

利用基因芯片分析科农 9204 小麦高产氮高效机制

孙丽静^{1,2}, 张 玮^{1,3}, 纪 军^{1,3}, 李 辉², 李俊明^{1,3}

(1. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所 农业资源研究中心, 河北 石家庄 050021; 2. 河北省农林科学院 粮油作物研究所, 河北省作物遗传育种实验室, 河北 石家庄 050035; 3. 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:利用 Affymetrix 小麦基因芯片技术, 比较高产氮高效小麦品种科农 9204 和对照京 411 在不同发育时期和不同组织器官的基因表达谱。结果表明, 孕穗期根中, 2 个品种中差异表达的基因共有 2 955 个, 其中科农 9204 中表达量高于京 411 的基因为 1 201 个, 科农 9204 中表达量低于京 411 的基因为 1 754 个。孕穗期旗叶中, 2 个品种中差异表达的基因共有 2 738 个, 其中科农 9204 中表达量高于京 411 的基因为 1 323 个, 科农 9204 中表达量低于京 411 的基因为 1 415 个。花后 10 d 旗叶中, 2 个品种中差异表达的基因共有 2 294 个, 其中科农 9204 中表达量高于京 411 的基因为 839 个, 科农 9204 中表达量低于京 411 的基因为 1 455 个。在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中, 科农 9204 中表达量均高于京 411 的基因为 220 个, 科农 9204 中表达量均低于京 411 的基因为 303 个。为验证基因芯片数据的可靠性和重复性, 选择 4 个差异表达基因进行半定量 RT-PCR 分析, 所有基因结果均与芯片检测结果吻合。根据基因功能注释, 孕穗期根、孕穗期旗叶、花后 10 d 旗叶科农 9204 和京 411 品种间差异表达的基因 GO 分类(按照生物过程分类)中, 差异最显著的 GO 分类均为细胞含氮化合物代谢途径, 从基因组水平揭示科农 9204 和京 411 细胞含氮化合物代谢途径的差异很可能是导致 2 个品种间产量和氮效率差异的分子机制。

关键词:小麦; 基因芯片; 差异表达基因; 半定量 RT-PCR

中图分类号: S512; S143.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)04-0213-08

Analysis of High Yielding and Nitrogen Use Efficiency Mechanism of Wheat Kn9204 Using Gene Microarray

SUN Li-jing^{1,2}, ZHANG Wei^{1,3}, JI Jun^{1,3}, LI Hui², LI Jun-ming^{1,3}

(1. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China; 2. Hebei Provincial Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050035, China; 3. The State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Beijing 100101, China)

Abstract: Variations in gene expression profiles in high yielding and nitrogen use efficiency wheat variety Kn 9204 and the control variety J411 in different developmental stages and different tissues were analyzed using Affymetrix wheat microarray. The results indicated that 2 955 differentially expressed genes were detected between the two varieties in root at booting stage, including 1 201 and 1 754 of genes were up- and down-regulated comparing Kn9204 to J411, respectively. 2 738 differentially expressed genes were detected between the two varieties in flag leaf at booting stage, including 1 323 and 1 415 of genes were up- and down-regulated comparing Kn9204 to J411, respectively. Besides 2 294 differentially expressed genes were detected between the two varieties in flag leaf 10 days after anthesis, including 839 and 1 455 of genes were up- and down-regulated comparing Kn9204 to J411, respectively. There were 220 and 303 of genes up- and down-regulated comparing Kn9204 to J411 in all the three groups, including both root and flag leaf at booting stage, and flag leaf 10 days after anthesis, respectively. Semi quantitative RT-PCR was further used to confirm the results of microarray, and all the four genes gained the same results by the two methods, indicating that the microarray results were biologically reproducible. To further characterize these differentially expressed genes, we used Gene Ontology (GO) for their annotation. The results showed that

收稿日期: 2014-04-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2011CB100300); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08002-005); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-03-03B); 河北省现代农业产业技术体系小麦创新团队项目

作者简介: 孙丽静(1982-), 女, 河北邯郸人, 助理研究员, 博士, 主要从事小麦分子育种及分子生物学研究。

通讯作者: 李俊明(1964-), 男, 河北石家庄人, 研究员, 硕士, 主要从事小麦分子染色体工程育种研究。

the most significant GO classification (According to the biological process classification) of differentially expressed genes between Kn9204 and J411 in all the three groups (Root at booting stage, flag leaf at booting stage and flag leaf 10 days after anthesis) was cellular nitrogen compound metabolic process, indicating that the difference of cellular nitrogen compound metabolic process between Kn9204 and J411 was probably to be the molecular mechanism leading to yielding and nitrogen use efficiency difference between the two varieties.

