水稻油体钙蛋白家族的进化及对干旱胁迫的响应性分析

魏征, 马红, 葛晓春*

复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 植物学研究所, 上海 200433

* 联系人, E-mail: xcge@fudan.edu.cn

2011-03-11 收稿, 2011-05-20 接受

农业部转基因专项(2008ZX08009-003, 2009ZX08009-071B)和国家自然科学基金(31070232)资助

摘要 油体钙蛋白不仅参与了油体的形成, 而且可能与植物耐受干旱胁迫有关. 目前对水稻中的油体钙蛋白的功能了解很少. 本文通过对水稻基因组数据库的序列搜索, 确定了水稻油体钙蛋白基因家族的 6 个成员. 通过对这些基因的序列、结构和染色体位置分析, 表明水稻油体钙蛋白基因家族的扩增可能与片段复制和串联重复有关. 通过对这些基因与其他物种中的油体钙蛋白基因的系统进化分析及功能比较分析, 揭示了拟南芥和水稻中功能可能对应的成员. 为了确定与干旱胁迫响应相关的油体钙蛋白基因, 通过荧光定量 PCR 检测了水稻油体钙蛋白家族在根、叶、花中的表达, 以及在这些组织中响应干旱胁迫的表达情况, 发现有 3 个基因成员在不同组织中受干旱胁迫的诱导, 为进一步对它们展开功能分析奠定了基础.

关键词

水稻
油体钙蛋白
干旱胁迫
荧光定量 PCR
基因表达

干旱是严重影响粮食作物产量的非生物胁迫因素, 常造成减产甚至绝收的后果. 植物在干旱胁迫下可通过多种机制来应对干旱胁迫, 包括 ABA 依赖与非 ABA 依赖的信号途径^[1,2]. 在这些信号途径中, 多种基因被激活, 它们被称为胁迫应答基因^[3-7]. 这些基因涉及的生理生化过程包括调控气孔的关闭、保持水分及离子的内外平衡、调节合成及分解代谢等^[1,8,9]. 干旱胁迫应答的基因主要可分为两大类, 即早期起信号作用或调控其他蛋白质活性的调节蛋白以及晚期影响细胞适应性的功能蛋白^[2-5]. 发掘和研究干旱途径中起作用的基因, 对于深入理解植物抗旱机制, 降低干旱影响等均有十分重要的意义.

我们在利用基因芯片研究干旱下的水稻发育时发现多个油体钙蛋白基因(*caleosin*)受到干旱胁迫的诱导. 油体钙蛋白主要存在于油体(oil body 或 lipid body), 它们是细胞内贮存脂质的小体, 广泛存在于植物以及真菌、藻类的某些细胞中, 大小和数目受植物营养情况及环境因素的影响^[10]. 在植物中, 种子中的油体含量较高, 但其他组织如根、叶、花也可能含有油体. 油体内含三酰基甘油(triacylglycerol,

TAG), 外面则包被单分子层的磷脂, 磷脂表面结合着油体蛋白(oleosin)和其他 3 种相对较少的蛋白质, 即油体钙蛋白(*caleosin*)以及 SOP2, SOP3 蛋白, 其功能与油体的形成及代谢密切相关. 油体钙蛋白的分子量在 15~30 kD 之间, 特征是具有一个 N 端结合 Ca^{2+} 的 EF-hand 区域, 一个中心疏水区域以及 C 端保守的蛋白激酶磷酸化位点^[10]. 油体钙蛋白的 N 和 C 端均位于胞浆中, 而中心疏水区域锚着在单层磷脂膜上, 含有一个脯氨酸结(proline knot), 使得它成为一个膜整合的蛋白质, 不能被高盐从膜上洗脱下来^[11]. 也有一些油体钙蛋白类似蛋白在中心区域亲水性较强, 这些蛋白表达于不含油体的组织, 可能通过其 Ca^{2+} 结合域和磷酸化位点行使信号转导功能^[10].

