

水稻 *CYP81A6* 基因干扰对其他基因表达的影响

杨阳¹ 刘金华¹ 高其康^{1,2,*}

(¹ 浙江大学 农业与生物技术学院 昆虫科学研究所, 杭州 310058; ² 浙江大学 农生环测试中心, 杭州 310058; * 通讯联系人, E-mail: Qkgao@zju.edu.cn)

Knockdown of *CYP81A6* Gene Affects Expression of Other Genes in Rice

YANG Yang¹, LIU Jin-hua¹, GAO Qi-kang^{1,2,*}

(¹ *Institute of Insect Sciences, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;*

*² Analysis Center of Agrobiology and Environmental Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; * Corresponding author, E-mail: Qkgao@zju.edu.cn)*

YANG Yang, LIU Jinhua, GAO Qikang. Knockdown of *CYP81A6* gene affects expression of other genes in rice. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(5): 447-456.

Abstract: To study the effects of knockdown the gene *CYP81A6* on gene expression of transgenic rice, we report the transcriptome profiling analysis of transgenic rice 450-3 and normal control rice Xiushui 110. In this study, mRNA of transgenic rice and its parent (control) were deeply sequenced, sequences information obtained and functional genes comparison against the rice gene database were analyzed. Results showed that 3529 genes in total were significantly differentially expressed, among which 1018 genes were upregulated and 2511 genes were downregulated. The differential expressed genes distribution of the two samples showed that there were 2533 genes expressed in both Xiushui 110 and 450-3, 633 genes only expressed in Xiushui 110, while 363 genes expressed just in 450-3. Comparative analysis with 296 resistance genes in the rice database showed that 64 resistance genes were involved in rice resistance, including two insect-resistant genes, 17 disease-resistant genes and 45 stress-resistant genes, indicating that resistance of transgenic plant 450-3 would be affected. Gene enrichment studies and further analysis showed that differential expressed genes were significantly enriched in 38 GO terms and 13 KO terms in 450-3, ‘heme binding’ (GO: 0020037) and ‘photosynthesis’ (KO 00195) were enriched most dramatically. Comparative transcriptome analysis of the transgenic rice 450-3 and Xiushui 110 was conducted to clarify the changes of gene expression level in 450-3. Knockdown of gene *CYP81A6* may result in extensive and variable change in the transcriptome of 450-3. Viewed from the gene evolution point, these observations may provide valuable information to address the safety of genetically modified crops, and it could be used as a new method for the safety evaluation of genetically modified organisms.

Key words: transgenic rice; *CYP81A6*; high-throughput sequencing; differential expressed gene; resistance gene

杨阳, 刘金华, 高其康. 水稻 *CYP81A6* 基因干扰对其他基因表达的影响. 中国水稻科学, 2013, 27(5): 447-456.

摘要: 为了明确抑制基因 *CYP81A6* 的表达对水稻的自身功能基因表达的影响, 对亲本水稻秀水 110 和转基因水稻 450-3 的 mRNA 进行深度测序, 并将获得的序列信息通过水稻基因数据库和生物信息学手段进行注释和功能基因比较。结果表明, 在 3529 个差异表达的基因中, 上调表达基因 1018 个, 下调表达基因 2511 个; 秀水 110 与 450-3 中共同表达的基因有 2533 个, 仅在 450-3 中表达的基因有 363 个, 仅在秀水 110 表达的基因有 633 个。与水稻基因数据库功能已知的 296 个抗性基因对比, 发现 450-3 中差异表达的基因有 64 个功能已知且与水稻抗性相关, 包括 2 个抗虫相关基因, 17 个抗病相关基因和 45 个抗逆相关基因, 预示着基因 *CYP81A6* 的抑制表达对水稻抗性会产生一定的影响。GO 功能和通路显著性富集分析显示, 差异表达基因显著富集在 38 个 GO 条目和 13 个通路上, 在结合能力 (GO: 0020037) 和光合作用 (KO 00195) 通路上富集最为显著。通过对转基因水稻的转录组分析, 阐明转基因水稻基因与亲本相比发生的变化, 进而分析这些变化对转基因水稻产生的影响, 从基因生态学角度为转基因水稻的安全性评价提供科学依据, 可作为一种新的方法应用于转基因生物的安全性评价。

关键词: 转基因水稻; *CYP81A6*; 高通量测序; 差异表达基因; 抗性基因

中图分类号: Q785; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2013)05-0447-10

转基因作物给全球带来了巨大的经济和社会价值, 随着该技术的广泛应用, 转基因作物已在全球大

面积种植。1997—1998 年, 在英国的实验显示转基因土豆喂食老鼠后导致老鼠出现肝脏癌症早期症

收稿日期: 2013-05-15; 修改稿收到日期: 2013-08-05。

基金项目: 浙江省自然科学基金重点资助项目 (Z3080241)。

状、睾丸发育不全以及免疫系统和神经系统部分萎缩的异常现象;1999年《Nature》杂志报道了转 *Bt* 基因的玉米花粉对美国的君王斑蝶 (*Danaus plexippus*) 产生了有害作用^[1], 转基因生物安全问题开始引起了人们的关注。

