

水稻病程相关蛋白质在逆境胁迫下的表达研究*

高庆华** 曾祥然** 贾霖 牛东东 李雪姣 关明俐 贾盟

兰金苹 窦世娟 李莉云 刘丽娟 刘国振***

(河北农业大学生命科学学院, 保定 071000)

摘要 植物病程相关(*PR*)基因一般在病原物侵染过程中受诱导发生转录上调。目前有证据提示植物 *PR* 基因在非生物逆境胁迫下也发生转录变化, 但其蛋白质的表达变化情况还鲜有报道。为了解水稻 *PR* 蛋白质在逆境胁迫下的表达特征, 本文采用免疫印迹技术(Western blotting, WB)调查了 8 个 *PR* 蛋白质在冷、热、旱、淹和盐等 5 种胁迫下的表达谱。结果表明: 在冷胁迫下 *PR8* 表达上调, 在热胁迫下 *PR1a*、*PR3*、*PR5* 和 *PR16* 表达下调; 在旱胁迫下 *PR1a*、*PR2* 和 *PR8* 表达上调, 而 *PR5* 和 *PR16* 表达下调, 在淹胁迫下 *PR1*、*PR2* 和 *PR15* 表达上调, *PR1a*、*PR3*、*PR5* 和 *PR8* 表达下调; 在盐胁迫下 *PR2* 和 *PR3* 表达上调, 而 *PR1a*、*PR5*、*PR8* 和 *PR16* 表达下调。另外, 对这些 *PR* 基因的上游启动子区进行分析, 发现存在与胁迫响应相关的调控元件, 其中脱落酸反应元件(ABRE)、TC-rich repeats 和 HSE 的出现频率较高。这些蛋白质表达数据进一步佐证了 *PR* 蛋白在逆境胁迫反应中发挥着重要且不尽相同的作用。

关键词 水稻, 病程相关蛋白质, 免疫印迹, 逆境胁迫, 启动子

学科分类号 Q7, S51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00014

水稻是最重要的农作物之一, 是世界上一半以上人口的主粮, 水稻的高产、稳产事关粮食安全。在影响水稻产量的因素中, 逆境胁迫(生物或非生物)扮演了重要的角色, 逆境胁迫轻则对水稻的生长发育造成不良影响, 降低产量, 严重时可使水稻死亡, 造成绝收^[1]。水稻及其他植物为了抵抗逆境对自身生长的影响, 在长期的进化过程中都在一定程度上发展了感受干旱、低温、高盐等胁迫信号的机制, 通过体内的信号传导途径, 激发转录因子与相应的顺式作用元件的结合, 进而启动特定基因的转录和表达, 最后导致植物对胁迫作出耐受反应^[2-5]。根据报道, 水稻中参与逆境应答的基因有功能类蛋白质, 如渗透调节物质、抗氧化物质、病程相关蛋白质等, 也有在信号传递与胁迫应答中起调节作用的基因, 如转录因子和蛋白激酶等。了解这些耐逆相关基因的表达特征及功能对解析水稻的耐逆机理具有重要的理论意义和应用价值。

病程相关(*PR*)基因的最初发现是由于它们在植物遭受病原物侵染时表达上升^[6], 但近年来有大量报道表明, 许多 *PR* 基因的转录也受伤害^[7]、生物

胁迫^[8-9]以及激素处理^[10-12]等诱导。如西红柿的 *PR-5a* 受盐胁迫的诱导^[13], 烟草的 *PR-5c* 也受盐胁迫的诱导^[14-15]。拟南芥中, *PR1*、*PR2* 和 *PR3* 在高盐胁迫下转录水平明显升高^[16], 在干旱胁迫下, *PR1*、*PR2* 和 *PR5* 的转录水平明显升高, 但 *PR3* 和 *PR4* 的转录水平下降^[16], 低温胁迫可以诱导 *PR1*、*PR2* 和 *PR5* 的积累^[17]。水稻的 *OsPR1a* 和 *OsPR1b* 基因受稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*, *M. grisea*)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、过氧化氢(H₂O₂)、蛋白酶抑制剂斑蝥素(cantharidin, CN)和草藻灭(endothall, EN)的诱导, 对光、伤害、磷酸酶抑制剂等环境胁迫和化学处理作出反应^[18-20]。转几丁质酶基因 *RC7* (*PR3*, Os05g33130)的水稻具有抗纹枯病能力^[21]。水稻 *OsPR4* 受冷、热、干旱和盐等非生物逆境的

