应用cDNA-AFLP比较干旱胁迫条件下水稻和旱稻转录本表达谱

高凤华, 张洪亮, 王海光, 高宏, 李自超*

中国农业大学农业部作物基因组学与遗传改良重点实验室, 北京市作物遗传改良重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: lizichao@cau.edu.cn

2009-02-26 收稿, 2009-05-20 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2004BC117201)、国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 200800190017)和国家转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2009ZX08009-073B)资助项目

摘要 很多年来, 水稻生长在有充足水分供应的稻田中, 而旱稻生长在自然雨水供给的土壤中, 这种长期生存环境的差别造成了旱稻比水稻抗旱。为了阐明水稻和旱稻干旱抗性的差异调控机制, 应用 cDNA-AFLP 技术调查了干旱胁迫条件下水稻和旱稻中全基因组的转录本调控。结果表明, 90%以上的基因在两种稻作基因型中不受干旱胁迫的影响, 多于 8%的基因在二者中受干旱胁迫调控, 少于 1%的基因在水稻或旱稻中特异表达; 57 个基因在旱稻中特异表达, 38 个在水稻中特异表达。旱稻特异表达基因包括可能在干旱抗性中起作用的细胞挽救和防御基因、信号转导分子、生长发育必需的核苷酸和氨基酸生物合成基因以及生长发育调控基因。而水稻特异表达基因与蛋白质和核苷酸降解有关。一些基因在旱稻中被较早上调, 而且旱稻中的下调基因也比水稻中下调早, 这表明同水稻相比更迅速的调控机制引起了旱稻对干旱胁迫较早的应答。旱稻中上调基因的表达水平高于水稻。水稻和旱稻之间基因表达的差异可能是干旱胁迫条件下旱稻比水稻具有更强的调控能力, 更强的干旱抗性, 更好的生长势的分子机制。

关键词
cDNA-AFLP
干旱胁迫
水稻
旱稻

干旱胁迫经常是作物产量和质量下降的一个主要原因。植物通过各种生化和生理变化来应答并适应干旱胁迫, 因此获得了胁迫抗性。很多研究关注干旱胁迫条件下植物基因表达的变化。通过比较水分胁迫植物与非水分胁迫植物基因表达谱, 已经鉴定了许多干旱应答基因^[1-5]。大量干旱应答基因的表达分析表明植物对干旱胁迫的应答包含两个ABA依赖的和两个ABA不依赖的转录调控系统^[6-9]。对众多干旱应答基因的功能分析使我们能够了解高等植物干旱抗性和应答的分子机制, 并提供通过基因工程来改良作物干旱抗性的机会^[10]。当前, 已经鉴定了许多增强水稻干旱抗性的基因^[11-14], 这加快了作物抗逆性育种进程。对稻作水分胁迫抗性的分子生物学研

究发展迅速^[15-17]。然而, 当前面临的挑战是如何鉴定控制干旱抗性和应答的关键基因。这些关键基因在环境胁迫条件下的表达可能是组成型的, 如拟南芥控制系统获得抗性的*NPR1* 基因^[18]。因此, 比较植物水分胁迫和非胁迫条件下基因表达不能鉴定这样的基因。

水稻是世界上一半以上人口的主食。由于水资源有限, 水稻未来的产量增加将基本上依赖降雨。旱稻从严格意义上讲是靠降雨供给水分, 经常遭受干旱胁迫, 已经发展了抗旱性状^[19]。相比较而言, 水稻一般生长在供给水分的稻田中, 已经发展了干旱敏感性状。前人已经研究了稻作抗旱性的遗传基础, 并对相关QTL做了分析, 这是以旱稻抗旱性和水稻干

引用格式: 高凤华, 张洪亮, 王海光, 等. 应用 cDNA-AFLP 比较干旱胁迫条件下水稻和旱稻转录本表达谱. 科学通报, 2009, 54: 2305~2319

Gao F H, Zhang H L, Wang H G, et al. Comparative transcriptional profiling under drought stress between upland and lowland rice (*Oryza sativa* L.) using cDNA-AFLP. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0524-5

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-16-2305>

旱敏感性为基础的^[20-26]。水稻和旱稻是研究干旱抗性分子机制很好的材料。然而,在这一领域的研究主要涉及生理和表型性状以及定位抗旱性QTL^[20-27]。尽管对水稻和旱稻水分胁迫应答已经做过研究,但只对一个或有限的基因做了比较^[28-30]。关于干旱胁迫条件下水稻和旱稻之间在全基因组的基因表达差异了解很少。

cDNA-AFLP是以PCR为基础的转录本表达谱技术,具有高通量分析、检测稀有表达转录本和高重复性特征^[31-33]。研究表明,它是鉴定差异表达基因的有效方法^[34-37]。先前的研究表明,我们使用的3个旱稻品种(干旱抗性)比3个水稻品种(干旱敏感)具有更强的抗旱性。在3个旱稻品种中,豪格劳和IRAT109的抗旱性强于旱稻297^[25,30,38]。

本研究采用cDNA-AFLP技术调查了干旱胁迫条件下水稻和旱稻全基因组的转录本调控,获得了水稻和旱稻之间的差异表达基因和二者中的干旱应答基因,并用实时PCR做了验证。

本研究的目的是调查水稻和旱稻对干旱胁迫的差异应答,发现这两个基因型抗旱性的差异调控机制。

1 材料与方法

( ) 植物材料与胁迫处理。本研究使用的稻作(*Oryza sativa* L.)品种包括具有抗旱性的3个粳型旱稻材料(豪格劳、旱稻297及IRAT109)和具有干旱敏感性的3个粳型水稻材料(越富、中作93及日本晴)^[17,22,30]。旱稻297是由水稻和旱稻亲本(牧交78-595×Khaomon, 中国农业大学)的杂交后代选育而来。6个品种的种子在32℃发芽2 d,然后种在沙土中。这6个材料种在装有沙土混合物的同一个盒子中(64 cm×42 cm×16 cm),每个材料保留3株。同样种植的第2个盒子作为对照。设3个重复。这些材料于2004年6月4日到8月4日在北京(北纬39.55°,东经116.24°)置于一个防止雨水进入的天棚中足水、足肥种植。为了干旱胁迫处理,两个月大的足水、足肥生长的分蘖期稻作植株进行断水处理类似于大田干旱条件直到叶片稍微下垂(72 h,处理1)和严重卷曲(96 h,处理2)。第2个盒子中的植株继续供给水分作为对照。使用气压渗透仪模型5520(中国农业大学)测量对照和处理的叶片渗透势^[39]。土壤水分含量用烘干法测量。将2个干旱处理的叶片及对照叶片收获,快速冻在液氮中,储存在-80℃冰箱中。

( ) RNA制备和cDNA-AFLP方案。对照和干旱胁迫处理的总RNA用Trizol试剂(鼎国,中国)提取。cDNA-AFLP方案参照文献^[31]。第1链cDNA以10 μg RNA用oligo d[T]₂₅和M-MuLV反转录酶(MBI)合成。第2链用DNA聚合酶, RNaseH和DNA连接酶(TaKaRa)反应获得。第2链cDNA用酚-氯仿法抽提并经Taq和Ase两步限制酶切反应。Taq和Ase接头用T4 DNA连接酶连接到cDNA片段的两端。用T或C作为3'选择性核苷酸的Taq和Ase引物进行预扩增。将预扩增产物稀释100倍,取5 μL用分别带有两个选择性碱基的Taq和Ase引物进行最终的选择性扩增。扩增产物用5%的聚丙烯酰胺凝胶分离,经银染展示。平均每对引物扩增65条谱带。因此,256对引物能够展示全基因组的cDNA,敏感性也很高,足以检测低丰度的信使RNA。

( ) 分析基因表达谱鉴定差异表达基因。通过视觉观察和分析谱带强度准确确定基因表达谱,表明转录本调控的微小差异。根据凝胶上的谱带,仅在旱稻或仅在水稻中展示了相似谱带的基因被认为是水稻和旱稻之间的差异表达基因,而在6个品种中的干旱胁迫调控基因被认为是对照和干旱胁迫处理之间的差异基因,包括诱导的和下调的基因,这些基因中只选择了显示重要差异表达基因进一步分析。

