

红莲型水稻不育系统花粉发育不同时期 MADS-box 基因家族的表达分析^{*}

孙清萍 汪莉 易平 朱英国^{**}

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 以红莲型水稻不育系、保持系、恢复系和杂种为材料, 根据MADS-box 的保守序列设计特异引物, 并分别以Oligo dT₁₂GC 和Oligo dT₁₂CG 为锚定引物对花粉发育单核期和二核期的花药进行了差异显示分析。扩增共得到 382 条带, 其中有组成型表达带 $22 \times 8 = 176$ 条。对差异带的统计分析表明:MADS-box 基因家族参与了CMS 和育性恢复的核质互作。最后, 对这些差异带与CMS 和育性恢复之间的关系以及特异引物在研究复杂生物学现象中的应用进行了讨论。

关键词: 水稻; 细胞质雄性不育; 育性恢复; MADS-box 基因家族; 差异显示

中图分类号: Q 344.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X (2002) 05-0325-04

Expression Analysis of MADS-box Gene Family on Uni-nucleate and Bi-nucleate Stage Anthers on HL-CMS System

SUN Qing-Ping, WANG Li, YI Ping, ZHU Ying-Guo

(The Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology and Institute of Genetics, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: This study analysed the differences of gene expression among the uni- and bi-nucleate stage anthers of the HL-CMS system with the method of differential display. 382 bands were detected in all samples with the specific MADS-box primer and Oligo dT₁₂GC and Oligo dT₁₂CG as anchor primers respectively. 46.1% ($22 \times 8 = 176$ bands) of which expressed constitutively among all the samples. The statistical analysis of the polymorphism bands showed that the MADS-box genes took an important role in the cytoplasm and nuclear interaction of CMS and fertility restoration in rice. At the last, this paper has discussed the relationship between the diversity bands and CMS and sterility restoration. The application of differential display using specific primer in complicated biological phenomena is also discussed.

Key words: *Oryza sativa* L; Cytoplasmic male sterility; Fertility restoration; MADS-box gene family; Differential display

MADS-box 是一类动植物中非常重要的调节基因家族, 它编码一类具有共同序列的蛋白转录因子。这些转录因子通过其保守结构域与特定的DNA 序列结合来调控基因的表达。这些DNA 序列不仅

可以是一般的结构基因, 而且也可以是MADS-box 基因家族本身^[1]。当蛋白转录因子与MADS-box 基因家族本身结合, 它可以通过调节其它MADS-box 基因的表达从而调控动植物的生长和发育, 所以

收稿日期: 2002-02-05, 修回日期: 2002-04-22。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170568)。

作者简介: 孙清萍(1977-), 男, 在读硕士研究生, 现从事植物发育遗传学研究。

** 通讯作者。

MADS-box 基因家族和它们所编码的蛋白转录因子一起行使调控表达的功能。研究表明,被子植物的大部分MADS-box 基因参与花发育的调控^[2],而且在植物花发育分子机制的ABC 模型中的大多数花发育相关功能基因属于MADS-box 基因家族^[3,4]。可见,MADS-box 基因家族对高等植物花的发育有着非常重大的意义。植物细胞质雄性不育是杂种优势利用的基础,对此现象机理的了解将有助于对杂种优势的利用,在应用上有着重大的意义。国内外研究表明,造成不育的主要原因在线粒体上,而育性恢复是核质互作的表达结果^[5-7]。红莲型细胞质雄性不育是本实验室发现的一类新的不育类型,在细胞学上其败育发生在二核早期。鉴于MADS-box 基因家族在植物花发育中所起的重要作用,MADS-box 基因家族与雄性不育及育性恢复可能有关。笔者根据MADS-box 基因家族的保守区域设计特异引物,对红莲型水稻细胞质雄性不育系统4个材料的单核期和二核期的花药进行了差异展示分析,以期了解MADS-box 基因家族在水稻细胞质雄性不育及育性恢复中可能起到的作用。

