

摘要

铝毒害是酸性土壤中限制植物生长的重要逆境因子。铝毒害抑制植物根伸长进而抑制植物对水分、养分的吸收最终抑制植物的生长、发育。本研究以热带抗铝旱稻品种 *Azucena* 和铝敏感水稻品种 IR1552 为材料, 采用 cDNA-AFLP 技术筛选铝诱导基因, 结合抗铝 QTL 的定位结果, 用反向 Northern 筛选主要 QTL 区间上的铝诱导基因, 以筛选抗铝候选基因。论文主要研究结果如下:

用 *Azucena* 和 IR1552 发展的 RIL 群体进行的抗铝 QTL 的定位结果表明: 在胁迫 1 星期、2 星期的情况下定位的结果是基本一致的, 分别在第 1 染色体 RZ801~RG381、第 9 染色体 RZ698~ACA-CTA1、第 12 染色体的 ACA-CTT1~RM117 等 3 个区间检测到 1 个 QTL。3 个 QTL 的总贡献率分别是 39% 和 35%。染色体 1 上的 QTL 有利等位基因来自 *Azucena*, 在 1 星期、2 星期的贡献率分别为 15% 和 9%; 染色体 9 上的 QTL 有利等位基因来自 IR1552, 1 星期和 2 星期的贡献率分别为 13%、15%; 第 3 个 QTL 有利等位基因来自 *Azucena*, 贡献率分别为 10% 和 11%。整合不同研究结果发现在第 1 染色体 C86 和 C742 的范围内有一个在 4 个不同的研究中都检测到的铝抗性 QTL。这一 QTL 在不同的研究中的贡献率在 9%~25% 之间。

通过 cDNA-AFLP 筛选到 34 个铝诱导的 TDFs, 其中有两个 TDFs 和同一基因同源, 可能为同一基因外, 其它为不同的基因。33 个单一基因中 19 个和已知基因同源, 其中 7 个 TDFs 为细胞壁组分代谢相关的, 3 个 TDFs 参与细胞代谢, 3 个为蛋白代谢相关的, 另外 6 个参与次生代谢、氧胁迫以及其它的细胞过程。这些铝诱导基因说明铝毒害影响不同的细胞代谢过程, 使植物产生一系列的生理生化反应。而铝对细胞壁的影响尤其明显, 铝诱导木质素、半纤维素、糖蛋白等细胞壁组分相关基因的表达。据此推测铝诱导细胞壁成分的改变, 使细胞壁加厚, 透性改变, 从而限制铝进入细胞质膜, 但同时也可能限制了细胞伸长。大部分铝诱导基因在铝抗性品种和铝敏感品种中都受铝诱导表达增强, 而且表达模式类似。它们可能是铝毒害引起的应激反应, 而非品种特异的铝抗性基因。根据整合的遗传图谱, 两个 TDFs (*OsAR16* 和 *OsAR28*) 位于已定位的 QTL 区间附近, 它们在铝抗性品种和敏感品种

中显示出不同的表达模式，可能是铝抗性的候选基因。

进一步利用已定位的 EST 信息，用反向 Northern 筛选定位在第 1 染色体 C86~C742 区间的 83 个 ESTs 以及 75 个定位在其它两个 QTL 位置的 ESTs。结果发现有 4 个位于 C86~C742 区间的 ESTs 受铝诱导增强表达，它们分别是氨基酸转运体 (C50531)、非特异脂转移蛋白 (E30131)、GDP 分裂抑制子 (E1391) 以及泛素样蛋白 SUMO-1 (E61853)。序列比较发现 E61853 和 cDNA-AFLP 筛到的 OsAR16 为同一基因。Northern 分析表明这些 EST 在抗性品种和敏感品种中显示出不同的表达模式。它们也是为进一步分析这一铝抗性 QTL 的候选克隆。另外通过 PCR 克隆了 OsAR28 全长 CDS，该 CDS 长为 513 bp，序列分析表明该基因和另一个未知功能基因中的前 510 bp 同源性较高(98%)。

关键词： 水稻 铝抗性 QTL EST cDNA-AFLP 候选基因

致谢

本论文是在导师吴平教授的悉心指导下完成的。论文从选题、方案制定、实施到结果分析和撰写,每一个细节都凝结着导师的心血和智慧。三年来导师在学业上给我以精心的指导,在生活上对我无微不至的关心和帮助,这些将使我终生受益。导师身上所表现出的对科学事业的执着追求、勇于奉献的精神,对科学前沿的敏锐洞察力,以及乐观进取的生活态度都将永远是我学习的楷模。值此论文完成之际,谨向尊敬的导师致以最崇高的敬意和最衷心的感谢!

我要将我至深的感谢献给同一课题组的杨玲老师、郑炳松老师。本研究的顺利完成离不开他们的齐心相助,所取得的每一分收获都包含着他们的智慧和劳动。此外要感谢易可可老师、吴运荣老师和姜华武博士后。论文工作的顺利完成得益于他们在工作和生活上给我的老师般的指导和朋友般的关心和帮助。刘非燕老师、李靖老师也给了我诸多帮助和指导,在此致以诚挚的感谢,同时也感谢王君晖老师、曾广文教授、黄建中老师的帮助和指导。

在博士期间实验室吴忠长、黄帼、杜黎明、陈双燕、侯兴亮、朱世华、佃蔚敏、张帆、金维正等和我一起同甘共苦渡过了3年的博士时光。张卫平、沈晓莹、夏铭、王小兵、陈青爽、李海波、王芳、贾巧君、齐晓朋、张麝龙、林涛、缪岩松、沈竹夏、何晓薇等也给了我诸多帮助。王首锋、樊叶杨、曹姣仙、周洁、韩秋敏、严成其、莫肖蓉、王明怡、焦芳婵、党磊、沈翊、宋昕蔚、朱凌、徐敏、汪少敏、俞超、段瑞君、杨益、余晓波及实验室的所有其他师兄姐妹们和我一起渡过了人生中最令人难忘的一段时光,忠心感谢他们的关心、帮助和支持。

此外,感谢黄娟琴以及盛海燕、金静、刘梅、朱正歌、饶志明等朋友们在我的实验过程和论文撰写过程中给我的帮助和鼓励。

最后,感谢我的父母、姐姐、姐夫、弟弟、弟妹和所有的朋友三年来对我的理解和支持!

毛传淦

2003年5月于杭州华家池

缩略语

缩写词	英文名称	中文名称
AAP	Amino acid permeases	氨基酸透性酶
BCB	Blue copper binding protein	蓝色铜结合蛋白
cDNA-AFLP	cDNA amplified fragment length polymorphism	cDNA扩增片段长度多态性
CDS	Coding sequence	编码序列
CEC	Cation exchange capability,	阳离子交换能力
DDRT-PCR	Differential display RT-PCR	差异显示反转录PCR
EST	Expressed sequence tag	表达序列标签
GDI	GDP-dissociation inhibitor	鸟苷二磷酸分裂抑制子
GST	Glutathione-S-transferase	谷胱甘肽硫转移酶
OsAR	<i>Oryza sativa</i> Al regulated	(水)稻铝调节的
PSS	Phosphatidylserine synthase	磷脂酰丝氨酸合成酶
QTL	Quantitative trait loci	数量性状位点
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR	RNA随机起始PCR
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性
RIL	Recombinant inbred lines	重组自交系
SSR	Simple sequence repeat	微卫星
SUMO-1	Small ubiquitin-like modifier-1	小泛素样修饰子-1
TDF	Transcript derived fragment	来自转录本的片段
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetylglucosamine	尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺

第一章 文献综述

第一部分 铝毒害和植物抗铝毒害的机制

1 引言

铝(Al)是地壳中含量最丰富的金属元素,也是在酸性土壤中限制作物产量的重要逆境因子,在pH值小于等于5的条件下铝毒害成为酸性土壤中限制植物生长的重要因素(Kochian, 1995)。全世界酸性土壤的比例达到可耕地面积的40%(Kochian, 1995)。据估计在亚洲、非洲和美洲的热带地区分别有37%、39%和55%的土壤是酸性土壤,总计达到1.6亿公顷(Sanchez 和 Salinas, 1981)。其中包括我国南方的广大红壤区域。随着世界范围的酸雨的影响,铝毒害问题将会更加严重。另外,大量的施用N肥也会导致土壤酸化。铝在土壤溶液中的形态随pH值的变化而不同。在酸性土壤中,铝的主要无机形态为 Al^{3+} 、 $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$,这些单体态铝离子对植物具有较大的毒性(Kinraide 和 Parker, 1987; Parker 等, 1989)。通过土壤改良(如施石灰)控制作物铝毒害可能会取得一定成效,但大面积土壤改良受制于成本,资源,劳力的投入,而且对深层土壤的改良效果较差。因此通过选育抗铝毒的作物品种是更为可行的方法。针对这一问题,阐明铝对植物的毒害机制和植物抗铝毒害的生物学机理具有重要理论和实践意义。

抑制植物根伸长是铝毒害的最明显症状(Taylor, 1988)。铝积累在根部,严重损伤植物根系,使根缩短变粗变脆,并抑制侧根的生长。铝影响植物对 P 、 Ca^{2+} 、 K^+ 等矿质元素和水的吸收、转运和利用并最终影响植物的生长发育。铝毒害影响植物根伸长的生理生化机制已经有许多的研究。尽管铝毒耐性在不同物种和同一物种不同品种间都存在巨大的变异,但对植物抗铝毒害的机制还不是很清楚。

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,也是小粒禾本科作物中最抗铝的植物,然而对水稻抗铝毒害的机制目前所知甚少。研究表明水稻不同品种对铝毒害的抗性存在显著的基因型差异(Khatiwards 等, 1996; Wu 等, 1997),这为通过作物遗传改良,培育高抗品种提供了可行性,同时也为研究水稻抗铝毒害的机制提供了理论基

础。弄清水稻抗铝毒害的生理及分子机制对通过育种实践培育高抗品种或通过基因工程改良作物的抗铝性是必要的。

本研究的目的是探寻铝对水稻的毒害机制及水稻抗铝毒害的分子机理，以期将来解决大面积酸性土壤的铝毒害问题提供理论基础。

2 铝对植物的毒害作用

2.1 毒性铝的种类

植物毒性相关的铝可分为几种类型，包括单核形式的 Al^{3+} 、多核 Al 以及低分子量的铝复合物。铝在土壤溶液中的形态随 pH 值的变化而不同。在 $\text{pH}<5$ 的酸性条件下，铝以八面体六水合物 $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ 的形式存在，通常又被称作 Al^{3+} ；当 pH 值升高时， $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ 去质子化形成 $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ 和 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 的单体羟基形态；而在中性 pH 值时，则以微溶的 $\text{Al}(\text{OH})_3$ （水铝矿）形态存在，在缺乏铝结合配位体时， $\text{Al}(\text{OH})_3$ 可抑制其它铝单体的溶解。在碱性条件下，特别是溶液 pH 值远高于胞质 pH 值(7.4)时，铝主要以 $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ 的形态存在。

通常认为对单子叶植物来说， Al^{3+} 毒性最大。对小麦根的实验即证实了这一点，但首先必须排除聚合态 Al (Al_{13}) 的影响(Kinraide, 1991)。 Al_{13} 被认为比 Al^{3+} 的毒性更大，但 Al_{13} 是否在自然界存在及其对土壤毒害的作用都不清楚。对双子叶植物来说 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ 或 $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ 是主要的毒害形态， Al^{3+} 则次之(Alva 等, 1986)。而 Al 的一些小分子化合物，如 Al-F、铝的有机酸盐则基本没有毒性(Kinraide, 1991)。

2.2 铝毒害的作用位点

根尖是铝毒害抑制根伸长的主要作用位点。事实上，仅仅根尖 2-3mm 的部分暴露于铝溶液中就足以抑制玉米和豌豆根的伸长(Delhaize 和 Ryan, 1995; Matsumoto 等, 1996); 根尖可分为根冠、分生组织区和伸长区。Bennet 和 Breen(1991) 认为根冠在玉米感受铝毒害中具有重要作用。但是随后对玉米根的实验证实，不论是整根还是去根冠根，铝对其生长的抑制及其抑制程度是相同的(Ryan 等, 1993)。因而，伸长区细胞的伸长被认为是铝抑制细胞伸长的靶位点。最近，Sivaguru 和 Horst (1998) 发现玉米根尖转换区的远端是铝毒的靶位点，在这一区域细胞进入快

速伸长的准备阶段。

2.3 铝毒害机理

因为铝能和许多细胞外及细胞内结构组分结合，人们提出了许多不同的假说来解释铝毒性机制。包括铝和根细胞壁的结合；铝破坏质膜及质膜的转运过程；以及铝和共质体组分的结合等等。但目前还没有有很强的证据来支持任何一种假说。

2.3.1 铝对根伸长的抑制

铝毒的主要症状是抑制根伸长。铝处理显著减少细胞长度而增加细胞直径。在铝敏感的玉米品种中，根伸长抑制在 30 min 之内就出现了(Llugany 等, 1995)。

许多研究认为，铝诱导的根伸长抑制是根尖细胞分裂受抑的结果。Clarkson(1965)第一个提出，铝抑制了 DNA 的合成，使根部分生组织细胞有丝分裂停止，抑制了根伸长。然而，Horst 和 Klotz (1990)认为铝抑制根伸长是抑制细胞伸长而不是抑制细胞分裂的结果。然而铝主要是干扰细胞分裂过程或者是细胞伸长过程仍然不是十分清楚，因为目前还没有一种足够敏感的技术来检测细胞分裂的抑制(Sivaguru 和 Horst, 1998)。细胞分裂是一个缓慢的过程，植物的细胞周期大约是一天，细胞分裂对总的根伸长的贡献只有 1%~2%。在另一方面，人们发现根伸长抑制在铝处理后 1-2 h 之内就已发生(Matsumoto, 2000)。在这种情况下人们一般会认为铝毒性的主要机制是对伸长区细胞的抑制。最近的研究还表明，铝胁迫诱导细胞程序性死亡进而导致小麦根伸长不可逆抑制(Pan 等, 2001)。

事实上，铝对根伸长的抑制和根部细胞分裂的停止几乎同时发生，或者甚至领先于后者，因此，铝对细胞分裂的抑制不可能是根伸长受抑的最初原因。由于根细胞的分裂周期约有 24 小时(Powell 等, 1986)，且分裂细胞只占整个根伸长区的一小部分，而根伸长在铝胁迫 1-2 小时内即被抑制。在这么短的时间内，对极少部分细胞分裂的抑制并不足以影响整个根的伸长。因此，铝对根细胞伸长的抑制才是根伸长最初受抑的主要原因，而铝对根细胞分裂的抑制可能是铝胁迫 24 小时后根长受抑的原因(Kochian, 1995)。

2.3.2 铝对质外体和共质体的毒害作用

要了解铝对根的毒害机制,首先必须了解铝到底是对质外体还是对共质体产生毒害或者两者兼而有之。因为 Al^{3+} 极易快速地进入质外体,在其中沉淀或结合到细胞壁和细胞膜外侧,并由此进入共质体,所以有人认为,铝对根的毒害主要在于质外体。例如,铝能结合细胞壁上的果胶质残基或蛋白质,降低细胞壁的延伸性和液压传导;从细胞壁或细胞膜上的重要位点置换出其它离子;结合到脂双层或膜结合蛋白上,抑制营养传递过程;或者也可能通过触发二级信号途径打断质外体的胞间代谢等等(Bennet 和 Breen, 1991; Rengel, 1992; Taylor, 1988)。事实上,要确定上述作用是否真的造成铝毒害是困难的,而证明铝在质外体的毒害位点的证据也并不那么确定。

铝可以通过多种途径(如:胞吞作用)穿过质膜进入细胞,而且人们发现小麦根尖积累的铝约有 50%-70% 分布在共质体(Tice 等, 1992),由此可见,铝和共质体的互作似乎也是铝毒害的重要方面。我们知道,短时期的铝接触(<60min)即可抑制根的伸长,但因为没有合适的方法来测量铝在共质体和质外体的分布情况,所以很难确定这一现象是否是由于铝快速进入共质体并积累到一定数量造成的。Lazof 等(1994)在对食荚菜豆根的研究中发现在根接触铝仅仅 30 分钟后即可在其共质体中检测到铝,说明在根生长受抑制之前,铝已经进入根细胞,那么,极有可能是铝对共质体的伤害造成根生长抑制。虽然共质体的中性 pH 环境(6.5-7.5)和丰富的铝配体的存在使 Al^{3+} 的浓度保持在极低的水平,但是由于铝对代谢过程中的许多重要分子具有极高的亲和性,因而仍可能对共质体造成相当程度的伤害。我们不难假设,共质体中铝配体复合物的形成,可能抑制了配体自身的重要功能,也可能是铝配体复合物自身阻碍了其它代谢过程(Kochian, 1995)。

在铝胁迫中,根尖细胞的质外体和共质体均会积累铝。对食荚菜豆的研究表明在相同胁迫条件下,敏感品种不论在质外体还是共质体,都比抗性品种积累更多的铝。可见,铝对根尖的伤害可能既包括质外体伤害也包括共质体伤害(Kochian, 1995)。

2.3.3 铝对细胞壁的影响

日益增多的证据表明, 质外体在感受铝的过程中起着主要作用(Horst, 1995)。铝会诱导许多细胞壁组分发生改变, 并诱导细胞壁加厚。细胞壁组分的改变对理解铝毒性和耐性的机制有很重要的作用。形态和组织学研究表明铝胁迫增加某些细胞壁组分如多糖和木质素的含量(Eleftheriou 等, 1993; Sasaki 等, 1996)。Van 等 (1994) 研究表明铝处理增加细胞壁果胶和多糖的含量, 果胶含量的增加是糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖含量增加的结果。Van 等(1994) 研究也表明铝处理诱导南瓜幼苗根中半纤维素含量提高, 并且发现它主要是由于木糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖提高的结果。铝对其它细胞壁组分如酶、伸展蛋白、木葡聚糖等的影响也很可能影响细胞壁功能的完整性。因此阐明体内和铝结合的糖组分以及参与细胞壁结构的合成和修饰的酶的活性和多糖的结构的变化将是很重要的研究内容(Matsumoto, 2000)。胼胝质在铝胁迫条件下迅速而活跃的合成并结合到质外体中, 如在大豆中胼胝质的形成受铝诱导, 并且低至 $5\mu\text{mol/L}$ 的铝处理 10 min 即可诱导胼胝质的形成(Horst, 1995)。尽管已经知道铝可能会影响许多细胞壁成分的改变, 但目前尚没有直接的分子证据支持, 也不知道这些改变对植物适应铝毒害环境具体有些什么作用。

2.3.4 铝对质膜的影响

根细胞质膜位于根细胞的边界, 并且富含磷脂, 因而质膜是潜在的铝最初结合的靶位点。关于铝毒害改变质膜的结构和功能以及铝和质膜的相互作用目前已有许多研究(Matsumoto, 2000)。根细胞质膜上磷脂和膜蛋白都可能是铝结合的靶位点(Akeson 等, 1989; Caldwell, 1989)。铝和质膜的结合诱导膜结构发生改变, 从而导致质膜功能的改变, 如质膜流动性及离子转运过程以及膜的电生理特性等的改变。另外铝胁迫还会诱导膜脂的过氧化, 并且发现膜脂的过氧化和早期根伸长抑制存在紧密的关系, 至于两者如何联系起来尚有待进一步研究(Matsumoto, 2000)。Yamamoto 等(2001)调查了铝胁迫条件下豌豆根细胞中铝的积累、膜脂过氧化、胼胝质形成以及根伸长抑制等 4 个事件, 认为膜脂过氧化是铝胁迫诱导的相对早期的症状, 并且部分地促使胼胝质的形成, 而不是根伸长抑制的主要原因。而膜完整性破坏是一个相对迟的症状, 是由于根延伸抑制而起的破裂。Kochian 等 (1991)表明