( ) 分离、克隆和测序差异片段。差异表达谱带从凝胶上切下并进行洗脱。在选择性扩增条件下对洗脱模板进行再扩增。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳。将与原始片段大小一致的扩增产物克隆到pGEM-T easy载体(Promega, USA)上。挑取6个克隆在选择性扩增条件下再扩增插入片段,在1%琼脂糖凝胶上再电泳。选择与原始片段大小完全一致的单插入克隆由上海生工公司(上海)测序。测序结果在公共数据库中用BLAST比对核苷酸和蛋白质序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。删除冗余序列。根据MIPS功能分类(<http://mips.gsf.de/projects/funcat>)将这些序列代表的基因进行功能分类。分析了一些基因的生化途径(<http://pathway.gramene.org/RICE/server.html>)。这个研究中获得的所有EST序列提交到GenBank,登录号为GE329399~329584。

( ) 实时PCR分析。总RNA从与cDNA-AFLP方案同样处理的材料中分离。合成第1链cDNA,然后用SYBR Green作为荧光标记,采用DNA Engine Opticon™(Bio-Rad, USA)进行PCR扩增。肌动蛋白基

因(上游引物, 5'-GTGACAATGGCACTGGAA-3'; 下游引物, 5'-TCTGTTAGCCTTTGGGT-3')用作 PCR 数据标准化的对照基因. 用 $2^{-\Delta C_T}$ 计算所做 10 个基因的转录本水平. 用 Primer 5.0 设计 EST 特异引物(网络版附录 1), 送上海生工公司合成. 实时 PCR 实验重复 3 次.

2 结果

2.1 胁迫处理

生长在沙土中的植株采用断水进行干旱处理. 72 和 96 h 后, 植株幼苗分别稍微下垂和严重卷曲, 土壤水分含量分别是 40% 和 20%. 这样大的表型变异可能由于取样时强烈的蒸发蒸腾作用. 测量了相应时间点的植株幼苗的叶渗透势(表 1). 研究表明, 渗透势能代表潜在的表型(干旱抗性或敏感性)特征^[40,41]. 旱胁迫后, 水稻和旱稻的叶渗透势下降, 水稻的变异系数(CV)高于旱稻. 72 h 干旱胁迫后, 水稻和旱稻的叶渗透势稍稍降低. 干旱严重时(96 h), 水稻和旱稻的变异系数增加, 旱稻的叶渗透势仍然高于水稻. 经 *t*-检验, 旱稻在 96 h 的平均叶渗透势同水稻相比达 5% 显著水平, 但在对照和 72 h 差别不显著. 结果表明, 同水稻相比旱稻能更好地保持水分, 这与 Qu^[42] 的研究结果相一致.

2.2 采用 cDNA-AFLP 分离和鉴定干旱胁迫条件下水稻和旱稻中差异表达基因

水稻和旱稻具有不同的特性, 如明显不同的干旱抗性, 这使我们有可能通过研究干旱胁迫条件下水稻和旱稻基因表达变化揭开植物干旱抗性机制. 用 3 个旱稻和 3 个水稻品种以消除背景差异. 水稻和旱稻差异表达基因是只在旱稻或只在水稻中特异表达并在同类基因型之间具有一致表达谱, 而干旱应答基因是在 6 个品种中在对照和胁迫植株之间具有

明显差异表达的基因. 不考虑单个品种中的差异表达基因, 只考虑所有旱稻基因型或所有水稻基因型中差异表达的基因. 本研究旨在揭示水稻和旱稻两个基因型干旱胁迫条件下基因表达的差异和共性. 这里, 特异表达意味着在 5% 聚丙烯酰胺上谱带仅在旱稻或仅在水稻中是清晰的, 而在另一方不可见. 平均每对引物扩增 65 条谱带, 因此能够调查水稻和旱稻干旱胁迫条件下全基因组的转录本变化.

对所有可见水旱稻差异 cDNAs 进行克隆和测序, 获得了 95 个单一序列, 占水稻转录本不到 1%. 发现了大约 1260 个干旱应答基因, 占水稻转录本的 8%. 但是只克隆了差异显著的干旱应答基因, 获得了 91 个单一序列. 通过分析干旱胁迫条件下的表达谱, 总共有 186 个显著差异表达基因, 分为 6 组(表 2).

第 1 组中的基因在 3 个旱稻品种特异表达或仅在旱稻中干旱调控, 在水稻中不表达. 每一个基因的表达谱在 3 个旱稻中相似. 这一组进一步分为 4 个亚组(1~4). 亚组 1 中的 20 个基因在干旱和足水条件下在旱稻中清晰表达, 但在水稻中不可见, 占这一组的大约 57%. 亚组 2 (8 个基因)和 3 (4 个基因)与亚组 4 (3 个基因)分别包括干旱诱导和下调的转录本. 几个基因甚至在非胁迫条件下在旱稻中清晰表达而在水稻中不可见, 这在一定程度上解释了水旱稻之间的抗旱性机制差异.

第 2 组中含有在毫格劳和 IRAT109 中特异表达但不在其他 4 个品种中表达的基因. 这一组又分为 4 个亚组. 亚组 1 中 10 个基因在干旱和足水条件下表达. 亚组 2 (2 个基因)和 3 (5 个基因)含有上调的转录本. 亚组 4 (5 个基因)含有下调的转录本.

第 3 组的基因在 3 个水稻中特异表达但不在 3 个旱稻中表达. 这一组可分为 3 个表达谱. 亚组 1

表 1 稻作幼苗在水分充足(CK)和旱胁迫(72, 96 h)条件下的叶渗透势(LOP)和变异系数(CV)

品种	LOP/MPa				CV (%)	LOP/MPa				CV (%)
	CK	均值	72 h	均值		CK	均值	96 h	均值	
旱稻										
旱稻 297	-1.12		-1.19			-1.28		-1.76		
毫格劳	-1.07	-1.04±0.10	-1.12	-1.09±0.12	3.32	-1.25	-1.25±0.03	-1.67	-1.66±0.11 ^{a)}	19.93
IRAT109	-0.93		-0.96			-1.23		-1.55		
水稻										
中作 93	-1.15		-1.25			-1.38		-1.98		
越父	-1.18	-1.20±0.07	-1.31	-1.36±0.14	8.84	-1.31	-1.37±0.06	-2.00	-2.04±0.09	25.44
日本晴	-1.28		-1.51			-1.42		-2.15		

a) 经 *t*-检验旱稻渗透势均值同水稻相比达 5% 显著水平($t' = 4.726$, $t_{0.05}[df = 2] = 4.303$)

中的 9 个基因在干旱和足水条件下仅在水稻中表达在旱稻中不可见. 亚组 2 中只有一个基因在 72 h 上调. 亚组 3 中 3 个弱表达基因在 96 h 下调.

第 1 组中的基因在旱稻 297 和 3 个水稻品种中特异表达, 但不在毫格劳和 IRAT109 中表达, 这表明旱稻 297 的转录本应答类似于它的一个亲本, 水稻. 这一组可分为 2 个表达谱. 亚组 1 中的 23 个基因在干旱和足水条件下清晰表达, 而亚组 2 中的 2 个基因是干旱下调的.

第 2 组中的基因在水稻和旱稻中是干早上调的. 这一组分为 3 个表达谱 1~3. 亚组 1 的 24 个基因在旱稻(处理 1)中比水稻(处理 2)中上调得早. 这些基因可能在稻作抗旱性中起着重要作用. 亚组 2(30 个基因, 在两个处理上调)和 3(13 个基因, 仅在处理 1 上调)中的基因表达在水稻和旱稻中共调控.

第 3 组中基因的表达在 3 个旱稻(处理 1)中比 3 个水稻(处理 2)中下调早.

旱稻品种旱稻 297 从水稻和旱稻杂交后代选育而来. 它的转录本有时与旱稻(毫格劳和 IRAT109)一致, 如第 1 和 2 组的基因, 有时又与水稻一致, 如第

3 组的基因. 这表明在旱稻或水稻中基因表达的特异共性, 这种共性在水稻和旱稻二者中不同. 因此, 第 1 和 2 组中的基因称为旱稻特异表达基因(57 个基因), 第 3 组中的基因称为水稻特异表达基因(38 个基因).

2.3 水稻和旱稻基因型对干旱胁迫应答的差异和共性

90%以上基因的转录本表达在 2 个稻作基因型中不受干旱胁迫影响, 少于 1%的稻作转录本在水稻和旱稻之间差异表达. 8%以上的基因在水稻和旱稻中均对干旱胁迫应答. 本研究中的差异表达基因表明干旱胁迫条件下水稻和旱稻之间的基因表达既有差异又有共性(图 1).

