文章编号:1000-5773(2008)04-0370-07

水稻种子萌发期高压诱导的 SSH-cDNA 文库构建与分析*

刘勋成[1,2],张 美[1],段 俊[1]

(1. 中国科学院华南植物园,广东广州 510650;
2. 中国科学院研究生院,北京 100039)

摘要:为了研究高压处理对高等植物基因表达的影响,以萌发过程中经高压处理后的水稻种子的 mRNA 作为检测子(Tester),以对照样品的 mRNA 作为驱动子(Driver),采用抑制差减杂交(SSH)结合镜像选择技术(MOS)构建了高压处理后水稻种子萌发过程中诱导表达的差减 cDNA 文库,并通过蓝白斑筛选获得了 580 个重组克隆。菌液 PCR 检测结果表明,这些克隆中的插入片段的大小主要分布在 200～1 000 bp 之间,平均大小约为 575 bp,其中单一扩增条带的有效重组克隆数为 542 个,有效的重组克隆率为 93.3%。对部分重组克隆进行测序发现,受高压诱导表达的基因主要涉及到代谢、胁迫响应、转录调控等方面。为高压处理后水稻种子基因表达模式变化的研究打下了基础。

关键词:高压;抑制差减杂交;水稻
中图分类号:O521.21 **文献标识码**:A

1 引 言

高压生物学是由高压物理学和生物学发展起来的一门新的交叉学科。近年来,随着高压物理学技术的进步和分子生物学技术的发展,高压生物学已成为一个新的研究热点[1]。高压能对生物体产生强烈的胁迫效应,高压处理能改变生物体的染色质的结构[2],影响遗传物质 DNA 的完整性[3],并能引起酵母、大肠杆菌等微生物基因表达模式的改变[4-6]。

近年来,高压作为一种新的诱变源被引入到高等植物水稻的诱变育种研究中。李桂双等研究发现,高压处理可以诱导水稻在当代及后代中发生株高、分蘖数、生长期、叶鞘及籽粒颜色等性状的变异,并获得了一系列可稳定遗传的突变体[7]。目前,对高压影响水稻生长发育及诱发水稻产生变异的机理研究报道甚少。在转录水平上研究高压处理后水稻种子中基因表达模式的变化,能为高压作用的机理研究提供有意义的信息。本研究以未经高压处理和经 75 MPa 高压处理后的水稻种子为实验材料,采用抑制差减杂交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH)结合镜像选择技术(Mirror Orientation Selection, MOS),首次成功地建立了高压处理后水稻种子萌发过程中诱导表达的差减 cDNA 文库,并对文库中的部分重组克隆进行了测序分析。本实验为研究高压对水稻的生物学效应和在高压处理后基因表达模式的变化提供了重要的信息。

* **收稿日期**:2007-11-28;**修回日期**:2008-03-28
基金项目:广东省自然科学基金重点项目(05103637);华南植物园科研启动经费(0553011001);广东省科技攻关计划项目(2006B20201016)
作者简介:刘勋成(1979—),男,博士研究生,主要从事植物分子生物学研究. E-mail:lxc06981@163.com
通讯作者:段 俊,男,博士,研究员,博士生导师,主要从事植物遗传育种与生物技术研究.
E-mail:duanj@scib.ac.cn

2　材料与方法

2.1　植物材料与高压处理

以水稻籼稻品种粤丰占的种子为实验材料。水稻种子在 30 ℃浸种 12 h 后,将种子分为 2 份,分别用装满水的小塑料袋密封,将一部分种子置于常压(0.1 MPa)下作为对照,另一部分种子在 75 MPa 的高静水压下进行处理,12 h 后取出对照及高压处理后的种子进行液氮速冻处理,并储藏于－70 ℃的冰箱中备用。

2.2　试剂

植物"RNAOUT"试剂盒购自天泽基因公司,FastTrack® AG mRNA Isolation Kits 购自 Invitrogen 公司,BD PCR-Select cDNA Subtraction Kit 购自 Takara 公司,pGEM T-easy Vector 购自 Promega 公司,DNA Marker 和 DNA Polymerase 购自 Takara 公司,其余的常规试剂均为国产或进口的分析纯试剂。