植物中第一个被鉴定的油体钙蛋白是从水稻中分离得到的 OsEFA27^[12], 因其含有 EF-hand, 锚定在膜上且大小为 27 kD 蛋白而得名. 这个基因是从 ABA 处理的水稻幼苗 cDNA 文库通过差示杂交筛选得到的. 除了 ABA 的诱导, OsEFA27 在营养器官中也受 NaCl 以及脱水处理的诱导, 说明它与水稻的非生物胁迫相关. 拟南芥油体钙蛋白家族则有 7 个成员,

英文引用格式: Wei Z, Ma H, Ge X C. Phylogenetic analysis and drought-responsive expression of the rice caleosin gene family (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2011, 56: 1612-1621, doi: 10.1360/972011-422

即 AtCLO-1~7. 其中 AtCLO-3 即 RD20, 与 AtCLO-1 和 AtCLO-2 具有 65% 的氨基酸相似性, 与其他 4 个分别具有 45% 左右的氨基酸相似性^[13]. AtCLO-1, AtCLO-2 和 AtCLO-3/RD20 具有过氧羟基脂肪酸羟化环氧化酶(peroxygenase) 活性, 同时含有血红素结合位点, 可以氧化羟基脂肪酸, 在脂类的代谢过程中起重要作用^[14]. 进一步的表达分析发现, AtCLO-1 和 AtCLO-2 主要表达于种子中以及萌发早期的幼苗中, 可能跟脂质的贮藏及分解利用有关^[11]; 而 AtCLO-3/RD20 则主要在地上组织包括气孔细胞、花等组织中表达, 在种子中表达水平很低^[10], 当它受到盐、冷、干旱、ABA 等的诱导时, N-端可结合钙离子, C-端可被磷酸化, 推测其在抵御干旱胁迫的脂类信号途径中起重要作用.

对于水稻油体钙蛋白家族, 除了关于 OsEFA27 的早期报道^[12], 目前还没有其他信息. 为了了解水稻中油体钙蛋白家族的概貌以及在干旱胁迫下的响应情况, 本文对水稻油体钙蛋白家族进行了初步分析, 发现水稻中存在 6 个成员, 分布于 4 条不同的染色体上, 对它们之间的进化关系以及与其他物种中的油体钙蛋白基因之间的进化关系进行了分析和探讨. 另外, 运用荧光定量 PCR 检测了水稻油体钙蛋白家族成员在正常生长条件下的各器官中的表达以及在渗透或干旱胁迫情况下的表达变化, 根据这些结果初步推测了水稻中应对干旱胁迫有关的油体钙蛋白成员, 结果有助于我们对它们在抗旱信号途径中的作用展开进一步研究.

1 材料与方法

(i) 植物材料与胁迫处理. 本研究所使用的水稻品种(*Oryza sativa* L.) 为日本晴. 将水稻种子用 3% 的 H₂O₂ 消毒处理 0.5 h 后再用清水冲洗多次, 于 28℃ 泡种 3 d 后转移至 37℃ 催芽. 当种子露白时将其中一部分移至底部有小孔的 96 孔板上. 将 96 孔板浮于盛水的容器中, 于水稻温室进行生长. 另一部分则在出芽之后将其移栽到装有土壤的盆中(盆规格 392 mm × 305 mm × 130 mm). 水稻温室温度设置为 28℃, 湿度为 60%, 光照时间为 12 h. 96 孔板中的水稻幼苗于第 10 天开始使用浓度为 20% 的 PEG6000 进行渗透胁迫, 取样时间分别为 0, 3, 8 和 24 h. 取样时分别将幼苗的叶片与根剪下, 迅速置于液氮中保存, 然后储存于 -80℃. 生长于土壤中的水稻在水稻刚转入生殖

生长时(约 40 d), 停止浇水. 每日测量其土壤相对水分含量, 当水分含量降至 30% 左右时, 每日适当补水, 维持该含水率 1 周, 之后收取正常生长以及干旱处理的长度在 3~5 mm 的水稻花, 置于液氮中, 后储存于 -80℃. 该实验进行 3 次生物学重复.

(ii) RNA 抽提与反转录. 使用 Trizol 试剂 (TaKaRa, 大连) 对收取的材料进行 RNA 提取. 使用分光光度计检测其 A₂₆₀/A₂₈₀, 计算浓度. 然后使用 Dnase I (TaKaRa) 去除 RNA 中的 DNA 污染, 并利用 Reverse Transcriptase M-MLV (TaKaRa) 反转录合成单链 cDNA.

(iii) 实时 PCR 分析. 依据荧光定量 PCR 引物设计原则, 使用 ABI Primer Express 3.0 软件按默认参数, 进行各个基因的特异性引物设计, 其序列见表 1. 同时使用水稻 *eEF1-α* (eukaryotic elongation factor1-α) 基因为内参, 其扩增引物序列分别为 5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3' 和 5'-GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA-3'^[15]. 采用 20 μL 反应扩增体系进行荧光定量 PCR: 10 μL 2 × SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa), 正反向引物各 0.4 μmol/L, ROX 0.4 μL 与 cDNA 模板 20~100 ng. 采用 qRT-PCR 专用 96 孔板 (Axygen, 杭州) 和高透光率封口膜 (Axygen), 荧光定量 PCR 仪采用 Real One Plus Real-Time PCR System (ABI, USA). 每个样品重复 3 次, PCR 程序为 95℃, 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环; 相对表达量 (fold change) = 2^{-ΔΔC_T}, 此处 ΔΔC_T = (C_{T-基因} - C_{T-eEF1-α})_{胁迫处理} - (C_{T-基因} - C_{T-eEF1-α})_{对照}. 对不同时间点的同一种水稻组织进行相对定量分析, 以 0 h 的作为对照.