虽然铝胁迫诱导根伸长和根形态发生巨大改变,但相对来说根细胞质膜变化较少。

2.3.5 铝毒害对钙的影响

早期的研究显示,土壤植物严重的铝毒害症状和 Ca^{2+} 缺乏症状相似,并且加入 CaSO_4 或 CaCO_3 可以减轻铝毒害症状。 Ca^{2+} 可能通过跨膜通道被转运至细胞中,该过程是被动、需能的,许多多价金属离子(如: La^{3+} 、 Ga^{3+} 、 Gd^{3+}),都能抑制 Ca^{2+} 的转运,而铝抑制植物对 Ca^{2+} 吸收和转运的报道也较多(Huang 等, 1992; Rengel, 1992)。尤其是 Huang 等(1992)的实验,证实了铝对铝敏感小麦品种 Ca^{2+} 吸收的抑制远大于抗铝小麦品种,似乎更说明了铝对 Ca^{2+} 吸收的抑制是铝毒害的一个重要方面。

但是,最近的实验又得出了不同的结果。Ryan 等(1997)证实,一定低浓度的铝溶液能抑制小麦根生长,但并不影响根对 Ca^{2+} 的吸收;而加入其它离子(如: Na^+ 、 Mg^{2+})可改善铝处理的根生长,但同时也抑制了根对 Ca^{2+} 的吸收。由此可见,铝毒害似乎并非由铝对 Ca^{2+} 吸收的抑制造成,至少可以说低浓度铝对植物根生长的抑制不是由此造成。

此外,尽管有人提出铝生理毒害的一个重要靶位点可能是 Ca^{2+} 结合蛋白—CaM。但目前还没有一致的证据证明该假设是正确的(Kochian, 1995; Matsumoto, 2000)。

2.3.6 铝毒害对细胞骨架的影响

在铝胁迫中,根伸长受到抑制,根尖膨胀,极有可能是 Al^{3+} 改变了细胞骨架,并最终影响了根的形态。

在人类和动物中, Al^{3+} 诱导的神经系统的紊乱经常和细胞骨架的缺陷有关。 Al^{3+} 强烈促进微管蛋白装配到微管上,并抑制了随后发生的 Ca^{2+} 诱导的微管蛋白的解聚作用(MacDonald 和 Martin, 1988)。微管的装配需要 Mg^{2+} , 一般认为,参与此过程的 Mg^{2+} 结合在 GTP 和 GDP 受体位置,而 Al^{3+} 对这一位置的结合常数是 Mg^{2+} 的 3×10^7 倍,也就是说, 4×10^{-10} mol 活性的 Al^{3+} 就可和 1×10^{-3} mol 活性的 Mg^{2+} 进行有效的竞争。微管装配过程中的 GTP 水解速度是调节体内微管动力学的关键,而这一速度会由于 Al^{3+} 的结合而降低。由于细胞中微管的形成和分解的动力学平衡很

敏感,因而,细胞内极低浓度的 Al^{3+} 可能就足以扰乱这一平衡状态,并导致细胞失去功能(Kochian, 1995)。在大豆根细胞中铝会诱导肌动蛋白网络的僵硬(Grabski 和 Schindler, 1995)。在玉米铝敏感品种根尖转换区远端(DTZ)的细胞中铝诱导的微管和微纤丝的变化是最明显的(Sivaguru 等, 1999)。转换区远端细胞的细胞骨架对铝特别敏感,这和这一区域的细胞对铝的特异敏感性相一致(Sivaguru 和 Horst, 1998)。最近对烟草的研究表明,微管细胞骨架的确是早期铝毒害的靶位点,铝诱导形成额外的皮层维管束,减少单个维管束的厚度,增加 α -维管蛋白和相应的维管蛋白折叠伴侣(Schwarzerova 等, 2002)。

2.3.7 铝毒害对信号传导过程的影响

医学领域的研究显示,铝毒害的细胞学机制可能包括 Al^{3+} 和参与磷脂酰肌醇信号传导途径的各个组分之间的互作,该结论在动物细胞中已经得到证实(Berridge, 1987),植物细胞中铝毒害也抑制这一信号通路,可能通过影响磷脂酶 C 来影响这一途径(Jones 和 Kochian, 1995)。实验证实,铝处理干扰这一信号途径可能通过抑制信号诱导的胞质三磷酸肌醇(IP3)浓度的升高而实现的。在某些实验中,可通过抑制随后发生的胞质 Ca^{2+} 浓度的升高而干扰这一途径(Kochian, 1995)。进一步研究表明铝确实会抑制磷脂酶 C 的活性(Pina-Chable 和 Hernandez-Sotomayor, 2001)。

阐明铝影响的信号途径对理解早期的铝毒害机制将是很重要的。铝也可能在蛋白磷酸化和去磷酸化中起作用(Matsumoto, 2000)。这需要进一步的研究来证明。

3 植物对铝毒害的抗性机理

已经知道不同的植物种间以及同一种内不同品种间对铝的抗性存在较大的变异。到底是什么机制促成这些植物抗铝呢?根据已有的知识植物铝抗性机制可分为促进铝从根尖排放的铝排斥机制和共质体耐铝的铝耐受机制。不同的细胞机制可促成植物抗铝性。但不可能所有植物都使用单一的抗性机制。

3.1 植物对铝的外部排斥机制

研究表明,根尖对铝的排斥作用是许多植物抗铝毒的机制之一,如小麦、玉米、大豆、黑麦等(Ma 等, 2001)。相对于小麦抗铝品种及其近等基因系来说,铝敏

感品种在根尖积累的铝是它们的 3-8 倍(Tice 等, 1992), 而根尖正是铝毒害的主要位点(Ryan 等, 1993): 两个品种在成熟根组织的铝含量并无差别。此机理可能包括整个根尖(质外体和共质体)的铝排斥作用。因而, 最可能的机制要么释放螯合铝的配体, 要么诱导增加根际 pH 值(Kochian, 1995)。

3.1.1 根际 pH 梯度障碍

铝胁迫时, 某些植物种类或品种能在根系质外体或根际维持较高的 pH 值, 在根-土壤界面形成一个 pH 屏障, 从而降低铝的溶解度, 限制铝进入共质体。Blamey 等(1983)证明, 当溶液 pH 从 4.5 上升到 4.6 时, 溶液中铝的浓度下降 26%。拟南芥突变体研究表明, 抗铝突变体 *alr-104* 是通过铝诱导提高根际 pH 值来排斥铝的(Degenhardt 等, 1998)。但这一机制是否在野生型的植物种中存在并行使抗铝作用尚缺乏足够的实验证据支持。

3.1.2 细胞壁的铝排斥作用

曾经有人提出根细胞壁可能是铝结合和固定的位点, 细胞壁会阻止铝和质膜结合, 或者进入共质体(Kochian, 1995)。已有研究表明铝会诱导细胞壁加厚及细胞壁组分的改变, 铝诱导多糖(Eleftheriou 等, 1993; Van 等, 1994)、木质素(Sasaki 等, 1996)、果胶(Van 等, 1994)、半纤维素(Tabuchi 和 Matsumoto, 2001)等细胞壁成分及胼胝质(Horst, 1995)的积累, 这些成分的改变可能会影响细胞壁透性, 另外, 这些物质积累在细胞壁上也可能会形成一种屏障阻止 Al 进入共质体中。

另一方面, 有人认为这主要是抗铝植物根系的阳离子交换力(Cation exchange capability, CEC)低, 因而抗性品种细胞壁上结合了更少的铝。低 CEC 作物品种积累单价阳离子优于多价阳离子, 对阳离子的吸收低于对阴离子的吸收, 因而降低了生长介质的酸化程度, 从而能减少铝进入共质体的数量(Taylor, 1988)。但 Kennedy 等(1986)认为, 植物根系 CEC 在植物抗铝中的作用微不足道。对于根系 CEC 在铝排斥机制中作用目前尚无定论。

3.1.3 铝诱导的根尖有机酸的排放

目前大量的研究集中于研究植物通过排放有机酸螯合 Al^{3+} 来缓解铝毒害的机

制。并且已经有足够的证据表明铝诱导有机酸分泌螯合根际 Al^{3+} 是植物抗铝毒害的机制之一。

该结论最早是在食荚菜豆中报导的(Miyasaka 等, 1991): 食荚菜豆植株在无菌铝溶液中生长 8 天, 抗铝植株根系分泌的柠檬酸是自身对照的 70 倍, 是铝敏感植株(铝处理、对照)的 10 倍。到目前为止, 已知有 10 多种抗铝植物通过根尖排放有机酸来减缓铝毒害(Ma, 2000; Ma 等, 2001)。柠檬酸、草酸、和苹果酸是不同植物根排放的能够有效的和 Al^{3+} 形成复合物的共同的有机酸。在小麦中根排放苹果酸; 在菜豆、玉米、大豆中排放柠檬酸; 在荞麦和芋头中分泌草酸; 一些其它植物如小黑麦、油菜、燕麦、黑麦和胡萝卜则同时分泌柠檬酸和苹果酸(Ma 等, 2001)。对于有机酸分泌, 存在着两种不同模式: 模式 1 在加铝和有机酸分泌开始之间没有明显的延迟。如小麦在铝处理开始 15 min 内即可检测到苹果酸(Delhaize 等, 1993)。模式 2 有机酸分泌相对于铝胁迫开始要延迟几个小时。如黑麦中柠檬酸、苹果酸分泌在胁迫后 6-10 h 期间逐渐增加(Li 等, 2000)。模式 1 暗示着铝可能激活一个已经存在的机制而不需要诱导新的蛋白(Ma, 2000)。在这种情况下铝可能仅简单的激活一个膜转运体而起始有机酸的分泌(Ma 等, 2001)。相比之下模式 2 可能需要诱导一些蛋白。这些蛋白可能参与有机酸的代谢或转运(Ma 等, 2001)。水稻是小粒禾本科作物中最抗铝的作物, 有机酸分泌机制是否在水稻中也存在呢? 至今仍很少看到水稻中有机酸分泌的报导, Ma 等(2002)研究表明除分泌少量的柠檬酸外水稻根并不分泌任何其它有机酸, 并且在抗性品种和敏感品种中柠檬酸的分泌量并无差异(Ma 等, 2002)。说明水稻中可能存在有机酸排放之外的其它抗铝机制。

3.2 植物对铝的内部耐受机理

相对来说, 对铝排放机制的研究大大多于对铝耐受机制的研究, 因而对铝耐受机制目前所知甚少。已经知道一些高等植物能积累高浓度的铝而不显示铝毒症状。荞麦在短期的铝暴露(5 d)就可以在每公斤重的干物中积累大于 400 mg 的铝(Ma 等, 1997), 而当生长在酸性土壤中时每公斤干物重可积累高达 15000 mg 的铝(Ma 等, 2001)。八仙花属植物也可以在几个月的生长期间积累高浓度的铝(>3000 mg kg⁻¹) (Hornung 等, 1999)。说明共质体铝耐受机制也是植物抗铝毒害的主要机制之一。

3.2.1 细胞溶质中的螯合作用

研究表明, 铝胁迫时, 植物抗铝品种根系相对于铝敏感品种含有更多的有机酸。Foy 等(1990)研究了 5 个不同抗铝性小麦品种根系有机酸浓度和其抗铝性的关系, 结果发现, 铝处理后小麦根系的延胡索酸、苹果酸、琥珀酸和总有机酸的浓度提高, 各品种两个铝处理水平的延胡索酸、苹果酸和总有机酸的浓度有显著性差异。由于有机酸能螯合 Al^{3+} , 且其和 Al^{3+} 的亲合度大于 ATP 等细胞内化学组分, 因而能阻止 Al^{3+} 和它们的结合, 有效地降低植物内部的 Al^{3+} 的毒害作用(Ma 等, 2001)。

最近的研究表明上面提到的两个铝积累物种是通过形成铝-有机酸复合物来解除细胞内铝的毒害(Ma 等, 2001)。在八仙花属植物中铝和柠檬酸以 1:1 形成复合物(Hornung 等, 1999), 而在荞麦中铝和草酸以 1:3 形成复合物(Ma 等, 1997), 并且已经通过核磁共振验证(Ma 等, 2001)。当前一个有效的假说是这些螯合物有效的减少了细胞质中 Al^{3+} 的活性, 阻止了铝和其它铝敏感的细胞组分形成复合物(Ma 等, 2001)。

3.2.2 铝诱导蛋白质的形成

铝可诱导植物产生一系列蛋白质。Cruz-Ortega 和 Ownby(1993)证实小麦根受铝诱导产生一种 18KD 的蛋白质, 与病原发生相关蛋白相似, 该蛋白在其它胁迫中也被诱导表达, 且抗铝和铝敏感基因型都表达。Basu 等(1994)鉴别了两种铝诱导的 51KD 的微粒体蛋白, 在 Cd 和 Ni 胁迫时也能少量产生, 而在其它胁迫中不产生, 并且该蛋白只在抗铝品种中产生, 认为它们可能与抗铝过程有关。朱睦元等(1990)对大麦耐酸铝变异体和野生型的过氧化物同工酶的电泳分析表明二者有明显的差异。某些特异性酶带与抗铝性有一定的关系。酸铝条件抑制了野生型细胞中这两条酶带多肽的产生, 而变异体细胞中仍能正常表达。

尽管已经发现一些铝诱导蛋白, 但至今没有明显的证据显示这些铝诱导的蛋白质与抗铝机理有关, 具体的机制需要从分子生物学的角度去进一步阐明。

3.3 植物抗铝毒害的分子机制

3.3.1 植物抗铝基因定位

随着遗传学的发展以及植物抗铝的遗传机制研究的开展。对植物抗铝毒害的基因定位研究也逐渐展开,目前已对多种植物进行了抗铝基因定位研究。

在双子叶植物拟南芥中运用重组自交系定位了 2 个铝抗性 QTL,分别位于第 1 和 4 染色体,总共解释了表型变异的 43%(Kobayashi 和 Koyama, 2002)。

单子叶禾本科作物抗铝性研究中,研究较多的是小麦、大麦和黑麦。已有研究表明在大麦中抗铝性是由单基因控制的(Minella 和 Sorrells, 1992)。不同品种的抗性差异主要是由于该基因不同等位基因决定的。Tang 等(2000)将其定位于染色体 4H 的长臂上。小麦中铝抗性是由主基因和一些微效基因共同控制的,在染色体 2D、4D 和 5D 上都存在铝抗性基因。Riede 和 Anderson (1996) 将一个主效基因定位于染色 4DL,这个基因解释了 85%的表型变异。在黑麦中运用染色体附加系和替换系发现铝抗性主基因位于染色 3R 和 4R 和 6R 上(Aniol 和 Gustafson, 1984; Gallego 等, 1998; Miftahudin 等, 2002)。

水稻铝抗性是由多基因控制的,目前已有 5 篇文章报导水稻抗铝基因的定位工作,结果表明水稻中抗铝 QTL 在不同的遗传背景中分别位于第 1、2、3、4、6、7、8、9、10、12 等染色体上(Ma 等, 2002; Nguyen 等, 2001; Nguyen 等, 2002; Nguyen 等, 2003; Wu 等, 2000)。为便于进一步分析和克隆铝抗性基因,本文将不同研究定位的水稻铝抗性 QTL 进行了整理(表 1.1),以便于不同遗传背景进行比较。除第 1 染色体上的 QTL 在不同群体中存在共性之外,其它染色体上的 QTL 都未能在 3 个以上的群体中检测到位于相近位置的 QTL。从表 1.1 可知,在不同的遗传背景中抗铝 QTL 存在较大变异。单个 QTL 效应及 QTL 的总效应也存在较大变异。另外从表 1.1 可看出不同群体中定位的单个铝抗性 QTL 的效应都较小(差不多都在 25%以下),上位分析表明水稻铝抗性遗传效应中上位性效应也占了较大的比例(Wu 等, 2000)。这反应了水稻铝抗性遗传机制的复杂性,也暗示着水稻的抗铝性不可能仅由单一机制来解释,可能是多种机制联合作用的结果。从以前的分析可知对于效应较小的 QTL,由于所用遗传群体、环境条件、统计方法及所用 QTL 分析软件的不

同会影响其定位准确性及对其效应的估计（毛等，1999）。因此综合不同材料和培养条件的定位结果，确定不同条件下都能起作用的 QTL 是进一步利用铝抗性 QTL 所必需考虑的问题。

表 1.1 不同水稻群体中定位的铝抗性 QTLs

群体	处理时间 (d)	染色体	QTL 区间	贡献率 (%)	文献
Azucena/IR1552	14	1	RZ801-RG323	19	Wu 等(2000)
RIL ₉		3	CDO1395-AGC-CAC4	9	
		12	RG9-RG457	10	
				Total 38	
Chicmbau/Omon269-95	10	1	WG110-RG109	25	Nguyen 等(2001)
F _{2,3}		2	RG139-CDO395	7.9	
		3	RG996-RZ142	10	
		5	BCD454-RG470	6.1	
		11	RG2-RZ53	6.2	
				Total 55.2	
Koshihikari/Kasalath// Koshihikari	4	1	C86-R2625	11.1	Ma 等(2002)
BC ₁ F ₇		2	R2510-R2460	7.3	
		6	S1520-G200	8.7	
				Total 27.1	
CT9993/IR62266	10	1	CDO345-ME1014	24.1	Nguyen 等(2002)
RIL ₆		1	RG1028-RZ543	18.5	
		2	C1408-C1419	13.4	
		3	ME82-CDO122	12.8	
		4	RG190-EM153	20.1	
		7	ME43-EM1511	10.3	
		8	ME53-C1121	28.7	
		9	RG667-RM215	19.3	
		10	EM169-G333	17.7	
		12	RG323-ME29	19.7	
				Total 60.5*	
O.rufipogon/IR64	14	1	RG406-RZ252	9	Nguyen 等(2003)
RIL ₆		3	CDO1395-RG391	24.9	
		7	RZ629-RG650	22.5	
		8	RG28-RM223	20.8	
		9	RM201-WAL17	9.9	
				Total 70.8*	

*: 此总贡献率通过多 QTL 模型计算。

3.3.3 植物铝诱导基因的克隆

通过不同的方法试图克隆抗铝基因的工作已在不同的作物中展开。至今已从植物克隆了 20 多个铝调节基因,其中在不同的小麦品种中已经克隆了 10 多个铝调节基因 (Hamel 等, 1998; Richards 等, 1994; Snowden 和 Gardner, 1993)。在拟南芥中也已经克隆了 10 多个基因(Richards 等, 1998)。克隆铝调节基因的工作在烟草中也已经展开(Ezaki 等, 2000; 2001)。从这些铝诱导基因的功能分析可知铝毒害会影响不同的生理、生化途径(表 1.2)。