为了加强对转基因生物安全性评价的研究工作, 国际组织和研究机构制定了“基于实质等同性”的转基因生物安全评价原则和标准。该原则主要是指将转基因作物及其转基因产品与非转基因对照物在农艺性状、表型以及组成成分等方面进行比较, 从而确定转基因产品与非转基因对照物的成分是否实质等同, 基于这一原则对转基因生物进行安全性评价^[2]。目前, 转基因作物安全性所面临的问题主要有两个方面: 1) 转基因作物的食用安全性; 2) 基因释放、漂移对生态安全的影响。而对转基因生物自身功能基因影响评价的问题, 至今未能得到明确的答案。转基因技术对转基因水稻原有的功能基因是否有影响, 这种影响对该转基因水稻的安全性是否有威胁, 也就是目前我们基于对转基因生物的安全评价是否科学全面。

细胞色素 P450 氧化酶系是植物体内一类具有催化次生代谢物质生物合成的代谢酶系。P450 家族基因庞大, 植物 P450 家族基因的编号从 CYP71 至 CYP99。目前, 水稻中生物学功能已明确 P450 基因仅有 6 个: CYP81A6^[3]、CYP74A^[4]、CYP78A11^[5]、CYP87A3^[6]、CYP90D2^[7] 和 CYP714D1^[8]。Lin 等^[9]发现可通过 RNA 干扰方法抑制水稻体内抗苯达松和磺酰脲类除草剂的 P450 家族基因 CYP81A6 的表达, 从而达到用苯达松对转基因水稻进行选择性的灭杀。本研究采用高通量测序技术对苯达松敏感型转基因水稻 450-3 和亲本秀水 110 所有 mRNA 进行深度测序, 获得的序列信息通过水稻基因数据库和生物信息学手段进行注释和功能基因比较, 以阐明转基因水稻基因相比亲本发生的变化, 进而分析这些变化对转基因水稻产生的影响, 从基因生态学角度为转基因水稻的安全性评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试植物

本研究中的植物材料有两种: 亲本秀水 110 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) 和转基因水稻 450-3^[9] (利用 RNA 干扰技术构建了以 CaMV35S

为启动子、抗草甘膦基因 G6 为筛选基因的载体, 抑制苯达松解毒酶基因 CYP81A6 的表达)。秀水 110 由浙江大学原子核农业科学研究所舒庆尧教授提供, 转基因水稻 450-3 由浙江大学昆虫科学研究所沈志成教授实验室提供。

1.2 生物测定

水稻种子浸种 24 h, 催芽至露白后播于温室中塑料槽内。水稻苗在播种 7 d 后移栽到塑料盆钵中, 为筛选出 F₁ 中由于性状分离产生的非转基因水稻苗, 选择生长状态相对稳定的 4~5 叶期, 分别进行药效试验, 共设两对对照组, 其中秀水 110 均为对照苗; 1) 对两种水稻都喷施苯达松 (2000 mg/L, 北京燕化永乐农药有限公司, 北京), 以检测 450-3 是否对苯达松敏感; 2) 在两种水稻叶片上涂抹苯达松, 取水稻苗中任一正常生长叶片, 涂抹苯达松药剂 (2000 mg/L), 以筛选出转基因稻苗供后面试验中使用。

1.3 靶基因检测

用 CTAB 法将用苯达松筛选得到的 4~5 叶期转基因苗单株 DNA, 并分别对其进行 PCR 验证。根据 Lin 等^[9]的研究, 450-3 中存在一段 440 bp 的片段。利用已知引物 35sR (CTCGAAGCTTACGT TTTTAATGTACTGAAT) 和 450R (AGATCTCC TTCTTGACGAGGTGGAGGTGT), 进行 PCR 验证, 引物为上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 总 RNA 的提取和 cDNA 文库的制备

根据 Trizol (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 试验操作方法, 将苯达松筛选出的 4~5 叶期转基因苗分别单株提取总 RNA。cDNA 测序文库制备按照 RNA 样品文库构建试剂盒 (Illumina TruSeq RNA Sample Pre Kit v2, Illumine, USA) 说明进行。

1.5 超高通量转录组测序

用超高通量测序法 (Illumina HiseqTM 2000 platform) 对两种水稻转录组进行测序。测序产生的序列文件, 根据 Q20 过滤原则 (每条序列至少有 30% 的碱基的质量值 ≥ 20 分) 过滤掉低质量的序列。利用 TopHat 1.3.1 将对应的序列映射到水稻库 (IRGSP build 5), 根据序列数目来统计每个基因的表达丰度, 基因表达量的计算使用 RPKM (reads per kb per Million reads) 法。依据 RPKM 值, 将 RPKM 值大于 0.5 的基因视作表达基因。根据 Audic 等^[10]的方法进行统计学分析, 差异表达基因定

义为错误发现率(false discovery rate, FDR)小于或等于 0.01, 且倍数差异在 2 倍以上 ($|\log_2 \text{ratio}| > 1$) 的基因, 其中 FDR 值指点错误发现率(false discovery rate)。在 GO 功能显著性富集分析(GO, <http://www.geneontology.org>) 和 KEGG 通路显著性富集分析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database)中, 将 $P < 0.01$ 的 GO 条目和 KO 条目视为显著性富集。

1.6 靶基因的荧光定量 PCR 检测

按照反转录酶试剂盒[TaKaRa PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 宝生物工程(大连)有限公司, 大连]说明进行, 将提取的 RNA 合成 cDNA。对于转基因水稻 450-3, 参考 Zhang 等^[1]报道的 *CYP81A6* 基因, 设计特异引物 450F(TGCA TCTCCAGGACGAAGTTCATGT)和 450R(AGCG CAGTCACTCTCTTCCAAATC), 内参基因为 *Actin*(F: TGGTCGTACCACAGGTATTGTGT88 T; R: AAGGTCGAGACGAAGGATAGCAT); 引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增条件如下: 95℃ 下预变性 2 min, 95℃ 下 15 s, 60℃ 下 15 s, 68℃ 下 20 s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的生物学测定和靶基因检测