* 国家自然科学基金资助项目(31171528)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0312-7528787, E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

收稿日期: 2013-01-10, 接受日期: 2013-04-26

诱导, 超表达 *OsPR4* 的植株在幼苗期和孕穗期增加了对干旱的耐受效果^[2]. 外源 JA 处理和稻瘟病菌接种可使 *PR5* (*TLP-D34*, *Os12g43380*) 转录水平增高^[10], 超表达 *PR5* 可提高水稻对纹枯病的抗性^[23-25]. *OsChib1* (*PR8*) 的转录也受 SA、乙烯、茉莉酸甲酯、 H_2O_2 和 $CuSO_4$ 等处理的诱导^[26]. 干旱、高盐均可诱导 *RSOsPR10* 转录水平快速升高^[27-28]. 这些数据说明 *PR* 基因广泛参与了水稻的逆境胁迫应答反应.

在胁迫应答基因的上游启动子区往往存在着与逆境信号应答有关的调控元件, 这些元件与转录因子的结合启动胁迫应答基因的表达. 用软件分析发现, *OsPR4b* 基因启动子区存在 W-box、PAL-boxA、GT-1 结合序列和 Dof 结合序列等^[29], 有报道表明, WRKY 转录因子能够和 W-box 结合, 在植物防卫反应中发挥调控作用^[30]. 在拟南芥 *rd29A* 基因的启动子区发现了一种与干旱胁迫相关的元件 DRE (dehydration-responsive element), 该元件的核心序列为 TACCGACAT^[31], 随后发现该序列也出现在其他受干旱、高盐、低温诱导的拟南芥基因 (如 *kin1* 和 *cor6.6* 等) 的启动子区^[32]. 脱落酸反应元件 ABRE (abscisic acid responsive element) 也是一类非生物逆境胁迫相关的诱导型启动子元件, 它们在小麦 *Em* 和玉米 *rab17* 基因中都存在^[33].

在过去的报道中大多关注的是 *PR* 基因的转录情况, 在我们的前期工作中, 采用基于抗体的蛋白质组学策略^[34], 用免疫印迹技术分析了几十个 *PR* 蛋白质的表达, 发现在水稻正常生长过程中及与白叶枯病菌的互作过程中, *PR1a*、*PR1b*、*PR1*、*PR2* 和 *PR3* 等蛋白质的表达都会发生变化^[8-9]. 另外, 对逆境胁迫条件下的 CBL 家族和 PP2A 家族蛋白进行分析, 也发现了一些表达发生变化的成员^[35-37]. 在此基础上, 本研究拟调查 *PR* 蛋白质在逆境胁迫下的表达特征, 为进一步分析其在逆境过程中的功能及了解逆境应答机理提供线索.

1 材料与方法

1.1 水稻材料

水稻(品种 9311)由湖南国家杂交水稻工程技术研究中心符习勤研究员提供. 水稻种子在 37℃ 浸种 48 h, 萌发的水稻幼苗在光照培养箱中生长, 培养条件为温度 28℃, 光照 / 黑暗周期为 14 h/10 h, 培养液为 1/2 Hogland^[38]. 以培养 14 天的水稻幼苗进行各种胁迫处理, 以未经胁迫正常生长的水稻为

对照.

1.2 非生物逆境胁迫处理

冷胁迫为 4℃, 取材时间点分别为处理后 0、0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 h; 热胁迫为 48℃, 取材时间点分别为处理后 0、0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 h; 旱胁迫用 20% PEG-6000, 取材时间点分别为处理后 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、1 天、2 天、3 天和 5 天; 淹胁迫为将水稻完全浸没于水中, 取材时间点分别为处理后 0 h、8 h、12 h、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天和 7 天; 盐胁迫处理用 200 mmol/L NaCl, 取材时间点为处理后 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、1 天、2 天、3 天和 5 天. 具体方法参见文献^[37], 取材后液氮速冻, 保存于 -70℃ 冰箱备用.

1.3 多克隆抗体

抗体来源参见本实验室以前的报道^[8-9].

1.4 水稻蛋白质提取

将 -70℃ 冻存的水稻叶片在液氮中充分研磨, 加入蛋白质提取液 (62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10% 甘油, 0.1% SDS, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 5% β -巯基乙醇), 混匀后冰上放置 10 min, 然后 12 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 取上清即为总蛋白质.