Key words: Wheat; Microarray; Differentially expressed genes; Semi-quantitative RT-PCR

小麦是全球的主要粮食作物之一,也是我国重要的粮食作物,在国民经济中占有重要地位。培育高产氮高效小麦对提高资源利用效率,缓解氮流失所造成的环境污染,保障粮食安全具有重要的战略意义。

科农 9204 是由中国科学院石家庄现代化研究所(现为中科院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心)选育的国审小麦品种(品种审定编号:2003037)^[1]。科农 9204 以其综合农艺性状好、高产和稳产性突出、配合力强等优势,作为亲本培育出了一批小麦新品种,如科农 1093^[2]、科农 199^[3]、冀 5265^[4]、科农 1006^[5]等,另有 14 个新品系正在参加各级区域试验。

科农 9204 氮肥利用效率高,已广泛用为研究氮高效生理和遗传机制的重要材料。童依平等^[6]用盆栽试验研究了 12 个冬小麦品种在高、低氮条件下的籽粒产量、氮素吸收效率和氮素利用效率,证明科农 9204 为氮高效利用型品种。贾永国等^[7]通过水培试验证明科农 9204 吸氮量和地上部干物质重均较高。王小燕^[8]通过对科农 9204、京 411 等 5 个小麦品种在不同施氮量条件下氮素吸收率、氮素生理效率、氮肥表观利用率的比较,证明科农 9204 在不同年份不同供氮水平条件下,氮素吸收效率均显著大于京 411,且具有较高的氮素利用效率。Wang 等^[9]研究表明,高、低氮条件下科农 9204 均表现出较高的籽粒产量、根干质量、氮吸收效率和氮效率,认为强健的根系是科农 9204 高氮吸收效率的生理机制。Cui 等^[10]研究表明科农 9204 在 6 个氮浓度处理和 3 年重复中籽粒产量均高于鲁麦 23,氮素利用效率高、耐低氮、生长快和开花后氮吸收量大是科农 9204 高产和氮高效的生物学基础。

基因芯片是大规模分析基因表达谱的有效手段,它可以高敏感度地定性、定量检测大量基因在不同样品中表达水平的差异,结合基因功能注释、GO (Gene Ontology) 分析等生物信息学分析,从而揭示不同样品间表型差异的分子机理。近年来,基因芯片已广泛应用于小麦抗逆^[11-13]、抗病^[14-16]、生长发育^[17]和养分利用^[18-19]等基因表达谱的分析。

为了揭示科农 9204 及其衍生后代高产氮高效

的分子机理,本研究利用基因芯片技术对科农 9204 及对照品种京 411 不同发育时期和不同组织器官中差异表达的基因进行了分析,并运用 RT-PCR 技术对部分基因进行了半定量验证,从而证明了芯片结果的可靠性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

小麦品种科农 9204 (Kn9204) 和对照京 411 (J411) 由中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心李俊明实验室提供,2011 年 10 月种植于中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心栾城农业实验站 (N 37°53', E 114°41', 海拔 50.1 m)。分别取科农 9204 和京 411 孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶,每个样本混取 5 棵植株的相同部位,3 次重复。取样后迅速置于液氮中冷冻并于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.2 基因芯片杂交、结果分析及基因功能预测和分析

以科农 9204 和京 411 孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶 6 个材料进行基因芯片分析。Affymetrix GeneChip® Wheat Genome Array 包含 61 127 个原位合成的探针组,代表了小麦 42 条染色体上的 55 052 个转录本 (<http://www.affymetrix.com>)。芯片杂交试验由上海晶泰生物技术有限公司 (Gene-Tech Biotechnology Limited Company) 完成。主要包括总 RNA 的提取和纯化、cDNA 的合成和纯化、cRNA 的合成和纯化、cRNA 片段化和配制杂交液、芯片杂交和洗脱、芯片扫描、图像分析和数据处理。根据上海晶泰生物技术有限公司提供的检测数据,筛选出试验组和对照组中表达差异大于 2 倍的探针,通过 HarvEST 软件和 PLEXdb (http://www.plexdb.org/modules/PD_probeset/batch_annotation.php) 对探针进行功能注释,通过 agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>) 对差异表达探针进行 GO 分析。

1.3 半定量 RT-PCR

用 TRIzol (Invitrogen) 按试剂说明书提取科农 9204 和京 411 孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗

叶 RNA,以 500 ng RNA 为模板,按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa) 试剂盒的说明书进行反转录。以 1 μ L 反转录产物为模板,以 *TaActin* 为内参,用 2 \times *Taq* PCR MasterMix (天根) 对 4 个芯片中筛选的差异表达基因进行半定量 RT-PCR 分析,以验证芯片结果。RT-PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, T_m 30 s,72 $^{\circ}$ C 29 ~ 104 s (根据扩增片段大小按 1 min 扩增 1 kb 计算),30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min;保持 20 $^{\circ}$ C。之后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。引物序列及退火温度见表 1。

表 1 用于半定量 RT-PCR 分析的引物

Tab. 1 Primers used in semi-quantitative RT-PCR analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	退火温度/ $^{\circ}$ C T_m
<i>TaPIPI</i>	F: TCTCTCCCAAAGCCAAGAGC R: CAGCGATAAGATTCCACCCG	58
<i>TaUreG</i>	F: CCTTCCACTTCCAAGTCTGG R: CATACGTGAACACATGCCCCG	58
<i>TaNAS1</i>	F: CTCATCAGCCACTCTCCAC R: GCAGGCGATCAAGCAGCTAG	60
<i>TaWPK4</i>	F: CCACCTCCACCTAATCCCCA R: GTTCTGTGAGTTGCACCCG	64
<i>TaActin</i>	F: GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC R: GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC	56