相对少的水稻和旱稻之间可见差异表达基因已全部测序. 旱稻特异表达基因的数目(57)多于水稻特异表达基因(38), 尤其是第 1 组中基因数(35)是第 2 组基因数(14)的 2.5 倍. 胁迫与非胁迫之间的差异表达基因占优势, 这些基因中只选择了显著的差异基因(第 1 组中 67 个上调基因, 第 2 组中 24 个下调基因)

表 2 cDNA-AFLP 分析差异表达基因的表达谱

组 ^{a)}	亚组	泳道																	
		A ₀	A ₁	A ₂	B ₀	B ₁	B ₂	C ₀	C ₁	C ₂	D ₀	D ₁	D ₂	E ₀	E ₁	E ₂	F ₀	F ₁	F ₂
(35)	1 (20)	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
	2 (8)		+			+			+										
	3 (4)		+	+		+	+		+	+									
	4 (3)	+			+			+											
(22)	1 (10)				+	+	+	+	+	+									
	2 (2)					+			+										
	3 (5)					+	+		+	+									
	4 (5)				+	+		+	+										
(13)	1 (9)										+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2 (1)											+			+			+	
	3 (3)										+	+		+	+		+	+	
(25)	1(23)	+	+	+							+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2 (2)	+	+								+	+		+	+		+	+	
(67)	1 (24)		+	+		+	+		+	+			+			+			+
	2 (30)		+	+		+	+		+	+		+	+		+	+		+	+
	3 (13)		+			+			+			+			+			+	
(24)		+			+			+			+	+		+	+		+	+	

a) 第 1 组, 在 3 个旱稻中特异表达而在 3 个水稻中不表达的基因; 第 2 组, 在毫格劳和 IRAT109 中特异表达而在其他 4 个品种中不表达的基因; 第 3 组, 在 3 个水稻中特异表达而在 3 个旱稻中不表达的基因; 第 4 组, 在旱稻 297 和 3 个水稻中特异表达而在其他 2 个旱稻中不表达的基因; 第 5 组在水稻和旱稻中均为干旱胁迫上调的基因; 第 6 组, 在水稻和旱稻中均为干旱胁迫下调的基因. 第 7~9 组, “+”, 表达清晰; “空白”, 表达不可见. 第 10 和 11 组: “+”, 表达上调, “空白”, 表达低. A~C 表示 3 个旱稻品种, 分别为旱稻 297, 毫格劳和 IRAT109; D~F 表示 3 个水稻品种, 分别为中作 93, 越父和日本晴; 0 泳道为对照(非胁迫), 1 和 2 分别为 72 和 96 h 干旱胁迫. 括号中的数字表示基因数目

图 1 6 组差异表达基因表明水稻和旱稻之间基因表达具有差异和共性

UR-SE, 旱稻特异表达基因(第 1 和 2 组); LR-SE: 水稻特异表达基因(第 1 和 2 组); UL-GU: 水稻和旱稻干旱胁迫条件下均上调的基因(第 3 组); UL-GD: 水稻和旱稻干旱胁迫条件下均下调的基因(第 4 组). 括号中的数字表示基因数目

进一步分析. 然而, 第 3 组 67 个基因中有 24 个基因在旱稻比水稻上调较早, 第 4 组 24 个基因在旱稻比水稻下调较早.

旱稻特异表达基因当中, 30 个基因(亚组 1 中 20 个, 亚组 2 中 10 个, 表 2) 在干旱胁迫和非胁迫条件下表达; 而水稻有 32 个这样的特异表达基因(亚组 1 中 9 个, 亚组 2 中 23 个, 表 2). 这些基因的表达仅在旱稻或只在水稻中可见, 这暗示它们是在旱稻或水稻中特异表达的, 水稻和旱稻基因表达具有特异性. 19 个基因(亚组 2 中 12 个, 亚组 2 和 3 中 7 个)在旱稻中上调, 8 个基因(亚组 4 中 3 个, 亚组 4 中 5 个)在旱稻中下调, 但这些基因在水稻中不可见. 在水稻中仅有 1 个基因(亚组 2)上调, 5 个基因下调(亚组 3 中 3 个, 亚组 2 中 2 个), 但这些基因在旱稻中不可见. 结果表明旱稻比水稻有更强的调控机制.

在干旱应答基因当中, 一般旱稻中上调的基因在水稻中也上调, 旱稻中下调的基因在水稻中也下调, 这些基因的表达谱在 3 个旱稻品种或在 3 个水稻品种是一致的. 这表明水稻和旱稻之间有共同的干旱应答调控机制. 旱稻中上调基因的表达水平也高于水稻, 这可能一定程度上解释了旱稻比水稻更强的抗旱性. 一些基因在旱稻中上调较早, 下调的基因倾向于在旱稻中下调较早. 结果表明, 旱稻对干旱胁迫的转录本应答比水稻更迅速, 这些更迅速的调控机制是旱稻对干旱胁迫较早应答的基础.

2.4 水稻和旱稻差异表达基因的功能分析

通过在公共数据库中 BLAST 比对对每一组差异表达基因进行功能注释(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 并根据 MAtDB (<http://mips.gsf.de/projects/funcat/>)的功能分类将这些基因进行分类(表 3~5 及网络版附录 2).

在旱稻特异表达基因中(表 3, UR-SE), 57 个基因中的 28 个基因比对到 9 个分类中, 而 28 个转录本为未知功能或没有注释, 1 个为未分类的. 在水稻特异表达基因中(表 4, LR-SE), 38 个基因中的 21 个基因比对到 9 个分类中, 而 16 个转录本为未知功能或没有注释, 1 个没有分类.

水稻和旱稻差异表达最大的功能分类是细胞防御和挽救类, 这类基因可能在抗旱性中起作用(表 5)^[2,43]. 旱稻中这类基因有 9 个, 包括 4 个热激蛋白和 5 个其他的胁迫诱导基因(网络版附录 2). 热激蛋白已公认在正常生长和胁迫应答条件下对一系列生理和细胞功能具有重要作用, 而不只是在热激条件下起作用^[44]. 这些基因在干旱胁迫条件下诱导表达可能在胁迫抗性中起作用. 然而, 在水稻中这样的基因不表达或是表达水平很低. 这些差异可能暗示旱稻比水稻更有效的胁迫应答机制.

旱稻中特异表达的信号转导分子包括受体激酶 (GE329436), 膜蛋白 (GE329536) 和蛋白激酶类 (GE329458), 而水稻中包含 CDPK2(GE329464)和两个转录因子. 这表明干旱抗性应答比干旱敏感应答涉及更上游的信号转导途径成员.

旱稻中蛋白质命运分类基因主要参与蛋白质周转或担当分子伴侣, 类似DnaK和DnaJ (clpA homolog CD4B, GE329559)^[45], 而水稻这一分类中特异表达基因主要参与在蛋白质降解中.

旱稻比水稻有更多的运输基因特异表达. 旱稻中的这类基因与生长、发育调控有关, 而水稻中的这类基因与适应性保护有关.

在代谢分类中, 旱稻特异表达基因包括 2 个参与在氨基酸代谢中的基因, 而水稻特异表达基因包括 4 个参与在碳水化合物代谢中的基因. PRS2 (GE329562) 参与在氨基酸代谢中, 催化PRPP (EC 2.7.6.1)的合成, PRPP是嘌呤、嘧啶、嘧啶核苷酸以及组氨酸和色氨酸的前提物^[46,47]; PRS为植物生长和发育所必需. 公认的次黄苷-尿苷偏爱核苷酸降解酶(GE329415)在水稻中干旱诱导, 但不在旱稻中, 可能参与在核苷酸水

表 3 cDNA-AFLP 鉴定旱稻特异表达而水稻不表达基因(旱稻特异表达基因, 第 和 组)