1 材料与方法

1.1 水稻花药总RNA的提取

以水稻红莲型细胞质雄性不育系统YTA、YTB、9311(R)和红莲二号(F₁)为材料,以花药镜检为基础,结合植株外部形态特征分别选取4个材料的单核期和二核期的幼穗,于4℃冷库中剥取穗子中部的花药,用Trizol Reagent 并按其说明提取花药总RNA, RNA 经甲醛电泳检测合格后于-70℃贮存。

1.2 反转录及特异引物PCR

锚定引物O ligo dT₁₂₋₁₈购自Promega 公司。反转录酶为Gibco 公司的Superscript RNase H⁻, 反转录按反转录酶的产品说明书进行。PCR 反应时,分别以O ligo dT₁₂ GC 和O ligo dT₁₂ CG 作为锚定引物,特异引物按文献[8]设计为5' CAA GA GCA TCGA GAA 3',由武汉金贝公司合成。PCR 反应体系为:总体积25 μL,其中Taq DNA 聚合酶1.0 U, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 10×扩增缓冲液2.5 μL, 200 μmol/L dNTPs, 1 μL DM SO, 1 μL 反转录产物,特异引物和锚定引物各0.2 μmol/L。PCR 程序为:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 延伸10 min; 4℃ 保存。PCR 反应于Perkin Elmer DNA Thermal

Cycler 480 扩增仪上进行。

1.3 PAGE 电泳、银染、差异带的回收及克隆

PCR 产物于5% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,以Promega 公司的Silver Sequence DNA Sequencing System 银染显带并照相记录实验结果。差异条带用无菌刀片直接从凝胶中挖出后在沸水中煮5 min,离心,取上清4 μL 按相同的条件再扩增差异片断,回收后连接到Promega 公司的pGEM-T Easy Vector 上,并转化DH5α菌株。

1.4 Northern 杂交分析

采用Promega 公司的Prime-a-Gene Labeling System 标记探针,Northern 杂交分析参照Sam-brook 进行,用变性PCR Marker 指示分子量大小。