(iv) 水稻油体钙蛋白家族的生物信息学分析. 从 Pfam 数据库下载油体钙蛋白结构域的 HMM

表 1 水稻油体钙蛋白 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	产物 长度 (bp)
<i>OsCLO-1</i>	CGCTCGGATTGAGGATTGTT AATCAATGGCGCCCTCG	59
<i>OsCLO-2</i>	AACGGCGACGGCATCA TCCAAGGGCTGAGAGCGATA	60
<i>OsCLO-3</i> (<i>OsEFA27</i>)	GCTGTTCCGCGCTGCTT TCGATTGCCAGCAGAGAA	59
<i>OsCLO-4</i>	CCCCAAGGACGCACCAT AAAGAACATCTATAAAGGAATGCACG	60
<i>OsCLO-5</i>	TGGCAGCTGCTGGCAAT TTCTATGGGTTCTTAGCTGGGG	58
<i>OsCLO-6</i>	TGATGCGAATGGAAGGTTTG GAAATATTCAAGAAGCATGCTCACA	60

(Hidden Markov Models, 登录号为 PF05042), 利用其一致性序列在 TIGR 数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)中进行比对搜索, 查找具有此结构域的水稻基因并下载其序列. 同时使用拟南芥及其他物种中的同源基因在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)与水稻数据库 TIGR 中进行同源序列的 BLAST 搜索. 获取每个基因的 DNA 序列, 包括基因的 cDNA 序列, 再用在线工具 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)构建基因结构图^[16]. 采用 MEME 程序(http://meme.nbcr.net/meme4_6_1/cgi-bin/meme.cgi)鉴定油体钙蛋白中的保守基序. 进一步将获取的基因氨基酸序列使用 Clustal X2 进行序列比对分析^[17], 并利用 BOXSHADE 程序(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)绘制比对图. 在此基础上使用 MEGA 4.0 软件(<http://www.megasoftware.net/>)进行水稻油体钙蛋白与其他植物的油体钙蛋白的进化分析^[18]. 进化树生成采用邻接法(N-J method), 使用如下参数: Method: Jones-Taylor-Thornton; Gaps: Pair-wise Deletion; Test of inferred phylogeny: Bootstrap; Replications: 1000; 其他参数采取默认值. 根据 TIGR 数据库中的油体钙蛋白基因在染色体组中的位置信息, 使用 MapInspect (<http://www.dpw.wau.nl/pv/PUB/MapComp/>)标示出每个油体钙蛋白基因在染色体组上的位置, 从而得到各个水稻油体钙蛋白基因在基因组中的分布状况.

2 结果

2.1 水稻油体钙蛋白家族成员鉴定

利用目前已知的油体钙蛋白序列, 并结合 HMMER 程序对相关水稻基因组蛋白质序列进行同源 BLAST, 对搜索结果利用 MEME 程序进行保守结构域预测, 删除不符合标准以及冗余的序列后, 获取了水稻基因组中的油体钙蛋白相关基因, 根据它们

在染色体上的位置顺序命名(表 2). 本研究共鉴定出水稻油体钙蛋白家族 6 个成员, 依次命名为 OsCLO-1~6. 使用 MEME 程序以及 Clustal X2 软件对这些蛋白进行氨基酸序列比对后发现, 这些蛋白具有共同的保守结构基序(图 1). 这些蛋白 N 端都有一个钙离子结合的 EF-hand 区域, 由多个氨基酸残基组成; 紧接着是一个保守的中心跨膜结构域; C 端也具有多个保守的蛋白激酶磷酸化位点. 结合之前其他物种如拟南芥中的油体钙蛋白的结构特征^[11], 确定水稻中的这 6 个基因均为油体钙蛋白家族成员. 根据 MEME 服务器预测的水稻油体钙蛋白中的保守基序, 每个基因均含有 3 个推定的保守基序(图 2), 所编码的蛋白的氨基酸数目在 217~272 之间.