2.3　总 RNA 的提取

水稻种胚总 RNA 的提取采用天泽基因公司的植物"RNAOUT"试剂盒,具体方法参考操作说明书。

2.4　mRNA 的分离

采用 FastTrack® MAG mRNA Isolation Kits 试剂盒分离水稻种胚 mRNA,具体步骤参考说明书。

2.5　抑制差减杂交

抑制差减杂交根据 Takara 公司的 BD PCR-Select cDNA Subtraction Kit 的操作说明书进行。分别取 2 μg 对照及高压处理后水稻种胚的 mRNA,以高压处理的样品 mRNA 作为检测子(Tester),以对照样品的 mRNA 作为驱动子(Driver),逆转录合成 cDNA,并将 cDNA 进行 *Rsa* Ⅰ酶切,酶切产物纯化后分别连接不同的接头 Adaptor1 和 Adapter2R,并将这两种连接不同接头的 cDNA 按照操作步骤进行两轮杂交和两轮 PCR 扩增。

2.6　镜像选择(MOS)

具体实验步骤参考 Rebrikov 等[8]的方法。分别取 150 ng 经过两轮 PCR 扩增后的产物,用 *Sma* Ⅰ酶在 37 ℃消化 3 h,消化产物纯化后在 68 ℃进行 4 h 的 MOS 杂交,然后采用巢式引物 NP2Rs(5'-GGTCGCGGCCGAGGT-3')进行扩增。

2.7　差减文库的构建

将经镜像选择后的产物连接到 pGEM T-easy 载体上,通过热击法转化到大肠杆菌 JM109 中,形成 cDNA 质粒文库,并涂于含 Amp 的 LB/X-gal/IPTG 的培养基上,通过蓝白斑筛选阳性克隆。超级感受态的制备及大肠杆菌的转化等方法参考《分子克隆实验指南》[9]上的方法进行。

2.8　重组子的 PCR 检测鉴定

挑取转化平板上的白色菌落至 1 mL 的添加 Amp 的 LB 培养基中,37 ℃摇菌培养 20 h 后,取 1 μL 的菌液为模板,以 NP2Rs 引物进行 PCR 反应检测插入的片段。

2.9　重组克隆的测序与序列同源性比对

从 SSH-cDNA 差减文库中随机挑出 63 个重组克隆,寄送到上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列的测定,将所获得的序列在 NCBI 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)中与收录的序列进行同源性检索比对。

3　实验结果

3.1　种子总 RNA 的质量

由于水稻种子中多糖含量较高,为较高质量总 RNA 的提取带来一定的困难,使用常规的 Trizol 等试剂提取的 RNA 难以满足实验的需要。

在本实验中,采用天泽基因公司的植物"RNAOUT"试剂盒提取种子总 RNA。提取的 RNA 经分光光度计检测,OD260/OD280 的值在 1.8～2.2 之间,说明提取的 RNA 纯度较高;1%琼脂糖凝胶电泳

检测结果(图 1)表明,提取的总 RNA 未出现明显的降解,呈明显的 28S、18S 条带,证实提取的 RNA 完整性较好。

3.2 mRNA 的质量

采用 Invitrogen 公司的 FastTrack® mRNA 分离试剂盒分离 mRNA。分离的 mRNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,电泳图谱(图 2)表明分离的 mRNA 呈弥撒状分布,无明显的 18S、28S 亮带,大小主要分布在 100～1 500 bp 之间。

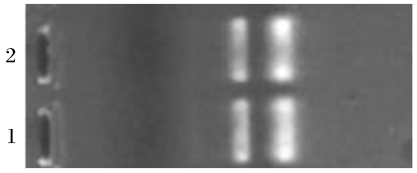


图 1 水稻种子总 RNA 电泳图谱
(1. 对照种子的 RNA;
2. 经高压处理的种子的 RNA)
Fig. 1 Electrophophoresis pattern of total RNA of rice seeds
(1. Total RNA of control seeds;
2. Total RNA of high pressure treated seeds)

