

玉米 CMS-C 不育系及保持系差异基因的克隆与表达分析

王继玥, 易洪杨, 汪生庆, 曹墨菊

(四川农业大学 玉米研究所, 教育部作物基因资源与遗传改良重点实验室,
农业部西南玉米生物学及遗传育种重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要:以玉米不育系 C48-2 及保持系 N48-2 为材料, 利用 PCR 和 RT-PCR 技术克隆了嵌合 *orf118-b* 并研究了 *cox2* 转录本的结构变化。*orf118-b* 是玉米 C48-2 线粒体基因组特有的嵌合 *orf*, 并能在单核期花药中特异表达。*cox2** 仅在 N48-2 单核期花药中特异表达, *cox2** 是 *cox2* 基因转录本 GRM ZM5G862955_T01 的新注释, 其 5'UTR 区域被延长。利用 Real-Time qPCR 检测了 *cdpk* 在不育系及保持系雄穗发育的花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期的基因表达水平。结果表明, *cdpk* 在 C48-2 的母细胞时期、四分体时期、双核期上调表达, 在 C48-2 的单核期下调表达。这些发现为进一步探索玉米 CMS-C 核质互作导致花粉败育的分子机制提供参考。

关键词:玉米; CMS-C; 嵌合 ORF; 差异表达

中图分类号:S513.03 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)03-0011-05

Cloning and Expression Analysis of Differential Genes Between C-Type Cytoplasmic Sterile Line and Its Maintainer Line in Maize

WANG Ji-yue, YI Hong-yang, WANG Sheng-qing, CAO Mo-ju

(Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Key Laboratory of Crop Genetic Resource and Improvement, Ministry of Education, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Maize in Southwest Region, Ministry of Agriculture, Chengdu 611130, China)

Abstract: *orf118-b* and *cox2** were cloned from sterile line C48-2 and its maintainer line N48-2 in maize by PCR and RT-PCR. *orf118-b* is a specific chimeric open reading frame in mitochondria genome of CMS-C line. *cox2** was special transcript of *cox2* only in N48-2, based on the maize genomic database, 5'UTR region of the transcript was extended comparison to the existed annotation. Expression of *cdpk* between C-Type cytoplasmic male sterility line and maintainer line at the pollen mother cells (PMCs) stage, the tetrad stage, the uninucleate stage and the binuclear stage were determined using Real-Time PCR. The results showed that *cdpk* was up-regulated in C48-2 at mother cell stage, tetrad stage, the binuclear stage, but was down-regulated in C48-2 at binuclear uninucleate stage. This results provide foundation for further explaining molecular mechanism of CMS-C in maize.

Key words: Maize; CMS-C; Chimeric ORF; Differential expression

细胞质雄性不育 (CMS) 广泛存在于多种植物中, 作为重要的种质资源, 在杂种优势利用中发挥重要作用。植物 CMS 分子机制一直是遗传学家和分子生物学家的研究重点。大量研究表明, 植物 CMS 属于功能获得性突变, 花粉败育是由线粒体基因与核基因异常互作导致的^[1]。前人已经在植物线粒

体基因组上发现了许多与 CMS 相关的嵌合基因或者 *orf*, 如玉米 CMS-T 中发现的 *T-urf13*^[2], 向日葵中的 *orf522*^[3], 小麦 T-CMS 中位于线粒体 *cox1* 基因上游的 *orf256*^[4], 水稻 WA-CMS 胞质中特有的 *orfB*^[5]。有学者把与 CMS 相关的基因或者蛋白称为 MCAG (CMS-associated gene or protein), 尽管在许多物种

收稿日期: 2014-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971794)

作者简介: 王继玥 (1984-), 男, 四川南充人, 在读博士, 主要从事玉米雄性不育研究。王继玥、易洪杨为同等贡献作者。

通讯作者: 曹墨菊 (1965-), 女, 河北魏县人, 教授, 博士, 主要从事玉米雄性不育研究。

中都发现了与之相关的 MCAG,但仍然很难揭示导致植物 CMS 的关键机制。主要原因在于 CMS 线粒体基因组上大量存在正常线粒体上没有的 *orf*,以及在高等植物中尚无法进行线粒体的转化,因而无法直接评估可能参与雄性不育的 MCAG 的功能。最近在水稻中发现了一个线粒体嵌合基因 WA352^[6],WA352 在水稻 CMS-WA 绒毡层中大量积累,抑制核基因编码的线粒体蛋白 COX11 的正常功能,使绒毡层细胞过早凋亡,从而导致花粉败育。这一研究证明,线粒体基因和保守核基因之间发生异常的互作会引发线粒体功能紊乱,进而产生败育表型。

