

薛亚莉, 魏晓双, 周海连, 等. 水稻 LEA₂ 家族的鉴定与表达谱分析[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(2): 93-102.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.02.010

水稻 LEA₂ 家族的鉴定与表达谱分析

薛亚莉¹, 魏晓双^{2,4,5}, 周海连^{2,4,5}, 李朝阳¹, 胡利华^{2,3}, 王令强^{1,2,4,5}, 张翠翠³

1. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070;

2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004;

3. 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004;

4. 广西大学农学院, 南宁 530004; 5. 广西甘蔗生物学重点实验室, 南宁 530004

摘要 为探索水稻 LEA₂ 家族成员的特点, 通过生物信息学分析从水稻基因组中鉴定出 60 个 LEA₂ 家族成员, 它们不均匀分布于 12 条染色体。蛋白序列分析结果显示, LEA₂ 家族蛋白的分子质量为 16.24~49.14 ku, 等电点 4.7~11.7, 有 42 个蛋白倾向于疏水; 系统进化树分析显示, LEA₂ 家族可以分成 5 个组, 同一组的蛋白成员包含的保守基序类型基本相同; 基因结构分析表明 LEA₂ 基因包含少量的内含子或者不含内含子; 启动子分析表明水稻 LEA₂ 基因启动子包含大量与逆境胁迫响应、激素信号传导及生长发育有关的作用元件。根据表达谱分层聚类分析及荧光定量 PCR 实验发现水稻 LEA₂ 家族基因间共表达现象明显, 同时发现 OsLEA2-2 和 OsLEA2-26 基因均受干旱胁迫上调表达 60 倍以上。

关键词 水稻; LEA₂; 非生物逆境胁迫; 生物信息学; 干旱胁迫; 冷胁迫; 淹水胁迫; 盐胁迫; 渗透胁迫

中图分类号 S 511: Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)02-0093-10

到 2050 年, 世界人口将从目前的 73 亿增加到预计的 97 亿, 粮食需求也将增长 59% 至 98%^[1]。水稻 (*Oryza sativa* L.) 是主要粮食作物之一, 发掘水稻抗逆基因, 培育高抗水稻品种, 对解决粮食安全问题意义重大。

胚胎发育晚期丰富 (late embryogenesis abundant proteins, LEA) 蛋白参与抵御非生物逆境胁迫^[2], 1981 年首次在棉花子叶中发现^[3], 随后在其他植物、动物和微生物中均有发现^[4]。LEA 蛋白最初被发现在种子脱水成熟过程中大量表达积累^[5], 进一步的研究表明, 植物在遭受干旱、低温、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 处理、高盐等逆境胁迫后, LEA 蛋白在植物不同的组织部位都可能大量表达^[6]。

LEA 蛋白在非生物逆境胁迫中发挥作用。在拟南芥中, 过表达小麦 LEA 基因 DHN-5 可显著提高植株对渗透胁迫的耐受性^[7]。将大麦 LEA 蛋白基因 HVA7 导入水稻, 转基因水稻株系对于干旱和盐分的耐受性显著增强^[8]。在草莓中过表达小麦的 LEA 基因 (WCOR410) 可显著提高叶片的抗寒

性^[9]。LEA 基因的异源表达不仅可以增加高等植物的胁迫耐受性, 对真菌及原核生物同样有效。在酵母中过表达水稻的 LEA 基因 OsLEA3-2, 提高了其对盐胁迫和渗透胁迫的耐受性^[10]。葡萄固氮菌 *lea1* 基因的突变使细胞对高温、渗透胁迫更敏感^[11]。将 8 个具有代表性的中国春小麦的 *TaLEAs* 基因导入大肠杆菌和酵母中, 增强了大肠杆菌和酵母对盐和热的耐受性^[12]。

植物 LEA 蛋白在 PFAM 数据库 (protein families database) 中根据 8 个 PFAM 号 (PF03760、PF03168、PF03242、PF02987、PF00477、PF00257、PF04927 和 PF10714) 分为 8 个家族, 分别是 LEA₁~LEA₆、Dehydrin 和 SMP。2007 年, Wang 等^[13]从水稻中鉴定出 34 个 LEA 家族成员, 其中 OsLEA5~OsLEA8 属于 LEA₂ 亚家族。含有 LEA₂ (PF03168) 结构域的蛋白是植物体内鉴定出的最多一类 LEA 蛋白, 且大多数属于疏水性蛋白^[14]。本研究利用粳稻品种日本晴的基因组序列、籼稻品种明恢 63 的全生育期基因表达芯片、日本晴

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2018GXNSFAA281116); 国家重点研发计划项目 (2018YFD0301303); 国家自然科学基金项目 (31771775; 31171524)

薛亚莉, E-mail: xue842937220@163.com

通信作者: 张翠翠, E-mail: zhangcuicui@zju.edu.cn

抽穗期的部分组织样品以及不同株龄的日本晴植株在干旱等多种逆境处理后的转录组测序数据或基因表达谱芯片数据,结合生物信息学分析和实时荧光定量 PCR,对水稻 LEA₂ 家族成员(OsLEA2)进行全基因组鉴定,并对其染色体分布、理化性质、系统进化及保守基序、基因结构及基因表达模式等进行分析,着重分析干旱处理、冷处理和淹水处理的本日本晴水稻植株中部分 OsLEA₂ 基因的表达,旨在为进一步研究水稻 LEA₂ 家族成员的功能提供参考,同时为水稻抗干旱育种提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 水稻 LEA₂ 家族成员的鉴定、染色体定位和蛋白的理化性质分析

拟南芥、小麦和水稻的全基因组数据分别从 TAIR 网站 (<https://www.arabidopsis.org/>)、Ensembl 网站 (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 和 TIGR 网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 下载。从 Pfam 数据库网站 (<http://Pfam.xfam.org>) 检索得到水稻 LEA₂ 基因家族的 PFAM 号 (PF03168), 利用 TBtools^[15] 上的 HMM Search 检索 ($e < 0.001$), 得到水稻 LEA₂ 蛋白候选序列。根据文献报道的 3 个拟南芥 *AtLEA₂* 基因家族蛋白序列^[16] 和 159 个小麦 *TaLEA₂* 基因家族蛋白序列^[17], 利用 TBtools 查找同源序列, 得到候选序列。基于 HMM Search 和 Blast 的结果, 将候选序列合并去重复后, 利用在线网站 Pfam (<http://Pfam.xfam.org/search>) 对全部候选蛋白序列进行结构域搜索确认, 存在 LEA₂ 结构域的蛋白序列被认为是 OsLEA₂ 家族成员。

从 TIGR 网站下载水稻全基因组蛋白序列、水稻染色体组相关信息。利用 TBtools 进行水稻 LEA₂ 家族成员的染色体定位, 同时运用在线网站 ExPASy (<http://web.expasy.org>) 进行分子质量、等电点和亲水性 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 预测。

