

何雨航, 杜易桓, 郭 昊, 等. 水稻 *OsENOD93b* 基因组织表达模式与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(7): 67-71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.011

水稻 *OsENOD93b* 基因组织表达模式与生物信息学分析

何雨航, 杜易桓, 郭 昊, 赵 頔, 马银花

(湖南人文科技学院农业与生物技术学院/农田杂草防控技术与应用协同创新中心, 湖南娄底 417000)

摘要: 主要探究 *OsENOD93b* 基因在水稻中的组织表达模式, 并对其作生物信息学分析。采用实时荧光定量 PCR 技术分析 *OsENOD93b* 基因的表达模式。用 ExPASy - Protparam、ProtScale、CDD、SOPMA、Phyre 2、Psort 等在线工具对 *OsENOD93b* 进行生物信息学分析。经组织表达模式分析可知, *OsENOD93b* 基因在叶片中的含量最多, 其次是茎, 含量最少的为根。通过 ExPASy - Protparam 分析发现, *OsENOD93b* 分子量为 16.429 89 ku, 是一种具有亲水性的不稳定的碱性蛋白。该蛋白属于 ENOD93 超级家族。通过 SOPMA 在线软件对 *OsENOD93b* 蛋白的二级结构进行分析预测, 发现其由无规则卷曲 (41.56%)、 α -螺旋 (39.61%)、延伸链区 (14.94%) 和 β -转角 (3.90%) 4 种形式组成。此外, 利用不同在线工具对 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构、保守区域、亚细胞定位进行生物信息学分析。结果表明, *OsENOD93b* 基因在进化过程中具有一定的保守性, 并有多样的潜在功能待研究。研究结果为进一步探明 *OsENOD93b* 基因的生物功能提供了依据。

关键词: 水稻; ENOD; *OsENOD93b*; 组织表达模式分析; 生物信息学

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0067-04

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是稻属谷类作物, 这类经济作物需要吸收氮素合成自身需要的营养物质, 因此对水稻结瘤固氮潜能进行研究具有重大的经济意义^[1-2]。生物学上一般把宿主植物基因编码的根瘤特异性蛋白统称为结瘤素, 编码这些物质的基因称为结瘤素基因^[3]。按照结瘤素基因出现的早晚和功能不同, 将其分为早期结瘤素基因、晚期结瘤素基因^[4-5]。根据不同结瘤基因突变体对结瘤过程的影响, 将结瘤基因分为共同结瘤基因、寄主专一性基因、调节基因三大类^[6]。早期结瘤素基因参与根瘤菌的侵染和根瘤发育过程, 而晚期结瘤素基因主要负责根瘤的功能^[7]。早期结瘤素基因包括豌豆 (*Pisum sativum* L.) 中的 *PsSYM10*、*PsENOD5*、*PsENOD12A*, 大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 中的 *ENOD2B*、蜡梅 [*Chimonanthus praecox* (Linn.) Link.] 中的 *CpNOD* 等。晚期结瘤素基因有紫云英

(*Astragalus sinicus* L.) 的 *As II C259*、*AsG2511*、*AsNODF32* 及百脉根 (*Lotus corniculatus* Linn.) 的 *LjCyp5* 等^[8-15]。到目前为止, 大豆早期结瘤素中研究得最清楚的是 *N-75* 基因, 晚期结瘤素中研究得较清楚的是豆血红蛋白, 它是豆科植物根瘤内的一种血红蛋白, 主要功能是运输氧、降低拟菌体周围的氧分压^[4]。

利用 *ENODZ* 的 mRNA 作探针进行研究发现在豌豆、菜豆及苜蓿中都有 1 段与 *ENODZ* 同源的基因。另外有报道显示, 不同宿主植物内含有的早期结瘤素基因的类型不同, 但均含有 *Enod2*、*Enod5*、*Enod12*、*Enod40*^[16-17]。*ENOD93* 就是一种早期结瘤素, 它在根瘤形成过程中的作用机制及在非豆科植物中的功能并不明确, 还有待进一步的研究^[4]。此外, *Sym* (symbiotic) 基因也属于早期结瘤素基因, 它是一类存在于豌豆中的共生基因^[18]。

