

水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因对干旱胁迫的应答

张小丽 刘 敏 商 奇 葛才林*

(扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; * 通讯联系人, E-mail: gecailin10@163.com)

Responses of Active Methyl Cycle and Transfer Genes to Drought Stress in Rice Leaves

ZHANG Xiao-li, LIU Min, SHANG Qi, GE Cai-lin*

(College of Bioscience and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; * Corresponding author, E-mail: gecailin10@163.com)

ZHANG Xiaoli, LIU Min, SHANG Qi, et al. Responses of active methyl cycle and transfer genes to drought stress in rice leaves. *Chin J Rice Sci*, 2011, 25(3): 236-242.

Abstract: The expressions of active methyl cycle and transfer genes in rice leaves of Zhonghan 3, Shanyou 63 and Aizaizhan were investigated by using gene-chip and mRNA differential display under 10% PEG6000 simulated drought stress. The results showed that the methyl cycle pathway was activated in leaves of Zhonghan 3 and Shanyou 63, but inhibited in leaves of Aizaizhan under drought stress. The expression of methyltransferase genes was induced by drought stress in Zhonghan 3 leaves, especially for the transcription of methylation modification gene of Rubisco, which could reduce the degradation of Rubisco protein. Drought stress inhibited the gene transcription of DNA methyltransferase and histone methyltransferase in Aizaizhan leaves. The results confirmed that the active methyl cycle and transfer genes were involved in rice drought resistance.

Key words: drought stress; gene chip; mRNA differential display; gene transcription

张小丽, 刘 敏, 商 奇, 等. 水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因对干旱胁迫的应答. 中国水稻科学, 2011, 25(3): 236-242.

摘 要: 以中旱 3 号、汕优 63 和矮仔占为材料, 在 10% PEG6000 模拟干旱条件下, 分别应用基因芯片和 mRNA 差异显示技术检测了不同基因型水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因表达对干旱胁迫的应答。中旱 3 号和汕优 63 叶片中活性甲基循环过程受干旱胁迫诱导, 而矮仔占叶片中这一过程受到干旱胁迫的抑制; 干旱胁迫诱导中旱 3 号叶片中更多甲基转移酶基因的表达, 尤其是对 Rubisco 蛋白甲基化修饰基因转录的诱导, 有利于防止 Rubisco 蛋白的氧化降解; 干旱胁迫抑制矮仔占叶片中 DNA 甲基转移酶、组蛋白甲基转移酶基因的转录。这一结果证明水稻中甲基循环、转移基因的表达在水稻耐旱中有一定的作用。

关键词: 干旱胁迫; 基因芯片; mRNA 差异显示; 基因转录

中图分类号: Q943.2; Q945.78; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2011)03-0236-07

我国水资源缺乏, 人均水资源仅占世界的 1/4, 且分布极不均匀。在我国, 农业消耗全国 70.4% 的水资源, 其中水稻灌溉消耗了 70%。因此, 研究水稻基因表达对干旱胁迫的应答, 揭示水稻的耐旱机制, 发掘耐旱基因资源, 选育节水水稻新品种, 具有十分重要的意义。

活性甲基循环包括甲硫氨酸途径和甲硫氨酸替补途径, 它是生物体内的单碳代谢源。在这一循环中产生的腺苷甲硫氨酸(SAM)是多种重要生理活性物质(如乙烯、多胺)的前体, 也是生物大分子(如蛋白质、DNA)甲基化修饰和甲基多元醇、甘氨酸甜菜碱等生理活性物质合成的甲基供体。不论是乙烯及其他生理活性物质的合成, 还是蛋白质、DNA 甲基化修饰的改变, 都与生物对生物和非生物胁迫的抗性或适应性密切相关。

国内外的研究表明, 番茄和水稻中的腺苷甲硫

氨酸合成酶基因表达受到盐胁迫的诱导^[1]。大麦叶片中甲硫氨酸合成酶基因的表达不仅受到盐分的诱导, 还受到干旱、冷胁迫、ABA 及 H₂O₂ 处理的诱导^[2]。ACC 或乙烯利能提高小麦的抗渍性^[3]。耐盐马铃薯在盐胁迫下有较高的乙烯产生速率^[4]。多胺不仅能调节植物的生长发育, 延缓衰老, 而且有利于维持胁迫条件下细胞内的离子平衡, 保护染色体结构, 清除活性氧自由基, 进而提高植物对干旱和盐胁迫的抗性^[5]。植物体内 DNA 甲基化受到多种环境胁迫的影响。例如, 重金属(Cu、Cd 和 Hg)能使水稻、小麦叶片和幼穗的 DNA 高甲基化^[6]。生物体内组蛋白和非组蛋白的甲基化也受到环境因素的影响。研究表明, 乙醇处理使鼠肝细胞中组蛋白