1.2 水稻 LEA₂ 家族成员的进化树构建、基序分布、基因结构和启动子区顺式作用元件分析

从 TIGR 网站下载水稻全基因组序列、全基因组蛋白序列、基因组结构相关信息。用 TBtools 提取 60 条 LEA₂ 蛋白序列进行 Clustalw 算法比对, 使用 MEGA7.0 软件, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, 设置重复值为 1 000; 使

用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 进行蛋白质保守基序分析, 搜索的基序数设置为 10, 基序长度设置为 6~25, 其他参数为默认参数; 利用 TBtools 绘制水稻 LEA₂ 基因结构图谱, 并选取起始密码子 ATG 上游 2 kb 的 DNA 序列, 利用 PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant_care/html/) 进行顺式作用元件预测。

1.3 水稻 LEA₂ 家族成员不同生育期组织表达模式分析

从 CREP 数据库 (<http://crep.ncpgr.cn/crep-cgi/home.pl>) 下载 51 个水稻 LEA₂ 基因的表达芯片数据, 选择明恢 63 的 24 个不同生育时期的平均信号值取 10 的对数后用于聚类分析, M1 ~ M24 表示明恢 63 的 24 个不同生育时期, 并使用 TBtools 软件的 HeatMap 可视化。用 NCBI Primer-BLAST 设计特异性引物 (表 1), 实时荧光定量 qPCR 检测部分 LEA₂ 基因在水稻抽穗期不同组织部位的表达情况。取粳稻品种日本晴抽穗期的根、茎、穗, 每个样品由 4 个单株混合。使用植物总 RNA 提取试剂盒提取水稻 RNA 后通过反转录试剂盒获得水稻 cDNA。qPCR 试剂盒使用 SYBR-Green qPCR Mix, 20 μ L 反应体系: 10 μ L 2 \times SYBR qPCR Mix, 上下游引物各 1 μ L, 8 μ L 稀释的 cDNA。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56.5 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环。以泛素蛋白基因 Ubiquitin (AK059011) 为内参, 每个样品 3 次技术重复, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 qPCR 的结果。

表 1 qPCR 实验中所用的引物

Table 1 Primers used in qPCR

引物 Primers	引物序列 Primer sequence (5'→3')
OsLEA2-18F	CAACGACGTCGAAGTGCATC
OsLEA2-18R	ACGTGAAGTTGAACCCGGTC
OsLEA2-24F	GGGTGGGGGTGTACTACAAG
OsLEA2-24R	TTGTGCCCTGGTAGATCG
OsLEA2-44F	GGTGGTCCAGCCATTCTACC
OsLEA2-44R	CACATCTGCACCTGGAACCT
OsLEA2-60F	GACTACCACCTACTGCCACG
OsLEA2-60R	CGACTAGCCGGAGATAGCAG
UBQ-F	CCAGGACAAGATGATCTGCC
UBQ-R	AAGAAGCTGAAGCATCCAGC

1.4 水稻 LEA₂ 家族成员不同逆境处理下的表达模式分析

粳稻品种日本晴营养期干旱胁迫的转录组数据 GSE65022 从 NCBI 的 GEO 数据库 (<https://www>.

ncbi.nlm.nih.gov/geo/) 下载。基于获得的干旱胁迫后的实验组和对照组的转录组数据,对 status 为“ok”且 $P < 0.05$ 的 LEA₂ 基因的表达量进行比较分析。日本晴苗期的 5 种不同胁迫的基因表达芯片数据 GSE7530 从 NCBI 的 GEO 数据库下载。基于水稻在 5 种不同逆境处理下的芯片数据,获得了 23 个水稻 LEA₂ 基因 (*OsLEA2-4*、*OsLEA2-5*、*OsLEA2-8*、*OsLEA2-9*、*OsLEA2-10*、*OsLEA2-11*、*OsLEA2-14*、*OsLEA2-18*、*OsLEA2-19*、*OsLEA2-20*、*OsLEA2-21*、*OsLEA2-23*、*OsLEA2-24*、*OsLEA2-26*、*OsLEA2-34*、*OsLEA2-35*、*OsLEA2-37*、*OsLEA2-45*、*OsLEA2-51*、*OsLEA2-52*、*OsLEA2-54*、*OsLEA2-59*、*OsLEA2-60*) 在不同逆境处理下 lgFC 值 (FC 表示 fold change, 是实验组与对照组表达量的比值), 并将 lgFC 还原为 FC 即相对表达量后作图。

2 结果与分析

2.1 水稻 LEA₂ 家族成员的搜索和鉴定

通过“HMM search”获得 72 条水稻 LEA₂ 家

族成员的候选蛋白序列,同时利用拟南芥^[16]和小麦 LEA₂ 家族成员的蛋白序列^[17]查找同源序列,分别获得 7 条和 89 条水稻 LEA₂ 家族成员的候选蛋白序列。不同来源的序列汇总并去除重复后,一共得到了 67 条可能编码 LEA₂ 蛋白的候选序列。将这些蛋白序列在 Pfam 数据库中进行结构域搜索确认,发现其中 3 条序列不含 LEA₂ 结构域,最终得出 64 条水稻 LEA₂ 蛋白序列,它们由 60 个 LEA₂ 基因编码。选择每个基因的第一条转录本为该基因的代表序列,根据其在基因组上的位置依次将 60 个 LEA₂ 基因分别命名为 *OsLEA2-1* ~ *OsLEA2-60* (表 2)。

2.2 水稻 LEA₂ 基因的染色体定位

60 个水稻 LEA₂ 基因在水稻的 12 条染色体上均有分布(图 1)。其中,1 号染色体最多,有 13 个基因;10 号染色体最少,只有 1 个;5 号染色体有 7 个,7 号染色体有 6 个,2 号、3 号、4 号和 12 号染色体均为 5 个,8 号和 11 号染色体各有 4 个,6 号染色体上有 3 个,9 号染色体上有 2 个(图 1)。

