

研究报告

水稻 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 基因及其启动子

杨 鹏^{1,3}, 傅亚萍², 张玉满¹, 颜永胜^{1,3}, 赵志强^{1,3}, 方荣祥¹, 孙宗修², 陈晓英¹

1 中国科学院微生物研究所植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

2 中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

3 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 磷脂酶 D(Phospholipase D, PLD)是在植物组织中广泛存在的一类磷脂酶,可催化磷脂如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)水解产生磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和一个自由的头部基团如胆碱(choline)。在植物体内 PLD 家族往往包括多个成员。利用反向遗传学技术对水稻磷脂酶 D 家族(*OsPLD*)中的两个成员 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 基因及其启动子的研究显示: *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的启动子在花器官的不同部位中驱动报告基因不同程度地表达,二者都受损伤和茉莉酸甲酯诱导,但是对诱导因子反应的时空模式不同。利用转基因技术在水稻中过量表达 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 基因或是干扰 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 基因表达都不能引起可见的水稻表型的变化,说明 *OsPLD* 家族不同成员可能有功能上的重复。

关键词: 水稻磷脂酶 D, 损伤诱导, 茉莉酸甲酯, 花器官

Analysis of Rice *OsPLD3* and *OsPLD4* Genes and Promoters

Kun Yang^{1,3}, Yaping Fu², Yuman Zhang¹, Yongsheng Yan^{1,3}, Zhiqiang Zhao^{1,3}, Rongxiang Fang¹, Zongxiu Sun², and Xiaoying Chen¹

1 State Key Laboratory of plant genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 State Key Laboratory of Rice Biology, National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: Phospholipase Ds (PLDs) exist in many plants. PLDs catalyse the hydrolysis of phospholipids (e.g. phosphatidylcholine) in cell membrane into phosphatidic acid (PA) and polar free heads (e.g. choline). Two PLD members from rice, *OsPLD3* and *OsPLD4*, were studied by reverse genetics approaches. The results showed that the promoters of *OsPLD3* and *OsPLD4* could drive the expression of the reporter gene in various tissues of the rice flower organs at different levels. The expression of both genes was induced by wounding and methyl jasmonate (MeJA), but with different intensity at different time intervals. No prominent phenotypes were observed by RNA interference with the gene-specific artificial miRNAs or over-expression of the target genes in rice plants, implying the functional redundancy among different members of the rice *PLD* family.

Keywords: *OsPLD*, wounding induction, methyl jasmonate, flower organ

Received: May 22, 2007; **Accepted:** June 14, 2007

Supported by: Chinese Academy of Sciences (CAS) Knowledge Innovation Program (No. KSCXZ-YW-N-025).

Corresponding author: Zongxiu Sun. Tel: +86-571-63370377; E-mail: sunzx405@tom.com

Xiaoying Chen. Tel: +86-10-64861838; E-mail: chenxy@sun.im.ac.cn

中国科学院知识创新工程重要方向项目资助 (No. KSCXZ-YW-N-025)。

磷脂酶 D(Phospholipase D, PLD)通过催化降解生物膜上的重要组分磷脂参与诸多细胞过程, 在植物的生长发育和对环境胁迫的应答过程中也起到广泛的作用。对多种植物的 PLD 研究表明, PLD 的水解产物磷脂酸(phosphatidic acid, PA)能结合其他分子起到信号分子的作用, 植物中 PLD 在应对各种环境胁迫, 如损伤, 病原物的侵染, 冻害, 盐胁迫, 活性氧胁迫中的作用正得到越来越多的关注^[1-3]。

水稻磷脂酶 D 家族是一个大的家族。McGee JD 等^[4]已发现籼稻亚种中的五个 PLDs (RPLDs), 其中 RPLD1 组成型存在于根、叶和分生组织中; RPLD2-RPLD5 不如 RPLD1 那样分布广泛, 在未受处理的根、叶和分生组织中用 Northern 杂交的方法检测不到 RPLD3-RPLD5, 推测这几种 RPLDs 可能是时空特异性表达或受某种条件诱导表达。亚细胞定位研究结果表明 RPLD1 主要存在于叶肉细胞的细胞壁、细胞膜和叶绿体中; RPLD2-RPLD5 在所定位的亚组织中分布都很稀疏, 只有 RPLD3 和 RPLD4 在水稻叶子的叶绿体中含量较高。

我们对水稻粳稻品种日本晴 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 进行分析和研究, 结果显示: 二者在损伤和 MeJA 的诱导过程中有快速、强烈和持久的表达, 其中 *OsPLD3* 的表达主要在生长发育期的开花阶段, 而 *OsPLD4* 启动子在颖壳的药隔维管束中特异表达。我们的研究结果为揭示 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的功能、表达调控机制及其在水稻基因工程方面的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及培养条件

以粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare)为基本研究材料和转基因的受体。用于各种处理的水稻幼苗在温室中用 1/2×Hoagland 培养基进行水培种植, 各组分浓度分别为 2 mmol/L Ca(NO₃)₂, 2.5 mmol/L KNO₃, 0.5 mmol/L NH₄NO₃, 0.5 mmol/L KH₂PO₄, 2 mmol/L MgSO₄; 50 μmol/L EDTA-Fe; 1/2×MS 微量元素液, pH 5.6。从种子发芽播种到 3 叶期, 一直在 28°C /22°C, 14 h/10 h (光照/黑暗)的条件下培养。

水稻开花期的 GUS 组织化学染色材料和用于检测开花期组织特异性表达的野生型材料等分别取自试验田中生长的正在抽穗开花的转基因 T₀代和 T₁

代水稻和野生型日本晴植株。

1.2 转基因水稻的获得以及阳性株系的检测

1.2.1 目的基因启动子的克隆和植物表达载体的构建

根据 McGee JD 等人^[4]对籼稻中 RPLD 家族的五个成员的分析, 我们选取了研究信息尚不多的水稻籼稻(Indica)亚种的两个磷脂酶 D-RPLD3 和 RPLD4, 利用所提供的 PAC 克隆号 P0481H08 在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上得到了粳稻(Japonica)亚种中与 RPLD3 和 RPLD4 相似程度最高的两个磷脂酶 D 的 DNA 序列和 mRNA 序列(GenBank 号分别为 AK100278 和 AK119861), 在 KOME 数据库 (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>)中的全长 cDNA 序列号分别为 J023073L15 和 002-178-H08, 我们将其分别命名为 *OsPLD3* 和 *OsPLD4*。对应的 DNA 序列都位于水稻第 6 染色体上, *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 在染色体上呈反向排列。按照 KOME 上预测的最长的 ORF, 分别在对应的起始密码子上游取 1142 bp 和 1005 bp 作为 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的启动子序列, 根据其序列分别设计引物并在末端引入 Hind III 和 BamH I 酶切位点和保护碱基: *OsPLD3*(5'-aaaaaagcttcattcaaccgttcgg-3' 和 5'-aaaaggatcctgccactcctcgatgatccagtggag-3')和 *OsPLD4*(5'-aaaaaagcttccattagtaagtgcgtggccac-3' 和 5'-aaaaggatcctgctgctgctccttcagttcag-3')。以日本晴基因组 DNA 为模板进行 PCR, 胶回收后接 pGEM-T 载体(Promega)中, 测序正确后, 酶切并接入 pCambia1300- pBI221 载体以替换其中的 35S 启动子。由 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 启动子连接 GUS 报告基因的构建得到的转基因水稻, 分别命名为 *OsPLD3 promoter::GUS* 和 *OsPLD4 promoter::GUS* (以下简称为 P3 和 P4)(图 1)。

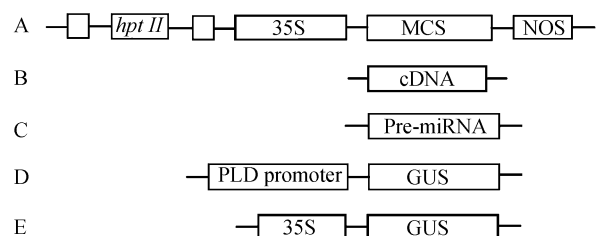


图 1 本实验中的各个表达载体构建示意图

Fig. 1 Schemes of various expression constructions
HptII: hygromycin phosphotransferase gene. All the constructs have the same backbone of pCambia1300.

A: pCambia1300-MCS; B: 35S-P:: *OsPLD3/4* cDNA(O3/4); C: 35S-P::*OsPLD3/4* miRNA(I3/4); D: *OsPLD3/4 promoter::GUS*(P3/4); E: pBI221-pCambia1300

1.2.2 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 过量表达和沉默载体的构建

过量表达载体的构建: 从日本国家农业生物科学研究所(National Institute of Agrobiological Sciences)的水稻全长 cDNA 库获取目的基因序列, 根据序列设计引物, 在引物两端引入 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点和保护碱基, 合成的引物序列分别为: *OsPLD3* cDNA(5'-gctctagactcaactgcatcg-3'和 5'-ggggatccgc atgcaccaccagc-3')及 *OsPLD4* cDNA(5'-gctctagaaggag cagcagcaatgg-3'和 5'-ggggatccaggaatggcaactcg-3')。PCR 得到的 cDNA 片段先连接入 pGEM-T 载体中, 测序正确后转接到 pCambia1300-MCS 载体上(图 1)。