2 结果与分析

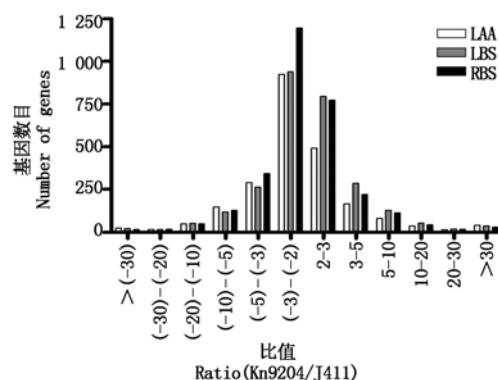
2.1 不同组织器官和发育时期科农 9204 和京 411 差异表达基因分析

为了检测不同组织器官和不同发育时期科农 9204 和京 411 品种间差异表达的基因,以孕穗期科农 9204 和京 411 旗叶 (Kn9204-LBS, J411-LBS) 和根 (Kn9204-RBS, J411-RBS), 以及花后 10 d 科农 9204 和京 411 旗叶 (Kn9204-LAA, J411-LAA) RNA 为材料,进行芯片分析,将 2 个品种中表达量差别 2 倍以上的基因定义为品种间差异表达的基因。

孕穗期根中,2 个品种中差异表达的基因共有 2 955 个,其中科农 9204 中表达量高于京 411 的基因为 1 201 个,科农 9204 中表达量低于京 411 的基因为 1 754 个。在科农 9204 中表达量高于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2 ~ 3 的有 771 个,占差异基因总数的 64.20%;3 ~ 5 倍的差异基因有 219 个,占总数的 18.23%;差异表达倍数大于 30 的基因有 32 个,占总数的 2.66%。在科农 9204 中表达量低于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2 ~ 3 的有 1 195 个,占差异基因总数的 68.13%;3 ~ 5 倍的差异基因有 341 个,占总数的 19.44%;差异表达倍数大于 30 的基因有 18 个,占总数的 1.03% (图 1)。

孕穗期旗叶中,2 个品种中差异表达的基因共有 2 738 个,其中科农 9204 中表达量高于京 411 的基因为 1 323 个,科农 9204 中表达量低于京 411 的基因为 1 415 个。在科农 9204 中表达量高于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2 ~ 3 的有 793 个,占差异基因总数的 59.94%;3 ~ 5 倍的差异基因有 285 个,占总数的 21.54%;差异表达倍数大于 30 的基因有 39 个,占总数的 2.95%。在科农 9204 中表达量低于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2 ~ 3 的有 938 个,占差异基因总数的 66.29%;3 ~ 5 倍的差异基因有 263 个,占总数的 18.59%;差异表达倍数大于 30 的基因有 23 个,占总数的 1.63% (图 1)。

花后 10 d 旗叶中,2 个品种中差异表达的基因共有 2 294 个,其中科农 9204 中表达量高于京 411 的基因为 839 个,科农 9204 中表达量低于京 411 的基因为 1 455 个。在科农 9204 中表达量高于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2 ~ 3 的有 491 个,占差异基因总数的 58.52%;3 ~ 5 倍的差异基因有 168 个,占总数的 20.02%;差异表达倍数大于 30 的基因有 42 个,占总数的 5.01%。在科农 9204 中表达量低于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2 ~ 3 的有 923 个,占差异基因总数的 63.44%;3 ~ 5 倍的差异基因有 289 个,占总数的 19.86%;差异表达倍数大于 30 的基因有 25 个,占总数的 1.72% (图 1)。



LAA. 花后 10 d 旗叶; LBS. 孕穗期旗叶;
RBS. 孕穗期根。图 2, 4, 表 2 ~ 4 同。

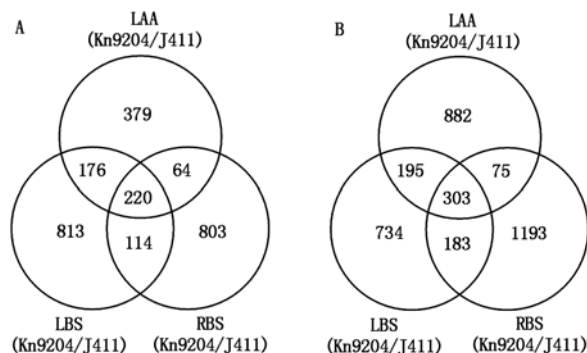
LAA. Flag leaf 10 days after anthesis; LBS. Flag leaf at booting stage;
RBS. Root at booting stage. The same as Fig. 2, 4 and Tab. 2 - 4.

图 1 不同组织器官和发育时期科农 9204 和京 411 具有不同倍数的差异表达基因的分布

Fig. 1 Distribution of differentially expressed genes with different folds of expression levels in Kn9204 and J411 in different organs or developmental stages

总体来说,2 个品种间差异表达基因数目变化趋势为:孕穗期根 (2 955) > 孕穗期旗叶 (2 738) > 花后 10 d 旗叶 (2 294)。在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中,科农 9204 中表达量高于京 411

的基因数均小于科农 9204 中表达量低于京 411 的基因数,孕穗期根中为 1 201 VS 1 754,孕穗期旗叶中为 1 323 VS 1 415,花后 10 d 旗叶中为 839 VS 1 455,以花后 10 d 旗叶中差异最为显著。在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中,科农 9204 中表达量高于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2~3 的基因占差异基因总数的比例均超过了一半以上 (58.52%~64.20%);在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中,科农 9204 中表达量低于京 411 的基因中,差异表达倍数为 2~3 的基因占差异基因总数的比例亦均超过了一半以上 (63.44%~68.13%)。在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中,科农 9204 中表达量均高于京 411 的基因为 220 个,科农 9204 中表达量均低于京 411 的基因为 303 个 (图 2),这些基因为不同组织、不同时期 2 个品种间稳定差异的基因。