Snowden 等 (1995) 从小麦中分离了 7 个铝诱导基因 (wali 1~7), 包括金属硫蛋白样蛋白, 苯丙氨酸氨裂解酶, 蛋白酶抑制剂以及伤害诱导基因等。Hamel 等 (1998) 从小麦中克隆了几个铝诱导基因, 包括过氧化物酶、半胱氨酸蛋白酶、苯丙氨酸氨裂解酶、草酸氧化酶。然而这些基因在抗性品种和敏感品种中都受铝诱导增强表达, 而且受金属毒害、低钙、生理伤害诱导 (Snowden 等, 1995)。表明这些基因可能和抗性品种的抗铝性没有关系而是铝毒害的一种防御反应。大部分这些基因和病原发生相关的传导途径相关(Hamel 等, 1998)。Cruz-Ortega 等 (1997) 的研究发现 1,3- β -葡聚糖酶和细胞骨架肌动蛋白 (fimbrin-like) 样蛋白也受铝诱导表达。这也表明铝毒害诱导植物防御相关基因和保持细胞骨架相关基因增强表达。Delhaize 等 (1999) 从小麦中克隆了一个编码磷脂酰丝氨酸合成酶 (PSS) 的基因, 酵母中表达表明它能增强抗铝性。铝离子易和磷脂结合, 因而质膜是铝进入细胞的主要障碍, 可想而知, 改变质膜的磷脂组成可以通过排斥铝而提高铝抗性。但是在拟南芥和烟草中高水平表达却导致叶片的坏死, 可能是过量积累磷脂酰丝氨酸的缘故。研究表明一个编码多药抗性 (MDR) 类似蛋白的基因也受铝诱导表达, 它是一个钙离子通道抑制剂, 可能是铝毒害的早期破坏了钙离子平衡的缘故(Sasaki 等, 2002)。

Ezaki 等(1995; 1996) 从烟草中分离到 3 个铝诱导基因, 包括生长素调节基因 (pAL111)、谷胱苷肽-S-转移酶 (GST, pAL142)、过氧化物酶 (pAL201)。其中前两个基因也受磷饥饿诱导增强表达。Richards 等 (1998) 也从铝处理 2 h 的拟南芥中克隆了过氧化物酶、GST 和一个蓝色铜结合蛋白基因。酵母研究表明热击蛋白 HSP150 也受铝诱导, 基因敲除突变结果表明 HSP150 在铝胁迫中起基本的保护作用

用(Ezaki 等, 1998)。这些氧胁迫相关基因的诱导表明铝胁迫和氧胁迫可能存在共同的反应途径, 亦或是铝胁迫结果会导致氧胁迫。

明凤等(2002)发现 RuBP 羧化酶与光合系统 I P700 编码基因也受铝诱导增强表达, 表明铝也可能影响光合作用系统。

表 1.2 目前为止报道的已知功能的铝诱导基因。

编号	基因	米白物种	参考文献
1	Blue copper binding protein (BCB)	Arabidopsis	Richards 等, 1998
2	Bowman-Birk protease inhibitor		
3	Glutathione-S-transferase(GST)		
4	Peroxidase		
5	Reticuline:oxygen oxidoreductase		
6	Superoxide dismutase,		
7	Anionic peroxidase	N. tabacum	Ezaki 等, 1996
8	GDP-dissociation inhibitor		Ezaki 等, 1999
9	Glutathione-S-transferase(GST)		Ezaki 等, 1995
10	Heat shock protein	S. cerevisiae	Ezaki 等, 1998
11	SED1 (putative membrane protein)		
12	1,3-beta-glucanase	T. aestivum	Cruz-Ortega 等, 1997
13	Fimbrin-like cytoskeletal protein		
14	Phosphatidylserine synthase (PSS)		Delhaize 等, 1999
15	Cysteine proteinase		Hamel 等, 1998
16	Oxalate oxidase		
17	ATP synthase		Hamilton 等, 2001
18	Vacuolar ATPase		
19	Multidrug Resistance (MDR)-Like protein		Sasaki 等, 2002
20	Bowman-Birk protease inhibitor		Snowden和Gardner, 1993
21	Metallothionein-like protein		
22	Phenylalanine ammonialyase		Snowden和Gardner, 1993; Hamel 等, 1998
23	RuBP羧化酶	O. Rufipogon	明凤等, 2002
24	光合系统I P700		

随着研究的进展, 铝诱导基因的发现正逐渐增多, 但目前还没有克隆抗铝基因的报道。进一步工作需要阐明这些基因到底和铝抗性有没有什么关系。运用基因

获得突变体（遗传转化）和基因缺失突变体（敲除或自然和人工诱发突变形成）是研究这些基因功能的有效途径。Ezaki 等 (1999) 将 11 个铝诱导基因转入酵母中进行铝胁迫筛选，结果表明蓝色铜结合蛋白（BCB）基因和烟草的 GDP 分裂抑制子 1（GDI 1）能提高铝抗性，其中 BCB 起着限制铝吸收的功能而 GDI 促进已吸收的铝的排出。拟南芥转基因结果表明 BCB、GDI、GST、过氧化物酶能减轻铝毒害和氧胁迫(Ezaki 等, 2000; Ezaki 等, 2001)，说明这些铝诱导基因参与对铝毒害的防御作用。

研究表明，通过生物技术途径获得抗铝植物是可行的。将假单胞菌柠檬酸合成酶基因转入烟草和番木瓜中可得到抗铝植株(de la Fuente 等, 1997)。这为将来通过基因工程改良作物抗铝性指明了方向。

第二部分 cDNA-AFLP 技术的原理及其应用

cDNA-AFLP 是一种新的显示差异表达基因的 RNA 指纹技术(Bachem 等, 1996), cDNA-AFLP 分析优于其它的 RNA 指纹技术和以 DNA 芯片为基础的方法(Baldwin 等, 1999; McClelland 等, 1995)。与差异显示方法相比, cDNA-AFLP 的退火温度相对较高, 使其严谨度更高并使其结果可以重演, 这已被 RNA 凝胶分析证实(Bachem 等, 1996; Bachem 等, 1998)。与以杂交为基础的技术(如 DNA 芯片)相比, cDNA-AFLP 能揭示含有合适限制性酶切位点的任何基因时空表达的改变, 且能区别同一个基因家族中高度同源的基因; 此外, cDNA-AFLP 不需要任何事先已知的序列信息; 这些优点使 cDNA-AFLP 成为一种克隆新基因的良好工具。

1 cDNA-AFLP 技术的原理与方法

cDNA-AFLP 技术是将 AFLP 技术应用于 mRNA 的差异表达的一种 RNA 指纹技术。它通过选择性引物的选择性扩增产物来显示不同物种、不同时间、不同处理条件下 cDNA 即 mRNA 之间的表达差异。它以 mRNA 为材料, 结合了 RT-PCR 和人工接头技术, 先将样本 mRNA 逆转录成 cDNA, 两边同时用 2 个分别识别 6bp 和 4bp 序列的限制性内切酶进行酶切。酶切片段和适宜的接头连接, 然后利用与接头互补的引物预扩增。再在引物 3' 末端加 2~3 个选择性碱基进行选择扩增, 最后在测序胶上展示可获得大小在 100~1000bp 之间的重复性好、清晰的条带(Bachem 等, 1996; Bachem 等, 1998)。

在基因组 AFLP 分析中, 需要有 3 个选择性碱基, 而 cDNA-AFLP 中, 利用 2 个选择性碱基即可, 因为 cDNA 的复杂性远较基因组 DNA 低。PCR 循环次数和模板稀释倍数对扩增条带影响较大。但每对引物组合一般可得到约 50 条左右的可识别条带。共有 256 对引物组合可供筛选, 总共可出现约 13000 条条带。由于扩增显示的模板条带数大约为模板的 2 倍, 所以共约有 6500 条条带被显示。假如植物 mRNA 样本总数有 15000~30000 之间, 利用一个酶切组合即有约半数的 mRNA 样本被检测。由于 AFLP 分析可以利用许多限制性内切酶, 如 EcoR I、HindIII、Pst I、Xba I、Taq I、Mse I 等, 再加上选择性碱基种类、数目很多, 所以理论上

cDNA-AFLP 可产生的标记数目是无限的,可以对生物体全部的 mRNA 样品进行筛选。

2 cDNA-AFLP 技术的特点

重复性好。cDNA-AFLP 在 cDNA 酶切片段两端加上统一的引物作为 PCR 扩增模板,并且退火温度较高,因而可靠性较高,其重复性可达 95%以上。Fukada 等(1999)也证实 cDNA-AFLP 分析重复性达 95%以上。Money 等(1996)为证实该技术的重复性,重复合成新的 cDNA 并按程序进行选择性的扩增,在进行的 10 个不同引物产生的条带中不同批次合成的 cDNA 表现结果完全一致。Habu 等(1997)比较了 cDNA-AFLP 技术和 DD-PCR 扩增的结果,结果发现其重复性大大高于 DD-PCR。Baldwin 等(1999)进一步证实了 RAP-PCR、DD-PCR 等技术对反应条件以及模板质量非常敏感。而 cDNA-AFLP 对反应模板与反应条件的要求就没有那么苛刻。

可准确地反映表达量的差异。DD-PCR 与 RAP-PCR 等 mRNA 指纹技术为了获得可见产物,都有要求一个较低的退火温度。特异扩增产物条带的强弱不仅同 cDNA 样本最初浓度有关,也依赖于引物模板间的特异配对的程度。而 cDNA-AFLP 技术由于其反应条件的严谨性,扩增产物水平完全依赖于单个模板的浓度,这样可对基因的表达量差异提供一个可靠的结果。与差异显示方法相比,cDNA-AFLP 的退火温度相对较高,使其严谨度更高并使其结果可以重复,这已被 Northern 杂交分析证实(Bachem 等,1996; Bachem 等,1998)。

3 cDNA-AFLP 技术的应用

3.1 研究基因的表达特性

cDNA-AFLP 分析同其它 RNA 指纹技术和基于 DNA 芯片技术比较,可直接地研究基因表达特性(Baldwin 等,1999)。Bachem 等(1996)利用已知表达模式的土豆贮藏蛋白 STATB2 基因验证 cDNA-AFLP 技术研究基因表达的可行性,证实它可用于研究基因的时空表达模式。Dellagi 等(2000)将 cDNA-AFLP 用于研究植物与病原相互作用过程中基因表达的变化。该技术还用于研究植物受农杆菌感染过程中的基因表达变化(Ditt 等,2001)。以及根瘤形成过程中的基因表达变化(Simoës-Araujo

等, 2002), 等等。另外, 该技术也应用于基因组范围的细胞周期差异表达基因的研究 (Breync 和 Zabeau, 2001)。

3.2 发展遗传标记

Suarez 等(2000)利用 cDNA-AFLP 分析木薯作图群体的一对亲本, 获得 500 多个 TDFs, 它们分别在各自的亲本中表达, 对其中 50 个 TDFs 进行克隆、分析, 并将部分标记定位于遗传图谱上。对 TDFs 遗传作图表明 TDFs 比随机 cDNA 有更多的多态性。

另外, cDNA-AFLP 还可以用于遗传群体分析, 直接构建基因组范围的转录图谱, cDNA-AFLP 得到的差异克隆可直接作为一个遗传标记用于遗传分析 (Brugmans 等, 2002)。

3.3 分离特异表达的基因

Habu 等(1997)利用 cDNA-AFLP 比较了普通牵牛白花、红花两个品系的花芽 mRNA。获得 2 个在红花花芽中高度表达而在白花中不表达的 cDNA 片段, 并通过筛选全长 cDNA 文库将其克隆。Dellegi 等(2000)利用 cDNA-AFLP 方法分离了不同条件下植物病原差异表达的基因, 并通过 Northern 验证。Bachem et al (2001)用该方法从马铃薯中克隆了一个类固醇脱氢酶基因。Johnes 和 Rower(1998)进一步指出 cDNA-AFLP 与 DD-PCR 相比较在分离差异表达基因方面具有更高的可行性。

Kojima 等(2000)利用了 cDNA-AFLP 技术结合基因定位结果克隆了小麦 Q 基因, 该基因位于染色体 5A 的长臂上, 控制麦穗形态和落粒性等农艺性状。他们比较了中国春和它的一个染色体缺失品系的 cDNA-AFLP 图谱(该品系缺失一段包括 Q 基因的 15%的 5A 染色体), 发现有 92 个片段在两个品系中有不同的表达。Northern 和 Southern 杂交表明其中 16 个片段在中国春中有特异或较强的转录信号。序列分析知 9 个克隆同已知基因无明显的同源序列。其中 6 个克隆定位于第 5 染色体上, 克隆 pTaQ22 恰被定位于 Q 基因位置。因此, 他们认为 cDNA-AFLP 可以方便地、系统地用于遗传背景比较复杂的多倍体作物基因的筛选和分离。

4 cDNA-AFLP 技术的发展

作为一种研究基因组范围的差异表达变化的方法, cDNA-AFLP 技术也在不断发展, 限制性内切酶的选择(Habu 等, 1997), 以及抑制性 PCR 技术应用于选择性扩增步骤, 使得这一技术的针对性和可靠性进一步得到提高(Fukuda 等, 1999)。另外荧光显色技术及自动化分析软件的应用使得这一技术更直观, 操作更简便、自动化程度更高(Breyne 等, 2002)。随着分子生物学的发展, cDNA-AFLP 技术将会更加完善, 应用范围会更加广泛。

第二章 比较基因定位分析

在酸性土壤中,铝毒害是限制作物产量的主要因素。全世界酸性土壤的比例高达40%,主要分布在热带和亚热带地区(Kochian, 1995),我国酸性土壤约占全国耕地面积的21%(熊毅, 1990)。主要分布在我国南方的广大红壤区域。铝毒害也是我国农业生产的重大限制因子。大多数旱作对铝敏感,如大、小麦在几个毫克铝/公斤土水平,即可发生铝害,而大多数酸性土壤中活性铝都超过这个水平。水稻相对于旱作物来说是一种较抗铝的作物,但品种间差异也很大,某些热带旱稻表现为高抗铝性。研究表明热带旱稻,如Palawan, Azucena等在30 mg Al/L水平下,根系生长仍然表现正常,而铝敏感水稻品种,如IR1552,在10 mg Al/L胁迫水平下根系生长即明显受阻(Khatiwards 等, 1996; Wu 等, 1997)。

施石灰是减轻酸性土壤中铝毒害的有效措施,可是费钱费力,对深层土壤没什么效果,而且大量施用石灰会破坏土壤结构。选用抗铝品种是解决酸性土壤铝毒害的经济有效的措施。铝毒的遗传学机制已经在几种重要植物中展开研究。已有研究表明大麦的抗铝性是由单基因控制的。小麦中抗铝性是由主基因和一些微效基因控制的,但不同遗传背景和铝胁迫浓度显著地影响抗铝基因的表达。Tang等用RFLP标记将大麦品种Dayton的抗铝基因定位于染色体4H的长臂上,并发现它和定位于染色体4D上的小麦抗铝基因都和同一个标记Xcdo1395紧密连锁,说明了两者抗铝基因位点是直向同源进化的。Lima等(1995)研究表明玉米中抗铝基因是由多基因控制的,抗铝基因表现为加性效应。

水稻是我国最重要的粮食作物之一,其种植面积约占粮食作物总面积的40%,总产量约占粮食总产量的一半。水稻也是当前分子生物学研究的模式植物,旱种水稻也是当前遗传育种的一个重要研究方向。因此,探明热带旱稻中抗铝基因背景,克隆抗铝基因对今后选育抗铝优良水稻品种或将抗铝基因运用于其他旱作中,以解决酸性土壤铝毒害问题具有重要的理论和实践意义。研究表明栽培稻不同基因型品种间对铝毒抗性存在较大差异。水稻抗铝性是由多基因决定的数量性状这已经在不同的研究中反映出来。尽管已经有多篇文章报道,但目前尚没有明确是否在不同的

研究材料中存在共同的 QTL。本章将对抗铝基因进行定位，并对当前不同研究报道的结果进行整合以便进一步研究参考。

1 材料

亲本材料：IR1552 和 Azucena。IR1552 是来自 IRRI 的籼型铝敏感水稻品种，Azucena 为热带粳型抗铝旱稻品种。

群体材料：本研究所用的重组自交群体为 IR1552×Azucena 杂交发展而来的重组自交系 F₁₀ 代的 96 个株系。

2 方法

2.1 水稻材料准备

2.1.1 种子处理

Azucena、IR1552 种子用蒸馏水洗净，3%次氯酸钠浸 20min。再用蒸馏水洗净，放于培养皿中，30℃黑暗浸种至露白（2 d），再在 27℃培养 2 d；将发芽的种子移至尼龙纱网上，进行 Al 胁迫处理。

2.1.2 胁迫处理

设 3 个重复，每个重复各 4 株苗按随机排列种植。发芽种子播于在底部有纱网的 PVC 板上，采用 1/2 营养液（对照：不含铝；处理：含铝 0.556 mmol/L 即 100 μmol/L 活性 Al³⁺，活性 Al³⁺采用 Geochem-PC 计算（Parker, 1995））进行溶液培养和胁迫处理，一周后将苗移入没有纱网的 PVC 板上培养。培养液母液配方如下（Yoshida 等, 1976），终浓度为母液稀释 1600 倍（1/2 营养液）。

培养液母液(各 500ml)：

solution I: NH₄NO₃ 45.7g; CaCl₂ 44.3g

solution II: NaH₂PO₄·2H₂O 20.15g; K₂SO₄ 35.7g

solution III: MgSO₄·7H₂O 162g

solution IV: MnCl₂·4H₂O 0.75g; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.037g; H₃BO₃ 0.467g;
ZnSO₄·7H₂O 0.0175g; CuSO₄·5H₂O 0.0155g; FeCl₃·6H₂O 3.85g; 柠檬酸一水合物 5.95g

培养液 pH=4.0, 每天调一次 pH, 每 5 天换一次培养液。

温度控制: 白天 28-30℃, 12 h; 夜晚 20-22℃。

光照强度: 250~300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

2.1.3 根长的测量

将在对照和处理溶液中生长 1 星期和 2 星期的苗取出, 分别用直尺测量 3 根最长根的长度。基本统计数据和分析采用 Excel 2000 进行。

2.2 遗传连锁图构建

本试验根据 RIL 群体以前发表的数据 (Wu 等, 2000) 随机选了 96 个株系构成一个新的群体用于遗传分析, 从部分性状及分子标记的分布来看该群体呈正态分布。利用该群体构成一个新的遗传连锁图, 该图谱包括 104 个 AFLP 标记和 114 个 RFLP 标记, 41 个微卫星标记, 1 个 CAPS 标记, 覆盖了水稻的 12 条染色体。整个连锁图总长度 2860 cM, 平均标记区间长度 11 cM。图谱构建采用 Mapmaker 3.0 完成。

2.3 QTL 分析

采用 Qgene3.06 (Nelson, 1997) 进行单因子方差分析和区间作图分析。LOD 值 > 2.2 认为存在可能的 QTL。

3 结果

3.1 铝抗性基因定位

3.1.1 表型表现

根据前人的研究, 用相对根长 (RRL=铝处理条件下最大根长/对照条件下最大根长) 作为抗铝性的指标。亲本和群体的相对根长分布如图 2.1 所示。由图可知相对根长的分布基本呈正态分布。经过 1 星期的胁迫 Azucena 和 IR1552 的平均相对根长分别约为 0.2 和 0.9。胁迫 2 星期的苗 Azucena 和 IR1552 的平均相对根长分别约为 0.3 和 1.0。这也说明 Azucena 是一个较抗铝的品种, 而 IR1552 则是铝较敏感的品种。

