

非生物胁迫下水稻 *OsMATE* 基因表达分析

张建军¹, 胥华伟², 周晓垂¹, 陈建东¹, 王玉琪^{1*}, 彭新湘¹

(1. 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642; 2. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: 从水稻(*Oryza sativa* L.)叶片中克隆到与高粱(*Sorghum bicolor*) *SbMATE* 最相似的同源基因 *OsMATE*, 利用半定量 RT-PCR 分析了 *OsMATE* 在水稻不同组织、不同非生物胁迫以及抗铝和铝敏感水稻品种中的表达。结果表明, *OsMATE* 在水稻根和叶中表达非常低, 叶鞘中几乎没有表达; 铝、镉、砷、盐、铁、PEG6000、百草枯和 ABA 等非生物胁迫都可以诱导水稻根 *OsMATE* 的大量表达, 而在水稻叶中, 只有砷、盐和 PEG6000 可以少量诱导 *OsMATE* 的表达; 并且铝毒胁迫下抗铝品种根中 *OsMATE* 的表达明显高于铝敏感品种。这说明非生物胁迫下 *OsMATE* 在水稻抗逆中可能发挥重要作用。

关键词: 水稻; *OsMATE*; 半定量 RT-PCR; 非生物胁迫

中图分类号: Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)04-0435-05

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.04.018

Expression Analysis of *OsMATE* in Rice under Abiotic Stresses

ZHANG Jian-jun¹, XU Hua-wei², ZHOU Xiao-chui¹, CHEN Jian-dong¹,
WANG Yu-qi^{1*}, PENG Xin-xiang¹

(1. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: *OsMATE*, the closest homology of sorghum (*Sorghum bicolor*) *SbMATE*, was cloned by PCR technique from rice (*Oryza sativa*) leaves, and then its expression pattern was analysed in different tissues and under abiotic stresses by semi-quantitative RT-PCR. The result showed that *OsMATE* expressed lowly in rice roots and leaves, and almost none in leaf sheaths. *OsMATE* expressed strongly in rice roots induced by abiotic stresses, such as aluminum (Al), cadmium, arsenic, salt, iron, PEG6000, paraquat and ABA, while little expressed in leaves by arsenic, salt and PEG6000 stress. The expression of *OsMATE* in roots of the Al-resistant 'XN1' was more than that in the Al-susceptible 'XX2' under Al stress. It suggested that *OsMATE* could play an important role in stress resistance of rice under abiotic stresses.

Key words: Rice; *OsMATE*; Semi-quantitative RT-PCR; Abiotic stresses

多药物和有毒化合物排出家族(Multidrug and toxic compound extrusion family, MATE family)属次级转运蛋白家族,广泛存在于细菌、真菌、植物和动物细胞中^[1-2]。MATE 蛋白一般由 400~700 个氨基酸组成,具有 12 个跨膜结构域。1998 年, Morita^[3] 首先证实副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的 MATE 蛋白具有运输

溴化乙锭和诺氟沙星等的的能力,后来又报道其也具有运输多种有机化合物的能力,如生物碱、黄连素和吡啶黄。植物中的 MATE 蛋白比动物和细菌中更多,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 中至少分别有 58 和 40 个基因属于 MATE 基因家族成员^[4],部分 MATE 基因家族成员证实具有

收稿日期: 2010-01-25 接受日期: 2010-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700052); 广东省自然科学基金博士启动项目(0700680); 华南农业大学校长基金项目(4600-K06332); 河南科技大学博士启动基金项目(09001271)资助

* 通讯作者 Corresponding author, email: wyq@scau.edu.cn

转运柠檬酸、类黄酮、生物碱、抗生素、甾和其它有毒化合物的作用^[5-10],并且过量表达 *MATE* 基因可提高植物对铝毒的抗性^[9-10]。

水稻是我国最重要的粮食作物之一,在国民经济中占有重要地位。近年来,干旱、盐害和重金属等非生物胁迫严重影响水稻的产量和品质。本实验室从抗铝水稻品种湘糯 1 号中克隆到 1 个与 *SbMATE* 最相似的同源基因 *OsMATE*,其仅在水稻根和叶中有微量表达,但能被铝毒大量诱导。本研究分析 *OsMATE* 在不同非生物胁迫以及抗铝和铝敏感品种中的表达差异,探讨 *OsMATE* 基因表达与非生物胁迫的关系,为深入研究 *OsMATE* 基因在水稻抗逆中的分子机理提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料和处理

