

水稻低温应答基因 *OsLCL3* 的分离与功能鉴定

黄建平 熊立仲

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为探明水稻响应低温的分子机制, 改良水稻对低温的抗性, 从水稻低温诱导表达谱中挑选了 1 个受低温诱导的基因 *OsLCL3*, 通过实时定量 PCR 和启动子驱动 *GUS* 报告基因转化水稻的方法验证其功能。对 *OsLCL3* 进行同源蛋白搜索, 发现它属于 DUF761 超家族, 并对这个超家族中的部分蛋白序列进行了系统树分析; 通过水稻原生质体瞬时表达系统, 初步确定 *OsLCL3* 蛋白定位于细胞核和细胞质中。在水稻中超量表达 *OsLCL3* 基因, 并对转基因植株进行低温胁迫处理, 发现超量表达 *OsLCL3* 的植株在低温胁迫下的电导率显著低于野生型对照植株, 胁迫后超量表达植株的存活率显著高于野生型对照植株。结果表明, *OsLCL3* 可能在水稻对低温的应答中起着重要作用。

关键词 水稻; 非生物逆境; 低温; 基因表达谱; 基因芯片; 转基因; *OsLCL3*; DUF761

中图分类号 S 511 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0001-09

水稻是起源于热带和亚热带且具有光温敏感性的重要粮食作物, 全世界半数以上的人口以其作为主粮。低温是限制其产量的主要环境因素之一, 低温不仅会导致幼苗生长缓慢、黄化, 分蘖受到抑制, 而且会在孕穗期影响水稻抽穗灌浆, 对水稻造成严重危害。随着分子生物学的不断发展, 转基因技术已经成为研究功能基因的有效手段。近年来, 通过转基因途径来改良水稻的低温耐受性已经逐步取得成效。目前水稻中已经有不少耐低温的功能蛋白被鉴定出来, 包括转录因子、信号分子和特定功能的蛋白。

在转录因子方面, CBF/DREB 转录调控网络在水稻对低温的适应中起着关键的作用。超量表达 *OsDREB1A* 和 *OsDREB1B*^[1] 能增加水稻对低温的耐受性。超量表达 *MYB* 类转录因子也能提高水稻的低温耐受性, 如 *OsMYB2*^[2] 和 *CMYB1*^[3] 等。大量的锌指类转录因子也在水稻耐低温中发挥功能, 如超量表达 *OsISAP8*^[4] 和 *ZFP182*^[5] 可以提高水稻幼苗对低温的耐受性。*WRKY* 类转录因子如 *OsWRKY45*^[6] 和 *OsWRKY76*^[7] 也在水稻对低温的适应中起着关键性作用。超量表达 *SNAC2*^[8] 和

OsNAC6^[9] 等 NAC 类转录因子也可以提高水稻对低温的耐受性。另外, 调控基因转录的 microRNA 也在水稻耐低温中发挥功能, 超量表达 *miR319b*^[10] 可以提高水稻对低温的耐受性。

信号转导途径上的信号分子如蛋白激酶 MAPK、CIPK 和 CDPK 等也参与水稻对低温胁迫的响应。超量表达 *OsMAPK5*^[11] 和 *OsMKK6DD*^[12] 可以在苗期提高水稻对低温的耐受性。逆境响应的 *CIPK* 类基因如 *OsCIPK03*^[13] 也在水稻对低温的适应中起着重要作用。钙依赖的蛋白激酶 *CDPK* 类基因如 *OsCDPK7*^[14] 和 *OsCDPK13*^[15] 正向调控植株对低温的抗性。最近报道的一个 G-蛋白信号调控因子 *COLD1*^[16] 能够赋予梗稻对低温的耐受性, 它在植物适应性中也发挥着重要作用。

代谢途径、物质合成和物质转运中的蛋白质也在水稻的耐低温中起着重要作用。超量表达交替氧化酶 *OsAOX1a*^[17]、G 蛋白成员 *OsRAN1*^[18]、液泡 H⁺ 转运无机焦磷酸酶 *OVP1*^[19] 和海藻糖磷酸盐合成酶 *OsTPS1*^[20] 等基因可以提高水稻对低温的耐受性。超表达 E3 泛素连接酶 *OsHOS1*^[21] 也表现出

收稿日期: 2015-03-18

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08009-003-002)

黄建平, 硕士研究生, 研究方向: 水稻逆境分子生物学, E-mail: hjp2008@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 熊立仲, 博士, 教授, 研究方向: 水稻分子育种, E-mail: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

对低温胁迫的一定抗性。

为探明水稻响应低温的分子机制,改良水稻对低温的抗性,本研究从水稻低温诱导表达谱中挑选了 1 个受低温诱导的基因 *OsLCL3*,通过实时定量 PCR 和启动子驱动 *GUS* 报告基因转化水稻的方法验证其功能。

1 材料与方法

1.1 *OsLCL3* 的来源

为了研究水稻苗期在低温胁迫后相关基因表达变化情况以及进一步克隆水稻抗低温的相关基因,笔者所在研究室曾对 172 份水稻微核心种质资源进行了苗期耐冷性鉴定,从中找到 5 份抗冷品种,即木瓜糯、立新梗、梗 87-304、有芒早梗和老虎种,随后将这 5 份抗冷品种及 4 份常规水稻品种 IRAT109、明恢 63、珍汕 97 和 9311 进行了苗期低温胁迫的表达谱芯片实验^[22];将 4 叶期的水稻置于 4℃ 的人工气候室中生长 24 h,分别在 0、6 和 24 h 取样,用 Affymetrix GeneChip Rice Genome Array 对以上 9 个品种低温处理前后的样品进行全基因组表达谱分析,芯片包含 57 381 个探针组,其中 1 347 个探针组代表籼稻来源的 1 260 个转录本,54 168 个探针组代表粳稻来源的 48 564 个转录本。本研究的目标基因 *OsLCL3* 是从该芯片的低温表达谱结果中挑选到的一个受低温强烈诱导表达的基因。