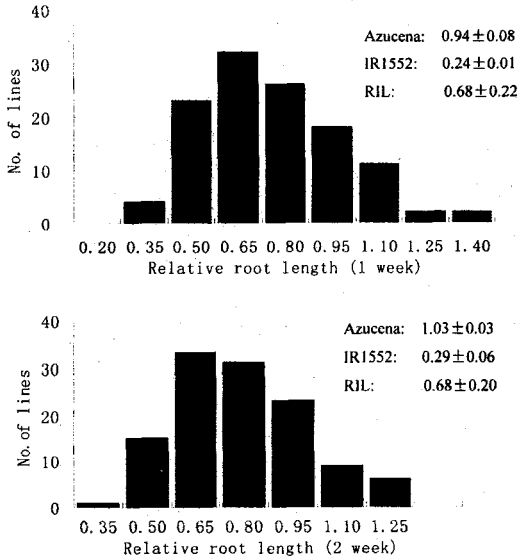


图 2.1. 相对根长在 RIL 群体中的分布图, 上图为胁迫 1 周苗, 下图为 2 周苗。各图右上角为亲本和群体的平均值及标准差。

3.1.2 铝抗性 QTL

单因子分析 (Single marker analysis) 和区间作图分析 (interval mapping) 用来检测铝抗性 QTL。LOD>2.2 则认为存在可能的 QTL。

处理条件下最大根长 (MRT_r)、对照条件下的最大根长 (MRCK) 及相对根长 (RRL=MRT_r/MRCK) 等 3 个性状分别进行 QTL 分析, 结果见表 2.1, 在对照条件并没有检测到根长的 QTL。在胁迫 1 星期、2 星期情况下, 分别检测到 1 个决定胁迫根长的 QTL, 位于染色体 1 的 RZ801-RG323 区间, 贡献率分别为 15% 和 11%。而对抗铝参数相对根长的分析表明, 在 1 星期和 2 星期胁迫条件下检测到的 QTL 基本上是一致的, 都检测到 3 个 QTL, 分别位于第 1、9、12 染色体上 (表 2.1, 图 2.2), 总共分别解释了 39% 和 35% 的表型变异。第一染色体上 QTL 在第 1、2 两周的贡献率随着胁迫时间延长而减少, 分别为 16% 和 9%, 有利等位基因来自 Azucena。相反第 9、12 染色体上的 QTL 随着胁迫时间延长而效应增大, 两者在第

1、2 星期的贡献率分别为 13%、15%和 10%、11%。12 染色体上 QTL 的有利等位基因来自 Azucena, 而第 9 染色体上的 QTL 的有利等位基因却来自铝敏感品种 IR1552。

表 2.1. 铝胁迫 1 星期、2 星期检测到的 QTL

性状	染色体	LOD 值	QTL 区间	贡献率	加性效应
MRT _r 1	1	2.2	RZ801-RG323	15%	-0.70
RRL1	1	2.4	RZ801-RG381	16%	-0.08
	9	2.9	RZ698-ACA-CTA1	13%	0.08
	12	2.2	ACA-CTT1-RM117	10%	-0.08
MRT _r 2	1	2.6	RZ801-RG323	11%	-0.88
RRL2	1	2.3	RZ801-RG381	9%	-0.07
	9	3.1	RZ698-ACA-CTA1	15%	0.07
	12	2.5	ACA-CTT1-RM117	11%	-0.08

注: MRT_r1、MRT_r2 为处理条件下 1 星期和 2 星期的最大根长; RRL1、RRL2 为 1 星期和 2 星期的相对根长。

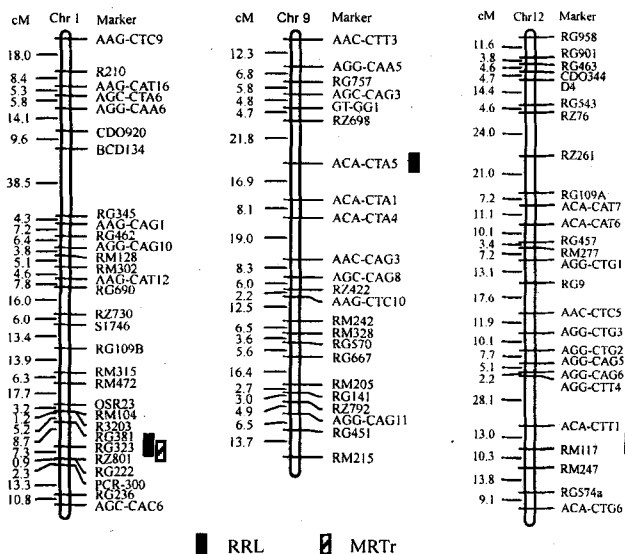


图 2.2. 已检测 QTL 的染色体位置。(因胁迫 1、2 星期的定位结果基本一致, 故没有分开表示。)

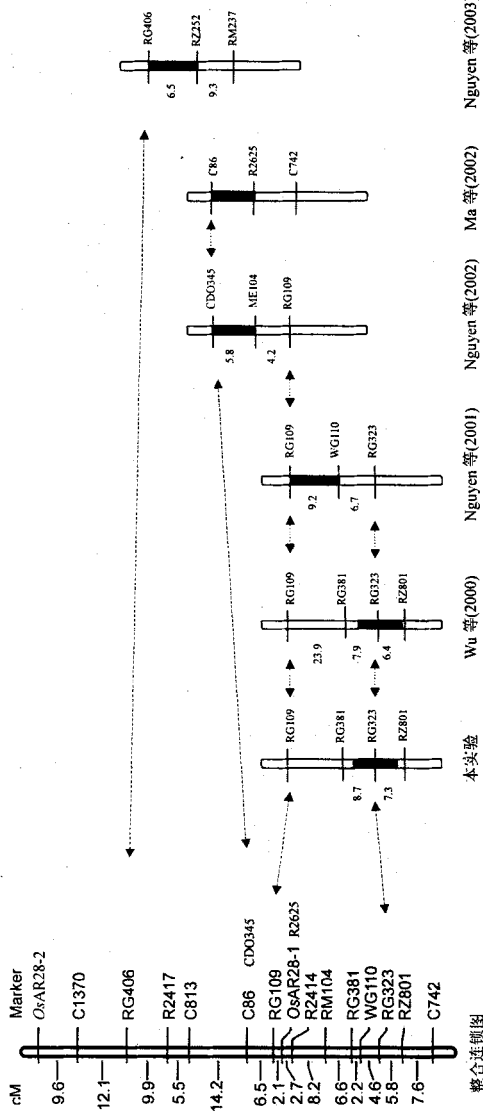


图 2.4 染色体 1 上定位的铝抗性 QTL 的比较定位结果。整合连锁图为通过 Nipponbare/Kasalath/Nipponbare 发展的 BC₁F₆ 群体用 mapmaker3.0 作的连锁图，带阴影的标记为通过序列定位的（和旁边的标记位于同一 BAC 上）。

4 讨论

以前的研究表明植物抗铝性同溶液浓度、pH 值、铝浓度、基因型及苗龄有关。本研究所定位的 QTL 和 Wu 等(2000)的定位结果并不一致也反映了这一问题。Wu 等(2000)用 Azucena 与 IR1552 发展而来的重组自交系进行铝抗性 QTL 的定位工作,在玻璃温室中采用全培养液培养,长到 7d 的幼苗统一将根剪掉,剩下 1cm 的根长用于铝胁迫处理,处理两周后测量根长,并进行定位。本研究在人工光照的培养室中采用半培养液直播培养的方式进行铝胁迫处理,在胁迫两周后测量根长,并进行定位。结果发现在胁迫两周时两种处理条件下都检测到 3 个 QTL,总贡献率分别为 38%和 35%,Wu 等在 1、3、12 染色体分别检测到一个 QTL,而本研究在 1、9、12 染色体上各检测到一个 QTL。染色体 1 上的 QTL 在两种处理中是一致的,而 12 染色体上的 QTL 并不在相同位置。这也说明不同的培养条件和处理方式对抗铝 QTL 的检测能力是有区别的,不同的苗龄、不同的处理方式可能会诱导不同的基因(QTL)起作用从而形成水稻的抗铝性。已有研究表明铝能诱导植物增强表达许多基因,本研究也发现了许多铝诱导基因,它们参与不同的生理、生化代谢途径(表 3.1)。这些铝诱导基因是否与水稻抗铝性有关将在下一章进行讨论。

本研究中第 9 染色体上 QTL 的有利等位基因来自敏感亲本 IR1552,说明在铝敏感品种中也存在铝抗性 QTL,只是由于敏感品种中积累的有利等位基因较少所以表现为敏感。而抗性品种中也存在不利的等位基因,但相对来说积累更多的有利等位基因,从而表现为抗性。另外,本实验的研究可知,铝抗性是由多个效应较小的 QTL 决定的。3 个 QTL 总共只解释了不到 40%的总变异。上位性分析表明(QTLMapper V 1.0)在第 1、2 星期胁迫下,上位性互作总效应分别为 39%和 47%(数据未列出)。Wu 等(2000)的研究也表明上位效应占了较大的比例(20%-32%)。从 QTL 的定位结果可知水稻抗铝性是由许多效应较小的基因决定的,加性效应和上位性效应都是抗铝性的重要遗传基础。根据这些结果可以推测水稻抗铝性是由许多基因或者甚至许多代谢途径共同作用的结果,单个基因或单个铝抗性机制可能不能很好的解释水稻的抗铝性。

群体中大量的超亲分离说明通过选择可得到更抗铝的株系。通过标记辅助选择选育积累较多有利 QTL 的品种是选育抗铝品种的有效手段。本研究所用铝抗性

品种是一个旱稻, 研究表明其抗旱 QTL (种子根长) 位于第 1 染色体的 S1746-RG109B 区域、第 2 染色体 AGC-CTA7-CDO718 区域、第 9 染色体的 RG570-RG667 区间(本实验室的研究结果)。并且第 1 染色体的抗旱 QTL 和铝抗性 QTL 靠近。通过标记辅助选择育种, 以 Azucena 为父本, 选优良水稻品种为母本杂交或回交, 再从后代分离群体中运用标记辅助选择选育含有抗铝和抗旱 QTL 的优良株系, 将是选育抗铝、抗旱水稻品种的一条有效途径。

克隆抗铝基因是研究抗铝机制, 并最终将其应用于改良水稻及其他旱作以提高其抗铝性的必经之路。本研究发现第 1 染色体的 QTL 是一个普遍存在的铝抗性 QTL, 尽管其效应不是很大, 但在不同的研究中差不多都能检测到。目前其精确的位置尚不明确, 这需要通过精细定位来确定。因为是一个效应较小的数量性状基因, 因此直接通过 F_2 大群体来定位将很难排除其它 QTL 的影响, 筛选与 QTL 共分离的标记也会存在一些困难。另外, 由于最终确定 QTL 的位置也需要通过 QTL 作图软件对大群体进行 QTL 分析, 而目前还没有有效的软件可以对 F_2 大群体进行数量性状的精细定位。因此直接用 F_2 群体将难以达到精细定位抗铝基因的目的。发展近等基因系是最终克隆铝抗性 QTL 的有效途径。通过回交选择仅第 1 染色体 QTL 区间被 Azucena 替代, 而其它位置都为 IR1552 基因型的株系和 IR1552 构成一对近等基因系, 或选择仅第一染色体 QTL 区间存在差异而其它位置基因型一致的两个株系构成一对近等基因系即可排除其它 QTL 的影响, 将复杂的数量性状分解成单个的基因, 从而通过精细定位或者位置候选基因策略最终将其克隆。

第三章 运用 cDNA-AFLP 筛选铝调节基因

铝毒害的主要症状是快速抑制根伸长。铝快速积累在质外体、质膜并最终进入细胞质中(Lazof 等, 1994)。目前已对铝毒性机制提出不同假说, 包括铝和根细胞壁的作用、铝和共质体组分如细胞骨架的结合等(Kochian, 1995)。虽然对于铝毒性机制已经有过许多研究, 但铝抑制根长的特异机制目前仍不清楚。尽管还不清楚铝毒性是质外体或是共质体现象, 日益增多的证据表明质外体在感受铝的过程中扮演着主要作用(Horst, 1995)。

一般认为铝抗性是根尖对铝的排斥作用或是共质体耐受作用或者两者共同起作用。通过根际分泌有机酸螯合铝从而解除铝毒害已经在许多植物中报道, 而铝在体内和有机酸形成复合物从而解除铝毒害的机制也在一些植物中起作用(Ma 等, 2001)。水稻是小粒禾本科作物中最抗铝的(Foy, 1988)。然而有关水稻抗铝毒害的机制目前所知还很有限。Ma 等(2002)研究发现在水稻中铝只诱导分泌少量的有机酸, 并且在抗性品种和敏感品种中其分泌量并无显著差异。这也意味着水稻可能存在一种不同于有机酸分泌的解除铝毒害的机制。

至今已从植物中克隆了 20 多个铝调节基因, 其中在不同的小麦品种中已经克隆了 10 多个铝调节基因 (Hamel 等, 1998; Richards 等, 1994; Snowden 和 Gardner, 1993)。在拟南芥中也已经克隆了 10 多个基因(Richards 等, 1998)。克隆铝调节基因的工作在烟草中也已经展开(Ezaki 等, 2000, 2001)。然而, 这些基因中大部分也受其他金属胁迫、低 Ca^{2+} 水平、物理伤害 (Snowden 等, 1995) 以及病原侵染(Hamel 等, 1998)等的诱导表达。并且在抗性品种和敏感品种中都受铝诱导表达增强(Hamel 等, 1998)。在水稻中除明风等(2002)从叶片中分离了 3 个铝诱导基因外, 目前没有其它铝调节基因的报道。

cDNA 扩增片段长度多态性 (cDNA-AFLP) (Bachem 等, 1996)是分离差异表达基因的一种非常有效的方法。Northern 杂交分析证明它具有较好的重复性 (Bachem 等, 1996, 1998)。它是一种基因组范围的表达分析工具, 并且不需要事先知道序列信息, 因而是一种发现新基因的有效的方法(Ditt 等, 2001)。本研究运用

cDNA-AFLP 分离到 34 个铝胁迫诱导的差异表达基因。这些差异表达的基因信息将有助于理解铝对水稻和其它植物的毒害机理和它们的抗铝机制。

1 材料

热带粳型抗铝早稻品种 Azucena 及籼型铝敏感水稻品种 IR1552

2 方法

2.1 水稻材料准备

2.1.1 水稻培养

Azucena、IR1552 种子用蒸馏水洗净, 3%次氯酸钠浸 20min。再用蒸馏水洗净, 放于培养皿中, 30℃黑暗浸种至露白 (2 d), 再在 27℃培养 2 d; 将发芽的种子移至尼龙纱网上, 半培养液培养 4 d, 进行铝胁迫处理。

2.1.2 胁迫处理

将苗移入 0.5mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.0)中渗透平衡 2h,然后移到含 0 和 183 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 (Al^{3+} 活度为 100 $\mu\text{mol/L}$) 的 CaCl_2 溶液 (pH 4.0) 中, 进行胁迫处理。

2.1.3 取样

胁迫后 0h、0.5h、2h、12h、24h、48h 分别取样一次 (取茎及根尖约 3~5cm), 同时取对照。所有样品于-70℃冷冻保存。

2.2 RNA 提取、纯化

2.2.1 总 RNA 提取

RNA 提取采用 GIBRCOL 公司 Trizol 试剂抽提方法:

50~100mg 组织加入液氮充分研磨,加 1ml Trizol (样品体积不能超过 Trizol 的 10%), 继续研磨直至完全溶解, 吸入离心管。

12000 g 离心 10 min (4℃),取上清, 15~30℃ 5min,

加 0.2ml 氯仿 (20: 1 的氯仿:异戊醇) 溶液, 用力摇 15s, 15~30℃ 2~3 min, 2~8

$^{\circ}\text{C} \leq 12000 \text{ g}$ 离心 15 min (4°C)，上层液相约为总体积的 60%。

取上清，加 0.5ml 异戊醇，混匀， $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 10 min， $2\sim 8^{\circ}\text{C} \leq 12000 \text{ g}$ 10 min。

去上清，加 75%乙醇 1ml (DEPC 水配制)，振荡， $2\sim 8^{\circ}\text{C} \leq 7500 \text{ g}$ 5 min。

去乙醇，空气干燥，用 DEPC 处理的水溶解 (无 RNA 酶)，于 -70°C 冷冻保存。

相同品种同一处理的根组织 0.5 h、2 h、12 h、24 h 4 个时期样按 RNA 等量混合，用于 mRNA 分离和 cDNA-AFLP 分析。

2.2.2 mRNA 分离纯化

采用 promega 公司的 PolyAtract® mRNA Isolation Systems

探针退火

取一无 RNA 酶的 1.5ml 管中加入 0.1-1.0 mg 总 RNA，加水 (无 RNA 酶) 到 500 μl ； 65°C ，10 min；

在 RNA 管中加 3 μl Biotinglated-Oligo (dT) Probe 和 13 μl $20\times\text{SSC}$ ，混匀，室温下冷却，约需 10 min；

磁粒清洗

轻轻地悬浮管中的颗粒至全部被分散开，将管放到 Magnetic Stand 使 SA-PMPS 颗粒层积在管的一边 (30 s)，小心去除悬液 (不要离心)。

用 $0.5\times\text{SSC}$ (无 RNA 酶，每次 0.3 ml) 洗 SA-PMPS 颗粒三次，每次用 Magnetic Stand 固定，小心移去悬液；

用 0.1 ml $0.5\times\text{SSC}$ 悬浮洗过的 SA-PMPS 颗粒。

纯化

将处理的 RNA 全部加入已经洗过的含 SA-PMPS 管中；室温 10 min，每 1-2 min 温和地颠倒混匀一次；

将 SA-PMPS 管放到 Magnetic Stand 固定，小心去除悬浮液，不要摇动 SA-PMPS 沉淀；

用 $0.1\times\text{SSC}$ 洗颗粒 (轻轻将颗粒从管底弹起使所有颗粒悬浮) 4 次，每次 0.3 ml；最后一次洗颗粒后在不搅动颗粒沉淀的前提下尽可能去除悬浮液。

洗脱 mRNA

用 0.1 ml 无 RNA 酶水将洗过的颗粒轻轻弹起悬浮；

用 Magnetic Stand 固定颗粒, 将洗脱的 mRNA 转移到灭菌的无 RNA 酶管中, 不要将颗粒丢弃!