水稻(*Oryza sativa*)抗铝品种湘糯 1 号('XN1')和铝敏感品种湘中粳 2 号('XX2')由湖南省农业科学院水稻研究所提供^[11]。水稻种子(约 1000 粒)用水冲洗干净后,浸种 12 h,取出转入垫有蒸馏水浸湿的滤纸的培养皿中,置于 28℃ 恒温培养箱中暗培养。发芽后点播于尼龙网,待长出 2~3 片真叶后,移栽至含 4 L 木村 B 营养液的塑料盆中,预培养 4 d 后分别进行如下处理:(1)将木村 B 营养液中的 KH_2PO_4 替换为等摩尔体积的 KCl 作为缺磷处理,然后分别加入 0、180、540、1620 $\mu\text{mol/L}$ KH_2PO_4 和 1 mmol/L AlCl_3 作为 4 个磷加铝的处理, pH 4.2;(2)将木村 B 营养液中分别加入终浓度为 1 mmol/L AlCl_3 、140 mmol/L NaCl 、50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 、50 $\mu\text{mol/L}$ Na_3AsO_4 、20% PEG6000、20 $\mu\text{mol/L}$ 的百草枯(Paraquat)、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 、100 $\mu\text{mol/L}$ ABA、100 $\mu\text{mol/L}$ 硝普钠(Sodium nitroprusside)和 360 $\mu\text{mol/L}$ 的 FeSO_4 模拟各种非生物逆境, pH 4.2, 处理 2 d 后,分别取根和叶,于 -80℃ 保存备用;(3)将木村 B 营养液中加入终浓度为 1 mmol/L 的 AlCl_3 作为铝毒处理, pH 4.2, 处理 2 d 和 4 d 后取根,于 -80℃ 保存备用。所有处理均以木村 B 营养液培养为对照处理。

1.2 总 RNA 的提取

取 50~100 mg 根或叶用液氮研磨后,加入 1.0 mL Trizol 提取缓冲液,参照 Invitrogen 公司总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。总 RNA 用 DNase (TaKaRa, 大连) 37℃ 处理 30 min, 除去微量

的基因组 DNA,然后抽提纯化 RNA。采用紫外分光光度计法检测总 RNA 的浓度和纯度,1% 的变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.3 半定量 RT-PCR 分析

取 1 μg 总 RNA,以 Oligo(dT)_{18} 为引物参照逆转录试剂盒说明合成 cDNA 第一链。以 *OsACTIN* 作为 RT-PCR 的内参,*OsACTIN* 引物为 ACTIN-F: 5'-GACTCTGGTGATGGTGTCAGC-3' 和 ACTIN-R: 5'-GGCTGGAAGAGGACCTCAGG-3';扩增 *OsMATE* 所用引物为 *OsMATE*-F: 5'-CCATCGCGGTGTTCA-ACCAG-3' 和 *OsMATE*-R: 5'-TCACGGACGGCAG-AATCTC-3'。反应条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,25~35 个循环;最后 72℃ 保温 5 min。以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,以凝胶成像系统(QuantityOne, Bio-Rad)进行分析。

2 结果和分析

2.1 *OsMATE* 在水稻中的表达

在正常情况下,*OsMATE* 在抗铝水稻品种 XN1 的根、叶鞘和叶片中的表达量非常低,35 个循环仅能在根和叶中检测到 *OsMATE* 的微量表达,而在叶鞘中几乎检测不到该基因的表达(图 1)。扩增片段的测序结果表明该 cDNA 片段与已报道的 *OsMATE* (Os01g69010)的相似性为 100%。