1.5 蛋白质印迹分析和信号采集

总蛋白质用 Tricine-SDS-PAGE^[39] 分离后转移到 PVDF 膜上进行蛋白质印迹分析, 蛋白质印迹分析方法参见文献^[40], 蛋白质印迹实验至少重复 3 次, 盐、旱胁迫以 HSP 信号作为内参^[41]、冷胁迫以丽春红染色的 PVDF 膜作为等量加样的标志^[42]. 用 Gel-pro analyzer 软件扫描 X 光片上的蛋白质印迹条带信号, 计算 3 次蛋白质印迹信号的平均值及方差, 比较其信号的相对强度.

1.6 *PR* 基因的启动子区调控元件分析

从水稻基因组数据库 (Rice Genome Annotation Project) 网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 下载 8 个 *PR* 基因上游 1.5k 的 DNA 序列, 然后利用 PlantCARE 软件 (<http://bioinformatics.psbg.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对可能的调控元件进行预测^[43-44].

2 结果与分析

对水稻幼苗进行逆境处理后, 在冷、热胁迫处理 2 天时可观察到叶片明显失绿, 绝大部分幼苗 (90% 以上) 倒伏并呈干枯状, 在旱、淹和盐胁迫至

3 天时水稻幼苗表现明显的伤害状态^[7], 我们采集了胁迫处理后不同时间点的地上部样品, 抽提蛋白质后进行免疫印迹分析。

2.1 水稻 PR 蛋白质在温度胁迫过程中的表达

为了解温度对水稻 PR 蛋白质表达的影响, 采

集冷、热二种胁迫处理后 9 个时间点的幼苗样品, 提取总蛋白质, SDS-PAGE 分离后用不同的 PR 抗体进行蛋白质印迹分析(图 1)。由图 1a、图 1b 可见: 在冷胁迫过程中, PR1 和 PR2 未检测到目的条带的信号, PR1a 对应的目标条带信号随胁迫时