OsPLD3 和 *OsPLD4* 的人工 miRNA 表达载体的构建: 引起 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 干扰的片段分别来自 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的 cDNA 序列中同源性较低的部分, 以防止交叉干扰, 目标序列分别为: *OsPLD3*(5'-ggccagcttgaagagtgcaa-3')和 *OsPLD4*(5'-gtcaatgggcaggctcgaga-3')。

用于构建两个 pre-miRNA 的引物序列分别为: D3Forwrd (5'-cgggatccatgagagagtcctttggccagcttccaaggagccaagatcttacctgaccacacacg-3') 和 D3Reverse (5'-aaaagagctcacgagagagtactgagccagcttgaagagtgcaagat-aatctagagagaataatg-3'), 及 D4Forward (5'-cgggatccatgagagagtcctttgtcaatgggaagctgctagagatcttacctgac-cacacacg-3') 和 D4Reverse (5'-aaaagagctcacgagagagta-ctgagtcgaatgggcaggctcgagagataatctagagagaataatg-3')。

以拟南芥 pre-miR171a 质粒为模板进行 PCR, 使用 LA Taq 酶和 2×GC buffer I (TaKaRa)。按照说明书组分和程序配制 PCR 反应体系和进行 PCR, 退火温度为 60。PCR 产物先连接入 pGEM-T 载体中, 测序正确后由 *Bam*H I 和 *Sac* I 接入 pCambia1300-pBI221 载体中替换其中的 *GUS* 基因。

由这些构建得到的转基因水稻植株分别命名为: 35S-P::*OsPLD3* cDNA(O3)和 35S-P::*OsPLD4* cDNA(O4); 35S-P::*OsPLD3* miRNA(I3)和 35S-P::*OsPLD4*miRNA (I4) (括号中为相应简称, 其中 O 表示过量表达; I 表示 miRNA 干扰)(图 1)。

1.2.3 农杆菌介导的水稻幼胚转基因方法

将上述构建好的质粒通过电击转化到农杆菌 EHA105 中, PCR 检测阳性克隆。基因转化过程参照 Hiei 等^[5]的方法。

1.2.4 转基因苗的潮霉素 B 抗性检测

取 P3 和 P4 的 T₀ 和 T₁ 代转基因苗旗叶上距离叶尖 2~3 cm 的叶段, 放入 1.0 mg/L 6-BA, 100 mg/L 潮霉素 B 的混合溶液中, 置于 28°C/22°C, 14 h/10 h (光照/黑暗)下 7 d, 观察叶片的变化情况。根据张洪等^[6]的方法初步判断是否为转基因植株。

1.2.5 转基因幼苗的萌发和转基因植物中 DNA 和 RNA 水平的检测

萌发部分 O4 和 I4 的种子并观察性状。潮霉素 B 筛选萌发种子和用潮霉素 B 抗性基因 *hpt* 特异引物在 DNA 水平检测转基因阳性植株的方法分别参照文献 [7,8]。以野生型 (WT) 和转化 pCambia1300 载体的转基因植株(简称为 V)作为对照, 观察阳性的转基因幼苗从种子萌发到 3 叶期根和芽的表型。

对上述方法筛选到的 O4 和 I4 的幼苗作 RNA 水平的检测。O4 和 I4 的抗性植株按照 TRIzol 试剂 (Invitrogen)的说明方法提取 RNA, 用 DNase I (TaKaRa)消化基因组 DNA。取 2 μg RNA, 使用 Superscript II (Invitrogen)反转录(RT)cDNA 的第一条链。RT 产物用来 PCR。检测引物用 Vector NTI 7.0 设计, 使之位于 miRNA 目标序列的 5'端, 以保证被 miRNA 破坏掉的 mRNA 不被检测出来。以同样的方法设计 *OsPLD3* 的 RT-PCR 引物。设计出的引物在 GenBank 上使用 BLAST 搜索以确定引物的特异性。引物序列分别为: *OsPLD3*(D3RTF: 5'-ggcatcaag tggggcttcagc-3' 和 D3RTR: 5'-gtgggtggaagcgaagggc-3') 及 *OsPLD4*(D4RTF: 5'-cgctcaaggccaatcacagc-3' 和 D4RTR: 5'-gtctgtgtcttgatccgggc-3')。以 *RubQ1* 为内参, 其引物序列为: rTF:5'-gggttcacaagtctgcctatttg-3' 和 rTR: 5'-acgggacacgaccaagga-3'^[9]。使用 LA Taq 酶和 2×GC buffer I 进行 PCR。*RubQ1* 取 1 μL RT 产物, *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 分别取 2 μL RT 产物为反转录 PCR 的模板, 按照说明书的比例配备 25 μL PCR 反应体系; 反应程序同样按照说明, 退火温度为 57。2.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.3 GUS 组织化学染色

