

应用差异蛋白质组学方法分析 作物化感作用的分子机理

何华勤^{1,2}, 林文雄^{1,2*}, 梁义元², 宋碧清², 柯玉琴^{1,2}, 郭玉春^{1,2}, 梁康迺²

(1. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002; 2. 农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002)

摘要: 试验旨在分析运用分子标记技术(QTL)和差异蛋白质组学技术研究作物化感作用分子机理的差异性。首先运用差异蛋白质组学技术探讨在生物胁迫(稗草)下水稻化感作用潜力变化的内在分子机理。分别用稗草和水稻的根系分泌物培养切自一株5叶龄化感水稻PB12777植株并经恢复的2个分蘖。7d后, 提取处理和对照相同叶位叶片的全蛋白质并进行双向电泳, 每张电泳胶片上获得800多个电泳斑点, 其中差异表达的蛋白质点有4个。采用MALDI-TOF-MS对各差异蛋白质点进行肽质量指纹图谱分析, 经过SWISS-PROT数据库查询, 结果表明化感水稻PB12777在稗草胁迫下的特异蛋白分别与苯丙氨酸氨解酶(PAL)、硫还原型蛋白(Trx_m)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGGR)和过氧化物酶(POD)相匹配。根据编码以上4个差异蛋白质的DNA序列, 发现编码以上4个差异蛋白的基因分别位于水稻染色体4、7、8和12上的特定克隆位点, 这就是与化感作用相关基因。前人也运用QTL方法开展作物化感作用的分子机理研究, 但由于所采用的供体材料、受体植物及对表型性状的评价方法等的不同, 定位结果存在较大的差异。综合比较两种方法后认为, 运用差异蛋白质组学技术分析水稻化感作用的分子机理, 比QTL技术更加直接和深入。因为比较胁迫处理和对照植物组织的2-DE图谱将能鉴定出由表达候选基因编码的胁迫蛋白质, 氨基酸残基序列的测定将揭示那些功能与胁迫性状密切相关的蛋白质, 这种编码的基因就是兼具功能与表达的候选基因。

关键词: 化感水稻; 环境胁迫; 差异蛋白质组学; 分子机理

文章编号: 1000-0933(2005)12-3141-05 中图分类号: S511 文献标识码: A

Analyzing the molecular mechanism of crop allelopathy by using differential proteomics

HE Hua-Qin^{1,2}, LIN Wen-Xiong^{1,2*}, LIANG Yi-Yuan², SONG Bi-Qing², KE Yu-Qin^{1,2}, GUO Yu-Chun^{1,2}, LIANG Kang-Jing² (1. School of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, China). Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(12): 3141~3145

Abstract In this paper, differential proteomic method was employed to study the molecular mechanism of crop allelopathy. The traditional QTL method was also compared. Experiments were conducted to determine the molecular mechanism of rice allelopathy under the biotic stresses induced by barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.). One of the two cloning tillers, obtained from single rice plant at 5 leaf-stage, was cultivated in pots with the addition of root exudates of either rice or barnyardgrass, respectively. At 7d, their leaf proteins were extracted for two-dimensional electrophoresis (2-DE). More than 800 proteins were resolved in each 2-DE gel and four leaf proteins displayed differentially. The four proteins showed high degree of reproducibility in the allelopathic rice response to the stresses of barnyardgrass. Individual protein spots were excised respectively from the 2-DE gel and measured by MALDI-TOF-MS. Their Peptide Mass Finger Prints (PMF) were obtained. Further SWISS-PROT database search identified four matched proteins: peroxidase 2 precursor (POD), phenylalanine

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200170, 30471028); 福建省自然科学基金重大资助项目(2002F012, B0510013)

收稿日期: 2005-03-06; **修订日期:** 2005-09-27

作者简介: 何华勤(1968~), 男, 博士, 副教授, 主要从事作物化感作用研究. E-mail: hehuaqin@pub2.fz.fj.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30471028, 30200170), and the Key Scientific Technological Program of Fujian Province, China (No. 2002F012, B0510013)

Received date: 2005-03-06; **Accepted date:** 2005-09-27

Biography: HE Hua-Qin, Ph.D., Associate professor, mainly engaged in crop allelopathy. E-mail: hehuaqin@pub2.fz.fj.cn

ammonia-lyase (PAL), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 3 (HGM R) and thioredoxin M-type (Trx m). The genes encoding these four differential proteins were located on the chromosome 4, 7, 8, and 12 of rice. The QTLs of rice allelopathy varied with the donor plants, receiver plants and bioassay methods used. QTL analysis based on its approximate map locations and its small effects on phenotype proved to be inefficient. Advances in proteomics provide opportunities for accurate identification of positional, functional and expressional genes. By comparison of 2-DE protein patterns obtained from the treated and untreated plants, a set of stress-responsive proteins encoded by expressional candidate genes could be identified. Sequencing of these stressed-responsive proteins will then reveal the gene functions associated with the stress tolerant trait. The encoding genes will thus be regarded as both expressional and functional candidate genes.