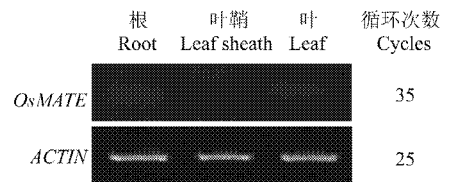


图 1 半定量 RT-PCR 分析 *OsMATE* 在水稻组织中的表达

Fig. 1 Expression of *OsMATE* in rice by semi-quantitative RT-PCR

2.2 *OsMATE* 在缺磷和铝毒胁迫下的表达

有研究表明缺磷胁迫能诱导白羽扇豆(*Lupinus albus*)中 *LaMATE* 的表达和柠檬酸的分泌,推测该基因参与了缺磷胁迫下柠檬酸的诱导分泌^[12];铝毒胁迫能诱导高粱(*Sorghum bicolor*)中 *SbMATE* 的表达和柠檬酸的分泌,并且高粱中 *SbMATE* 的过量表达能够增加根中柠檬酸的分泌^[10];大麦(*Hordeum vulgare*)中 *MATE* 基因过量表达能够增加根中柠檬酸的分泌,但铝毒不能诱导其表达^[10]。因此,植物中有些 *MATE* 基因可能与柠檬酸的分泌相关,但它

们的功能可能因该基因的定位和调控等方面的差异而不同。我们的结果表明,铝毒处理 3 d 和 6 d 后,抗铝水稻品种 XN1 的根中 *OsMATE* 被大量诱导,随着磷浓度的提高,*OsMATE* 的诱导表达量逐步降低(图 2),这可能与磷能和铝结合从而降低活性铝的浓度有关;而在水稻叶中,铝毒胁迫不能诱

导 *OsMATE* 的表达(图 2);在缺磷条件下,水稻根和叶中的 *OsMATE* 均没有表达(图 2)。因此,*OsMATE* 可被铝毒大量诱导,尤其是在缺磷的条件下,铝毒可以大量诱导水稻根中 *OsMATE* 的表达,*OsMATE* 表达的提高可能会增加植物根中柠檬酸的分泌而缓解铝的毒害。

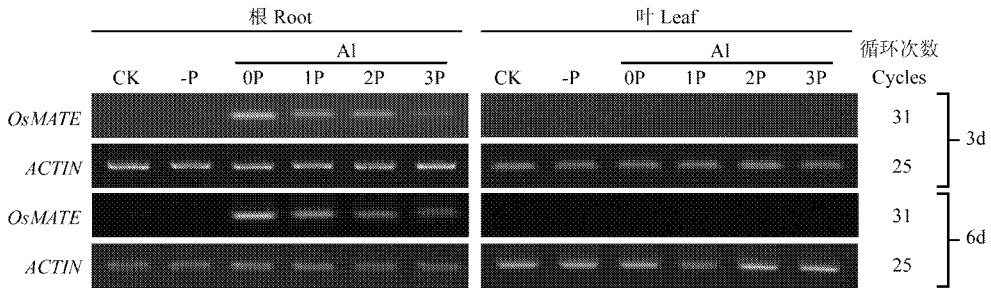


图 2 半定量 RT-PCR 分析 *OsMATE* 在缺磷和铝毒胁迫下的表达

Fig. 2 Expression of *OsMATE* under phosphate deficiency and aluminum toxicity by semi-quantitative RT-PCR
 CK: 对照 Control; -P: 缺磷 Phosphate deficiency; Al: 1 mmol/L AlCl₃; 0P: 0 μmol/L KH₂PO₄; 1P: 180 μmol/L KH₂PO₄; 2P: 540 μmol/L KH₂PO₄; 3P: 1620 μmol/L KH₂PO₄.

2.3 非生物胁迫下 *OsMATE* 的表达

从图 3 可以看出,非生物胁迫下,水稻根中 *OsMATE* 除了能被铝毒大量诱导外,也能被盐、镉、砷、PEG6000、百草枯、铁和 ABA 等胁迫诱导;水稻

叶片 *OsMATE* 只能被盐、砷和 PEG6000 胁迫所诱导。说明非生物胁迫下水稻根和叶中 *OsMATE* 的表达有很大差异,推测 *OsMATE* 可能参与介导了水稻对多种非生物胁迫的反应。

