

## 水稻二半乳糖甘油酯合成酶 *DGD* 响应热胁迫的生物信息学和基因表达分析

彭澎, 刘兰兰, 汪启明\*, 饶力群\*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 利用比较基因组学方法获得 5 个水稻二半乳糖甘油酯合成酶(*OsDGD*)同源基因; 运用生物芯片分析, 发现 *OsDGD* 参与对热胁迫和干旱胁迫的应答; 采用实时定量 PCR 技术, 分析 5 个 *OsDGD* 在热胁迫幼穗 6~7 期日本晴、9311 和 N22 水稻剑叶中的表达特征, 发现 *OsDGD1*、*OsDGD2* 和 *OsDGD3* 在耐热品种 N22 中的表达明显受到热胁迫诱导, 由此推测, *OsDGD* 可能参与了水稻的耐热信号传导。

**关键词:** 水稻; 热胁迫; 二半乳糖甘油酯合成酶; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: Q559.344

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)03-0239-06

## Bioinformatic analysis and gene expression of digalactosyl-diacylglycerol synthase(*DGD*) on there sponse of thermal stresson rice

Peng Peng, Liu Lanlan, Wang Qiming\*, Rao Liqun\*

(College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Five homologous genes of digalactosyl-diacylglycerol synthase(*OsDGD*) were obtained through the approach of comparative genomics from rice. From the analysis of biochip expression, the result indicated that *OsDGD* genes were involved in thermal and drought stress. By using real-time quantitative PCR analysis and adopting flag leaves of the young panicle at 6-7 stages of cultivar *Oryza sativa* Nipponbare 9311 and N22 as materials, the expression levels of 5 *OsDGD* genes in response to thermal stress showed that *OsDGD1*, *OsDGD2* and *OsDGD3* were obviously induced by thermal stress in N22 line, which had higher basal thermo-tolerance level. By taken all test results into consideration, we inferred that *OsDGD* genes were involved in thermal stress of signal transduction pathway in rice.

**Keywords:** *Oryza sativa* L.; thermal stress; digalactosyl-diacylglycerol synthase; bioinformatic; gene expression

随着全球气温的上升, 热逆境对植物的影响日趋显著<sup>[1-2]</sup>。水稻在孕穗期和抽穗期对温度极为敏感<sup>[3]</sup>。水稻剑叶的膜透性与温度相关, 它影响细胞膜结构的稳定性, 从而影响水稻生长<sup>[4]</sup>。植物类囊

体膜的通透性与植物耐热存在密切联系, 类囊体二半乳糖甘油酯合成酶(*DGD*)基因对膜通透性起调控作用。在拟南芥和其他一些高等植物中, *DGD* 基因通过调控类囊体单半乳糖甘油酯和双半乳糖甘油酯

收稿日期: 2015-03-24

修回日期: 2015-04-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301081); 科技部国家科技支撑计划项目(2014BAD01B04); 教育部博士点基金项目(20134320120009); 湖南省自然科学基金项目(14JJ3094); 湖南省教育厅创新平台开放基金项目(13K063)

作者简介: 彭澎(1990—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究, 569392983@qq.com; \*通信作者, 饶力群, 博士, 教授, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究, raoliqun@163.com; \*通信作者, 汪启明, 博士, 副教授, 主要从事植物逆境生物化学与分子生物学研究, wqmqmx21@126.com

的比例调控拟南芥耐热能力,从生理水平提高植物的耐热性<sup>[5]</sup>。关于 *DGD* 基因功能研究的研究对象多集中于拟南芥<sup>[6-8]</sup>,而对于其在水稻中表达的研究较少。利用基因芯片分析植物逆境胁迫下的表达情况,可以发掘与胁迫响应相关的基因,探究逆境胁迫下的分子机制,为植物抗逆提供理论基础<sup>[9]</sup>。笔者通过多种水稻生物信息学网站,分析水稻 *DGD* 基因的基因序列及其响应热和干旱胁迫的表达特征;利用实时定量 PCR 技术,分析 *OsDGD* 在不同时间热胁迫日本晴、9311 和 N22 中的表达水平,旨在进一步明确 *OsDGD* 参与水稻耐热信号传导的机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为日本晴(*Oryza sativa* L. spp. *japonica* cv. Nipponbare)、9311(*Oryza sativa* L. spp. *indica* cv. 9311)、N22(*Oryza sativa* L. spp. *Aus* cv. Nagina 22)水稻品种。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 水稻 *DGD* 基因的生物信息学分析

