

水稻空间诱变雄性不育突变体 *ws-3-1* 的抑制缩减杂交分析

易继财, 梅曼彤

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为了解空间诱变产生的水稻核雄性不育突变体 *ws-3-1* 基因表达的特点, 对 *ws-3-1* 和原种特粘占 13 减数分裂二分体时期的 cDNA 进行了抑制缩减杂交 (SSH) 分析, 分别从正向和反向缩减文库中检测到 109 和 104 个表达有差异的克隆. 对这些克隆进行了测序和同源性分析, 并利用 Northern 杂交技术, 从中鉴定出 5 个在原种与突变体间减数分裂二分体时期表达有差异的基因, 并分析了该雄性不育突变体基因表达的变化与表型的关系.

关键词: 水稻雄性不育突变体; 抑制缩减杂交 (SSH); 基因表达

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)01-0070-03

Suppression Subtractive Hybridization Analysis of Rice Male Sterility Mutant *ws-3-1* Induced by Space Flight

YI Ji-cai, MEI Man-tong

(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Differentially expressed genes between rice male sterility mutant *ws-3-1*, induced by space flight, and Texianzhan 13, its original indica rice variety, at the meiotic stage were analyzed by cDNA suppression subtractive hybridization (SSH). Forward- and reverse- subtractive libraries were constructed by using cDNAs from Texianzhan13 or *ws-3-1* as tester. By using library screening with Southern blotting, 109 and 104 positive clones with different transcriptional abundance between Texianzhan13 and *ws-3-1* were selected from the forward- or reverse-subtractive libraries respectively. Northern blotting analysis was performed to compare the transcription level between *ws-3-1* and Texianzhan13, and difference in expression abundance was found in five cDNA clones. The differences in the expression of these genes and their relationship with male sterility were discussed.

Key words: rice male sterility mutant; suppression subtractive hybridization (SSH); gene expression

我国研究人员多年来利用空间飞行器搭载植物干种子, 从其后代获得了不少在农业上有应用价值的作物品种和品系, 还产生了许多在自然状态下难以发现的特殊变异类型^[1-2], 这些材料既可作为新种质资源, 也可作为植物基因克隆的新材料, 对其研究还有助于了解空间诱变的规律及其分子机理. 以我国返地卫星搭载水稻特粘占 13 种子, 从其后代中获

得一个雄性不育突变体 *ws-3-1*, 陈中正等^[3] 对其进行了细胞学观察, 证明 *ws-3-1* 是一份水稻雄性不育的新种质, 减数分裂二分体时期中层细胞就已开始出现异常降解, 导致败育, 与已报道的水稻雄性不育细胞学机理研究结果不一样. 为了解该突变体基因表达的特点, 本研究应用了具有敏感性高、假阳性率低、重复性好、可同时分离多个差异表达的基因等优

收稿日期: 2006-08-24

作者简介: 易继财 (1971—), 男, 讲师, 博士, E-mail: jicai@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30170534); 863 航天领域项目 (2002AA744061)

点的抑制缩减杂交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 技术^[4], 以突变体 *ws-3-1* 和原种特籼占 13 减数分裂二分体时期的小穗为材料, 利用 cDNA 抑制缩减杂交技术, 对 *ws-3-1* 花粉败育时期的 cDNA 与同时期原种的 cDNA 进行了抑制缩减杂交研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用材料——广东省的重要栽培籼稻品种特籼占 13 及其隐性核雄性不育突变体 (*ws-3-1*) 均为华南农业大学农学院陈志强教授惠赠。雄性不育突变体 *ws-3-1* 来自特籼占 13, 其干种子 [*w*(水) 约为 13%] 经卫星空间搭载 15 d, 返地后在 M_2 代选出。该雄性不育突变体在所有开花期均未见花粉, 属于无花粉型败育, 其不育性彻底且非常稳定。用原种和 IR36 作为父本与 *ws-3-1* 杂交, 均正常结实, 说明 *ws-3-1* 雌性正常可育。通过镜检选择二分体时期的小穗, 作为抑制缩减杂交研究的起始材料。

1.2 RNA 提取和 mRNA 分离

RNA 提取参照 Invitrogen 公司的 RNA 提取试剂 TRIZOL® 的使用说明进行。mRNA 分离纯化参照 Promega 公司的 PolyAtract® mRNA isolation system 试剂盒操作进行。