组	GenBank 登录号	GenBank 比对号	E 值	基因注释 ^{a)}	访问号(TIGR) ^{b)}	亚组
	GE329399	AK119255	0	热激蛋白 70	LOC_Os11g47760	1
	GE329433	AK119162	5.00×10^{-32}	公认的光系统 反应中心亚单位 , 叶绿体前提物(PSI-L) (PSI 亚单位)	LOC_Os12g23200	1
	GE329434	AK061956	4.00×10^{-35}	多聚泛素(RUBQ2)	LOC_Os02g06640	1
	GE329435	AK105453	6.00×10^{-78}	翻译控制的瘤蛋白类蛋白	LOC_Os11g43900	1
	GE329436	AK100447	4.00×10^{-94}	植物硫素 LRR 受体激酶	LOC_Os02g06190	1
	GE329440	AK103799	3.00×10^{-92}	N-氨基甲酰-氨基酸酰胺水解酶类蛋白	LOC_Os12g40550	1
	GE329441	AK065026	5.00×10^{-97}	未知蛋白	LOC_Os07g08290	1
	GE329461	AK121396	0	公认的减数分裂蛋白 mei2	LOC_Os02g48790	1
	GE329490	AP006452	1.00×10^{-81}	没有注释	LOC_Os02g42040	1
	GE329510	XM_473881	0	公认的肌球蛋白重链	LOC_Os04g52460	1
	GE329517	AP005298	4.00×10^{-94}	没有注释	LOC_Os06g24690	1
	GE329518	AP005483	9.00×10^{-45}	推测蛋白	LOC_Os09g14920	1
	GE329528	AP005460	2.00×10^{-80}	推测蛋白	LOC_Os01g36350	1
	GE329536	AK106877	1.00×10^{-62}	公认的膜蛋白	LOC_Os10g11860	1
	GE329559	AK066153	0	公认的 ATP-依赖 Clp 蛋白酶 ATP-结合亚 单位 clpA 同源物 CD4B, 叶绿体前提物	LOC_Os12g12850	1
	GE329562	AK068485	7.00×10^{-96}	磷酸核糖焦磷酸酶 2	LOC_Os06g41360	1
	GE329575	AP005881	0	公认的反转录酶家族蛋白	LOC_Os09g17410	1
	GE329579	AL606630	5.00×10^{-75}	没有注释	LOC_Os05g27990	1
	GE329583	AK108103	3.00×10^{-29}	没有注释	LOC_Os03g47270	1
	GE329584	AACV01020293	3.00×10^{-54}	没有注释	LOC_Os07g11800	1
	GE329403	AK100676	0	公认的热激蛋白	LOC_Os01g08560	2
	GE329429	AK120655	0	低分子量热激蛋白 Oshsp17.7	LOC_Os03g16040	2
	GE329457	NM_195614	0	公认的聚蛋白	LOC_Os01g63120	2
	GE329458	AL713936	2.00×10^{-41}	蛋白激酶家族类	LOC_Os12g06670	2
	GE329462	AP005630	3.00×10^{-73}	没有注释	LOC_Os05g25790	2
	GE329465	AP005610	4.00×10^{-29}	没有注释	LOC_Os01g25386	2
	GE329466	AK109474	3.00×10^{-73}	热激蛋白 70	LOC_Os03g16860	2
	GE329540	AK100844	1.00×10^{-78}	FK506-结合蛋白	LOC_Os04g28420	2
	GE329454	AK062958	2.00×10^{-149}	公认的乙烯应答蛋白	LOC_Os02g52314	3
	GE329455	AP005770	3.00×10^{-83}	没有注释	LOC_Os02g23821	3
	GE329525	AK070914	2.00×10^{-99}	没有注释	LOC_Os01g32780	3
	GE329572	AL713908	4.00×10^{-154}	未知蛋白	LOC_Os12g37860	3
	GE329439	AAAA02003142	9.00×10^{-89}	没有注释	LOC_Os11g07260	4
	GE329524	AC119073	8.00×10^{-08}	没有注释	LOC_Os11g11550	4
	GE329546	AK067831	0	公认的 MtN19	LOC_Os08g42590	4
	GE329406	NM_195907	8.00×10^{-171}	公认的液泡分类受体蛋白	LOC_Os10g20630	1
	GE329421	AP003209	1.00×10^{-63}	没有注释	LOC_Os06g19130	1
	GE329424	AK063482	1.00×10^{-81}	公认的 DNA 甲基转移酶 DMT106	LOC_Os05g04330	1
	GE329449	AC145808	6.00×10^{-36}	没有注释	LOC_Os11g25800	1
	GE329450	AK121550	5.00×10^{-18}	没有注释	LOC_Os10g30600	1
	GE329481	CT854893	1.00×10^{-91}	没有注释	LOC_Os01g25280	1
	GE329492	AK065234	8.00×10^{-109}	没有注释	LOC_Os01g47460	1
	GE329495	AP004666	2.00×10^{-115}	推测的蛋白	LOC_Os01g11360	1
	GE329541	AP004559	8.00×10^{-40}	没有注释	LOC_Os01g07382	1
	GE329577	AK120350	3.00×10^{-52}	金属硫蛋白类蛋白(ML2)	LOC_Os08g15149	1
	GE329420	XM_475339	0	公认的聚蛋白	LOC_Os05g37230	2
	GE329438	AP003992	1.00×10^{-43}	没有注释	LOC_Os02g07880	2
	GE329473	XM_478702	2.00×10^{-146}	单糖运输子 6 (MST6)	LOC_Os07g37320	3
	GE329494	AL837527	2.00×10^{-69}	未知蛋白	LOC_Os07g42354	3

续表 3

组	GenBank 登录号	GenBank 比对号	E 值	基因注释 ^{a)}	访问号(TIGR) ^{b)}	亚组
	GE329552	AF009412	3.00×10^{-54}	稻作质体蓝素前提物	LOC_Os06g01210	3
	GE329558	AK103708	1.00×10^{-47}	公认的栎精 3-O-葡萄糖苷-6"-O-丙二酰转移酶	LOC_Os02g28170	3
	GE329567	AK065291	0	没有注释	LOC_Os01g52304	3
	GE329463	AK106715	7.00×10^{-12}	公认的细菌疫病抗性蛋白 Xa1	LOC_Os11g29520	4
	GE329471	AK111644	0	公认的氨基乙酸脱氢酶	LOC_Os01g51410	4
	GE329531	AC133860	3.00×10^{-92}	没有注释	LOC_Os06g20440	4
	GE329534	AP003270	7.00×10^{-61}	没有注释		4
	GE329402	AK106470	1.00×10^{-126}	未知蛋白	LOC_Os02g48130	4

a) 根据最好的 BLAST 匹配对相应的转录本注释; b) TIGR 数据库访问号; “没有注释”意为与没有注释的现有序列同源

表 4 cDNA-AFLP 鉴定水稻特异表达而旱稻不表达基因(水稻特异表达基因, 第 和 组)

组	GenBank 登录号	GenBank 比对号	E 值	基因注释 ^{a)}	访问号(TIGR) ^{b)}	亚组
	GE329400	AC145775	3.00×10^{-98}	公认的聚蛋白	LOC_Os11g43290	1
	GE329427	XM_471249	4.00×10^{-88}	公认的 gag-pol 前提物	LOC_Os08g27320	1
	GE329464	AP005292	1.00×10^{-50}	公认的钙依赖蛋白激酶 2(CDPK2)	LOC_Os07g44710	1
	GE329484	AP003232	0	公认的聚蛋白	LOC_Os01g58920	1
	GE329497	AC113433	4.00×10^{-164}	推测蛋白类似 Ulp1 蛋白酶类蛋白	LOC_Os03g29710	1
	GE329529	AP004776	7.00×10^{-156}	公认的聚蛋白	LOC_Os12g20470	1
	GE329578	AK104371	1.00×10^{-95}	公认的天冬氨酸蛋白酶 oryzasin 1 前提物	LOC_Os01g18630	1
	GE329580	AC104278	8.00×10^{-80}	没有注释	LOC_Os05g46830	1
	GE329581	AC150654	1.00×10^{-78}	没有注释		1
	GE329415	AK070068	0	公认的次黄苷-尿苷偏爱核苷酸降解酶	LOC_Os05g33630	2
	GE329452	AP004666	4.00×10^{-47}	没有注释	LOC_Os11g47460	3
	GE329472	XM_471198	1.00×10^{-113}	公认的反转录酶家族蛋白	LOC_Os08g24570	3
	GE329544	AC158405	1.00×10^{-43}	公认的 ABC 运输子家族蛋白	LOC_Os09g03939	3
	GE329401	AP006236	5.00×10^{-88}	没有注释	LOC_Os04g17890	1
	GE329404	AK067434	3.00×10^{-148}	公认的含有 KOW 结构域转录因子家族蛋白	LOC_Os05g43060	1
	GE329405	AC135498	5.00×10^{-144}	未知蛋白	LOC_Os11g16840	1
	GE329407	AK099646	3.00×10^{-167}	NADP 依赖苹果酸酶(NADP-ME2)	LOC_Os01g52500	1
	GE329408	XM_472085	1.00×10^{-141}	推测蛋白类似转座子蛋白	LOC_Os02g25800	1
	GE329417	NM_189274	3.00×10^{-59}	没有注释	LOC_Os04g17890	1
	GE329468	AK069538	2.00×10^{-62}	公认的 lin-10 蛋白同源物	LOC_Os06g49990	1
	GE329498	AL732639	1.00×10^{-40}	没有注释	LOC_Os12g28720	1
	GE329502	NM_189274	1.00×10^{-28}	没有注释	LOC_Os04g17890	1
	GE329503	AP003871	6.00×10^{-39}	没有注释		1
	GE329512	AK066269	1.00×10^{-41}	公认的 UDP-葡萄糖 4-表异构酶(UGE-2)	LOC_Os08g28730	1
	GE329513	XM_476173	3.00×10^{-82}	公认的熊果苷合酶	LOC_Os05g12450	1
	GE329519	AAAA02006912	4.00×10^{-14}	没有注释	LOC_Os01g04260	1
	GE329532	AK099016	2.00×10^{-24}	公认的三角状五肽(PPR)重复含有蛋白	LOC_Os08g09270	1
	GE329533	AP005839	4.00×10^{-53}	公认的转座酶家族蛋白	LOC_Os11g17970	1
	GE329539	AK102865	2.00×10^{-20}	没有注释	LOC_Os03g02840	1
	GE329547	AC128647	3.00×10^{-98}	公认的 KAP-2	LOC_Os03g63910	1
	GE329550	AL606620	1.00×10^{-69}	细胞壁转化酵素 3	LOC_Os04g33720	1
	GE329553	BX890594	1.00×10^{-75}	没有注释	LOC_Os04g17890	1
	GE329555	AK120203	1.00×10^{-72}	公认的叶蛋白	LOC_Os10g35760	1
	GE329568	AK103348	2.00×10^{-118}	未知蛋白类似 3'核糖核酸外切酶	LOC_Os01g17279	1
	GE329569	AC069300	2.00×10^{-93}	没有注释	LOC_Os12g18700	1
	GE329571	AY360388	1.00×10^{-97}	没有注释	LOC_Os04g17890	1
	GE329487	XM_471503	2.00×10^{-38}	公认的 TNF2 类转座蛋白	LOC_Os09g18130	2
	GE329551	AK058962	1.00×10^{-65}	未知蛋白	LOC_Os12g36800	2