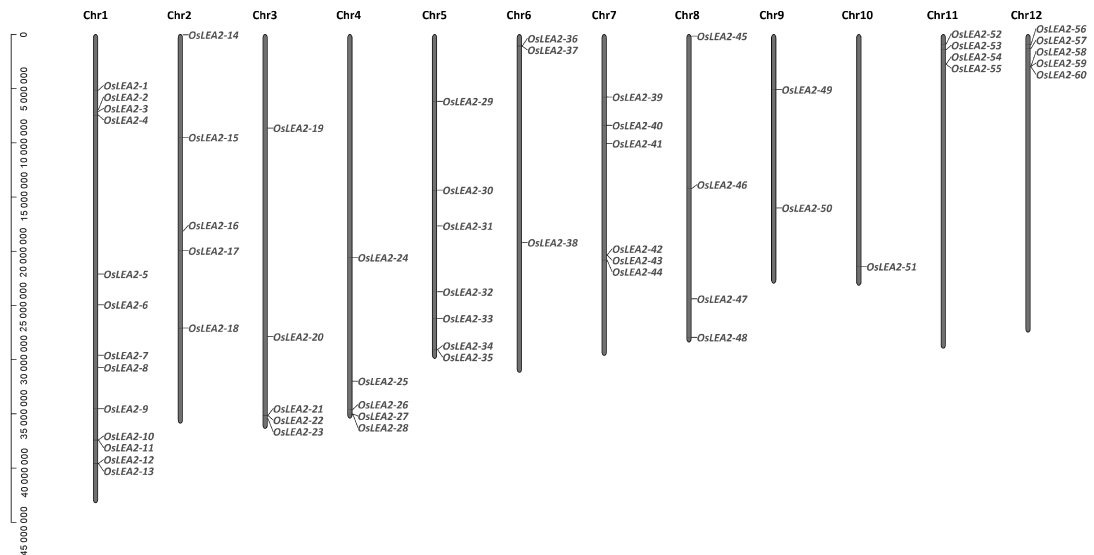
表 2 水稻 LEA₂ 家族成员理化性质

Table 2 Physicochemical properties of rice LEA₂ family members

基因名称 Gene name	TIGR 基因名称 TIGR gene name	染色体 Chromosome	分子质量/ku Molecular mass	长度/aa Length	等电点 Isoelectric point	亲水性 GRAVY
<i>OsLEA2-1</i>	LOC_Os01g09880.1	1	29.78	288	9.87	0.075
<i>OsLEA2-2</i>	LOC_Os01g12580.1	1	16.24	151	5.00	-0.066
<i>OsLEA2-3</i>	LOC_Os01g12820.1	1	35.39	330	8.84	-0.218
<i>OsLEA2-4</i>	LOC_Os01g13340.1	1	35.34	331	10.04	-0.303
<i>OsLEA2-5</i>	LOC_Os01g39290.1	1	29.91	291	10.38	0.149
<i>OsLEA2-6</i>	LOC_Os01g43530.1	1	19.75	180	4.79	-0.255
<i>OsLEA2-7</i>	LOC_Os01g51470.1	1	17.81	167	4.70	0.325
<i>OsLEA2-8</i>	LOC_Os01g53470.1	1	26.73	251	5.51	-0.046
<i>OsLEA2-9</i>	LOC_Os01g59680.1	1	33.31	312	10.17	0.019
<i>OsLEA2-10</i>	LOC_Os01g64450.1	1	26.74	241	9.30	0.042
<i>OsLEA2-11</i>	LOC_Os01g64470.1	1	26.01	238	9.88	-0.248
<i>OsLEA2-12</i>	LOC_Os01g68080.1	1	23.43	206	11.40	-0.647
<i>OsLEA2-13</i>	LOC_Os01g68090.1	1	49.14	455	10.14	-0.471
<i>OsLEA2-14</i>	LOC_Os02g01060.1	2	22.50	214	10.44	0.142
<i>OsLEA2-15</i>	LOC_Os02g16610.1	2	20.36	201	11.32	0.460
<i>OsLEA2-16</i>	LOC_Os02g30450.1	2	26.87	250	6.07	-0.202
<i>OsLEA2-17</i>	LOC_Os02g33550.1	2	23.71	224	9.04	0.219
<i>OsLEA2-18</i>	LOC_Os02g44670.1	2	21.53	197	10.49	0.140
<i>OsLEA2-19</i>	LOC_Os03g15630.1	3	25.16	238	9.25	0.339
<i>OsLEA2-20</i>	LOC_Os03g48950.1	3	25.06	232	9.02	0.188
<i>OsLEA2-21</i>	LOC_Os03g62010.1	3	22.80	212	9.46	0.165
<i>OsLEA2-22</i>	LOC_Os03g62020.1	3	22.38	209	8.16	0.112
<i>OsLEA2-23</i>	LOC_Os03g62620.2	3	34.80	316	4.88	-0.382
<i>OsLEA2-24</i>	LOC_Os04g33990.1	4	23.56	220	8.26	0.290
<i>OsLEA2-25</i>	LOC_Os04g53650.1	4	23.60	222	9.86	0.173
<i>OsLEA2-26</i>	LOC_Os04g58090.1	4	27.79	255	10.17	-0.067
<i>OsLEA2-27</i>	LOC_Os04g58850.1	4	22.21	205	9.14	0.303
<i>OsLEA2-28</i>	LOC_Os04g58860.1	4	24.53	220	7.61	0.126
<i>OsLEA2-29</i>	LOC_Os05g11010.1	5	30.33	293	10.03	0.090
<i>OsLEA2-30</i>	LOC_Os05g24760.1	5	21.42	213	10.91	0.473

续表 2 Continued Table 2

基因名称 Gene name	TIGR 基因名称 TIGR gene name	染色体 Chromosome	分子量/ku Molecular mass	长度/aa Length	等电点 Isoelectric point	亲水性 GRAVY
<i>OsLEA2-31</i>	LOC_Os05g30490.1	5	26.76	260	8.77	0.170
<i>OsLEA2-32</i>	LOC_Os05g40400.1	5	22.07	211	11.70	0.286
<i>OsLEA2-33</i>	LOC_Os05g45070.1	5	26.42	253	9.15	0.280
<i>OsLEA2-34</i>	LOC_Os05g50710.1	5	16.55	151	5.07	0.020
<i>OsLEA2-35</i>	LOC_Os05g50720.1	5	25.99	247	9.51	0.214
<i>OsLEA2-36</i>	LOC_Os06g02840.1	6	20.91	199	6.73	0.288
<i>OsLEA2-37</i>	LOC_Os06g02940.1	6	23.42	218	8.44	0.139
<i>OsLEA2-38</i>	LOC_Os06g32970.1	6	24.95	238	6.74	0.208
<i>OsLEA2-39</i>	LOC_Os07g10610.1	7	27.44	257	9.57	0.199
<i>OsLEA2-40</i>	LOC_Os07g14700.1	7	24.55	227	7.75	0.149
<i>OsLEA2-41</i>	LOC_Os07g17120.1	7	35.18	317	4.80	-0.384
<i>OsLEA2-42</i>	LOC_Os07g34040.1	7	22.67	213	9.14	0.239
<i>OsLEA2-43</i>	LOC_Os07g34050.1	7	19.64	190	9.04	0.597
<i>OsLEA2-44</i>	LOC_Os07g34720.1	7	22.55	200	8.98	-0.111
<i>OsLEA2-45</i>	LOC_Os08g01220.1	8	25.21	227	9.20	0.137
<i>OsLEA2-46</i>	LOC_Os08g23460.1	8	25.72	242	8.39	0.005
<i>OsLEA2-47</i>	LOC_Os08g38580.1	8	25.21	232	10.43	0.321
<i>OsLEA2-48</i>	LOC_Os08g44410.1	8	20.60	192	6.11	0.122
<i>OsLEA2-49</i>	LOC_Os09g09460.1	9	36.84	339	7.97	-0.073
<i>OsLEA2-50</i>	LOC_Os09g26480.1	9	28.23	265	9.22	0.132
<i>OsLEA2-51</i>	LOC_Os10g39970.1	10	25.92	242	8.93	0.199
<i>OsLEA2-52</i>	LOC_Os11g02730.1	11	25.25	235	10.06	0.234
<i>OsLEA2-53</i>	LOC_Os11g03600.1	11	29.75	276	10.97	-0.070
<i>OsLEA2-54</i>	LOC_Os11g05860.1	11	23.04	210	7.69	0.150
<i>OsLEA2-55</i>	LOC_Os11g05870.1	11	36.23	342	9.79	-0.147
<i>OsLEA2-56</i>	LOC_Os12g02700.1	12	24.89	233	9.49	0.203
<i>OsLEA2-57</i>	LOC_Os12g03370.1	12	29.38	275	10.50	-0.007
<i>OsLEA2-58</i>	LOC_Os12g06210.1	12	23.06	224	9.64	0.222
<i>OsLEA2-59</i>	LOC_Os12g06220.1	12	20.81	192	9.08	-0.110
<i>OsLEA2-60</i>	LOC_Os12g06260.1	12	23.14	212	8.26	0.140