玉米 CMS 一般分为 S 型、T 型和 C 型,与 S 型、T 型相比,C 型不育系发现较晚,其败育的分子机制也不够明确。研究表明,植物激素^[7]、同工酶^[8]、活性氧引发的细胞程序性死亡^[9],线粒体基因重排或重组^[10]、RNA 编辑^[11]以及选择性剪接等可能与玉米 CMS 的发生有关。虽然已经对玉米正常胞质和 T 型、S 型以及 C 型不育胞质的线粒体基因组进行了全基因组测序,并且在 CMS-C 线粒体基因组上发现了 725 个 *orf*,但仍无法确定与 CMS-C 直接相关的基因。2012 年 Stephane Bentolila 等^[12]利用高通量测序技术,对水稻不育胞质和正常胞质的线粒体基因组进行了全基因组测序。发现不育胞质和正常胞质的线粒体基因组上都存在大量的基因重组或重排,揭示嵌合基因 *orf126* 可能与水稻 WA-CMS 的表型相关。Igarashi K 等^[13]通过比较水稻不育系及其育性恢复系线粒体基因组差异并结合 Northern Blot 技术,揭示嵌合 *orf113* 是导致水稻 RT98-CMS 败育的关键基因。虽然水稻和玉米的败育机制有所区别,这些发现仍对玉米 CMS 的研究有重要的参考价值。

笔者前期通过转录组测序发现嵌合 *orf118-b* 在 C48-2 中特异表达,*cox2* 基因的 GRM ZM5G862955_T01 转录本 5'UTR 区域被延长,编码钙依赖蛋白激酶(CDPK)的基因在 C48-2 中的表达量比 N48-2 高几十倍。本研究对这些差异表达基因进行克隆和表达分析,以验证转录组测序结果,为进一步研究玉米 CMS-C 的分子机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

玉米 C 型细胞质雄性不育系 C48-2 及其保持系 N48-2,不育系经保持系多代回交。

1.2 线粒体 DNA 和花药总 RNA 的提取

采用汪静等^[14]的方法,分别提取不育系 C48-2 及其保持系 N48-2 的线粒体 DNA。采用 TaKaRa 公

司的 RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒提取 C48-2 和 N48-2 花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期花药总 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测线粒体 DNA 和花药总 RNA 质量。

1.3 cDNA 第一链合成

以 C48-2 和 N48-2 的总 RNA 为模板,采用 TaKaRa 公司去基因组污染的反转录试剂盒反转录合成 cDNA 第一条链。

1.4 PCR 和 RT-PCR

将 *cox2* 基因发生 5'端延伸的转录本命名为 *cox2**。根据 *orf118-b* (350 bp) 和 *cox2** (1 399 bp) 转录本的序列设计特异引物,用 TaKaRa 公司的高保真酶(PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase),分别以 DNA 和 cDNA 第一条链为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ L: DNA 或 cDNA 1 μ L, dNTP Mixture 1.6 μ L, Forward Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, Prime STAR Buffer (Mg²⁺) 4 μ L, Prime STAR HS 0.2 μ L, ddH₂O 12.4 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 5 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 ~ 120 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 8 min。引物序列如下:

orf118-b: F 5'-CATCGCCCTACTCATCGCTTATA-3', R 5'-TCTGAGAAGGAAGTATTGGCTATGC-3'

*cox2**: F 5'-TCAAGAATGGATCAGTCTAGTCTC-3', R 5'-ATACCCAATCCGCATAATCTTTC-3'

1.5 Real-Time PCR

根据 *cdpk* (钙依赖的蛋白激酶) 基因 CDS 区的保守序列设计荧光定量 PCR 特异性引物,以 *18s* 和 β -Actin 为双内参基因,分析花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期花药中 *cdpk* 基因的表达模式。反应体系 (20 μ L): 稀释 10 倍 cDNA 2 μ L, Real Master Mix 10 μ L, Forward Primer 0.5 μ L, Reverse Primer 0.5 μ L, ddH₂O 7 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 5 s,44 个循环。按照 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法分析基因的相对表达量。引物序列如下:

cdpk: F 5'-ACCTTGACAAAACCGTGAA-3', R 5'-GGATGCTTTCTCCCGTCT-3'; *18s*: F 5'-CTGAGAAACGGCTACCACA-3', R 5'-TCTGAGAAGGAAGTATTGGCTATGC-3'; β -Actin: F 5'-GTCCCTCACCTCCC AAAAG-3', R 5'-GCTGCCTCAACACCTCAACCC-3'。