1.2 *OsLCL3* 同源蛋白分析

在 TIGR (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公共数据库中用 *OsLCL3* 蛋白序列进行相似性序列分析(Blast),搜索其同源蛋白序列。使用软件 ClustalX (version 1.83) 和 Genedoc 对 *OsLCL3* 及其同源蛋白进行多序列比对,用软件 MrBayes 3.0 构建进化树^[23]。

1.3 *OsLCLs* 表达谱分析

OsLCL3 的水稻生育期的表达谱数据来自水稻表达谱数据库(CREP)^[24],选取水稻品种明恢 63 全生育期中的 32 个代表性的器官组织,把数据库中的表达信号值取对数转换后用 Cluster 3.0 做分层聚类分析。

为了研究 *OsLCL3* 基因对逆境胁迫的响应,将 4 叶期的水稻品种中花 11 进行低温(4℃)、高温(42℃)和拔出晾干进行干旱脱水处理,分别在处理

前、处理后 0.5、1、3、6 h 和 12 h 取样,立即用液氮速冻磨样。抽提总 RNA,逆转录出 cDNA,使用 *Actin1* (LOC_Os03g50885) 作为内参基因,利用相对定量的方法计算出目标基因的相对表达量变化^[25]。

1.4 植物转基因材料获得

根据 *OsLCL3* 基因注释编号(LOC_Os03g19070)以及 cDNA 克隆编号(AK061293)找出该基因上游 1.8 kb 的序列,分离 *OsLCL3* 基因的启动子序列,并将其连接到 *GUS* 表达载体 DX2181 (从 CAMBIA 公开使用的载体改造而来,载体含有 *GUS* 报告基因),得到 *OsLCL3* 启动子驱动报告基因 *GUS* 的表达载体 *OsLCL3P*-DX2181-*GUS* (后文统一简称为 *OsLCL3P*-*GUS*),用农杆菌介导的转化方法^[26],转化水稻品种中花 11,得到转基因植株。同时将不含外源片段的 DX2181 空载体转化水稻品种中花 11 作为对照。在公共数据库中找到 *OsLCL3* 基因的 cDNA 克隆编号(AK061293),根据编号对应的序列分离 *OsLCL3* 的全长 cDNA,并连接到表达载体 pCAMBIA1301U (来源于 CAMBIA 公司,由 Ubiquitin 启动子驱动),转化水稻品种中花 11,得到 *OsLCL3* 基因超量表达的转基因植株。

1.5 *GUS* 比酶活的测定

对转化表达载体 *OsLCL3P*-DX2181 及空载体 DX2181 的转基因阳性植株进行 4℃ 低温处理,取处理前 0 h 和处理 24 h 的样品。*GUS* 蛋白抽提及 *GUS* 比酶活测定参考文献^[27]进行。

1.6 超表达材料胁迫处理和电导率测定

用实时荧光定量 PCR 的方法检测出 *OsLCL3* 基因超量表达的转基因植株,种植并分离出阳性植株和野生型植株,种植于小红桶中,待植株生长到 4 叶期,置于 4℃ 冷库做低温胁迫处理,观察植株的状态并拍照。植株胁迫 4 d 后恢复正常条件下生长,观察并统计植株的存活率,同时在胁迫前和胁迫 48 h 后取等量的水稻叶片,测量叶片的电导率,具体操作方法参照文献^[27]进行。

1.7 亚细胞定位

扩增 *OsLCL3* 的全长 cDNA,构建到载体 HBT-sGFP 和 p2YGW7 上,分别于 3' 端融合 GFP 和 5' 端融合 YFP,构建融合表达载体 HBT-*OsLCL3*-sGFP 和 p2YGW7-YFP-*OsLCL3*。用 QIA-

GEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) 进行质粒纯化。纯化好的质粒通过 PEG 介导的转化方法导入水稻原生质体^[28], 12~24 h 后, 用荧光共聚焦显微镜 (Leica, Germany) 进行观察。

2 结果与分析

2.1 *OsLCL3* 基因的同源蛋白序列分析

OsLCL3 基因编码 1 个包含 214 个氨基酸的蛋白质。在 TIGR 数据库中对其进行蛋白检索 (BLASTP), 发现水稻中的 3 个同源蛋白都被注释为长细胞关联位点蛋白 (long cell-linked locus protein, LCL), 但并没有与之相关的任何文献报道。在 NCBI 数据库对其进行非冗余蛋白序列比对检索, 发现它在植物中有很多同源蛋白。在蛋白保守结构域数据库 CDD^[29] 中, 它们属于 DUF761 超家族。该家族中仅有 3 个蛋白被描述为棉花纤维蛋白, 其余蛋白的功能均未知。