收稿日期: 2010-07-12; 修改稿收到日期: 2010-11-16。

基金项目: 江苏省作物栽培生理重点实验室开放课题(0273880036)。

H3K9 的甲基化水平降低,但却导致 H3K4 的甲基化水平提高,进而导致细胞内基因表达的变化^[7]。

目前,国内有关水稻植株内活性甲基循环、转移相关基因表达对干旱胁迫的应答方面的研究报告较少。因此,本研究以水稻耐旱品种(中旱 3 号)、中度干旱敏感杂交组合(汕优 63)和干旱敏感品种(矮仔占)为材料,在分析干旱胁迫对水稻叶片生理生化影响的基础上,应用基因芯片技术和 mRNA 差异显示技术研究了水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因对干旱胁迫的应答,以探讨活性甲基循环、转移相关基因在水稻耐旱中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 3 个对干旱敏感程度不同的代表性水稻材料,即中旱 3 号(抗旱性 3 级,需水量为普通水稻的 1/3)、汕优 63(弱抗旱)和矮仔占(不抗旱)^[8-9]。其中,中旱 3 号由上海农业科学院作物科学研究所提供,其余由扬州大学作物栽培生理实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 水稻植株的培养与处理

用国际水稻研究所完全培养液培养水稻幼苗,待幼苗长至 3 叶龄时移到含有 10% PEG6000 的培养液中,在自然光温条件下模拟干旱处理。PEG6000 是一种亲水性很强的大分子有机物,溶于水后能产生强大的渗透压,在 25℃ 下,10% PEG6000 溶液的渗透压大约为 -0.1483 MPa。因此,PEG6000 常用作植物耐旱性选择剂或水分胁迫剂^[10]。

1.2.2 水稻叶片相对含水量的测定

相对含水量 = (叶片鲜质量 - 叶片干质量) / 叶片鲜质量 × 100% (差减法)。

1.2.3 水稻叶片丙二醛含量的测定

参照 Heath 和 Packer^[11] 的方法测定叶片丙二醛含量。

1.2.4 水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因表达的基因芯片分析

将生长一致的 4 叶龄水稻幼苗分别移到含有 10% PEG6000 的处理液中,每组都设置 1 个对照组(完全培养液),每个处理设 3 个重复。正常光温条件下培养,每天更换培养液。3 d 后取水稻根系,采用 TRIzol 法提取总 RNA,制备靶标 cDNA,芯片杂交、清洗、染色和扫描。

基因芯片由北京博奥生物有限公司生物检测实

验室完成,利用 Affymetrix 公司的 Rice Genome Array,检测水稻的基因表达谱,检测方法编号 AG-C01F-01,数据分析方法编号 AG-C01D-01。

对于单张芯片结果中的 Call 值,用 GCOS 1.4 (Affymetrix GeneChip Operating Software 1.4) 软件处理,并用 dChip2008^[1-2] 软件对 GCOS 1.4 的输出结果进行数据分析。

利用分子注释系统 (Molecule Annotation System) 对基因芯片中检测到的差异表达基因进行序列比对、基因组比较和生物学功能查询。

1.2.5 水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因的基因表达分析

根据基因芯片的检测结果,对活性甲基循环、转移中若干关键基因的 mRNA 转录进行 RT-PCR 分析。这些基因包括腺苷甲硫氨酸合成酶基因 (SAMS)、甲硫氨酸合成酶基因 (MS)、酸式-还原酮二加氧酶基因 (ARD)、DNA 甲基转移酶基因 (DN-MTs)、组蛋白甲基转移酶基因 (HMTs) 和 SET 结构域蛋白基因 (SET) 等。

1.2.5.1 引物设计

根据上述基因的核苷酸序列,分别设计特异性上、下游引物(表 1)。

1.2.5.2 水稻叶片总 RNA 提取

总 RNA 的提取采用 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒 (QIAGEN 公司)。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。