研究人员利用生物信息学方法证明, 水稻基因组有 31 个基因与结瘤素基因具有高度同源性, 如水稻基因 *CAC39050*、*S23543*、*BAB63833*、*BAB93352* 与结瘤素基因的同源性高达 70% 以上^[7]。据报道, 大豆早期结瘤素基因 *Gmenod40* 和水稻早期结瘤素基因 *Osenod40* 的表达模式相似^[19-20]。此外, 已发表的文献显示, 豆科植物苜蓿的早期结瘤素基因 *Mrenod40* 在水稻、苜蓿中的表达方式相同^[2,21]。水

收稿日期: 2020-08-25

基金项目: 湖南省自然科学基金 (编号: 2019JJ50281); 湖南省教育厅项目 (编号: 18B455); 国家级大学生创新创业训练计划平台项目 (编号: 201910553027X)。

作者简介: 何雨航 (1999—), 女, 湖南邵阳人, 主要从事水稻遗传及转基因方面的研究。E-mail: 1835147713@qq.com。

通信作者: 马银花, 博士, 讲师, 主要从事水稻遗传及转基因方面的研究。E-mail: mayinhua1988@126.com。

稻结瘤素的研究对于提高水稻产量和经济价值有着举足轻重的作用,发现更多具有特异性功能的结瘤素家族成员也是目前研究的重要任务。

本试验以水稻为研究对象,对筛选出的 *OsENOD93b* (*LOC_Os02g13380*) 进行理化性质分析与亲水性疏水性、保守区域、蛋白二级、三级结构预测,并进行亚细胞定位,以期为深入研究该基因提供理论依据,丰富水稻结瘤素基因家族的种类。

1 材料与方法

1.1 *OsENOD93b* 蛋白的生物信息学预测

OsENOD93b 蛋白的理化性质使用线上工具 ExPASy - ProtParam 进行分析;亲水性、疏水性使用 ProtScale 线上软件进行分析;蛋白保守功能区通过 CDD 软件进行在线分析;蛋白二级结构使用线上工具 SOPMA 进行分析;蛋白三级结构通过 Phyre 2 软件进行预测,蛋白亚细胞定位使用在线网站 Psort 进行分析。上述各软件的网址见表 1^[22]。

1.2 *OsENOD93b* 组织表达模式分析

首先进行水稻各组织器官总 RNA 的提取,其次,将获得的 RNA 进行反转录形成 cDNA,以此进行组织表达模式分析,具体步骤参考 Ma 等的方法^[23-24]。

表 1 分析软件的名称和网址

软件名称	网址
ExPASy - ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
Phyre 2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
Psort	https://www.genscript.com/psort.html

2 结果与分析

2.1 *OsENOD93b* 蛋白理化性质分析与亲水性预测

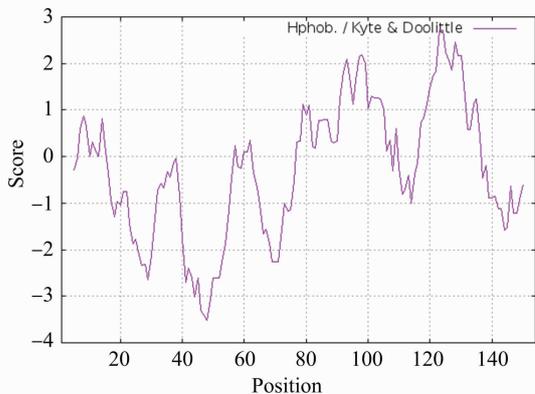
ExPASy - ProtParam 线上软件的分析结果表明, *OsENOD93b* 是 1 个由 154 个氨基酸构成、分子式为 $C_{711}H_{1181}N_{227}O_{210}S_5$ 、相对分子量为 16.429 89 ku、理论等电点 (theoretical pI) 为 11.42 的蛋白质。该蛋白质富含强碱性氨基酸 [包括精氨酸 (Arg)、赖氨酸 (Lys) 等, 共计 23 个], 且含有大量强酸性氨基酸 [包括天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu), 共计 9 个]。 *OsENOD93b* 蛋白的不稳定指数为 67.09, 表现出不稳定性, 其脂肪系数为 81.88。表 2 关于氨基酸组成的分析结果显示, 丙氨酸 (Ala)、精氨酸、丝氨酸 (Ser)、亮氨酸 (Leu)、脯氨酸 (Pro)、甘氨酸 (Gly)、缬氨酸 (Val) 所占比例较高, 分别为 14.9%、10.4%、9.1%、7.1%、7.1%、6.5%、6.5%, 色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 所占比例较低, 都为 0.6%。用 ProtScale 线上工具对 *OsENOD93b* 蛋白的亲水性进行预测, 发现 *OsENOD93b* 蛋白的氨基酸组成中既有亲水氨基酸, 又有疏水氨基酸 (图 1), 其中主要包含亲水性氨基酸, 因此判断该蛋白为亲水性蛋白。综上, *OsENOD93b* 蛋白是 1 个具有亲水性的不稳定的碱性蛋白。