对水稻 (*Oryza sativa*)、短药野生稻 (*Oryza brachyantha*)、玉米 (*Zea mays*) 等 15 个物种中 *OsLCL3* 的同源蛋白进行序列比对, 结果显示 *OsLCL3* 在草本类单子叶植物中比较保守。与其他 DUF761 超家族蛋白相比, 草本类单子叶植物中的这类蛋白除了 DUF761 结构域和另一个位于第 40 到第 60 个氨基酸之间的一段保守序列外, 其他位置的氨基酸序列与双子叶植物的 DUF761 蛋白序列有很大差异, 属于草本单子叶植物特有的序列。另外 2 个木本的单子叶植物香蕉和海枣椰的蛋白序列在非保守区与草本的单子叶植物也有很多差异 (图 1A)。另外, 水稻中的 *OsLCL1.1*、*OsLCL1.2* 和 *OsLCL11* 的蛋白序列与 *OsLCL3* 及其他单子叶植物的同源序列相比, 也有很大的差异。DUF761 结构域仅有 3 个氨基酸 (14%) 序列是非常保守的, 且这 3 个氨基酸构成的蛋白极为相似, 说明这 3 个蛋白在进化中开始朝相同的方向进化, 并且可能行使同样的功能, 但与 *OsLCL3* 的功能可能有很大不同 (图 1A)。进化分析的结果也显示, DUF761 超家族可以明显地区分单子叶植物和双子叶植物, 以及单子叶植物中的草本分支和木本分支。结果还显示, *OsLCL1.1*、*OsLCL1.2* 和 *OsLCL11* 这 3 个蛋白独自成为另一个分支, 与 *OsLCL3* 不在一个分支

上 (图 1B)。

2.2 *OsLCL3* 对逆境胁迫的响应

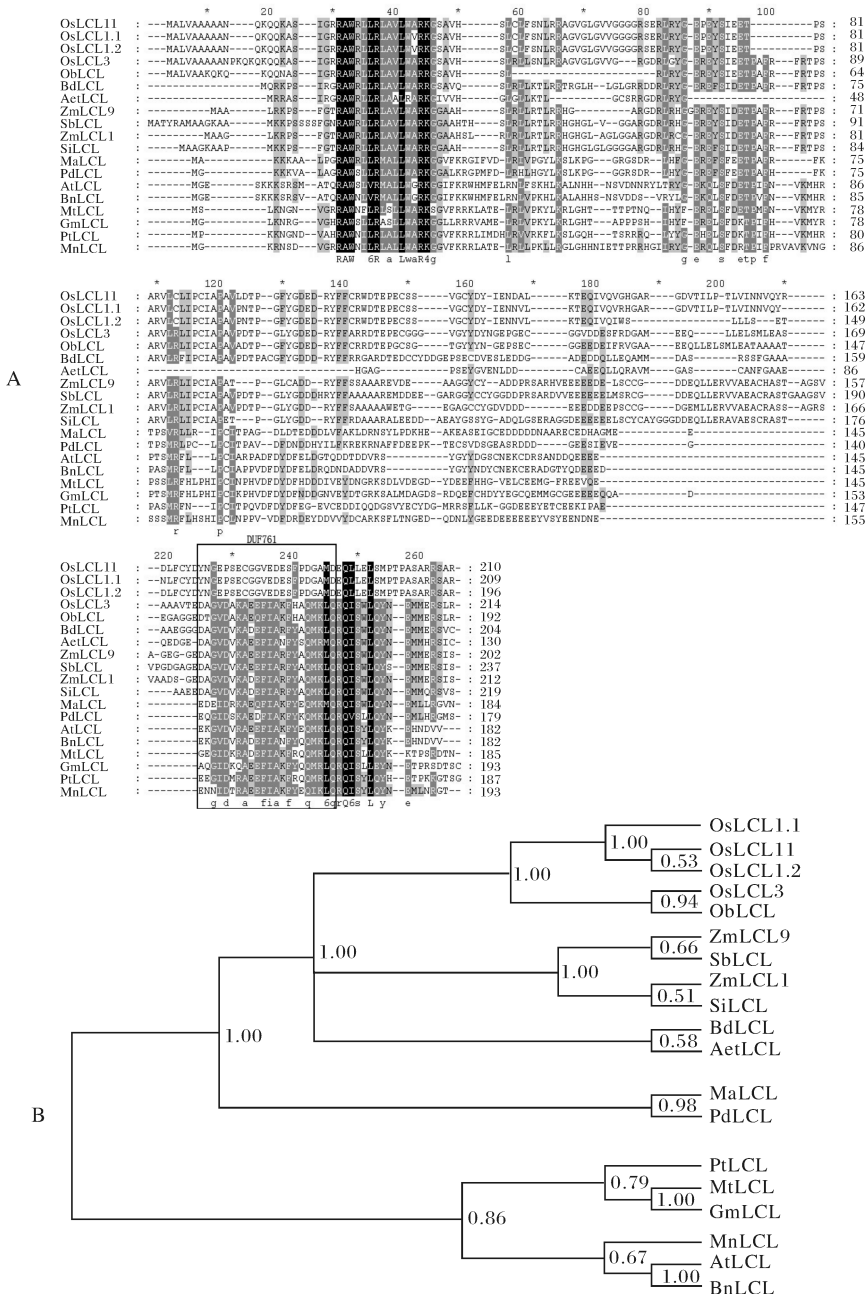
分层聚类分析的结果显示, *OsLCL3* 的表达模式与另外 3 个水稻同源基因存在明显的差异 (图 2A)。该基因在愈伤、幼穗和开花期的茎中表达比较高, 在整个生育期中的表达都相对较低, 而另外 3 个同源基因的表达则更低, 几乎没有表达 (图 2A、B)。

