

研究报告

Research Article

水稻 *Dof* 基因家族的组织表达谱及胁迫诱导表达特征分析

周淑芬[✉], 颜静宛[✉], 刘华清[✉], 林智敏[✉], 陈睿[✉], 杨绍华[✉], 王锋[✉]

福建省农业科学院生物技术研究所, 福建省农业遗传工程重点实验室, 福州, 350003

✉ 通讯作者: wf@fjage.org ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第60篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0060

收稿日期: 2012年08月06日

接受日期: 2012年10月12日

发表日期: 2012年12月16日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012年第10卷第6期635-643页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

周淑芬等, 2012, 水稻 *Dof* 基因家族的组织表达谱及胁迫诱导表达特征分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.60 pp.1438-1446 (doi: 10.3969/mpb.cn.2012.10.0060)

引用格式(英文):

Zhou et al., 2012, Transcriptional Profiling Analysis of *OsDof* Gene Family in Various Rice Tissues and Their Expression Characteristics under Different Stresses, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.60 pp.1438-1446 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0060)

摘要 基因的表达与调控是一个复杂的分子网络, 受许多转录因子的时空表达调节。*Dof* 蛋白是一类植物特有的转录因子, 在多种植物特有生物学过程中起着关键的调控作用。水稻全基因组中发现含 30 个 *Dof* 基因, 但对其绝大部分基因的功能尚缺少了解。本研究对 30 个水稻 *Dof* 基因及启动子区进行生物信息学分析, 发现 *OsDof* 基因上游 1.5 kb 启动子区含有大量的光反应、组织器官表达、植物激素反应及逆境反应等重要的顺式作用元件。进一步通过荧光定量 RT-PCR 技术分析, 结果表明了大部分 *OsDof* 基因呈多器官较低丰度表达, 少部分为器官优势或高丰度表达。另外, 与未胁迫处理的水稻幼苗相比较, 28 个 *OsDof* 基因的表达受光、ABA、NaCl 或 PEG 等胁迫处理的调节, 其中 27 个 *OsDof* 基因可以对 2 种或 2 种以上的胁迫条件产生响应, 表明这些成员可能在生理水平上参与不同胁迫相关信号途径之间的交互作用。

关键词 旱稻; 抗旱性; 根系性状; 游离脯氨酸含量; SOD 酶活性

Transcriptional Profiling Analysis of *OsDof* Gene Family in Various Rice Tissues and Their Expression Characteristics under Different Stresses

Zhou Shufen[✉], Yan Jingwan[✉], Liu Huaqing[✉], Lin Zhimin[✉], Chen Rui[✉], Yang Shaohua[✉], Yang Shaohua[✉]

Key Laboratory of Agricultural Genetic Engineering of Fujian Province, Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, 350003

✉ Corresponding author, wf@fjage.org ✉ Authors

Abstract Regulation of gene expression is a complex molecular network controlled by temporal and spatial expression of many transcription factors (TF). *Dof* proteins are a family of plant-specific transcription factors, which play important roles in many biological processes restricted to the plants. 30 of *Dof* genes were found in the rice (*Oryza sativa*) genome, but few of them have been functionally characterized. In this study, We performed a bioinformatics analysis of 30 *OsDof* genes and their 5' flanking promoter sequences. Four kinds of cis-elements were detected to be overrepresented in the 1.5 kb upstream regions of *OsDofs*, including light-responsive elements, tissue-expressed elements, hormone-responsive elements and stress-responsive elements. Furthermore, qRT-PCR analysis revealed that most *OsDof* genes were low and multiple-organ expression, and few of them were highly expressed or tissue-preferential expression. In addition, Compared to the control without stress treatment, 28 *OsDof* genes were regulated by the stress treatments of light, ABA, NaCl or PEG. Out of them, 27 *OsDof* genes were responsive to two or more types of the above stress treatments, which suggested that these genes should involve in cross-talking among pathways of different signal transduction.

Keywords Rice (*Oryza sativa* L.); *Dof* gene family; Cis-element; Expression and regulation; Stress

转录因子(transcription factor, TF)是基因表达调控网络中的一个重要调节子, 它与基因调控区的顺式作用元件特异性结合, 调节着基因转录的起始、基因表达的程度、基因的时空特异性表达及应答外界环境的胁迫。根据转录因子与DNA结合的结构域

特点, 可将它们分为若干家族, *Dof*蛋白是一类植物特有的转录因子, 因其N末端含有一个单指指结构, 因此被称为Dof(DNA binding with one finger)。Dof蛋白通常包括两个结构域, 即N末端的Dof结构域和C末端的转录调节域(Yanagisawa, 2002)。Dof

结构域由 52 个氨基酸组成且含有一个保守的 CX2CX21CX2C 基序, 其中的 4 个 Cys 残基与 1 个 Zn^{2+} 共价结合形成一个单锌指 C2C2 结构域(Umemura et al., 2004)。Dof 结构域中的单锌指及锌指旁边 C 侧链状结构中某些特定氨基酸均能与 DNA 结合, 这些变动的氨基酸决定了 Dof 能与不同的 DNA 序列结合, 调控多种基因的表达(Yanagisawa, 2002)。另外, Dof 蛋白的调节域位于较不保守的 C 末端, 也决定了 Dof 蛋白的功能具有多样性。

研究表明, Dof 蛋白在植物生长发育过程中参与了多种生物学过程。如玉米 Dof1 和 Dof2 通过调控 *PEPC* 等多种基因的表达调控碳代谢(Yanagisawa, 2000), 拟南芥中的 DAG1 和 DAG2 做为一对功能相反的基因调控种子萌发基因的表达(Gualberti et al., 2002), 玉米的 PBF 和其在小麦、大麦中的同源蛋白 BPBF 和 WPBF 调控胚乳特异性贮藏蛋白基因的表达(Vicente-Carbajosa et al., 1997; Mena et al., 2002; Dong et al., 2007), 烟草的 Dof 蛋白 NtBBF1 激活在顶端分生组织和微管组织中受生长素诱导表达的植物癌基因 *rolB* 的表达(Baumann et al., 1999), 南瓜 AOBP 抑制受生长素诱导表达的抗坏血酸氧化酶基因的表达(Kisu et al., 1998), 拟南芥 OBP1 调控植物防御基因的表达(Chen et al., 1996)。