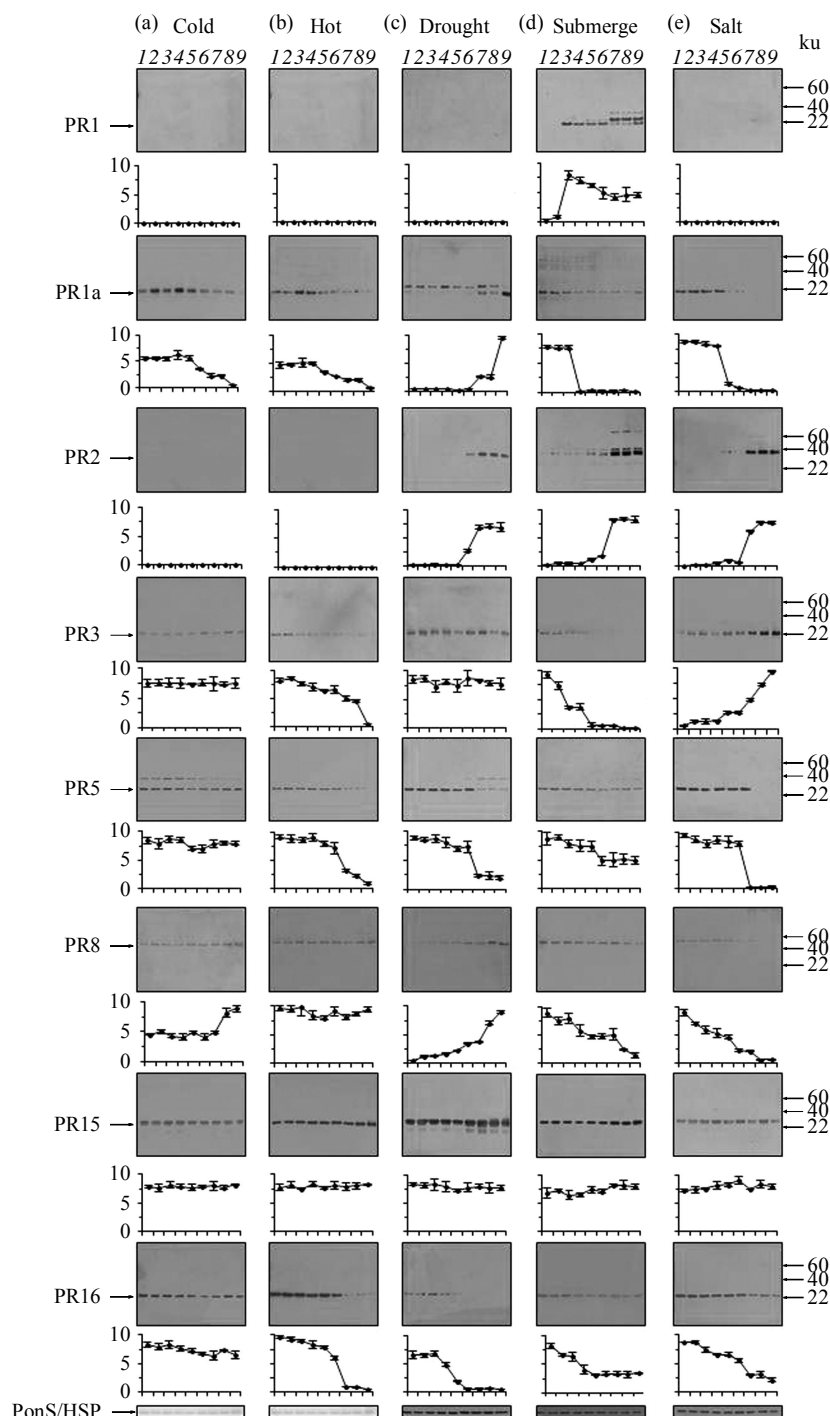


Fig. 1 The expression profiling of rice PR proteins under stressed conditions

(a)~(e) are Western blot data for the expression of PR proteins in rice seedling under cold, hot, drought, submerged and salt conditions, respectively. 1~9: Protein samples isolated from different time points (as stated in the text) of rice seedlings under stressed conditions. Upper panels: Western blot detection of the expression of PR proteins. Lower panels: Plot of average and standard deviation among three repeats of Western blot analysis. Ponceau S (PonS)- stained gel or Western blot results detected by anti-HSP antibody were showed at the bottom to demonstrate equal loading.

间的延长表现为下调, PR8 条带的信号随胁迫时间的延长表现上调, 而 PR3、PR5、PR15 和 PR16 的表达丰度未发生明显变化; 在热胁迫过程中, PR1 和 PR2 也未检测到目的条带的信号, PR1a、PR3、PR5 和 PR16 的条带信号随胁迫时间延长下调, 而 PR8 和 PR15 的表达量未受明显影响。

2.2 水稻 PR 蛋白质在水分胁迫过程中的表达

为了解水分对水稻 PR 蛋白质表达的影响, 我们分析了旱、淹处理后 9 个时间点的蛋白质样品, 总蛋白质经 SDS-PAGE 分离后用不同的 PR 抗体进行蛋白质印迹分析(图 1)。从图 1c 和图 1d 的结果可见, 在旱胁迫过程中, PR1 未检测到目的条带的信号, PR1a、PR2 和 PR8 蛋白质的表达呈现了上调, PR5 和 PR16 随胁迫时间的延长表现下调, PR3 和 PR15 表达量未受明显影响; 在淹胁迫过程中, PR1 和 PR2 蛋白质的表达均为上调, 但 PR1a、PR3、PR5、PR8 和 PR16 等 6 个蛋白质的表达均表现下调, PR15 的表达丰度未发生明显变化。

2.3 水稻 PR 蛋白质在高盐胁迫过程中的表达

为了解在盐胁迫过程中 PR 蛋白质的表达, 同样采集了盐胁迫后 9 个时间点的幼苗样品, 提取总蛋白质后用 SDS-PAGE 分离, 然后用不同的 PR 蛋白质特异抗体进行蛋白质印迹分析(图 1)。从图 1e 可见, 在盐胁迫下, PR1 未检测到目的条带的信号, PR2 和 PR3 蛋白质的表达均表现上调, PR1a、PR5、PR8 和 PR16 随胁迫时间的延长表现下调, PR15 的表达丰度未发生明显变化。

2.4 水稻 PR 基因启动子区调控元件分析

通常基因的表达模式主要与其上游启动子有关, 启动子区有不同功能的调控元件。我们下载了 8 个 PR 基因编码区上游 1 500 bp 的序列, 用

PlantCARE 软件对它们所包含的顺式元件进行了预测, 发现在 8 个 PR 基因的启动子区鉴定到的顺式作用元件共有 74 个(数据未附)。根据这些元件的注释结果, 将其分为胁迫相关、激素处理相关、光反应相关、基础代谢相关以及功能未知等 5 类, 在胁迫相关的顺式元件中, ABRE、TC-rich repeats 和 HSE 的出现频率较高, 在激素相关的顺式元件中, 脱落酸反应元件(ABRE)、茉莉酸甲酯应答元件(CGTCA-motif)和 TGACG- motif 出现频率较高, 在光反应类别中出现频率较高的顺式元件有 Box 4、GAG-motif、G-box 和 Sp1 等, 在基础代谢类别中出现频率较高的元件有 CAAT-box、CAT-box、circadian、Skn-1_motif 和 TATA-box, 另外还有 4 个顺式元件的功能未知, 它们是 AAGAA-motif、Unnamed_1、Unnamed_3 和 Unnamed_4。