取潮霉素 B 检测为阳性的转基因植株进行 GUS 染色。染色液的组成为: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 10 mmol/L Na₂EDTA(pH 8.0), 0.5 mmol/L K₃[Fe(CN)₆], 0.5 mmol/L K₄[Fe(CN)₆], 5%(V/V)甲醇,

0.1%(V/V)TritonX-100, 1.5 mmol/L X-Gluc。在 37 下染色后 75%乙醇脱色, 观察结果。其中叶、根和穗的染色情况用 Nikon5900 照相机拍摄; 雄蕊用体视镜 Olympus SZX9 拍摄。

1.4 损伤和 MeJA 处理对 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 转录水平的影响

取 3 叶期的水稻第 2、3 片叶, 截断成 2~3 cm 长的叶段放入 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲溶液(pH 7.0)中, 在生长条件下放置相应时间后提取 RNA, 以直接用液氮冷冻研磨的叶片提取 RNA 为对照(CK)。

生长到 3 叶期的幼苗移入高瓶, 加入 1 mmol/L MeJA, 并用保鲜膜封口, 于不同的时间点取样。由于在移动过程中可能会造成一定的诱导, 因此在实验中取 C1(短期适应)和 C24(长期适应)两个对照。

提取 RNA、RT-PCR 检测的方法和引物同 1.2.5 所述。

1.5 开花期的野生型水稻中 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的表达水平检测

从田间开花期的野生型水稻的叶、根、穗取样,

并尽可能地快速冻存于液氮中。提取 RNA、RT-PCR 检测的程序和引物同 1.2.5 所述。

2 结果

2.1 T_0 代转基因水稻花期各个组织染色情况

取抽穗期 P3 和 P4 T_0 代植株上的叶、根, 以及完全抽出将要开花的穗的顶部枝梗 GUS 组织化学染色 24 h, 结果如图 2 所示。转基因叶在被损伤部位有很强烈的染色, 未损伤部位基本上没有染色(图 2A)。根部没有明显着色(图 2B)。为使颖壳内部的花器官能充分暴露在染液中, 将颖壳人为打开; 如图 2C 所示, 在颖壳上有明显的着色, 主要在颖壳的主脉等维管组织中。将图 2C 中上部箭头所示 P4 颖壳中的一个雄蕊放大(图 2D), 观察可见, 以花粉囊的开口处为分界, 内部的药隔维管束中, *OsPLD4* 启动子诱导 GUS 报告基因高表达, 而在花丝维管束中没有报告基因被诱导表达的迹象。雌蕊中亦没有可见的染色。用 T_1 代转基因植株验证得到相同的结果。

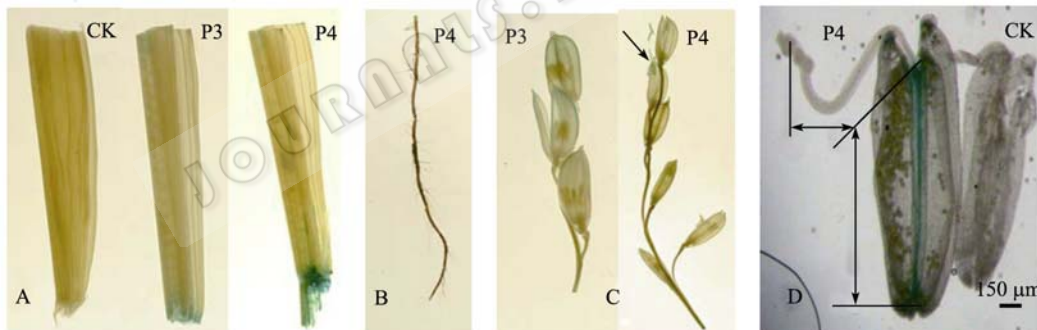


图 2 花期 *OsPLD3* promoter::GUS(P3)和 *OsPLD4* promoter::GUS(P4) T_0 代水稻各个组织 GUS 染色

Fig. 2 GUS staining for T_0 plants of *OsPLD3* promoter::GUS (P3) and *OsPLD4* promoter::GUS (P4)

A: basal sections of leaves from WT (CK) and transgenic plants (P3 and P4);

B: part of root from P4 transgenic plant; C: sections of panicles in P3 and P4 transgenic plants;

D: stamens from P4 panicle (the arrowed part in C) and WT (CK) panicle. ① filament, ② anther. The scale bar: 150 μ m

2.2 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 在水稻幼苗叶片损伤后的诱导表达

对 3 叶期水稻的 RT-PCR 检测结果显示: 尽管 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 都受损伤诱导但是表现出对同一刺激的不同应答方式(图 3)。

2.3 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 受 MeJA 的调控

RT-PCR 结果显示 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 都受 MeJA (1 mmol/L)诱导, 但是两者的启动子在应答强度上也表现出很大的不同, *OsPLD3* 的诱导表达强烈而持续时间超过 4 h, *OsPLD4* 的表达水平则相对较