自从 Yanagisawa 和 Izui (1993) 在玉米中鉴定了第一个 Dof 蛋白 MNB1 以来, 越来越多的 Dof 基因在不同植物中被预测或鉴定出来。通过全基因组测序及比较基因组学分析, 目前已在拟南芥和水稻基因组中分别预测存在 36 个和 30 个 Dof 基因(Lijavetzky et al., 2003), 大麦中有 26 个(Moreno-Risueno et al., 2007), 大豆中有 28 个(Kushwaha et al., 2011), 小麦中有 31 个(Chen et al., 2005)。但是, 它们当中大部分基因的功能尚未被阐述。

本研究在对 30 个 *OsDof* 基因及启动子区进行生物信息学分析的基础上, 利用荧光定量 RT-PCR 技术分析了水稻根、茎、叶、种及幼苗中 *OsDof* 基因的表达, 并探讨了黄化、ABA、NaCl 和 PEG 处理对幼苗中 *OsDof* 基因表达的影响, 为进一步阐述它们的生物学功能提供线索。

1 结果与分析

1.1 *OsDof* 基因家族的生物信息学分析

通过转录因子数据库 PlnTFDB 收集 30 个水稻 Dof 基因序列, 它们分布于水稻 11 条染色体中(11 号染色体除外), 1 号和 3 号染色体包含的数目最多, 各

含有 6 个 Dof 基因(表 1)。*OsDof* 基因结构较为简单, 基因长度 528~2 583 bp, 其中 16 个基因(或 53.3%)为单外显子, 9 个(30%)含有 1 个内含子; 4 个基因(*OsDof8*, *OsDof17*, *OsDof18* 和 *OsDof28*)存在不同的转录本, 即选择性剪切。*OsDof* 基因所编码的蛋白质长度为 175~551 个氨基酸, Dof 结构域位于其 N 端的 20AA-171AA 之间, GO 分析显示它们均为 DNA 结合蛋白。

使用 PlantCARE 数据库(Lescot et al., 2002)对 *OsDof* 基因翻译起始密码子上游约 1.5 kb 的侧翼序列进行顺式作用元件分析, 发现它们除了具有 TATA-motif、CAAT-motif 等典型的真核生物顺式调控元件外, 还含有 60 多个其他重要的调控元件, 主要参与光反应、组织器官表达、激素反应、逆境反应等 4 大生理现象的调控(表 2)。光反应元件涉及的种类和数目最多, 分布于每个 *OsDof* 基因的上游调控区, 而且 G-box 和 SP1 元件存在于大部分水稻 Dof 基因上游调控区。激素反应元件包括了 ABA、GA、SA、MeJA 及乙烯和生长素反应元件, 分别存在于 10、10、8、16、3、5 个 *OsDof* 基因上游启动子区, 组织表达元件中有 17 个 *OsDof* 基因发现有含有种子表达元件 Skn-1 或 GCN4, 还发现 7 个 *OsDof* 基因上游启动子区仅含有光反应元件, 而不含组织器官表达、激素反应、胁迫反应元件。以上结果暗示了 *OsDof* 基因表达的多样性, 可能参与多种胁迫的表达调控。

1.2 *OsDof* 基因家族的组织表达谱

通过 EST 数据库查询, 共获得 21 个 *OsDof* 基因在各种不同组织器官中的 EST 序列, 除 *OsDof6*、*OsDof9* 和 *OsDof26* 外, 其余 18 个基因在 3 个或 3 个以上组织或器官中同时含有 EST, 表明了大部分 Dof 基因趋向于多器官表达, 暗示了 Dof 基因广泛参与水稻各器官生长发育的表达调控。(图 1)

利用荧光定量 RT-PCR 技术进一步分析 *OsDof* 基因家族各个成员在粳稻日本晴植株的幼苗、根、茎、叶、种等组织中的表达。其中, 根、茎、叶等组织取材于抽穗后期, 种子取材于授粉后 5~10 d。结果显示除了 *OsDof9* 在检测的组织中检测不到表达信号外, 其它 *OsDof* 基因能在 1 个或多个组织中检测到不同水平的表达, 其中 22 个基因在三个及以上的组织中表达。依表达水平的高低, 可将 *OsDof* 基因家族成员分为低、中、高丰度表达 3 大类: 低丰度表达基因的相对表达量为 0~5, 包括 11 个成员(图 1A);