1.3 Southern 杂交和 Northern 杂交

按 Sambrook 等^[5] 的方法进行。

1.4 抑制缩减杂交

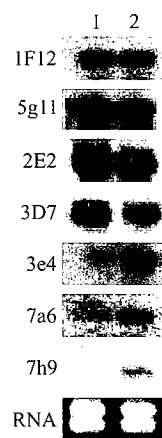
参照 CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 使用手册, 以原种特籼占 13 的 cDNA 作为待测子 1 (Tester1) 或突变体 *ws-3-1* 的 cDNA 作为待测子 2 (Tester2) 分别构建正向和反向缩减文库。

2 结果与分析

ws-3-1 的花粉败育最早开始于减数分裂二分体时期, 选取此时期 *ws-3-1* 与原种特籼占 13 的小穗, 提取 mRNA, 反转录成 cDNA, 进行抑制缩减杂交, 分别建立了以特籼占 13 为待测子 (Tester), *ws-3-1* 为驱动子 (Driver) 的可育特异的正向缩减文库 (共有 1 152 个克隆), 以及以 *ws-3-1* 为待测子, 特籼占 13 为驱动子的不育特异的反向缩减文库 (共有 1 536 个克隆)。随后, 分别用特籼占 13 和 *ws-3-1* 总 RNA 反转录标记探针, 对缩减文库进行 Southern 杂交筛选, 从正向和反向缩减文库中分别获得 109 和 104 个表达有差异的候选克隆。将这些表达差异的克隆进行酶切分类, 根据酶切分类的结果, 共选取了 43

个代表性的差异克隆进行测序。对测定序列进行表达序列标签 (expression sequence tag, EST) 分析, 结果显示这些克隆所代表的基因大多数都在水稻的穗部或花器官中有表达, 表明缩减杂交得到的这些差异基因大多数都与水稻穗或花的发育有关。经 Blast 同源性检测, 除 3 个克隆的序列在水稻中可能编码未知功能蛋白外, 其余克隆的序列均与水稻基因同源。

从 Blast 同源性分析的结果可知, 这些育性相关基因大致可分为 2 类: 一类是基因表达调控相关基因。如逆境响应锌指蛋白 (3D7)、蛋白激酶家族蛋白 (3e4)、逆境诱导蛋白 STI 1 (7a6)、MADS 盒蛋白 MADS 1 (5g11)、dnaK 类型分子伴侣 Bip (2H6) 和 DNA 结合蛋白 (6b6-2); 另一类基因则是与花药或花粉发育可能直接相关的基因, 如 β 微管蛋白 (2E2)、肽脯氨酰异构酶 (7h9)、YY1 蛋白 (1G3)、ATPase 家族蛋白 (4F4-3)、 β -1,3-葡聚糖合成酶 (2F10) 和 40S 核糖体蛋白 S3a/CYC07 蛋白 (2g2)。另外, 1F12 编码磷酸甘油酸变位酶, 5f5 编码 4- α -葡聚糖转移酶, 二者与能量代谢有关, 也可能直接影响花粉的发育。随后, 选取这些与育性可能直接或间接相关的克隆, 对原种和突变体减数分裂二分体时期的总 RNA 进行 Northern 杂交, 以鉴定其所代表的基因在原种与突变体间是否真正存在表达量的差异, 部分杂交结果示于图 1, Northern 杂交分析结果统计于表 1。从表 1 可



cDNA 克隆 1F12、5g11、2E2、3D7、3e4、7a6 和 7h9 为杂交探针; 1、2 分别代表特籼占 13 和 *ws-3-1* 减数分裂二分体时期的总 RNA
cDNA clones 1F12, 5g11, 2E2, 3D7, 3e4, 7a6 and 7h9 used as probes; 1 and 2 respectively are the total RNA of Texianzhan13 and *ws-3-1* at the dyad stage of the meiosis

图 1 抑制缩减杂交获得的部分表达差异克隆的 Northern 杂交分析

Fig. 1 Northern analysis of differentially expressed clones obtained from suppression subtractive hybridization

见,在正向和反向2个缩减文库中共有5个克隆,即2E2、3D7和3e4、7a6、7h9,在原种和突变体间的表达存有差异,而其余克隆(如1F12、2F10、2H6和2g2、5f5、5g11、6b6-2等)则未检测到表达有差异,另有部分克隆(如1G3、4F4-3和2c10等)可能由于表达量太低等原因而在原种和突变体中均未检测出杂交信号。

表1 缩减文库阳性克隆的同源性分析及 Northern 分析结果

Tab. 1 Homologous analysis of positive clone from subtractive library and its Northern analysis