水稻亲本秀水 110 中存在对苯达松的解毒酶, 对苯达松不敏感, 而转基因水稻 450-3 对苯达松敏

感。在生物测定中, 对 450-3 和秀水 110 都喷施苯达松, 450-3 死亡, 而秀水 110 正常生长(图 1-A); 为筛选掉转基因水稻 450-3 的 F₁ 中由于性状分离而产生的对苯达松不敏感植株, 对 450-3 的每株水稻取任一叶片涂抹苯达松, 叶片在 5 d 内枯萎的为转基因植株, 而正常生长的为非转基因植株(图 1-B)。PCR 验证结果表明, 在转基因水稻 450-3 中能扩增出一段 440 bp 的片段, 在秀水 110 中没有扩增到该片段(图 1-C)。

2.2 测序数据统计分析

用超高通量测序法分别对两种水稻转录组进行测序, 根据测序产生的序列文件, 所提供的两个样本秀水 110 和 450-3 分别获得 33 878 012 和 26 715 880 条序列, 产生 3.38 亿和 2.67 亿个碱基。经 Q20 过滤掉低质量的序列后的统计分析显示, 两个样本分别获得 2.84 亿和 2.21 亿个碱基(表 1)。

2.3 基因表达分析

2.3.1 基因表达数据统计

利用 TopHat 1.3.1 将每个样品中对应的序列映射到水稻基因数据库, 根据序列数目来统计每个基因的表达丰度。两个材料映射到水稻基因数据库的基因总数均为 34 792 个, 在亲本秀水 110 中, 基因表达数目为 22 532 个, 占水稻总基因数量的 64.76%; 转基因水稻 450-3 中, 基因表达数目为 22 067 个, 占水稻总基因数量的 63.43%。两者比较发现, 秀水 110 和 450-3 中共同表达的基因有



A—转基因水稻对苯达松的敏感性测定; B—转基因植株筛选; C—PCR 验证转基因水稻; CK—秀水 110; 1—转基因水稻 450-3; M—2000 bp 分子量标记。

A, Sensitivity test of transgenic rice plants to bentazon; B, Screening of transgenic plants; C, PCR analysis of transgenic plants; CK, Xiushui 110(the parent of 450-3); 1, Transgenic rice 450-3; M, 2000 bp Marker.

图 1 转基因水稻的生物学测定和靶基因检测

Fig. 1. Bioassay and target gene detection of transgenic plants.

表 1 高通量测序数据统计

Table 1. Summary of sequencing assembly after illumina sequencing.

数据类别 Data type	样品名称 Sample name	总序列数 Total reads	双端总序列数 Total read pairs (Paired end)	序列长度 Read length /bp	总碱基数 Total base pairs/bp
原始数据 Raw data	秀水 110 Xiushui 110	33 878 012	16 939 006	100	3 387 801 200
	450-3	26 715 880	13 357 940	100	2 671 588 000
过滤后数据 Filtered data	秀水 110 Xiushui 110	28 356 342	14 178 171	100	2 835 634 200
	450-3	22 088 422	11 044 211	100	2 208 842 000

21 182 个,仅在秀水 110 中表达的基因有 1350 个,仅在 450-3 中表达的基因有 885 个(图 2-A)。

2.3.2 差异表达基因

在总的 3529 个差异表达基因中,1018 个基因上调表达,2511 个基因下调表达。仅在 450-3 表达的基因有 363 个,仅在秀水 110 中表达的基因有 633 个(图 2-B)。

在 450-3 表达上调最显著的 10 个基因中,仅有 2 个基因的功能已知:羟脯氨酸糖蛋白 GAS31 和肽酶基因;在表达下调最显著的 10 个基因中,3 个基因的功能已知:RIR1b 蛋白、OSIGBa0140C02.4 蛋白和非蛋白编码基因。与水稻基因数据库功能已知的抗性基因对比发现:转基因水稻 450-3 中有 64 个基因功能已知,包括 2 个抗虫相关基因,17 个抗病相关基因和 45 个抗逆相关基因。表 2 列出了抗虫相关基因以及差异表达倍数前 10 位的抗病和抗逆相关基因。

2.4 GO 显著性富集分析

GO 功能显著性富集分析能给出相比基因组背景差异表达基因中显著富集的 GO 功能条目,从而给出差异表达基因与哪些生物学功能显著相关。对

450-3 中 3529 个差异表达的基因进行 GO 分析,结果发现在细胞(cell)、细胞部件(cell part)、结合能力(binding)、催化(catalytic)、细胞过程(cellular process)和代谢过程(metabolic process)方面映射的差异表达基因最多(图 3)。

两种水稻所有基因向 Gene Ontology 数据库的各个条目映射后,得到 1 516 个 GO 条目。与亲本秀水 110 相比,转基因水稻 450-3 中差异表达基因显著富集的 GO 条目有 38 个,占总数的 2.51%,其中 22 个(57.90%)GO 条目归属分子功能大类,14 个(36.84%)GO 条目归属生物过程大类,仅有 2 个(5.26%)GO 条目归属细胞成分大类。GO 功能显著性富集结果显示,在结合能力(heme binding)、电子载体活性(electron carrier activity)、转录调控(regulation of transcription)、代谢过程(metabolic process)、氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)这 5 个 GO 条目上富集的差异表达基因数目较多。显著性富集前 10 位的 GO 条目见表 3。