用 0.15 ml 无 RNA 酶水再次洗脱颗粒, 将两次洗脱的 mRNA 混合 (0.25ml), 测 OD 值。

mRNA 的浓缩与检测

在 mRNA 溶液中加入 NaAc(pH5.2), 至终浓度 0.3 mol/L; 混匀, 加二倍体积预冷的乙醇, 混匀, 冰上放置至少 30 min;

4°C, 10,000g 15min, 小心弃去上清液, 用 70%乙醇洗沉淀, 离心后在空气中晾干核酸沉淀 (以上步骤也可用冷冻干燥替代), 用少量无 RNA 酶水溶解(0.5-1 μ g/ μ l) -70°C 保存备用。

2.3 cDNA-AFLP

2.3.1 cDNA 合成

cDNA 合成采用 clontech 公司的 SMART™ cDNA library construction kit(PT3001)合成 (用约 1 μ g mRNA 进行 cDNA 合成)。

第一链 cDNA 合成:

向灭过菌的 0.5ml 离心管中加入下列试剂:

- 1 μ l RNA 样品(1 μ g mRNA)
- 1 μ l SMART III Oligonucleotide
- 1 μ l CDS III/3' PCR Primer
- 2 μ l ddH₂O

5 μ l total

混合样品, 短暂离心。72°C 保温 2 分钟。迅速置于冰上冷却 2 分钟。短暂离心收集样品于管底。加入下列试剂于反应管中:

- 2 μ l 5 \times First-Strand Buffer
- 1 μ l DTT (20 mmol/L)
- 1 μ l dNTP Mix (10 mmol/L)
- 1 μ l MMLV 逆转录酶(200 U/ μ l, GIBRCOL SuperscriptII)

10 μ l 总体积

用移液枪轻轻吹吸混匀样品，短暂离心收集样品。42℃空气浴 1h。将反应管置于冰上终止第一链合成。加 1μl NaOH, 68℃空气浴 30min。保存于-20℃。

第二链 cDNA 合成（引物延伸法）

预热 PCR 仪到 95℃。加入以下试剂于反应管中：

11μl	第一链 cDNA
71μl	去离子水
10μl	10×cDNA PCR buffer
2μl	50×dNTP Mix
2μl	5'PCR Primer
2μl	CDSIII/3'PCR Primer
2μl	50× Advantage cDNA Polymerase Mix

100μl

混合样品，短暂离心收集样品于管底。加两滴矿物油于反应液上，将反应管置于预热的 PCR 仪上。按下列程序运行：

GeneAmp 480

72℃	10min
95℃	1min
3 cycles:	
95℃	15sec
68℃	6min

循环结束后，取出 5μl 样品在 1.1%琼脂糖凝胶上电泳，检测合成情况。合成出的 cDNA 是 0.1~3 kb 弥散的带。

2.3.2 cDNA 纯化

采用 QIAquick PCR Purification Kit

加 5 倍体积的 PB 溶液到 1 倍体积的 cDNA 中，混匀。

加到 QIAquick 柱中，>13000 RPM 离心 30~60 s。

弃流出液，加 0.75ml PE 溶液至柱中，>13000 RPM 离心 1 min。

弃流出液, >13000 RPM 再 1min。

将柱置于新的 1.5ml 离心管, 加 50 μ l 溶液 EB, 静置 1min, 全速离心 1min。

测 OD, 取 200ng 用于酶切, 其它-70 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.3 cDNA 酶切

TaqI 酶切:

20 μ l	cDNA(约 100ng)
1 μ l	TaqI (10U)
4 μ l	RL buffer (10 \times)
15 μ l	H ₂ O

40 μ l

65 $^{\circ}$ C 水浴 2h。

AseI 酶切:

在 TaqI 酶切体系中添加:

1 μ l	RL buffer (10 \times)
1 μ l	AseI (10U)
8 μ l	H ₂ O

50 μ l

37 $^{\circ}$ C 水浴 2h。

TaqI 接头(接头 1): 取 25 μ g T1 和 22 μ g T2 混合后水定容到 100 μ l(此为 50pmol/L 的 TaqI 接头)。

AseI 接头(接头 2): 取 2.6 μ g A1 和 2 μ g A2 混合后水定容到 100 μ l(此为 5pmol/L 的 AseI 接头)。

2.3.4 连接

在酶切体系中加入:

1 μ l	接头 1
1 μ l	接头 2
0.5 μ l	10mmol/L ATP
0.5 μ l	RL buffer (10 \times)
0.2 μ l	T4 DNA 连接酶
2 μ l	H ₂ O (实际上每体系加入 5 μ l)

55 μ l

37°C水浴 3h。可先取 10 μ l 连接产物稀释 10 倍。

2.3.5 预扩增

20 μ l	连接稀释产物
1 μ l	引物 T3 (100ng/ μ l 或 20 μ mol/L)
1 μ l	引物 A3 (100ng/ μ l 或 20 μ mol/L)
5 μ l	10 \times PCR buffer
0.5 μ l	dNTPs (25mmol/L)
0.25 μ l	Taq 酶 (1U)
22.25 μ l	H ₂ O

50 μ l

PCR[94°C: 30 sec, 52°C: 30 sec, 72°C: 60 sec] \times 16 循环。

5 μ l 产物于 1.8% agarose gel 上电泳, 结果呈一弥散带。PCR 产物稀释到约 1ng/ μ l (稀释 10-20 倍)。用于选择性扩增。

2.3.6 选择性扩增

3 μ l	预扩增稀释产物
3 μ l	特异性引物 1 (30ng)
3 μ l	特异性引物 2 (30ng)
2 μ l	10 \times PCR buffer
1 μ l	dNTPs (25mmol/L)
0.125 μ l	Taq-Pol (0.5U)
7 μ l	H ₂ O

20 μ l

PCR 条件:

94°C	2min	
94°C	30sec	← 每循环一次复性温度下降 0.7°C, 共 12 个循环
65°C	30sec	
72°C	1min	
94°C	30sec	← 20 个循环
56°C	30sec	
72°C	1min	
72°C	7min	
4°C		

2.3.7 测序胶电泳、染色

2.3.7.1 电泳

将聚合好的胶清洗好，于 $1\times$ TBE 中 2000V 60W 左右电泳 20min。将鲨鱼齿梳装好。

特异性扩增产物用 loading buffer (二甲苯氰 1mg 溴酚兰 1mg 0.5mol/L EDTA 20ml 溶于 1ml 去离子甲酰胺) 等体积混匀。95℃变性 3min 后立即置于冰上。取 3 μ l 上样电泳。

2.3.7.2 银染

玻璃板处理:

将玻璃板用洗洁精洗涤，双蒸水漂洗干净。晾干后用无水乙醇蘸在面巾纸上擦洗，晾干。

制备新鲜的 binding solution: 3 μ l Bind silicone 加入到 1ml 95%的乙醇和 0.5%冰醋酸中。

配备 5%的 sigmacote: 25 μ l sigmacote 加入到 475 μ l 氯仿中。

短板: 用 binding solution 擦拭一遍短板, 4-5min 后, 95%的乙醇擦拭一遍。

长板: 用约 0.5ml sigmacote 擦拭一遍长板, 5-10min 后, 95%的乙醇擦拭一遍。

准备溶液:

固定/终止液: 1.8L ddH₂O 中加入 200ml 冰醋酸。

染色液: 2g AgNO₃ 和 3ml 37%的甲醛溶于 2L ddH₂O 中。

显色液: 60g Na₂CO₃ 溶于 2L ddH₂O, 冰浴至 10℃, 用之前加 3ml 37%的甲醛和 400 μ l 10mg/ml 的 Na₂S₂O₃。

配胶:

5 \times TBE	16ml
尿素	33.6g
Acr:Bis 贮液	12ml
ddH ₂ O	24ml
80ml	

(注: Acr:Bis 贮液为 19g Acr 和 1g Bis 溶于 50ml ddH₂O, 过滤)

灌胶前加入 40 μ l TEMED 和约 400 μ l 10% 的过硫酸铵，混匀。

灌胶用一小漏斗下接橡皮管，与橡皮管上接一 1ml 枪头。小漏斗放于高处，加入凝胶溶液，赶走橡皮管及枪头中气泡，通过控制橡皮管调整溶液流出速度。将玻璃板成 40 度角斜放，将溶液灌入玻板中，应无气泡，灌好后将鲨鱼齿梳倒插入液面 5-6 mm，将板成 20 度角放置聚合。待其聚合 2h 后，再电泳（也可在头天晚上灌制好，凝固后用保鲜膜封好口，电泳前将板上残留物冲洗干净。），揭板。

染色：

固定：在托盘(1)中加入固定/终止液，将有胶的短板放入托盘，轻摇 20min 或直到指示剂颜色消失为止。另胶可在溶液中浸泡过夜(不摇动)。将溶液回收留用，清洗托盘。如此时显色液还未预冷，可于此时置于冰上。

洗胶：在托盘(2)中用 ddH₂O 漂洗凝胶 3 次，每次 2 min，在将玻板取出时，让玻板竖直滴干 10-20 s。

染色：在托盘(1)中加入 2L 染色液，将有胶的玻板放入托盘，轻摇 30 min。

显色准备：完全配制好显色液，将 1L 预冷的显色液置于托盘(2)中，剩下的溶液仍置于冰上。将胶从染色液中拿出放在一边，染色液倒回容器，用水冲洗托盘(1)。并在此托盘中加入约 2L ddH₂O。

洗胶：将胶浸入装有 ddH₂O 的托盘中，拿出，滴干水，立即将胶置于预冷的显色液中。注意，从将胶置于水中到将其放入显色液中，时间不超过 5-10 s（可将板放入水中约 3-4 s，立即拿出竖直滴干 2 s，直接放入显色液）。如洗胶时间过长，重复染色过程。

显色：轻摇显色液，至胶上条带出现(或第一条条带出现)后，将胶转入剩余的 1 L 预冷显色液继续显色 2-3 min 或直到所有条带都出现。

固定：将 1 L 固定液加入到显色液中，终止显色反应。

洗涤：用 ddH₂O 洗涤凝胶两次，每次 2 min。

室温下自然晾干。

2.4 特异性片段克隆、测序

2.4.1 克隆

用刀片割下特异性条带，将凝胶溶于 400 μ l 高盐溶液（20%乙醇，1mol/L LiCl 和 10mmol/L Tris-HCl, pH7.5）中，室温放置 24h，65 $^{\circ}$ C 温浴 2h，无水乙醇沉淀并溶于 20 μ l TE。取 5 μ l 回收的 DNA 为模板，用以下条件扩增，循环数可提高到 40 个循环。

94 $^{\circ}$ C: 4min [94 $^{\circ}$ C: 30sec, 56 $^{\circ}$ C: 30sec, 72 $^{\circ}$ C: 1min] \times 35 循环 72 $^{\circ}$ C: 7min。
(20 μ l 体系)

PCR 产物电泳，切下所需条带用 QIAquick Gel Purification Kit 回收，方法同 PCR 纯化 Kit。用 T-Vector 与特异性片段进行连接，反应如下：载体 DNA 50ng、目的 DNA 片段 200ng、10 \times 连接缓冲液 1 μ l、T₄ DNA 连接酶 3U，加水至 10 μ l。16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

2.4.2 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞制备及质粒转化

按 1:100 比例将过夜菌加入到新鲜的 LB 中，37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.375。50ml 一管分装，在冰上放置 5-10 min。4 $^{\circ}$ C 1600g 离心 7min，沉淀菌体。用 10ml CaCl₂ 溶液重悬菌体。4 $^{\circ}$ C 1100g 离心 5min。10ml CaCl₂ 重悬菌体，冰上放置 30min。4 $^{\circ}$ C 1100g 离心 5min。用 1ml CaCl₂ 重悬菌体，按 100 μ l 一管分装于 -70 $^{\circ}$ C 保存。一管 100 μ l 感受态菌加 10ng DNA 冰上放置 10min。将管放入 42 $^{\circ}$ C 水浴 1min 进行热击，然后加入 900ml SOC 培养基 37 $^{\circ}$ C 下 225 rpm 培养 1hr。于合适的抗生素（如氨苄青霉素，Amp）平板上用蓝白斑筛选单菌落。

2.4.3 质粒抽提

在平板上选择一个白色单菌落接种到 LB 液体培养基（含 50 μ g/ml 氨苄青霉素），37 $^{\circ}$ C 下 225rpm 培养 16 hr，取 1.5ml 菌液 12000g 离心沉淀菌体，去上清，加 100 μ l 溶液 I 悬浮菌体。加入 200 μ l 溶液 II，颠倒离心管 5 次混合溶液，放置冰上 3min。加入 150 μ l 溶液 III，混匀，冰上放置 5min。4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 5min，上清转移至新的离心管。加入等体积的异丙醇，混匀，4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 5min，去上

清。70%的乙醇漂洗沉淀，晾干后加入 50 μ l TE 溶解。

2.4.4 测序

直接拿 PCR 产物或克隆好的质粒用 MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia, USA) 测序。已测序列用 DNASTAR 分析并去除载体序列。

2.5 序列比较及基因功能分析

序列分析采用 blast 软件进行 internet 比较(NCBI, National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。根据 RGP 释放的数据，和已定位的 BAC 完全同源的序列（基因）就认为定位在该 BAC 位置。

未知功能克隆根据其基因组序列在 RGP (<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>) 进行注释，或用 Genscan 软件(<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/genscan.html>) 预测蛋白后进行比较。功能已知的基因根据同源基因推断 (BLASTX 或 TBLASTX 比较 E values 小于 $1e-5$) (Ditt 等, 2001)。

2.6 Southern 和 Northern 杂交分析方法

预杂交：将杂交膜装入杂交管或放入杂交盒中，加入一定体积 65 $^{\circ}$ C 预热的预杂交液 (0.25mol/L Na_2HPO_4 、1%BSA、1mmol/L EDTA、7%SDS)，保证 RNA 面直接接触预杂交液，同时预杂交液要覆盖所有膜。在 65 $^{\circ}$ C、40rpm 下预杂交反应至少持续 6h。

探针标记：取 50ng-100ng 探针（总体积约 10 μ l），沸水浴 10min，立即冰浴 10min。离心后加入标记混合液：LS 12 μ l + 1 μ l Klenow Fragment (5U/ μ l) + 3 μ l P^{32} -dCTP, 37 $^{\circ}$ C 下反应 30min, 之后加入 0.25mmol/L 的 dNTP 4 μ l, 继续反应 20min。

探针变性：标记好的探针 100 $^{\circ}$ C 变性 10min，迅速冰浴 10min。

杂交：将变性好的探针立即加入预杂交液中，混匀，保证膜被完全覆盖，在 65 $^{\circ}$ C、40rpm 下杂交 12h 以上。

洗膜：将膜从杂交液中取出，放入装有 65 $^{\circ}$ C 洗膜液的盒中，洗膜液分别为：2 \times SSC+0.1%SDS、1 \times SSC+0.1%SDS、0.1 \times SSC+0.1%SDS，65 $^{\circ}$ C/60rpm 下分别洗 20min、20min、20min。

包膜压片：取出尼龙膜，轻轻沥干液体，用保鲜膜包好，压磷屏，用 Typhoon 8600 扫描仪 (Molecular Dynamics, USA) 检测信号。

脱探针：将湿润的膜放入煮沸的 0.1% (w/v) SDS (pH7.5)，轻轻摇动至溶液冷却，将膜在 $2\times$ SSC 中过一遍，检测放射强度，若太高需再脱一次。用保鲜膜包好待用。注意不要让膜干燥。

3 结果

3.1 抗敏品种的铝抗性表现和根中铝积累情况

抗铝的热带粳型早稻 Azucena 和铝敏感的籼型水稻 IR1552 用于铝胁迫处理 ($100\ \mu\text{mol/L}$ 活性铝)。结果表明 IR1552 相对 Azucena 来说要敏感的多，铝对其根伸长的抑制远比 Azucena 严重 (图 3.1)。然而，在两个品种中根伸长在最初的 12 小时就受到显著抑制 (图 3.1)。苏木精 (铝组织化学染色剂) 染色结果表明 IR1552 根被染成深色而 Azucena 只有轻微的染色 (图 3.2)，这表明铝抗性品种比敏感品种在根中积累更少的铝。这也暗示着铝排放机制可能在水稻抗铝机制中起重要作用。

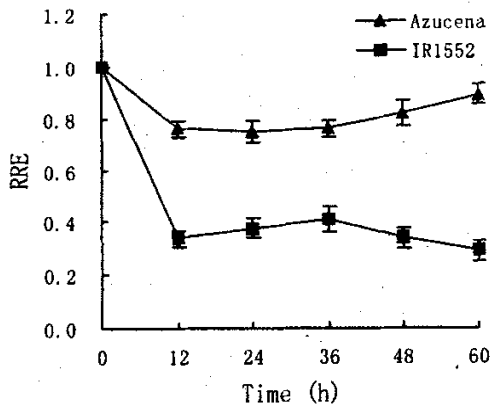


图 3.1. 铝抗性 (Azucena) 和敏感品种 (IR1552) 在不同胁迫时间下的相对根长。数据为 15 株苗的平均值，误差线为标准差。

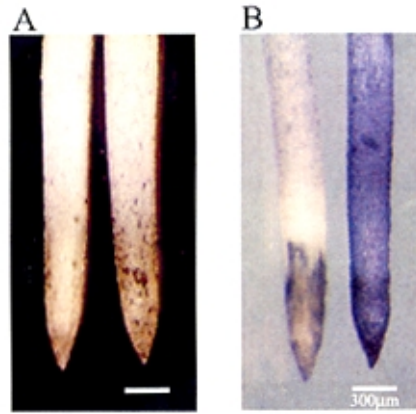


图 3.2. 根组织化学染色结果。A 图为 Azucena, B 图为 IR1552, 在两个图中左边为 CK 条件下的根, 右边为处理条件下的根。图中的白色横条代表 300 μm 。

3.2 铝调节基因的筛选

在本实验中我们运用 cDNA-AFLP 技术对 Azucena 和 IR1552 在铝胁迫和对照条件下的根组织 RNA 进行了差异表达分析 (附图 1 为部分引物对的 cDNA-AFLP 扩增结果)。通过 35 对引物组合的选择性扩增, 得到了 2100 条扩增条带。在 Azucena 或 IR1552 中或者在两个品种中都受铝诱导表达的片段认为是铝调节的 TDF。通过本实验我们分离到 34 个大小在 100 bp 到 600 bp 的铝调节的 TDFs。不同的 TDF 定名为 *OsAR* (*Oryza sativa* Al regulated)。 *OsAR7* 和 *OsAR8* 都对香豆醇-3-羟化酶 (*p-coumarate 3-hydroxylase*) 基因同源, 表明这两个差异表达片段属于同一个基因。 Blast 比较表明在 33 个单基因中有 19 个分别和已知的基因同源 (表 3.1)。 10 个 TDFs 能找到同源的基因组序列或 EST, 另有 4 个 TDFs 未能找到显著同源的序列信息, 分别称其为未知功能基因和未知基因。

在 19 个已知基因中, 7 个可能参与细胞壁组分代谢, 其中包括 4 个木质素合成的基因 (*OsAR4*, *OsAR5*, *OsAR6* 和 *OsAR7*), 1 个半纤维素合成相关的酶 (*OsAR9*), 1 个糖蛋白合成 (*OsAR11*) 和 1 个其它组分相关的基因 (*OsAR10*) 还有 1 个氧胁迫相关基因 (*OsAR13*)。有 10 个基因可能参与细胞代谢 (*OsAR1*, *OsAR2* 和 *OsAR3*), 逆转座元件 (*OsAR19*), 基因表达调控 (*OsAR20*), 蛋白代谢 (*OsAR14*, *OsAR15* 和 *OsAR16*) 以及细胞周期调控 (*OsAR17*) 和发育调控 (*OsAR18*) 等。从 cDNA-AFLP 的表达模式可以看出有 17 个基因在 Azucena 和 IR1552 中都受铝诱导增强表达 (表

3.1)。有一个差异表达片段仅在 Azucena 中增强表达 (*OsAR18*)，这个克隆编码一个 KN-1 样蛋白。而另一个克隆仅在 IR1552 中增强表达 (*OsAR12*)，该克隆可能参与紫杉醇的生物合成。

在 10 个未知功能基因和 4 个未知基因中，有两个基因 (*OsAR24* 和 *OsAR34*) 仅在 Azucena 中诱导增强表达，有一个基因在 Azucena 中受铝胁迫诱导抑制。另外 11 个基因在两个品种中都受铝诱导增强表达。