表1 定量 RT-PCR 引物序列

Table 1 The list of gene specific primers of the *OsDof* genes for qRT-PCR

编号 <i>Code</i>	基因名称 <i>Gene locus</i>	上游引物序列(5'-3') Primer sequences forward (5'-3')	上游引物序列(5'-3') Primer sequences reverse (5'-3')	扩增大小(bp) Amplicon size (bp)	Tm (°C)
<i>OsDof1</i>	<i>Os01g09720</i>	CGGCAGGTGGTGGAGGATTGG	GGCACGCCTTGCAGAAGTGGC	144	60
<i>OsDof2</i>	<i>Os01g15900</i>	CACTGTGGGTTCCCAAGACG	AAGAGCACGAGCAGGACGAG	173	64
<i>OsDof3</i>	<i>Os01g17000</i>	GCATTGCCTTCCCTACTGG	GGGCAGGGTATCCCATCTTT	131	60
<i>OsDof4</i>	<i>Os01g48290</i>	AAGGTGATCCAGCCCGACG	AGGCGGATGCGGATGAGG	78	64
<i>OsDof5</i>	<i>Os01g55340</i>	CGGCGGGTTC AAGCTGTTC	CCTCCGGTTCAACCTTCTCCC	110	60
<i>OsDof6</i>	<i>Os01g64590</i>	CCTGACATGGTCCTGGAAGGC	GGTGGTTCAGAACTTGGCGTA	130	64
<i>OsDof7</i>	<i>Os02g15350</i>	GGCGAAGCTGTGATGACGA	TCATGGCCGAGCTGCTGTC	187	60
<i>OsDof8</i>	<i>Os02g45200</i>	GGCGATGGAGTTGCTGAGGAG	GAGCACGGTCTGAGCTTGTTC	163	60
<i>OsDof9</i>	<i>Os02g47810</i>	AGCACGGGATGGGGTCGT	GCACTTGAGCGGCTGGTCG	125	64
<i>OsDof10</i>	<i>Os02g49440</i>	CACCATCGCCGTCATAAACC	CCTGCGCTGCGAAGCTGAA	170	60
<i>OsDof11</i>	<i>Os03g07360</i>	CGAGATGCCAGTCGGTTTGT	CACATGGCTCCTCCGTTTCAT	138	60
<i>OsDof12</i>	<i>Os03g16850</i>	CCGATGTACCAACTGGGACTGG	CCGCCATGTACTGCCTCTGC	178	64
<i>OsDof13</i>	<i>Os03g38870</i>	CCTTCATGCACATGGCTGGT	CGCCGCTGTTGAGGTTACTG	159	64
<i>OsDof14</i>	<i>Os03g42200</i>	GTGGGAGGGAGTAGCAGGGAG	ATGGGGACGTTGCGGAGG	155	60
<i>OsDof15</i>	<i>Os03g55610</i>	CAACACGGTCGGGATGGA	CCGTTGGGAGTGGGCAAG	114	64
<i>OsDof16</i>	<i>Os03g60630</i>	CGCCAATGTCCGGCATTAC	TGAGCGTTGCTGTCTCCATC	151	64
<i>OsDof17</i>	<i>Os04g47990</i>	CAGGTTGCTGTTCCCGTTTCG	CGCCGATCATGCCGTTCCA	194	60
<i>OsDof18</i>	<i>Os04g58190</i>	CGGCTTCCCGTTCCTCAGTG	GCGATGTCGGCGAAGTTGTC	177	60
<i>OsDof19</i>	<i>Os05g02150</i>	GCAGAGCTTCCCGTTCTTCC	TGATGGCATCGCATGGTG	163	60
<i>OsDof20</i>	<i>Os05g36900</i>	AACTTCAGCGTGGACCAGA	CGCGTTGCACCAGACAT	186	64
<i>OsDof21</i>	<i>Os06g17410</i>	CCTTGCTGCTGCTGTTTC	TTGGGCTGCGCCGTGAA	166	64
<i>OsDof22</i>	<i>Os07g13260</i>	CCCGCACTTCCCGTTCCTTAG	TCGTCCATCTTACCGAGGC	195	64
<i>OsDof23</i>	<i>Os07g32510</i>	GCGTTCGAGATGCACCAGCAG	CACGATGGAGCCGGACAGGA	171	60
<i>OsDof24</i>	<i>Os07g48570</i>	CATCTTCAGTTTGGCCCTTCA	TTGTCACTCCTTGC GGTTTG	178	60
<i>OsDof25</i>	<i>Os08g38220</i>	TCGTCTCTTCTCTGTCATCC	AGCTTCGGTCTGCTCTTGG	162	60
<i>OsDof26</i>	<i>Os09g29960</i>	GGCACCAGAAGCCACAACCA	CGAACGGGCTCGTGTCCAG	137	64
<i>OsDof27</i>	<i>Os10g26620</i>	GTCCAGTCTCAGGCCATCTCAT	ATCGTCTTCGGCACCCACA	152	60
<i>OsDof28</i>	<i>Os10g35300</i>	AGGCGGCTACAGCATCG	GACCGGGCATGTATCTT	185	64
<i>OsDof29</i>	<i>Os12g38200</i>	GGAGGAGCACGGCACCAACA	CGACGATGAGCTGAACCCTGAC	133	64
<i>OsDof30</i>	<i>Os12g39990</i>	CGAGGGACACCAAGTTCTG	GCCGATGGGGACGTTGC	119	64

表2 调控元件的种类及数目

Table 2 Types and numbers of cis-elements

元件类别 Types of cis-elements	光反应元件 Elements for light reaction	组织表达元件 Elements for tissue expression	激素反应元件 Elements for hormone response	逆境反应元件 Elements for stress response
元件种类 Types of cis-element	32	12	11	7
元件数目 Numbers of cis-element	293	100	81	45