水稻 *DGD* 基因的结构特征和上游调控元件分别由 Rice-map(<http://www.ricemap.org/index.jsp>)和 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行分析;分别进行蛋白同源性及相互作用分析和系统进化树的构建。利用 STRING(<http://www.string-db.org/>)分析蛋白同源性及其相互作用;运用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树;利用 ROAD(<http://ricearray.org/index.shtml>)进行水稻 *DGD* 基因的生物芯片分析,其中干旱胁迫处理水稻分蘖期叶片的相对含水量为 65%~75%,热胁迫处理材料为生长 14 d 的水稻幼苗,于 42 °C 培养 3 h。

#### 1.2.2 水稻 *DGD* 基因表达的实时荧光定量分析

取幼穗分化至 6~7 期的水稻材料,置于光照 16 h、相对湿度 80%、42 °C 的恒温培养室,分别取处理 0、3、6、12 h 的水稻剑叶进行液氮速冻,于 -80 °C 保存,以处理 0 h 的植株为对照。利用 Trizol 法分别提取以上材料的总 RNA,反转录合成 cDNA,均一化浓度后作为反应模板。根据 *OsDGD* 的 cDNA

序列设计特异引物,以水稻 *ACTIN* 作为内参基因(表 1),进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应步骤参照荧光定量 PCR 试剂盒(康为世纪公司)。试验进行 3 次重复。相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[10]</sup>计算。

表1 实时荧光定量PCR引物

Table 1 Primers for RT-qPCR	
引物名称	序列(5'→3')
ACTIN-F	CCTCTCCAGCCTTCCTTCAT
ACTIN-R	TCTCCTTGCTCATCCTGTCAG
DGD1-qF	GATGACAGGAACGGCCATCA
DGD1-qR	AGGCGAACCGAACACAATCT
DGD2-qF	TTCGCTTCCCAATCCTTCACA
DGD2-qR	TCGCCGCTAGGGTTTTTCG
DGD3-qF	TGCTCACCCTGCTCAACTG
DGD3-qR	TACAGGGTGCTGCCTTGAG
DGD4-qF	GGAGCTGTATGGCAGTGGAG
DGD4-qR	ACATCTGTGGTGCTTGGGTT
DGD5-qF	TTTGTGCCCCAGTGAAGGA
DGD5-qR	ATCTCTCGGTGCTGCTTCC