A. 科农 9204 中表达量高于京 411 的基因数;

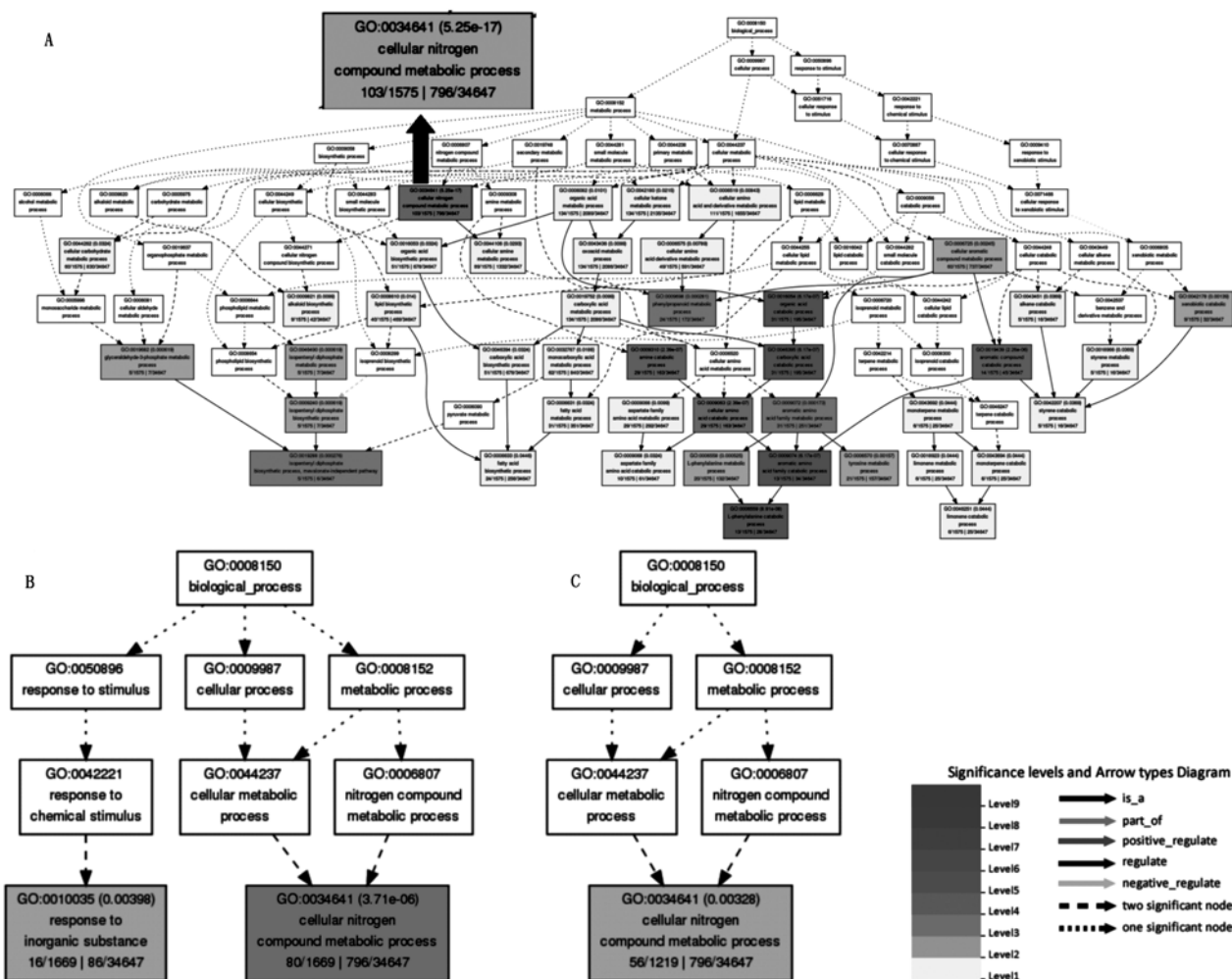
B. 科农 9204 中表达量低于京 411 的基因数。

A. Number of up-regulated genes comparing Kn9204 to J411;

B. Number of down-regulated genes comparing Kn9204 to J411.

图 2 不同组织器官和发育时期科农 9204 和京 411 表达量差异 2 倍以上的基因

Fig. 2 Venn diagram indicating number of differentially expressed genes comparing Kn9204 to J411 in different organs or developmental stages



A. 孕穗期旗叶中科农 9204 和京 411 差异表达基因 GO 分类网络图;B. 孕穗期根中科农 9204 和京 411 差异表达基因 GO 分类网络图;C. 花后 10 d 旗叶中科农 9204 和京 411 差异表达基因 GO 分类网络图。颜色越深表明差异越显著。

A. Gene ontology analysis of differentially expressed genes comparing Kn9204 to J411 in flag leaf at booting stage;B. Gene ontology analysis of differentially expressed genes comparing Kn9204 to J411 in root at booting stage;C. Gene ontology analysis of differentially expressed genes comparing Kn9204 to J411 in flag leaf 10 days after anthesis. The darker showed more significant differences.