Key words: allelopathic rice (*Oryza sativa* L.); environmental stresses; differential proteomics; molecular mechanism

据 Olofsdotter 报道, 化感作用对水稻在田间抑草作用能力的贡献率高达 34%^[1]。为此, 选育具有较强化感作用潜力的作物新品种, 抑制田间杂草, 降低人类对除草剂的依赖程度, 是化感作用研究与应用的方向。Dilday 等^[2]首先进行了有益的探索, 选择到既具有较强化感作用潜力又保持优良性状的水稻品种 P B12777。西非水稻发展联合体 (West African Rice Development Associated, WARDA) 也启动一项由各方面专家联合开展的研究计划, 旨在设计具有较好竞争性状的水稻新品种。但作物化感作用属数量性状, 受多基因控制, 不同基因控制和表达的时期也不同^[3~5]。因此, 应不断发现、定位、标记和克隆水稻化感作用新基因, 丰富和有效聚合可利用的化感作用基因。在此基础上, 才能有针对性的选用非等位化感作用基因的水稻品种作为亲本材料, 配置杂交组合, 获得化感作用基因聚合的高产水稻新品种。Jensen 等、Enaba 等、曾大力等和徐正浩等分别开展水稻化感作用的 QTL 定位研究^[6~9], Wu 等也运用 QTL 技术对控制小麦化感作用的基因进行定位^[10]。但其定位结果因供体材料的差异、所选用受体植物 (莠苣或稗草) 的不同以及对表型性状 (化感作用潜力) 评价方法的不同而差异明显。

Einhellig 等^[11]的研究认为植物化感物质的产生与释放受外部环境条件的调节。H. Wu 等^[12]也认为环境胁迫能调节基因表达, 加快化感物质的合成, 促进化感物质从植物内部释放到外部环境中, 提高植物的化感作用潜力。环境胁迫包括生物胁迫, 如伴生杂草胁迫和非生物胁迫, 如光、温、营养胁迫等。Kim 等^[13]认为随着伴生杂草密度的增大, 水稻的化感作用潜力随之提高。但环境胁迫引起水稻化感作用潜力变化的分子机理尚不明确。而近年来应用蛋白组学和生物信息学技术探讨水稻逆境胁迫响应的分子机理取得了较大的进展^[14~17]。因此, 运用差异蛋白组学和生物信息学技术分析生物胁迫 (稗草胁迫) 下化感水稻抑草作用的差异蛋白质表达, 进而定位出化感作用相关基因, 这可能要比以往的 QTL 定位研究更加直接和深入。但有关该方面的研究尚未见报道。

为此, 本文运用差异蛋白质组学的方法, 探讨在稗草胁迫下国际公认具有强化感作用的水稻品种 P B12777 抑草作用潜力变化的分子机理。然后分析运用差异蛋白质组学和 QTLs 方法研究水稻化感作用分子机理的差异性, 这将为最终实现功能克隆、分子操纵水稻的化感作用潜力奠定理论基础。

1 材料与方法

以具有较强化感作用潜力的水稻品种 P B12777 (来自美国) 为供体材料 (Donor plant)。试验中以收集于田间得稗草 (*Echinochloa crusgalli* L.) 为生物胁迫。选取长势良好的 5 叶龄水稻苗, 小心切取长势较均匀的两分蘖, 分别移栽到塑料盆中用水稻生长全培养液培养恢复待用。而在另两盆 2.5 L 的全培养液中分别培养 3 叶龄水稻苗和稗草苗各 15 株。10d 后, 移去水稻和稗草苗, 收集各自剩余的培养液, 测试其中的 N、P、K 含量并补充至全培养液水平, 然后分别播上经恢复后的供试水稻分蘖苗。以稗草根分泌物培养的水稻分蘖苗为处理, 以相同品种水稻的根系分泌物培养的分蘖苗为对照。7d 后, 分别选取相同叶位的叶片, 液氮速冻后备用。3 次重复。