## 2 结果与分析

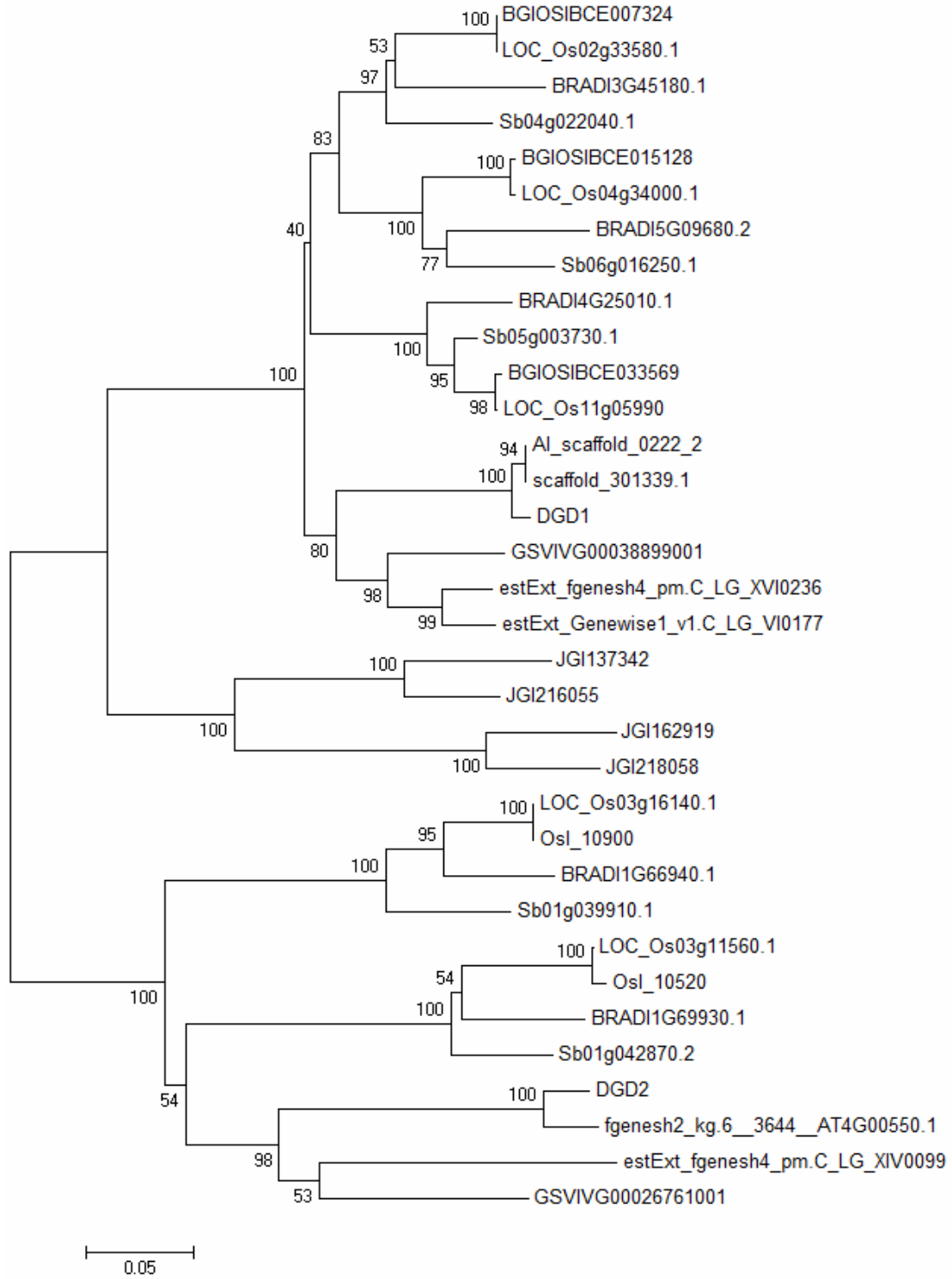
### 2.1 水稻 *DGD* 基因的生物信息学分析结果

#### 2.1.1 水稻 *DGD* 基因的序列分析结果

比对拟南芥 *DGD* 序列,发现水稻 *DGD2* 基因(LOC\_Os11g05990)位于 11 号染色体,长度为 4 773 bp,其蛋白质含 737 个氨基酸残基。进一步在水稻基因组中比对水稻 *DGD2* 基因,发现水稻中还存在另外 4 个与 *OsDGD2*(LOC\_Os11g05990)同源性较高的基因 *OsDGD1*(LOC\_Os03g11560.1)、*OsDGD3*(LOC\_Os02g33580.1)、*OsDGD4*(LOC\_Os03g16140.1)和 *OsDGD5*(LOC\_Os04g34000.1),它们都具有二半乳糖甘油脂合成酶功能。分析 *OsDGD* 启动子顺式作用元件,发现 5 个基因均具有光应答顺式作用元件 G-box,且 *OsDGD3* 和 *OsDGD4* 具有热胁迫应答顺式作用元件 HSE,*OsDGD2*、*OsDGD3*、*OsDGD4* 和 *OsDGD5* 都具有脱落酸应答顺式作用元件 ABRE。