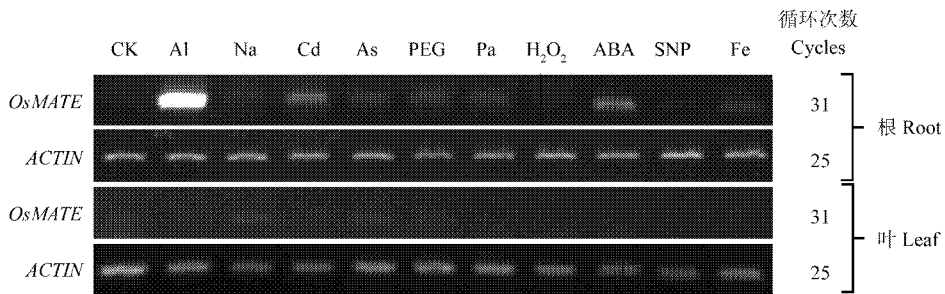


图 3 半定量 RT-PCR 分析 *OsMATE* 在非生物逆境下的表达

Fig. 3 Expression of *OsMATE* under abiotic stresses by semi-quantitative RT-PCR

CK: 对照 Control; Al: 1 mmol/L AlCl₃; Na: 140 mmol/L NaCl; Cd: 50 μmol/L CdCl₂; As: 50 μmol/L Na₃AsO₄; PEG: 20% PEG6000; Pa: 20 μmol/L Paraquat; ABA: 100 μmol/L; SNP: 100 μmol/L Sodium nitroprusside; Fe: 360 μmol/L FeSO₄.

2.4 铝毒胁迫下 *OsMATE* 基因的表达

有研究表明,铝毒能诱导水稻根中柠檬酸的分泌,但感抗品种之间差异不明显^[13]。*OsMATE* 是与编码柠檬酸通道蛋白的 *SbMATE* 最相似的同源基因,推测在水稻根中 *OsMATE* 可能与柠檬酸的分泌有关,从图 4 可看出,在铝毒胁迫下,*OsMATE* 在 XN1 根中大量诱导,而 XX2 中较少,说明 *OsMATE* 在水稻抗铝毒中起一定作用。

3 讨论

MATE 蛋白家族几乎存在于所有的生物体中,很多研究报道该类蛋白与阳离子药物和次生代谢产物等物质的运输相关,近年来受到人们的关注。由于该蛋白家族很大,大部分蛋白的功能还未见报道^[4,14],目前已知植物中的 *MATE* 基因大部分与柠檬酸的分泌有关^[4,8-10,12],而拟南芥中的 AtDTX1 和 FRD3 具有运输生物碱、抗生素、铁、镉和其他有毒

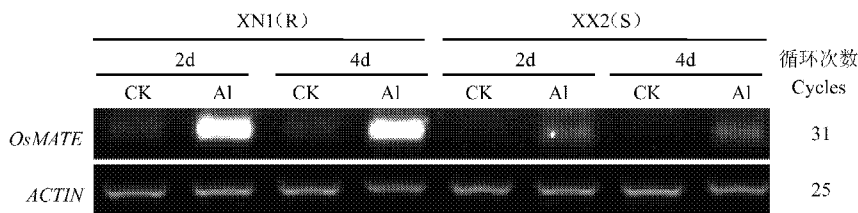


图 4 半定量 RT-PCR 分析铝毒胁迫下 *OsMATE* 的表达

Fig. 4 Expression of *OsMATE* under aluminum stress by semi-quantitative RT-PCR

CK: 对照 Control; R: 抗铝品种 Al-resistance; S: 铝敏感品种 Al-susceptible.