1.1 差异蛋白质的分离与质谱分析

聚丙烯酰胺凝胶双向电泳参照何华勤^[18]及 O'Farrel 等^[19]的方法进行。银盐染色参照王新等的方法略作修改进行^[20]。选取差异蛋白质点, 其胶内酶解参照 Bergman 等的方法进行^[21]。运用德国 BRUKER 公司的 Reflex™ III MALDI-TOF 质谱仪进行 MALDI-TOF/MS 分析, 得到各蛋白质点的肽质量指纹图谱。

1.2 数据库查询

根据 MALDI-TOF/MS 的测试结果, 通过网站 <http://www.expasy.org/tools/peptide.html> 和 <http://www.matrixscience.com> 进行查询。查询的条件: 肽质量指纹图谱中的肽片断质量控制 800~3500 kDa, 表观 MW 的误差范围为 20%, 对表观的 pI 值未做要求, 在查询所得到的结果中根据电泳结果进行筛选。肽片段分子量最大容许误差范围为 0.5 Da, 每个肽允许有 2 个不完全裂解位点, 物种来源选择水稻栽培种, 离子选择 $[M+H]^+$ 和 monoisotopic, 最少匹配肽片段规定为 4, 半胱氨酸为碘乙酰胺处理。

2 结果与分析

对稗草胁迫下化感水稻 P B312777 叶片中的蛋白进行双向电泳, 获得稳定性较好的电泳图谱, 结果见图 1。由 Gel Doc2000 凝胶成像系统获取 2D 胶银染后的图象, 利用 2-DE 电泳分析专用软件 M ELAN IE 3 对电泳胶点进行胶点分析, 结果表明在处理和对照的电泳图谱中均得到 800~ 900 多个清晰的蛋白质点, 且大部分清晰的胶点分布在等电点 pI 为 4 0~ 9 0 和分子量 MW 为 14 4KD~ 99 0KD 区间的范围内。

通过 M ELAN IE 3 胶分析软件, 将处理与对照的电泳图谱迭合, 寻找出两张图谱上明显差异(含量差值大于 1 5 倍)的蛋白质点, 分别标记为 1、2、3 和 4(图 1)。其中蛋白质点 1 和 4 出现在稗草胁迫的化感水稻 P B312777 叶片(处理)的电泳胶片中, 而在无稗草胁迫的 P B312777 叶片(对照)电泳胶片中不出现。蛋白质点 2 和 3 在处理中的表达量大, 而在对照中表达量小(图 2)。

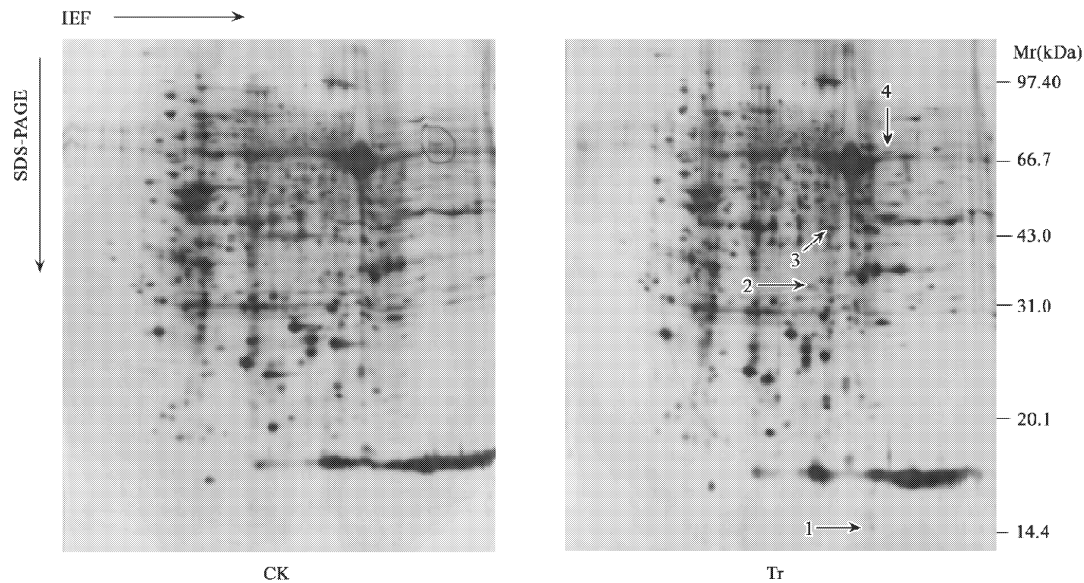


图 1 稗草胁迫(Tr)和对照(CK)的化感水稻 P B312777 叶片中的蛋白质电泳图谱

Fig 1 2-DE map of total protein from the leaf of P B312777 stressed by weed(Tr)and Control(CK)