#### 2.1.2 水稻 *DGD* 的同源比对与进化分析

通过 STRING 对 5 个 *OsDGD* 的蛋白序列进行同源比对,并构建系统进化树(图 1)。由图 1 可知,*DGD* 存在于多个物种中,在高粱、短柄草、拟南芥、葡萄和毛果杨的相似度较高,表明 *DGD* 基因在多种物种中保守存在。



图中字母LOC代表粳稻；BGI和OSI代表籼稻；BRA代表短柄草；Sb代表高粱；AI和Scaffold代表拟南芥；GSV代表葡萄；est和fge代表毛果杨；JGI代表藓类。

图1 *OsDGD*同源蛋白的系统进化树

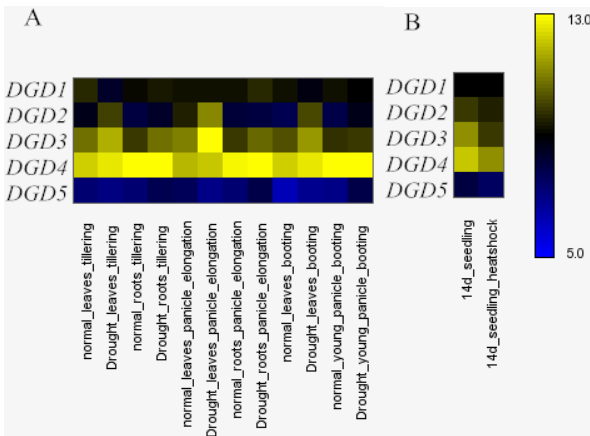
Fig.1 Phylogenetic tree of *OsDGD* genes and their homologous proteins

2.1.3 水稻 *DGD* 基因的生物芯片分析

水稻对干旱的响应能力分析结果表明，在叶、根、穗等部位，*OsDGD2*、*OsDGD3*、*OsDGD4* 和

*OsDGD5* 基因在干旱胁迫处理后的表达水平比正常生长的均高，而 *OsDGD1* 的表达水平比正常生长的低(图 2-A)。通过对水稻热胁迫响应能力进行分析，

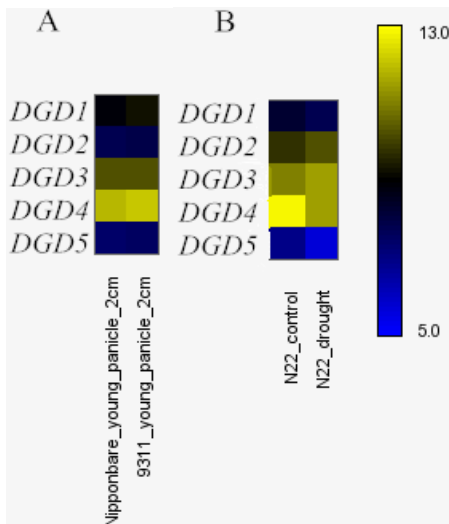
发现 5 个 *OsDGD* 基因的表达水平均比正常生长的低(图 2-B)。通过对 *OsDGD* 在不同水稻品种中的表达进行分析,发现在日本晴和 9311 中,*OsDGD1*、*OsDGD2* 和 *OsDGD5* 基因的表达量均不高,而 *OsDGD3* 和 *OsDGD4* 的表达量较高(图 3-A)。在 N22 中,*OsDGD2*、*OsDGD3* 和 *OsDGD4* 的表达量较高,而 *OsDGD1* 和 *OsDGD5* 的表达量较低(图 3-B)。