图 1 水稻 *LEA_2* 基因的染色体位置Fig.1 Chromosome positions of rice *LEA_2* genes2.3 水稻 *LEA_2* 家族蛋白的理化性质

水稻 *LEA_2* 家族蛋白的平均长度为 243 aa, 有 52 个 *LEA_2* 蛋白长度在 150 ~ 300 aa, 最长的蛋白

(*OsLEA2-13*) 含有 455 个氨基酸, 最短的蛋白 (*OsLEA2-2*和 *OsLEA2-34*) 含有 151 个氨基酸。水稻 *LEA_2* 家族蛋白分子质量都偏小, 最小的只有

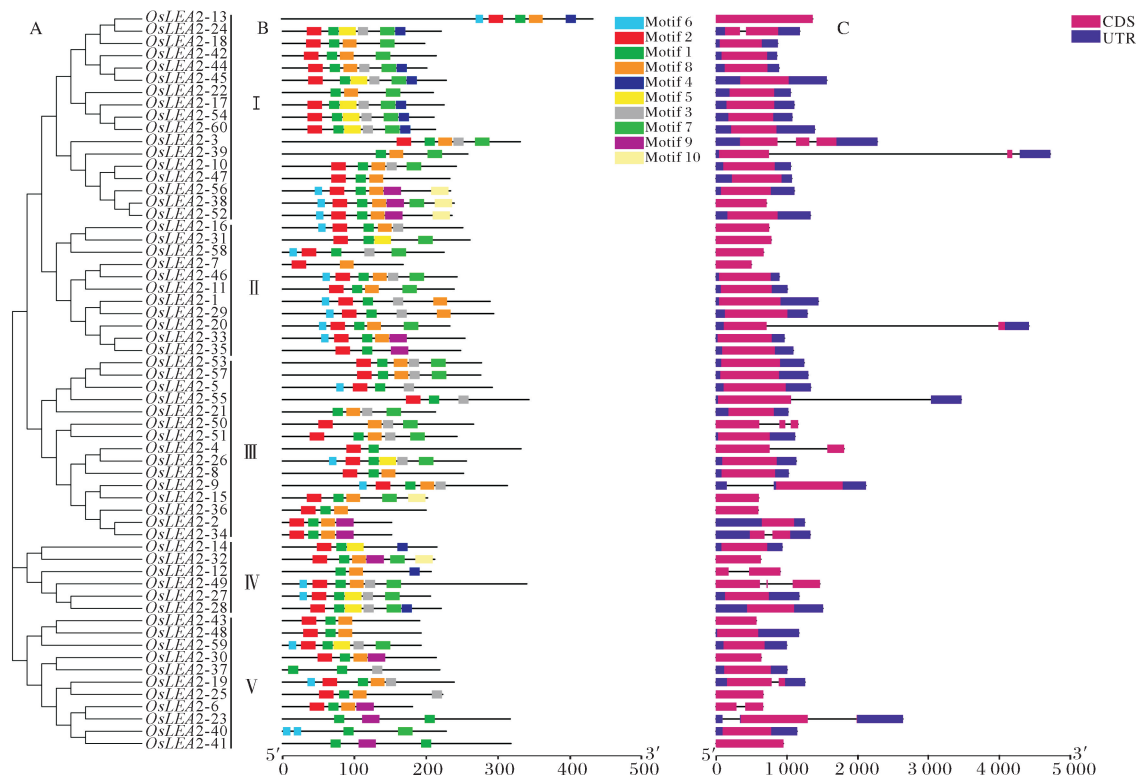
16.24 ku(OsLEA2-2),最大的也只有 49.14 ku(OsLEA2-13)。水稻 LEA₂ 家族蛋白的等电点分布较广,在 4.70 (OsLEA2-7)到 11.70 (OsLEA2-32);其亲水值在 -0.647 (OsLEA2-12)到 0.597 (OsLEA2-43),其中只有 18 个蛋白质 GRAVY 值 < 0,倾向于亲水;其他 42 个蛋白质的 GRAVY 值均 > 0,倾向于疏水(表 2)。

2.4 水稻 LEA₂ 家族的系统进化、保守基序及基因结构分析

系统进化分析表明,60 个水稻 LEA₂ 家族成员可分为 5 个组(I ~ V),分别包含 17、11、15、6 与 11 个水稻 LEA₂ 基因(图 2A)。分析水稻 LEA₂ 家族成员的保守基序情况,共发现 10 种保守基序(Motif 1 ~ 10),聚类到同一个组的 LEA₂ 家族成

员包含的保守基序类型基本相同,不同组成员间存在一定的差异(图 2B)。另外,95%的 LEA₂ 基因有 3 ~ 6 个基序,主要是 Motif 1、Motif 2 和 Motif 8,其中 96.7%成员含有 Motif 1,86.7%的成员含有 Motif 2,66.7%的成员含有 Motif 8。

基因结构分析表明,水稻 LEA₂ 家族成员的基因结构相对简单,不含或者很少含有内含子,所有基因的外显子均不超过 3 个,其中,83.3%的基因只有 1 个外显子区,11.7%的基因有 2 个外显子区,5%的基因有 3 个外显子区(图 2C)。另外,进化关系较近的基因具有相似数量的外显子和内含子。这表明水稻 LEA₂ 基因家族在进化上比较保守,这种基因结构的进化保守性可能与 LEA 蛋白参与许多重要的生物学过程密切相关。



A: 水稻 LEA₂ 家族成员的系统进化树; B: 水稻 LEA₂ 家族成员的保守基序分布; C: 水稻 LEA₂ 基因的基因结构。A: The phylogenetic relationship of rice LEA₂ family members; B: Distribution of conservative motifs of rice LEA₂ family members; C: Gene structures of rice LEA₂ genes.