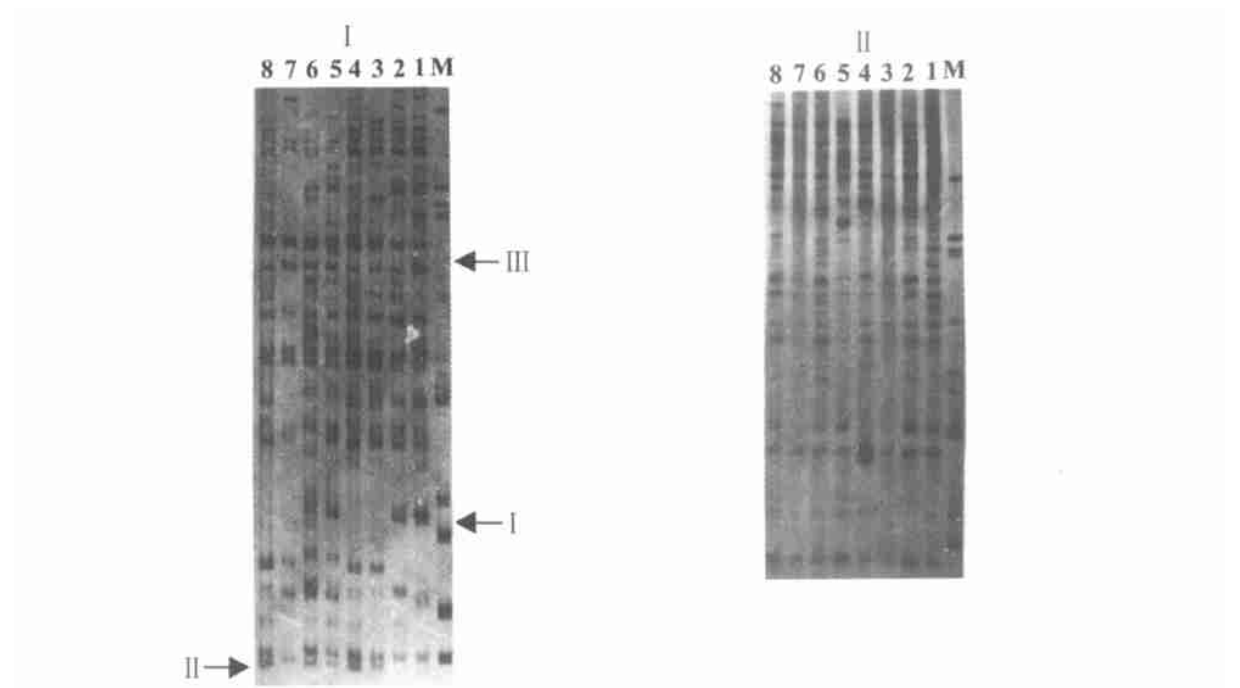
2 结果与分析

2.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

电泳银染结果(图1)表明,MADS-box 基因家族在水稻花粉发育两个时期均丰富表达,且样品间存在较丰富的多态性。8个样品共扩增得到382条带,平均每个样品每个时期约有24条表达带。由于锚定引物是O ligo (dT)₁₂加两个选择碱基,它所揭示的信息是总信息的1/12,如果不考虑mRNA 的不同剪接等,推算每个样品约有280个MADS-box 基因表达。与植物中其它的基因家族相比^[9],MADS-box 是个很大的基因家族。另一方面,在花粉发育两个时期的丰富表达也暗示了MADS-box 基因家族在水稻花粉发育中起着重要的作用。在382条带中组成型表达带22×12=176条(图1中箭头III所指),占总数的46.1%。这些带代表的MADS-box 基因在水稻花粉发育的过程中可能行使着一些基本调控功能。

样品间的差异很丰富,我们把在材料上表现出差异的带进行分类并归纳为表1和表2。表1所示为单个材料特异带的统计结果(包括材料特异表达的带和材料特异表达缺失的带)。从表1可以看出,每个材料都有自己特异的带,所有材料共有48条特异带,占总带数的12.6%。差异丰富的原因可能是由MADS-box 调控方式的灵活与多样造成的^[12]。A和B的细胞核相同,但细胞质不同,A和B之间表现出的差异说明不同的细胞质对MADS-box 基因的表达有显著的影响。F是A和R的杂种,F特异的带可能与杂种优势和育性恢复有关。

表2所示为共有材料特异带的统计结果。共有材料特异带是指在某个时期,2个材料中有表达,而



1 YTA 单核期; 2 YTB 单核期; 3 9311单核期; 4 红莲二号单核期; 5 YTA 二核期; 6 YTB 二核期; 7 9311二核期; 8 红莲二号二核期; M. pGEM-7Zf(+)DNA /Hae III M marker
1 Uni-nucleate stage anthers of YTA; 2 Uni-nucleate stage anthers of YTB; 3 Uni-nucleate stage anthers of 9311; 4 Uni-nucleate stage anthers of Honglian-2; 5 Bi-nucleate stage anthers of YTA; 6 Bi-nucleate stage anthers of YTB; 7 Bi-nucleate stage anthers of 9311; 8 Bi-nucleate stage anthers of Honglian-2; M. pGEM-7Zf(+) DNA /Hae III M arker

图 1 红莲不育系统 2 个时期花药MADS-box 特异引物差异展示图谱

Fig. 1 Patterns of displayed cDNA from different stage anthers of the HL- CMS system of rice using MADS-box specific primer

表 1 MADS-box基因家族单个材料间的差异

Table 1 Difference of special expression in single material of MADS-box gene family								
时期 Stage	O ligo dT ₁₂ GC				O ligo dT ₁₂ CG			
	A	B	R	F	A	B	R	F
单核 Uni-nucleate	1	0	2	2	4	4	2	5
二核 Bi-nucleate	3	5	4	2	6	4	3	1