表 2 *OsENOD93b* 蛋白不同氨基酸所占比例

氨基酸含量	数量 (个)	占比 (%)
丙氨酸 (Ala, A)	23	14.9
精氨酸 (Arg, R)	16	10.4
天冬酰胺 (Asn, N)	8	5.2
天冬氨酸 (Asp, D)	4	2.6
半胱氨酸 (Cys, C)	2	1.3
谷氨酰胺 (Gln, Q)	5	3.2
谷氨酸 (Glu, E)	5	3.2
甘氨酸 (Gly, G)	10	6.5
组氨酸 (His, H)	2	1.3
异亮氨酸 (Ile, I)	8	5.2
亮氨酸 (Leu, L)	11	7.1
赖氨酸 (Lys, K)	7	4.5
甲硫氨酸 (Met, M)	3	1.9
苯丙氨酸 (Phe, F)	4	2.6
脯氨酸 (Pro, P)	11	7.1
丝氨酸 (Ser, S)	14	9.1
苏氨酸 (Thr, T)	9	5.8
色氨酸 (Trp, W)	1	0.6
酪氨酸 (Tyr, Y)	1	0.6
缬氨酸 (Val, V)	10	6.5

2.2 *OsENOD93b* 蛋白的保守域

用 CDD 在线软件对 *OsENOD93b* 蛋白的保守功



score值表示氨基酸残基疏水性,该分值越高则表示所测蛋白的疏水性越强,分值越低代表亲水性越强

图1 OsENOD93b 蛋白的疏水性/亲水性预测分析

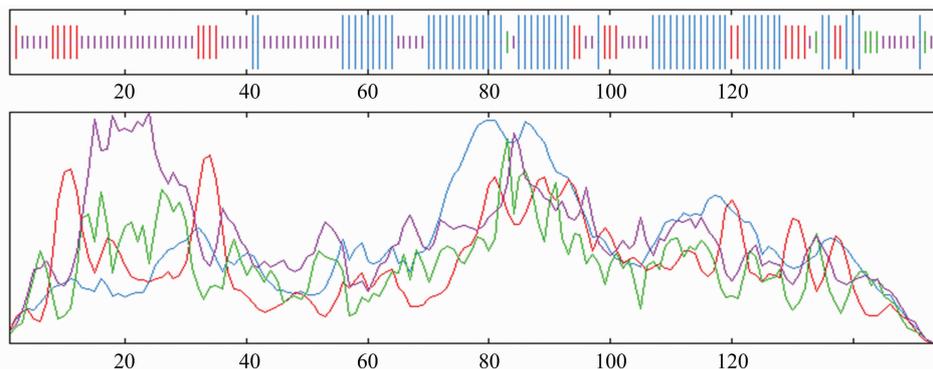
能域进行预测,由图 2 可知,*OsENOD93b* 基因的特 定匹配 (specific hits) 和非特定匹配 (non-specific hits) 都在 ENOD93,且该蛋白属于 ENOD93 superfamily (ENOD93 超级家族)。