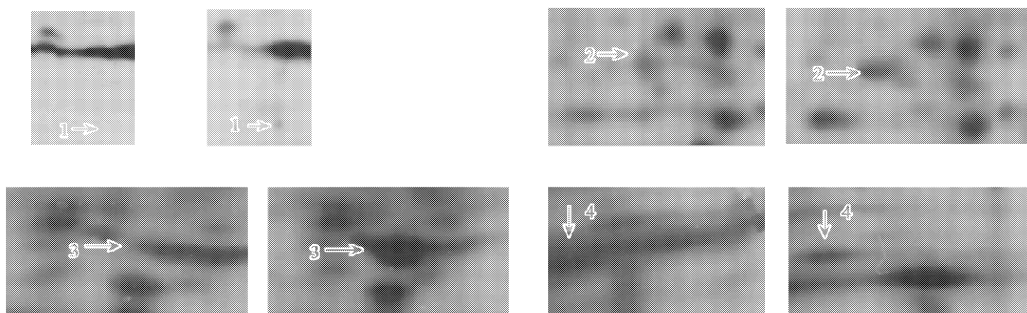


图 2 对照(A)与处理(B)的化感水稻 P B312777 叶片中的差异蛋白质变化

Fig 2 Changes of differential expressions in the leaf of P B312777 untreated (A) and treated(B)w with the weed stresses

图中数字代表不同的蛋白质点Numbers represent different spots

从电泳胶片上, 小心切取差异蛋白质点 1、2、3 和 4, 经酶解后运用 M AL T FTOF M S 进行肽质量指纹图谱分析, 根据各差异蛋白质点的肽质量指纹图谱(P M F)在 S W I S S - P R O T 数据库中进行搜索, 获得各差异蛋白质点的匹配蛋白。结果表明, 差异蛋白质点 1、2、3 和 4 分别与水稻中的 M -型的硫还原蛋白酶 (T R X m)、过氧化物酶(P O D 2)的前体物、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(H M G R)、苯丙氨酸氨解酶(P A L)相匹配。同时稗草胁迫下化感水稻的生理生化试验结果也证实了 T R X m 酶、 P O D 2 酶、 H M G R 酶、 P A L 酶是胁迫下化感水稻中的差异表达蛋白^[18]。

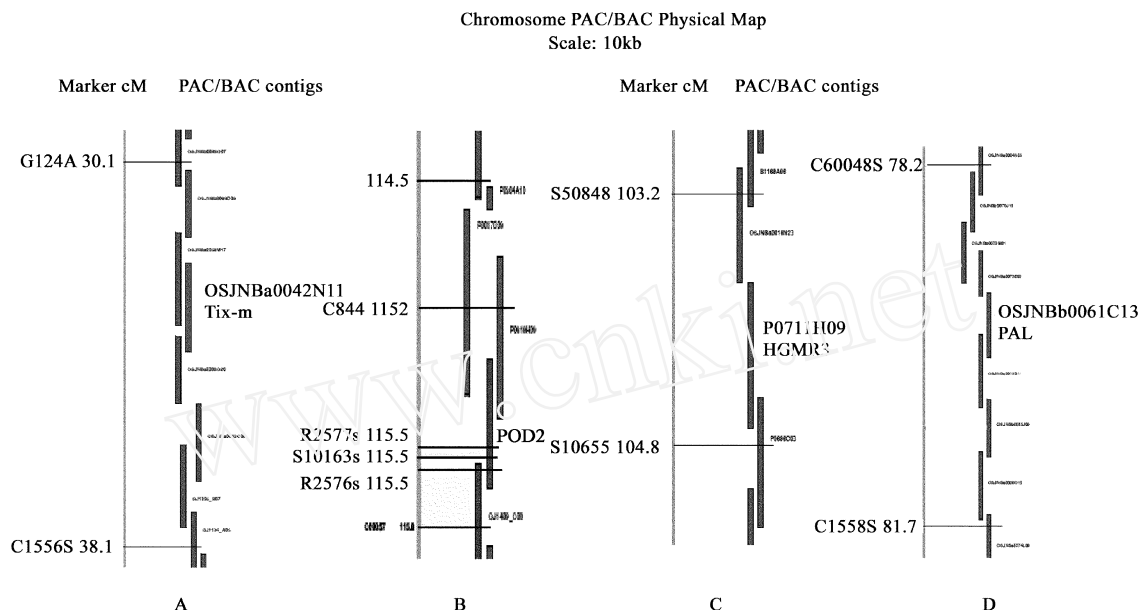


图3 编码蛋白质 Trx-m (A)、POD2(B)、HGM3(C) 和 PAL 酶(D)的基因定位

Fig. 3 The location of gene encoding Trx-m (A), POD2(B), HGM3(C) and PAL (D) at rice chromosome