1.6 序列分析

PCR 产物回收后,连接到 pEASY-zero (全式金公司) 载体,转化大肠杆菌,挑取 3 个阳性克隆送上海美吉公司测序。DNAMAN 软件进行基因以及蛋

白质序列间多重比对。利用 SOPMA 软件在线分析蛋白质二级结构类型,分子量、等电点、疏水性等理化特性。利用 WoLFPSORT (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) 在线软件进行亚细胞定位预测。利用 TMHMM Server V. 2. 0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件进行跨膜结构预测。

2 结果与分析

2.1 *orf118-b* 的克隆及序列分析

分别以 C48-2 和 N48-2 线粒体 DNA 和单核期花药的 cDNA 为模板扩增 *orf118-b*, 结果如图 1 所示。可以看出, 在 C48-2 的线粒体 DNA 和 cDNA 中能扩增出嵌合 *orf118-b* 的目的条带, 而在 N48-2 中未检测到扩增条带, 这与转录组测序的结果一致, 说明 *orf118-b* 是 C 胞质特有的嵌合基因, 且能在单核期花药中特异表达。生物信息学预测显示, 其编码蛋白质为亲水性蛋白, 具有 5 个丝氨酸磷酸化位点, 2 个苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点, 表明丝氨酸磷酸化可能是其发挥功能的主要方式。亚细胞定位预测显示, 其编码的蛋白位于细胞核的可能性较大, 二级结构预测显示该蛋白含有 42% 的 α -螺旋和 43% 无

规则卷曲。跨膜结构预测显示, *orf118-b* 编码的蛋白不具有跨膜结构域。

2.2 *cox2*^{*} 的验证

为了验证 *cox2*^{*} 存在的真实性及特异性, 我们设计了 *cox2*^{*} 转录本的特异引物 *cox2*^{*}F-*cox2*^{*}R (图 2)。上引物位于 *cox2* 基因第一外显子 5' 端的基因间区, 下引物位于 *cox2* 基因第二外显子区。以 C48-2 和 N48-2 线粒体 DNA 为模板, 均能扩增出目的条带。说明在 DNA 水平, C48-2 和 N48-2 的 *cox2* 基因不存在差异。而以 C48-2 和 N48-2 单核期花药的 cDNA 为模板, 只能在 N48-2 中扩增出条带, C48-2 中未能扩增出条带。说明 C48-2 中不表达 *cox2* 基因延长的转录本 *cox2*^{*}。

序列分析发现, 与玉米基因组数据库现有 *cox2* 基因转录本 GRM ZM5G862955_T01 的注释相比, 在 N48-2 单核期花药中特异表达的延长转录本 *cox2*^{*} 比 *cox2* 基因转录本 T01 向 5' 上游延长了 55 bp, 即在正常胞质中获取了 *cox2* 基因转录本的新注释 (图 2)。通过对比 N48-2 中 *cox2* 的 DNA 和 cDNA 序列发现了 22 处 RNA 编辑位点, 都是 C-U 的转换, 其中 2 处共编辑位点, 与前人研究结果吻合。跨膜结构预测显示 *cox2*^{*} 编码的蛋白具有 3 个跨膜结构域。

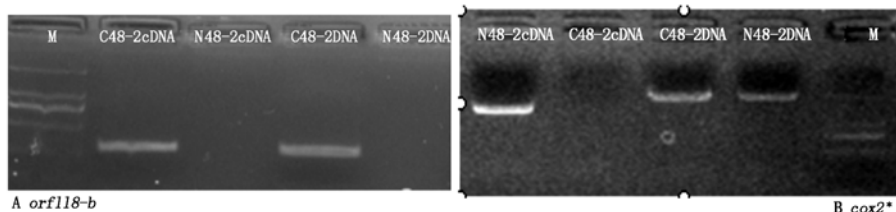


图 1 PCR 和 RT-PCR 电泳图

Fig. 1 The PCR and RT-PCR amplification of *orf118* and *cox2*^{*}

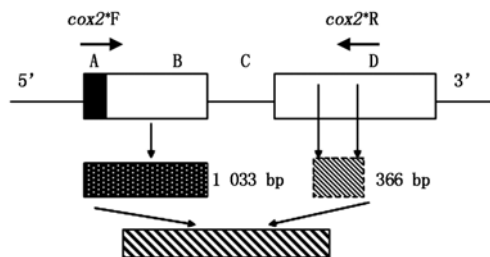


图 2 *cox2*^{*} 的引物设计和转录示意图
A. 5' 端延长序列; B. 第一外显子; C. 内含子; D. 第二外显子。
A. Extended sequence in 5' end; B. The first exon; C. Intron; D. The second exon.