2.5 通路显著性富集分析

两种水稻所有基因向 KEGG 数据库的各个条目映射后,得到 284 个 KO 条目。将差异表达的

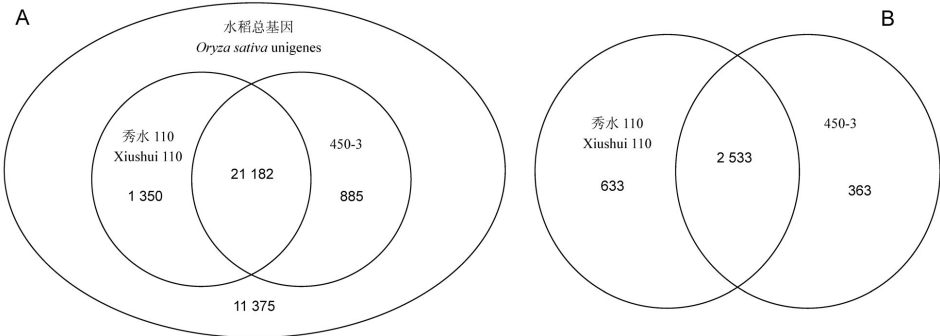


图 2 秀水 110 和 450-3 中的总表达基因(A)和差异表达基因(B)分布
Fig. 2. Distribution of total expressed genes (A) and differential expressed genes (B) in Xiushui 110 and 450-3.

表 2 450-3 中差异表达前 10 位的功能已知抗性基因

Table 2. The top ten functional defined resistance genes differentially expressed in 450-3.

基因功能分类	基因	差异表达倍数*	基因功能注释
Gene type	Gene ID	Fold change*	Gene annotation
抗虫基因 Insect-resistant gene	Os06t0604200	−3.34	磷脂酶 D(<i>OsPLDα4</i>)
	Os08t0139700	−1.33	水稻(E)-β-丁香烯合酶(<i>OsTPS3</i>)
抗病基因 Disease-resistant gene	Os06t0569500	1.05	贝壳杉烯氧化酶基因(<i>OsKOS1</i>)
	Os09t0518200	1.64	水杨酸葡萄糖基转移酶基因(<i>OsSGT1</i>)
	Os04t0401000	−2.10	稻瘟病抗性基因(<i>pi-21</i>)
	Os02t0654700	−2.12	水稻乙烯反应元件结合蛋白基因(<i>OsBIERF3</i>)
	Os07t0592600	−2.25	吲哚乙酸氨基化合成酶基因(<i>OsGH3-8</i>)
	O450-3t0508600	−2.43	水稻白叶枯病感病基因 (<i>Os-11N3</i>)
	Os02t0771400	−2.66	蛋白酪氨酸磷酸酶(<i>OsPFA-DSP2</i>)
	Os04t0578000	−2.87	1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶基因(<i>OsACS2</i>)
	Os03t0225900	−2.90	丙二烯氧合酶基因(<i>OsAOS2</i>)
	Os02t0181300	−3.09	WRKY 转录因子(<i>OsWRKY 71</i>)
	Os08t0174500	1.20	开花抑制因子; 籽粒产量、株高和抽穗期多效性控制基因; CCAAT 盒结合蛋白 HAP3 亚基(<i>DTH8</i>)
		1.70	水稻开花抑制因子(<i>OsCOL4</i>)
		1.97	热激转录因子基因(<i>OsHsfA2d</i>)
		2.19	钾转运蛋白(<i>OsHAK5</i>)
		9.28	柠檬酸盐转运体(<i>OsFRDL4</i>)
		−3.25	NAC 转录因子基因(<i>OsNAC10</i>)
		−3.53	水稻 bHLH 转录因子(<i>OsIRO2</i>)
		−4.33	晚期胚胎富集蛋白基因(<i>OsLEA3</i>)
		−4.95	AP2/EREBP 转录因子基因(<i>OsDREB1E</i>)
		−9.24	水稻受体激酶基因(<i>OsRMC</i>)

* 正值为上调;负值为下调。

* Positive for up-regulated and negative for down-regulated.

表 3 富集前 10 位 GO 条目上的差异基因数目

Table 3. Numbers of differential expressed genes in top ten enriched GO term.

GO 条目 GO term	差异表达基因数 Differential expressed gene number	总基因数 All gene number	案例基因数		<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	GO 注释 GO annotation
			Case gene number			
			上调	下调		
			Up- regulated	Down- regulated		
GO:0020037	102	545	25	77	3.45×10^{-11}	结合能力 Heme binding
GO:0009055	119	703	28	91	2.23×10^{-9}	电子载体活性 Electron carrier activity
GO:0004497	68	356	19	49	2.48×10^{-8}	单加氧酶活性 Monooxygenase activity
GO:0045449	116	707	18	98	3.01×10^{-8}	转录调控 Regulation of transcription
GO:0005506	76	451	20	56	2.33×10^{-6}	铁离子结合 Iron ion binding
GO:0008152	195	1412	41	154	3.10×10^{-6}	代谢过程 Metabolic process
GO:0016211	7	9	—	7	3.60×10^{-6}	氨连接酶活性 Ammonia ligase activity
GO:0016841	7	9	—	7	3.60×10^{-6}	转氨酶活性 Ammonia-lyase activity
GO:0006559	7	10	—	7	1.09×10^{-5}	L-苯丙氨酸降解过程 L-phenylalanine catabolic process
GO:0009765	9	17	8	1	1.43×10^{-5}	光合作用,光捕获 Photosynthesis, light harvesting

“—”表示无差异表达基因。

“—”, No differential expressed genes.