根据编码以上4个蛋白质的DNA序列,在水稻的12条染色体上定位出相关的基因,结果见图3。由图3可见,编码以上4个差异蛋白质的基因分别位于水稻第4、7、8和12条的染色体上。

3 讨论

寻找控制作物重要性状的主要基因和QTL定位是功能基因组学的一个重要任务。为了丰富可利用的化感作用基因,推动化感水稻的选育及其在生产上的推广和运用,近年来各国研究人员通过各种研究手段对新的化感作用基因进行定位、标记和克隆。本研究从化感水稻在稗草胁迫下被诱导的特异蛋白入手,根据编码蛋白质的核苷酸序列,运用生物信息学技术,分别在水稻的第4、7、8、12条染色体上定位出4个控制水稻化感作用潜力的特定克隆基因位点。这种精确的基因定位技术为下一步运用辅助标记技术(MAS)进行水稻特殊性状选育的研究奠定坚实的基础。Salekdeh等认为如果QTL的定位能够达到特定克隆基因的水平,辅助标记技术(MAS)将变得更加有效,因为基因本身就是一种标记,不需要连锁标记(linked marker)^[16]。

比较分析前人对作物化感作用的QTLs定位结果,可发现明显存在两个方面的问题。一是前人对化感作用QTL定位的间距都较大,与本研究的精确定位尚有一定区别。Jensen等^[6]将控制水稻化感作用潜力的基因定位在第2、3、3、8染色体上,但其构建的DNA标记平均距离为14cm。当一个QTL定位间距为5~10cm时,在这间距上可能有100甚至更多的基因,这些基因只能称为QTL的“位置候选基因(positional candidate genes)”^[22]。只有当能够了解这上百个基因的序列,并且其中与QTL定位性状相关的基因被确定下来,这些基因称为“位置和功能候选基因(positional and functional candidate gene)”,而其余的大部分基因应被剔除^[22]。二是前人的QTL定位结果均来源于一个近似连锁图谱,近似连锁图谱对表型性状的应用效果较差^[23]。前人对水稻化感作用的QTLs研究,都是从表型性状(化感作用潜力)上来区分这些基因。Jensen等^[6]运用“迟播共培法”,Enaba等^[7]运用“水浸提法”评价化感作用潜力的高低,然后通过连锁图谱上的DNA标记,定位出相关基因。但Huang等、Shihua Shen等研究认为要从表型性状上区分这些具有类似功能的基因难度很大,因为具有类似功能的基因是以金字塔的速度增加,如具有类似功能的抗病基因^[24, 25]。

本研究运用差异蛋白质组学技术找到在同一时间、相同组织(叶片)、作为相同性状(化感抑草潜力)的基因型表达出来的基因,这些基因可以称为“位置和表达的候选基因(positional and expressional candidate genes)”^[26]。从本研究结果可见,通过比较胁迫处理和对照植物组织的2-DE图谱将能鉴定出由表达候选基因编码的胁迫蛋白质,氨基酸残基序列的测定将揭示那些功能与胁迫性状密切相关的蛋白质,这种编码的基因就是兼具功能与表达的候选基因。然后可以根据编码蛋白质序列信息设计DNA引物后克隆相关基因,通过转基因或反基因的后代检测其对性状的贡献率。本研究结果证实了这种功能克隆的可行性,为深入开展分子育种工作奠定了坚实的理论基础。

References

[1] Olofsdotter M. Getting closer to breeding for competitive ability and the role of allelopathy—an example from rice (*Oryza sativa* L.).