图 3 不同组织器官和发育时期科农 9204 和京 411 差异表达基因 GO 分类网络图 (按照生物过程分类)

Fig. 3 Gene ontology analysis (biological process) of differentially expressed genes comparing Kn9204 to J411 in different organs or developmental stages

表 2 不同组织器官和发育时期科农 9204 表达量均高于京 411 5 倍以上的基因功能注释
Tab.2 Functions of probes with more than five fold up-regulated comparing Kn9204 to J411
in different organs or developmental stages

探针号 Probe set ID	Kn9204/J411 比值 Ratio			功能描述 Description of function
	LAA	LBS	RBS	
Ta. 28263. 1. S1_at	244. 22	295. 95	109. 91	Histone H2B. 2
TaAffx. 113846. 1. S1_s_at	232. 01	164. 20	96. 73	Aquaporin protein
Ta. 10349. 2. S1_at	147. 70	120. 22	482. 69	Universal stress protein domain containing protein
Ta. 30908. 1. S1_at	137. 62	25. 57	21. 60	EF hand family protein
Ta. 1944. 1. S1_at	126. 74	44. 21	92. 20	Superoxide dismutase, mitochondrial precursor
TaAffx. 104814. 1. S1_at	107. 50	61. 14	145. 68	NBS-LRR disease resistance protein
Ta. 4092. 2. S1_at	97. 59	50. 32	180. 18	Af10-protein
Ta. 1908. 1. S1_at	90. 18	62. 48	18. 34	GTP cyclohydrolase I 1
Ta. 10508. 2. S1_a_at	69. 09	29. 38	41. 80	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Ta. 28411. 1. A1_at	67. 44	54. 20	109. 07	Calmodulin-related calcium sensor protein
Ta. 3830. 1. S1_a_at	65. 91	40. 68	19. 96	ATP-dependent DNA ligase
Ta. 2895. 1. S1_x_at	52. 39	24. 16	26. 59	Aquaporin protein, PIP1D, PIP1;5
TaAffx. 58902. 1. S1_x_at	48. 00	30. 78	46. 51	NADH-ubiquinone oxireductase
Ta. 2895. 1. S1_at	46. 21	24. 43	14. 52	Aquaporin protein
Ta. 11279. 1. A1_at	35. 68	40. 81	37. 36	Transposon protein
Ta. 20949. 1. A1_at	35. 10	13. 17	10. 22	Glyoxalase family protein
Ta. 14739. 1. S1_s_at	33. 34	19. 02	12. 58	Flowering promoting factor-like 1
Ta. 6210. 1. S1_at	30. 57	17. 79	10. 25	Serine/arginine repetitive matrix protein 1
TaAffx. 16946. 1. S1_at	27. 85	17. 23	32. 32	Glycosyltransferase
Ta. 30798. 1. A1_at	27. 67	8. 50	5. 65	Vacuolar-processing enzyme
Ta. 7694. 1. S1_s_at	26. 69	10. 73	9. 77	Histone H2B. 2
Ta. 1763. 3. S1_at	22. 12	28. 91	64. 95	Ras-related protein
TaAffx. 104444. 1. S1_at	22. 07	14. 74	18. 80	LTPL119
Ta. 3830. 2. S1_x_at	20. 54	23. 29	12. 55	Glycosyltransferase
TaAffx. 92191. 1. A1_at	18. 66	6. 31	7. 65	NBS-LRR disease resistance protein
Ta. 14739. 1. S1_x_at	14. 15	5. 93	5. 78	PBS lyase HEAT-like repeat protein
TaAffx. 108612. 1. S1_at	11. 93	5. 76	16. 73	Alanyl-tRNA synthetase
TaAffx. 128848. 1. S1_at	11. 35	33. 17	7. 66	Transporter family protein
TaAffx. 37764. 1. A1_at	10. 60	21. 33	7. 54	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 12 precursor
TaAffx. 18856. 1. S1_at	10. 31	10. 51	10. 62	Part of small (Ribosomal) subunit (SSU) processosome
Ta. 7318. 1. S1_a_at	10. 28	11. 20	7. 28	Glutathione transport system permease protein gsiC
TaAffx. 97770. 1. A1_at	9. 17	10. 16	5. 44	TadE family protein
Ta. 5897. 3. S1_at	9. 17	9. 94	5. 61	Thrombospondin, type I domain containing 3 isoform 2
Ta. 3830. 2. S1_at	8. 29	14. 03	6. 38	Glycosyltransferase
Ta. 12045. 1. S1_at	7. 64	5. 30	6. 11	Late embryogenesis abundant group 1
Ta. 16053. 1. S1_at	7. 29	5. 63	6. 41	Leucine zipper protein-like
Ta. 5897. 3. S1_x_at	7. 23	7. 12	6. 40	Thrombospondin, type I domain containing 3 isoform 2
TaAffx. 54508. 1. S1_at	6. 15	10. 51	8. 11	Peptidyl-tRNA hydrolase
Ta. 17960. 1. S1_at	5. 86	13. 13	11. 53	O-methyltransferase