2.3 *OsENOD93b* 蛋白的二级结构

利用线上工具 SOPMA 预测 *OsENOD93b* 蛋白的二级结构。由图 3 可以看出,*OsENOD93b* 蛋白的二级结构主要由无规则卷曲 (41.56%)、 α -螺旋 (39.61%)、延伸链区 (14.94%) 和 β -转角 (3.90%) 组成。因此可知,该蛋白的空间构象可能主要由无规则卷曲结构构成。



图2 *OsENOD93b* 基因编码蛋白的保守功能域



蓝色曲线表示蛋白 α -螺旋,红色曲线表示延伸链区,绿色曲线表示 β -转角,紫色曲线表示无规则卷曲

图3 *OsENOD93b* 编码蛋白的二级结构

2.4 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构预测

利用线上工具 Phyre2 预测 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构。由图 4 可以看出,该蛋白只含有 1 条肽链,没有三级结构,说明该蛋白空间构象较简单,且不能折叠形成特异的空间构象。



图4 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构预测

2.5 *OsENOD93b* 蛋白的亚细胞定位

通过线上工具 Psort 对 *OsENOD93b* 蛋白进行亚细胞定位,结果(表 3)表明,该蛋白定位在线粒体的可能性为 30.4%,定位在细胞质的可能性为 26.1%,定位在细胞核、内质网、高尔基体、液泡、分泌系统囊泡、细胞外(包括细胞壁)等地方的可能性分别为 8.7%、8.7%、8.7%、8.7%、4.3%、4.3%。根据上述数据推测,*OsENOD93b* 蛋白定位在线粒体的可能性最大,其次是细胞质,也可能是胞核、内质网、高尔基体、液泡、分泌系统囊泡和细胞外(包括细胞壁)。

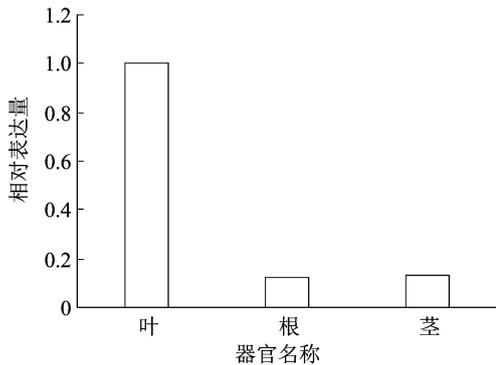
2.6 *OsENOD93b* 基因组织表达模式分析

首先,通过特定方法提取水稻根、茎、叶的 RNA,将其反转录成 cDNA。其次,利用实时荧光定量 PCR 的方法,检测 *OsENOD93b* 基因在不同组织器官中的表达水平。研究结果显示,*OsENOD93b* 基

表3 OsENOD93b 蛋白定位在不同亚细胞结构中的可能性

亚细胞结构	可能性 (%)
线粒体	30.4
细胞质	26.1
细胞核	8.7
内质网	8.7
液泡	8.7
高尔基体	8.7
分泌系统囊泡	4.3
细胞外(包括细胞壁)	4.3

因的总体表达水平相对较高,在根、茎、叶器官中均有表达,在叶中的表达量最高,其次是茎中,表达量最少的为根中(图5)。上述结果表明,*OsENOD93b* 的功能在不同植物中可能具有一定的潜在多样性。

图5 *OsENOD93b* 的组织表达模式

3 讨论

本研究发现,*OsENOD93b* 在水稻根、茎、叶中有不同水平的表达,在叶中的表达量最高,在根、茎中的表达量相对较低。但是根据其在各组织中均有表达,且相对表达量较高的情况来看,*OsENOD93b* 基因在水稻早期结瘤素家族中有着举足轻重的地位。因此,对 *OsENOD93b* 表达的特异性进行详细研究,有助于探明 *OsENOD93b* 蛋白功能的特异性。

生物信息学分析发现,*OsENOD93b* 蛋白是一个亲水的、不稳定的碱性蛋白,属于 ENOD93 superfamily(ENOD93 超级家族)。蛋白二级结构预测发现,该蛋白晶体的空间构象可能是以无规则卷曲结构构成的;*OsENOD93b* 蛋白没有三级结构,由 1 条链组成;此外,*OsENOD93b* 蛋白定位预测结果表明,它定位于线粒体的可能性最大,比定位在细胞质的可能性更大。由此可见,*OsENOD93b* 蛋白极有可能在线粒体中表达其功能。但目前尚未发现