TDF	大小 (bp)	表达 ^a		同源物	功能分类	Genebank 登录号
		A	I			
<i>OsAR1</i>	255	+	+	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	细胞代谢	CB483485
<i>OsAR2</i>	283	+	+	2-oxoglutarate dehydrogenase		CB483486
<i>OsAR3</i>	334	+	+	Aspartate aminotransferase		CB483487
<i>OsAR4</i>	333	+	+	4-coumarate:CoA ligase isoform 2	木质素合成	CB483488
<i>OsAR5</i>	128	+	+	Phenylalanine ammonia-lyase		CB483489
<i>OsAR6</i>	133	+	+	Putative cinnamyl-alcohol dehydrogenase		CB483490
<i>OsAR7</i>	272	+	+	<i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase		CB483491
<i>OsAR8</i>	232	+	+	<i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase		CB483492
<i>OsAR9</i>	256	+	+	Xylose isomerase	细胞壁相关	CB483493
<i>OsAR10</i>	241	+	+	Beta-1,3-glucanase		CB483494
<i>OsAR11</i>	194	+	+	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase		CB483495
<i>OsAR12</i>	322		+	0-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase	次生代谢	CB483496
<i>OsAR13</i>	265	+	+	Quinone oxidoreductase	氧胁迫	CB483497
<i>OsAR14</i>	286	+	+	Proteinase inhibitor	蛋白代谢	CB483498
<i>OsAR15</i>	227	+	+	Elongation factor EF-2		CB483499
<i>OsAR16</i>	112	+	+	SUMO-1		CB483500
<i>OsAR17</i>	572	+	+	MCT-1 protein-like	其它	CB483501
<i>OsAR18</i>	253	+		Rice KN1-like proteins		CB483502
<i>OsAR19</i>	268	+	+	Putative retroelement pol polyprotein		CB483503
<i>OsAR20</i>	239	+	+	Histone H4		CB483504
<i>OsAR21-23</i>		+	+	Unknown protein		CB483505-07
<i>OsAR24</i>		+		Unknown protein		CB483508
<i>OsAR25</i>		-		Unknown protein		CB483509
<i>OsAR26-30</i>		+	+	Unknown protein		CB483510-14
<i>OsAR31-33</i>		+	+	No match ^b		CB483515-17
<i>OsAR34</i>		+		No match ^b		CB483518

表 3.1. 铝调节 TDFs 的功能分析及它们在 cDNA-AFLP 中的表达模式

注：^a：A: Azucena; I: IR1552; (+): 表达上调; (-): 表达下调; ^b：同已有的基因组序列、EST 及蛋白数据库无显著同源。

3.3 部分铝诱导基因的时空表达模式

对 10 个铝诱导基因包括 5 个参与木质素和半纤维素合成的酶、1 个紫杉醇合成相关酶、延伸因子及 KN-1 样蛋白，再加两个未知功能基因进行了不同时间和组织的 Northern 分析。Northern 结果也反映了 cDNA-AFLP 的可靠性。*OsAR9*, *OsAR12* 和 *OsAR24* 这 3 个基因可能表达丰度比较低，在 Northern 分析时没有结果。这些基因在 Azucena 和 IR1552 的根茎的表达中存在 5 种表达模式。1) 4-香豆酸辅酶 A 连接酶异构体 2、苯丙氨酸氨裂解酶、假定香豆醇脱氢酶(*OsAR4*, *OsAR5* 和 *OsAR6*) 等 3 个基因在 Azucena 的根茎中都受铝诱导表达增强，而在 IR1552 叶片中仅有微弱的表达增强。3 个基因在 Azucena 中的表达比 IR1552 中要强，但在 IR1552 中它们更早达到表达高峰；2) 编码对-香豆酸-3-羟化酶的基因(*OsAR7*)在茎中表达较弱，而在根中，IR1552 中的表达要早于 Azucena，表达量也高一些；3) 一个编码未知蛋白的基因(*OsAR28*)在两个品种的茎中都几乎不表达，但在根中 IR1552 的表达要早于 Azucena，在 Azucena 中其 mRNA 的量随着处理时间的延长而逐渐增加，而在 IR1552 中则在早期诱导增强然后逐渐减少。4) 编码延伸因子 EF-2 的基因(*OsAR15*)在 Azucena 组成型增强表达，在 IR1552 茎中则是随着表达时间延长表达量下降，而根中稍有增强；5) 编码 KN1 样蛋白的基因(*OsAR18*)，在 Azucena 根中组成型增强表达，而在茎中胁迫早期 (2h 之内) 表达量下降而在后面的时间点 (12 h 之后) 则表达增强。在 IR1552 中则在根、茎中都为组成型表达 (图 3.3)。

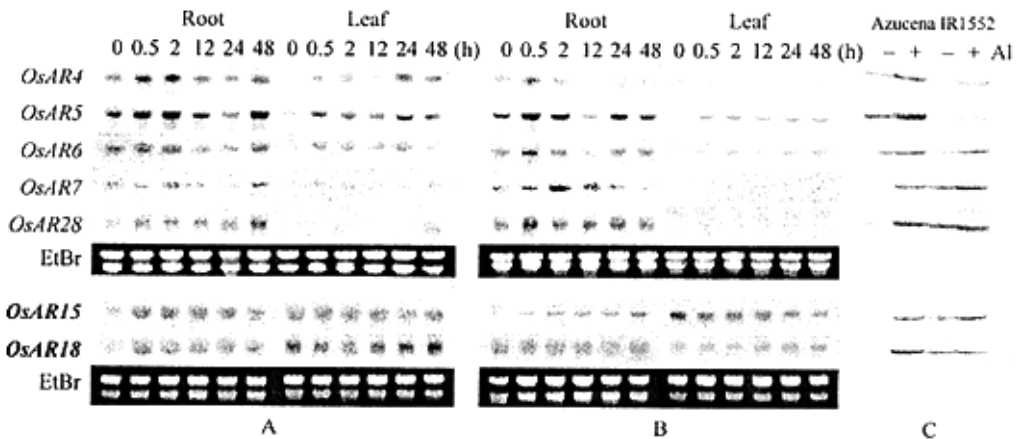


图 3.3 7 个铝调节基因的时空表达模式。A、B 图为 Northern 分析结果，A 为 Azucena，B 为 IR1552；C 图为 cDNA-AFLP 结果。

4 讨论

cDNA-AFLP 是一种分离差异表达基因的有效方法。本研究中分离的 33 个 TDFs 中有 3 个和小麦中报道的铝诱导基因同源(Cruz-Ortega 等, 1997; Snowden 和 Gardner, 1993; Snowden 等, 1995), 它们分别是苯丙氨酸氨裂解酶、蛋白酶抑制剂和 β -1,3-葡聚糖酶。这一结果也表明不同植物可能存在相似的铝应答机制。

本实验得到的 19 个已知基因分别参与不同的代谢途径。由表 3.1 知, 有 7 个参与细胞壁组分的合成代谢, 有 3 个参与细胞内物质代谢、另外有 3 个参与蛋白合成分解。此外, 分别有一个基因参与次生代谢、氧胁迫、细胞周期调控 (*OsAR17*)、植物发育 (*OsAR18*)、逆转座元件 (*OsAR19*)、转录调节 (*OsAR20*) 等相关代谢途径等等。说明铝毒害结果会影响植物体内一系列的代谢途径, 使植物产生一系列的生理生化反应。这些反应有些可能对植物有利的, 是植物体为抵抗铝的毒害而产生的防御反应。而有些则可能对植物体产生毒害作用, 是铝对植物毒害作用的体现。

4.1 铝胁迫诱导细胞壁组分相关基因

在 19 个已知基因中有 7 个可能参与细胞壁组分的代谢(表 3.1)。形态学和组织学研究已经表明铝胁迫可以诱导细胞壁组分的改变, 如多糖和木质素含量的增加(Eleftheriou 等, 1993; Sasaki 等, 1996)。

在本实验中 4 个编码木质素生物合成相关酶(Humphreys 和 Chapple, 2002)的基因(*OsAR4*, *OsAR5*, *OsAR6* 和 *OsAR7*)受铝诱导增强表达。Northern 分析表明这些基因在根中表达比茎中要高。在铝处理条件下, 铝敏感品种 IR1552 比铝抗性品种更早地积累 mRNA。木质素是植物细胞次生壁的主要结构成分。不同的胁迫因子, 包括离子缺乏、病原侵染以及物理伤害都能诱导细胞壁中木质素的沉积。Sasaki 等(1996) 研究表明不论在铝抗性品种和铝敏感品种中根伸长的抑制程度和木质素的含量都是呈正相关的, 在根中铝敏感品种比铝抗性品种会积累更多的木质素, 这和前面提到的这些基因的表达模式相一致。

3 个基因包括木糖异构酶(*OsAR9*), β -1,3-葡聚糖酶(*OsAR10*)和尿苷二磷酸-N-乙酰葡糖胺(UDP-GlcNAc)焦磷酸化酶(*OsAR11*)在铝抗性品种和敏感品种都受铝诱导增强表达。木糖异构酶催化 D-木酮糖和 D-木糖的转化

(<http://www.brenda.uni-koeln.de/>), D-木糖是半纤维素的主要组成成分。这和铝能诱导半纤维素在细胞壁中沉积的事实(Tabuchi 和 Matsumoto, 2001)相一致。Van 等(1994)研究表明铝处理诱导南瓜幼苗根中半纤维素含量提高, 并且发现它主要是由于木糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖提高的结果。

β -1,3-葡聚糖酶在植物防御病原侵染过程起着重要作用。这个基因在植物受伤以及病原细菌、真菌和病毒侵染过程中强烈诱导表达。在植物胚胎发生、小孢子发生、开花、物理伤害过程中这个基因也在起作用(Leubner-Metzger 和 Meins, 1999)。在小麦中它也受铝诱导增强表达(Cruz-Ortega 等, 1997)。曾经有人提出 β -1,3-葡聚糖酶在种子萌发过程促进细胞壁成分的水解(Leubner-Metzger 和 Meins, 1999), 这也暗示着在铝胁迫条件下它可能也参与细胞壁成分的修饰。

尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc)焦磷酸化酶可逆地催化 UDP-GlcNAc-1-P 和 UTP 合成 UDP-GlcNAc (<http://www.brenda.uni-koeln.de/>)。UDP-GlcNAc 是一个普遍存在又是必需的代谢产物, 它在好几个代谢途径中起着重要作用。在细菌中是细胞壁肽聚糖的细胞质前体。在真核生物中它在生物合成 N-、O-连接的糖蛋白过程中作为特异的糖基供体(Piro 等, 1994)。而糖蛋白也是细胞壁的重要组成成分, 表明铝也可能影响细胞壁糖蛋白的合成代谢。

Tabuchi 和 Matsumoto (2001) 表明铝毒害改变细胞壁成分的代谢, 因而使得细胞壁加厚变脆。这和我们的结果相一致。木质素、半纤维素、糖蛋白和其它次生代谢物质的合成和在细胞壁的沉积, 改变了细胞壁结构, 它们可能使细胞壁加厚, 透性改变, 阻止铝进入细胞质膜。然而细胞壁成分的改变、加厚也可能限制了根细胞伸长从而也抑制根伸长(Van 等, 1994), 并使植物处于氧胁迫状态, 铝诱导的醌氧化还原酶基因(*OsAR13*)增强表达也说明了这一点。醌氧化还原酶被公认为是微生物抵抗氧胁迫反应中的一个重要酶, 其增强表达可能是铝诱导氧胁迫反应的表现。

4.2 铝抗性候选基因

本实验中分离了 33 个铝诱导基因, 但没发现有有机酸合成和代谢相关的基因, 对有机酸分泌相关的柠檬酸合成酶、细胞质和乙醛酸循环体苹果酸脱氢酶的反向 Northern 分析表明它们并没有显著的受铝诱导增强表达。这和 Ma 等(2002)的发现相符合, 在他们研究中发现水稻在铝胁迫条件下仅诱导分泌少量的柠檬酸, 而检

测不到其它有机酸。大部分这些基因在铝抗性品种和敏感品种中都受铝诱导表达。但在铝抗性品种和敏感品种中存在不同的时空表达模式。根据它们的表达模式可以推测表达模式为 1 的基因可能在两个品种中都起保护性作用；表达模式为 2、3 的基因可能在铝抗性和敏感品种中有不同的效应；而表达模式为 4、5 的基因可能是品种特异的铝应答基因。

编码泛素样蛋白 SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier-1, OsAR16) 和一个未知蛋白(OsAR28)的两个 TDFs 根据整合图谱定位在染色体 1 的铝抗性 QTL 附近(图 4.3)。OsAR28 (181 bp)在 Azucena 和 IR1552 中显示了不同的表达模式, 其转录本在 Azucena 中逐渐增加, 而在 IR1552 中逐渐下降(图 3.3)。OsAR16 (112 bp)是一个泛素样蛋白(SUMO 连接系统中的一个成员)。SUMO 系统是泛素样多肽超家族的一个成员, 它是植物蛋白修饰系统中一条不同于泛素化修饰类型的途径, 在拟南芥中包括 8 个基因。它能共价结合到细胞内不同的靶蛋白上, 从而改变它们的功能、定位和半寿期。SUMO-1 在植物中受热胁迫、 H_2O_2 、乙醇等诱导, 在植物胁迫反应中起保护和修复的作用(Kurepa 等, 2003)。这两个基因可能在水稻抗铝机制中起一定的作用, 进一步的功能验证和分析需要将它们转入水稻中, 通过在铝敏感品种中增强表达, 在铝抗性品种中敲除, 从而确定其是否参与水稻抗铝反应以及如何起作用。

第四章 QTL 区间上铝诱导差异表达基因的筛选

尽管铝毒耐性在不同物种和同一物种不同品种间都存在巨大的变异,但对植物抗铝毒害的机制目前还不是很清楚。铝抗性是一个多基因控制的复杂的性状,已经有许多研究运用不同的技术试图克隆植物抗铝基因,至今已从植物中克隆了 20 多个铝调节基因,其中在不同的小麦品种中已经克隆了 10 多个铝调节基因 (Hamel 等, 1998; Richards 等, 1994; Snowden 和 Gardner, 1993)。在拟南芥中也已经克隆了 10 多个基因(Richards 等, 1998)。克隆铝调节基因的工作在烟草中也已经展开(Ezaki 等, 2000, 2001)。在水稻中除明风等(2002)从叶片中分离了 3 个铝诱导基因外,目前没有其它铝调节基因的报道,我们也从水稻中筛选了 34 个铝诱导基因。然而,这些基因中大部分在抗性品种和敏感品种中都受铝诱导表达增强(Hamel 等, 1998)。尽管在酵母和拟南芥中增强表达一些铝诱导基因能提高它们的抗铝性,但到目前为止,还没有克隆抗铝基因的报道。由第二章可知在不同的水稻抗铝材料中都在第 1 染色体 C86 和 RZ801 这一区间上检测到一个抗铝 QTL。但目前尚不知道这个 QTL 是什么基因在起作用。在第三章中通过 cDNA-AFLP 在该区间筛选到两个铝诱导基因。本章将采用反向 Northern 的方法筛选该位置上的铝诱导 EST, 以便为筛选候选的抗铝基因提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

所用铝处理材料为 Azucena。所有 EST 克隆由日本 MAFF DNA Bank (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>) 提供。

1.2 反向 Northern 分析

点膜:

采用常规的 PCR 条件,用 M13 引物扩增 EST 克隆,电泳检测后,加入 NaOH

和 EDTA 至终浓度为 0.4mol/L 的 NaOH、10mmol/L 的 EDTA, 100°C 变性, 冰浴。然后用 BIO-RAD 点样器 (Bio-Dot[®] Microfiltration Apparatus) 点到 Hybond-N⁺ 尼龙膜上 (Amersham Pharmacia Biotech), 点样方法参照点样器说明书。80°C 烘膜 2 h, 备用。

反转录标记探针:

0.5ml 管中加入 mRNA 1 μ g, T13A、T13G、T13C (0.5 μ g/ μ l) 各 1 μ l, 六聚体随机引物 (1 μ g/ μ l) 3 μ l, 70°C 变性 10min, 冰浴 5min。

建立标记体系如下 (25 μ l):

5× Reaction Buffer	5 μ l
dNTP (无 dCTP, 20mmol/L)	1 μ l
dCTP (0.5mmol/L)	1 μ l
RNase inhibitor	1 μ l
MMLV (200U/ μ l)	1 μ l
P ³² -dCTP	6 μ l

37°C 反应 1 h, 加入 0.5 μ l RNaseH (60U/ μ l), 继续作用 30min。100°C 变性 10min, 冰浴 5min。

杂交方法和洗膜条件、Northern 杂交方法及序列分析、定位方法同上一章。

1.3 cDNA 全长序列的获得

根据序列预测结果设计引物 PCR 扩增得到全长序列, 再利用 5'RACE, 3'RACE 验证。

2 结果分析与讨论

2.1 铝诱导差异表达 EST 的筛选

从第一部分工作已知不同水稻和旱稻品种中在第一染色体 C86~RZ801 的区间存在一个铝抗性 QTL (图 2.4)。这个 QTL 是如何起作用的, 是通过转录水平调节抑或是转录后水平的调节目前尚不清楚。Wu 等(2002)将 6591 个 EST 定位在水稻高密度遗传图谱上。根据他们的定位结果在 C86 和 C742 (RZ801 之外) 之间有 83 个 EST, 在另外两个 QTL 区间附近也找到 75 个 EST, 再加上柠檬酸合成酶、细胞质和乙醛酸循环体苹果酸脱氢酶等有机酸分泌相关的酶。我们运用反向 Northern

对这些 EST 进行了检测。对这些 EST 进行 PCR 扩增后点在尼龙膜上, 用胁迫条件下 0.5 h、2 h、12 h、24 h 各时间点的等量的 RNA 混合成一个处理 RNA 池, 对照条件下相同时间点 RNA 混合成对照 RNA 池, 处理和对照 RNA 池分别纯化 mRNA 用作反向 Northern 的探针。处理和对照的探针分别和两张点了同样 EST 的膜杂交, 两次重复实验都有差异表达的克隆就认为是差异表达克隆。结果如图 4.1 所示。经过两次重复, 最后找到 4 个差异表达的克隆 (图中箭头所指), 它们都位于第一染色体 C86~C742 这一区间, 几个有机酸分泌相关的基因并没有显著的铝诱导表达差异。

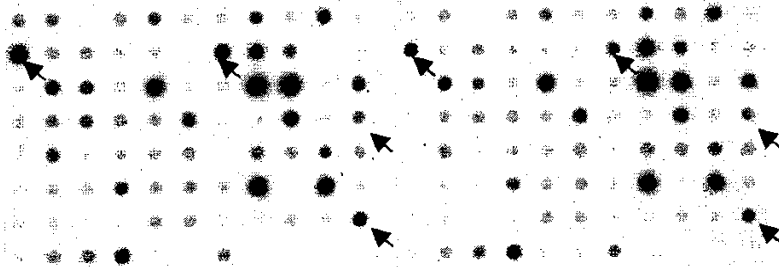


图 4.1 EST 克隆的反向 Northern 结果。箭头所指的为差异表达克隆。两张膜上所点的样完全一样, 最后一个点为 actin 作为对照。左图为和处理探针杂交的结果, 右图为和对照探针杂交的结果。

2.2 差异克隆的分析

对 4 个差异表达的 EST 克隆测序后, 进行 BLAST 比较, 假定的功能列于表 4.1, 它们分别是氨基酸转运体 (C50531)、假定的 Rho-GDP 分裂抑制子 (E1391)、非特异脂转移蛋白 (E30131)、泛素样蛋白 SUMO-1 (E61853)。序列分析发现所筛到的 EST 克隆 E61853 和上一章 cDNA-AFLP 筛到的 *OsAR16* 为同一个基因。