A 干旱胁迫; B 热胁迫。

图2 *OsDGD*基因在干旱和热胁迫下的芯片表达分析结果

Fig.2 Chip expression analysis of *OsDGD* genes in drought and thermal stresses



A 日本晴及9311; B N22。

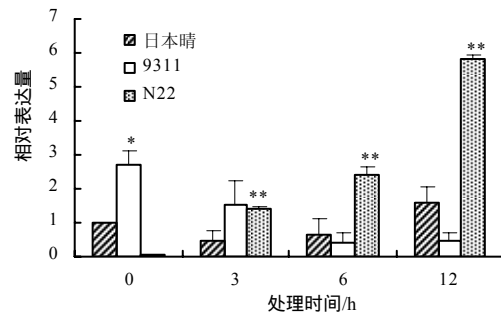
图3 *OsDGD*基因在不同材料中的芯片表达分析结果

Fig.3 Chip expression analysis for *OsDGD* genes at different materials

### 2.2 水稻 *DGD* 基因响应热胁迫的表达分析

利用实时定量 PCR 方法研究 *OsDGD* 在热胁迫时的表达水平,结果表明,不同水稻品种中,*OsDGD* 响应热胁迫的表达呈现较大的差异。在热胁迫时,*OsDGD1* 在日本晴及 9311 中的表达量下降,在 N22

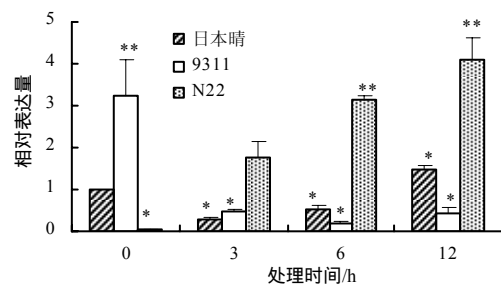
中的表达量升高。*OsDGD1* 在 9311 中的表达量随着热处理时间的增加而逐渐降低;在日本晴及 N22 中,随着热处理时间的增加,其表达量也逐渐增加(图 4)。*OsDGD2* 在日本晴中的表达为先下降后升高,随着热处理时间的增加,其表达量逐渐升高;在 9311 中,*OsDGD2* 的表达量下降,且 3 h 处理后的表达量基本不变;在 N22 中,*OsDGD2* 在高温胁迫下被显著诱导,其表达量明显提高(图 5)。*OsDGD3* 基因在日本晴及 9311 中,其表达是先下降后升高,而在 N22 中表达明显提高,且随着高温胁迫时间的增加,其表达量均逐渐增加(图 6)。*OsDGD4* 与 *OsDGD3* 呈现出类似的表达情况,但其总体表达量均比 *OsDGD3* 的高(图 7)。随着高温胁迫时间的增加,*OsDGD5* 在日本晴中的表达量逐渐增加;随着热处理时间增加,*OsDGD5* 在 9311 及 N22 中的表达量有所下降(图 8)。上述研究结果表明,随高温处理时间的增加,在耐热水稻中,*OsDGD1*、*OsDGD2*、*OsDGD3* 和 *OsDGD4* 的表达量增加,而在不耐热水稻中的表达量减少,表明 *OsDGD1*、*OsDGD2*、*OsDGD3* 和 *OsDGD4* 参与了水稻的热胁迫反应。



\*表示  $P < 0.05$ ; \*\*表示  $P < 0.01$ 。

图 4 *OsDGD1* 在不同热胁迫处理水稻中的相对表达量

Fig.4 Expression analysis for *OsDGD1* at different thermal stresses and different rice varieties



\*表示  $P < 0.05$ ; \*\*表示  $P < 0.01$ 。

图 5 *OsDGD2* 在不同热胁迫处理水稻中的相对表达量

Fig.5 Expression analysis for *OsDGD2* at different thermal stresses and different rice varieties

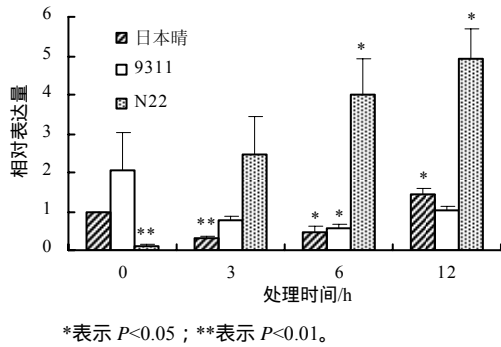


图 6 *OsDGD3* 在不同热胁迫处理水稻中的相对表达量  
Fig.6 Expression analysis for *OsDGD3* at different thermal stresses and different rice varieties