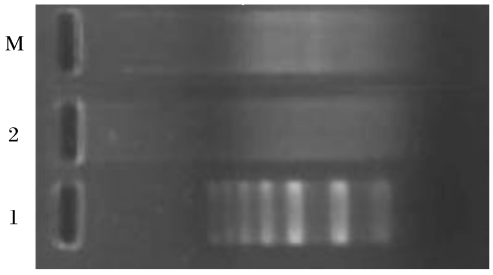


图 2 分离的 mRNA 电泳图谱
(M. 2kb RNA ladder;1. 对照种子的 mRNA;
2. 经高压处理的种子的 mRNA)
Fig. 2 Electrophoresis pattern of isolated mRNA
(M. 2kb RNA ladder;1. mRNA of control seeds;
2. mRNA of high pressure treated seeds)

3.3 抑制差减杂交第一轮及第二轮 PCR 结果

图 3、图 4 所示分别为抑制差减杂交后的第一轮及第二轮 PCR 的电泳检测结果。由图 3 可以看出,经过第一轮 PCR 扩增后,经差减杂交的 cDNA 样品的电泳条带较弱,大小主要分布在 200～1 500 bp 之间,而未经抑制差减杂交的 cDNA 的条带较亮,且大小的分布明显超出 200～2 000 bp 的范围。从图 4 可以看出经过第二轮 PCR 后,在差减杂交样品的电泳图谱中可以看到数条隐约可见的条带,而未差减的 cDNA 样品则呈现弥散状分布,无明显的特异条带扩增。说明在本实验中,经差减杂交的 cDNA 样品在经过两轮 PCR 扩增后非目的片段大大减少,差异表达的 cDNA 得到有效地富集和扩增。

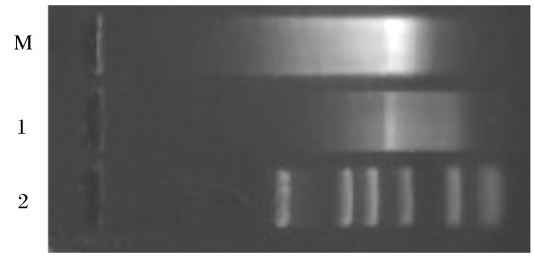


图 3 cDNA 第一轮 PCR 后的质量检测
(M. DL 2000 Marker;
1. 差减杂交后的第一轮 PCR 结果;
2. 未经差减杂交后的第一轮 PCR 结果)
Fig. 3 Detection of cDNA after first PCR
(M. DL 2000 Marker;
1. The first PCR products of subtracted sample;
2. The first PCR products of control seeds)

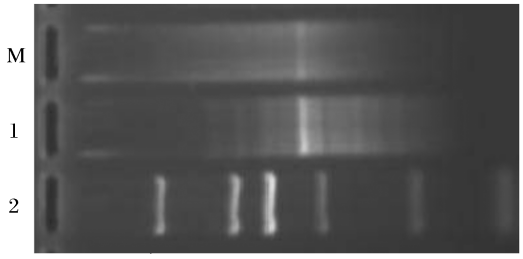


图 4 cDNA 第二轮 PCR 后的质量检测
(M. DL 2000 Marker;
1. 差减杂交后的第二轮 PCR 结果;
2. 未经差减杂交后的第二轮 PCR 结果)
Fig. 4 Detection of cDNA after second PCR
(M. DL 2000 Marker;
1. The second PCR products of subtracted sample;
2. The second PCR products of control seeds)

3.4　镜像选择后 cDNA 文库的检测

图 5 所示为抑制差减杂交的 cDNA 经过 MOS 反应和未经 MOS 反应的电泳图。结果显示使用 MOS 技术对抑制差减杂交得到的 cDNA 样品进行处理后,电泳图谱中背景分子显著减少,同时出现了明显的条带,说明差异表达的 cDNA 被进一步地富集。

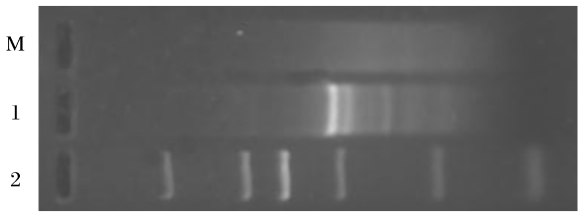


图 5　镜像选择后差减 cDNA 文库的检测

(M. DL2000 Marker;1. 抑制差减杂交的 cDNA 经过 MOS 反应后的产物;2. 抑制差减杂交后的 cDNA)