1.2.5.3 cDNA 第 1 链的合成

cDNA 第 1 链的合成根据 TIAN Script cDNA 第 1 链合成试剂盒说明进行:在 20 μL 反应体系中,冰浴中加入 4 μL 总 RNA,2 μL Oligo(dT)₁₅,2 μL 2.5 mmol/L dNTP,5.5 μL RNase-free 双蒸水,混匀,70℃ 下加热 5 min,冰上冷却 2 min,离心,再加入 4 μL 5 × First-Strand Buffer,1 μL 0.1 mol/L DTT,0.5 μL RNasin (40 U/μL),1 μL M-MLV (200 U/μL),混匀,离心,42℃ 下温浴 50 min,95℃ 下加热 5 min 终止反应。

1.2.5.4 mRNA 差异显示

mRNA 差异显示根据 2 × Taq PCR MasterMix 试剂盒说明进行:在 20 μL 反应体系中,加入 10 μL 2 × Taq PCR Master Mix,1 μL 上游引物 (10 μmol/L),1 μL 下游引物 (10 μmol/L),2 μL cDNA 模板,6 μL 双蒸水。PCR 参数设为:94℃ 下预变性 5 min,35 个循环 (94℃ 下 30 s,48℃ 下 30 s,72℃ 下

表 1 mRNA 差异显示的特异性引物

Table 1. Specific primers for mRNA differential display analysis.

基因名称	基因名缩写	基因登录号	引物序列
Gene name	Gene symbol	Gene ID	Primer sequence
腺苷甲硫氨酸合成酶	SAMS	149392638	F:TGTCAGCTGATGTCGGTCTC
S-adenosylmethionine			R:CTTGCGAACCTCCGTAAGAC
甲硫氨酸合成酶	MS	115489653	F:CTTCTGAGCAGCATCCTTCC
Methionine synthase			R:AGCAGGAATGTCAGCGAAGT
酸式-还原酮二加氧酶	ARD	122936794	F:CATCGCCATAATCGAAGGTT
Aci-reductone dioxxygenase			R:TTAGGCGCCAGCTGATTACT
DNA 甲基转移酶	DNMTs	115451682	F:TCCGGAACAACCGTAAAGAC
DNA methyltransferase			R:GACAGTCGTTACCGGAAAT
组蛋白甲基转移酶	HMTs	115489491	F:GAACAACCATGGATCCAACC
Histone methyltransferase			R:TCACCTTTGCTTGTGCAGAC
SET 结构域蛋白	SET	115447356	F:CATCACACGCCATTTACAGG
SET domain containing protein			R:ACAAAGGGCTTCCTCATCCT

1 min),72℃下延伸 10 min。反应结束后,取 5 μL 反应产物在 0.8%琼脂糖凝胶上 120 V 恒压电泳约 25 min,EB 染色,凝胶成像。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对水稻叶片生理生化影响

2.1.1 干旱胁迫对水稻叶片相对含水量的影响

由图 1 可知,供试水稻叶片的相对含水量均随着模拟干旱处理时间的延长而逐步降低;中旱 3 号相对含水量降幅最小,矮仔占相对含水量降幅最大,汕优 63 居中。

2.1.2 干旱胁迫对水稻叶片丙二醛含量的影响

由图 2 可知,供试水稻叶片的丙二醛含量均随着模拟干旱处理时间的延长而逐步升高。中旱 3 号丙二醛含量升幅最小,矮仔占升幅最大,汕优 63 居中。这表明,中旱 3 号叶片中受干旱胁迫导致的脂质过氧化程度最低。

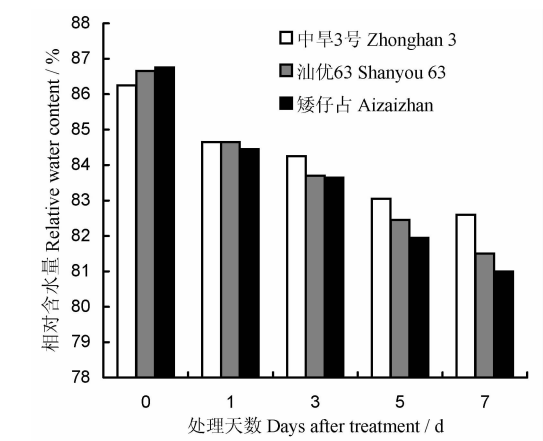


图 1 干旱对水稻叶片相对含水量的影响
Fig. 1. Effects of drought stress on relative water content in rice leaves.