图 2 *cox2*^{*} 的引物设计和转录示意图
Fig. 2 Schematic diagram of primer design and transcription of *cox2*^{*}

2.3 *cdpk* 基因表达模式分析

通过实时荧光定量 PCR 检测了 C48-2 和 N48-2 花药中 *cdpk* 基因在花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期的表达水平。由图 3 可知, 相对于 N48-2, *cdpk* 在 C48-2 的花粉母细胞时期、四分体时期、双核期上调表达, 双核期的表达差异最明显,

C48-2 中的表达量比 N48-2 高 20 多倍, 与转录组测序结果相吻合。单核期, *cdpk* 在 C48-2 中的表达量略低于 N48-2, 但差异不明显。CDPK (钙依赖蛋白激酶) 主要参与非生物胁迫的信号转导过程。 *cdpk* 基因在 C48-2 小孢子花粉母细胞时期和四分体时期

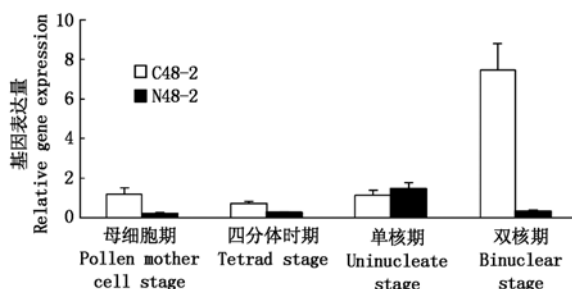


图 3 花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期花药中 *cdpk* 基因的表达情况

Fig. 3 Gene expression analysis of *cdpk* during the pollen mother cells (PMCs) stage, the tetrad stage, the uninucleate stage and the binuclear stage

上调表达,可能促进钙离子在细胞内的积累,从而释放更多活性氧(ROS)以及其他凋亡因子,从而诱导细胞过早凋亡。败育后由于大量凋亡因子释放,从而促进双核期 *cdpk* 基因在 C48-2 中大量表达。

3 讨论

植物细胞质雄性不育是线粒体基因组与核基因组间不协调所导致的^[6]。因此,研究线粒体嵌合基因与核基因间的差异表达对于揭示核质互作的分子机制十分重要。本研究发现嵌合 *orf118-b* 是 C48-2 线粒体基因组特有的,其编码的蛋白不具有跨膜结构域,与已知 CMS 相关嵌合 *orf* 的典型特征不吻合^[15]。目前已在多种植物线粒体基因组上发现了与植物 CMS 相关的嵌合 *orf*。这些嵌合 *orfs* 是 CMS 线粒体基因组特有的,通过基因重组产生,通常与线粒体呼吸链相关基因嵌合,多位于线粒体呼吸链相关基因侧翼区,与其共转录,其推定的蛋白产物大多具有天然疏水性和跨膜结构域^[16]。但有的 CMS-*orfs* 并不具有这些特征,而一些具有这些特征的 *orf* 却与 CMS 无关,因此很难根据核酸序列来判断与 CMS 相关的线粒体基因。嵌合 *orf118-b* 与玉米 C 胞质花粉败育的关系还有待于进一步研究。

本研究发现 *cox2* 基因 5'端延长转录本 *cox2** 只在保持系单核期花药中表达,不育系 *cox2* 基因的转录本未发生变化。N48-2 中 *cox2** 转录本的 5'UTR 区域向基因间区延长了 55 bp,因此获得了 *cox2* 基因转录本的新注释。研究表明,mRNA 的 5'末端对外显子具有调控作用^[17]。UTR 不仅调控 mRNA 的体内稳定性及降解速率,控制其利用效率,协助辨认特殊密码子,而且还决定 mRNA 的翻译位点及控制其翻译效率。前人研究表明,玉米不育系 C48-2 中 *cox2* 的编辑频率明显低于其保持系^[14]。*cox2* 基因编辑率降低可能会影响翻译效率,从而产生不完整或者缺陷的 COX2 蛋白,最终导致花粉败育。但 *cox2* 基因编辑频率降低是否与 *cox2* 基因 5'末端 UTR 结构差异有关尚待进一步研究。

本研究显示,*cdpk* 基因在 C48-2 和 N48-2 小孢子发育过程中的表达水平存在差异,尤其双核期的差异十分明显,验证了前期转录组测序的结果。CDPK 作为植物细胞内胞质 Ca^{2+} 的受体,在植物 Ca^{2+} 信号转导过程发挥重要功能。CDPK 通过识别细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化,并进一步使信号级联放大^[18]。CDPK 通过调控信号转导过程中下游基因的表达从而影响植物生长、发育和抗胁迫响应等多种代谢活动^[19]。研究表明在玉米花粉发育晚期,抑