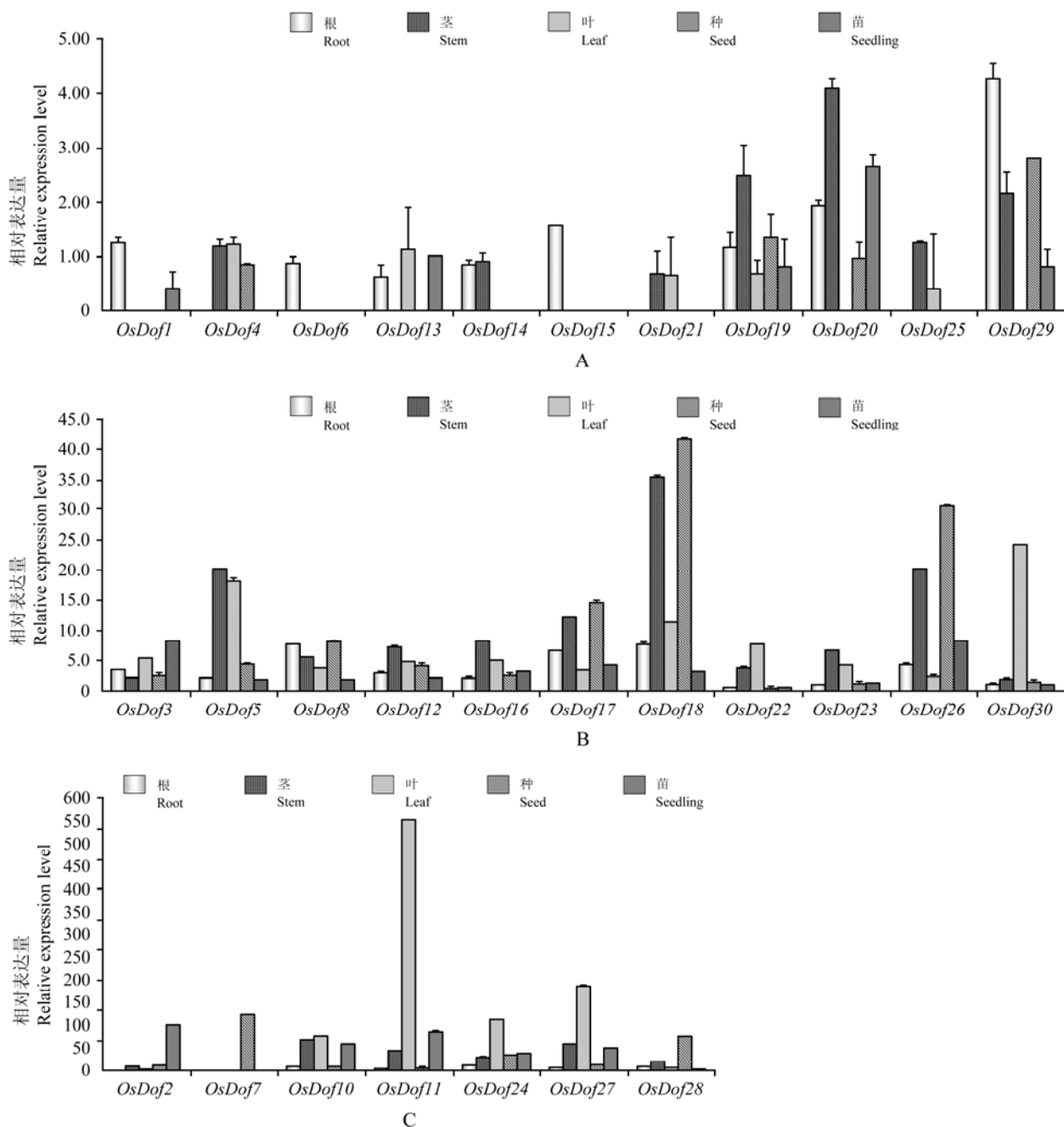


图1 荧光定量PCR分析*OsDof*基因的组织表达谱

注: A: 低丰度表达*OsDof*基因; B: 中丰度表达*OsDof*基因; C: 高丰度表达*OsDof*基因

Figure 1 Tissue-expression patterns of the *OsDof* genes by qRT-PCR analysis

Note: A: Low abundance expression of the *OsDof* genes; B: Middle abundance expression of the *OsDof* genes; C: High abundance expression of the *OsDof* genes

中丰度表达基因的相对表达量为 5~50, 包括 11 个成员(图 1B); 高丰度表达基因的相对表达量为 50~550, 包含 7 个成员(图 1C)。可见, 大部分 *OsDof* 基因在各器官中表达丰度较低。在这些表达的 *OsDof* 基因中, 我们发现了 9 个器官特异或优势表达基因, 包括根中特异表达 *OsDof6* 和 *OsDof15*, 种子特异

表达 *OsDof7* 和种子中优势表达 *OsDof28*, 叶中优势强表达 *OsDof11*, *OsDof24*, *OsDof27* 和 *OsDof30*, 苗中优势表达 *OsDof2*。进一步对这些器官特异或优势表达 *OsDof* 基因进行生物学功能分析, 有助于我们理解 *Dof* 基因家族在植物生长发育中的特异性调控机制。

1.3 *OsDof*基因家族在黄化幼苗中的表达

顺式调控元件分析发现30个*OsDof*基因启动子区富含光反应元件, 为了进一步了解*OsDof*基因表达对光信号的反应, 我们利用定量RT-PCR比较了30个*OsDof*成员在水稻幼苗中黑暗与光照(16 h光/8 h暗)两种培养条件下的表达差异。结果显示(表3), 25个*OsDof*基因在黑暗条件下, 幼苗叶片中的表达水平高于其在光照条件下的表达, 包括5个高丰度

表达、8个中丰度表达和12个低丰度表达(图2)。在5个高丰度表达基因中, *OsDof2*、*OsDof11*和*OsDof27*这三个基因在光照条件下表达丰度高, *OsDof24*和*OsDof5*则分别为中丰度和低丰度表达, 但它们在暗诱导下表达提高的倍数均较高。中丰度诱导表达基因中, 除*OsDof26*基因在光照下表达水平为中丰度, 其它基因均为低丰度表达。*OsDof9*、*OsDof25*、*OsDof10*、*OsDof3*和*OsDof17*五个基因在光照与暗处理