2.2 干旱胁迫对水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因表达影响的基因芯片分析

从表 2 和表 3 中可以看出,干旱胁迫诱导中旱 3 号和矮仔占叶片中 ACC 合成酶的转录,也诱导中旱 3 号叶片中 ACC 氧化酶的转录,这表明干旱胁迫促进中旱 3 号和矮仔占叶片中乙烯的合成。中旱 3 号叶片中有 15 个与甲基循环、转移相关基因的转录受到干旱胁迫的诱导(比率大于 1.5),包括高半胱氨酸-S-甲基转移酶、SAM 依赖的羧基甲基转移酶、氧甲基转移酶 ZRP4、氧甲基转移酶家族、咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶、SAM 结合基序含有蛋白、磷酸乙醇胺甲基转移酶、甲基转移酶 DUF248 和 Rubisco 大亚基甲基转移酶。同时,干旱胁迫抑制氧甲基转移酶 ZRP4、甲基转移酶 DUF248 和硫嘌呤-S-甲基转移酶 3 个基因的转录。矮仔占叶片中仅有属于 SAM 依赖的羧基甲基转移酶、氧甲基转移酶 ZRP4、氧甲基转移酶家族、磷酸乙醇胺甲基转移酶

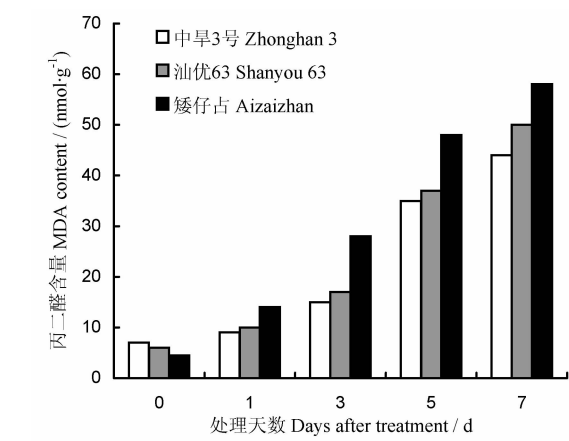


图 2 干旱对水稻叶片丙二醛含量的影响
Fig. 2. Effects of drought stress on the content of MDA in rice leaves.

表 2 中旱 3 号叶片中表达受干旱胁迫影响的甲基循环、转移相关基因

Table 2. Methyl cycle and transfer genes as affected by drought stress in Zhonghan 3.

蛋白质 Encoded protein	基因编号 Gene	比率 Ratio
ACC 合成酶 ACC synthase	Os04g0578000	1. 863
ACC 氧化酶 ACC oxidase	Os02g0771600	1. 817
高半胱氨酸-S-甲基转移酶 Homocysteine S-methyltransferase	Os03g0221200	1. 587
SAM 依赖的羧基甲基转移酶 SAM dependent carboxyl methyltransferase family protein	Os06g0244000	5. 486
	Os05g0102000	3. 907
	Os02g0719600	2. 249
	Os11g0260100	1. 742
	Os09g0344500	3. 836
氧甲基转移酶 ZRP4 O-methyltransferase ZRP4	Os10g0118200	3. 159
	Os03g0824500	0. 481
氧甲基转移酶家族 2 O-methyltransferase, family 2 domain containing protein	Os11g0303600	3. 232
氧甲基转移酶家族 3 O-methyltransferase, family 3 protein	Os08g0154000	1. 620
咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶 Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	Os08g0498400	2. 867
SAM 结合基序含有蛋白 SAM binding motif domain containing protein	Os03g0126300	1. 625
甲基转移酶 DUF248 Putative methyltransferase DUF248 family protein	Os03g0379100	1. 624
	Os02g0755000	1. 587
	Os04g0570800	0. 385
磷酸乙醇胺甲基转移酶 Phosphoethanolamine methyltransferase	Os01g0695100	1. 830
Rubisco 大亚基甲基转移酶 Rubisco large subunit N-methyltransferase	Os09g24530	1. 645
硫嘌呤-S-甲基转移酶 Thiopurine S-methyltransferase family protein	Os03g0843800	0. 408

表 3 矮仔占叶片中表达受干旱胁迫影响的甲基循环、转移相关基因

Table 3. Methyl cycle and transfer genes as affected by drought stress in Aizaizhan.