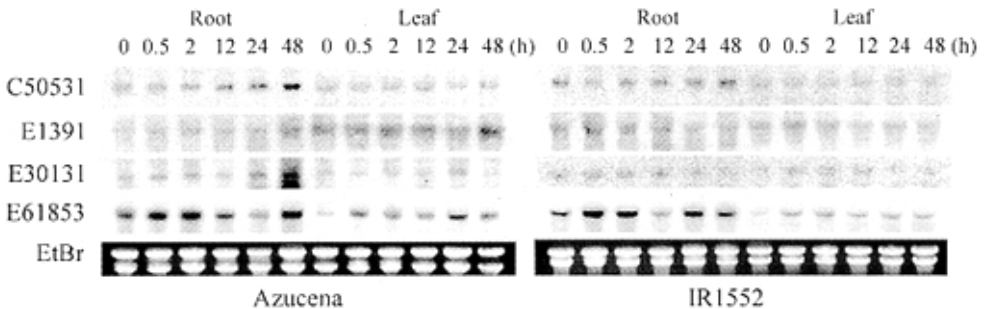


图 4.2 差异表达 EST 克隆的 Northern 结果。

表 4.1 EST 克隆的序列比较分析

克隆名称	得分	E value	功能
C50531	159	8E-67	Putative amino acid transport protein
E1391	138	1E-31	Putative Rho GDP-dissociation inhibitor
E30131	55.1	1E-06	PVR3-like protein, non-specific lipid transfer protein
E61853	150	1E-44	Ubiquitin-like protein SUMO-1

E30131 编码非特异脂转移蛋白 (nsLTP)。其在 Azucena 根中受铝诱导表达增强, 而在 IR1552 根中则受铝诱导表达量下降, 在茎中表达量相对较低。非特异脂转移蛋白参与磷脂、糖脂、脂肪酸、类固醇等物质在膜间的转移。非特异脂转移蛋白是由体内分泌的, 然后定位到拟南芥表皮层细胞壁或椰菜表皮蜡质层中(Horvath 等, 2002)。研究发现植物 nsLTP 基因的表达受许多环境条件如高盐、干旱、极端温度、以及生物胁迫的诱导(Kader, 1997)。非特异脂转移蛋白在防御细菌和真菌侵染过程中起着抑制细菌和真菌的作用(Kristensen 等, 2000; Molina 等, 1993), 分离的非特异脂转移蛋白有抗菌作用(Cammue 等, 1995)。然而 nsLTP 是否促进水稻抗铝性尚有待进一步研究。

E1391 编码 Rho-GDP 分裂抑制子 (Rho-GDI)。Rho-GDI 是一个抑制 GDP/GTP 交换的蛋白。它抑制 GTP 和 GTP 酶结合从而抑制 GTP 酶的活性, Rho-GTP 酶是在细胞骨架调控、细胞生长和分化、基因表达以及超氧阴离子产生等过程中信号传导途径的分子开关(Kieffer 等, 2000)。一般情况下, Rho 蛋白和 Rho-GDI 在细胞质中形成二聚体复合物。激活的时候 Rho-GTP 酶和 GTP 结合转移到质膜上和其它效应子结合。Leffers 等(1993)发现过量表达 Rho-GDI 导致肌动蛋白细胞骨架的破坏, 并指出 Rho-GDI 在调节 Rho 蛋白的活性中起重要作用。从 Northern 结果来看, 在铝处理条件下 Rho-GDI 在抗铝品种根中随着胁迫时间延长而表达逐渐增强, 而在铝敏感品种中则在胁迫 30min 即开始诱导, 随后表达逐渐减弱, 在茎中其受铝诱导表达变化的趋势不明显 (图 4.2)。从其在抗铝和铝敏感品种的差异表达情况来看, Rho-GDI 可能和水稻铝抗性有关系。研究表明 GDI 受真菌诱导子诱导表达(Kim 等, 1999), 酵母表达分析表明, 增强表达烟草 GDI 能够促进体内铝的排出从而提高铝抗性(Ezaki 等, 1999)。到底 Rho-GDI 和水稻铝抗性有些什么关系需要进一步的工作来研究。

E61853 为一泛素样蛋白 SUMO-1, 序列比较发现该克隆和 cDNA-AFLP 得到的 *OsAR16* 是一致的。两者属于同一个基因。该基因的功能及其与铝耐性的关系在前一章已经作了讨论, 在此不再讨论。

C50531 为假定的氨基酸转运体。氨基酸转运体参与体内氨基酸的分配, 是体内能源分配途径的重要组成部分。生长中的叶片、分生组织以及生殖器官都必需依赖氨基酸转运体输入氨基酸来维持生长和发育。在叶片衰老和种子萌发过程中氨基酸转运体也起着重要作用, 目前植物中已发现了 8 个氨基酸转运体, 它们分别在不同的组织行使功能。研究表明氨基酸转运体受环境条件的诱导, 旱处理和盐胁迫诱导某些氨基酸转运体的表达及酶活性增强(Ortiz-Lopez 等, 2000)。本研究发现氨基酸转运体也受铝胁迫诱导增强表达, Northern 分析表明它在根中表达量较高而在茎中表达较弱, 而且在茎中铝胁迫并不影响其表达。在根中其在 Azucena 中受铝诱导逐步增强表达, 而在 IR1552 中其受铝诱导表达模式为早期表达下降 (0.5 h) 随后逐步升高。根据其在抗铝品种和铝敏感品种中的表达模式可以推测该氨基酸转运体可能也是铝胁迫影响根细胞间能量和物质的交流进而影响根细胞中能源分配的一种反映。

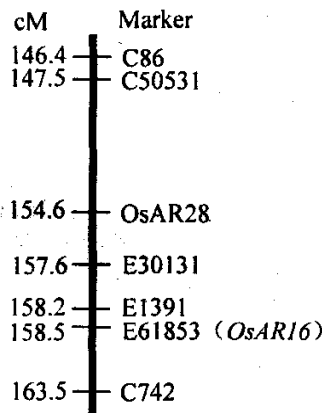


图 4.3 铝诱导差异表达的 EST 的染色体分布图。各 EST 通过序列比较定位

(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>)

根据本章及上一章的结果, 在第一染色体铝抗性 QTL 所在染色体区间筛选到 5 个铝诱导差异表达基因, 这些基因是否与抗铝性有关目前尚无法确定, 但它们可

能是将来分析该铝抗性 QTL 的候选基因。

2.3 OsAR28 全长 cDNA 的克隆

由第三章的分析可知 OsAR28 可能在水稻抗铝反应中起作用。根据 cDNA-AFLP 筛选得到的 181bp 的 TDF 进行 BLAST 比较发现它和一个 BAC 克隆 B1078G07 中的一段完全同源，序列相似性达到 100%。和另两个 BAC 克隆 P0671D01 和 P0445H04 的同源性为 96%。在 BAC 克隆 B1078G07 中以和 TDF 同源的序列为中心向两端各延伸 2kb 共 4kb 的序列用 Genscan 软件预测得到一个 615bp 的 ORF。到 RGP 进行基因组注释得到一个 513bp 的 ORF。根据预测的结果我们在 CDS 的两端各延伸 20bp 设计了一对包含起始密码子和终止密码子的引物。引物序列为 OsAR28-a: 5' GTC CTT ACA TCC GCG ACA AGC 3'; OsAR28-b: 5' CAC CGA GCA ATG GAA TCG AGG 3'。并以胁迫条件下的 cDNA 为模板进行 PCR，得到一条约 500bp 的条带，将该条带克隆并测序发现比 Genescan 预测的 CDS 少一个外显子（图 4.4）而和 RGP 注释的结果一致，为一 513bp 的 CDS。

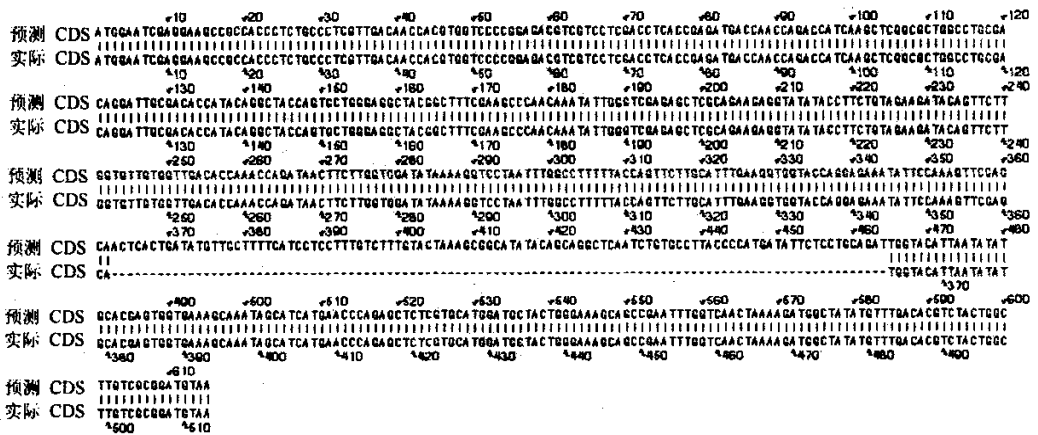


图 4.4 OsAR28 实际 CDS 和预测 CDS 的比较。

进一步和基因组的比较发现，该基因包括 7 个外显子 6 个内含子（图 4.5）。蛋白预测表明该蛋白是一个可溶性蛋白，可能定位于细胞质中（0.65）。该克隆和 BAC B1078G07.5 完全同源。基因组注释结果表明该序列编码一个 513bp 的未知功能的基因。和另一 BAC P0671D01.11 同源性也很高，基因组注释结果表明该段序列编

码一个 1245bp 的未知功能基因。该基因的前 510bp 和我们得到的克隆有 98% 同源性。Southern 杂交也表现出类似的结果 (图 4.6), 进一步以该克隆为探针采用日本晴/Kasalash//日本晴发展的 BC₁F₆ 群体进行 RFLP 定位, 结果定位结果和序列分析的结果一致, 两个拷贝分别定在 154.6cM 和 114.1cM 的位置 (图 2.4; OsAR28-1 即为 OsAR28 本身, 而 OsAR28-2 为与其同源的另一基因)。但 Northern 杂交结果表明大片的基因可能表达丰度较低, 只出现极弱的条带, 铝诱导的趋势不清楚 (未显示结果)。



图 4.5 OsAR28 外显子和内含子结构示意图

该克隆和拟南芥中一个未知蛋白有较高的同源性 (66%), 此外它和酵母 3'→5'外切核酸酶复合体 RRP40 有一定同源性 (45%), 该酶复合体参与 RNA 的加工和降解, 目前在植物中研究较少, 尚未有研究报道它和胁迫相关。根据基因组注释结果将该基因归为未知功能基因。进一步研究其与铝抗性的关系正在本实验室进行。

λ/HindIII Apal BamHI DraI EcoRI EcoRV HindIII XbaI



图 4.6 AS5 在 Azucena 和 IR1552 中的多态性及拷贝数分析结果

第五章 结论及进一步研究展望

1 结论

铝对植物的毒害作用是多方面的, 尽管目前已经有许多研究阐明铝对植物的不同组织器官的影响。但目前尚没有一个系统一致的结论。本文对这一问题进行了研究。从形态上来看, 铝诱导根伸长抑制, 使根变粗变脆, 同时也影响地上部分的生长, 造成植株矮小。从分子的角度来看, 铝诱导基因参与不同的生理生化代谢途径, 如细胞代谢、蛋白代谢、氧胁迫等相关的途径。铝对细胞壁组分的影响是相当明显的, 7个铝诱导基因参与细胞壁组分如木质素、半纤维素、糖蛋白等组分的代谢, 这些铝诱导基因可能是铝毒害产生的应激反应, 也可能是植物防御铝毒害的一系列生理反应。

有机酸排放机制并不在水稻抗铝机制中起主要作用。水稻铝抗性是一个复杂的性状, 它由3个以上效应较小的基因(QTL)控制。并且受加性效应和上位性效应共同影响。在第一染色体C86-C742的区间有一个较稳定存在的铝抗性QTL, 它的贡献率在9%到25%之间, 因不同研究材料而异。在该区间找到5个铝诱导差异表达的EST克隆, 其中两个通过cDNA-AFLP筛选得到, 其它为通过反向Northern分析得到。这5个克隆将是进一步克隆该QTL的候选基因。OsAR28全长cDNA的克隆, 将有助于研究其功能及其与抗铝性的关系。

2 进一步的研究展望

克隆铝抗性基因是研究铝抗性机制并将其应用于改良植物抗铝性的直接有效的途径。针对这一问题可以走两条路:(1)筛选抗铝或铝敏感的突变体并将其克隆。

(2)根据已经定位的铝抗性QTL发展近等基因系最终将其克隆。由于铝抗性由效应较小的基因决定的, 因此两种策略都存在同样的问题, 那就是筛选到的铝抗性或敏感突变体和野生型的铝抗性差异可能并不是很明显。发展的近等基因系也可能差

异不是很大。在做进一步研究时,会影响表型判断的准确性,因此需要寻找一种最佳的胁迫条件,以便尽可能地区分铝抗性的差异。

QTL 区间的铝诱导基因的研究也是克隆铝抗性 QTL 的候选策略,同时也可阐明这些铝诱导基因与铝毒害及早稻抗铝性间的关系。这可以通过在抗性品种中敲除(如 RNAi 等方法)或在敏感品种中增强表达得以展开研究。

参考文献

- 毛传藻,程式华.(1999). 水稻农艺性状 QTL 定位精确性及其影响因素的分析.农业生物技术学报, 7(4):386-394
- 明凤, 梁斌, 姜玉霞, 王敬文, 叶鸣明, 沈大棱.(2002). 铝诱导普通野生稻 (*Oryza Rufipogon* L.) 光合系统相关基因表达.复旦学报(自然科学版), 41(6): 679-683
- 熊毅,李庆远主编. 中国土壤(第二版). 北京: 科学出版社, 1990, 464-574.
- 朱睦元, 黄纯农, 徐阿炳, 袁妙葆.(1990). 大麦耐酸铝愈伤组织变异体的筛选及特性研究. 植物学报, 32(10): 743-746
- Akeson, M.A., Munns, D.N., Burau, R.G. (1989). Absorption of Al^{3+} to phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 986, 33-40.
- Alva, A.K., Edwards, D.G., Asher, C.J., Blamey, F.P. (1986). Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminum monomers in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 959-962.
- Aniol, A. Gustafson, J.P. (1984). Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye, and triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* 26, 701-707.
- Bachem, C.W., Horvath, B., Trindade, L., Claassens, M., Davelaar, E., Jordi, W., Visser, R.G. (2001). A potato tuber-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development. *Plant J.* 25, 595-604.

- Bachem,C.W., Oomen,R.J.F., Visser,R.G. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16, 157-173.
- Bachem,C.W., van der Hoeven,R.S., de Bruijn,S.M., Vreugdenhil,D., Zabeau,M., Visser,R.G. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9, 745-753.
- Baldwin,D., Crane,V., Rice,D. (1999). A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 96-103.
- Basu,A., Basu,U., Taylor,G.J. (1994). Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminium-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminium stress. *Plant Physiol.* 104, 1007-1013.
- Bennet,R.J. Breen,C.M. (1991). The recovery of the roots of *Zea mays* L. from various aluminum treatments: Towards elucidating the regulatory processes that underlie root growth control. *Envir. Exp. Bot.* 31, 153-163.
- Berridge,M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 159-193.
- Blamey,F.P.C. (1983). Effects of aluminium, OH: Al and P: Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Sci.* 136, 197-206.
- Breyne,P. Zabeau,M. (2001). Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 136-142.
- Breyne,P., Dreesen,R., Vandepoele,K., De Veylder,L., Van Breusegem,F., Callewaert,L., Rombauts,S., Raes,J., Cannoot,B., Engler,G., Inze,D., Zabeau,M. (2002). Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 99, 14825-14830.
- Brugmans,B., Del Carmen,A.F., Bachem,C.W., Van Os,H., Van Eck,H.J., Visser,R.G. (2002). A novel method for the construction of genome wide transcriptome maps. *Plant J.* 31, 211-222.
- Caldwell,C.R. (1989). Analysis of aluminum and divalent cation binding to wheat root plasma membrane proteins using terbium phosphoresence. *Plant Physiol.* 91, 233-241.
- Cammue,B.P., Thevissen,K., Hendriks,M., Eggermont,K., Goderis,I.J., Proost,P., Van Damme,J., Osborn,R.W., Guerbette,F., Kader,J.C. Broekaert,W.F. (1995). A potent antimicrobial protein

- from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109, 445-455.
- Clarkson, D.T. (1965). The effect of aluminum and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Anal. Bot.* 29, 309-315.
- Cruz-Ortega, R., Ownby, J.D. (1993). A protein similar to PR (pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol. Plant.* 89, 211-219.
- Cruz-Ortega, R., Cushman, J.C., Ownby, J.D. (1997). cDNA clones encoding 1,3-beta-glucanase and a fimbriin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiol.* 114, 1453-1460.
- de la Fuente, J.M., Ramirez-Rodriguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L. (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276, 1566-1568.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L.V. (1998). Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117, 19-27.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107, 315-321.
- Delhaize, E., Hebb, D.M., Richards, K.D., Lin, J.M., Ryan, P.R., Gardner, R.C. (1999). Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 274, 7082-7088.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Randall, P.J. (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103, 695-702.
- Dellagi, A., Birch, P.R., Heilbronn, J., Lyon, G.D., Toth, I.K. (2000). cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology* 146 (Pt 1), 165-171.
- Ditt, R.F., Nester, E.W., Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10954-10959.
- Eleftheriou, E., Moustakas, M., Fragiskos, N. (1993). Aluminate-induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. *J. Exp. Bot.* 44, 427-436.