2.2 差异表达基因功能注释

为了从整体水平分析基因表达差异, 阐明导致科农 9204 和京 411 2 个品种间产量和氮效率差异的分子机制, 本研究对孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶科农 9204 和京 411 品种间差异表达的基因分别进行 GO 分类(按照生物过程分类)。FDR < 0.05 的 GO 分类在孕穗期旗叶中为 42 个, 按显著性

从大到小依次为: 细胞含氮化合物代谢途径(Cellular nitrogen compound metabolic process), L-苯丙氨酸分解代谢途径(L-phenylalanine catabolic process), 胺分解代谢途径(Amine catabolic process), 胞内氨基酸分解代谢途径(Cellular amino acid catabolic process), 芳香族氨基酸分解代谢途径(Aromatic amino acid family catabolic process) 等。FDR < 0.05

的 GO 分类在孕穗期根中只有 2 个,按显著性从大到小依次为:细胞含氮化合物代谢途径(Cellular nitrogen compound metabolic process)和对无机物的响应(Response to inorganic substance)。FDR < 0.05 的 GO 分类在花后 10 d 旗叶中则只有 1 个,即细胞含氮化合物代谢途径(Cellular nitrogen compound metabolic process)。将以上有效的 GO 分类进行生物途径网络作图(图 3),发现在根和不同发育时期的旗

叶中,差异最显著的 GO 分类均为细胞含氮化合物代谢途径(Cellular nitrogen compound metabolic process),从基因组水平揭示科农 9204 和京 411 细胞含氮化合物代谢途径的差异很可能是导致 2 个品种间产量和氮效率差异的分子机制。此外,L-苯丙氨酸、胺、胞内氨基酸和芳香族氨基酸等含氮化合物的分解代谢途径在孕穗期旗叶中的差异也可能对 2 个品种间的产量和氮效率差异有一定的贡献。

表 3 不同组织器官和发育时期科农 9204 表达量均低于京 411 5 倍以上的基因功能注释

Tab.3 Functions of probes with more than five fold down-regulated comparing
Kn9204 to J411 in different organs or developmental stages

探针号 Probe set ID	Kn9204/J411 比值 Ratio			功能描述 Description of function
	LAA	LBS	RBS	
Ta. 27111. 1. S1_at	-84.22	-81.31	-9.18	Dihydroneopterin aldolase
Ta. 28489. 1. A1_at	-67.72	-30.06	-22.69	Heat shock protein DnaJ
Ta. 13859. 1. A1_at	-59.28	-42.04	-22.10	Calmodulin-related calcium sensor protein
Ta. 24948. 1. S1_at	-54.54	-53.84	-35.20	Anaphase-promoting complex subunit 1
Ta. 23397. 1. S1_x_at	-51.95	-17.83	-11.27	Glycine-rich cell wall structural protein precursor
TaAffx. 106304. 1. S1_at	-36.14	-151.70	-32.12	Thaumatococcus, putative
Ta. 5257. 2. S1_x_at	-31.84	-15.44	-24.01	OsRC12-11-Hydrophobic protein OSR8
Ta. 23373. 1. S1_at	-24.08	-19.79	-9.33	Glyoxalase family protein
Ta. 24747. 1. A1_x_at	-23.13	-37.98	-8.47	Sucrase-related
Ta. 20909. 2. S1_s_at	-23.11	-26.92	-7.18	SCP-like extracellular protein
Ta. 24947. 1. S1_at	-20.95	-45.28	-45.06	OsRC12-6-Hydrophobic protein LTI6B
Ta. 5278. 1. S1_x_at	-20.13	-20.23	-25.36	Phospholipase
Ta. 5559. 1. S1_at	-20.07	-13.46	-22.64	Pre-rRNA-processing protein TSR2
Ta. 28688. 1. A1_at	-18.86	-9.53	-10.12	Transcription elongation factor 1
Ta. 24150. 1. S1_at	-17.33	-18.19	-20.64	Glutathione S-transferase
Ta. 7124. 1. A1_at	-15.93	-18.02	-15.07	Conserved hypothetical protein
Ta. 25383. 1. A1_at	-15.30	-25.68	-12.57	Transferase family protein
Ta. 7545. 1. A1_a_at	-15.02	-9.23	-5.18	Kinesin motor domain containing protein
Ta. 4943. 1. S1_at	-14.03	-7.93	-6.77	REX1 DNA Repair family protein
Ta. 1422. 2. S1_at	-13.78	-17.85	-49.73	DNA-directed RNA polymerase subunit
Ta. 20895. 1. S1_at	-13.23	-19.61	-12.97	Late embryogenesis abundant protein
Ta. 30123. 2. A1_at	-12.90	-8.60	-11.30	Haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
Ta. 5278. 1. S1_at	-11.39	-12.01	-9.54	Phospholipase
Ta. 20895. 1. S1_x_at	-11.33	-11.56	-11.87	Late embryogenesis abundant protein
Ta. 7968. 1. S1_at	-10.04	-5.19	-5.31	Thioesterase family protein
Ta. 30793. 3. S1_x_at	-9.02	-11.37	-7.15	Transcription elongation factor 1
Ta. 18681. 1. S1_x_at	-8.94	-8.86	-5.29	Cyclic phosphodiesterase
Ta. 3768. 1. A1_at	-8.22	-10.66	-14.28	Mitochondrial ATP synthase precursor
Ta. 7326. 2. S1_at	-7.97	-7.63	-10.25	Transmembrane protein 93
Ta. 23322. 2. S1_at	-7.80	-19.90	-12.86	Thaumatococcus
Ta. 28366. 1. S1_a_at	-7.40	-12.43	-6.06	60S ribosomal protein L22-2
Ta. 2842. 1. S1_s_at	-6.86	-7.12	-10.64	Oxysterol-binding protein
Ta. 1383. 1. S1_s_at	-6.72	-9.65	-5.88	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic
Ta. 10697. 1. A1_at	-6.64	-5.74	-7.49	Heparanase-like protein precursor
Ta. 5515. 1. S1_a_at	-5.27	-5.97	-8.07	CAMK_CAMK_like. 32