蛋白质 Encoded protein	基因编号 Gene	比率 Ratio
ACC 合成酶 ACC synthase	Os01g0192900	3. 276
SAM 依赖的羧基甲基转移酶 SAM dependent carboxyl methyltransferase family protein	Os05g0102000	1. 729
氧甲基转移酶 ZRP4 O-methyltransferase ZRP4	Os09g0344500	2. 077
氧甲基转移酶 O-methyltransferase	Os12g0202800	1. 736
磷酸乙醇胺甲基转移酶 Phosphoethanolamine methyltransferase	Os05g0548900	1. 520
己异戊二烯二羟安息香酸甲基转移酶 Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase	Os06g0152400	2. 099
甲基转移酶 DUF248 Putative methyltransferase DUF248 family protein	Os05g0378800	0. 552
氧甲基转移酶家族 2 O-methyltransferase, family 2 domain containing protein	Os07g0464200	0. 596
DNA 甲基转移酶 PMT1 DNA methyltransferase PMT1-like protein	Os01g061200	0. 438

和己异戊二烯二羟安息香酸甲基转移酶共 5 个基因的转录受到干旱胁迫的诱导。同时,矮仔占叶片中属于氧甲基转移酶家族 2、甲基转移酶 DUF248 和 DNA 甲基转移酶 PMT1 的 3 个基因的转录受到干旱胁迫的抑制。

这一结果表明,中旱 3 号叶片中甲基循环、转移相关基因表达对干旱胁迫的响应程度高于矮仔占,且中旱 3 号叶片中甲基循环、转移相关基因的表达多数受到干旱胁迫的诱导。

2.3 干旱胁迫对水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因表达影响的 mRNA 差异显示分析

基因芯片的结果表明,中旱 3 号和矮仔占叶片中甲基循环、转移相关基因表达能对干旱胁迫作出

应答。本研究进一步应用 mRNA 差异显示技术,分析(或验证)了水稻叶片中催化活性甲基循环的关键酶基因和催化 DNA、蛋白质甲基化修饰的重要甲基转移酶基因表达对干旱胁迫的应答。

2.3.1 水稻叶片总 RNA 的检测分析

图 3 为总 RNA 的电泳图谱。结果表明,总 RNA 中的 28 s 与 18 s rRNA 的亮度比值约为 2 : 1,可见 RNA 样品完整,未降解,符合实验要求,可用于 RT-PCR 检测。

2.3.2 RNA 差异显示结果

2.3.2.1 对活性甲基循环相关基因表达的影响

水稻叶片中与活性甲基循环相关的基因包括 SAMS、ARD 和 MS。从图 4 中可以看出, SAMS

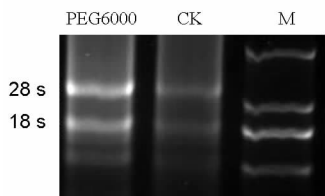


图 3 总 RNA 凝胶检测
Fig. 3. Total RNA gelatin check.

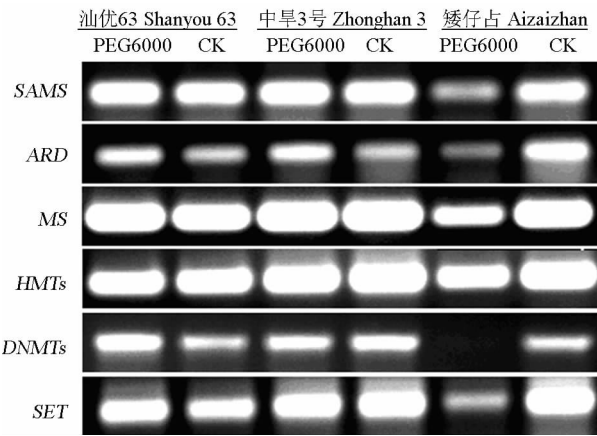


图 4 水稻叶片中活性甲基循环、转移相关基因表达对于干旱胁迫的应答
Fig. 4. Expressions of active methyl cycle and transfer genes in response to drought stress in rice leaves.

和 MS 基因的转录在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的明显抑制,而在中旱 3 号和汕优 63 中则几乎没有受到影响。ARD 基因的转录在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的抑制,而在中旱 3 号和汕优 63 中受到轻微诱导。这一结果表明,活性甲基循环过程在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的抑制,而在中旱 3 号和汕优 63 中受到一定程度的诱导。

2.3.2.2 对 DNA 和蛋白质甲基转移酶基因表达的影响

水稻叶片中与活性甲基转移相关的基因有 HMTs、DNMTs 和 SET。从图 4 中可以看出, HMTs 基因的转录在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的轻微抑制,而在中旱 3 号和汕优 63 中没有受到影响。DNMTs 基因的转录在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的强烈抑制,而在汕优 63 中受到明显诱导,在中旱 3 号中没有受到影响。SET 基因的转录在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的明显抑制,但在汕优 63 中受到明显诱导,在中旱 3 号中未受影响。