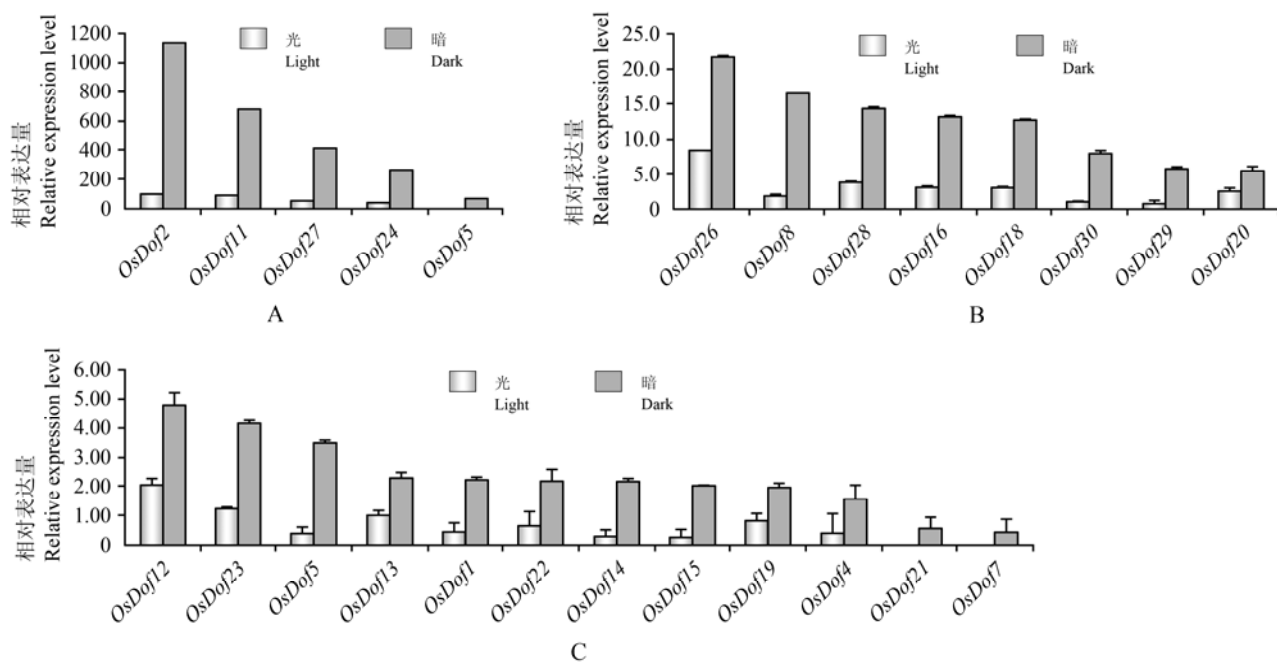


图2 荧光定量PCR分析*OsDof*基因在水稻黄化苗中的表达

注: A: 暗处理下高表达*OsDof*基因; B: 暗处理下中丰度表达*OsDof*基因; C: 暗处理下低丰度表达*OsDof*基因

Figure 2 Expression analysis of *OsDof* gene in rice etiolated seedling by qRT-PCR

Note: A: High expression of the *OsDof* genes under dark treatment; B: Middle abundance expression of the *OsDof* genes under dark treatment; C: Low abundance expression of the *OsDof* genes under dark treatment

下, 其表达水平没有发生明显变化。

1.4 不同胁迫下*OsDof*基因家族的表达特征

顺式作用元件分析发现部分*OsDof*基因上游调控区含有激素和逆境胁迫反应相关的调控元件, 本实验对水稻幼苗分别进行了200 μ mol/L ABA、200 mmol/L NaCl和25% PEG三种胁迫处理, 定量RT-PCR分析各个*OsDof*基因在各种处理及未经处理幼苗中的表达水平。结果如表3所示: 7个*OsDof*基因受ABA诱导表达上调, 9个基因表达下调, 其中*OsDof2*、*OsDof27*、*OsDof24*和*OsDof11*诱导上下调表达水平高, *OsDof12*和*OsDof3*诱导上下调倍数高(图3A)。在NaCl逆境下, 8个基因的表达受到诱导,

10个基因表达受到抑制, *OsDof27*、*OsDof11*、*OsDof2*、*OsDof24*和*OsDof5*诱导表达丰度及上调倍数较高(图3B)。与ABA和NaCl处理不同的是, 在25%的PEG处理中大部分基因(21/30)的表达受到诱导, 仅有*OsDof11*、*OsDof2*和*OsDof10*三个基因的表达受到抑制, 这三个基因表达丰度高且下调倍数高; 在上调表达基因中也有4个基因表达丰度高且上调倍数高(图3C)。以上结果表明了大量的*OsDof*基因参与了ABA、NaCl和PEG的表达调控, 尤其是在PEG胁迫下, 大量基因受到诱导表达。

比较各个*OsDof*基因在ABA、NaCl、PEG及暗处理(黄化苗)等4种胁迫条件下的表达水平(表3), 结果显示: 与未处理的水稻幼苗相比, *OsDof9*和*OsDof25*