对水稻品种中花 11 在低温、高温和干旱脱水处理前后 *OsLCL3* 基因的 mRNA 表达水平进行检测, 发现它在 mRNA 水平上受低温强烈诱导表达。与处理前相比, 低温处理 6 h 后其表达量上调约 170 倍 (图 3A、图 3B)。但它的表达并不受高温和干旱诱导 (图 3A)。由于其另外 3 个同源基因序列十分相似, 只能用一个探针来检测它们的表达量, 结果显示它们并不受低温的诱导 (图 3A)。

对 *OsLCL3P-DX2181* 转基因植株进行低温处理后, GUS 活性检测结果显示, 当植株受到低温胁迫后, GUS 活性显著增加到 3~7 倍 (图 3C), 结果表明在转录后或者蛋白水平上 *OsLCL3* 也受低温诱导表达。

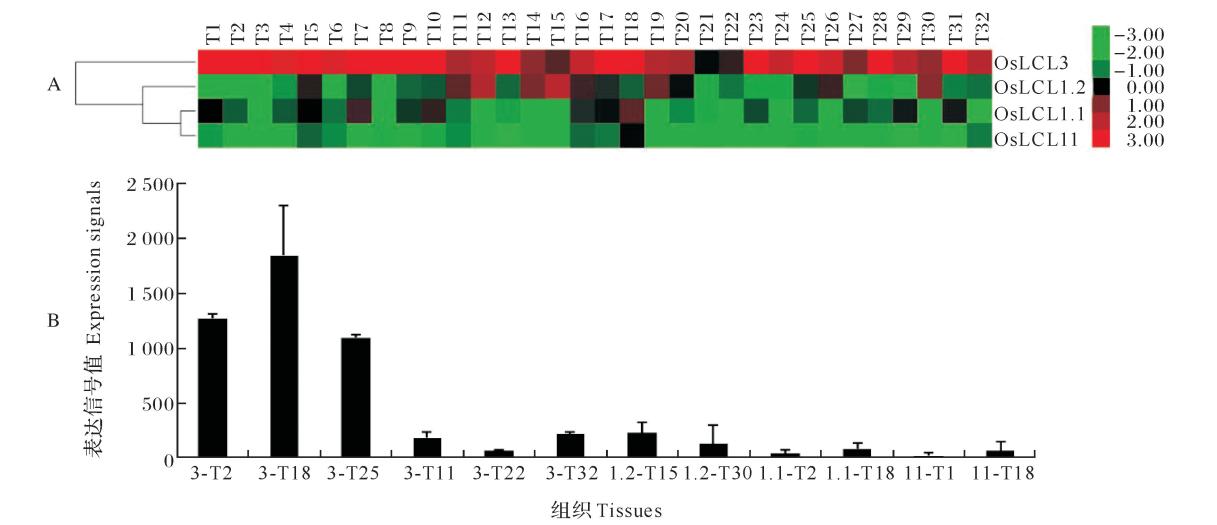
2.3 *OsLCL3* 在细胞核和细胞质的定位

亚细胞定位的结果显示, *OsLCL3* 蛋白 N 端和 C 端融合到荧光蛋白的亚细胞定位模式是一样的, 两端的融合没有影响到 *OsLCL3* 蛋白的定位。将 HBT-*OsLCL3*-sGFP 与已报道的核定位基因的融合载体 pM999-ECFP-*OsGHD7*^[30] 共同转化水稻原生质体, 发现 *OsLCL3*-sGFP 蛋白的表达部位仅部分与细胞核蛋白共定位 (图 4A、B、C), 还在其他部位有表达。由于 *OsLCL3*-sGFP 蛋白表达部位与细胞膜的位置接近, 细胞膜定位基因的融合载体 pBI221-mRFP-*OsSCAMP1*^[31] 也被用来与 HBT-*OsLCL3*-sGFP 共同转化水稻原生质体。结果显示细胞膜定位蛋白的表达部位明显位于膜上, 而 *OsLCL3*-sGFP 蛋白的表达部位在细胞膜内的区域, 并且与细胞膜蛋白的部位没有重叠 (图 4D、E、F)。结果表明 *OsLCL3* 蛋白并不定位于细胞膜, 而是定位在细胞核和细胞质 (图 4G、H、I、J), 但其在细胞质中的具体定位还需要进一步的研究。



A: OsLCL3 部分同源蛋白多序列比对 Alignment of part of OsLCL3 homologous protein sequences; B: OsLCL3部分同源蛋白进化树分析 Phylogenetic tree of part of OsLCL3 homologous protein sequences. Os: 水稻 *Oryza sativa*; Ob:短药野生稻 *Oryza brachyantha*; Zm:玉米 *Zea mays*; Sb:高粱 *Sorghum bicolor*; Bd: 二穗短柄草 *Brachypodium distachyon*; Si:小米 *Setaria italica*; Aet:节节麦 *Aegilops tauschii*; Ma:香蕉 *Musa acuminata*; Pd:海枣椰 *Phoenix dactylifera*; At:拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; Bn:甘蓝型油菜 *Brassica napus*; Mt:蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula*; Gm:大豆 *Glycine max*; Pt:毛果杨 *Populus trichocarpa*; Mn:川桑树 *Morus notabilis*.