3 讨论

3.1 活性甲基循环过程对于干旱胁迫的应答

活性甲基循环过程涉及多个酶的参与,其中甲硫氨酸合成酶、腺苷甲硫氨酸合成酶和酸式-还原酮二加氧酶是活性甲基循环过程中的关键酶。

甲硫氨酸合成酶(MS)催化高半胱氨酸(腺苷甲硫氨酸的有毒代谢产物)重新获得甲硫氨酸。甲硫氨酸合成途径能对多种胁迫作出应答,玫瑰幼苗中甲硫氨酸合成酶基因的表达受到盐胁迫的诱导^[12],大麦叶片中一个编码 MS 基因的表达也受到盐胁迫的诱导^[13]。

甲硫氨酸在腺苷甲硫氨酸合成酶(SAMS)的催化下可进一步转变为腺苷甲硫氨酸(SAM)。在多种非生物胁迫条件下,植物体内活性甲基循环速率加快,有利于 SAM 的合成。

酸式-还原酮二加氧酶(ARD)是甲硫氨酸替补途径的一个分支酶。在原核和真核生物中,甲硫氨酸替补途径能将甲硫腺苷转变为甲硫氨酸。水稻体内 ARD 的表达也受到非生物胁迫,如重金属的诱导^[14]。

本研究结果表明,不抗旱的矮仔占叶片中活性甲基循环过程受到干旱胁迫的抑制,而在抗旱品种中旱 3 号和汕优 63 叶片中这一过程受到诱导,进而能在干旱胁迫条件下为多种转甲基过程提供更充足的底物。

3.2 活性甲基转移过程对于干旱胁迫的应答

SAM 依赖的羧基甲基转移酶家族(SAMT)是一种以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,水杨酸(SA)为受体的甲基转移酶。在野生型和高盐敏感型拟南芥中,盐胁迫均可诱导 SAMT 上调表达^[15]。用汞处理豌豆根,从 SSH 文库中筛选到 6 个表达上调的基因,其中就包括 SAMT^[16]。本研究检测到 SAMT 在中旱 3 号叶片中的表达受到干旱胁迫的诱导,说明当外界环境缺水时该基因的表达受到诱导,而 SAMT 基因又受 SA 的诱导。因此,推测 SAMT 在植物水杨酸信号传导途径中可能发挥重要作用。

氧甲基转移酶 ZRP4 基因与盐胁迫密切相关,本研究检测到中旱 3 号叶片中 2 个氧甲基转移酶 ZRP4 基因的表达受到干旱胁迫的诱导,说明在逆境胁迫下植物调节甲基转移酶的活性,能够高效地修复胁迫引起的蛋白质损伤,从而提高植物的抗逆能力^[17]。

磷酸乙醇胺甲基转移酶(PEAMT)的主要功能

是催化磷酸乙醇胺甲基化,最终合成磷酸胆碱,是合成磷酸胆碱的关键酶^[18-19]。磷酸胆碱是合成磷脂酰胆碱和甜菜碱的前体。磷脂酰胆碱是植物细胞膜上含量最丰富的磷脂,其含量与植物的抗寒性相关^[20]。甜菜碱是一类小分子渗透调节剂,对细胞的渗透调节、生物大分子结构和功能的稳定有一定的作用。本研究结果表明,*PEAMT*在中早3号和矮仔占叶片中的表达受到干旱胁迫的诱导,显然,*PEAMT*表达上调对提高水稻的耐旱能力有重要作用。

咖啡酰辅酶A甲基转移酶(CCoAOMT)是木质素生物合成途径的关键酶。该基因家族的3个成员在水稻幼叶的厚壁组织和维管束中大量表达,说明该基因家族与水稻的木质化进程关系密切^[21]。本研究检测到*CCoAOMT*在中早3号叶片中的表达受到干旱胁迫的诱导,说明该基因表达的上调促进了干旱条件下水稻的木质化进程,提高了水稻对非生物胁迫的防御能力。