- Ezaki,B., Gardner,R.C., Ezaki,Y., and Matsumoto,H. (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122, 657-665.
- Ezaki,B., Gardner,R.C., Ezaki,Y., Kondo,H., Matsumoto,H. (1998). Protective roles of two aluminum (Al)-induced genes, HSP150 and SED1 of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 99-105.
- Ezaki,B., Katsuhara,M., Kawamura,M., Matsumoto,H. (2001). Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 918-927.
- Ezaki,B., Sivaguru,M., Ezaki,Y., Matsumoto,H., Gardner,R.C. (1999). Acquisition of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of the BCB or NiGD11 gene derived from plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 81-87.
- Ezaki,B., Tsugita,S., Matsumoto,H. (1996). Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: Possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiol. Plant.* 96, 21-28.
- Ezaki,B., Tsugita,S., Matsumoto,H. (1996). Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: Possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiol. Plant.* 96, 21-28.
- Ezaki,B., Yamamoto,Y., Matsumoto,H. (1995). Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminum treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* 93, 11-18.
- Foy,C.D. (1988). Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19, 959-987.
- Foy,C.D., Lee,E.H., Coradetti,C.A., Taylor,G.J. (1990). In *Plant nutrition-physiology and applications*, M.L.van Beusilchen, ed. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 381-389.
- Fukuda,T., Kido,A., Kajino,K., Tsutsumi,M., Miyauchi,Y., Tsujiuchi,T., Konishi,Y., Hino,O. (1999). Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 35-40.
- Gallego,F.J., Calles,B., Benito,C. (1998). Molecular markers linked to the aluminum tolerance gene

- Alt1* in rye. *Theor. Appl. Genet.* 97, 1104-1109.
- Grabski, S. Schindler, M. (1995). Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol.* 108, 897-901.
- Habu, Y., Fukada-Tanaka, S., Hisatomi, Y., Iida, S. (1997). Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 516-521.
- Hamel, F., Breton, C., Houde, M. (1998). Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. *Planta* 205, 531-538.
- Hamilton, C.A., Good, A.G., Taylor, G.J. (2001). Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiol.* 125, 2068-2077.
- Hornung, E., Walther, M., Kuhn, H., Feussner, I. (1999). Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4192-4197.
- Horst, W.J. (1995). The role of the apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: A review. *The Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 158, 419-428.
- Horst, W.J., Klotz, F. (1990). Screening soybean for aluminum tolerance and adaptation to acid soil. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*, N. Bassam, M. Dambroth, and B.C. Loughman, eds. (The Netherlands: Kluwer Academic Publication), pp. 353-360.
- Horvath, B.M., Bachem, C.W.B., Trindade, L.M., Oortwijn, M.E.P., Visser, R.G.F. (2002). Expression Analysis of a Family of nsLTP Genes Tissue Specifically Expressed throughout the Plant and during Potato Tuber Life Cycle. *Plant Physiol.* 129, 1494.
- Huang, J.W., Grunes, D.L., Kochian, L.V. (1992). Aluminium effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta* 188, 414-421.
- Humphreys, J.M., Chapple, C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 5, 224-229.
- Johnes, J., Rower, H. (1998). A comparison the efficiency of differential display and cDNA-AFLP as a

- tools for the isolation of differentially expressed parasite genes. *Fundamental and Applied Nematology* 21, 81-88.
- Jones,D.L. Kochian,L.V. (1995). Aluminum Inhibition of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Signal Transduction Pathway in Wheat Roots: A Role in Aluminum Toxicity? *Plant Cell* 7, 1913-1922.
- Kader,J.C. (1997). Lipid transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sci.* 2, 66-70.
- Kennedy,C.W., Smith,W.C.J., Ba,M.T. (1986). Root cation-exchange capacity of cotton cultivars in relation to aluminium toxicity. *J. Plant Nutr.* 9, 1123-1133.
- Khatiwards,S.P., Senadhira,D., Carpena,A.L., Zeigler,S.R., Fernandez,P.G. (1996). Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 93, 738-744.
- Kieffer,F., Elmayer,T., Rubier,S., Simon-Plas,F., Dagher,M.C., Blein,J.P. (2000). Cloning of Rac and Rho-GDI from tobacco using an heterologous two-hybrid screen. *Biochimie* 82, 1099-1105.
- Kim,W.Y., Kim,C.Y., Cheong,N.E., Choi,Y.O., Lee,K.O., Lee,S.H., Park,J.B., Nakano,A., Bahk,J.D., Cho,M.J., Lee,S.Y. (1999). Characterization of two fungal-elicitor-induced rice cDNAs encoding functional homologues of the rab-specific GDP-dissociation inhibitor. *Planta* 210, 143-149.
- Kinraide,T.B. (1991). Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant Soil* 134, 167-178.
- Kinraide,T.B. Parker,D.R. (1987). Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum. *Plant Cell Environ.* 12, 479-487.
- Kobayashi,Y. Koyama,H. (2002). QTL Analysis of Al Tolerance in Recombinant Inbred Lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43, 1526-1533.
- Kochian,L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 237-260.
- Kochian,L.V., Shaff,J.E., Ryan,P.R. (1991). Microelectrode-based investigations into the relationship between Al toxicity and root-cell membrane transport processes. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10, 117-133.
- Kojima,T., Habu,Y., Iida,S., Ogihara,Y. (2000). Direct isolation of differentially expressed genes from a specific chromosome region of common wheat: application of the amplified fragment

- length polymorphism-based mRNA fingerprinting (AMF) method in combination with a deletion line of wheat. *Mol Gen. Genet* 263, 635-641.
- Kristensen,A.K., Brunstedt,J., Nielsen,K.K., Roepstorff,P., Mikkelsen,J.D. (2000). Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Sci.* 155, 31-40.
- Kurepa,J., Walker,J.M., Smalle,J., Gosink,M.M., Davis,S.J., Durham,T.L., Sung,D.Y., Vierstra,R.D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J. Biol. Chem.* 278, 6862-6872.
- Lazof,D.B., Goldsmith,J.G., Rufty,T.W., Linton,R.W. (1994). Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips (a microanalytical study using secondary ion mass spectrometry). *Plant Physiol.* 106, 1107-1114.
- Leffers,H., Nielsen,M.S., Andersen,A.H., Honore,B., Madsen,P., Vandekerckhove,J., Celis,J.E. (1993). Identification of two human Rho GDP dissociation inhibitor proteins whose overexpression leads to disruption of the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 209, 165-174.
- Leubner-Metzger G, Meins FJ. (1999). Functions and regulation of plant b-1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 49-76.
- Li,X.F., Ma,J.F., Matsumoto,H. (2000). Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol.* 123, 1537-1544.
- Lima,M., Miranda Filho,J.B.D., Furlani,P.R. (1995). Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. *Brazilian Journal of Genetics* 18, 579-584.
- Llugany,M., Poschenrieder,C., Barcelo,J. (1995). Monitoring of aluminum-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminum and proton toxicity. *Physiol. Plant.* 93, 265-271.
- Ma,J.F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41, 383-390.
- Ma,J.F., Ryan,P.R., Delhaize,E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of

- organic acids. Trends Plant Sci. 6, 273-278.
- Ma,J.F., Shen,R., Zhao,Z., Wissuwa,M., Takeuchi,Y., Ebitani,T., Yano,M. (2002). Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait Loci for Al tolerance. Plant Cell Physiol. 43, 652-659.
- Ma,J.F., Zheng,S.J., Matsumoto,H., Hiradate,S. (1997). Detoxifying aluminum with buckweat. Nature 390, 569-570.
- MacDonald,T.L. Martin R.B. (1988). Aluminium ion in biological systems. Trends Biol. Sci. 13, 15-19.
- Matsumoto,H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. Int. Rev. Cytol. 200, 1-46.
- Matsumoto,H., Senoo,Y., Kasai,M., Maeshima,M. (1996). Response of the plant root to aluminum stress: Analysis of the inhibition of the root elongation and changes in membrane function. J. Plant Res. 109, 99-105.
- McClelland,M., Mathieu-Daude,F., Welsh,J. (1995). RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. Trends Genet. 11, 242-246.
- Miftahudin,G., Scoles,J., Gustafson,J.P. (2002). AFLP markers tightly linked to the aluminum tolerance gene Alt3 in rye (*Secale cereale L.*). Theor. Appl. Genet. 104, 626-631.
- Minella,E. Sorrells,M.E. (1992). Aluminum tolerance in barley: genetic relationship among genotypes of diverse origin. Crop Sci. 32, 593-598.
- Miyasaka,S.C., Buta,J.G., Howell,R.K., Foy,C.D. (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. Plant Physiol. 96, 737-743.
- Molina,A., Segura,A., Garcia-Olmedo,F. (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. FEBS Lett. 316, 119-122.
- Money,T., Reader,S., Qu,L.J., Dunford,R.P., Moore,G. (1996). AFLP-based mRNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 24, 2616-2617.
- Nguyen,B.D., Brar,D.S., Bui,B.C., Nguyen,T.V., Pham,L.N., Nguyen,H.T. (2003). Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, ORYZA

- RUFIPOGON Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 106, 583-593.
- Nguyen, V.T., Burow, M.D., Nguyen, H.T., Le, B.T., Le, T.D., Paterson, A.H. (2001). Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 102, 1002-1010.
- Nguyen, V.T., Nguyen, B.D., Sarkarung, S., Martinez, C., Paterson, A.H., Nguyen, H.T. (2002). Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. Mol Genet Genomics 267, 772-780.
- Ortiz-Lopez, A., Chang, H., Bush, D.R. (2000). Amino acid transporters in plants. Biochim. Biophys. Acta 1465, 275-280.
- Pan, J., Zhu, M., Chen, H. (2001). Aluminum-induced cell death in root-tip cells of barley. Environ. Exp. Bot 46, 71-79.
- Parker D, Norvell W, Chaney R. (1995). Geochem-PC: a chemical speciation program for IBM-compatibles. In: Loeppert RH, Schwab AP, Goldberg S, eds. Chemical equilibrium and reaction models. Madison, WI: Soil Science Society of America, 253-269.
- Parker, D.R., Kinraide, T.B., Zelazny, L.W. (1989). On the phytotoxicity of polynuclear hydroxy-aluminum complexes. Soil Sci. Soc. Am. J. 53, 789-796.
- Pina-Chable, M.L. Hernandez-Sotomayor, S.M. (2001). Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 65, 45-56.
- Piro, G., Buffo, M., Dalessandro, G. (1994). Membrane-bound glucosamine acetyltransferase in coleoptile segments of *Avena sativa*. Physiol. Plant. 90, 181-186.
- Powell, M.J., Davies, M.S., Francis, D. (1986). The influence of zinc on the cell cycle in the root meristem of a zinc-tolerant and a non-tolerant cultivar of *Festuca rubra* L. New Phytol. 102, 419-428.
- Rengel, Z. (1992). Role of calcium in aluminum toxicity. New Phytol. 121, 499-513.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., Gardner, R.C. (1998). Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 116, 409-418.
- Richards, K.D., Snowden, K.C., Gardner, R.C. (1994). Wali6 and wali7 (Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots). Plant Physiol. 105, 1455-1456.

- Riede, C.R., Anderson, J.A. (1996). Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance in wheat. *Crop Sci.* 36, 905-909.
- Ryan, P.R., Ditomaso, J.M., Kochian, L.V. (1993). Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44, 437-446.
- Ryan, P.R., Reid, R.J., Smith, F.A. (1997). Direct Evaluation of the Ca^{2+} -Displacement Hypothesis for Al Toxicity. *Plant Physiol.* 113, 1351-1357.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual.* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchez, P.A., Salinas, J.G. (1981). Low-input technology for managing oxisols and ultisols in tropical America. *Adv. Agron.* 34, 279-406.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. (1996). Ligin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiol. Plant.* 96, 193-198.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Ma, J., Matsumoto, H. (1997). Early events induced by aluminum stress in elongating cells of wheat root. *Soil. Sci. Plant Nutri.* 43, 1009-1014.
- Sasaki, T., Ezaki, B., Matsumoto, H. (2002). A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced by aluminum and inhibitors of calcium flux in wheat. *Plant Cell Physiol.* 43, 177-185.
- Schwarzerova, K., Zelenkova, S., Nick, P., Opatrny, Z. (2002). Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant Cell Physiol.* 43, 207-216.
- Simoes-Araujo, J.L., Rodrigues, R.L., de, A.G.L., Mondego, J.M., Alves-Ferreira, M., Rumjanek, N.G., Margis-Pinheiro, M. (2002). Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules. *FEBS Lett.* 515, 44-50.
- Sivaguru, M., Horst, W.J. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116, 155-163.
- Sivaguru, M., Baluška, F., Volkmann, D., Felle, H.H., Horst, W.J. (1999). Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119, 1073-1082.
- Snowden, K.C., Gardner, R.C. (1993). Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 103, 855-861.

- Snowden, K.C., Richards, K.D., Gardner, R.C. (1995). Aluminum-induced genes (induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips). *Plant Physiol.* 107, 341-348.
- Suarez, M.C., Bernal, A., Gutierrez, J., Tohme, J., Fregene, M. (2000). Developing expressed sequence tags (ESTs) from polymorphic transcript-derived fragments (TDFs) in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genome* 43, 62-67.
- Tabuchi, A., Matsumoto, H. (2001). Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. *Physiol. Plant.* 112, 353-358.
- Tang, Y., Sorrels, M.E., Kochian, L.V., Garvin, D.F. (2000). Identification of RFLP Markers linked to barley aluminum tolerance gene *Alp*. *Crop Sci.* 40, 778-782.
- Taylor, G.J. (1988). The physiology of aluminum tolerance. In *Metal Ions in Biological Systems: Aluminum and its Role in Biology*, H. Siegel and A. Sigel, eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 123-198.
- Taylor, G.J., Hunter, D.B., Stenphens, J. (1996). Direct measurement of Al transport across the plasma membrane of *Chara corallina*. Proceedings of the 4th International Symposium on Plant-Soil Interactions at low pH.
- Tice, K.R., Parker, D.R., DeMason, D.A. (1992). Operationally defined apoplastic and symplastic aluminium fractions in root tips of aluminium-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100, 309-318.
- Van, H.L., Kuraishi, S., Sakurai, N. (1994). Aluminum-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. *Plant Physiol.* 106, 971-976.
- Wu, J., Maehara, T., Shimokawa, T., Yamamoto, S., Harada, C., Takazaki, Y., Ono, N., Mukai, Y., Koike, K., Yazaki, J., Fujii, F., Shomura, A., Ando, T., Kono, I., Waki, K., Yamamoto, K., Yano, M., Matsumoto, T., Sasaki, T. (2002). A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *Plant Cell* 14, 525-535.
- Wu, P., Liao, C.Y., Hu, B., Yi, K.K., Jin, W.Z., Ni, J.J., He, C. (2000). QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1295-1303.
- Wu, P., Zhao, B., Yan, J., Luo, A., Wu, Y., Senadhihra, D. (1997). Genetic control of seedling tolerance to

aluminum toxicity in rice. *Euphytica* 97, 289-293.

Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. (2001). Lipid Peroxidation Is an Early Symptom Triggered by Aluminum, But Not the Primary Cause of Elongation Inhibition in Pea Roots. *Plant Physiol.* 125, 199-208.

Yoshida, S., Forno, D., Cock, J., Gomez, K. (1976). *Laboratory manual for physiological studies of rice.* (Manila, Philippines: International Rice Research Institute).

Abstract

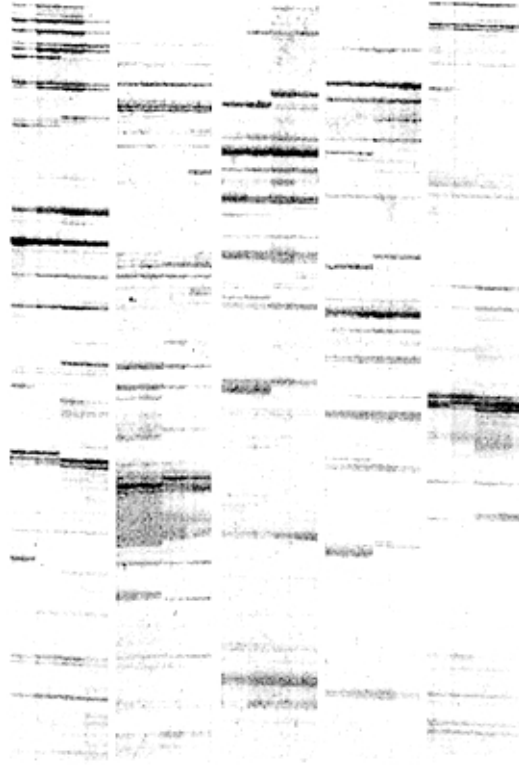
Aluminum (Al) toxicity is a major factor limiting plant growth on acid soil. Al toxicity inhibits root growth, and then limits plant from absorbing water and other nutrients, and consequently reduces plant growth. In this study, an upland tropical japonica rice Azucena and a lowland indica rice IR1552 were used for screening Al induced gene. A recombinant inbred line (RIL) population derived from a cross between IR1552 and Azucena were used for detecting QTLs for tolerance to Al toxicity at different seedling stages. Comparative mapping analysis was carried out for the QTLs reported for rice tolerance to Al toxicity from different genetic populations. cDNA-AFLP was used for identifying Al induced genes. All of the 34 TDFs were aligned to integrated genetic and physical map by sequence alignment or genetic mapping. ESTs mapped at the detected QTL interval were screened by reverse Northern. The results were summarized as follows:

1. QTLs for Al tolerance were identified by using the RIL population described as above. Three QTLs were detected after both one week and two weeks of Al to stress at the interval RZ801~RG381, RZ698~ACA-CTA1 and ACA-CTT1~RM117 on chromosome 1, 9 and 12, respectively. The 3 QTLs accounted about 39% and 35% of total variation in root length after one week Al stress treatment and two weeks stress treatment, respectively. The QTL on chromosome 1 explained about 15% and 9% of phenotypic variation after 1 and 2 weeks of Al stress with positive allelic effect from Azucena. Positive allele of QTLs on chromosome 9 is from IR1552 which explained about 13% and 15% of total phenotypic variation. The QTL on chromosome 12 explained about 10% and 11% of phenotypic variation with positive allele(s) from Azucena. By integrated mapping based on rice genetic map, an identical QTL interval between C86 and C742 were found on chromosome 1 from 4 different genetic populations.

2. Thirty four Al induced TDFs were screened by cDNA-AFLP, including 33 unique genes. Of 33 unique genes, 19 showed homology with known genes. Seven of the 19 genes are involved in cell wall components metabolism, 3 for cellular metabolism, 3 for protein metabolism and 6 for secondary metabolism, oxidative stress and other metabolic pathways. The result indicates that Al toxicity affected different physiological and biochemical pathways.

3. Two Al induced genes (OsAR16, OsAR28) located near the QTL interval on chromosome 1 were singled out by cDNA-AFLP. According to the transcription map, 83 ESTs located between C86 and C742 were screened. Four Al induced ESTs were confirmed by Northern blot analysis. The 4 genes are for amino acid transport protein (C50531), non-specific lipid transfer protein (E30131), Rho GDP-dissociation inhibitor (E1391) and Ubiquitin-like protein SUMO-1 (E61853). One of the 4 ESTs (E61853) showed homology with OsAR16. Full length CDS of OsAR28 was obtained by PCR according to the predicted results of bioinformatics. This CDS was 513bp, which showed homology (98%) with first 510 bp of another predicted gene in chromosome 1. Blast results showed that it was homology with an exosome complex exonuclease (45% in Blastn). Further work need to be performed for confirming if this gene show any relationship with Al tolerance in rice.

Keywords: Aluminum toxicity Candidate gene cDNA-AFLP EST QTL Rice (*Oryza sativa* L.)



附图 1. cDNA-AFLP 电泳图。每 4 个泳道为一对引物的扩增结果, 分别为 Azucena 处理、Azucena CK、IR1552 处理、IR1552 CK。

博士期间发表的文章

- Mao C.Z., Yi K.K., Yang L., Zheng B.S., Wu Y.R., Wu P*. 2003, Identification of Al-regulated genes in rice. J Exp Bot submitted
- Mao C.Z., Yang L., Zheng B.S., Wu P*. 2003. Compare mapping QTL for Al-tolerance and identification of positional Al-induced genes 整理中
- Yang L., Zheng B.S., Mao C.Z., Yi K.K., Wu Y.R., Wu P*. 2003. cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit Gene (accepted)
- Yang L., Zheng B.S., Mao C.Z., Yi K.K., Liu F.Y., Wu Y.R., Wu P*. 2003. Analysis of gene expression during enhanced seminal root elongation of rice under upland condition by cDNA-AFLP. 植物生理与分子生物学. 29(1): 65-70
- Yang L., Zheng B.S., Mao C.Z., Yi K.K., Wu Y.R., Wu P*. Tao Q.N. 2003 seminal, adventitious and lateral root growth and physiological responses in rice to upland conditions. Journal of Zhejinag University: Science -----in press
- Zheng B.S., Yang L., Zhang W.P., Mao C.Z., Wu Y.R., Yi K.K., Liu F.Y., Wu P*. QTLs and candidate genes mapping for rice root traits and comparative analysis across three genetic populations under water limitation Theor. Appl. Genet. 2003 (accepted)
- 程式华, 毛传澡, 占小登 等. 2001. 籼粳交 DH 群体和 RIL 群体的构建及籼粳分化. 中国水稻科学, 15(4):257-260