表 2 MADS-box 基因家族共表达差异

Table 2 Co-expression difference of MADS-box gene family																
时期 Stage	O ligo dT ₁₂ GC								O ligo dT ₁₂ CG							
	AB	AR	AF	BR	BF	RF			AB	AR	AF	BR	BF	RF		
单核 Uni-nucleate	2	0	4	4	1	5			5	0	3	0	0	0		
二核 Bi-nucleate	2	0	5	0	2	3			3	0	2	0	1	2		

在另外 2 个材料中没有表达的特异带。如 A 和 F 共有的特异带是指在 A 和 F 有表达,而在 R 和 B 是没有表达的带。A 和 F 的细胞质相同,它们的共有特异带较多,共 14 条。虽然 A 和 B 的细胞核是相同的,但 B 和 A 及 F 的细胞质却不同,B 和 F 间的共有特异带(4 条)明显比 A 和 F 的共有特异带少。这

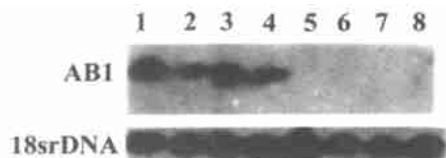
再次表明不同的细胞质对细胞核内 MADS-box 基因的表达影响显著。表中 AR 和 BR 的共有特异带栏内几乎都是 0,这是因为 AR 之间以及 BR 之间无论在细胞核或是细胞质上都没有什么联系,理论上它们不应该有共有特异带。这也从侧面证明了我们试验结果的可靠性。

我们也按时期的不同将差异带进行了分类统计(数据未列出)和分析,但结果没有发现在各个材料间一致而在时期上却不一致的时期特异带。将材料和时期结合起来进行分析时,可以发现一些有规律的差异带。如 A 和 B 在单核期共同缺失一条带(如图 1 箭头 II 所示),而这条带在 A 和 B 的二核期以及 R 和 F 的所有时期都表达。这些带以及在材料上表现出差异的那些带都已回收,进一步的研究正在进行之中。

2.2 Northern 杂交

选取 A 和 B 间共有特异表达的分子量约 150 bp 的差异片段(图 1 照片中箭头 I 所指)AB1 作 Northern 杂交分析,结果显示(图 2),AB1 在粤泰 A、粤泰 B 中具有大小(约 1.5 kb)一致的杂交带,而在恢复系 R 及 F 杂种中没有杂交信号,和差异展示

的结果相吻合。差异片段AB1的真实性得到Northern杂交的验证,也说明高退火温度的特异引物的RT-PCR反应可靠性较高。



1 YTA 单核期; 2 YTA 二核期; 3 YTB 单核期; 4 YTB 二核期; 5 9311单核期; 6 9311二核期; 7 红莲二号单核期; 8 红莲二号二核期

1 Uninucleate stage anthers of YTA; 2 Binucleate stage anthers of YTA; 3 Uninucleate stage anthers of YTB; 4 Binucleate stage anthers of YTB; 5 Uninucleate stage anthers of 9311; 6 Binucleate stage anthers of 9311; 7 Uninucleate stage anthers of Honglian-2; 8 Binucleate stage anthers of Honglian-2

图2 AB1和18s rDNA的Northern杂交分析

Fig. 2 Northern blot analysis of AB1 and 18s rDNA

3 讨论

MADS-box 基因家族首先在酵母中发现^[1], 随后在小鼠、人、拟南芥等中发现也有其表达。高等植物中MADS-box 主要在花器官原基分化期表达^[3], 但近年来的研究表明,MADS-box 在植物其它部位也有表达^[11,12], 且某些MADS-box 在烟草花粉发育的全过程中持续表达^[13]。本研究表明MADS-box 在水稻花粉发育的单核期和二核期都有表达, 说明MADS-box 在水稻中不仅仅局限于控制花器官原基的分化, 其功能是丰富的。