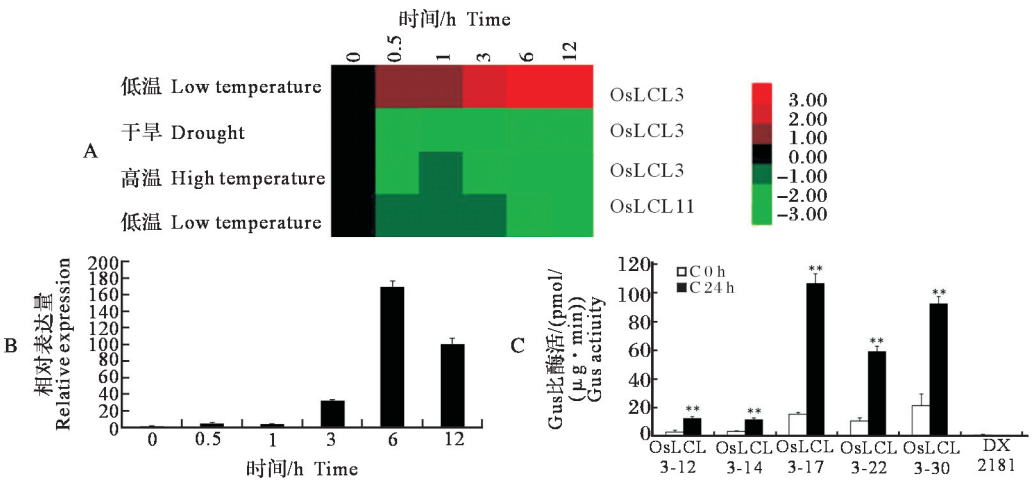
图 1 OsLCL3 部分同源蛋白序列分析
Fig.1 Analysis of OsLCL3 homologous sequences



A: *OsLCL3* 及其同源基因的全生育期组织器官表达模式 Expression pattern of *OsLCL3* during the entire life cycle of rice; B: *OsLCL3* 及其同源基因在代表性组织 (T1、T2、T11、T15、T18、T22、T25、T30 和 T32) 中的表达信号值 Expression signals of the *OsLCL3* in representative tissues (T1, T2, T11, T15, T18, T22, T25, T30 and T32). 数据来自水稻明恢 63 的表达谱数据库 (CREP), 图 A 由 Cluster 3.0 软件生成。The expression data of the *OsLCLs* in Minghui 63 was extracted from the CREP database (<http://crep.ncpgr.cn/crep-cgi/home.pl>). Figure A was generated by the software Cluster 3.0. T1: 筛选阶段的愈伤 Calli of selective stage; T2: 诱导 15 d 的愈伤 Calli of 15 days after induction; T3: 继代 15 d 的愈伤 Calli of 15 days after subculture; T4: 再分化 5 d 后的愈伤 Calli of 5 days after regeneration; T5: 浸种 72 h 的种子 Seeds of 72 h after imbibition; T6: 暗培养下发芽 48 h 的胚芽 Plumule of 48 h after emergence under darkness; T7: 暗培养下发芽 48 h 的胚根 Radicle of 48 h after emergence under darkness; T8: 光培养下发芽 48 h 的胚芽 Plumule of 48 h after emergence under light; T9: 光培养下发芽 48 h 的胚根 Radicle of 48 h after emergence under light; T10: 发芽 3 d 的胚芽和胚根 Plumule and radicle of 3 days after germination; T11: 三叶期的水稻苗 Leaf and root at three-leaf stage; T12: 两分蘖时期植株的根 Root of seedling with 2 tillers; T13: 两分蘖时期植株的芽 Bud of seedling with 2 tillers; T14: 二次枝梗原基分化期的叶片 Leaf at secondary-branch primordium differentiation stage; T15: 二次枝梗原基分化期的叶鞘 Sheath at secondary-branch primordium differentiation stage; T16: 二次枝梗原基分化期的幼穗 Young panicle at secondary-branch primordium differentiation stage; T17: 雌蕊和雄蕊原基分化期的幼穗 Young panicle at pistil and stamen primordium differentiation stage; T18: 花粉母细胞的形成时期的幼穗 Young panicle at pollen-mother cell formation stage; T19: 4~5 cm 幼穗期的叶 Leaf of rice with 4-5 cm young panicle; T20: 4~5 cm 幼穗期的叶鞘 Sheath of rice with 4-5 cm young panicle; T21: 4~5 cm 幼穗期的穗 Panicle of rice with 4-5 cm young panicle; T22: 抽穗前 5 d 的剑叶 Flag leaf at 5 days before heading; T23: 抽穗前 5 d 的茎 Stem at 5 days before heading; T24: 抽穗期的花序 Panicle at heading stage; T25: 抽穗期的茎 Stem at heading stage; T26: 开花前 1 d 的颖壳 Hull at 1 day before flowering; T27: 开花前 1 d 的雄蕊 Stamen at 1 day before flowering; T28: 授粉后 3 d 的小穗 Spikelet at 3 days after pollination; T29: 授粉后 7 d 的胚乳 Endosperm at 7 days after pollination; T30: 抽穗后 14 d 的剑叶 Flag leaf at 14 days after heading; T31: 授粉后 14 d 的胚乳 Endosperm at 14 days after pollination; T32: 授粉后 21 d 的胚乳 Endosperm at 21 days after pollination.