图 2 水稻 LEA₂ 家族成员的系统进化、保守基序及基因结构

Fig.2 Phylogenetic relationship, conserved motifs and gene structures of rice LEA₂ family members

2.5 水稻 LEA₂ 家族基因启动子区的顺式作用元件

对 60 个 LEA₂ 基因起始密码子上游 2 kb 区域内的启动子序列进行在线分析,发现 60 个基因的启动子区域共包括 1 712 个顺式作用元件。其中与

生长发育相关的元件有 678 个光响应调控元件、49 个分生组织调控元件、8 个种子特异性调控元件等;与激素信号传导途径相关的元件包括 308 个茉莉酸甲酯响应元件、212 个脱落酸响应元件、44 个生长素响应元件等;与非生物逆境胁迫有关的元件包括 38

个低温胁迫响应元件、52 个干旱胁迫响应元件、99 个厌氧诱导响应元件等(图 3)。在水稻 *LEA_2* 基因家族,有 83.3% 的成员含有 ABA 的响应元件 ABRE,有 58.3% 的成员含有干旱响应元件 MBS,

有 48.3% 的成员含有低温的响应元件 LTR。这些结果说明 *LEA_2* 基因家族成员可能在干旱、低温等逆境胁迫中受到激发从而发挥其保护植物的作用。

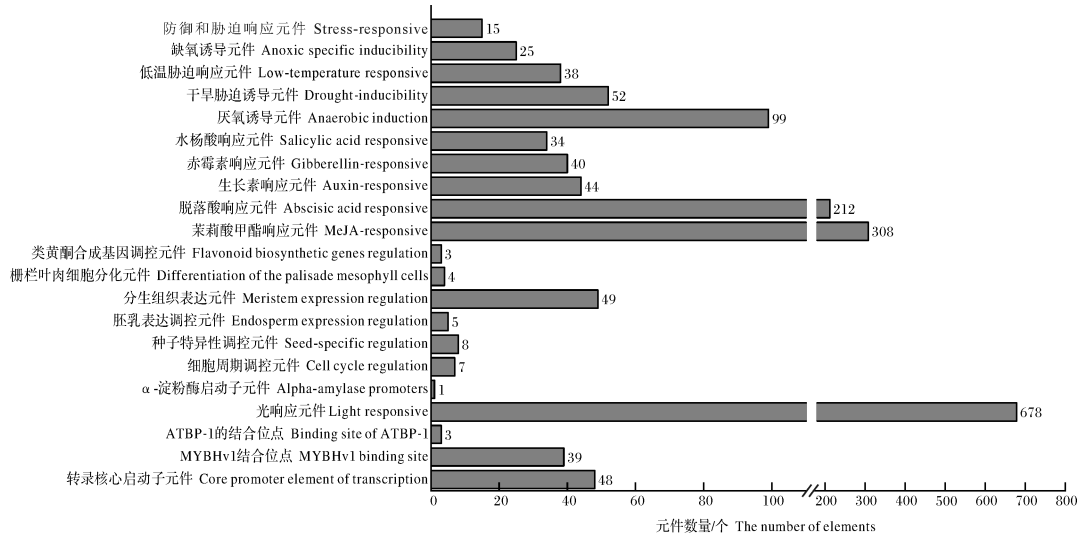


图 3 水稻 *LEA_2* 启动子区的顺式元件比较分析

Fig.3 Comparison analysis of *cis*-elements in rice *LEA_2* promoter regions

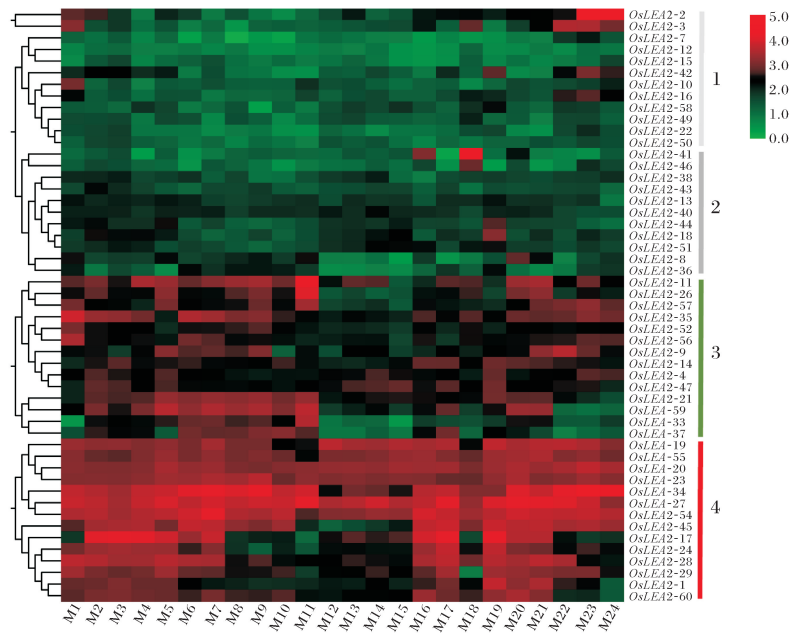
2.6 水稻 *LEA_2* 家族基因的组织表达谱

从 CREP 数据库搜索水稻品种明恢 63 全生育期表达谱数据,获得 51 个 *OsLEA2* 基因在 24 个不同发育时期的表达情况,并进行分层聚类(图 4)。结果发现,水稻 *LEA_2* 基因的全生育期的表达模式总体可分为 4 类:第 1 类包含 12 个基因,其中除了 *OsLEA2-2*、*OsLEA2-3*、*OsLEA2-10*、*OsLEA2-16*、*OsLEA2-42* 等 5 个基因在受精不同时间的胚乳(M22、M23、M24)或发芽 72 h 后的种子(M1)中表达量较高外,其他成员在大多数时期都处于较低水平;第 2 类包含 11 个基因,其中 *OsLEA2-8*、*OsLEA2-41*、*OsLEA2-46* 在雄蕊(M18)或颖壳(M20)这类花器官中表达量最高,*OsLEA2-18*、*OsLEA2-44* 在营养器官茎(M18)中表达量最高,该类基因在其他时期的表达量都处于中等偏低水平;第 3 类包含 14 个基因,该类基因在所有的幼穗组织(M12 ~ M16)中表达量偏低,在其他大部分时期中的表达量偏高;第 4 类包含 14 个基因,与第 1 类的 12 个基因相反,在大多数时期的表达量都比较高。总体上,在整个水稻 *LEA_2* 家族基因间共表达现象明显,4 类基因大致表现出 4 种表达模式,即每一类里的基因表达模式都比较相似,暗示 *LEA_2* 家族内可能存在功能冗余现象。