a), b) 同表 3

表 5 各组差异表达基因不同功能组的克隆数

功能分类	UR-SE			LR-SE			UL-GU			UL-GD
			合计			合计	1	2~3	合计	VI
细胞挽救和防御	6	3	9					5	5	2
信号转导	3		3	1		1		3	3	2
转录					2	2	1	3	4	
蛋白质命运	2	1	3	1		1		2	2	1
运输	3	2	5	1	1	2		2	2	1
蛋白质活性调控										1
氨基酸代谢		2	2				2	1	3	4
C-化合物和糖类代谢					4	4	2	1	3	3
脂质、脂肪酸和类异戊二烯代谢							1	1	2	
核苷酸代谢	1		1	1		1		1	1	1
次生代谢								2	2	1
能量	1		1				1	4	5	3
细胞周期和 DNA 加工	1		1		1	1		1	1	
储存蛋白					2	2				
转座子、病毒和质粒蛋白	2	1	3	5	2	7		1	1	1
其他	1		1		1	1	1		1	
未知	15	13	28	4	12	16	16	16	32	4
总数	35	22	57	13	25	38	24	43	67	24

a) “其他”表明已知基因但不属于以上功能组; b) “未知”意思是同未知、推测蛋白或没有注释序列同源

解中。这表明旱稻可能通过维持生长必需物质增加了干旱条件下的存活能力和抗旱性，而水稻只是对干旱适应性和被动的应答。

Anderson和Hanson^[48]研究表明，拟南芥Mei2 同源物AML1 结合AtRaptor1B，它是真核细胞生长的一个主要调控子。旱稻的mei2 (GE329461)基因在分类上属于细胞周期和DNA加工一类，可能在干旱胁迫和正常生长条件下调控旱稻生长。在水稻中特异表达的核苷酸内切酶(GE329568)可能参与在DNA降解中。在旱稻中特异表达的光系统 反应中心亚单位 (PSI-L) (GE329433)参与在光合作用中^[49]，可能暗示同水稻相比，旱稻在干旱胁迫条件下有更稳定的光合能力。

2.5 两个水稻基因型干旱胁迫调控基因的功能预测

鉴定了 67 个水稻和旱稻共有干旱胁迫诱导基因(网络版附录 3, 第 组), 其中 24 个基因在旱稻比水稻诱导早。35 个已知基因分为 13 个功能组(表 5 和网络版附录 2)。11 个基因属于代谢类, 其中 3 个与氨基酸代谢相关, 表明干旱胁迫大大影响了氨基酸代谢。5 个基因属于细胞挽救和防御类, 7 个属于调控基因(3 个信号转导类, 4 个转录类), 这些基因可能分别调控植物干旱胁迫抗性和基因表达。属于蛋白质命运的两

个基因可能促进干旱条件下蛋白质的周转, 5 个属于能量分类基因。较早诱导的 24 个基因分别属于代谢、能量、转录因子类, 还有 16 个未知基因(表 5, V1)。43 个干旱诱导基因在水稻和旱稻中共调控(表 5, V2 和 3)。本研究也鉴定了一些公认的干旱诱导基因, 如细胞色素P450 (GE329573)、蛋白磷脂酶 2C (GE329561)、ERD1 (GE329426)和WRKY38 (GE329538)^[2,50]。WRKY转录因子(GE329538)在旱稻中比在水稻中诱导得早; 已报道Hv-WRKY38 以ABA不依赖方式参与冷和干旱胁迫应答, 因此可能在非生物胁迫应答中起着调控作用^[50]。同WRKY38 相比, 蛋白磷酸酯酶 2C (GE329561)以ABA依赖的方式增加^[51,52]。这表明干旱应答基因表达中存在ABA依赖和不依赖信号转导级联途径。OsRSH3 (GE329413)和硫氧还蛋白h (GE329423)分别扩增、克隆和测序 7 次, 产生相似表达谱和完全一致序列, 因此表明结果的可靠性和它们在干旱应答中较高的转录本丰度。OsRSH3 与At-RSH 1 同源, At-RSH 1 与拟南芥合成(p)ppGpp有关(pppGpp是细菌严紧应答的一个效应子核苷酸)。据此可推论At-RSH基因可能调控快速的植物(p)ppGpp介导的对病原和其他胁迫的应答^[53]。该研究中OsRSH3 的高表达可能表明它在干旱应答中的重要性。硫氧

还蛋白h是一个抗氧化剂^[54-56]，它在干旱和光氧化条件下的诱导^[57,58]表明它在抗氧化损害中的重要作用。这里，一个高表达的硫氧还蛋白h (GE329423)可能消除干旱胁迫产生的活性氧。甘油-3-磷酸脱氢酶(GE329416)和乙二醛酶 (GE329570)可能分别在消除过氧化氢(H₂O₂) (EC 1.11.1.7)和解毒(EC 3.1.2.6)中起作用。植物对干旱胁迫的应答中，一些基因参与呼吸和电子运输如NADH：泛醌氧化还原酶类蛋白(GE329437)，*xd1* 基因(GE329491)、氨氧化酶(GE329418)和硫氧还蛋白h (GE329423)，表明植物遭受胁迫条件时增强呼吸以产生必需的能量。这一组中有32个未知基因。例如GE329414，这个转录本在GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中不能比对已知基因，但在水稻TIGR 数据库(<http://blast.jcvi.org/>)中同一个F-box 家族蛋白(LOC_Os04g48270)同源。F-box蛋白是SCF(Skp1/Cullin或CDC53/F-box protein) E3泛素连接酶的一个亚单位^[59]，已表明在植物生长发育^[60,61]和胁迫应答^[62]中起着关键作用。因此，对这些未知基因的研究可能发现干旱胁迫应答的重要基因。

在下调基因当中(网络版附录 4; 表 5, 第 组), 有 4 个氨基酸代谢基因和 3 个碳水化合物代谢基因(网络版附录 2)。与光合作用相关的基因下调，如二磷酸核酮糖羧化小亚基(GE329445)和光系统 10K 蛋白(GE329515)(网络版附录 4)。这些结果与先前的报道一致，表明水分胁迫抑制了光合作用^[2,3,5,63]。蛋白激酶C抑制子在这一组中出现可能刺激了蛋白激酶C，因此激活了相关信号级联途径。