为了进一步明确差异显著基因的具体功能,我们逐一分析孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶

中科农 9204 表达量与京 411 差异均在 5 倍以上的基因,结果发现有接近一半的基因功能未知。在孕

穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中科农 9204 表达量均高于京 411 的 220 个基因中,表达量差异 5 倍以上的基因为 68 个,其中有注释的基因为 39 个(表 2),包括组蛋白、水通道蛋白、超氧化物歧化酶、逆境响应蛋白、抗病蛋白等。在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中科农 9204 中表达量均低于京 411 的 303 个基因中,表达量差异 5 倍以上的基因为 82 个,其中有注释的基因为 35 个(表 3),包括醛缩酶、热激蛋白、钙调素相关的钙感知蛋白、后期促进复合物、疏水蛋白等。

2.3 半定量 RT-PCR 验证芯片结果

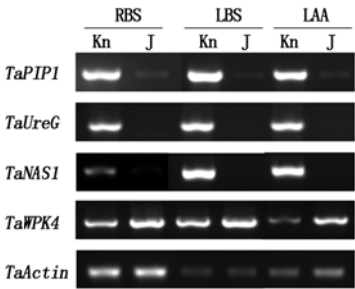
为验证芯片结果的可靠性,在芯片结果中选择 4 个在科农 9204 和京 411 孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中表达量均有明显变化的基因(表

4)进行半定量 RT-PCR 分析。为了试验数据的可靠性,首先根据生物信息学进行序列比对拼接并得到 4 个基因 *TaPIPI*、*TaUreG*、*TaNAS1* 和 *TaWPK4* 的全长 cDNA 序列,设计引物(表 1),并对扩增产物进行测序以验证引物的特异性。之后进行 RT-PCR 分析,以 *TaActin* 基因作为内参基因,试验重复 3 次以验证差异的稳定性(图 4)。结果显示,在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中,*TaPIPI*、*TaUreG* 和 *TaNAS1* 在科农 9204 中的表达量均高于京 411,与芯片结果一致;*TaWPK4* 在科农 9204 中的表达量均低于京 411,也与芯片结果一致。由以上结果可以看出,所有备选基因 RT-PCR 检测结果均与芯片结果一致,因此,芯片结果是可信的。

表 4 备选基因总结

Tab. 4 Summary of candidate genes

探针号 Probe set ID	基因 Gene	Kn9204/J411 比值 Ratio			功能描述 Description of function
		LAA	LBS	RBS	
TaAffx. 113846. 1. S1_s_at	<i>TaPIPI</i>	232. 012	164. 199	96. 731	Aquaporin protein
Ta. 14115. 2. S1_at	<i>TaUreG</i>	12. 068 3	12. 816 8	3. 188 93	Urease accessory protein G
Ta. 5145. 4. S1_at	<i>TaNAS1</i>	4. 485 1	3. 009 21	3. 338 68	Nicotianamine synthase
Ta. 144. 1. S1_at	<i>TaWPK4</i>	-9. 141 38	-9. 125 75	-1. 608 39	WPK4 protein kinase



以 *TaActin* 为内参;Kn. 科农 9204;J. 京 411。
TaActin was used as an internal control;Kn. Kn9204;J. J411.

图 4 半定量 RT-PCR 验证基因芯片结果

Fig. 4 Confirmation of the microarray data by semi-quantitative RT-PCR

3 讨论

本研究采用基因芯片技术构建了 2 个小麦品种科农 9204 及对照京 411 不同发育时期和不同组织器官的 6 个基因表达谱数据库。为了验证数据的准确性和可靠性,运用 RT-PCR 方法对部分基因进行了半定量验证,表明本研究及其数据的可靠性和准确性。

总体来说,科农 9204 和京 411 2 个品种间差异表达基因数目变化趋势为:孕穗期根 > 孕穗期旗叶 > 花后 10 d 旗叶,说明同一时期不同器官相比,根中基因表达较旗叶中活跃;不同时期同一器官相比,孕穗期基因表达比花后 10 d 活跃。在孕穗期根、孕穗

期旗叶和花后 10 d 旗叶中,科农 9204 中表达量高于京 411 的基因数均小于科农 9204 中表达量低于京 411 的基因数,并且以花后 10 d 旗叶中差异最为显著。在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中,无论是科农 9204 中表达量高于京 411 的基因还是科农 9204 中表达量低于京 411 的基因,差异表达倍数在 5 倍以下的基因占差异基因总数的比例为 78. 55% ~87. 57%,差异表达倍数在 30 倍以上的基因占差异基因总数的比例为 1. 03% ~5. 01%,说明 2 个品种间差异表达的大部分基因的表达量变化较小。在孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶中,科农 9204 中表达量均高于京 411 的基因为 220 个,其中表达量差异 5 倍以上的基因为 68 个;科农 9204 中表达量均低于京 411 的基因为 303 个,其中表达量差异 5 倍以上的基因为 82 个。基因注释显示,有接近一半的基因功能未知。