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

- Weed Technology*, 2001, **15**: 798~806
- [2] Dilday R H, Yan W G, Moldenhauer K A, *et al* Allelopathic activity in rice for controlling major aquatic weeds. In: M. Olofsdotter ed *Allelopathy in Rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 1998 7~26
- [3] Olofsdotter M. Rice—A step toward use of allelopathy. *Agronomy J*, 2001, **93**: 3~8
- [4] He H Q, Shen L H, Xiong J, *et al* Conditional Genetic Effect of Allelopathy in Rice (*Oryza sativa* L.) under Different Environmental Conditions. *Plant Growth Regulation*, 2004, **44**(3): 211~218
- [5] Lin W X, Dong Z H, Chen X X, *et al* Analysis on Dynamic Heterosis for Allelopathy in Rice under Different Environment Conditions. *Agriculture Science in China*, 2003, **2**(7): 707~714
- [6] Jensen L B, Courtois B, Shen L S, *et al* Locating genes controlling allelopathic effects against barnyardgrass in upland rice. *Agronomy J*, 2001, **93**: 21~26
- [7] Ebana K, Yan W G, Dilday R H, *et al* Analysis of QTL associated with the allelopathic effect of rice using water-soluble extracts. *Breeding Science*, 2001, **51**: 47~51
- [8] Zeng D L, Qian Q, Teng S, *et al* Genetic analyses on rice allelopathy. *Chin Sci Bull*, 2003, **48**(1): 70~73
- [9] Xu Z H, He Y, Cui S R, *et al* Gene mapping on rice allelopathy against barnyardgrass. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, **14**(12): 2258~2260
- [10] Wu H, Pratley J, Ma W, *et al* Quantitative trait loci and molecular markers associated with wheat allelopathy. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, **107**: 1477~1481
- [11] Einhellig F A. Interactive effects of allelochemicals and environmental stress. In: Chou C H and Waller G R eds *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins, and Insect Pheromones and Allomones*. Institute of Botany. Academia Sinica Monograph Series no. 9, Taipei, China, 1989 101~106
- [12] Wu H, Pratley J, Lemerle D, *et al* Crop Cultivars with Allelopathy Capability. *Weed Research*, 1999, **39**: 171~180
- [13] Kim K U, Shin D H, Lee I J, *et al* Rice Allelopathy in Korea. In: K. U. Kim and D. H. Shin eds *Rice Allelopathy*. Korea Chan-Suk Park publish, 2000 57~82
- [14] Randeep Rakwal, Ganesh Kumar Agrawal. Rice proteomics: current status and future perspectives. *Electrophoresis*, 2003, **24**: 3378~3389
- [15] Ramanjulu S, Bartels D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment*, 2002, **25**: 141~151
- [16] Salekdeh G h, Sipongco J, Wade L J, *et al* A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research*, 2002, **76**: 199~219
- [17] Wasinger V C, Cordwell S J and Cerpa-Poljak A. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* 1995, **16**: 1090~1094
- [18] He H Q. Study on rice (*Oryza sativa* L.) allelopathy and its molecular mechanism. The thesis for the Ph.D degree. Fujian Agriculture and Forestry University, 2004 61~76
- [19] O'Farrell P S, Goodman H G, and O'Farrell P H. High resolution two-dimension electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Journal of Cell*, 1997, **12**: 1133~1142
- [20] Wang X, Wang B L, Zhang Z Y, *et al* The improvement and application of 2-DE technology in proteomics analysis. *J. Cell and Molecular Immunol*, 2001, **17**(2): 191~192
- [21] Bergman A C, Benjamin T, Laiya A, *et al* Identification of gel-separated tumor marker protein by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2001. 679~686
- [22] Zivy M and de Vienne D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology*, 2000, **44**: 575~580
- [23] Flowers T J, Koyama M L, Flowers S A, *et al* QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *J. Exp. Bot*, 2000, **51**: 99~106
- [24] Huang N, Angeles E R, Domingo J, *et al* Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet*, 1997, **95**: 313~320
- [25] Shen S H, *et al* Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics*, 2003, **3**: 527~535
- [26] Plumion C, Pionneau C, Brach J, *et al* Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Plant Physiology*, 2000, **123**: 959~969

参考文献

- [8] 曾大力, 钱前, 滕胜, 等. 水稻化感作用的遗传分析. *科学通报*, 2003, **48**(1): 70~73
- [9] 徐正浩, 何勇, 崔绍荣, 等. 水稻化感作用控制杂草的基因定位研究. *应用生态学报*, 2003, **14**(12): 2258~2260
- [18] 何华勤. 水稻化感作用及其分子机理研究. 福建农林大学博士学位论文, 2004 61~76
- [20] 王新, 王伯良, 张宗友, 等. 蛋白质组分析中双向电泳技术的改良和应用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, **17**(2): 191~192