2.6 cDNA-AFLP 数据的可靠性

本研究中旱稻特异表达基因和水稻特异表达基因分别在旱稻和水稻的不同品种中展示了相似的表达谱，如第 I 组中的 35 个基因和第 组中的 13 个基因。水稻和旱稻干旱诱导基因在 6 个品种中展示了相似的表达谱，如亚组 V2 和 3 中的 43 个基因。旱稻比水稻分别上调和下调早的基因在 3 个旱稻或 3 个水稻品种中有相似的表达谱，如亚组 1 中的 24 个基因和第 组中的 24 个基因。另外 186 个单一差异转录本中的 32 个(在不同组中)分别扩增、克隆和测序至少两次，产生了一致的表达谱和序列(数据未显示)。

为进一步评价 cDNA-AFLP 结果的可靠性，10 个基因的表达谱用实时 PCR 验证。验证了第 组中的 4 个基因(GE329399, GE329403, GE329510, GE329562)和第 组中的 6 个基因(GE329413, GE329418,

GE329422, GE329423, GE329538, GE329573)，结果显示的谱带与 cDNA-AFLP 实验高度一致(图 2)。

3 讨论

3.1 本研究干旱胁迫处理和水稻和旱稻基因表达比较

为阐明植物抗旱性机制，许多研究通过比较胁迫处理和非处理植株以鉴定水分胁迫应答基因^[1-5]。然而，这些材料生长在发芽介质琼脂上^[1,2]或是液培条件下^[17,30,43]，用PEG处理^[30,43]或直接暴露于空气中^[2,3,17]代替干旱处理。这样的生长条件和干旱胁迫不同于大田条件。因此这些结果可能没有完全反应大田条件下基因表达的真正变化。另外，大量的干旱应答基因很令人困惑。水稻和旱稻具有不同的抗旱性，比较它们干旱条件下的基因表达有可能阐明植物抗旱机制。水稻和旱稻差异基因表达已有一些研究。干旱条件下，抗性品种上调基因的转录本水平高于敏感性品种^[16]。水分缺乏条件下旱稻比水稻展示了更高的表达^[29]。尽管Wang等人^[30]比较了水稻和旱稻基因表达，但这些基因来自一个旱稻的PEG诱导cDNA文库。因此这些结果不能展示所有旱稻基因的表达谱，尤其不包括任何水稻基因。

本研究采用cDNA-AFLP技术比较了具有不同抗旱性的两个稻作基因型全基因组的转录本表达谱。当前，芯片技术已用作基因表达分析^[2,8,17,35]，然而，该技术依赖点在芯片上的基因或序列不能区分同源基因。同芯片相比cDNA-AFLP首要的优势是不需要预先了解DNA序列信息，容易检测新的转录本。该方法对于区分同源基因以及克服芯片研究中植物基因冗余引起的问题尤其有用^[32,64]。研究表明一些转录本用cDNA-AFLP技术容易检测而在芯片实验中没有明显表达^[32]。本研究鉴定了许多同水稻基因组DNA同源的未知序列，不能明确的与任何已知的ORF相联系。这些片段可能是先前没有鉴定的ORFs或很可能来源于5'或3'非编码序列。对这些未知序列的研究可能促进稻作抗旱性机制的理解。

本研究意在鉴定水稻和旱稻差异表达基因，以及二者中的干旱调控基因。稻作植株持续断水进行干旱胁迫类似于大田干旱条件。使用3个旱稻品种和3个水稻品种以增加结果的可靠性和鉴定水稻和旱稻差异调控机制。同全基因组表达基因相比只发现了几个旱稻特异表达基因和水稻特异表达基因，这表明水稻和旱稻有不同的抗旱性机制。一大批干旱应

图 2 对独立的生物学样品采用实时 PCR (b)和 cDNA-AFLP (a)分析验证表达谱

(a) A~C, 旱稻品种, 分别为旱稻 297, 毫格劳和 IRAT109; D~F, 水稻品种, 分别为中作 93, 越父, 日本晴. (b) 横坐标, 干旱胁迫; 纵坐标, 基因表达水平. 0, 对照, 1 和 2 分别为 72 和 96 h 干旱胁迫. 对 0, 72, 96 h 干旱胁迫处理的 3 个旱稻和 3 个水稻叶 cDNAs 进行实时 PCR (a)分析. 共分析了 10 个基因: GE329399, 热激蛋白 70 基因; GE329403, 公认热激蛋白基因; GE329510, 公认的肌球蛋白重链基因; GE329562, 磷酸核糖焦磷酸合酶 2 基因; GE329418, 公认的氨氧化酶基因; GE329422, 公认的延胡索酰乙酰胺乙酸水解酶基因; GE329538, WRKY 转录因子基因; GE329413, OsRSH3 基因; GE329423, 硫氧还蛋白 h 基因; GE329573, 公认的细胞色素 P450 基因. 特定的寡核苷酸引物用来检测转录本水平. 网络版附录 1 列出了引物序列. cDNA-AFLP 分析(a)与实时 PCR(b)所用材料处理相同

答基因在二者中共调控, 这暗示水稻和旱稻有共同的抗旱性分子机制. 两个基因型基因表达的时间选择不同, 可能是由于调控上的微小差异, 而这种微小差异诱导了较大的抗性或敏感性^[65]. 3 个旱稻的基因表达谱展示了共性, 不同于 3 个水稻品种展示的共性. 这表明旱稻可能有共同的干旱抗性分子机制, 而水稻有共同的干旱敏感分子机制. 旱稻 297 有时应答更类似水稻, 可能反应了它来自水旱稻后代. 这些结果说明我们的cDNA-AFLP分析在鉴定差异表达基因方面是有很有效的. 尽管克隆了几乎所有水稻和旱稻差异可见基因, 仍然有一些这样的基因没有克隆, 因为技术困难, 如凝胶上很高的背景, 很高的谱带密度, 弱的基因表达. 本研究旨在获得控制干旱抗性和应答的重要差异表达基因, 所得结果将会对水稻和旱

稻抗旱性分子机制有一个新的了解.

3.2 旱稻干旱应答调控可能比水稻更迅速

干旱应答基因当中, 一些基因在旱稻中上调或下调较水稻早, 表明抗性系可能通过更迅速的应答获得了更有效的抗性. 相似的结果在水稻盐耐性系 (Pakkali)和盐敏感系 (IR29)中也观察到^[66]. 本研究中许多基因在 96 h处理后在两个稻作基因型中仍然上调, 表明该胁迫条件是适当的, 而不是致死的.

旱稻对干旱胁迫较早的应答可能是因为有更迅速的调控机制. 至少有 4 个独立的干旱胁迫应答基因表达的调控系统: 2 个是ABA依赖的, 2 个是ABA不依赖的^[67-69]. 我们鉴定的应答基因谱, 如蛋白磷酸酯酶 2C (ABA-依赖, GE329561)^[2], wrky38 (ABA-不依赖, GE329538)^[50]和ERD1 (ABA-不依赖, GE329426)^[70]

等的各种表达谱进一步支持了这一结论。

24 个在两个稻作基因型中具有时间表达差异的诱导基因(网络版附录 3, 亚组 1)被鉴定。胁迫诱导基因的启动子区含有参与胁迫应答基因表达的顺式作用因子。顺式因子与其转录因子之间的相互作用作为转录起始的分子开关起作用。因此比较水稻和旱稻胁迫应答基因启动子区的顺式因子对于阐明其不同的抗旱性调控机制是很重要的。两个主要的顺式因子, ABRE 和 DRE/CRT, 分别在 ABA- 依赖和 ABA-不依赖基因表达途径中起作用^[8,71]。在干旱应答基因中, 鉴定了一个 WRKY 转录因子(GE329538), 与先前报道的一个以 ABA-不依赖方式干旱诱导的基因高度同源^[50]。植物 WRKY 蛋白识别 W-box 因子具有 TGAC 中心序列, 该序列出现在许多防御相关基因的启动子中^[72]。NPR1, 编码拟南芥防御应答的一个关键调控子, 为 WRKY 因子所控制^[73]。我们鉴定的这个 WRKY 转录因子可能是这一应答的一个关键调控子。它以 ABA-不依赖方式快速诱导表明旱稻中这一信号转导途径迅速调控机制的存在。