小麦不同品种间在氮利用效率上存在显著的基因型差异^[6,20-23],科农 9204 的氮高效利用特性在许多研究中得到了证实^[6-10]。前人的研究结果为科农 9204 氮高效利用提供了大量的生理证据,但对其分子机制以及起关键作用的基因却没有研究报道。本研究通过基因芯片技术分析孕穗期根、孕穗期旗叶和花后 10 d 旗叶科农 9204 和京 411 品种间差异表达的基因,并分别进行 GO 分类(按照生物过程分

类), $FDR < 0.05$ 的 GO 分类在孕穗期旗叶中为 42 个, 孕穗期根中只有 2 个, 花后 10 d 旗叶中则只有 1 个, 其中差异最显著的 GO 分类均为细胞含氮化合物代谢途径 (Cellular nitrogen compound metabolic process), 从基因组水平揭示科农 9204 和京 411 细胞含氮化合物代谢途径的差异很可能是导致 2 个品种间产量和氮效率差异的分子机制。这也为前人生理水平的研究结果提供了很好的分子支持。

参考文献:

- [1] 钟冠昌, 李俊明, 穆素梅, 等. 高产稳产小麦新品种—科农 9204[J]. 麦类作物学报, 2003, 23(1): 100.
- [2] 李俊明, 王志国, 安调过, 等. 面包小麦新品种—科农 1093[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 157.
- [3] 李俊明, 张相岐, 张爱民, 等. 高产广适小麦新品种—科农 199[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(2): 368.
- [4] 刘玉平, 王江浩, 赵爱菊, 等. 高产广适冬小麦新品种冀 5265 的选育[J]. 河北农业科学, 2009, 13(2): 60–61.
- [5] 李俊明, 纪 军, 王志国, 等. 高产广适冬小麦新品种—科农 1006[J]. 麦类作物学报, 2013, 33(6): 1317.
- [6] 童依平, 李继云, 李振声. 不同小麦品种吸收利用氮素效率的差异及有关机理研究 I. 吸收和利用效率对产量的影响[J]. 西北植物学报, 1999, 19(2): 104–111.
- [7] 贾永国, 安调过, 李俊明, 等. 不同小麦基因型孕穗期根系性状与吸氮量的关系[J]. 华北农学报, 2006, 21(3): 37–40.
- [8] 王小燕. 不同小麦品种产量和氮素吸收利用率的差异及其生理与遗传机理研究[D]. 北京: 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 2008.
- [9] Wang R F, An D G, Hu C S, *et al.* Relationship between nitrogen uptake and use efficiency of winter wheat grown in the North China Plain[J]. Crop and Pasture Science, 2011, 62(6): 504–514.
- [10] Cui Z, Zhang F, Chen X, *et al.* Using in-season nitrogen management and wheat cultivars to improve nitrogen use efficiency[J]. Science Society of America Journal, 2011, 75(3): 976–983.
- [11] Aprile A, Mastrangelo A M, De Leonardis A M, *et al.* Transcriptional profiling in response to terminal drought stress reveals differential responses along the wheat genome[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 279.
- [12] Qin D, Wu H, Peng H, *et al.* Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using wheat genome array[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 432.
- [13] 李永春, 孟凡荣, 王 潇, 等. 水分胁迫条件下洛旱 2 号小麦根系的基因表达谱[J]. 作物学报, 2008, 34(12): 2126–2133.
- [14] Golkari S, Gilbert J, Prashar S, *et al.* Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes[J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(1): 38–49.
- [15] Coram T E, Settles M L, Chen X. Transcriptome analysis of high-temperature adult-plant resistance conditioned by *Yr39* during the wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction[J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(4): 479–493.
- [16] 王俊美, 刘红彦, 徐红明, 等. 应用基因芯片分析红蜘蛛白粉菌胁迫条件下的基因表达谱[J]. 作物学报, 2009, 35(7): 1188–1193.
- [17] Gregersen P L, Holm P B. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(1): 192–206.
- [18] Ruuska S A, Lewis D C, Kennedy G, *et al.* Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 66: 15–32.
- [19] Howarth J R, Parmar S, Jones J, *et al.* Co-ordinated expression of amino acid metabolism in response to N and S deficiency during wheat grain filling[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(13): 3675–3689.
- [20] 张国平, 张光恒. 小麦氮素利用效率的基因型差异研究[J]. 植物营养与肥料学报, 1996, 2(4): 331–336.
- [21] 郭战玲, 沈阿林, 寇长林, 等. 河南省不同小麦品种氮效率的差异研究[J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 185–189.
- [22] 张锡洲, 阳显斌, 李廷轩, 等. 小麦氮素利用效率的基因型差异[J]. 应用生态学报, 2011, 22(2): 369–375.
- [23] 董莉莉, 李友军, 吴金芝, 等. 施用不同形态氮肥对土壤供氮能力及冬小麦氮素利用的影响[J]. 河南农业科学, 2008(8): 81–83.