图 2 *OsLCL3* 及其同源基因在水稻主要组织和器官中的表达谱

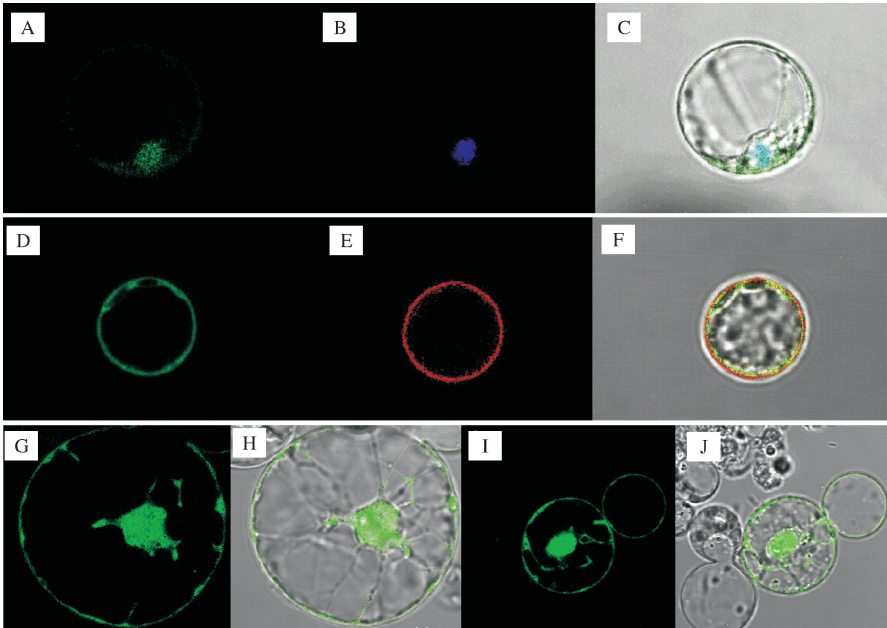
Fig.2 Expression profiles of *OsLCL3* in major tissues and organs of rice



A: *OsLCL3* 和 *OsLCL11* 在低温、干旱和高温处理下不同时间点的相对表达量 The relative expression of *OsLCL3* 和 *OsLCL11* at different time points under low temperature stress, drought stress and high temperature stress. B: *OsLCL3* 基因在 4 °C 处理下不同时间点的相对表达量 The relative expression level of *OsLCL3* at different time points under 4 °C. C: *OsLCL3* 启动子驱动报告基因 GUS 蛋白在 4 °C 胁迫下的表达活性 GUS activity of the *OsLCL3P*-GUS transgenic rice under 4 °C stress. *OsLCL3*-12, *OsLCL3*-14, *OsLCL3*-17, *OsLCL3*-22, *OsLCL3*-30; *OsLCL3P*-DX2181 转化中花 11 得到的 5 个独立转基因家系植株 Five independent positive lines of transgenic Zhonghua 11 containing *OsLCL3P*-DX2181; DX2181; DX2181 空载体转化的中花 11 作为对照家系 Transgenic Zhonghua 11 of empty DX2181 as a control. * *: *t*-检验表明差异极显著, *P* 值小于 0.01 Significant difference at *P* < 0.01 by *t*-test.

图 3 *OsLCL3* 逆境表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *OsLCL3* under stress treatments



A, D, G, I: *OsLCL3*-sGFP 的定位 Localization of *OsLCL3*-sGFP; B: ECFP-*OsGHD7* (已知核蛋白) 的定位 Localization of ECFP-*OsGHD7* (a known nuclear protein); C: A 和 B 及明场的融合 Merged image of A, B and bright field; E: mRFP-*OsSCAMP1* (已知细胞膜蛋白) 的定位 Localization of mRFP-*OsSCAMP1* (a known cell membrane protein); F: D 和 E 及明场的融合 Merged image of D, E and bright field; H: G 与明场的融合 Merged image of G and bright field; J: I 与明场的融合 Merged image of I and bright field.

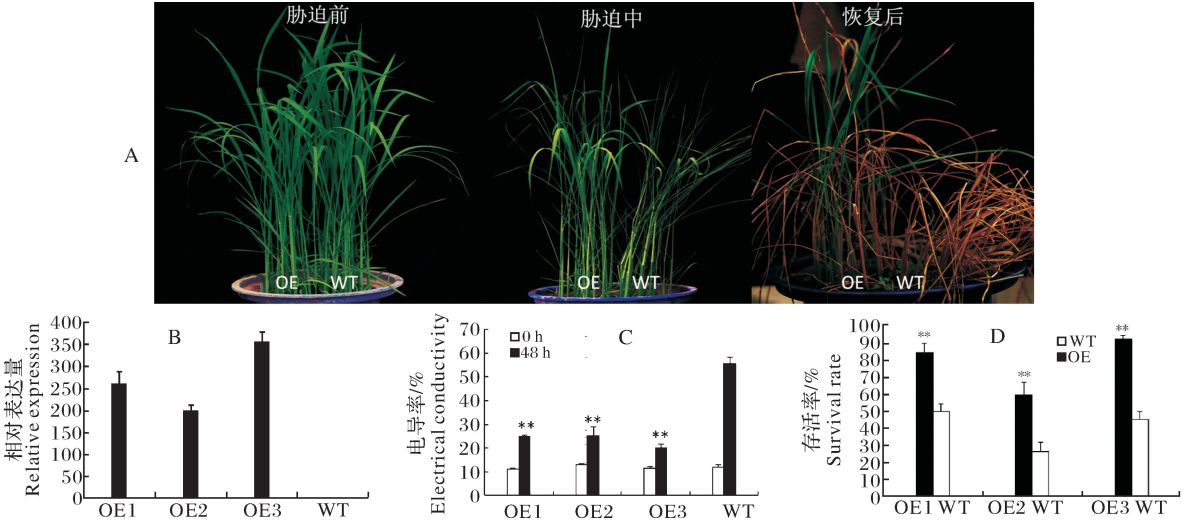
图 4 *OsLCL3* 蛋白的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *OsLCL3* protein