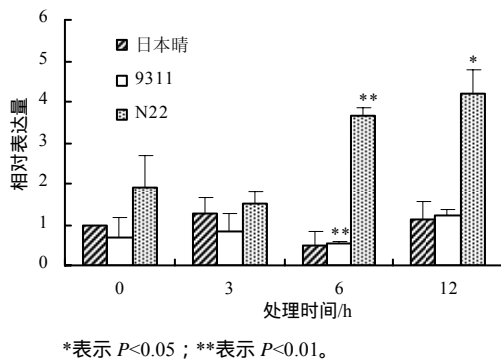


图 7 *OsDGD4* 在不同热胁迫处理水稻中的相对表达量  
Fig.7 Expression analysis for *OsDGD4* at different thermal stresses and different rice varieties

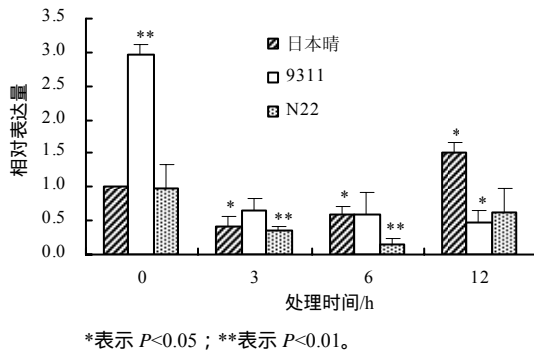


图 8 *OsDGD5* 在不同热胁迫处理水稻中的相对表达量  
Fig.8 Expression analysis for *OsDGD5* at different thermal stresses and different rice varieties

### 3 结论与讨论

拟南芥 *DGD1* 突变体的 DGDG 含量较野生型的低, 导致该突变体的光合系统结构和功能以及对热胁迫的响应等方面均发生了一定变化<sup>[11-12]</sup>。本研究中通过生物信息学网站 STRING, 分析了可能与 *OsDGD* 蛋白相互作用的蛋白, 发现粳稻中参与合成光合膜主要结构成分的单半乳糖甘油酯合成酶与 *OsDGD* 的相互作用最强, 表明 *DGD* 与叶绿体

中类囊体膜的透性相关。对 *OsDGD* 启动子顺式作用元件的分析结果表明, 5 个基因分别具有与光应答和非生物胁迫相关的作用元件。热胁迫应答顺式作用元件 HSE, *OsDGD2*、*OsDGD3*、*OsDGD4* 和 *OsDGD5* 具有脱落酸应答顺式作用元件 ABRE。由此推测, *OsDGD* 可能参与调控光合系统结构和响应耐热等非生物胁迫的信号传导。

水稻耐热品种 N22 受热胁迫时表现出相对较好的花药开裂水平和较高的结实率, 体现了其本质的耐热性<sup>[13]</sup>。Li 等<sup>[14]</sup>和 Deepti 等<sup>[15]</sup>发现水稻 N22 品种响应干旱胁迫与热胁迫的信号途径中存在多个调控元件。本研究中通过干旱胁迫和热胁迫的水稻芯片分析, 发现 *OsDGD* 表达受耐热和干旱胁迫调控, 且在 N22 中多个 *OsDGD* 对干旱胁迫更敏感。通过实时定量 PCR 分析, 发现在分化至 6~7 期的水稻幼穗剑叶中, 5 个 *OsDGD* 同源基因在日本晴、9311 和耐热品种 N22 中的表达有差异, *OsDGD3* 和 *OsDGD4* 的表达量均高, *OsDGD1* 和 *OsDGD5* 的表达量均低, 而 *OsDGD2* 在日本晴及 9311 中的表达量较低, 在 N22 中的表达量高。随高温处理时间的增加, 在日本晴中, 5 个 *OsDGD* 基因的表达量无明显变化; 在 9311 中, 5 个 *OsDGD* 基因的表达量均下降, 而在耐热水稻品种 N22 中, 除 *OsDGD5* 外, 其余 4 个基因的表达量较其他 2 种水稻材料的高, *OsDGD1*、*OsDGD2* 和 *OsDGD3* 在 N22 中的表达明显受到热胁迫的诱导。试验结果与生物芯片分析结果基本相吻合, 进一步表明 *OsDGD* 参与了对水稻耐热性的调控。