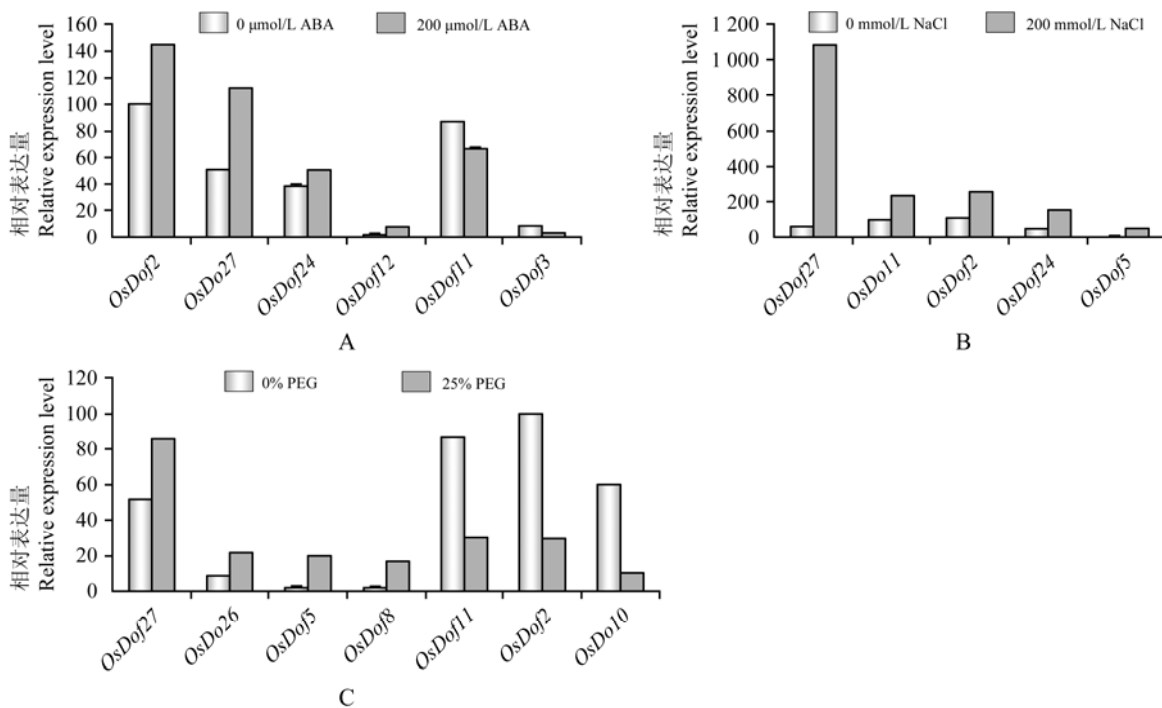


图3 荧光定量分析*OsDof*基因在ABA, NaCl和PEG胁迫下的表达

注: A: ABA处理下部分基因的定量RT-PCR分析; B: NaCl处理下部分基因的定量RT-PCR分析; C: PEG处理下部分基因的定量RT-PCR分析

Figure 3 Expression analysis of *OsDof* gene under stress treatments of ABA, NaCl and PEG by qRT-PCR

Note: A: qRT-PCR analysis of some *OsDof* genes under ABA treatment; B: qRT-PCR analysis of some *OsDof* genes under NaCl treatment; C: RT-PCR analysis of some *OsDof* genes under PEG treatment

的表达水平在处理组与未处理组之间没有发生变化, *OsDof10*仅在25% PEG的诱导下表达水平下降, 其它27个*Dof*基因表达同时受2种或2种以上处理的影响。在27个受2种及以上胁迫影响的基因中, 共有11个基因的表达同时受ABA、NaCl、PEG和暗培养四种处理影响, 其中*OsDof5*和*OsDof27*的表达水平均表现为上升。值得注意的是, 在PEG和暗处理下, 大量*OsDof*基因表达上升, 其中21个基因在这两处理下同时表现为上调, 这是一个很有趣的现象, 有待进一步深入研究。

2讨论

基因的组织表达谱常常可以暗示该基因在相应表达部位的生物学功能(Ray et al., 2007)。EST数据及定量RT-PCR结果均表明大部分*OsDof*基因在各个组织或器官中都有不同程度的表达, 表明这些基因可能在水稻生长的各个发育时期都发挥功能。本研究发现了9个器官特异或优势表达基因, 它们可能在水稻生长发育的某一个或某几个发育阶段起着比较特异的功能。目前在水稻中已有2个特异或优势表达基因的生物学功能被阐述, 分别为种子

特异表达基因*OsDof7* (RPBF)和叶中优势表达基因*OsDof11*, 前者可能通过赤霉素信号途径在水稻种子萌发过程中起着重要的调控作用(Washio, 2001), 后者在长日照条件下通过调控*Hd3a*和*OsMADS14*的表达水平促进水稻的开花(Li et al., 2009)。本研究鉴定的另7个特异或优势表达*OsDof*基因可能在它们所表达的器官发育中起着重要的作用, 有待进一步研究它们的功能。(表3)

许多转录因在植物响应干旱、激素、高盐、病原等胁迫反应中起重要作用, *Dof*蛋白做为转录激活子或抑制子参与调节植物的光、激素及防御反应等(Shinozaki et al., 2003), 调查水稻*Dof*基因的逆境响应表达谱可以为我们的研究相关基因在逆境胁迫下的生物学功能提供一些有价值的线索。定量RT-PCR分析*OsDof*基因在水稻幼苗期正常生长、暗处理、ABA、NaCl和PEG等胁迫条件下的表达, 结果显示除了2个不受任何胁迫的影响和1个只受PEG的调节外, 其它27个*OsDof*基因的表达水平在2种及以上胁迫条件下发生了不同程度的上升或下降, 暗示了*OsDof*基因广泛参与各种胁迫的应答反应, 而且多

表3 *OsDof* 基因在四种处理下的表达响应

Table 3 Expression responses of the *OsDof* genes under four treatments of abiotic stresses

基因	ABA	NaCl	PEG	Dark	基因	ABA	NaCl	PEG	Dark	基因	ABA	NaCl	PEG	Dark
Gene					Gene					Gene				
<i>OsDof1</i>	↓	↓	↑	↑	<i>OsDof11</i>	↓	↑	↓	↑	<i>OsDof21</i>	-	-	↑	↑
<i>OsDof2</i>	↑	↑	↓	↑	<i>OsDof12</i>	↑	-	↑	↑	<i>OsDof22</i>	↑	↓	↑	↑
<i>OsDof3</i>	↓	↓	-	-	<i>OsDof13</i>	↓	↓	↑	↑	<i>OsDof23</i>	-	↑	↑	↑
<i>OsDof4</i>	-	-	↑	↑	<i>OsDof14</i>	-	-	↑	↑	<i>OsDof24</i>	↑	↑	-	↑
<i>OsDof5</i>	↑	↑	↑	↑	<i>OsDof15</i>	-	-	↑	↑	<i>OsDof25</i>	-	-	-	-
<i>OsDof6</i>	-	-	↑	↑	<i>OsDof16</i>	-	-	↑	↑	<i>OsDof26</i>	↓	↑	↑	↑
<i>OsDof7</i>	-	-	↑	↑	<i>OsDof17</i>	↓	↓	-	-	<i>OsDof27</i>	↑	↑	↑	↑
<i>OsDof8</i>	↓	↓	↑	↑	<i>OsDof18</i>	↓	↓	↑	↑	<i>OsDof28</i>	-	↓	↑	↑
<i>OsDof9</i>	-	-	-	-	<i>OsDof19</i>	-	↓	↑	↑	<i>OsDof29</i>	↑	↓	↑	↑
<i>OsDof10</i>	-	-	↓	-	<i>OsDof20</i>	↓	-	-	↑	<i>OsDof30</i>	-	↑	↑	↑