2.4 超量表达 *OsLCL3* 转基因植株的耐低温特性

将 *OsLCL3* 在水稻品种中花 11 中超量表达,选取 3 个独立的超量表达阳性家系(图 5B),在其 T2 代和 T3 代对转基因植株进行 4℃ 低温胁迫处理。在低温胁迫过程中,当对照植株叶片全部卷曲和枯死时,*OsLCL3* 超量表达植株的大部分叶片未卷(图 5A)。在胁迫前,超量表达植株和野生型对照植株的相对电导率并没有明显差异;在胁迫 48 h 后,超量表达植株的相对电导率约为 25%,而野生型对

照植株的相对电导率已经达到了 55%,超量表达植株电导率显著低于野生型对照(图 5C)。这说明在低温胁迫过程中,超量表达植株的细胞膜稳定性显著高于对照植株。4℃ 胁迫 4 d,正常条件(25℃)生长 4 d 后,统计植株的存活率,发现超量表达植株的存活率约 80%,而对照家系植株的存活率只有大约 40%。超量表达植株的存活率显著高于对照家系植株(图 5D)。这些结果都说明超量表达*OsLCL3* 基因可以增强水稻的耐低温能力。



A: *OsLCL3* 超量表达水稻植株 4 叶期 4℃ 低温处理的表型 (OE: 超量表达植株, WT: 野生型对照植株) Phenotype of *OsLCL3*-overexpression transgenic plants and the wild type control under 4℃ treatment at four-leaf stage (OE: Transgenic plants, WT: Wild type control); B: 超量表达家系与野生型植株的相对表达量 The relative expression level of overexpression transgenic lines and wild type control; C: 4℃ 低温处理 48 h 后, 转基因家系和野生型对照的电导率 The electrical conductivity of overexpression transgenic lines and wild type control after 48 hours under 4℃ treatment (** : *t*-检验表明差异极显著, *P* 值小于 0. 01 The difference was significant at *P*<0. 01 by *t*-test); D: 超表达植株与野生型的存活率 The survival rate of overexpression lines and wild type control (** : *t*-检验表明差异极显著, *P* 值小于 0. 01 The difference was significant at *P*<0. 01 by *t*-test).

图 5 *OsLCL3* 超量表达转基因水稻的耐低温胁迫特性

Fig. 5 Increased cold tolerance of *OsLCL3*-overexpression transgenic rice

3 讨 论

本研究从低温诱导表达谱芯片数据中挑选了一个受低温强烈诱导表达的基因 *OsLCL3*, 并用实时荧光定量 PCR 的方法验证了该基因受低温诱导, 同时分离了该基因的启动子, 驱动报告基因 *GUS* 的表达也验证了该基因的启动子是一个低温诱导型启动子。干旱、高盐和低温等非生物胁迫所引起的逆境诱导信号传导, 有很多相似点和交叉点^[32]。但是 *OsLCL3* 的表达并不受干旱脱水的影响, 说明低温诱导的 *OsLCL3* 的表达机制与干旱引起的逆境信号

转导机制可能是相互独立的。

本研究初步分析了 *OsLCL3* 蛋白的亚细胞定位情况, 发现 *OsLCL3* 蛋白定位于细胞核和细胞质中, 而在细胞膜上没有 *OsLCL3* 蛋白的分布。Ma 等^[33] 在研究玉米中碳的分区时定位到一个 C 端含有 DUF761 结构域的蛋白 ZmTDY1, 它特异地 在 韧 皮 部 细胞 中 表 达, 其 结 果 显 示 全 长 ZmTDY1 与 内 质 网 蛋白 共 定 位, ZmTDY1 的 N 端 71 个 氨 基 酸 的 部 分 也 与 内 质 网 蛋白 共 定 位, 而 C 端 201 个 氨 基 酸 的 部 分 定 位 于 细胞 质 和 细胞 核 中, 这 与 本 研 究 *OsLCL3* 的 定 位 有 相 似 之 处。DUF761 超 家 族 中 有

3 个蛋白被描述为棉花纤维蛋白,可以推测 OsLCL3 可能也是具有细胞骨架纤维方面功能的蛋白质。从以上这些分析中推测,OsLCL3 可能具有细胞中物质转运方面的功能。OsLCL3、ZmTDY1 和棉花纤维蛋白除了都具有 DUF761 结构域外,其他部分的蛋白序列几乎没有相似性,但他们的亚细胞定位及功能具有相似性,暗示 DUF761 结构域对 DUF761 超家族蛋白发挥功能很重要,并且 DUF761 超家族蛋白的功能可能具有保守性。

目前,植物中有 1/4 的基因编码未知功能蛋白,DUF761 超家族中的成员均为未知功能基因。Song 等^[34]挑取了拟南芥中的一些未知功能的基因,考察了它们对氧化胁迫的响应,发现一些未知功能的基因可以增加拟南芥对氧化胁迫耐受性,其中一个为 DUF761 (AT1G11210) 蛋白基因。结果显示,在氧化物质叔丁基氢过氧化物和百草枯的处理下,超量表达 DUF761 的植株的根长显著高于对照,但是转基因植株对渗透和高盐胁迫处理并没有明显的耐受性。本研究中水稻 DUF761 超家族成员 OsLCL3 可以提高植株对低温的耐受性,但它是否通过提高植株对氧化胁迫的耐受性来提高耐低温能力还需进一步的试验验证。