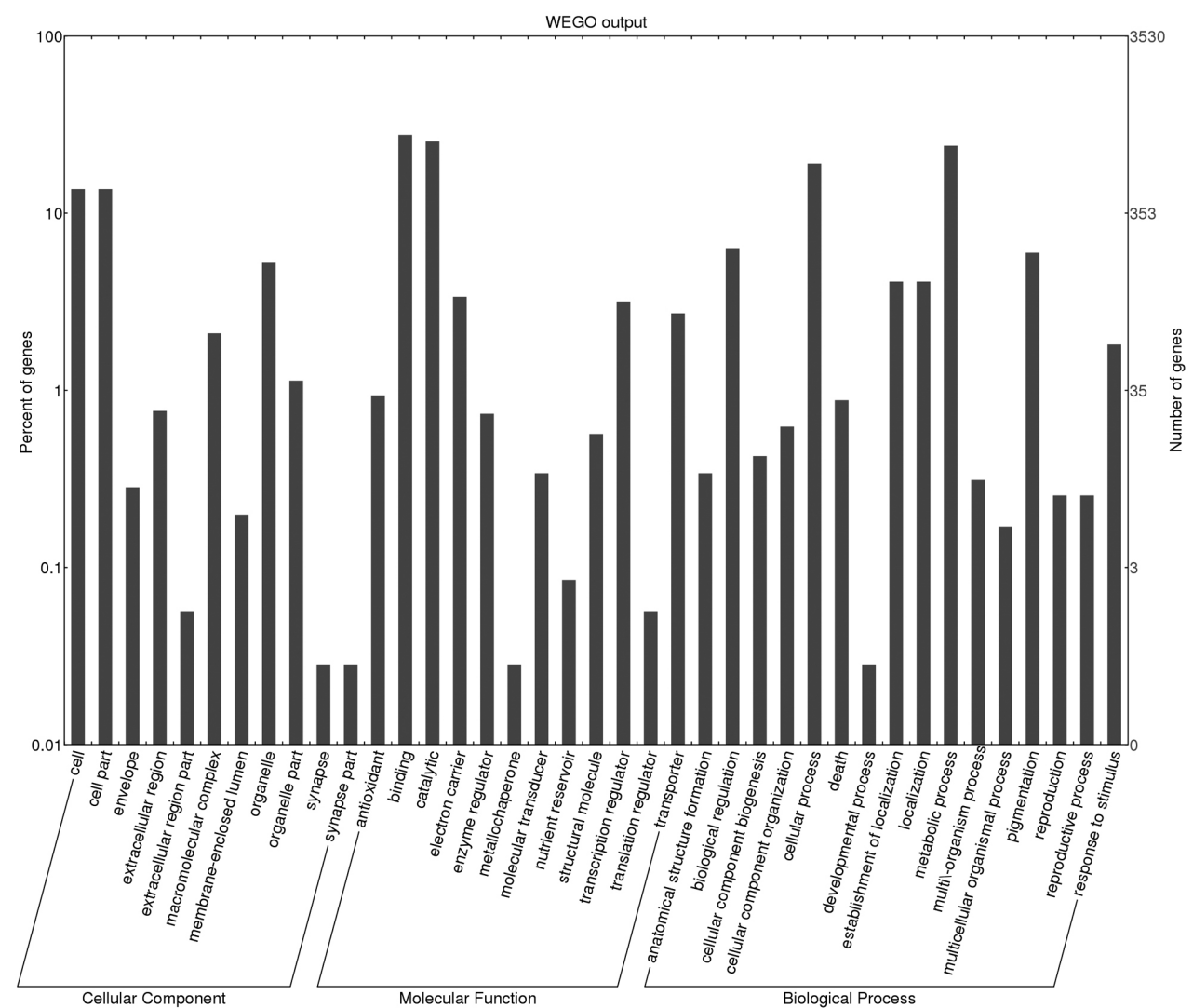


图 3 差异表达基因的 GO 分类

Fig. 3. Histogram presentation of gene ontology classification of differential expressed genes.

3529 个基因向 KEGG 数据库的各个条目映射后,进行通路显著性富集分析:差异表达基因显著富集在 13 个 KO 条目上(表 4),占总数目的 4.58%。其中,光合作用(KO 00195, photosynthesis)通路富集最为显著。此外,在氮代谢(KO 00910, nitrogen metabolism)、苯丙素合成(KO 00940, phenylpropanoid biosynthesis)、苯丙氨酸代谢(KO 00360, phenylalanine metabolism)、转录因子(KO 03000, transcription factors)、植物激素信号转导(KO 04075, plant hormone signal transduction)、氨基糖和核苷酸糖代谢(KO 00520, amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、植物病原互作(KO 04626, plant-pathogen interaction)以及淀粉和蔗

糖代谢(KO 00500, starch and sucrose metabolism)通路上富集的差异表达基因数目较多。在氮代谢和植物病原互作这两个通路中富集的差异表达基因均为下调,而在光合天线蛋白通路中富集的差异表达基因均为上调。450-3 中显著富集的 KO 条目见表 4。

2.6 功能基因的 RT-PCR 验证

对靶基因 *CYP81A6*、P450 基因 *CYP78A9*^[12]和 *CYP86A1*^[13]以及 450-3 中上下调最显著的两个基因 *STBXGAS31* (上调倍数为 15.37)和 *RIR1b* (下调倍数为 17.85),进行荧光定量 PCR 验证。

结果表明,与亲本秀水 110 相比,P450 家族基因 *CYP78A9* 和基因 *GAS31* 在转基因水稻 450-3

表 4 富集 KO 条目上的差异基因数目

Table 4. Numbers of differential expressed genes in enriched KO term.