2.2 水稻油体钙蛋白基因结构与染色体分布

通过查找水稻数据库 TIGR, 获取了这些基因的相关序列, 使用在线工具构建了水稻油体钙蛋白家族各成员的结构示意图(图 3). 从图中可见, 所有这 6 个基因均含有内含子, 说明它们不是起源于逆转录转座事件. 这 6 个基因含有不同的外显子与内含子数目, 其中 *OsCLO-1*, *OsCLO-3* 与 *OsCLO-5* 均含有 6 个外显子; *OsCLO-2* 含有 7 个外显子; 而 *OsCLO-6* 与 *OsCLO-4* 则分别具有 5 个和 4 个外显子. 这些基因长度跨度较大, 从 1.5 到 8 kb 之间, 其中 *OsCLO-5* 第 2 个内含子长度达到了 5 kb, 显示了各个基因之间的差异性. 通过高密度遗传图谱, 并结合各个油体钙蛋白基因家族成员的基因组位置信息, 在染色体上绘出了这 6 个油体钙蛋白基因的相对位置, 从而确定了水稻油体钙蛋白基因家族成员的染色体分布(图 4). 该图显示, 它们在染色体上的分布是不均匀的. 6 个基因分布于 2, 3, 4, 6 这 4 条染色体上, 其中第 6 号染色体上含有 3 个油体钙蛋白基因, 聚集在一起, 极有可能是由于串联复制导致的; 在 2, 3, 4 号染色体上则

表 2 水稻油体钙蛋白家族基本信息

基因名称	RAP-DB 座位	cDNA 登录号	外显子数目	氨基酸数目	所在染色体
<i>OsCLO-1</i>	Os02g0734400	EU965606	6	217	2
<i>OsCLO-2</i>	Os03g0222600	AK243437	7	272	3
<i>OsCLO-3</i>	Os04g0511200	AK243204	6	245	4
<i>OsCLO-4</i>	Os06g0254300	AK066241	4	226	6
<i>OsCLO-5</i>	Os06g0254600	AK071531	6	226	6
<i>OsCLO-6</i>	Os06g0254700	AK073727	5	243	6

图 1 水稻油体钙蛋白的序列比对

黑线标出 3 个保守的结构域，分别是 N 端的钙离子结合的 EF-hand 区域，中间的疏水区域与 C 端的亲水区域

图 2 水稻油体钙蛋白结构基序

基序 1,2,3 分别代表图 1 中 N 端 EF-hand 区域，中间的疏水区域与 C 端的亲水区域

图 3 水稻油体钙蛋白基因编码区内含子/外显子结构

各仅含有一个基因；根据 TIGR 数据库，*OsCLO-6* 与 *OsCLO-1* 位于染色体片段复制区域，这对基因可能是由于染色体复制导致的。

2.3 水稻油体钙蛋白基因家族的分子进化分析

为了进一步分析水稻与其他植物中的油体钙蛋白家族的进化关系，利用 MEGA 4.0 软件邻接法构建

图4 水稻油体钙蛋白基因在染色体上的位置分布
Cen代表中心粒位置,虚线标示出的为片段复制的对应基因

了进化树(图 5). 该图显示卷柏、苔藓与莱茵衣藻的油体钙基因位于树的底端, 表明油体钙蛋白起源于绿色植物的早期. 水稻油体钙蛋白与拟南芥和裸子植物的油体钙蛋白在进化关系上呈现 2 个不同的大的分枝, 表明被子植物与裸子植物的油体钙蛋白基因至

少具有 2 个共同祖先. 其中一支包含 *AtCLO-1*, *AtCLO-2*, *AtCLO-3*, *OsCLO-3*, *PgCLO-1* 与 *SgCLO-1*, 表明这些基因起源于被子和裸子植物的共同祖先. 据报道, 拟南芥中的 *AtCLO-3* 可以通过调控气孔的大小、水分蒸腾速率从而参与拟南芥应答干旱反应^[13], 而水稻 *OsCLO-3*, 即已报道的 *OsEFA-27*, 也受 ABA 和盐胁迫的诱导^[12], 说明 *OsCLO-3* 可能也参与了水稻的抗旱反应途径. 另外一个大的分枝除了水稻和拟南芥外, 也包含了裸子植物, 说明这些蛋白起源于种子植物的祖先. 其中 *AtCLO-4*, *AtCLO-5*, *AtCLO-6*, *AtCLO-7* 与 *OsCLO-1*, *OsCLO-4*, *OsCLO-5*, *OsCLO-6* 在一个分枝上, 它们可能来源于被子植物中的一个祖先, 目前还没有这些蛋白功能的报道, 值得进一步研究. 有意思的是 *OsCLO-2* 单独成一支, 可能具有不同功能, 而它的拟南芥同源蛋白基因则可能丢失了. 另一个分支则包含赤松、云杉, 它们中的油体钙蛋白基因来自于共同的祖先基因.

