25 Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1,300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 2001, 13: 61—72[DOI]
- 26 Wang R, Guegler K, Labrie S T, et al. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell*, 2000, 12: 1491—1509[DOI]
- 27 Lian X, Wang S, Zhang J, et al. Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 617—631[DOI]
- 28 Wasaki J, Yonetani R, Kuroda S, et al. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant Cell Environ*, 2003, 26: 1515—1523[DOI]
- 29 Hammond J P, Bennett M J, Bowen H C, et al. Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol*, 2003, 132: 578—596[DOI]

- 30 Wu P, Ma L, Hou X, et al. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1260—1271 [\[DOI\]](#)
- 31 Misson J, Raghothama K G, Jain A, et al. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11934—11939 [\[DOI\]](#)
- 32 Yoshida S, Forno D A, Cook J H, et al. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. Manila: International Rice Research Institute, 1976. 61—67
- 33 Duff S M G, Sarath G, Plaxton W C. The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. *Physiol Planta*, 1994, 90: 791—800 [\[DOI\]](#)
- 34 Ueki K. Control of phosphatase release from cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol*, 1978, 19: 385—392
- 35 Ascencio J. Acid phosphatase as a diagnostic tool. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1994, 25: 1553—1564 [\[DOI\]](#)
- 36 Goldstein A H, Danon A, Baertlein D A, et al. Phosphate inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: excretion of acid phosphatase by tomato and suspension-cultured cells. *Plant Physiol*, 1988, 87: 711—715 [\[DOI\]](#)
- 37 Green P J. The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45: 421—445 [\[DOI\]](#)
- 38 Nakamura Y, Awai K, Masuda T, et al. A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2005, 280: 7469—7476 [\[DOI\]](#)
- 39 Frentzen M. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 270—276 [\[DOI\]](#)
- 40 Prasad R, Dewerqifosse P, Goffeau A, et al. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet*, 1995, 27: 320—329 [\[DOI\]](#)
- 41 Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 555—590 [\[DOI\]](#)
- 42 Cogliatti D H, Clarkson D T. Physiological changes in, and phosphate uptake by potato plants during development of, and recovery from phosphate deficiency. *Physiol Plant*, 1983, 58: 287—294 [\[DOI\]](#)
- 43 Schachtman D P, Reid R J, Ayling S M. Phosphorus uptake by plant: from soil to cell. *Plant Physiol*, 1998, 116: 447—453 [\[DOI\]](#)
- 44 Drew M C, He C J, Morgan P W. Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. *Plant Physiol*, 1989, 91: 266—271 [\[DOI\]](#)