低, 持续时间较短。结果如图 4。

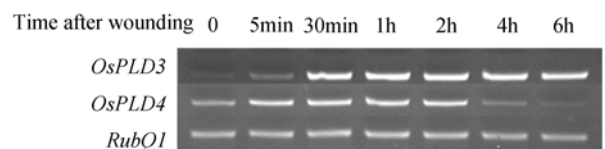


图 3 在水稻幼苗叶片损伤后 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的诱导表达
Fig. 3 Expression of *OsPLD3* and *OsPLD4* after wounding in rice seedling leaf

The samples were taken for RT-PCR at the time points shown above. *RubQ1* was tested as the reference gene

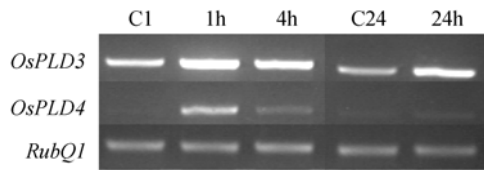


图4 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 受 MeJA 的诱导表达

Fig. 4 Induction of *OsPLD3* and *OsPLD4* by MeJA (1 mmol/L) assayed by RT-PCR

C1 and C24: MeJA-untreated controls for 1h/4h and 24h, respectively

2.4 水稻花期各个组织 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的表达

为对花期各个组织的 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 表达有一个清楚的了解, 遂取田间开花期的野生型水稻的叶、根、穗进行 RT-PCR 检测, 其中为探究完全抽出并且顶部枝梗已经开花的穗和尚未完全从旗叶中抽出的穗中基因表达量有无变化, 同时取同一株上不同发育时期的两种穗子进行实验。结果如图 5 所示。*OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的根部表达量稍高, 无法排除因根部取样时间稍长而导致的受损伤诱导的可能性。*OsPLD3* 和 *OsPLD4* 在开花期各部分表达方式的不同, 尤其在穗中表达量的差异再一次显示它们的启动子在组织表达特异性中有不同的顺式元件参与。

2.5 过量表达和 RNA 干扰的转基因植株性状的观察

对田间 O3、O4 和 I3、I4 的 T₀ 代转基因植株

都分别进行了观察, 地上部分的茎、叶和花与野生型植株和转空载体植株相比没有呈现出明显的不同。

此外, 萌发 O4 和 I4 一些株系的种子, RT-PCR 检测 RNA 水平的表达变化, 结果如图 6 所示。所检测的 9 个过表达株系的 mRNA 水平都有不同程度的升高(图 6A); RNAi 干扰株系中 I4-3, -33, -36, -48, -53 与对照 V-3 和 V-4 相比有所下降, 但是在检测的 10 个株系中没有发现 *OsPLD4* 被完全敲除(图 6B)。

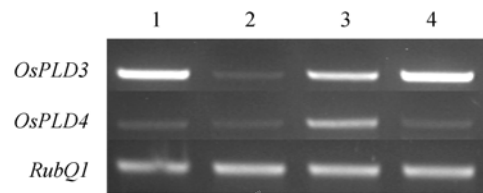


图5 水稻花期各个组织 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的表达

Fig. 5 Tissue specific expression of *OsPLD3* and *OsPLD4* in floral stage

1: panicle in completely heading rice; 2: flag leaf; 3: root; 4: panicle in incompletely heading rice

挑选检测 RNA 表达变化的株系种子与 V-3、V-4 和 WT 同时萌发, 在 1.1 所述情况下种植, 观察苗期性状。从种子萌发到长成籽苗过程中, 转基因和对地上部分高度、茎的粗细、初生根长度、根数量以及根毛的密度都没有明显变化。

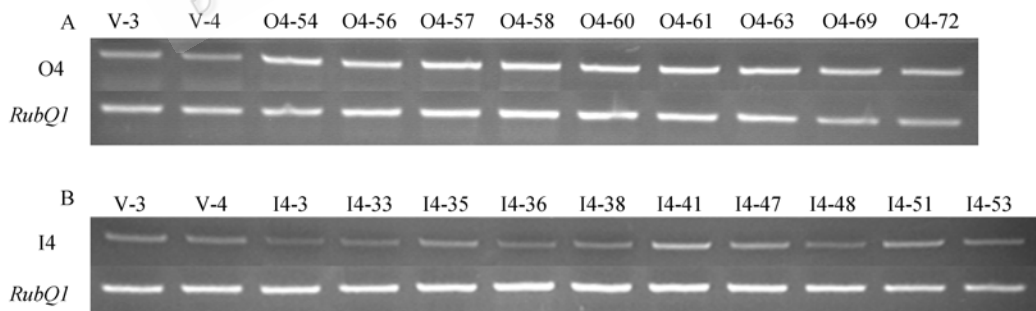


图6 *OsPLD4* 的过量表达(O4)和 RNA 沉默(I4)转基因株系 mRNA 水平的检测

Fig. 6 mRNA expression level test for transgenic lines of O4 and I4

V-3 and V-4 are the transgenic lines with vector of pCambia1300 as controls

2.6 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 启动子中相关顺式作用元件分析

利用 PLACE 软件对 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 启动子(分别为 1142 bp 和 1005 bp)分析, 下面主要对与本实验相关的一些顺式元件作一说明^[10]。