图5 水稻与其他植物油体钙蛋白的系统进化树

2.4 水稻油体钙蛋白家族的表达及对干旱胁迫的响应性分析

使用 PEG6000 以及干旱处理水稻, 收集根、叶、花等不同组织, 利用荧光定量 PCR 手段来检测各基因表达情况. PEG6000 是一种高分子渗透剂, 常用来模拟干旱胁迫^[19,20]. 在此使用浓度为 20% 的 PEG6000 来对水稻幼苗进行处理, 分别收取处理后 3, 8 和 24 h 的水稻幼苗的根和叶, 以 0 h 作为对照. 对于花, 则主要采用减数分裂期的花, 其长度在 3~5 mm 之间, 因为这个阶段的花器官对干旱最为敏感^[21]. 定量 PCR 结果显示, 在正常情况下以及模拟干旱胁迫条件下, 油体钙蛋白基因家族各个成员表达情况存在着显著性的差异.

首先, 在正常条件下, 水稻油体钙蛋白家族在各组织中的表达有较大差异(图 6(a)~(c)). 在叶片中,

OsCLO-1, *OsCLO-3*, *OsCLO-4* 基因表达水平相对较高, 而 *OsCLO-2*, *OsCLO-5*, *OsCLO-6* 则相对较低; 在根中, *OsCLO-1*, *OsCLO-2*, *OsCLO-5* 表达水平相对较高, 以 *OsCLO-5* 水平为最高; 而在花中, *OsCLO-1* 的表达水平最高, 其他成员表达水平相对较低. 以上结果说明水稻油体钙蛋白家族各成员在不同器官中的作用可能有分工. *OsCLO-1* 几乎在所有组织中都有较强的表达, 它可能与油体的生物合成或者基本的代谢活动有关. 其他油体钙蛋白则具有一定的组织特异性, 其功能可能发生了分化.

对 PEG6000 以及干旱胁迫处理的材料在不同时间点取样进行定量 PCR 检测, 结果显示, 各个基因的表达差异明显(图 7~9). 在叶片中(图 7), 受 PEG6000 诱导的基因主要有 *OsCLO-2*, *OsCLO-3* 和 *OsCLO-6*, *OsCLO-2* 在处理 8 h 时上升明显, 约为原来的 4 倍; 而 *OsCLO-3* 则在处理 0~24 h 内一直呈缓

图 6 正常条件下水稻油体钙蛋白基因在各组织的表达

(a) 叶片; (b) 根; (c) 花

图 7 PEG6000 处理后水稻油体钙蛋白基因在叶片中的表达变化

图 8 PEG6000 处理后水稻油体钙蛋白基因在根部的表达变化

图9 干旱处理后水稻油体钙蛋白基因在花中的表达变化

慢上升趋势,在24 h时上升到原来的2.7倍; *OsCLO-6*的表达先期略有下降,但在24 h时,它的表达上升到原来的4.9倍.其他成员中除了*OsCLO-4*的表达受到明显抑制外,变化较小;在根部(图8),受到明显诱导的基因为*OsCLO-3*,在24 h诱导倍数高达8.3倍,而其他基因*OsCLO-2*和*OsCLO-6*最高受到约2.7倍的诱导,变化幅度不大,*OsCLO-5*的表达则始终被抑制,在3, 8和24 h时,表达分别下降了45, 15和10倍;在花中(图9),干旱处理后,*OsCLO-3*, *OsCLO-6*的表达分别提高到原来的2.5与2.8倍,而*OsCLO-4*的表达则下降了2.5倍左右.

通过对水稻油体钙蛋白家族基因的表达分析看出, *OsCLO-1*在受PEG6000以及干旱胁迫时,在各个水稻组织中的表达基本没有发生改变,它可能属于组成型的油体钙蛋白基因;而*OsCLO-3*和*OsCLO-6*则在各个组织中的表达水平均有所上调,强烈暗示了它们与干旱胁迫的关系.