这些结果表明旱稻中 ABA-依赖和 ABA-不依赖途径均有比水稻更迅速的调控机制。研究两个稻作基因型干旱条件下不同时间表达的基因有助于进一步理解这一过程。

3.3 旱稻可能比水稻有更强的生长发育调控能力

本研究发现几个在干旱和非胁迫条件下均表达的旱稻特异表达基因与生长发育相关, 包括 5 个调控基因, 植物硫素 LRR 受体激酶基因(GE329436)^[74-76], RUBQ2 基因(GE329434)^[77,78], TCTP 基因(GE329435)^[79,80], 肌球蛋白重链基因(GE329510)^[81-83], mei2 基因(GE329461)^[48]以及 2 个与生长发育必需物质生物合成相关基因, N-氨基甲酰-氨基酸酰胺水解酶类蛋白基因(GE329440) (EC3.5.1.6)和 PRS2 基因(GE329562) (EC 2.7.6.1)。这表明同水稻相比旱稻在干旱胁迫条件下有更强的生长发育调控能力。干旱胁迫严重影响了植物生长发育^[84]。干旱胁迫条件下旱稻比水稻显示了更好的生长、抗旱性和水分供给的生理指标^[24-27]。这支持了我们的基因表达结果。

3.4 热激蛋白在抗旱性中的重要性

本研究中 4 个热激蛋白(Hsps)在干旱胁迫条件下在旱稻中特异表达在水稻中不表达。许多胁迫因子能够诱导 Hsps 表达如干旱、冷、紫外线而不仅仅是热

胁迫^[85]。Hsps 在胁迫条件下主要在下列方面起作用: ( ) 作为分子伴侣维持原始蛋白结构稳定性^[86]; ( ) 维持生物膜结构稳定性^[87]; ( ) 作为抗氧化剂消除过剩的活性氧(ROS)^[88,89]。当植物处于干旱胁迫时, 蛋白质变性失去功能, 细胞中的 ROS 水平大大增加导致了氧化胁迫, 损伤了细胞成分如核酸、蛋白质、碳水化合物、脂质等^[90,91]。因此, 干旱胁迫条件下特异表达的 Hsps 可能在抗旱性中起着重要作用。Cho 和 Hong^[92]证实了 HSP70 与植物抗旱性密切相关。近来, Hsps 在植物中的超表达增强了植物胁迫抗性包括水分胁迫抗性^[92-95]。本研究的 Hsps 超表达或将促进这些 Hsps 高表达的相关基因导入作物可能改善作物抗旱性。

3.5 旱稻比水稻抗旱性更强的分子机制

该研究表明水稻和旱稻抗旱性分子机制既有共性又有差异。根据水稻和旱稻差异表达基因分析了旱稻比水稻更强抗旱性的分子机制(图 3)。第一, 细胞挽救和防御基因如 4 个热激蛋白在旱稻中特异表达, 而水稻中没有这样的基因。这可能是旱稻比水稻更强抗旱性的一个原因。第二, 水稻和旱稻可能有各自独立的基因调控基因表达。旱稻中的基因比水稻中的涉及更上游的信号转导成员, 这使得旱稻可能传递胁迫信号更迅速。第三, 核苷酸和氨基酸生物合成基因, 如 PRS2 和 N-氨基甲酰-氨基酸酰胺水解酶类蛋白基因(GE329440)在足水和干旱条件下在旱稻中特异表达而在水稻中不可见。干旱条件下这些生长必需物质的合成受到限制。这表明干旱条件下旱稻能够有一定程度的生长。水稻中特异表达的蛋白酶和核苷酸水解酶可能降解了蛋白质和核苷酸而限制了植物生长。第四, 几个生长发育调控基因, 如 RUBQ2 基因、mei2 基因、TCTP 基因、植物硫素 LRR 受体激酶和肌球蛋白重链, 可能使得旱稻在干旱条件下能够维持生长和存活。第五, 光系统 反应中心亚单位 (PSI-L)与 PsaL 基因同源 (该基因已报道被光诱导^[49]), 在旱稻中特异表达, 表明叶绿体组分和光合能力可能在水旱稻之间不同。研究表明黑小麦中干旱抗性基因型的光合装置的活性高于干旱敏感基因型^[41], 这支持了我们的研究结果。最后, 旱稻比水稻有更迅速的干旱应答机制, 旱稻部分基因诱导较早, 如胺氧化酶基因(GE329418)和 WRKY 因子基因(GE329538), 而下调基因也比水稻早, 因此旱稻比水稻能更迅速地达到代谢平衡。

图3 干旱条件下旱稻比水稻抗旱和生长更好的分子机制

致谢 感谢悉尼大学的 Robert A McIntosh 教授对论文写作关键的评阅和修正。感谢王道文研究员、高飞博士、阳文龙博士、刘冬成博士(中国科学院遗传与发育生物学研究所)和张娟博士(Donald Danforth 植物科学中心, St Louis, MO, USA)有价值的评阅和建议。

参考文献

- 1 Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 2001, 13: 61—72
- 2 Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*, 2002, 31: 279—292[DOI]
- 3 Ozturk Z N, Talamé V, Deyholos M, et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol*, 2002, 48: 551—573[DOI]
- 4 Rabbani M A, Maruyama K, Abe H, et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1755—1767[DOI]
- 5 Rizhsky L, Liang H J, Shuman J, et al. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1683—1696[DOI]
- 6 Bray E A. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 48—54[DOI]
- 7 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 217—223
- 8 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 410—417[DOI]
- 9 Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*, 2004, 55: 225—236
- 10 Valliyodan B, Nguyen H T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 189—195[DOI]
- 11 Islam M A, Du H, Ning J, et al. Characterization of Glossy1-homologous genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance. *Plant Mol Biol*, 2009, 70: 443—456, doi:10.1007/s11103-009-9483-0[DOI]
- 12 Karaba A, Dixit S, Greco R, et al. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15270—15275[DOI]
- 13 Cai H, Zhou Y, Xiao J, et al. Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 527—537[DOI]

- 14 Zheng X, Chen B, Lu G, et al. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379: 985—989[DOI]
- 15 Hazen S P, Pathan M S, Sanchez A, et al. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Funct Integr Genomics*, 2005, 5: 104—116[DOI]
- 16 Rodríguez M, Canales E, Borroto C J, et al. Identification of genes induced upon water-deficit stress in a drought-tolerant rice cultivar. *J Plant Physiol*, 2006, 163: 577—584[DOI]
- 17 Zhou J, Wang X, Jiao Y, 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[DOI]
- 18 Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, et al. The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 1997, 88: 57—63[DOI]
- 19 Yadav R, Courtois B, Huang N, et al. Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a doubled-haploid population of rice. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 619—632[DOI]
- 20 Qu Y, Mu P, Zhang H, et al. Mapping QTLs of root morphological traits at different growth stages in rice. *Genetica*, 2008, 133: 187—200
- 21 Zheng B, Yang L, Mao C, et al. Comparison of QTLs for rice seedling morphology under different water supply conditions. *J Genet Genomics*, 2008, 35: 473—484[DOI]
- 22 Yue B, Xue W, Luo L, et al. Identification of quantitative trait loci for four morphologic traits under water stress in rice (*Oryza sativa* L.). *J Genet Genomics*, 2008, 35: 569—575[DOI]
- 23 Nguyen T T, Klueva N, Chamareck V, et al. Saturation mapping of QTL regions and identification of putative candidate genes for drought tolerance in rice. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272: 35—46
- 24 Mu P, Li Z C, Li C P, et al. QTL mapping of the root traits and their correlation analysis with drought resistance using DH lines from paddy and upland rice cross. *Chinese Sci Bull*, 2003, 48: 1—7
- 25 Yue B, Xiong L Z, Xue W Y, et al. Genetic analysis for drought resistance of rice at reproductive stage in field with different types of soil. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1127—1136[DOI]
- 26 Yue B, Xue W Y, Xiong L Z, et al. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: Separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics*, 2006, 172: 1213—1228
- 27 Yu S, Chen T, Liu C. Comparative studies on the physiology of lowland and upland rice I. On the water relation and drought resistance of lowland rice “Lao Lai Ching” and upland rice “Nang Ton Xao”. *J Integr Plant Biol*, 1958, VII: 187—201
- 28 Lian H L, Yu X, Ye Q, et al. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 481—489[DOI]
- 29 Lian H L, Yu X, Lane D, et al. Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. *Cell Res*, 2006, 16: 651—660[DOI]
- 30 Wang H G, Zhang H L, Gao F H, et al. Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 1109—1126[DOI]
- 31 Bachem C W, Oomen R J, Visser R G. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, 16: 157—173[DOI]
- 32 Reijans M, Lascaris R, Groeneger A O, et al. Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*, 2003, 82: 606—618[DOI]
- 33 Yang L, Zheng B S, Mao C Z, et al. cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit. *Gene*, 2003, 314: 141—148[DOI]
- 34 Simoes-Araujo J L, Rodrigues R L, de A Gerhardt L B, et al. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules. *FEBS Lett*, 2002, 515: 44—50[DOI]
- 35 De Paepe A, Vuylsteke M, Van Hummelen P, et al. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2004, 39: 537—559[DOI]
- 36 Bove J, Lucas P, Godin B, et al. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol*, 2005, 57: 593—612[DOI]
- 37 Guo J, Jiang R H, Kamphuis L G, et al. A cDNA-AFLP based strategy to identify transcripts associated with avirulence in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol*, 2006, 43: 111—123[DOI]
- 38 Gao Y, Chen N Z, Xiong Y M, et al. Immunohistochemical localization for expansin in the root of upland rice and its expression analysis on the drought-resistance of upland rice (in Chinese). *Prog Natl Sci*, 2006, 16: 475—479
- 39 Zou Q. *Experimental Guides for Plant Physiology* (in Chinese). Beijing: China Agricultural Press, 2000
- 40 White D A, Beadle C L, Worledge D. Leaf water relations of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* and *E. nitens*: Seasonal, drought and species effects. *Tree Physiol*, 1996, 16: 469—476
- 41 Hura T, Hura K, Grzesiak S. Physiological and biochemical parameters for identification of QTLs controlling the winter triticale drought tolerance at the seedling stage. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47: 210—214[DOI]