综合分析, 认为 *OsDGD* 与水稻耐热具有相关性, 是一个潜在的水稻耐热调控元件。水稻的耐热表型与多种环境因子密切相关, 植物响应光、温信号基因表达调控网络的分子遗传机制至今仍不清楚, 因此, 挖掘新的水稻耐热分子传导途径对全面认识植物耐热分子调控网络具有重要意义。

#### 参考文献:

[1] Peng S, Huang J, Sheehy J E, et al. Rice yields decline with higher night temperature from global warming[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 9971-9975.

- [2] Grover A ,Chandramouli A ,Agarwal S ,et al .Transgenic Rice for Tolerance Against Abiotic Stresses[M] . Rice Improvement in the Genomic Era .New York :Datta S K , 2009 : 237–267 .
- [3] Satake T , Yoshida S . High temperature induced sterility in indica rices at flowering[J] . Jpn J Crop Sci , 1978 , 47 : 6–17 .
- [4] 邓化冰 , 史建成 , 肖应辉 , 等 . 开花期低温胁迫对水稻剑叶保护酶活性和膜透性的影响[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2011 , 37(5) : 581–585 .
- [5] Chen J , Burke J J , Xin Z , et al . Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance[J] . Plant Cell Environ , 2006 , 29(7) : 1437–1448 .
- [6] Dörmann P , Hoffmann-Benning S , Balbo I , et al . Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol [J] . The Plant cell , 1995 , 7(11) : 1801–1810 .
- [7] Kelly A A , Froehlich J E , Dörmann P . Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGDI* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipidsynthesis[J] . Plant Cell , 2003 , 15(11) : 2694–2706 .
- [8] Jagadish S V K , Craufurd P Q , Wheeler T R . Phenotyping parents of mapping populations of rice for heat tolerance during anthesis[J] . Crop Sci , 2008 , 48 : 1140–1146 .
- [9] 雷东阳 , 旷浩源 , 陈立云 . 利用基因芯片研究植物非生物逆境响应基因表达的进展[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2012 , 38(2) : 156–161 .
- [10] Livak K J , Schmittgen T D . Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J] . Methods , 2001 , 25(4) : 402–408 .
- [11] Klau Essemine J , Govindachary S , Ammar S , et al . Functional aspects of the photosynthetic light reactions in heat stressed *Arabidopsis* deficient in digalactosyldiacylglycerol[J] . Plant Physiol , 2011 , 168(13) : 1526–1533 .
- [12] Sashka Boychova Krumova , Sergey Petrovich Laptinok , Laszlo Kovacs Tunde Toth , et al . Digalactosyl-diacylglycerol-deficiency lowers the thermal stability of thylakoid membranes[J] . Photosynthesis Res , 2010 , 105(3) : 229–242 .
- [13] 穰中文 , 周清明 . 耐热水稻品种Nagina 22高温胁迫下的生理响应[J] . 植物遗传资源学报 , 2012 , 13(6) : 1045–1049 .
- [14] Li Xia , Lovely M F Lawas , Richard Malo , et al . Metabolic and transcriptomicsignatures of rice floral organs reveal sugar starvation as a factor in reproductive failure under heat and drought stress[J] . Plant Cell Environ , 2015 , doi : 10 . 1111/ pce . 12545 .
- [15] Deepti Nigam , Sanjeev Kumar , Mishra D C . Synergistic regulatory networks mediated by microRNAs and transcription factors under drought , heat and salt stresses in *Oryza sativa* spp.[J] . Gene , 2015 , 555(2) : 127–139 .

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库