2.6.1 与花发育相关的顺式作用元件

RT-PCR 的结果显示, *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 在花期的表达有十分显著的不同。预测结果揭示一些在花的不同器官和发育阶段起作用的顺式表达元件, 同时表明 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 启动子含有顺式作用元件的种类和数量的不同, 结果见表 1。

表 1 与花器官相关的顺式元件
Table 1 *cis*-element related to floral organs

Name	Core sequence	D3	D4	Tissue	Reference
POLLENILELAT52	AGAAA	2+/3-*	3+	Late pollen	[11,12]
GTGANTG10	GTGA	3+/5-	3+/4-	Late pollen	[13]
MYBPLANT	MACCWAMC	1+	4+	Petal collar	[14]
MYB26PS	GTTAGGTT	N/A	1-	Flower bud	[15]
QELEMENTZM3	AGGTCA	N/A	1+	Pollen	[16]
NTBBF1ARROLB#	ACTTTA	2-	N/A	Vascular bundle	[17]

Note: *2+/3- signify 2 copies on the Current Strand, and 3 copies on the Opposite Strand; N/A, none. M=A/C; W=A/T. # phloem-specific element

2.6.2 与损伤和 MeJA 诱导相关的顺式作用元件

Brown RL 等人的研究^[18]表明, GCC-box 是在拟南芥 JA 信号途径中的标记基因 PDF1.2 中负责应答的主要元件。GCCCORE 在 *OsPLD4* 启动子序列正链上存在两个拷贝。

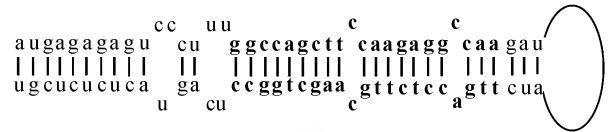
OsPLD3 不含 GCC-box, 但是在负链上存在另外一个被表明与损伤和其他一些病原诱导相关的顺式元件——AGMOTIFNTMYB2, 又称 AG-motif, 该元件存在于烟草 *NtMyb2* 的启动子中, *NtMyb2* 调节下游一类 *PAL* 基因表达, 这些基因都受损伤和某些病原诱导^[19]。

3 讨论

3.1 利用拟南芥 miRNA 干扰水稻基因不能达到完全沉默的效果

以拟南芥 pre-miR171a 质粒为模板进行 PCR(见 1.2.2), 得到 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的 miRNA 的作用前体(pre-miRNA)。设计过程充分考虑形成的二级结构和自由能与天然的 miRNA171a 保持一致。使用 ViennaRNA-1.5(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNA-fold.cgi>)预测两个前体序列的二级结构, 结果如图 7 所示。根据图 6B 的结果来看, 使用拟南芥中的 pre-miR171a 干扰 *OsPLD4* 的表达不能达到完全沉默的效果。究其原因可能是当 35S 启动子驱动 miRNA 的前体在水稻各部分组成型表达后, 由于水稻中加工 miRNA 的体系与拟南芥中的不同, 不能按照预期加工和利用成熟的 miRNA 片段从而不能达到完全沉默的效果。

Pre-miRD3:



Pre-miRD4:

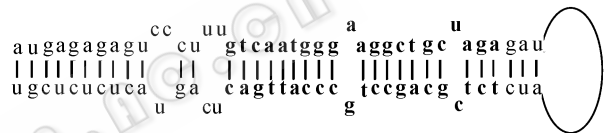


图 7 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的 miRNA 前体结构示意图
Fig. 7 Hair-pin structures for pre-miRNA of *OsPLD3* and *OsPLD4*

3.2 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 启动子驱动报告基因 *GUS* 在花器官中的表达

花丝和药隔中的维管束是水分和养料输送到花粉囊的唯一通道。而药隔维管束与花丝维管束最大的不同之处在于, 前者还负责将这些养分通过某种方式传送到药室的绒毡层细胞, 以供给附着在上面的花粉养分, 促其发育。相关研究表明^[20], 雄性不育系的药隔维管束存在明显异常, 通常药隔维管束发育的不良状况和功能障碍多发生在花粉发育的初级阶段——单核发育的早期和减数分裂期。这些充分显示了 *OsPLD4* 在水稻花发育过程中的重要性。