OsENOD93b 在线粒体中的详细功能。后续将对 *OsENOD93b* 进行功能性研究,以期发现对未来新型水稻品种有利的功能。

4 结论

组织表达模式分析结果表明,*OsNOD93b* 参与各组织的表达,在叶中的表达明显。通过 ExPASy - ProtParam 在线软件预测可知,*OsNOD93b* 是一个具有亲水性、保守的、碱性的、不稳定的蛋白分子,亚细胞定位预测结果显示,该蛋白可能在定位线粒体中,以高水平、保守的方式调控水稻的重要生物学功能及作用机制。

参考文献:

- [1] Dey M, Datta S K. Promiscuity of hosting nitrogen fixation in rice: an overview from the legume perspective [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, 22(3): 281 - 314.
- [2] 王彦章, 俞冠翘, 沈善炯, 等. 大豆早期结瘤素基因 *enod2B* 启动子在水稻中的表达受结瘤因子诱导 [J]. *科学通报*, 2004, 49(3): 238 - 244.
- [3] 曹鹏. 放线菌根瘤结构及四川桉木光合特性研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2008: 1 - 75.
- [4] 王洪隆, 荆玉祥. 豆科植物根瘤发生的分子生物学 [J]. *植物学通报*, 1991, 8(1): 1 - 8.
- [5] 王喆. 蜡梅结瘤素基因 *CpNOD* 的克隆与表达分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2012: 1 - 75.
- [6] 樊妤姬, 陈丽梅, 马庆生. 根瘤菌共生结瘤基因的分子遗传学研究进展 [J]. *遗传*, 1998(2): 3 - 5.
- [7] 王彦章, 俞冠翘, 朱家璧. 水稻中结瘤素基因的同源基因研究 [J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(3): 202 - 208.
- [8] 谢玉会, 田婷婷, 黄国栋, 等. 豌豆早期结瘤素基因 *PsSYM10* 的克隆及其表达载体的构建 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2010, 32(6): 69 - 72.
- [9] Albrecht C, Geurts R, Lapeyrie F, et al. Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 15(5): 605 - 614.
- [10] 王洪伟, 张兴国, 黎林, 等. 豌豆早期结瘤素基因 *ENOD12A* 的克隆及与 *PsLectin* 基因二元表达载体的构建 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 34(3): 202 - 205.
- [11] 王彦章, 俞冠翘, 沈善炯, 等. 大豆早期结瘤素基因 *enod2B* 启动子在水稻中的表达受结瘤因子诱导 [J]. *科学通报*, 2004, 49(3): 238 - 244.
- [12] 王喆, 汤玲, 睦顺照, 等. 蜡梅结瘤素基因 *CpNOD* 的克隆与表达分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(2): 20 - 26.
- [13] 丑敏霞, 魏新元, 陈大松, 等. 紫云英参与共生固氮的 2 个新结瘤基因的分离与鉴定 [J]. *科学通报*, 2007, 52(18): 2140 - 2146.
- [14] 李一星. 半胱氨酸蛋白酶基因 *Asnod32* 在紫云英根瘤衰老过程中的功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

杨滨娟,张颖睿,袁嘉欣,等. 紫云英与氮肥配施对水稻氮素吸收利用的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):71-77.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.012

紫云英与氮肥配施对水稻氮素吸收利用的影响

杨滨娟,张颖睿,袁嘉欣,黄国勤

(江西农业大学农学院/江西农业大学生态科学研究中心,江西南昌 330045)