Fig. 5　Detection of subtracted cDNA library after MOS

(M. DL2000 Marker;1. The products of subtracted cDNA library after MOS;2. The products of subtracted cDNA library)

3.5　重组子的 PCR 检测结果

差减杂交后的产物连接到 pGEM T-easy载体并转化到大肠杆菌 JM109 后,通过蓝白斑筛选得到 580 个重组克隆。图 6 所示为重组克隆的菌落 PCR 检测的电泳结果。电泳图谱显示,这些重组克隆中插入片段的大小不等,分布在 200～1 000 bp 之间,插入片段的平均大小约为 575 bp。经统计,在筛选的 580 个克隆中,PCR 检测结果为单一扩增条带的有效克隆数为 542 个,占全部克隆的 93.4%。

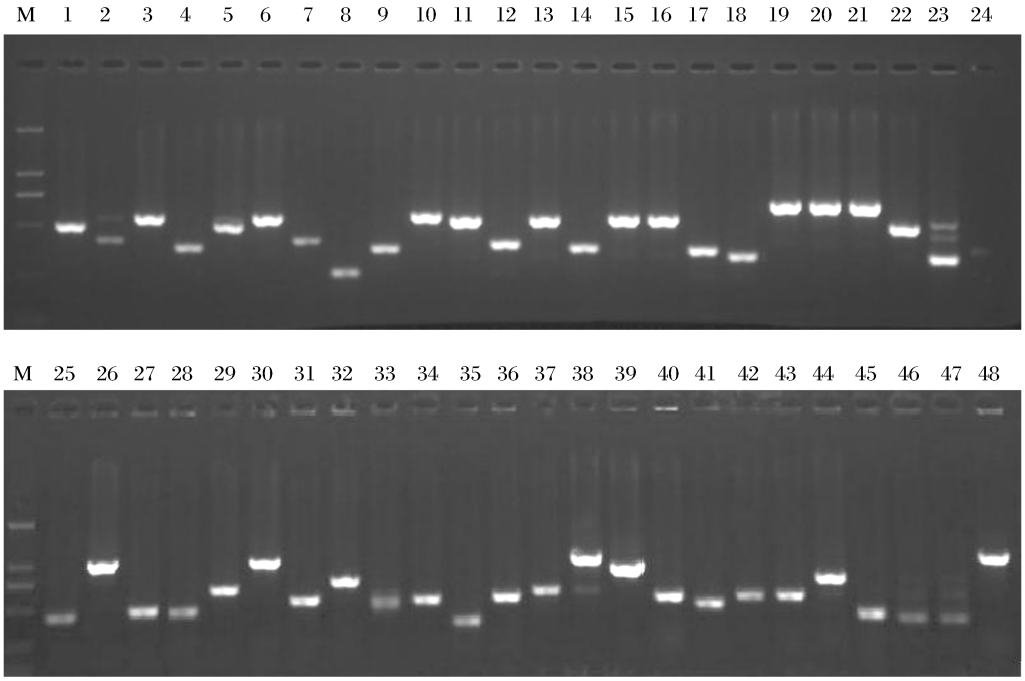


图 6　部分重组子的 PCR 鉴定(M. DL 2000 Marker;1～48. 筛选出的重组克隆)

Fig. 6　Identification of some recombinants by using PCR(M. DL 2000 Marker;1～48. Selected recombinant clones)

3.6　cDNA 文库重组克隆的测序结果

在高压诱导表达的 cDNA 文库中,随机挑取了 63 个重组克隆进行测序,得到了 30 个有效的 cDNA 序列(见表 1),其中 17 个为功能已知的基因序列,11 个为未知功能的基因序列,另外 2 个与已知的 cDNA序列同源性很低。由表 1 可以看出,这些已知的受高压诱导表达的基因主要涉及到代谢、胁迫响应、转录调控等方面。