表 1 中列出了与胁迫相关的调控元件及 PR 蛋白质在不同逆境胁迫下的表达模式, 从表 1 可以看出, 与脱落酸相关 ABRE 元件的出现频率最高, 暗示这些 PR 可能受脱落酸途径的调控。TC-rich repeats 是与防卫反应相关的元件, 该元件出现在 PR1、PR1a、PR2、PR3 和 PR5 的启动子区, 其中 4 个 PR 在水稻-白叶枯病菌的不亲和互作中表现上调。MBS 与干旱诱导有关, 4 个带有 MBS 的 PR 中有 2 个在旱胁迫中表达上调。据报道, LTR 是与低温诱导有关, 但 3 个带有 LTR 的 PR 在低温胁迫下均未见蛋白质的表达变化。HSE是与热胁迫有关的元件, 5 个带有 HSE 的 PR 在热胁迫下有 3 个表现下调。ARE 和 GC-motif 都与氧胁迫有关, 4 个带有 ARE 元件的 PR 有 3 个在淹胁迫下的表达有变化, 4 个带有 GC motif 的 PR 在淹胁迫下全部表达变化。

Table 1 The expression patterns of rice PR proteins under stressed conditions and stress-related cis-elements in the promoter region of PR genes

Gene name	PR protein expression detected by Western blot						cis-elements in the promoter region of PR genes						
	Cold	Hot	Drought	Submerge	Salt	Xoo-R ^[8]	ABRE	TC-rich repeats	MBS	LTR	HSE	ARE	GC-motif
PR1	○	○	○	↑	○	↑	+	+	+	+			
PR1a	↓	↓	↑	↓	↓	↑	+	+			+		
PR2	○	○	↑	↑	↑	↑	+	+	+		+	+	+
PR3	≡	↓	≡	↓	↑	↑	+	+	+	+	+		+
PR5	≡	↓	↓	↓	↓	≡	+	+		+		+	
PR8	↑	≡	↑	↓	↓	↑	+		+		+		+
PR15	≡	≡	≡	≡	≡	≡						+	
PR16	≡	↓	↓	↓	↓	≡	+				+	+	+

↑: Up regulation; ↓: Down regulation; ≡: Constant expression; ○: Not detectable; +: Positive.

3 讨 论

众所周知,蛋白质是生命活动的主要执行者.因此,对蛋白质表达特征的研究是了解基因功能以及生命活动机理的重要内容.本实验采用基于抗体的蛋白质组学策略,利用前期制备的水稻 PR 家族蛋白质特异的抗体,通过蛋白质印迹检测了相应蛋白质在冷、热、旱、淹和盐等 5 种胁迫过程中的表达变化,发现了在逆境胁迫下表达发生变化的 PR 蛋白质,所获得的数据对了解水稻 PR 蛋白质在非生物胁迫过程中的功能提供了重要的线索.

从 8 个 PR 蛋白质在不同逆境胁迫下的表达特征可以看出(图 1、表 1),PR1 仅在淹胁迫条件下被诱导表达,在其他胁迫条件下未见表达,推测该蛋白质可能在淹胁迫应答过程中发挥作用,PR1 的表达变化可作为水稻受淹胁迫时的蛋白质标志物.PR1a 在 5 种逆境下的表达均有变化,在冷、热、淹和盐胁迫下表达下调,在干旱胁迫下表达上调,据报道该基因的转录受稻瘟病菌(*M. grisea*)、JA、SA、H₂O₂、CN 和 EN 的诱导,对光、伤害、磷酸酶抑制剂等环境胁迫和化学处理等都会作出反应^[18-20].此外,PR1a 蛋白质在水稻-白叶枯病菌互作反应中也发生了上调^[9],说明水稻 PR1a 对生物和非生物胁迫都较为敏感,可作为广谱的蛋白质标志物.PR2 在水分和盐胁迫下被诱导,可以推测其在水分和盐胁迫应答中发挥作用.PR3 在热和淹胁迫中的表达下调,在盐胁迫中表达上调.PR5 和 PR16 的表达模式相似,二者在除冷胁迫之外的胁迫中(热、旱、淹和盐)都发生了下调变化,说明这 2 个蛋白质的表达对胁迫反应也较为敏感.PR8 在冷和旱胁迫中表达上调,在淹和盐胁迫中表达下调.PR15 在所有的胁迫反应中均未见到表达的变化,说明该蛋白质对胁迫不太敏感,或许该蛋白质在水稻中发挥更为保守的作用.本研究提供了特定 PR 蛋白质参与逆境应答反应的初步证据,从表达特征还可以推测它们在逆境胁迫过程中发挥着不同的作用.另外,这些数据也为水稻耐逆机理中候选基因的选择提供了一定的实验依据.