3 讨论

3.1 水稻油体钙蛋白家族的鉴定分析

油体钙蛋白近年来陆续在拟南芥^[11]、芝麻^[22]、小麦^[23]等中被发现,它们均为一个多基因家族,具有比较典型的保守结构域.之前油体钙蛋白被认为仅作为油体的构成成分,参与油体的脂质储存过程,这也是其命名的原因^[10].但随着研究的深入,发现油体钙蛋白也可能涉及了植物非生物胁迫等过程, Aubert等人^[24]研究发现,拟南芥RD20涉及ABA,干旱、盐等非生物胁迫过程,在其他物种中的油体钙蛋白也有类似的报道^[25].为了进一步深化对油体钙蛋

白的认识,本研究依据有关蛋白保守结构域以及已知同源基因等信息,分析了水稻中的油体钙蛋白顺序,鉴定出了6个油体钙蛋白基因.结合之前文献以及对这6个基因的相关序列的对比分析,发现这些基因均包括了油体钙蛋白的3个特征性的保守结构域^[10].随后再对已鉴定的这些基因进行BLAST搜索,没有在水稻中发现别的同源基因,所以基本确定了水稻油体钙蛋白家族的成员组成.

目前发现基因复制主要有3种机制,即片段复制、串联复制以及逆转座事件^[26].水稻中6个油体钙蛋白基因分布于4条不同的染色体上,其中6号染色体上有3个油体钙蛋白基因,可能由于基因的串联复制(tandem duplicaiton)导致.串联重复常常表现为多个基因位于染色体相邻的位置上. *OsCLO-4*, *OsCLO-5*, *OsCLO-6*这3个基因位于第6号染色体的相邻位置, *OsCLO-4*和*OsCLO-5*的同源性达到92%, *OsCLO-4/5*和*OsCLO-6*的同源性则分别为50%和49%,推测*OsCLO-4*和*OsCLO-5*可能起源较近的一次重复事件,而*OsCLO-6*与*OsCLO-4/5*重复发生的年代较早(图5). Wang等人^[27]通过WU-BLASTP以及其他方法对水稻基因组分析,检测到大量染色体间的片段复制,这些复制片段几乎覆盖了水稻全基因组,包括了水稻第2号染色体与第4和6号染色体、第3号染色体与第7, 10和12号染色体、第1与5号染色体、第8与9号染色体以及第11与12号染色体间的复制片段.所有的复制片段约占整个基因组的65%左右^[26].根据这些染色体复制信息,发现本研究中的位于第2号染色体上的*OsCLO-1*与位于第6号染色体的*OsCLO-4/5/6*分别定位于2个复制的基因组片段中,其中*OsCLO-1*与*OsCLO-6*氨基酸相似性为55%.据此推测,在水稻中可能由于片段复制产生了*OsCLO-1*与*OsCLO-6*,然后*OsCLO-6*经串联重复后产生*OsCLO-4*和*OsCLO-5*.综上所述,水稻油体钙蛋白家族的扩增可能经历了片段复制、串联重复等进化过程,并且随着这些过程而产生结构和功能上的差异性.

目前从藻类、苔藓、卷柏、云杉、拟南芥等低等和高等植物中均发现了油体钙蛋白的存在(表3),但主要是通过EST (expressed sequence tag)数据库发现其编码顺序,相应的功能研究则非常缺乏;从进化树(图5)可以看出,水稻及其他物种中的油体钙蛋白基因至少具有2个共同祖先:衣藻中的3个基因形成一

表3 油体钙蛋白进化树相关基因信息

物种	基因名称	登录号	来源
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsCLO-1</i>	Os02g0734400	http://rapdb.dna.affrc.go.jp/
	<i>OsCLO-2</i>	Os03g0222600	
	<i>OsCLO-3</i>	Os04g0511200	
	<i>OsCLO-4</i>	Os06g0254300	
	<i>OsCLO-5</i>	Os06g0254600	
	<i>OsCLO-6</i>	Os06g0254700	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtCLO-1</i>	At4g26740	http://www.arabidopsis.org/index.jsp
	<i>AtCLO-2</i>	At5g29560	
	<i>AtCLO-3</i>	At2g33380	
	<i>AtCLO-4</i>	At1g23240	
	<i>AtCLO-5</i>	At1g70680	
	<i>AtCLO-6</i>	At1g23250	
	<i>AtCLO-7</i>	At1g23240	
<i>Selaginella moellendorffii</i>	<i>SmCLO-1</i>	167445	http://genome.jgi-psf.org/Selmo1/Selmo1.home.html
	<i>SmCLO-2</i>	110494	
	<i>SmCLO-3</i>	36610	
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>PpCLO-1</i>	144002	http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html
	<i>PpCLO-2</i>	229609	
	<i>PpCLO-3</i>	125936	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>CrCLO-1</i>	116444	http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html
	<i>CrCLO-2</i>	402194	
	<i>CrCLO-3</i>	403084	
<i>Picea asperata mast</i>	<i>SgCLO-1</i>	TC92091	http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=spruce
	<i>SgCLO-2</i>	TC87871	
	<i>SgCLO-3</i>	TC87450	
	<i>SgCLO-4</i>	TC95063	
	<i>SgCLO-5</i>	TC105354	
	<i>SgCLO-6</i>	TC102320	
	<i>SgCLO-7</i>	TC85508	
<i>Pinus densiflora</i>	<i>PgCLO-1</i>	TC122874	http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=pine
	<i>PgCLO-2</i>	TC123231	
	<i>PgCLO-3</i>	TC120358	
	<i>PgCLO-4</i>	TC126262	
	<i>PgCLO-5</i>	TC124094	
	<i>PgCLO-6</i>	TC118311	
	<i>PgCLO-7</i>	TC120317	
	<i>PgCLO-8</i>	TC117369	