参 考 文 献

- [1] ITO Y, KATSURA K, MARUYAMA K, et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2006, 47: 141-153.
- [2] YANG A, DAI X, ZHANG W H. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63: 2541-2556.
- [3] DUAN M, HUANG P, YUAN X, et al. CMYB1 encoding a MYB transcriptional activator is involved in abiotic stress and circadian rhythm in rice[J]. *Scientific World Journal*, 2014, 178038.
- [4] KANNEGANTI V, GUPTA A K. Overexpression of OsSAP8, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66: 445-462.
- [5] HUANG J, SUN S, XU D, et al. A TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80: 337-350.
- [6] TAO Z, KOU Y, LIU H, et al. OsWRKY45 alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62: 4863-4874.
- [7] YOKOTANI N, SATO Y, TANABE S, et al. WRKY76 is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64: 5085-5097.
- [8] HU H, YOU J, FANG Y, et al. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67: 169-181.
- [9] NAKASHIMA K, TRAN L S, VAN N D, et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice[J]. *Plant J*, 2007, 51: 617-630.
- [10] WANG S T, SUN X L, HOSHINO Y, et al. Micro RNA319 positively regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e91357.
- [11] XIONG L, YANG Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 745-759.
- [12] XIE G, KATO H, IMAI R. Biochemical identification of the OsMKK6-OsMPK3 signalling pathway for chilling stress tolerance in rice[J]. *Biochem J*, 2012, 443: 95-102.
- [13] XIANG Y, HUANG Y, XIONG L. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144: 1416-1428.
- [14] SAIJO Y, HATA S, KYOZUKA J, et al. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants[J]. *Plant J*, 2000, 23: 319-327.
- [15] ABBASI F, ONODERA H, TOKI S, et al. OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55: 541-552.
- [16] MA Y, DAI X, XU Y, et al. COLD1 confers chilling tolerance in rice[J]. *Cell*, 2015, 160: 1209-1221.
- [17] LI C R, LIANG D D, XU R F, et al. Overexpression of an alternative oxidase gene, OsAOX1a, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12: 5424-5432.
- [18] XU P, CAI W. RAN1 is involved in plant cold resistance and development in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65: 3277-3287.
- [19] ZHANG J, LI J, WANG X, et al. OVP1, a vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49: 33-38.
- [20] LI H W, ZANG B S, DENG X W, et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice[J]. *Planta*, 2011, 234: 1007-1018.
- [21] LOURENCO T, SAPETA H, FIGUEIREDO D D, et al. Isola-

tion and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) E3-ubiquitin ligase OsHOS1 gene in the modulation of cold stress response[J]. *Plant Molecular Biology*,2013,83:351-363.

[22] 叶海燕. 水稻基因低温表达谱分析和 TIFY 家族逆境相关基因的功能鉴定[D]. 武汉:华中农业大学图书馆,2011.

[23] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*,2003,19:1572-1574.

[24] WANG L, XIE W, CHEN Y, et al. A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice[J]. *Plant J*,2010,61: 752-766.

[25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*,2001,25:402-408.

[26] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994,6:271-282.

[27] 杨梅. 抗逆相关 MYB 类转录因子和逆境诱导型启动子的分离与鉴定[D]. 武汉:华中农业大学生命科学技术学院,2011.

[28] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. *Nat Protoc*,2007,2:1565-1572.

[29] MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON J B, et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins[J]. *Nucleic Acids Res*,2011,39:225-229.

[30] XUE W, XING Y, WENG X, et al. Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice[J]. *Nat Genet*,2008,40:761-767.

[31] LAM S K, SIU C L, HILLMER S, et al. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells[J]. *The Plant Cell*,2007,19:296-319.

[32] HUANG G T, MA S L, BAI L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants[J]. *Mol Biol Rep*, 2012,39:969-987.

[33] MA Y, SLEWINSKI T L, BAKER R F, et al. Tie-dyed1 encodes a novel, phloem-expressed transmembrane protein that functions in carbohydrate partitioning[J]. *Plant Physiology*, 2009,149:181-194.

[34] SONG L H, CIFTCI-YILMAZ S, HARPER J, et al. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic *Arabidopsis* plants expressing proteins of unknown function[J]. *Plant Physiology*,2008,148:280-292.

Isolating and characterizing one low-temperature-responsive gene *OsLCL3* in rice

HUANG Jianping XIONG Lizhong

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To better understand the molecular mechanism of rice (*Oryza sativa* L.) in response to cold stress and further improve its tolerance to cold stress, a cold-responsive gene *OsLCL3* was screened from cold stress expression profiles of rice gene chips. *OsLCL3* was confirmed to be induced by low temperature (4 °C) strongly with real-time fluorescent quantitative PCR and the expression of *GUS* reporter gene expression in stable transgenic rice driven by the promoter of *OsLCL3*. Homologous protein sequence analysis showed that *OsLCL3* and its homologous proteins belong to DUF761 super family. Phylogenetic analysis of part members of this family including four homologs in rice genome was conducted. Subcellular localization analysis of *OsLCL3* in rice protoplast showed that it was localized in nucleus and cytoplasm. Transgenic rice lines with over-expressing *OsLCL3* were obtained and three of them were tested for low temperature stress tolerance. Results showed that the electrical conductivity of overexpression lines under the low temperature stress was significantly lower than that of wild type plants. The survival rate of overexpression lines was significantly higher than that of wild type plants. These results indicate that *OsLCL3* may play an important role in low temperature response in rice.

Keywords rice; abiotic stress; low temperature; gene expression profiles; gene chip; transgene; *OsLCL3*; DUF761

(责任编辑:张志钰)