KO 条目 KO term	差异表达基因数 Differential expressed gene number	总基因数 All gene number	Case 基因数		P 值 P-value	KO 注释 KO annotation
			Case gene number			
			上调 Up regulated	下调 Down regulated		
KO 00195	14	41	12	2	1.43×10^{-6}	光合作用 Photosynthesis
KO 00910	12	32	—	12	2.65×10^{-6}	氮代谢 Nitrogen metabolism
KO 00196	8	15	8	—	5.63×10^{-6}	光合作用细胞中的天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins
KO 00940	15	53	1	14	8.56×10^{-6}	苯丙素生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis
KO 00360	13	48	2	11	5.77×10^{-5}	苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism
KO 03000	21	108	1	20	8.10×10^{-5}	转录因子 Transcription factors
KO 04075	22	129	5	17	4.05×10^{-4}	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction
KO 00520	17	89	4	13	4.85×10^{-4}	氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
KO 04626	13	68	—	13	2.20×10^{-3}	植物病原互作 Plant-pathogen interaction
KO 00904	5	15	3	2	4.69×10^{-3}	双萜类生物合成 Diterpenoid biosynthesis
KO 00500	15	95	2	13	7.08×10^{-3}	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism
KO 02000	5	17	1	4	8.48×10^{-3}	转运子 Transporters
KO 04540	5	17	1	4	8.48×10^{-3}	缝隙连接 Gap junction

“—”：无差异表达基因。
“—”，No differential expressed genes.

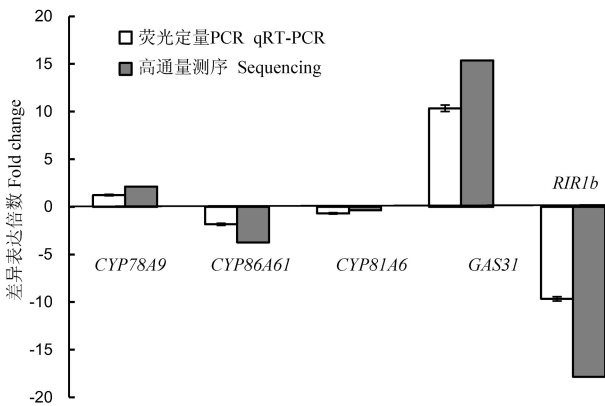


图 4 基因表达量的荧光定量 PCR 的一致性验证
Fig. 4. qRT-PCR validation of expression of some genes.

中均显著上调表达,而基因 *CYP81A6*、P450 家族基因 *CYP86A1* 和基因 *RIR1b* 在 450-3 中表达均显著下调,该结果与测序结果一致(图 4)。

3 讨论

本研究利用超高通量测序技术对转基因水稻和亲本所有 mRNA 进行深度测序,并用生物信息学手段进行注释和功能基因比较,可明确利用 RNAi 技术抑制基因 *CYP81A6* 的表达对亲本水稻自身基因的表达产生影响。其中包含对部分水稻抗性相关基因的影响,而对抗病和抗逆境的影响尤为明显。

抗虫相关基因 *OsPLDα4* 在虫害诱导水稻的直接及间接防卫过程中起重要作用^[14]; *OsTPS3* 基因可以催化合成挥发性倍半萜烯,在水稻植株间接防御中有重要作用^[15]。本研究中,基因 *OsPLDα4* 和 *OsTPS3* 在 450-3 中的表达明显下调,说明基因 *CYP81A6* 的抑制表达有可能对水稻的抗虫防御过程产生不利的影响。

在抗病相关上下调表达最显著的 10 个基因中,6 个基因与水稻的病原菌抗性相关,4 个基因涉及水稻的抗病应答及防卫反应。与病原菌抗性相关的基因中,*OsKOS1*^[16] 体外与水稻矮缩病毒 P2 蛋白作用会导致水稻矮缩病的形成,该基因在 450-3 中上调表达将有可能降低水稻植株对矮缩病的抗性。此外,其他 5 个与病原菌抗性相关基因在 450-3 中均下调表达。其中,*OsACS2*^[17] 和 *pi-21*^[18] 基因与水稻稻瘟病抗性相关;*OsAOS2*^[19-20] 的过量表达会提高植株对真菌感染的寄主抗性,这 3 个基因的下调表达可能会导致 450-3 植株对稻瘟病等真菌性病害的抗性减弱。基因 *Os-11N3*^[21] 在促进白叶枯病发病过程中发挥特异作用,*OsPFA-DSP2*^[22] 在水稻中负调控转基因植株对病原菌的响应,这两个基因在 450-3 内均为负调控植株对病原菌的抗性,其下调表达将有可能提高 450-3 对白叶枯病以及其他病原菌的抗性。与水稻抗病应答及防卫反应相关的基因

中,*OsSGT1*^[23]是水稻化学诱导抗病性的关键因子,该基因在450-3中的上调表达预示着植株在化学诱导方面的抗病性将有可能会有所提高。基因*OsBIERF3*^[24]、*OsWRKY 71*^[25]和*OsGH3-8*^[26-27]均在450-3植株的抗病应答以及防卫反应中起重要作用,这些基因的下调表达将有可能对450-3的抗病反应产生不利的影响。