从第 2 类和第 4 类基因中各挑选 2 个基因,采用 qPCR 的方法分析它们在粳稻品种日本晴抽穗期的根、茎和穗中的表达水平,结果与水稻品种的表达谱芯片一致:属于第 2 类的 *OsLEA2-18* 和 *OsLEA2-44* 整体的表达水平偏低,根和穗中的表达水平相近,茎中的表达量相对高出约 1 倍;属于第 4 类的 *OsLEA2-24* 和 *OsLEA2-60* 在抽穗期的根中表达量低,穗中的表达量是根中的 5 倍以上,茎中的表达量又是穗中的 2 倍左右;此外,每一类中的 2 个基因的表达模式均高度相似(图 5)。

2.7 水稻 *LEA_2* 家族基因在不同逆境处理下的表达谱

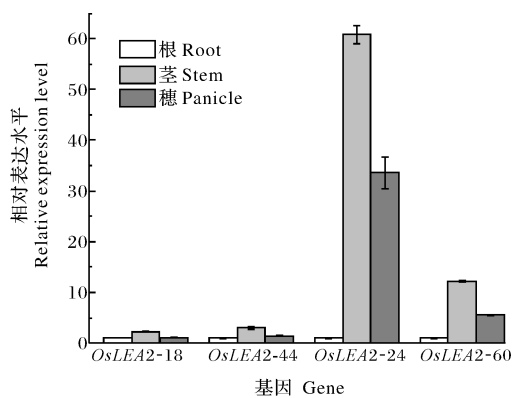
基于日本晴营养期植株干旱胁迫后的转录组数据,筛选得到了 18 个基因的可靠数据,其中 13 个基因在胁迫组中的表达量比对照组高,说明它们被干旱胁迫诱导上调表达,另外 5 个基因在胁迫组中的表达量比对照组低,说明干旱胁迫使它们下调表达(图 6)。干旱诱导上调表达的基因中,有 12 个上调显著(2 倍以上),其中 *OsLEA2-26* 上调倍数最高达到 99.37 倍,*OsLEA2-2* 上调 60.10 倍,*OsLEA2-11* 和 *OsLEA2-27* 均上调约 30 倍,*OsLEA2-3* 和 *OsLEA2-8* 均上调约 10 倍(图 6A);干旱诱导下调



绿色表示低表达；红色表示高表达；M1：发芽 72 h 后的种子；M2：萌发后的胚芽和胚根；M3：三叶期的幼苗；M4：2 分蘖期的茎；M5：2 分蘖期的根；M6：二次枝梗分化期的叶鞘；M7：减数分裂期的叶鞘；M8：二次枝梗分化期的叶；M9：减数分裂期的叶；M10：抽穗前 5 d 的剑叶；M11：抽穗 14 d 后的剑叶；M12：二次枝梗分化期的幼穗；M13：雌雄蕊分化期的幼穗；M14：花粉母细胞形成期的幼穗；M15：减数分裂期的幼穗；M16：抽穗期的幼穗；M17：抽穗前 5 d 的茎；M18：开花 1 d 前的雄蕊；M19：抽穗期的茎；M20：开花 1 d 前的颖壳；M21：开花 3 d 后的小穗；M22：受精 7 d 后的胚乳；M23：受精 14 d 后的胚乳；M24：受精 21 d 后的胚乳。Green denotes low expression；Red denotes high expression；M1：Seed, 72 h after imbibition；M2：Embryo and radicle after germination；M3：Leaf and root at three-leaf stage；M4：Shoot, seedling with 2 tillers；M5：Root, seedling with 2 tillers；M6：Sheath, young panicle at stage 3；M7：Sheath, 4-5 cm young panicle；M8：Leaf, young panicle at stage 3；M9：Leaf, 4-5cm young panicle；M10：Flag leaf, 5 days before heading；M11：Flag leaf, 14 days after heading；M12：Young panicle at stage 3；M13：Young panicle at stage 4；M14：Young panicle at stage 5；M15：Panicle, 4-5cm young panicle；M16：Panicle, heading stage；M17：Stem, 5 days before heading；M18：Stamen, one day before flowering；M19：Stem, heading stage；M20：Hull, 1 day before flowering；M21：Spikelet, 3 days after pollination；M22：Endosperm, 7 days after pollination；M23：Endosperm, 14 days after pollination；M24：Endosperm, 21 days after pollination.

图 4 不同组织中 *OsLEA2* 基因的表达谱分层聚类

Fig.4 Hierarchical clustering of *OsLEA2* genes in different tissues



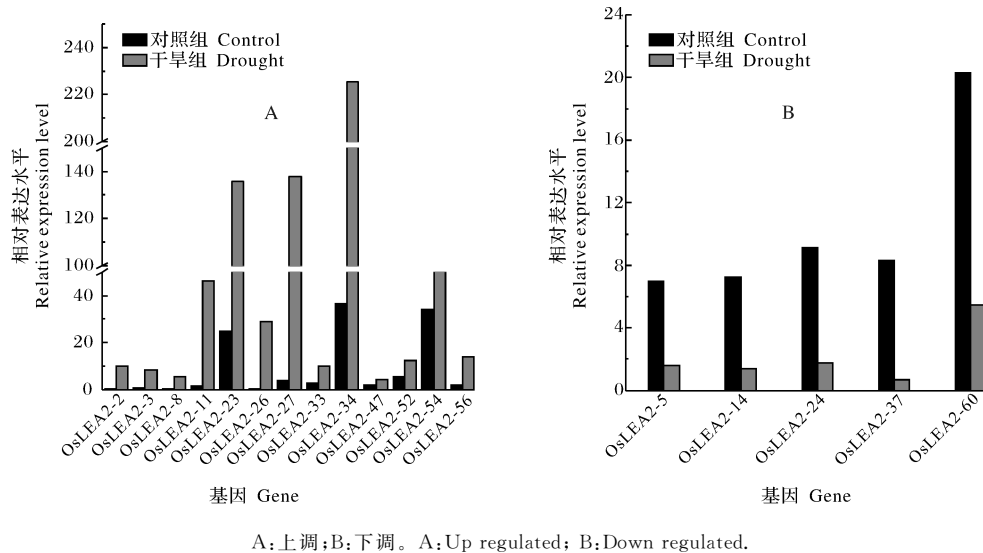
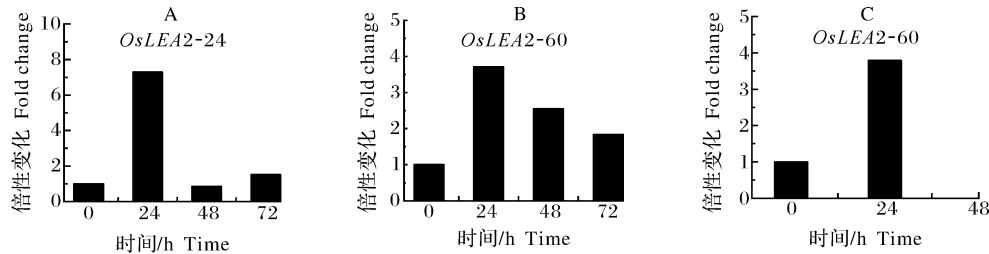
根中的表达量定为 1，标准差来自于 3 次技术重复。The expression levels in root are arbitrarily set as 1, and the SD are based on three technical replicates.