对 PR 基因启动子区的调控元件进行分析,在 8 个 PR 中都鉴定到与逆境胁迫相关的元件.据报道,拟南芥在高盐、干旱和低温胁迫下发生转录变化的 miRNA 其启动子区也存在 ARE、ABRE、MBS、HSE、LTR 和 TC-rich repeats 等元件^[45],在

水稻的热激反应因子中启动子区有 HSE、ABRE、LTR 和 MBS 等元件的存在^[46],棉花的 GhDREB1 基因可在低温和盐胁迫下被诱导,但不被脱落酸和干旱诱导,对其启动子分析发现有与低温胁迫有关的调控元件(LTR)和赤霉素诱导相关的元件(P-box)^[47].根据我们对 PR 启动子区调控元件的分析(表 1),PR2 和 PR3 启动子区存在较多的逆境胁迫相关的顺式元件,它们在 6 种逆境胁迫下有 4 种发生了可见的蛋白质表达变化,虽然 PR1a 中的启动子区只存在 3 个与逆境胁迫相关的顺式元件,但其在所有逆境胁迫下均发生了蛋白质的表达变化.在 PR15 的启动子区只有 ARE,而没有其他的逆境相关元件,该蛋白质的表达在参试的逆境反应中均没有发生变化.通过 PR 蛋白质在逆境胁迫下的表达模式与 PR 启动子区调控元件的对应分析,我们获得一些有意思的关联信息,但真正的对应关系还需实验数据的支持.PR 蛋白质在不同胁迫过程中的功能可能存在着重叠性,不同启动子元件间的功能也可能存在交叉,使表达特征与调控元件间的对应关系分析变得很复杂,但随着表达数据的积累,可以预期获得有效的信息.

本实验采用基于抗体的蛋白质组学策略,对 8 个 PR 蛋白质在非生物逆境胁迫下的表达特征进行了系统的调查.可以设想,在更大范围内对 PR 蛋白质的表达进行调查,将有助于了解水稻 PR 蛋白质的功能相关性.另外,对主要水稻生长逆境的并行调查将能更好地了解 PR 蛋白质的功能多样性和复杂性.

参 考 文 献

- [1] Smirnov N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*, 1993, **125**(1): 27-58
- [2] Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 2005, **24**(1): 23-58
- [3] Kasuga M, Liu Q, Miura S, *et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol*, 1999, **17**(3): 287-291
- [4] Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, *et al.* Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, **9**(4): 436-442
- [5] Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 1995, **7**(7): 1099-1111
- [6] van Loon L C. The nomenclature of pathogenesis-related proteins. *Physiol Mol Plant P*, 1990, **37**(3): 229-230
- [7] Agrawal G, Rakwal R, Jwa N S, *et al.* Signalling molecules and

- blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. *Plant Physiol Bioch*, 2001, **39**(12): 1095–1103
- [8] Hou M, Xu W, Bai H, *et al.* Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* *pv.* *oryzae*. *Plant Cell Rep*, 2012, **31**(5): 895–904
- [9] Wu Q, Hou M, Li L, *et al.* Induction of pathogenesis-related proteins in rice bacterial blight resistant gene Xa21-mediated interactions with *Xanthomonas Oryzae* *pv.* *Oryzae*. *J Plant Pathol*, 2011, **93**(2): 455–459
- [10] Schweizer P, Buchala A, Silverman P, *et al.* Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. *Plant Physiol*, 1997, **114**(1): 79–88
- [11] Park C H, Kim S, Park J Y, *et al.* Molecular characterization of a pathogenesis-related protein 8 gene encoding a class III chitinase in rice. *Mol Cells*, 2004, **17**(1): 144–150
- [12] Agrawal G K, Rakwal R, Jwa N-S. Differential induction of three pathogenesis-related genes, PR10, PR1b and PR5 by the ethylene generator ethephon under light and dark in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *J Plant Physiol*, 2001, **158**(1): 133–137
- [13] Rodrigo I, Vera P, Frank R, *et al.* Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Mol Biol*, 1991, **16**(5): 931–934
- [14] Singh N K, Bracker C A, Hasegawa P M, *et al.* Characterization of osmotin A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiol*, 1987, **85**(2): 529–536
- [15] Stintzi A, Heitz T, Kauffmann S, *et al.* Identification of a basic pathogenesis-related, thaumatin-like protein of virus-infected tobacco as osmotin. *Physiol Mol Plant P*, 1991, **38**(2): 137–146
- [16] Seo P J, Lee A K, Xiang F, *et al.* Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell physiol*, 2008, **49**(3): 334–344
- [17] Seo P J, Kim M J, Park J Y, *et al.* Cold activation of a plasma membrane - tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2010, **61**(4): 661–671
- [18] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem Bioph Res Co*, 2000, **274**(1): 157–165
- [19] Agrawal G K, Rakwal R, Jwa N S. Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochem Bioph Res Co*, 2000, **278**(2): 290–298
- [20] Agrawal G K, Rakwal R, Jwa N-S, *et al.* Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: a model illustrating components participating during defence/stress response. *Plant Physiol Bioch*, 2001, **39**(12): 1095–1103
- [21] Datta K, Tu J, Oliva N, *et al.* Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci*, 2001, **160**(3): 405–414
- [22] Wang N, Xiao B, Xiong L. Identification of a cluster of *PR4-like* genes involved in stress responses in rice. *J Plant Physiol*, 2011, **168**(18): 2212–2224
- [23] Datta K, Velazhahan R, Oliva N, *et al.* Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**(6): 1138–1145
- [24] Rethinasamy V, Chen-Cole K, Anuratha C S, *et al.* Induction of thaumatin-like proteins (TLPs) in *Rhizoctonia solani*-infected rice and characterization of two new cDNA clones. *Physiol Plantarum*, 1998, **102**(1): 21–28
- [25] Naseri G, Sohani M M, Pourmassalehghou A, *et al.* In planta transformation of rice (*Oryza sativa*) using thaumatin-like protein gene for enhancing resistance to sheath blight. *Afr J Biotechnol*, 2012, **11**(31): 7885–7893
- [26] Park C H, Kim S, Park J Y, *et al.* Molecular characterization of a pathogenesis-related protein 8 gene encoding a class III chitinase in rice. *Mol Cells*, 2004, **17**(1): 144–150
- [27] Takeuchi K, Gyohda A, Tominaga M, *et al.* RSOsPR10 expression in response to environmental stresses is regulated antagonistically by jasmonate/ethylene and salicylic acid signaling pathways in rice roots. *Plant Cell Physiol*, 2011, **52**(9): 1686–1696
- [28] Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, *et al.* A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly *via* the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45**(5): 550–559
- [29] 朱廷恒, 罗红丽, 宋凤鸣, 等. 水稻病程相关蛋白基因 *OsPR-4b* 启动子的克隆及缺失体构建. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2005, **31**(1): 22–26
- Zhu T H, Luo H L, Song F M, *et al.* *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2005, **31**(1): 22–26
- [30] Rushton P J, Reinstadler A, Lipka V, *et al.* Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*, 2002, **14**(4): 749–762
- [31] Yamaguchi-shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, **6**(2): 251–264
- [32] Wang H, Datla R, Georges F, *et al.* Promoters from *kin1* and *cor6.6*, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. *Plant Mol Biol*, 1995, **28**(4): 605–617
- [33] Kizis D. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J*, 2002, **30**(6): 679–689
- [34] 刘国振, 刘斯奇, 吴琳, 等. 基于抗体的水稻蛋白质组学——开