制花粉管中的 *cdpk* 基因的表达会导致花粉萌发和花粉管延伸受阻^[18]。Gyeong 等^[20]的研究表明在矮牵牛花粉发育过程中,过量表达 CDPK1 会影响花粉管的生长极性,过量表达 CDPK2 会抑制花粉管的延伸。这些研究证明,*cdpk* 基因参与花发育过程的调控,其异常表达会影响花的正常发育。花发育涉及多种代谢途径,某一个或者多个代谢途径的异常都会影响小孢子的正常发育,从而影响雄性配子的形成。C48-2 和 N48-2 线粒体基因结构与核基因表达的差异,反映出核质互作不协调。因此,有必要对这些差异基因进行深入研究以揭示核质互作的关键机制。

参考文献:

- [1] Fujii S,Toriyama K. Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility [J]. Plant Cell Physiol,2008,49(10):1484-1494.
- [2] Rottman W H,Brears T,Hodge T P,et al. A mitochondrial gene is lost via homologous recombination during reversion of CMS T maize to fertility [J]. EMBO J,1987,6(6):1541-1546.
- [3] Renate Horn,Joachim E G,Hustedt,et al. The CMS-associated 16 kDa protein encoded by orfH522 in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasms of sunflower[J]. Plant Mol Biol,1996,30(3):523-538.
- [4] Ssingh M,Brown G. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear gene alters expression of a novel mitochondrial gene region [J]. Plant Cell,1991,3(12):1349-1362.
- [5] Das S,Sen S,Chakraborty A,et al. An unedited 1.1 kb mitochondrial *orfB* gene transcript in the wild abortive cytoplasmic male sterility(WA-CMS) system of *Oryza sativa* L. subsp. indica. [J]. BMC Plant Biol,2010,10:39.
- [6] Dangping Luo,Hong Xu,Zhenlan Liu,et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. Nature Genetics,2013,45(5):573-577.
- [7] Xia T,Liu J. Relation between ethylene and cytoplasmic male sterility in maize(*Zea mays* L.) [J]. Acta Agriculturae Boreali Sinica,1996,11(3):68-72.
- [8] Xia T,Liu J. Cytochrome oxidase activity and ATP content of male-Sterile cytoplasm in maize(*Zea mays* L.) [J]. Acta Agriculturae Boreali Sinica,1994,9(4):33-37.
- [9] Huang L,Xiang J,Jiazhou Liu,et al. Expression characterization of genes for CMS-C in maize[J]. Protoplasma,2011,249:1119-1127.
- [10] Allen O,Fauron C M,Minx P,et al. Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes

- of maize[J]. *Genetics*, 2007, 177(2): 1173 – 1192.
- [11] Wang J, Cao M J, Pan G T, *et al.* RNA editing of mitochondrial functional genes atp6 and cox2 in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Mitochondrion*, 2009, 9(5): 364 – 369.
- [12] Stefan Stephane Bentolila Stefanov. A reevaluation of rice mitochondrial evolution based on the complete sequence of male-fertile and male-sterile mitochondrial genomes [J]. *Plant Physiology*, 2012, 2(158): 996 – 1017.
- [13] Igarashi K, Kazama T, Motomura K, *et al.* Whole genomic sequencing of RT98 mitochondria derived from *oryza rufipogon* and Northern Blot analysis to uncover a cytoplasmic male sterility-associated gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(2): 237 – 243.
- [14] 汪 静. 玉米细胞质雄性不育系及其保持系线粒体功能基因 RNA 编辑研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007: 22 – 23.
- [15] Clifton S W, Minx P, Fauron C M, *et al.* Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(3): 3486 – 3503.
- [16] Kubo T, Kitazaki K, Matsunaga M, *et al.* Male sterility-inducing mitochondrial genomes: how do they differ [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2011, 30(4): 378 – 400.
- [17] 章国卫, 宋 东, 陈 竺. mRNA 选择性剪接的分子机制[J]. *遗传学报*, 2004, 31(1): 102 – 107.
- [18] 王娇娇, 韩胜芳, 李小娟, 等. 钙依赖蛋白激酶 (CDPKs) 介导植物信号转导的分子基础[J]. *草业学报*, 2009, 18(3): 241 – 250.
- [19] 万丙良 查中萍 戚华雄. 钙依赖的蛋白激酶与植物抗逆性[J]. *生物技术通报*, 2009(1): 7 – 10.
- [20] Gyeong M Y, Dowd P E, Gilroy S. *et al.* Calcium-dependent protein kinase isoforms in petunia have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 867 – 878.