图 5 *OsLEA2* 基因在抽穗期不同组织中的表达水平

Fig.5 Expression level of *OsLEA2* genes in different tissues at heading stages

表达的 5 个基因，*OsLEA2-5*、*OsLEA2-14*、*OsLEA2-24*、*OsLEA2-37* 和 *OsLEA2-60* 分别下调 77%、81%、81%、91% 和 73% (图 6B)。

基于日本晴幼苗在不同逆境处理前后的基因表达芯片数据，获得了 23 个 *OsLEA2* 基因在不同逆境处理下的表达情况。结果发现，只有 *OsLEA2-24* 和 *OsLEA2-60* 检测到了 2 倍以上的表达量差异；*OsLEA2-24* 在 10 °C 冷处理 24 h 后表达量较处理前上调 7.29 倍，处理 48 h 后表达量迅速下降到处理前的 84%，处理 72 h 后表达量又上升到处理前的 1.51 倍；*OsLEA2-60* 在淹水处理 24 h 后表达量上调 3.72 倍，随着处理时间的延长，*OsLEA2-60* 表达量上调依次减小至 2.55 倍 (处理 48 h)、1.84 倍 (处理 72 h)，*OsLEA2-60* 基因在干旱处理 24 h 后表达量上调 3.79 倍 (图 7)。

图 6 *OsLEA2* 基因干旱胁迫后的表达模式Fig.6 Expression patterns of 18 *OsLEA2* genes after drought stressA: *OsLEA2-24* 冷胁迫 *OsLEA2-24* cold stress; B: *OsLEA2-60* 淹水胁迫 *OsLEA2-60* flooding stress; C: *OsLEA2-60* 干旱胁迫 *OsLEA2-60* drought stress.图 7 *OsLEA2* 基因在不同逆境处理下的表达水平Fig.7 Expression level of *OsLEA2* genes under different stress conditions

3 讨论

Battaglia 等^[14]将 LEA 蛋白分为 7 个组,其中第 5 组是非典型的疏水性蛋白,根据序列相似性分为 5A、5B 和 5C 三个亚组,5C 亚组即 LEA₂ 家族。Wang 等^[13]2007 年从水稻基因组鉴定的 LEA₂ 基因 *OsLEA5*、*OsLEA6*、*OsLEA7* 和 *OsLEA8*,在本研究中分别命名为 *OsLEA2-2*、*OsLEA2-6*、*OsLEA2-23* 和 *OsLEA2-34*。目前,仅有关于 *OsLEA2-34* (*OsLEA5c*) 基因功能的研究报道^[2,18]。

本研究通过籼稻明恢 63 全生育期的基因表达芯片对 51 个 *OsLEA2* 基因的表达情况进行分层聚类,发现它们的表达模式大致可分为 4 类,4 类基因间共表达现象明显。在粳稻品种日本晴抽穗期的根、茎、穗中,用 qPCR 的方法分别检测第 2 类基因 *OsLEA2-18* 和 *OsLEA2-44* 及第 4 类基因 *OsLEA2-24* 和 *OsLEA2-60* 的表达情况,结果发现

属于同类的 2 个基因的表达模式高度相似(图 5),验证了表达谱分层聚类的结果。另外,LEA 基因在高等植物的种子中大量表达^[5],籼稻的芯片数据显示只有第 1 类的 *OsLEA2-2* 和 *OsLEA2-16* 仅在受精后的胚乳中表达较高,以及第 4 类的 *OsLEA2-19*、*OsLEA2-20*、*OsLEA2-23*、*OsLEA2-27*、*OsLEA2-34*、*OsLEA2-54* 和 *OsLEA2-55* 等 7 个基因几乎在全部 24 个组织中都有较高的表达量,有 25 个基因(包括第 1 类中除 *OsLEA2-2*、*OsLEA2-3*、*OsLEA2-16*、*OsLEA2-42* 之外的 8 个基因,第 2 类全部 11 个基因,第 3 类的 *OsLEA2-21*、*OsLEA2-33*、*OsLEA2-37*、*OsLEA2-59* 等 4 个基因,第 4 类的 *OsLEA2-17* 和 *OsLEA2-60* 等 2 个基因)不同于先前发现的 LEA 基因,在受精后的胚乳中表达量持续较低(图 4)。此外,这 25 个基因中,*OsLEA2-10* 仅在发芽 72 h 的种子中表达量稍高,*OsLEA2-46* 仅在开花前 1 d 的雄蕊中表达量稍高,*OsLEA2-41* 仅在幼穗和雄蕊中表达量高,

OsLEA2-18 和 *OsLEA2-44* 仅在抽穗期的茎中表达量稍高, 暗示这 5 个基因可能分别只在种子萌发、幼穗或雄蕊发育等过程中发挥功能。

前人的研究发现植物在遭受干旱、低温、ABA 处理、盐处理等逆境胁迫后, LEA 蛋白在植物不同的组织部位都可能大量表达^[6]。通过分析水稻 LEA₂ 家族基因启动子区的顺式作用元件发现, 有 83.3% 的基因含有 ABA 的响应元件, 58.3% 的基因含有干旱响应元件, 48.3% 的基因含有低温响应元件。基于日本晴营养期植株干旱胁迫后的转录组发现, 干旱胁迫诱导 12 个基因显著上调表达和 5 个基因显著下调表达 (图 6); 其中, *OsLEA2-2* 和 *OsLEA2-26* 在干旱胁迫组中的表达量分别是对照组的 60.10 倍和 99.37 倍, *OsLEA2-2* 启动子包含低温响应元件 (LTR) 1 个、干旱响应元件 (MBS) 2 个、ABA 响应元件 (ABRE) 14 个, *OsLEA2-26* 启动子包含 ABRE 5 个, 可以将这 2 个基因作为培育抗旱水稻品种的候选基因开展更深入的研究。