表 1 高压诱导表达的基因

Table 1 Genes induced by high hydrostatic pressure

	Clone ID	Length/(bp)	Accession number	Homology
Metabolism (Carbohydrate metabolism, protein storage and biosynthesis)	H47	530	X05662	Glutelin type Ⅰ
	H120	501	AB016501	Glutelin
	H139	509	AJ251899	S-adenosylmethionine decarboxylase 2
	H149	920	AAR13692	Fe^{2+} dioxygenase-like protein
	H388	340	AF156714	Prolamin (RP5) gene
	H416	470	AF194115	Prolamin 7 gene
Defense response (Response to oxidation, protein ubiquitination)	H9	456	AK103694	Glyoxalase Ⅰ
	H102	728	D01000	Copper/zinc-superoxide dismutase(Cu/Zn SOD)
	H105	434	AB059239	Glycine rich protein
	H342	324	AF198626	Copper chaperone(CCH)
	H407	278	AAU14999	MtN19-like protein
	H513	951	AF184280	Polyubiquitin(RUBQ2) gene
	H532	741	AK121978	Cell death-related protein SPL11
	H545	500	AK101323	Heat shock protein 90(HSP90)
Transcriptional regulation	H97	934	AK102071	Arginine/serine rich splicing factor 1
	H145	936	AJ575228	TA4 protein
	H284	284	AK067029	ADP-ribosylation factor
Unknown protein	H128	332	ABF95824	
	H232	328	AK072775	
	H274	556	AK066751	
	H334	496	AK240743	
	H335	341	AP008214	
	H370	1150	AAV44205	
	H394	496	AK122111	
	H467	521	AK073700	
	H469	802	AK066751	
	H473	591	AK067080	
	H490	662	AK067980	
Novel gene	H259	335		
	H557	254		

4 讨 论

抑制差减杂交是 Diatchenko 等人[11]在 1996 年将杂交和 PCR 技术完美结合起来而建立的一种新的筛选差异表达基因的技术,此技术应用两次差减杂交和两次抑制性 PCR,在差减杂交过程中使丰度不同的 cDNA 拷贝数趋于均衡,保证了较低丰度的差异表达基因也能得到有效地扩增。抑制差减杂交技术与其它差异基因分离方法如 mRNA 差异显示(DDRT-PCR)、cDNA 代表性差异分析(cDNA-RDA)和 cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)等技术相比具有灵敏度高、假阳性率较低的特点,表现出了独特的优越性[10-12]。

在本实验中,经过第一轮 PCR 扩增后,检测发现未经抑制差减杂交的 cDNA 样品的条带较亮,且大小的分布超出 200～2 000 bp 的范围,而经差减杂交的 cDNA 样品的电泳条带明显较弱,其大小主要分布在 200～1 500 bp 之间,说明在第一轮 PCR 扩增后经差减杂交的样品中非目 cDNA 片段的相对含量大大减少;经过第二轮的 PCR 扩增后,检测发现未差减的 cDNA 样品呈现弥散状分布,而在经差减杂交样品的电泳图谱中可以看到数条隐约可见的条带,说明高压诱导表达的基因得到有效的富集和扩增。本研究证实了抑制差减杂交是一种有效的分离差异表达基因的方法。

镜像选择技术是 Rebrikov 等人[8]提出的一种能有效降低或消除 SSH 文库中非差异表达的转录本背景克隆(假阳性克隆)的方法,该技术基于目标克隆和背景克隆的差异(每种背景克隆分子都只有一个

与 SSH 中两个不同的接头序列相应的方向,而真正差异表达的目标 cDNA 片段都具有两个序列方向)能选择性的剔除差减 cDNA 文库中的假阳性克隆。在本实验中,我们将镜像选择技术作为抑制差减杂交技术的一种改进措施,首次应用到高压处理后水稻种子萌发过程中被诱导表达的 cDNA 文库的构建中。实验结果表明,差减杂交后的 cDNA 样品在经过镜像选择处理后,电泳图谱中出现了明显的条带,且差减 cDNA 文库中的背景分子显著地减少,说明镜像选择处理降低了高压诱导表达的差减 cDNA 文库的假阳性率。

在本研究中,我们利用抑制差减杂交结合镜像选择技术首次成功地构建了高压处理后水稻种子萌发过程中被诱导表达的 cDNA 文库,并通过筛选获得了 580 个重组克隆,随机的挑取了 63 个重组克隆进行测序,得到了 30 个有效的 cDNA 序列,序列比对分析表明这些受高压诱导表达的基因主要涉及到代谢、胁迫响应、转录调控等方面。