注: "↑", "↓" 和 "-" 分别表示与对照相比, 表达水平上升, 下降和没变化

Note: "↑", "↓" and "-" representing up-, down-, no change-regulated expression, respectively, compared to CK

数*OsDof*基因可能参与不同胁迫信号途径之间的交互作用。在表达水平受2种及多种胁迫信号影响的27个基因中, 25个基因的表达受光的调节, 表明了*OsDof*基因可能通过光信号与其它胁迫信号相互作用共同调控水稻的生长发育。光是一种重要的环境信号, 调控幼苗形态建成、种子萌发、去黄化、叶发育、开花等一系列发育事件(Jiao et al., 2007)。目前, 一些研究已经证明光及一些不同的信号途径之间通过交互作用共同调节植物的生长发育。如光与激素信号传导途径互作调控植物胚轴的生长、幼苗形态建成和种子的萌发等(Kurepin et al., 2007; Seo et al., 2009; Lau and Deng, 2010)。

顺式作用元件作为重要的分子开关参与基因的转录调控, 本研究发现30个*OsDof*基因上游启动子区均含有大量的光反应元件, 有些基因上游含有组织表达、激素反应和逆境反应相关元件, 如17个和10个基因分别含有种子表达和ABA反应元件。通过定量RT-PCR分析, 我们发现预测的*OsDofs*顺式元件和基因表达的关系并非十分吻合, 如: 通过RT-PCR分析, 我们在30个含有光反应元件的*Dof*基因中, 只检测到25个在正常条件下和暗处理条件下的表达水平发生变化, 另5个基因则没有发生明显变化。RT-PCR分析19个基因在种子中的相对表达量大于1, 其中12个基因上游启动子区预测含有种子表达元件, 7个不含有种子表达元件基因; 同样在10个含有ABA反应元件的基因中, RT-PCR结果显示只有其中6个基因的表达水平发生变化, 另还有10个

基因虽然没有预测到ABA反应元件, 但其表达也受到ABA的调控。原因可能是逆境处理时间不够未引起基因表达发生变化, 也可能是*OsDofs*基因中的顺式元件超出本研究中分析的1 500 bp启动子区, 还有可能是一些新的还未鉴定的新的调控元件存在启动子区。

3材料与方法

3.1 *OsDof*基因的收集及生物信息学分析

*OsDof*基因及相关信息收集源于数据库Plntfdb (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>) 和 Gramene (http://www.gramene.org/Oryza_sativa/)。EST数据的获得来自(http://rice.plantbiology.msu.edu/expression_anatomy.shtml), 利用网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 对30个*OsDofs*基因翻译起始密码子上游约1.5 kb的启动子序列进行顺式元件分析。上游启动子序列来源于网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。

3.2 表达分析的材料准备

用于*OsDof*基因的组织表达谱分析材料包括5个组织, 分别为大田中自然生长水稻日本晴抽穗后期的根、茎、叶, 授粉5~10 d的种子, 培养箱中营养液培养至三叶期幼苗的叶。诱导表达谱分析材料为水稻三叶期幼苗的叶, 包括NaCl 200 mmol/L、ABA 200 μmol/L、25% PEG6000和黄化4种处理。处理方案如下: 水稻日本晴种子在28℃培养箱中经浸种2 d、催芽2 d后, 将萌芽一致的种子转移至培养皿中用

1/2MS培养液进行水培培养(16 h光照/8 h黑暗)。当幼苗生长至三叶期, 移至塑料培养瓶, 用200 mmol/L NaCl、200 μmol/L ABA和25% PEG6000分别处理40 h、40 h和16 h, 黄化苗的获得则通过暗培养至三叶期幼苗完全出现黄化。所有样品液氮速冻后贮存于-80℃下用于RNA提取。

3.3 定量RT-PCR引物的设计

使用引物设计软件Primer Premier 5.0对30个*OsDof*基因进行荧光定量引物设计并送往广州英伟创津公司进行合成。本实验用的荧光定量引物序列如表1所示。

3.4 水稻总RNA的提取及反转录

水稻总RNA的提取采用RNAsimple Total RNA Kit (天根), 经Dnase I (TakaRa公司)处理后, 用RNAClean Kit (天根)纯化。通过琼脂糖凝胶电泳检测, 选取具有清晰18S和28S带的总RNA用于反转录, 即cDNA第一链合成, 使用Promega A3500试剂盒。具体方法按试剂盒说明书进行, 然后保存于-20℃备用。

3.5 定量RT-PCR

定量RT-PCR反应使用罗氏公司的SYBR Green法荧光定量试剂盒。20 μL反应体系包含: 1 μL反转录产物, 10 μL Faststart Universal SYBR Green Master (ROX)及10 μmol/L的上下游引物各0.6 μL。定量PCR在ABI7500定量PCR仪(Applied Biosystems, 美国)上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量的方法进行表达量的比较。运行的反应程序为: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ (或64℃) 1 min, 40个循环; 60℃收集荧光。定量PCR反应利用*Actin*基因作为内参。