阳性克隆名称 name of positive clones	同源性分析结果 results of homologous analysis	可能功能 predicted functions	EST 分析表达部位 EST analysis for expression location	Northern 分析 ¹⁾ Northern analysis	缩减文库类型 type of subtractive library
2E2	β 微管蛋白	花药或花粉发育等	黄化苗、穗等	+	正向
3D7	逆境响应锌指蛋白	基因表达调控	穗、叶等	+	正向
3e4	蛋白激酶家族蛋白	基因表达调控	叶、雌蕊等	+	反向
7a6	逆境诱导蛋白 STI1	基因表达调控	愈伤组织、穗、根、黄化苗等	+	反向
7h9	肽脯氨酰异构酶	花粉发育等	芽、穗等	+	反向
1G3	YY1 蛋白前体	花维管发育	穗、花药等	...	正向
4F4-3	类似 AFG1 的 ATPase 家族蛋白	花药或花粉发育	花、愈伤组织、芽等	...	正向
2c10	未知蛋白	未知	穗、愈伤组织等	...	反向
1F12	不依赖于 2,3-二磷酸甘油酸的 磷酸甘油酸变位酶	能量代谢	愈伤组织、叶、穗等	-	正向
2F10	β -1,3-葡聚糖合成酶	花粉发育	穗、根、芽等	-	正向
2H6	dnaK 类型分子伴侣 Bip	蛋白折叠、降解	穗、根、芽、叶及愈伤组织等	-	正向
2g2	40S 核糖体蛋白 S3a	细胞分裂	穗、根、黄化苗等	-	反向
5f5	4- α -葡聚糖转移酶	淀粉(能量)代谢	芽、叶、穗、花等	-	反向
5g11	MADS 盒蛋白 MADS1	基因表达调控	愈伤组织、穗、花、芽等	-	反向
6b6-2	DNA 结合蛋白	基因表达调控	穗、黄化苗、愈伤组织等	-	反向

1) +: 有差异; -: 无差异; ...: 无结果

3 讨论

从上述结果可见,通过抑制缩减杂交研究,得到了其表达在原种和突变体之间有差异的2类基因:一类是调控基因表达的相关基因,如锌指蛋白,蛋白激酶家族蛋白等,此类基因在突变体中有表达下调的(如逆境响应锌指蛋白,3D7),也有表达上调的(如蛋白激酶家族蛋白和逆境诱导蛋白 STI1,3e4和7a6),这类基因可能调控其下游基因的表达,从而间接调控花粉发育;另一类基因则是与花药或花粉发育可能直接相关的基因,这些基因在突变体中表达下调(如2E2)或表达上调(如7h9),可能直接影响到花药或花粉发育。其中,2E2代表的基因编码 β 微管蛋白,微管蛋白是构成微管的基本组分,而微管骨架参与细胞中多种生命过程^[6],微管骨架的异常则可能导致细胞生长、发育紊乱,譬如有可能导致小孢子败育^[7]。在陈中正等^[3]的研究中,也发现微管骨架排列异常的现象,因此推测 β 微管蛋白基因在突变体中表达下调可能导致了微管排列异常。另一个与育性可能直接有关的基因是7h9所代表的肽脯氨酰异构酶(peptidylprolyl isomerase, PPIase)基因,该基

因在突变体中表达上调,似乎可能是由于突变激活了该基因的表达。据报道,PPIase参与蛋白质折叠^[8]或调节转录因子活性^[9],但对其具体生理功能仍然未明。Kurek等^[10]报道,植物中PPIase的变化可能和育性有关,如将小麦FKBP73蛋白(属于PPIase家族)的C-端138个氨基酸残基缺失,然后在水稻中过量表达,结果导致转基因水稻不育。FKBP73蛋白共由522个氨基酸残基组成,其N-端具有3个PPIase功能域,与PPIase活性有关,而C-端包含1个TPR(tetratricopeptide)模体(motif)和1个钙调蛋白结合域(CaMbd),则与蛋白间相互作用有关。他们认为,FKBP蛋白的C-端所含结构域对于PPIase正确发挥作用非常关键,因为将完整的FKBP73基因在水稻中过量表达,转基因水稻仍然表现为可育,而当其C-端缺失时,推测PPIase功能域可能与花药中的特异蛋白发生了有害的结合,从而影响了育性,但是该基因调控雄性不育的机制仍然有待深入研究。

水稻雄性不育的细胞学机制,大多数认为可能与绒毡层异常、中层异常、不裂药或微管异常等有关

(下转第81页)

了 a 、 b 、 c 值在联结性测定中的作用. 因此, 以 χ^2 检验为基础, 结合 AC 和 PC 共同来测定种群间的联结性会得到较准确的结论^[2,6-7].