本研究基于冷胁迫、聚乙二醇 (PEG) 模拟的干旱胁迫、淹水胁迫、甘露醇引起的渗透胁迫和盐胁迫共 5 种处理前后的日本晴幼苗的芯片数据, 研究了 23 个 *OsLEA2* 基因处理前后幼苗表达量的变化, 发现只有 *OsLEA2-24* 在冷处理后表达上调超 7 倍, *OsLEA2-60* 在淹水和干旱处理 24 h 后表达量均上调近 4 倍 (图 7)。Huang 等^[2] 报道 *OsLEA2-34* 在 PEG 模拟的干旱处理 1 h 后, 表达量迅速上调超 6 倍, 6 h 后表达量下降至不到 2 倍; 盐胁迫 1 h 后, *OsLEA2-34* 基因上调表达超过 3 倍, 6 h 后表达量几乎回复到处理前的水平。本研究中, *OsLEA2-34* 基因在任何处理的任何时间点均未发现其表达量的明显变化 (数据未展示)。基因的内含子多会延迟调控反应, 表达水平在应激反应中迅速变化的基因含有明显较低的内含子密度^[19]。水稻 LEA₂ 家族的基因不含或者很少含有内含子, 其表达水平在应激反应中的变化应该比较迅速, 但本研究中, 5 种逆境处理前后的水稻幼苗的表达水平变化差异较小。综合上述结果推测, 水稻 LEA₂ 家族基因启动子上存在大量 ABA 及非生物逆境胁迫响应元件, 可能赋予它们在数小时之内迅速响应干旱或冷胁迫等环境的能力, 而 10 日龄日本晴幼苗芯片数据中的样品大部分在处理 24 h 后采集, 这可能是绝大部分基因未检测到表达量显著变化的原因。

参考文献 References

- [1] VALIN H, SANDS R D, MENSBRUGGHE D, et al. The future of food demand: understanding differences in global economic models[J]. *Agricultural economics*, 2014, 45: 51-67.
- [2] HUANG L, ZHANG M J, JIA J, et al. An atypical late embryogenesis abundant protein *OsLEA5* plays a positive role in ABA-induced antioxidant defense in *Oryza sativa* L. [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(5): 916-929.
- [3] DURE L, GREENWAY S C, GALAU G A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(14): 4162-4168.
- [4] SHIH M D, HOEKSTRA F A, HSING Y C. Late embryogenesis abundant proteins[J]. *Adv Bot Res*, 2008, 48: 211-255.
- [5] ROBERTS J K, DESIMONE N A, LINGLE W L, et al. Cellular concentrations and uniformity of cell type accumulation of two lea proteins in cotton embryos[J]. *Plant cell*, 1993, 5(7): 769-780.
- [6] HUNDERTMARK M, HINCHA D K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. *BMC Genom*, 2008, 9: 118 [2020-11-09]. <https://core.ac.uk/display/45756176>. DOI: 10.1186/1471-2164-9-118.
- [7] BRINI F, YAMAMOTO A, JLAIEL L, et al. Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(4): 676-688.
- [8] XU D P, DUAN X L, WANG B Y, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110(1): 249-257.
- [9] HOUDE M, DALLAIRE S, N'DONG D, et al. Overexpression of the acidic dehydrin *WCOR410* improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves [J]. *Plant Biotechnol J*, 2004, 2(5): 381-387.
- [10] DUAN J L, CAI W M. *OsLEA3-2*, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45117 [2020-09-06]. <https://doi:10.1371/journal.pone.0045117>.
- [11] RODRIGUEZ-SALAZAR J, MORENO S, ESPIN G. LEA proteins are involved in cyst desiccation resistance and other abiotic stresses in *Azotobacter vinelandii* [J]. *Cell stress chaperones*, 2017, 22(3): 397-408.
- [12] LIU H, XING M Y, YANG W B, et al. Genome-wide identification of and functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum*) [J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13375 [2020-09-06]. <https://doi:10.1038/s41598-019-49759-w>.
- [13] WANG X S, ZHU H B, JIN G L, et al. Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.) [J].

- Plant Sci, 2007, 172: 414-420.
- [14] BATTAGLIA M, OLVERA-CARRILLO Y, GARCIARRUBIO A, et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins[J]. Plant Physiol, 2008, 148(1): 6-24.
- [15] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [16] BIES-ETHEVE N, GAUBIER-COMELLA P, DEBURES A, et al. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67(1): 107-124.
- [17] ZAN T, LI L Q, LI J T, et al. Genome-wide identification and characterization of late embryogenesis abundant protein-encoding gene family in wheat: evolution and expression profiles during development and stress [J/OL]. Gene, 2020, 736: 144422 [2020-09-06]. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144422>.
- [18] 胡廷章, 杨俊年, 周大祥, 等. 水稻 *OsLEA5c* 基因的克隆、表达和抗逆性分析[J]. 河南农业科学, 2014, 43(9): 18-23. HU T Z, YANG J N, ZHOU D X, et al. Cloning, expression and resistance analysis of *OsLEA5c* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Henan agricultural sciences, 2014, 43(9): 18-23.
- [19] JEFFARES D C, PENKETT C J, BAHLER J. Rapidly regulated genes are intron poor[J]. Trends Genet, 2008, 24(8): 375-378.

Characterization and expression profile analysis of LEA_2 family in rice

XUE Yali¹, WEI Xiaoshuang^{2,4,5}, ZHOU Hailian^{2,4,5},
LI Zhaoyang¹, HU Lihua^{2,3}, WANG Lingqiang^{1,2,4,5}, ZHANG Cuicui³

1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,
Nanning 530004, China;

3. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

4. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China;

5. Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biology, Nanning 530004, China

Abstract In order to explore the characteristics of LEA_2 family members in rice, we characterized 60 LEA_2 family members in the whole genome of rice with bioinformatics, and found they were unevenly distributed on 12 chromosomes. Results of analyzing protein sequence showed that the molecular weight of the LEA_2 proteins were between 16.24 ku and 49.14 ku with isoelectric points ranging from 4.7 to 11.7, and 42 of them tended to be hydrophobic. Results of phylogenetic analysis indicated that rice LEA_2 proteins are classified into five major clades, and proteins in the same clade has similar conservative motifs. Results of analyzing gene structure showed that *LEA_2* genes had no or few introns. Results of analyzing promoter sequence showed that there were a large number of *cis*-elements related to growth and development, hormone signal transduction and stress response in promoter regions of rice *LEA_2* genes. Based on the hierarchical cluster analysis of the expression profile and fluorescence quantitative PCR assays, the co-expression of LEA_2 family genes was found to be obvious. Both *OsLEA2-2* and *OsLEA2-26* were up-regulated and expressed by more than 60 times under drought stress.

Keywords rice; LEA_2; abiotic stress; bioinformatics; drought stress; cold stress; flooding stress; salt stress; osmotic stress

(责任编辑: 张志钰)