但是, 这种特异表达的原因还不清楚, 推测与 JA 的产生和存在有关。已经有研究表明^[21], PLA1 介导产生的 JA 在花粉成熟、花药开裂和花的开放中起到重要作用, 同时 PLA1 也受到损伤诱导。在我们的研究中尚未验证 *OsPLD4* 是否在水稻花发育的某一阶段负责 JA 的产生或是参与 JA 信号转导, 但它受损伤诱导和在药隔维管束的特异表达的联系和特性值得进一步探究。

此外, *OsPLD3* 在颖壳的维管束中高表达是否也跟 JA 诱导的水稻颖壳的成熟和开裂有关亦需要进一步的实验支持。

3.3 过表达目的基因的转基因水稻和 RNAi 干扰表达的转基因水稻性状的分析

选择了部分 mRNA 表达有变化的 O4 和 I4 的种子萌发并观察性状, 没有发现可见的表型上的变化。一种可能的解释是 *OsPLD4* 在正常的生长过程中与其他的 *OsPLDs* 在功能上存在一定的重复。当 *OsPLD4* 的表达部分升高和部分降低时 *OsPLD4* 和 *OsPLDs* 组成的 PLD 的库可以将这种轻微的变化稀释掉。但是这些假设还需要进一步从生理、生化和分子水平进一步验证。此外, 由于没有得到目的基因被完全敲除的株系, 我们认为敲除载体的设计还需要进一步的改进。

3.4 预测启动子顺式元件对实验结果的部分阐释

通过对在花器官中起特异作用的顺式元件分析和表 1 显示的结果推测, *OsPLD3* 有在发育成熟花粉表达高于 *OsPLD4* 的可能, 但 P3 之所以未能得到在雄蕊中有 GUS 染色的迹象有可能也是因为取样时间与 *OsPLD3* 在花器官中起作用的时间不符。本实验中没有发现所研究的启动子有驱动 GUS 基因在花粉中表达的迹象。以上分析也并不能够解释 P4 的 GUS 在药隔维管束中特异性表达的现象, 说明在 *OsPLD4* 启动子中存在着一类新的顺式元件负责这种特异性表达。

此外, 在应答损伤和 MeJA 的应答中, 虽然不能简单将 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 的不同表达完全归因于含有不同的顺式元件——GCC-box 和 AG-motif, 但至少这两个元件特异性的存在说明了这两个基因的不同应激表达方式。

3.5 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 启动子在植物基因工程中的应用

杂交水稻“三系”配套育种方法的成功使水稻的产量大幅度提高。但是杂交水稻种子带菌多是水稻生产中的严重问题^[22]。我们的实验显示, *OsPLD4* 启动子可在水稻颖壳的维管组织以及药隔维管束中表达 GUS 基因, *OsPLD3* 启动子更是在颖壳上具有强烈的表达活性, 因此可以考虑使用 *OsPLD3* 和 *OsPLD4* 启动子培育在水稻花器官各部分中表达抗菌蛋白的基因工程水稻。此外, 杂交水稻育种过程

中会受到许多特定条件的限制^[20], 基因工程手段无疑有助于培育出更加容易控制的条件败育株系。正如本研究结果显示, *OsPLD4* 启动子可驱动 GUS 基因在雄蕊的药隔维管束中高表达, 这说明 *OsPLD4* 启动子应该含有药隔维管束特异表达的顺式元件, 利用这样的顺式元件在花药中特异诱导表达某种导致植物雄性不育的基因可以人工培育雄性不育株系, 了解该顺式元件的作用原理不仅具有深刻的理论意义, 也具有较高的应用价值。

REFERENCES

- [1] Wang XM. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol*, 2005, **139**: 566–573.
- [2] Wang C, Zien CA, Wang XM, et al. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2000, **12**: 2237–2246.
- [3] Bargmann BOR, Laxalt AM, Munnik T, et al. *LePLDβ1* activation and relocalization in suspension-cultured tomato cells treated with xylanase. *Plant J*, 2006, **45**: 358–368.
- [4] McGee JD, Roe JL, Leach JE, et al. Rice phospholipase D isoforms show differential cellular location and gene induction. *Plant Cell Physiol*, 2003, **44**(10): 1013–1026.
- [5] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, **6**: 271–282.
- [6] Zhang H, Ma J, Sun ZX, et al. Reliability study on the response of HPT gene in transgenic rice to hygromycin by leaf assay. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2005, **17**(6): 341–345.
张洪, 马骏, 孙宗修, 等. 用叶片检测转基因水稻对潮霉素反应的可靠性研究. *浙江农业学报*, 2005, **17**(6): 341–345.
- [7] Rong J, Song ZP, Lu BR, et al. Low frequencies of transgene flow between Bt/CpTI rice and their non-transgenic counterparts under alternating cultivation. *Biodiversity Science*, 2006, **14**(4): 309–314.
戎俊, 宋志平, 卢宝荣, 等. Bt/CpTI 转基因稻及其非转基因亲本对照在间隔种植条件下的转基因漂移. *生物多样性*, 2006, **14**(4): 309–314.
- [8] Wu GT, Lang CX, Chen JQ, et al. Raising fat content in transgenic rice by anti-PEP gene transformation. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, **32**(3): 339–344.
吴关庭, 朗春秀, 陈锦清, 等. 应用反义 PEP 基因表达技术提高稻米脂肪含量. *植物生理与分子生物学学报*,