在抗逆相关上下调表达最显著的10个基因中,4个基因与水稻盐胁迫防御相关,3个基因与耐旱性相关,另有2个开花抑制因子和1个热胁迫防御因子。与盐胁迫相关的基因中,*OsFRDL4*^[28]是水稻对高铝耐受的一个组分,*OsHAK5*^[29]能够用来提高植物细胞对盐的耐受性,这两个基因在450-3中的上调表达将有可能提高植株的耐盐性。基因*OsIRO2*^[30]是水稻在缺铁条件下铁吸收基因的关键调节因子,*OsRMC*^[31-32]在植物的盐胁迫反应中也起到非常重要的作用。这两个基因在450-3中均显著下调表达。目前已有研究报道,在缺铁条件下,*OsIRO2* RNAi植株的生长受到抑制、叶片发黄;而基因*OsRMC*在RNAi植株内的下调表达,会导致转基因株系的种子萌发对盐胁迫不敏感,植株生长受抑。耐旱性相关基因中,*OsNAC10*^[33]在水稻根部的特异表达会增大根系,提高水稻抗干旱能力和产量;*OsDREB1E*^[34]的过量表达可以略微提高水稻耐旱性;*OsLEA3*^[35]与水稻的耐旱性有关,带有合适启动子的*OsLEA3-1*的过表达植株耐旱性显著增强,这3个基因的下调表达将可能对450-3植株的耐旱性产生不利的影响。基因*OsCOL4*^[36]和基因*DTH8*^[37]均是水稻中的开花抑制因子,基因*OsHsfA2d*^[38]是水稻热胁迫防御响应中的中心调节子。这3个基因在450-3中的上调表达将有可能对450-3植株的花期以及热胁迫防御产生直接的影响。

GO功能显著性富集分析显示转基因水稻450-3中差异表达基因显著富集的生物功能有38种,其中36种主要归属分子功能大类和生物过程大类。这说明RNAi技术干扰基因*CYP81A6*的表达会对450-3的分子功能和生物过程产生主要影响。与RNAi靶基因*CYP81A6*映射的GO条目有4个:单加氧酶活性(GO: 0004497)、铁离子结合能力(GO: 0005506)、亚铁血红素结合能力(GO: 0020037)和电子载体活性(GO: 0009055)。这4个GO条目均位于450-3中显著富集的GO条目前5位,表明

*CYP81A6*对基因的抑制表达会对其家族其他同功能基因产生重要影响。

通路显著性富集分析显示,450-3中有13个通路显著富集差异表达基因,这预示着在转基因水稻450-3植株内这些生物合成途径将有可能受到显著影响。其中,光合作用(KO 00195)通路受到的影响最为显著。靶基因*CYP81A6*在水稻体内与5条通路相关:二苯乙烯类化合物、姜酚的生物合成(KO 00945)、双酚降解(KO 00363)、多环芳香烃的降解(KO 00624)、Famino 苯甲酸的降解(KO 00627)以及柠檬烯和 α -蒎烯的降解(KO 00903)。对所有与这5条通路相对应的基因进行分析发现,仅有4个基因与这些通路对应,包括1个邻羟基肉桂酸转移酶基因,1个P450家族基因和两个醛脱氢酶基因。对比发现仅P450基因是5条通路共有的基因,预示该基因与靶基因*CYP81A6*可能有某种程度的联系。在富集最显著的5条通路中,2条通路与光合作用相关(KO 00195, KO 00196),2条通路与苯丙素合成代谢相关(KO 00940, KO 00360),另1条通路与氮代谢(KO 00910)相关。目前已有研究表明,苯丙氨酸代谢通路中的苯丙氨酸裂解酶与植物的防御系统相关,这预示着基因*CYP81A6*的抑制表达将有可能导致450-3植株的抗病性发生改变^[39]。

本研究结果表明,基因*CYP81A6*的抑制可对亲本水稻原有的基因表达产生一定的影响,这些影响有正效应,也有负效应,可为转基因水稻的安全性评价提供科学依据。

参考文献:

- [1] Losey J E, Rayor L S, Carter M E, et al. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, 399(6733): 214-214.
- [2] Novak W K, Haslberger A G. Substantial equivalence of anti-nutrients and inherent plant toxins in genetically modified novel foods. *Food & Chem Toxicol*, 2000(38): 473-483.
- [3] Pan G, Zhang X Y, Liu K D, et al. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol Biol*, 2006, 61: 933-943.
- [4] Lee D S, Nioche P, Hamberg M, et al. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature*, 2008, 455: 363-368.
- [5] Miyoshi K, Ahn B O, Kawakatsu T, et al. PLASTO-CHRON1, a timekeeper of leaf initiation in rice, encodes cytochrome P450. *PNAS*, 2004, 101: 875-880.