- 42 Qu Y Y. Location and genetics analysis of the QTLs associated with drought resistance traits in lowland and upland rice. Doctor Dissertation. Beijing: China Agricultural University, 2007
- 43 Zheng J, Zhao J, Tao Y, et al. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA microarray. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 807—823
- 44 Grover A. Molecular biology of stress responses. *Cell Stress Chaperones*, 2002, 7: 1—5[DOI]
- 45 Wickner S, Gottesman S, Skowrya D, et al. A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 12218—12222[DOI]
- 46 Khorana H G, Fernandez J F, Kornberg A. Pyrophosphorylation of ribose-5-phosphate in the enzymatic synthesis of 5-phosphorylribose 1-pyrophosphate. *J Biol Chem*, 1958, 230: 941—948
- 47 Hove-Jensen B. Mutation in the phosphoribosylpyrophosphate synthetase gene (prs) that results in simultaneous requirements for purine and pyrimidine nucleosides, nicotinamide nucleotide, histidine and tryptophan in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1988, 170: 1148—1152
- 48 Anderson G H, Hanson M R. The *Arabidopsis* Mei2 homologue AML1 binds AtRaptor1B, the plant homologue of a major regulator of eukaryotic cell growth. *BMC Plant Biol*, 2005, 5: 2[DOI]
- 49 Okkels J S, Scheller H V, Svendsen I, et al. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an 18-kDa hydrophobic photosystem I subunit (PSI-L) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Biol Chem*, 1991, 266: 6767—6773
- 50 Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, et al. Hv-WRKY38: A new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 399—416[DOI]
- 51 Leung J, Bouvier-Durand M, Morris P C, et al. *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 1994, 264: 1448—1452[DOI]
- 52 Leung J, Merlot S, Giraudat J. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 1997, 9: 759—771
- 53 van der Biezen E A, Sun J, Coleman M J, et al. *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3747—3752[DOI]
- 54 Broin M, Cuiné S, Eymery F, et al. The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell*, 2002, 14: 1417—1432[DOI]
- 55 Serrato A J, Cejudo F J. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, 2003, 217: 392—399[DOI]
- 56 Huang D J, Chen H J, Hou W C, et al. Active recombinant thioredoxin h protein with antioxidant activities from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam Tainong 57) storage roots. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 4720—4724[DOI]
- 57 Rey P, Pruvot G, Becuwe N, et al. A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant J*, 1998, 13: 97—107[DOI]
- 58 Broin M, Cuiné S, Peltier G, et al. Involvement of CDSP32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Lett*, 2000, 467: 245—248[DOI]
- 59 Deshaies R J. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 435—467[DOI]
- 60 Moon J, Parry G, Estelle M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell*, 2004, 16: 3181—3195[DOI]
- 61 Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 555—590[DOI]
- 62 Zhang Y, Xu W, Li Z, et al. F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148: 2121—2133[DOI]
- 63 Tezara W, Mitchell V J, Driscoll S D, et al. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 1999, 401: 914—917[DOI]
- 64 Vuylsteke M, Van Den Daele H, Vercauteren A, et al. Genetic dissection of transcriptional regulation by cDNA-AFLP. *The Plant Journal*, 2006, 45: 439—446[DOI]
- 65 Zhu J K. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 66—71[DOI]
- 66 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
- 67 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 1997, 115: 327—334[DOI]
- 68 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 217—223
- 69 Valliyodan B, Nguyen H T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 189—195[DOI]
- 70 Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. A nuclear gene *erd1* encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally upregulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*.

- Plant J, 1997, 12: 851—861[DOI]
- 71 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. Trends Plant Sci, 2005, 10: 88—94[DOI]
- 72 Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci, 2000, 5: 199—206[DOI]
- 73 Yu D Q, Chen C H, Chen Z X. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. Plant Cell, 2001, 13: 1527—1539
- 74 Matsubayashi Y, Takagi L, Sakagami Y. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 13357—13362[DOI]
- 75 Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, et al. Disruption and overexpression of *Arabidopsis* phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. Plant Physiol, 2006, 142: 45—53[DOI]
- 76 Yang H P, Matsubayashi Y, Nakamura K, et al. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor found in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 13560—13565[DOI]
- 77 Ferreira R M B, Rodrigues Ramos P C, Franco E, et al. Changes in ubiquitin and ubiquitin-protein conjugates during seed formation and germination. J Exp Bot, 1995, 46: 211—219[DOI]
- 78 Woffenden B J, Freeman T B, Beers E P. Proteasome inhibitors prevent tracheary element differentiation in zinnia mesophyll cell cultures. Plant Physiol, 1998, 118: 419—430[DOI]
- 79 Gachet Y, Tournier S, Lee M, et al. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. J Cell Sci, 1999, 112: 1257—1271
- 80 Bommer U A, Borovjagin A V, Greagg M A, et al. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. RNA, 2002, 8: 478—496[DOI]
- 81 Yokota E, Yukawa C, Muto S, et al. Biochemical and immunocytochemical characterization of two types of myosins in cultured tobacco bright yellow-2 cells. Plant Physiol, 1999, 121: 525—534[DOI]
- 82 Reddy A S N, Day I S. Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. Genome Biol, 2001, 2: RESEARCH0024
- 83 Tominaga M, Kojima H, Yokota E, et al. Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. EMBO J, 2003, 22: 1263—1272[DOI]
- 84 Bartels D, Nelson D E. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. Plant Cell Environ, 1994, 17: 659—667[DOI]
- 85 Sun W, van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. Biochim Biophys Acta, 2002, 1577: 1—9
- 86 Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends Plant Sci, 2004, 9: 244—252[DOI]
- 87 Tsvetkova N M, Horvath I, Torok Z, et al. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 13504—13509[DOI]
- 88 Harndahl U, Buffoni-Hall R, Osteryoung K W, et al. The chloroplast heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants against oxidative stress. Cell Stress Chaperon, 1999, 4: 129—138[DOI]
- 89 Gustavsson N, Kokke B P, Harndahl U, et al. A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. Plant J, 2002, 29: 543—553
- 90 Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 373—399[DOI]
- 91 Møller I M, Jensen P E, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu Rev Plant Biol, 2007, 58: 459—481[DOI]
- 92 Cho E K, Hong C B. Over-expression of tobacco NtHSP70-I contributes to drought-stress tolerance in plants. Plant Cell Rep, 2006, 25: 349—358[DOI]
- 93 Alvim F C, Carolino S M B, Cascardo J C M, et al. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. Plant Physiol, 2001, 126: 1042—1054
- 94 Murakami T, Matsuba S, Funatsuki H, et al. Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. Mol Breed, 2004, 13: 165—175[DOI]
- 95 Wang L, Zhao C M, Wang Y J, et al. Over-expression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances chilling tolerance in tomato plant. J Plant Physiol Mol Biol, 2005, 31: 167—174