化合物的作用^[7-8,15]; *MATE* 基因在不同逆境胁迫下的表达模式也存在较大差异^[10,12], 说明植物中的 *MATE* 基因可能因为具有相似的结构域而具有相似的功能, 但由于不同基因的表达模式、亚细胞定位以及底物特异性等方面的差异导致 *MATE* 基因家族成员的功能多样性。探讨 *MATE* 基因的功能不仅对 *MATE* 运输有毒化合物、重金属和次生代谢物的代谢机理具有重要意义, 也为植物提高抵抗非生物胁迫的能力提供理论依据。本研究从水稻中克隆到 1 个与 *SbMATE* 最相似的 *MATE* 家族基因 *OsMATE*, 用半定量 RT-PCR 分析表明该基因仅在水稻根和叶片中有微量表达, 但可被铝、盐、镉、砷、PEG6000、百草枯、铁和 ABA 等非生物胁迫大量诱导; 其中铝诱导的表达量最高, 这与 *SbMATE* 能被铝毒诱导的结果一致^[10]; 并且其在抗铝品种中的诱导量明显高于铝敏感品种, 而其它重金属镉、砷等的诱导表达稍低。由于 *OsMATE* 与 *SbMATE* 的序列非常相似并均能被铝毒诱导, 推测 *OsMATE* 可能介导水稻根中铝毒诱导柠檬酸的分泌。然而, 近年来的证据表明在铝毒胁迫下水稻仅能分泌少量的柠檬酸, 而且其分泌量在抗铝品种和铝敏感品种之间没有显著差异^[13,16]。铝毒胁迫下抗铝与铝敏感品种根只分泌微量的柠檬酸, 且没有显著差异(数据未列出), 说明水稻的抗铝毒可能与柠檬酸的分泌关系不大。另一方面, 由于 *MATE* 蛋白功能的多样性, *OsMATE* 除了被铝毒诱导外, 还能被很多其它非生物胁迫诱导, 因此, 推测 *OsMATE* 可能通过转运其它有机化合物、次生代谢物或重金属以缓解非生物胁迫对水稻的伤害。在正常情况下 *OsMATE* 的表达量非常低, 而非生物胁迫可大量诱导该基因的表达, 表明其启动子为逆境诱导型启动子, 可利用 *OsMATE* 的启动子替换植物表达载体中常用的组成型启动子, 如花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 启动子和玉米泛素 Ubiquitin 启动子, 构建逆境诱导型植物表达载体, 通过逆境诱导调控目的基因

(特别是抗逆基因和致死基因)的表达研究基因功能, 为植物抗逆性机理研究提供科学依据。

参考文献

- [1] Wu P Z(吴平治), Luan S(栾升), Li D P(李东屏). Advances in the study of *MATE* gene family in *Arabidopsis* [J]. Hereditas (遗传), 2006, 28: 906-910. (in Chinese)
- [2] Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, et al. The *MATE* proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations [J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27: 587-593.
- [3] Morita Y, Kodama K, Shiota S, et al. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homology in *Escherichia coli* [J]. Antimicrobiol Agents Chemother, 1998, 42: 1778-1782.
- [4] Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, et al. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice [J]. Plant Physiol, 2009, 149: 297-305.
- [5] Debeaujon I, Peeters A J M, Leon-Kloosterziel K M, et al. The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium [J]. Plant Cell, 2001, 13: 853-871.
- [6] Marinova K, Pourcel L, Weder B, et al. The *Arabidopsis* *MATE* transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin accumulating cells of the seed coat [J]. Plant Cell, 2007, 19: 2023-2038.
- [7] Li L G, He Z Y, Pandey G K, et al. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 5360-5368.
- [8] Durrett T P, Gassmann W, Rogers E E. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation [J]. Plant Physiol, 2007, 144: 197-205.
- [9] Furukawa J, Yamaji N, Wang H, et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48: 1081-1091.
- [10] Magalhaes J V, Liu J P, Guimaraes C T, et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (*MATE*) family confers aluminum tolerance in sorghum [J]. Nat Genet, 2007, 39: 1156-1161.
- [11] Xu H S, Gu W L, Dong D F, et al. Differential resistance of two subtropical rice cultivars to aluminum toxicity [J]. J Plant Nutr, 2004, 27: 1601-1609.
- [12] Uhde-Stone C, Liu J, Zinn K E, et al. Transgenic proteoid roots of

- white lupin: a vehicle for characterizing and silencing root genes involved in adaptation to P stress [J]. *Plant J*, 2005, 44: 840–853.
- [13] Ma J F, Shen R F, Zhao Z Q, et al. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 652–659.
- [14] Liu F(刘芳), Chen Q H(陈奇辉), Li D P(李东屏). The analysis on expression pattern of DTX12, a member of MATE family genes in *Arabidopsis* [J]. *Acta Laser Biol Sin*(激光生物学报), 2008, 17: 28–31.(in Chinese)
- [15] Green L S, Rogers E E. *FRD3* controls iron localization in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2523–2531.
- [16] Yang J L, Li Y Y, Zhang Y J, et al. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 602–611.