个独立的大分枝,而苔藓以上包括赤松、云杉、拟南芥、水稻等的基因形成另一个大的分枝,表明藻类与植物中的油体钙蛋白基因很早就分开进化。从进化树上还可看出,云杉、赤松等裸子植物的油体钙蛋白倾向于形成一个分枝,和水稻、拟南芥等被子植物的油体钙蛋白分化明显;作为单子叶和双子叶植物的代表,水稻和拟南芥中的油体钙蛋白基因在进化上没有发生明显的分离。两种植物中部分油体钙蛋白

基因在进化上处于比较接近的位置,例如水稻的 *OsCLO-3* 和拟南芥的 *AtCLO-1,2,3*,表明它们可能来源于一个共同的祖先基因。

3.2 水稻油体钙蛋白基因家族基因表达以及干旱胁迫应答

干旱是影响水稻产量的重要的环境胁迫因素,近年来通过利用一些新的实验技术,特别是全基因

组测序与基因芯片的利用,发掘了大批新的干旱响应基因.我们通过基因芯片分析了水稻在干旱胁迫下的转录组变化,发现多个油体钙蛋白可以受到干旱胁迫的诱导(数据未显示).本研究对整个水稻油体钙蛋白基因家族在各个组织中响应干旱或者渗透胁迫的情况进行了调查,结果显示,各个成员对于干旱胁迫反应呈现出明显的差异.*OsCLO-2*, *OsCLO-3* 和 *OsCLO-6* 是该家族中的主要干旱诱导基因,而其他成员变化不大或者受干旱胁迫的抑制,显示了该家族成员之间功能的分化.*OsCLO-3* 即 *OsEFA27*,它在营养组织中受 ABA 和盐的诱导^[12],本研究结果显示它在营养器官和花器官中都受干旱胁迫诱导,暗示具有干旱应答功能.最近有人发现,*OsCLO-3* 在拟南芥中最接近的同源基因之一 *RD20* (*AtCLO-3*)受 ABA 诱导和干旱诱导,其突变体气孔开度升高,蒸腾速率加快,从而表现出对干旱的敏感性^[24],说明在不同物种中该同源基因均可能参与了对干旱的响应,其功能研究印证了进化分析的推测.

油体钙蛋白除了位于油体中,还有人发现它可能位于内质网膜上以及细胞内的某些膜泡中^[11,13].据推测其 N 端可能位于内质网膜腔中,而 C 端则位于细胞质中.在干旱胁迫下,油体钙蛋白 N 端可感受内质网膜腔内的 Ca^{2+} 变化,而 C 端发生磷酸化,从而在干旱胁迫的信号传递过程中起作用,目前该作用模式还有待实验证实;一些油体钙蛋白本身也具有过氧羟基脂肪酸羟化环氧化酶活性,在氧化亚油酸、合成氧脂素(oxylin)等脂类信号途径中起作用^[13],这些脂类与茉莉酸的合成具有相关性,而茉莉酸是生物和非生物胁迫信号传导途径中的重要激素分子.目前对水稻中油体钙蛋白的功能还未开展研究,本研究对于我们了解水稻中该家族的概貌,以及推测哪些基因可能在水稻抗干旱胁迫的过程中起作用提供了重要信息.我们进一步将采取生化和遗传学手段对该家族中的成员在水稻抗旱信号途径中的功能进行分析,为利用这些基因来改善植物的抗旱能力提供帮助.

致谢 感谢张亮生在基因分子进化分析中的帮助.