- 2006, **32**(3): 339–344.
- [9] Paszkowski U, Kroken S, Briggs SP, *et al.* Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS*, 2002, **99**(20): 13324–13329.
- [10] Higo K, Ugawa Y, Korenaga T, *et al.* Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(1): 297–300.
- [11] Bate N, Twell D. Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol*, 1998, **37**(5): 859–869.
- [12] Filichkin SA, Leonard JM, Nonogaki H, *et al.* A novel endo-beta-mannanase gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol*, 2004, **134**(3): 1080–1087.
- [13] Rogers HJ, Bate N, Twell D. Functional analysis of *cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Mol Biol*, 2001, **45**: 577–585.
- [14] Sablowski RWM, Moyano E, Bevan M, *et al.* A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J*, 1994, **13**: 128–137.
- [15] Uimari A, Strommol/Ler J. Myb26: a MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *Plant J*, 1997, **12**: 1273–1284.
- [16] Hamilton DA, Schwarz YH, Mascarenhas JP. A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol Biol*, 1998, **38**(4): 663–669.
- [17] Baumann K, De Paolis A, Gualberti G, *et al.* The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the *rolB* oncogene in plants. *Plant Cell*, 1999, **11**: 323–333.
- [18] Brown RL, Kazan K, Manners JM, *et al.* A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, **132**: 1020–1032.
- [19] Sugimoto K, Takeda S, Hirochika H. Transcriptional activation mediated by binding of a plant GATA-type zinc finger protein AGP1 to the AG-motif (AGATCCAA) of the wound-inducible Myb gene *NtMyb2*. *Plant J*, 2003, **36**: 550–564.
- [20] Sun ZX, Cheng SH. Hybrid Rice Breeding: From Three Line, Two Line to One Line System, 1st ed. Beijing: China Agricultural Press, 1994.
孙宗修, 程式华. 杂交水稻育种——从三系两系到一系, 第一版. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [21] Ishiguro S, Oda AK, Okada K, *et al.* The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2001, **13**: 2191–2209.
- [22] Zhang TY, Qi JF. The occurring regulation and controlling techniques of diseases and insect pests in the field of hybrid rice seed production. *Hybrid Rice*, 2001, **16**(5): 24.
章田英, 齐金富. 杂交水稻种子生产田病虫害发生特点与防治技术. 杂交水稻, 2001, **16**(5): 24.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

中国主要蝗虫及蝗灾的生态学治理

陈永林 编著

978-7-03-015739-3 ¥98.00 2008年1月3日出版

本书主要介绍我国重要蝗虫及蝗灾生态学治理的古今主要成就。全书分十章:第一章介绍蝗虫种类、区系、分布特点,重要蝗种危害特点。第二章介绍我国古代的蝗虫名称、蝗虫发生地与蝗神庙的分布以及历代蝗灾发生情景简述。第三章介绍我国飞蝗三亚种的识别、分布及其发生生境、蝗区的概念、类型、结构、形成和飞蝗生物学特性以及飞蝗种群的发生动态。第四章阐述我国草原不同类型的蝗虫区系种类分布、栖境选择、生态位、群落演替规律和优势蝗种的生物学与生态学特性。第五、六章分别介绍我国稻田与竹林主要有害蝗种的识别、生物学特性及综合防治。第七章提出“蝗虫灾害学和灾害体系新概念”、蝗灾发生特点、规律及主要研究内容。第八章阐述我国古代蝗灾治理的法规、策略、方法以及近代有关飞蝗灾害的生态学治理方针、对策、效益和草原蝗害的生态学治理途径。第九章简要介绍国际蝗虫研究与治蝗进展。第十章系统简述记载始于商代至今的蝗虫研究、蝗灾发生和治理的重要史事提要以作本书的小结。

本书可供生物学、昆虫学、蝗虫学、昆虫生态学、植物保护学、环境保护学、灾害学等研究技术人员和高等院校讲授上述有关课程人员参考,以及全国农林牧业植物保护站、测报站、病虫害防治站和决策管理部门备用参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目