4.1　高压诱导代谢相关基因的表达

在本研究中,受高压诱导表达的与代谢相关的基因主要为储藏蛋白代谢相关的基因,包括 Glutelin、Glutelin type Ⅰ、Prolamin 和 Prolamin 7。水稻种子发芽涉及到储藏蛋白的降解和能量的消耗等一系列复杂的代谢过程。谷蛋白和醇溶谷蛋白是水稻种子中主要的储藏蛋白,分别占种子胚乳谷蛋白总量的 60%～75% 和 18%～20%[13]。在种子的发芽过程中,胚乳中的储藏蛋白降解为氨基酸和其它的简单化合物,以提供呼吸和其它代谢途径的能量[14]。在本研究中,在 75 MPa 的高静水压处理后,水稻种子中一些储藏蛋白代谢相关基因的表达模式发生了变化,4 个储藏蛋白合成相关的基因 Glutelin、Glutelin Type Ⅰ、Prolamin 和 Prolamin 7 的表达上调,该结果表明高压处理可能抑制了种子中储藏蛋白的降解,从而减少了发芽过程中能量的供应而抑制了种子的发芽。我们在前期的实验中也发现,在高压处理后,水稻种子的发芽率和成苗率降低,这可能与高压抑制储藏蛋白降解有关[15]。本研究为合理解释高压处理后,水稻种子发芽率和成苗率降低的原因提供了重要信息。

4.2　高压诱导胁迫响应相关基因的表达

在本研究中,在高压诱导表达的 cDNA 文库中还获得了 8 个与胁迫响应相关的基因,这些基因包括 Glyoxalase Ⅰ、Cu/Zn SOD、CCH、Glycine Rich Protein、MtN19-Like Protein、HSP90、Polyubiquitin 和 Cell Death-Related Protein。在这些基因中,Cu/Zn SOD 和 CCH 为氧化胁迫相关的基因,Cu/Zn SOD 属于金属酶家族基因,催化超氧阴离子形成 O_2 和 H_2O_2,该基因的功能在于清除细胞中的过量的氧化自由基,从而保护细胞防止氧化损伤[16]。CCH 是一种金属酶分子伴侣,该基因能键合 Cu 离子并传递给 Cu/Zn SOD,在抗氧化代谢途径中起到重要作用[17]。Cu/Zn SOD 和 CCH 的诱导表达表明,高压处理过程中,水稻种子中可能发生了活性氧的积累和氧化损伤事件。

另外,在我们选取的测序的重组克隆中,得到了 11 个功能未知的基因序列,这些序列功能的探明能为高压引起的生物学效应提供更多的信息,后续工作尚在进行之中。

References:

[1] Winter R. High Pressure Effects in Molecular Biophysics [A]//Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi", Course CXLVII on High Pressure Phenomena [C]. Amsterdam: IOS, 2002: 413-453.

[2] Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, et al. Hsp70 Accumulation in Chondrocytic Cells Exposed to High Continuous Hydrostatic Pressure Coincides with mRNA Stabilization Rather than Transcriptional Activation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2319-2324.

[3] Dixon D R, Pruski A M, Dixon L R J, et al. The Effects of Hydrostatic Pressure Change on DNA Integrity and Embryonic Development in the Hydrothermal-Vent Mussel *Bathymodiolus Azoricus*: Implications for Future Deep-Sea Mutagenicity Studies [J]. Mutation Research, 2004, 552: 235-246.

[4] Iwahashi H, Odani M, Ishidou E, et al. Adaptation of *Saccharomyces Cerevisiae* to High Hydrostatic Pressure Causing Growth Inhibition [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 2847-2852.

[5] Fernandes P M, Domitrovic T, Kao C M, et al. Genomic Expression Pattern in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells in Response to High Hydrostatic Pressure [J]. FEBS Letters, 2004, 556: 153-160.

[6] Vogel R F, Pavlovic M, Hormann S, et al. High Pressure-Sensitive Gene Expression in *Lactobacillus Sanfranciscensis* [J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38: 1247-1252.