参考文献

- Muhammad F, Abdul W, Dong J L, et al. Advances in drought resistance of rice. *Crit Rev Plant Sci*, 2009, 28: 199–217
- Zhang J H, Jia W S, Yang J C, et al. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop Res*, 2006, 97: 111–119
- Kant P, Gordon M, Kant S, et al. Functional genomics-based identification of genes that regulate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. *Plant Cell Environ*, 2008, 31: 697–714
- Oono Y, Seki M, Nanjo T, et al. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis thaliana* gene expression during rehydration press after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J*, 2003, 34: 868–887
- Kreps J A, Wu Y J, Chang H S, et al. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. *Plant Physiol*, 2002, 130: 2129–2141
- Zhou J L, Wang X F, Jiao Y L, et al. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 591–608
- 丁勇, 陈庆波, 徐春雷, 等. 油菜油体钙蛋白基因 *BnCLO1* 的克隆和表达. *作物学报*, 2008, 34: 1921–1928
- Garcia-Mata C, Lamattina L. Absciscic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide Biol Ch*, 2007, 17: 143–151
- Beck E H, Fettig S, Knake C, et al. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J Biosci*, 2007, 32: 501–510
- Frandsen G I, Mundy J, Jason T C Z. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol Plant*, 2001, 112: 301–307
- Næsted H, Frandsen G I, Jauh G Y, et al. Caleosins: Ca^{2+} -binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol Biol*, 2000, 44: 463–476
- Frandsen G, Müller-Uri F, Nielsen M, et al. Novel plant Ca^{2+} -binding protein expressed in response to absciscic acid and osmotic stress. *J Biol Chem*, 1996, 271: 343–348
- Partridge M, Murphy D J. Role of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stresses responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47: 796–806
- Hanano A, Burcklen M, Flenet M, et al. Plant seed peroxygenase is an original heme-oxygenase with an EF-hand calcium binding motif. *J Biol Chem*, 2006, 281: 33140–33151

- 15 Jain M, Nijhawan A, Tyagi A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Bioph Res Co*, 2006, 345: 646–651
- 16 Guo A Y, Zhu Q H, Chen X, et al. GSDS: A gene structure display server. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29: 1023–1026
- 17 Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2947–2948
- 18 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599
- 19 德英, 赵来喜, 穆怀彬. PEG6000 渗透胁迫下应用电导法对披碱草属种质幼苗抗旱性初步研究. *中国农学通报*, 2010, 26: 173–178
- 20 闻玉, 赵翔, 张骁. 水分胁迫下一氧化氮对小麦幼苗根系生长和吸收的影响. *作物学报*, 2008, 34: 344–348
- 21 杨弘远. 水稻生殖生物学. 浙江: 浙江大学出版社, 2005. 35–70
- 22 Chen J C F, Tsai C C Y, Tzen J T C, et al. Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40: 1079–1086
- 23 Feng H, Wang X M, Sun Y F, et al. Cloning and characterization of a calcium binding EF-hand protein gene *TaCab1* from wheat and its expression in response to *Puccinia striiformis* sp. *tritici* and abiotic stresses. *Mol Biol Rep*, 2010, doi: 10.1007/s11033-010-0501-8
- 24 Aubert Y, Vile D, Pervert M, et al. RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 1975–1987
- 25 Jiménez J A, Alonso-Ramírez A, Nicolás C. Two cDNA clones (*FsDhn1* and *FsClo1*) up-regulated by ABA are involved in drought responses in *Fagus sylvatica* L. seeds. *J Plant Physiol*, 2008, 17: 1798–1807
- 26 Yu J, Wang J, Lin W, et al. The genome of *Oryza sativa*: A history of duplication. *PloS Biol*, 2005, 3: e38
- 27 Wang X Y, Shi X L, Hao B L, et al. Duplication and DNA segmental loss in the rice genome: Implications for diploidization. *New Phytol*, 2005, 165: 937–946

Phylogenetic analysis and drought-responsive expression of the rice caleosin gene family

WEI Zheng, MA Hong & GE XiaoChun

State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Plant Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Caleosins are proteins that are components of plant oil bodies, and may be involved in the drought tolerance of plants. So far, the rice caleosin gene family remains largely uncharacterized. Using BLAST analyses against the rice genome database and other bioinformatic tools, 6 members of the caleosin family were identified in the rice genome. The evolutionary relationships among caleosin genes from rice, *Arabidopsis* and other species were analyzed. In addition, fluorescent real-time PCR method was employed to analyze the expression patterns of the caleosin gene family in different organs such as root, leaf, and flower, and to examine their expression-level changes in response to drought or osmotic stress. The results suggested that some members of the caleosin gene family are involved in drought tolerance, thus providing important background information for further study on their physiological roles under drought stress.

rice, caleosin, drought stress, real time PCR, gene expression

doi: 10.1360/972011-422