- 端与展望. 中国科学: 生命科学, 2011, **41**(3): 173-177
- Liu G Z, Liu S Q, Wu L, *et al.* Scientia Sinica Vitae, 2011, **41**(3): 173-177
- [35] 刘雨萌, 兰金苹, 曹英豪, 等. 水稻类钙调磷酸酶亚基 B 蛋白质在叶片生长和白叶枯病抗性反应中的表达. 植物学报, 2012, **47** (5): 483-490
- Liu Y M, Lan J P, Cao Y H, *et al.* Chin Bull Bot, 2012, **47**(5): 483-490
- [36] 刘 钊, 贾 霖, 贾 盟, 等. 水稻 PP2Ac 类磷酸酶蛋白质在盐胁迫下的表达. 中国农业科学, 2012, **45**(12): 2339-2345
- Liu Z, Jia L, Jia M, *et al.* Scientia Agricultura Sinica, 2012, **45**(12): 2339-2345
- [37] 贾 霖, 刘雨萌, 范 伟, 等. 水稻类钙调磷酸酶亚基 B 蛋白质在逆境胁迫下的表达研究. 中国农业科学, 2013, **46**(1): 1-8
- Jia L, Liu Y M, Fan W, *et al.* Scientia Agricultura Sinica, 2013, **46**(1): 1-8
- [38] Hoagland D R, Arnon D I. The water-culture method for growing plants without soil. Calif Agric Expt Sta Cir, 1950, **347**(2): 32
- [39] SCH GGER H. Tricine-SDS-PAGE. Nat Protoc, 2006, **1**(1): 16-22
- [40] 陈 浩, 李莉云, 白 辉, 等. 水稻 U-Box 蛋白质在不同发育时期的表达分析. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(9): 1208-1214
- Chen H, Li L Y, Bai H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2009, **36**(9): 1208-1214
- [41] Li X, Bai H, Wang X, *et al.* Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. J Exp Bot, 2011, **62**(14): 4763-4772
- [42] Wang Y S, Pi L Y, Chen X, *et al.* Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. Plant Cell, 2006, **18**(12): 3635-3646
- [43] Rombauts S, Déhais P, van Montagu M, *et al.* PlantCARE, a plant *cis*-acting regulatory element database. Nucl Acid Res, 1999, **27**(1): 295-296
- [44] Lescot M, Déhais P, Thijs G, *et al.* PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucl Acid Res, 2002, **30** (1): 325-327
- [45] Liu H H, Tian X, Li Y J, *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA, 2008, **14**(5): 836-843
- [46] Mittal D, Chakrabarti S, Sarkar A, *et al.* Heat shock factor gene family in rice: genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. Plant Physiol Bioch, 2009, **47**(9): 785-795
- [47] Shan D P, Huang J G, Yang Y T, *et al.* Cotton GhDREB1 increases plant tolerance to low temperature and is negatively regulated by gibberellic acid. New Phytol, 2007, **176**(1): 70-81

The Expression Profiling of Rice Pathogenesis-related Proteins in Seedling Stage Under Environmental Stresses*

GAO Qing-Hua**, ZENG Xiang-Ran**, JIA Lin, NIU Dong-Dong, LI Xue-Jiao, GUAN Ming-Li, JIA Meng, LAN Jin-Ping, DOU Shi-Juan, LI Li-Yun, LIU Li-Juan, LIU Guo-Zhen***

(College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract The transcription of plant pathogenesis related (*PR*) genes were known to be induced by pathogen invasion. Immerging evidences revealed that the transcription of *PR* genes also up-regulated under abiotic stresses, however, limited data for *PR* proteins expression was reported. To characterize the expression of rice *PR* proteins under stresses, we examined the expressions of eight *PR* proteins under cold, hot, drought, submerge and salt stresses at seedling stage by Western blotting (WB) via antibody-based proteomics strategy. The results showed that the expressions of *PR8* was up-regulated under cold stress, the expressions of *PR1a*, *PR3*, *PR5* and *PR16* were down-regulated under hot stress. The expressions of *PR1a*, *PR2* and *PR8* were up-regulated while *PR5* and *PR16* were down-regulated under drought stress, the expressions of *PR1*, *PR2* and *PR15* were up-regulated and *PR1a*, *PR3*, *PR5* and *PR8* were down-regulated under submerge stress. The expressions of *PR2* and *PR3* were up-regulated while *PR1a*, *PR5*, *PR8* and *PR16* were down-regulated under salt stress. In addition, a number of stress responsive *cis*-elements, such as the ABRE, TC-rich repeats and HSE, were identified in the promoter region of *PR* genes. These data supported that *PR* proteins play important and specific roles in the process of stress tolerance.

Key words rice, pathogenesis-related proteins, Western blotting (WB), abiotic stress, promoter

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00014

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31171528).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-312-7528787, E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

Received: January 10, 2013 Accepted: April 26, 2013