- [6] Chaban C, Waller F, Furuya M, et al. Auxin responsiveness of a novel cytochrome p450 in rice coleoptiles. *Plant Physiol*, 2003, 133: 2000-2009.
- [7] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, et al. A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *Plant Cell*, 2003, 15: 2900-2910.
- [8] Zhu Y Y, Nomura T, Xu Y H, et al. ELONGATED UPPER-MOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell*, 2006, 18: 442-456.
- [9] Lin C Y, Fang J, Xu X L, et al. A built-in strategy for containment of transgenic plants: Creation of selectively terminable transgenic rice. *PLoS One*, 2008, 3: e1818.
- [10] Audic S, Claverie J M. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 1997, 7: 986-95.
- [11] Zhang L, Lu Q, Chen H G, et al. Identification of a cytochrome P450 hydroxylase, CYP81A6, as the candidate for the bentazon and sulfonylurea herbicide resistance gene, *Bel*, in rice. *Mol Breeding*, 2007, 19: 59-68.
- [12] Ito T, Meyerowitz E M. Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2000, 12: 1541-1550.
- [13] Hofer R, Briesen I, Beck M, et al. The *Arabidopsis* Cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J Exp Bot*, 2008, 59: 2347-2360.
- [14] Qi J F, Zhou G X, Yang L J, et al. The chloroplast-localized phospholipases D $\alpha 4$ and $\alpha 5$ regulate herbivore-induced direct and indirect defenses in rice. *Plant Physiol*, 2011, 157: 1987-1999.
- [15] Cheng A X, Xiang C Y, Li J X, et al. The rice (E)- β -caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, 2007, 68(12): 1632-1641.
- [16] Zhu S F, Gao F, Cao X S, et al. The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. *Plant Physiol*, 2005, 139(4): 1935-1945.
- [17] Iwai T, Miyasaka A, Seo S, et al. Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiology*, 2006, 142: 1202-1215.
- [18] Fukuoka S, Saka N, Koga H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science*, 2009, 325: 998-1001.
- [19] Haga K, Iino M. Phytochrome-mediated transcriptional up-regulation of allene oxide synthase in rice seedlings. *Plant & Cell Physiol*, 2004, 45(2): 119-128.
- [20] Mei C S, Qi M, Sheng G Y, et al. Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. *Mol Plant-Microbe Int*, 2006, 19: 1127-1137.
- [21] Antony G, Zhou J H, Huang S, et al. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell*, 2010, 22: 3864-3876.
- [22] He H J, Su J B, Shu S Y, et al. Two homologous putative protein tyrosine phosphatases, *OsPFA-DSP2* and *AtPFA-DSP4*, negatively regulate the pathogen response in transgenic plants. *PLoS One*, 2012, 7: e34995.
- [23] Umemura K, Satou J, Iwata M, et al. Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, *OsSGT1*, to chemically induced disease resistance in rice plants. *Plant J*, 2008, 57: 463-472.
- [24] Cao Y F, Song F M, Goodman R M, et al. Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress. *J Plant Physiol*, 2006, 163(11): 1167-1178.
- [25] Liu X Q, Bai X Q, Wang X J, et al. *OsWRKY71*, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 969-979.
- [26] Ding X H, Cao Y L, Huang L L, et al. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell*, 2008, 20: 228-240.
- [27] Yadav S R, Khanday I, Majhi B B, et al. Auxin-responsive OsMGH3, a common downstream target of OsMADS1 and OsMADS6, controls rice floret fertility. *Plant & Cell Physiology*, 2011, 52(12): 2123-2135.
- [28] Yokosho K, Yamaji N, Ma J F. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J*, 2011, 68: 1061-1069.
- [29] Horie T, Sugawara M, Okada T, et al. Rice sodium-insensitive potassium transporter, *OsHAK5*, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells. *J Biosci & Bioengin*, 2011, 111(3): 346-356.
- [30] Ogo Y, Itai R N, Nakanishi H, et al. The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *Plant J*, 2007, 51: 366-377.
- [31] Zhang L, Tian L H, Zhao J F, et al. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiol*, 2009, 149: 916-928.
- [32] Jiang J F, Li J H, Xu Y Y, et al. RNAi knockdown of *Oryza sativa root meander curling* gene led to altered root development and coiling which were mediated by jasmonic acid signaling in rice. *Plant, Cell & Environ*, 2007, 30(6): 690-699.
- [33] Jeong J S, Kim Y S, Baek K H, et al. Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol*, 2010, 153(1):

185-197.

- [34] Chen J Q, Meng X P, Zhang Y, et al. Over-expression of *Os-DREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Bio-technol Lett*, 2008, 30: 2191-2198.
- [35] Xiao B Z, Huang Y M, Tang N, et al. Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet*, 2007, 115(1): 35-46.
- [36] Lee Y S, Jeong D H, Lee D Y, et al. *OsCOL4* is a constitutive flowering repressor upstream of *Ehd1* and downstream of *Os-phyB*. *Plant J*, 2010, 63(1): 18-30.
- [37] Wei X J, Xu J F, Guo H N, et al. *DTH8* suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. *Plant Physiol*, 2010, 153(4): 1747-1758.
- [38] Wang C, Zhang Q, Shou H X. Identification and expression analysis of *OsHsfs* in rice. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10: 291-300.
- [39] Diallinas G, Kanellis A K. A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 473-479.

《植物遗传资源学报》2014 年征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据 2011 年度中国期刊引证研究报告统计,《植物遗传资源学报》影响因子为 1.396,在自然科学与工程技术类学科排名第 9。

报道内容为大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,大 16 开本,196 页。定价 20 元,全年 120 元。各地邮局发行。邮发代号:82-643。国内刊号 CN11-4996/S,国际统一刊号 ISSN1672-1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。地址:北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部;邮编:100081;电话:010-82105794 010-82105796(兼传真);网址:www.zwyczy.cn; E-mail: zwyczyxb2003@163.com; zwyczyxb2003@sina.com。