摘要:为了探明紫云英还田配施减量氮肥的作用机制,为南方稻田合理施肥提供理论指导和技术支撑。在“紫云英-双季稻”复种型农作制度基础上,采用大田试验,设置3个梯度的紫云英还田量,并配施相应的减量氮肥,以常规施肥作对照,分析不同紫云英与氮肥配施比例对水稻产量、干物质积累情况以及氮素积累的影响,并利用施氮量和水稻产量建立纯N-紫云英-水稻产量的关系模型。研究表明:紫云英 27 000 kg/hm² + 纯N 120 kg/hm² 有提高早稻产量的趋势,紫云英 45 000 kg/hm² + 纯N 60 kg/hm² 的晚稻产量最高,从全年产量来看,紫云英 36 000 kg/hm² + 纯N 90 kg/hm² 表现最佳。与常规施肥相比,翻压紫云英还田可以提高早稻中后期干物质积累比例,提高植株氮素积累量和氮收获指数。紫云英替代系数的变化表明,在早稻供氮量充足的情况下,随着紫云英还田量在全部施肥量中比例的增加,紫云英替代氮肥效应的能力逐渐减弱。

关键词:水稻;施氮水平;紫云英;氮素吸收利用;关系模型

中图分类号: S551;S344 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0071-07

长江中下游冬闲田、冬季光温水热等资源的合理开发利用一直是我国重点关注的农业问题^[1-2]。江西、湖南等省是我国双季稻主产区,但在晚稻收

获后由于茬口紧、冬种作物品种少、经济效益低等原因,90%以上的农户会选择撂荒,造成土地和光、温、水、热资源的严重浪费^[3-5]。利用冬闲田种植紫云英、油菜等绿肥,可以美化农村环境,带动当地旅游产业的兴起和发展^[6],还可以减少粉尘扬灰,降低雾霾指数,有利于改善空气质量^[7],能够防止水土流失,改善土壤肥力,维持稻田生态环境^[8-9]。氮素是水稻生长必不可少的营养元素之一^[10],但氮肥的过量施用,不仅会导致水稻贪青晚熟、倒伏减产,降低氮肥利用效率^[11],还极易造成土壤中氮素盈余,导致农业资源浪费、水体富营养化等环境问

收稿日期:2020-07-06

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0300208);国家自然科学基金(编号:41661070)。

作者简介:杨滨娟(1985—),女,山东淄博人,博士,助理研究员,主要从事耕作制度与农业生态研究。E-mail: yangbinjuan@jxau.edu.cn。

通信作者:黄国勤,博士,教授,主要从事作物学、生态学、农业发展与区域农业、资源环境与可持续发展等研究。E-mail: hgqjxes@sina.com。

[15] 苟洪兰. 半胱氨酸蛋白酶基因在百脉根根瘤衰老中的功能研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012.

[16] 黄家凤,李克梅,王爱英,等. 豆科植物-根瘤菌共生固氮的分子机理[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2002,6(1):74-78.

[17] Borisov A Y, Tsyganov V E, Ovtsyna A O, et al. Genetic programs for development of nodules and Arbuscular mycorrhiza in Legumes: solid facts and unsolved problems[C]//Sustainable Agriculture and the Environment Proceedings of the 14th International Nitrogen Fixation Congress. Springer,2004:261-263.

[18] 黎林. 豌豆早期结瘤素基因克隆及 *PsENOD12A* 与 *PsLectin* 基因导入烟草研究[D]. 重庆:西南大学,2009:1-71.

[19] Reddy P M, Aggarwal R K, Ramos M C, et al. Widespread occurrence of the homologue of the early nodulin (*ENOD*) genes in *Oryza* species and related grasses[J]. Biochemical and Biophysical

Research Communications,1999,258(1):148-154.

[20] Kouchi H, Takane K I, So R B, et al. Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules[J]. The Plant Journal,1999,18(2):121-129.

[21] Dey M, Torrizo L B, Chaudhuri R K, et al. Transgenic rice harbouring legume *ENOD40* gene[J]. Rice Genet Newsl,1999,16:147-149.

[22] 高南,李俊林,郝东利,等. *OsaKT2/3* 基因的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):25-27.

[23] Ma Y H, Zhao Y, Shanguan X X, et al. Overexpression of *OsaRRK1* changes leaf morphology and defense to insect in rice[J]. Frontiers in Plant Science,2017,8:1-14.

[24] 马银花,李萍芳,何雨航,等. 水稻 *OsaRRK1* 蛋白的进化分析及其亚细胞定位[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版),2020,33(3):371-376.