DNA甲基转移酶DNMTs催化SAM上的甲基基因取代DNA嘧啶环第5位碳原子上的氢,生成5-甲基胞嘧啶,从而对DNA进行甲基化修饰。DNA甲基化与组蛋白修饰相互作用,通过改变染色质的结构来调控基因表达^[22]。基因芯片和mRNA差异显示的检测结果均显示,矮仔占叶片中*DNMTs*基因的转录受到干旱胁迫的强烈抑制,在中早3号中未受明显影响,而在汕优63中*DNMTs*基因的转录受到显著诱导。因此,干旱胁迫能影响矮仔占和汕优63叶片中的DNA甲基化水平,进而影响基因的表达。本研究结果表明,*DNMTs*基因的转录在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的强烈抑制,在中早3号中未受明显影响,而在汕优63中受到显著诱导。因此,干旱胁迫可能通过影响矮仔占和汕优63叶片中的DNA甲基化水平,进而影响基因的表达。

组蛋白甲基转移酶(HMTs)和SET结构域蛋白主要催化SAM上的甲基转移到组蛋白或非组蛋白上进行甲基化修饰,进而影响基因的表达。本研究结果表明,*HMTs*基因的转录在矮仔占叶片中受到干旱胁迫的轻微抑制,而在中早3号和汕优63中没有受到影响。因此,组蛋白甲基转移酶可能在水稻耐旱中不起重要作用。

Rubisco大小亚基N-甲基转移酶和含SET结构域蛋白分别催化Rubisco蛋白大小亚基的甲基化修饰^[23]。现已证实,当植物处于不同类型的环境胁迫下,叶片内Rubisco蛋白的加速衰老和水解是植

物对胁迫的共同应答过程^[24]。Zheng等^[25]推测Rubisco大小亚基的甲基化可能与其稳定性相关,即通过甲基化修饰可以降低它对蛋白质水解的敏感性^[25]。本研究结果表明,中早3号叶片中Rubisco大亚基N-甲基转移酶基因的转录受到干旱胁迫的诱导,而在矮仔占中未检测到相应的诱导作用。汕优63叶片中含SET结构域蛋白基因的转录也受到干旱胁迫的明显诱导,在中早3号中未受影响,而在矮仔占中受到明显抑制。因此,笔者认为在水稻抗旱材料中早3号和较为耐旱材料汕优63中,Rubisco蛋白的甲基化修饰对于防止Rubisco蛋白的氧化降解可能有一定的作用。

3.3 乙烯合成过程对干旱胁迫的应答

在乙烯合成途径中,ACS催化腺苷甲硫氨酸转变为ACC,然后再由ACO催化ACC转变为乙烯。

ACS的表达和不同植物组织器官中的乙烯含量受到多种生物和非生物胁迫的影响。水胁迫和干旱诱导乙烯前体ACC在柑橘根系中积累^[26]。南瓜植株体内ACS的表达受到创伤的诱导^[27]。不仅如此,ACS基因的转录还受到活性氧自由基和甲基茉莉酮酸的诱导^[28]。

基因芯片分析结果显示,中早3号叶片中ACS和ACO基因以及矮仔占叶片中ACS基因的转录受到干旱胁迫的诱导。这一结果表明,干旱胁迫促进水稻叶片内乙烯的生物合成,激活水稻叶片内的乙烯信号途径。

4 结论

本研究结果表明,中早3号和矮仔占叶片中乙烯合成基因的转录受到干旱胁迫的诱导。中早3号和汕优63叶片中活性甲基循环过程受到干旱胁迫的诱导,而在矮仔占中则受到抑制。中早3号和矮仔占叶片中SAM依赖的羧基甲基转移酶、氧甲基转移酶ZRP4、磷酸乙醇胺甲基转移酶基因的转录均受到干旱胁迫的诱导。中早3号叶片中氧甲基转移酶家族2和3、咖啡酰辅酶A甲基转移酶、未知功能的甲基转移酶DUF248基因的转录也受到干旱胁迫的诱导。中早3号叶片中Rubisco大亚基N-甲基转移酶和含SET结构域蛋白基因的转录也受到干旱胁迫的诱导,进而促进Rubisco蛋白的甲基化修饰。而矮仔占叶片中DNA甲基转移酶、组蛋白甲基转移酶基因的表达受到干旱胁迫的抑制。这一结果证明水稻中甲基循环、转移及乙烯合成相关基因的表达参与干旱胁迫的应答,不同类型水稻品

种的应答方式和在耐旱中的作用有显著差别。

参考文献：

[1] Espartero J, Pintor-Toro J A, Pardo J M. Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol Biol*, 1994, 25(2): 217-227.

[2] Narita Y, Taguchi H, Nakamura T, et al. Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Sci*, 2004, 167: 1009-1016.