但用 χ^2 检验得出联结性强的种对, 其相关性不一定都强. 例如 3-5 (红锥 - 蜜花树)、4-6 (木荷 - 中华楠) 有极显著的正联结, 但它们的正相关性较弱, 相关系数 r 分别为 0.288、0.262, 红锥和蜜花树均喜温暖湿润的气候, 耐荫, 相同的生境需求决定它们存在正联结性强, 但它们所处的生态位不同, 就造成它们的正相关性较弱, 这也与实际情况相吻合, 木荷和中华楠也是由于所处的生态位不同, 造成正相关性较弱. 这是 2 种方法所用数据的差异造成的, χ^2 分析用的是种存在与否的多元数据, 而 r 分析用的是数量数据, 所含的信息量较大, 故后者的精度和准确性要高些. 但 χ^2 检验与 r 检验所得的结果基本一致, 只是强弱的差异, 可以相互检验和补充^[8].

参考文献:

- [1] 马丹炜, 王跃华, 王道模, 等. 青城山森林植被常见种

群种间联结性的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2004, 41(1): 169-173.

- [2] 邓贤兰, 刘玉成, 吴杨. 井冈山自然保护区栲属群落优势种群的种间联结关系研究[J]. 植物生态学报, 2003, 27(4): 531-536.
- [3] 孙中伟, 赵士洞. 长白山北坡椴树阔叶红松林群落木本植物种间联结性与相关性研究[J]. 应用生态学报, 1996, 7(1): 1-5.
- [4] 苏志尧, 陈北光, 吴大荣. 广东英德石门台自然保护区的植被类型和群落结构[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(1): 58-62.
- [5] 林伟强, 刘惠明, 张璐. 广州帽峰山次生林主要种群种间联结性研究[J]. 生态科学, 2004, 23(1): 42-46.
- [6] 张思玉. 桫欏群落内主要乔木种群的种间联结性[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(4): 335-339.
- [7] 胡理乐, 江明喜, 党海山, 等. 从种间联结分析濒危植物木荷小勾儿茶在群落中的地位[J]. 植物生态学报, 2005, 29(2): 258-265.
- [8] 张金屯, 焦蓉. 关帝山神尾沟森林群落木本植物种间联结性与相关性研究[J]. 植物研究, 2003, 23(4): 458-463.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 72 页)

联, 主要是绒毡层异常导致花粉营养失调败育^[11-12]. 陈中正等^[3]对本研究材料的研究表明, 中层异常是导致花粉败育的关键, 因此 *ws-3-1* 是进行分子生物学基础研究的良好材料, 本研究的结果将有助于水稻核雄性不育机理的研究.

参考文献:

- [1] 蒋兴村. 863-2 空间诱变育种进展及前景[J]. 空间科学学报, 1996, 16 (增刊): 77-82.
- [2] 梅曼彤. 空间辐射环境对生物系统的效应[M]//姜景山. 空间科学与应用. 北京: 科学出版社, 2001: 551-565.
- [3] 陈中正, 刘向东, 陈志强, 等. 水稻空间诱变雄性不育新种质的细胞学研究[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(3): 199-205.
- [4] 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.
- [5] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989: 6.3-10.68.

- [6] GODDARD R H, WICK S M, SILFLOW C D, et al. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton[J]. Plant Physiol, 1994, 104 (1): 1-6.
- [7] 徐是雄, 刘向东, 冯九焕, 等. 水稻 IR36 及光温敏核雄性不育系矮 64S 小孢子母细胞减数分裂期间微管骨架的变化[J]. 植物学报, 2001, 43 (3): 221-226.
- [8] SCHMID F X. Protein folding: Prolyl isomerases join the fold[J]. Curr Biol, 1995, 5 (9): 993-994.
- [9] SCHIENE-FISCHER C, YU C. Receptor accessory folding helper enzymes: The functional role of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases[J]. FEBS Lett, 2001, 495 (1/2): 1-6.
- [10] KUREK I, DULBERGER R, AZEM A, et al. Deletion of the C-terminal 138 amino acids of the wheat *FKBP73* abrogates calmodulin binding, dimerization and male fertility in transgenic rice[J]. Plant Mol Biol, 2002, 48: 369-381.
- [11] 利容千. 我国水稻雄性不育的细胞生物学研究概况与展望[J]. 植物学通报, 1999, 16 (增刊): 30-34.
- [12] 谢潮添, 魏冬梅, 田惠桥. 高等植物雄性不育的细胞生物学研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报, 2006, 32 (1): 17-23.

【责任编辑 李晓卉】