作者贡献

周淑芬和颜静宛是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 周淑芬完成数据分析和论文初稿的写作; 刘华清、林智敏、陈睿和杨绍华参与实验设计, 试验结果分析; 王锋是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由福建省自然科学基金项目(2009J01091)和福建省财政专项-福建省农业科学院科技创新团队项目(CXTD-2011-09)共同资助。

参考文献

BBaumann K., De Paolis A., Costantino P., and Gualberti G., 1999, The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is

essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants, *Plant Cell*, 11(3): 323-333 <http://dx.doi.org/10.2307/3870863> <http://dx.doi.org/10.11-05/tpc.11.3.323> PMID:10072394 PMCID:144195

Chen R., Ni Z., Qin Y., Nie X., Lin Z., Dong G., and Sun Q., 2005, Isolation and characterization of TaDof1 transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L), *DNA Seq.*, 16 (5): 358-363 <http://dx.doi.org/10.1080/104251705002729-40> PMID:16243726

Chen W.Q., Chao G., and Singh K.B., 1996, The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBPI-binding sites, *Plant J.*, 10(6): 955-966 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10060955.x> PMID:9011080

Dong G.Q., Ni Z.F., Yao Y.Y., Nie X.L., and Sun Q.X., 2007, Wheat Dof transcription factor WPBF interacts with *TaQM* and activates transcription of an alphasialin gene during wheat seed development, *Plant Mol. Biol.*, 63(1): 73-84 <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-006-9073-3> PMID:1702-1941

Gualberti G., Papi M., Bellucci L., Ricci I., Bouchez D., Camilleri C., Costantino P., and Vittorioso P., 2002, Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds, *Plant Cell*, 14(6): 1253-1263 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.010491> PMID:12084825 PMCID:150778

Jiao Y., Lau O.S., and Deng X.W., 2007, Light-regulated transcriptional networks in higher plants, *Nat. Rev. Genet.*, 8(3): 217-230 <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2049> PMID:173042-47

Kisu Y., Ono T., Shimofurutani N., Suzuki M., and Esaka M., 1998, Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene, *Plant Cell Physiol.*, 39(10): 1054-1064 <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029302> PMID:9871365

Kurepin L.V., Emery R.J.N., Pharis R.P., and Reid D.M., 2007, The interaction of light quality and irradiance with gibberellins, cytokinins and auxin in regulating growth of *Helianthus annuus* hypocotyls, *Plant Cell Environ.*, 30(2): 147-155 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.0161-2.x> PMID:17238906

Kushwaha H., Gupta S., Singh V.K., Rastogi S., and Yadav D., 2011, Genome wide identification of *Dof* transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and *Arabidopsis*, *Molecular Biology Reports*, 38(8): 5037-5053 <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0650-9> PMID:21161392

- Lau O.S., and Deng X.W., 2010, Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13(5): 571-577 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.07.001> PMID:20739215
- Lescot M., Déhais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Peer Y.V.D., Rouzé P., and Rombauts S., 2002, PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences, *Nucleic Acids Res.*, 30(1): 325-327 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.1.325> PMID:11752327 PMCid:99092
- Li D.J., Yang C.H., Li X.B., Gan Q., Zhao X.F., and Zhu L.H., 2009, Functional characterization of rice *OsDof12*, *Planta*, 229(6): 1159-1169 <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-009-0893-7> PMID:19198875
- Lijavetzky D., Carbonero P., and Vicente-Carbajosa J., 2003, Genomewide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis *Dof* gene families, *BMC Evol. Biol.*, 3: 17-28 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-3-17> PMID:12877745 PMCid:184357
- Mena M., Cejudo F.J., Isabel-Lamoneda I., and Carbonero P., 2002, A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone, *Plant Physiol.*, 130(1): 111-119 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.005561> PMID:12226491 PMCid:166544
- Moreno-Risueno M.A., Martinez M., Vicente-Carbajosa J., Carbonero P., 2007, The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants, *Mol. Genet. Genomics*, 277(4): 379-390 <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-006-0186-9> PMID:17180359
- Ray S., Agarwal P., Arora R., Kapoor S., and Tyagi A.K., 2007, Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*), *Mol. Genet. Genomics*, 278(5): 493-505 <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-007-0267-4> PMID:17636330
- Seo M., Nambara E., Choi G., and Yamaguchi S., 2009, Interaction of light and hormone signals in germinating seeds, *Plant Mol. Biol.*, 69(4): 463-472 <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-008-9429-y> PMID:19031046
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., and Seki M., 2003, Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6(5): 410-417 [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00092X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00092X)
- Umemura Y., Ishiduka T., Yamamoto R., and Esaka M., 2004, The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain, *Plant J.*, 37(5): 741-749 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2003.01997.x> PMID:14871313
- Vicente-Carbajosa J., Moose S.P., Parsons R.L., and Schmidt R.J., 1997, A maize zinc-finger protein binds the prolamins box in zein gene promoters and interact with the basic leucine zipper transcriptional activator opaque2, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94(14): 7685-7690 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.14.7685> PMID:9207153 PMCid:23883
- Washio K., 2001, Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains, *Biochim. Biophys. Acta*, 1520(1): 54-62
- Yanagisawa S., 2002, The Dof family of plant transcription factors, *Trends Plant Sci.*, 7(12): 555-560 [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02362-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02362-2)
- Yanagisawa S., and Izui K., 1993, Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif, *J. Biol. Chem.*, 268(21): 16028-16036 PMID:8340424
- Yanagisawa S., 2000, *Dof1* and *Dof2* transcription factors are associated with expression of multiple gene involved in carbon metabolism in maize, *Plant J.*, 21(3): 281-288 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113.2000.00685.x> PMID:107584798