[3] 董建国, 李振国. 乙烯生物合成中间体-1-氨基环丙烷-1-羧酸及其丙二酸结合物的测定. *植物生理学通讯*, 1983, 19: 46-48.

[4] Wong W S, Li G G, Ning W, et al. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. *Plant Sci*, 2001, 161: 969-977.

[5] 段辉国, 袁 澍, 刘文娟, 等. 多胺与植物逆境胁迫的关系. *植物生理学通讯*, 2005, 41(4): 531-536.

[6] 葛才林, 杨小勇, 刘向农, 等. 重金属对水稻和小麦 DNA 甲基化水平的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(5): 363-368.

[7] Pal-Bhadra M, Bhadra U, Jackson D E, et al. Distinct methylation patterns in histone H3 at Lys-4 and Lys-9 correlate with up- & down-regulation of genes by ethanol in hepatocytes. *Life Sci*, 2007, 81: 979-987.

[8] 肖爱国, 刘荣甫, 黄新平, 等. 中早 3 号的特征特性及早直播标准化栽培技术. *安徽农业学报*, 2006, 34(4): 647.

[9] 李 艳, 马 均, 王贺正, 等. 水稻品种苗期抗旱性鉴定指标筛选及其综合评价. *西南农业学报*, 2005, 18(3): 250-255.

[10] 戴高兴, 彭克勤, 萧浪涛, 等. 聚乙二醇模拟干旱对耐低钾水稻丙二醛、脯氨酸含量和超氧化物歧化酶活性的影响. *中国水稻科学*, 2006, 20(5): 557-559.

[11] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 125: 189-198.

[12] Eckermann C, Eichel J, Schr der J. Plant methionine synthase: New insights into properties and expression. *Biol Chem*, 2000, 381: 695-703.

[13] Narita Y, Taguchi H, Nakamura T, et al. Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Sci*, 2004, 167: 1009-1016.

[14] Ge C L, Wan D Z, Wang Z G, et al. A proteomic analysis of rice seedlings responding to 1,2,4-trichlorobenzene stress. *J Environ Sci*, 2008, 19(3): 1-11.

[15] Gong Z Z, Koiwa H, Cushman M A, et al. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mu-

tants. *Plant Physiol*, 2001, 126(3): 363-375.

[16] Helena S, Strid A. Six genes strongly regulated by mercury in *Pisum sativum* roots. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(2): 135-142.

[17] Mudegeet M B, Clarke S. Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methy-transferase in wheat. *Biol Chem*, 1994, 269: 25605-25612.

[18] Nuccio M L, Ziemak M J, Henry S A, et al. cDNA cloning of phosphoethanolamine N-Methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. *Biol Chem J*, 2000, 275: 14095-14101.

[19] Smith D D, Summers P S, Weretilnyk E A. Phosphocholine synthesis in spinach: Characterization of phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Physiol Plant*, 2000, 108: 286-294.

[20] Kinney A J, Clarkson D T, Loughman B C. The regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in rye(*Secale cereale*) roots: Stimulation of the nucleotide pathway by low temperature. *Biochem J*, 1987, 242: 755-759.

[21] 赵华燕, 沈庆喜, 吕世友, 等. 水稻咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因(CCoAOMT)表达特性分析. *科学通报*, 2004, 49(14): 1390-1394.

[22] 苏 玉, 王 溪, 朱卫国. DNA 甲基转移酶的表达调控及主要生物学功能. *遗传学报*, 2009, 31(11): 1087-1093.

[23] Trievel R C, Flynn E M, Houtz R L, et al. Mechanism of multiple lysine methylation by the SET domain enzyme Rubisco LSM1. *Nat Struct Biol*, 2003, 10: 545-552.

[24] Albuquerque J A, Esquivel M G, Teixeira A R, et al. The catabolism of ribulose biphosphate carboxylase from higher plants: A hypothesis. *Plant Sci*, 2001, 161(1): 55-65.

[25] Zheng Q, Simel E J, Klein P E, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase. *Protein Expr Purif*, 1998, 14: 104-112.

[26] Gomez-Cadenas A, Tadeo F R, Talon M, et al. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of *Cleopatra mandarin* requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol*, 1996, 112: 401-408.

[27] Tudela D, Primo-Millo E. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in *Cleopatra mandarin* seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol*, 1992, 100: 131-137.

[28] Weiss C, Bevan M. Ethylene and a wound signal modulate local and systemic transcription of *win2* gene in transgenic potato plants. *Plant Physiol*, 1991, 96: 943-951.