[7] Li G S, Bai C K, Duan J, et al. Research on Mutation in Rice (*Oryza Sativa L.*) Induced by High Hydrostatic

Pressure [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2006, 20(4): 421-428. (in Chinese)
李桂双,白成科,段 俊,等. 高静水压诱导水稻产生突变的研究 [J]. 高压物理学报, 2006, 20(4): 421-428.
[8] Rebrikov D V, Britanova O V, Gurskaya N G, et al. Mirror Orientation Selection (MOS): A Method for Eliminating False Positive Clones from Libraries Generated by Suppression Subtractive Hybridization [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: E90.
[9] Sambrook J, Russell D. Molecular Clone: A Laboratory Manual (3rd ed) [M]. Translated by Huang P T. Beijing: Science Press, 2002: 93-96. (in Chinese)
Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南(第3版) [M]. 黄培堂,译. 北京:科学出版社, 2002: 93-96.
[10] Ji W, Wright M B, Cai L, et al. Efficacy of SSH PCR in Isolating Differentially Expressed Genes [J]. BMC Genomics, 2002, 20: 3-12.
[11] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression Subtractive Hybridization: A Method for Generating Differentially Regulated or Tissue-Specific cDNA Probes and Libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030.
[12] Li G C, Jin L P, Xie K Y, et al. The Principle of Suppression Subtractive Hybridization Technique and Its Application in Plant Gene Isolation [J]. China Biotechnology, 2004, 24(9): 26-34. (in Chinese)
李广存,金黎平,谢开云,等. 抑制差减杂交(SSH)技术及其在植物基因分离上的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(9): 26-34.
[13] Su P H, Yu S M, Chen C S, et al. Spatial and Temporal Expression of a Rice Prolamin Gene RP5 Promoter in Transgenic Tobacco and Rice [J]. Plant Physiol, 2001, 158(2): 247-254.
[14] Mandal S, Mandal R K. Seed Storage Proteins and Approaches for Improvement of Their Nutritional Quality by Genetic Engineering [J]. Current Science, 2000, 79(5): 576-589.
[15] Bai C K, Li G S, Duan J, et al. Effect of High Hydrostatic Pressure on Seeds Germination and Seedling Isoenzyme in Rice (*Oryza sativa L.*) [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2003, 17(4): 283-289. (in Chinese)
白成科,李桂双,段 俊,等. 高静水压对水稻种子萌发及同工酶的影响 [J]. 高压物理学报, 2003, 17(4): 283-289.
[16] McCord J M, Fridovich I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein) [J]. J Biol Chem, 1969, 244(3): 6049-6055.
[17] Hwang I K, Eum W S, Yoo K-Y, et al. Copper Chaperone for Cu, Zn-SOD Supplement Potentiates the Cu, Zn-SOD Function of Neuroprotective Effects against Ischemic Neuronal Damage in the Gerbil Hippocampus [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(3): 392-402.

Construction and Analysis of SSH-cDNA Library Induced by High Pressure in Rice Seeds during Germination

LIU Xun-Cheng[1,2], ZHANG Mei[1], DUAN Jun[1]

(1. *South China Botanic Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou* 510650, *China*;
2. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: In order to study the effect of expression pattern of high hydrostatic pressure on high plant, a SSH-cDNA library was constructed with rice germinating seeds in this paper. Suppression subtractive hybridization (SSH) in combination with mirror orientation selection (MOS) was performed using the mRNA from rice germinating seeds treated by 75 MPa high hydrostatic pressure as tester and the mRNA from control (seeds untreated by high hydrostatic pressure) as the driver. 580 recombinant clones were picked through blue/white screening. PCR detection of the recombinant clones showed that the size of inserts mainly ranged from 200 bp to 1 000 bp, and the average size of these inserts were about 575 bp. Among the 580 recombinant clones, 542 clones (93.3%) were identified to be effective single band ones. After sequencing some of the recombinant clones, it was found that the genes induced by high hydrostatic pressure were mainly involved in metabolism, stress response and transcriptional regulation. The research paved the way for studying the gene expression patterns of rice seeds responding to high hydrostatic pressure.

Key words: high hydrostatic pressure; suppression subtractive hybridization (SSH); rice