A 和B 同核异质,A 和F 同质异核,A 的特异带可能与水稻CMS 相关。表1中A 在二核期表现出较多的差异带也和前人细胞学的研究结果红莲型水稻不育发生在二核期相符^[10]。另外,B 的差异带和A 的差异带相比, 由于B 只与A 同核, 而细胞质同和其它的材料没有关系, 所以B 的差异带应该比A 的多, 然而, 试验结果与此相反(见表1)。对此我们认为其原因可能是: 在A、B、R、F 中只有A 的花粉是不育的, 此生理现象中代谢的不正常诱导了细胞内一系列特异的应答, 最终表现为A 特异带的增多。因此我们推测,A 的特异带大部分是不育的“结果”; 而不是不育的“原因”。

红莲型水稻细胞质上的缺陷可以导致花粉绒毡层细胞畸形增生, 形成绒毡层周缘质团, 进而导致花粉败育^[14], 但核内的恢复基因的表达却能弥补细胞质上的缺陷, 恢复花粉的育性。MADS-box 表达明显受到细胞质影响的试验结果暗示MADS-box 可能参与了红莲型水稻CMS 和育性恢复的核质互作

的过程, 对MADS-box 基因家族的深入研究, 将有助于对水稻CMS 及育性恢复机理的深入了解。

高退火温度的特异引物差异展示与随机引物差异展示相比具有较高的可靠性, 而且其揭示的遗传信息也不是“随机”的。利用以基因家族保守序列为基础的特异引物展示能很快地了解基因家族在复杂生物学现象中的表达与功能, 如借助基因芯片等技术对回收的差异带进行进一步的研究将有助于对所研究问题的了解。

参考文献

- [1] Ma H, Yanolaky M F, Meyerowitz E M. ACL1-ACL6, an Arabidopsis gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes *Genes Dev*, 1991, **5**: 484-495
- [2] Riechmann J L, Meyerowitz E M. MADS domain proteins in plant development *Biol Chem*, 1997, **378**: 1079-1101
- [3] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorl: genetic interaction controlling flower development *Nature*, 1991, **353**: 31-37
- [4] Meyerowitz Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration *Trends in Plant Science*, 1998, **31**: 75-180
- [5] Kadowaki K, Suzuki T, Kazama S. A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male sterility of rice *Mol Gen Genet*, 1990, **224**: 106-116
- [6] Szklarczyk M, Oczkowski M, Augustyniak H, et al. Organisation and expression of mitochondrial *atp9* genes from CMS and fertile carrots *Thero Appl Genet*, 2000, **100**: 263-270
- [7] Jack T, Brockman L L, Meyerowitz E M. The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens *Cell*, 1992, **68**: 683-697
- [8] Song R, Laca V, Linton E, et al. Sequence, Regulation, and Evolution of the Maize 22-kD alpha Zein Gene Family. *Genome Res*, 2001, **11** (11): 1817-1825
- [9] 武汉大学遗传研究室. 红芒野生稻-莲塘早不育系花粉败育过程的细胞形态学观察 *植物学报*, 1977, **20** (2): 150-155
- [10] Zuccheri J C, Caspi M, Dunn K. ng19: a third MADS box gene expressed in alfalfa root nodules *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, **14** (12): 1463-1467
- [11] Alvarez-Buylla E R, Liljegren S J, Pelaz S, et al. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes *Plant J*, 2000, **24** (4): 457-466
- [12] Chung Y Y, Lee K J, An G. Characterization of a tobacco MADS-box gene homologous to AGL2 *Mol Cells*, 1998, **8** (6): 764-769
- [13] 徐树华. 水稻“红莲-华矮15”不育系及其保持系的花粉发育细胞学观察 *武汉大学学报(自然科学版)*, 1979 (2): 79-84