

红莲型细胞质雄性不育(HL-CMS)水稻不育系与保持系中3个ANTs基因表达模式的比较

罗凤燕*, 程钢*, 谭艳平, 刘学群, 刘新琼, 周杰, 王春台**

中南民族大学生命科学院, 生物技术国家民委重点实验室, 武汉 430074

摘要: 探讨红莲型细胞质雄性不育(HL-CMS)水稻不育系‘粤泰A’(‘YTA’)和保持系‘粤泰B’(‘YTB’)中3个腺苷酸转位酶(ANT)基因在三叶期根、茎、叶以及不同发育时期的幼穗中的表达模式。结果表明: *ANT1*和*ANT2*在‘YTA’和‘YTB’三叶期的根、茎、叶中的表达量都较高,而在生殖生长不同时期的幼穗中表达量较低。‘YTA’中*ANT1*在不同时期的幼穗中表达量都较低,而*ANT2*的表达量到穗生长期II的幼穗才较低。‘YTB’中*ANT1*在生殖生长的穗生长期III的幼穗有很高的表达。*ANT3*的表达水平在研究的各组织中的表达都较低,在‘YTB’穗生长期V的幼穗中表达最高。相对于‘YTA’,‘YTB’中只有*ANT3*在穗生长期III和穗生长期V的幼穗中呈现明显的优势表达;而相对于‘YTB’,‘YTA’中*ANT2*和*ANT3*在穗生长期I、*ANT2*在穗生长期VI幼穗具有明显的优势表达。3个*ANTs*基因在HL-CMS不育系‘YTA’和保持系‘YTB’不同组织及发育时期的表达模式的差异,暗示它们可能与HL-CMS水稻不育系和保持系的发育调控有关。

关键词: 水稻; *ANTs*; 实时荧光定量PCR; 基因表达

Comparison on Expression Mode of Three *ANTs* Genes between Sterile Line and Its Maintainer Line in Honglian-Type Cytoplasmic Male Sterile (HL-CMS) Rice (*Oryza sativa* L.)

LUO Feng-Yan*, CHENG Gang*, TAN Yan-Ping, LIU Xue-Qun, LIU Xin-Qiong, ZHOU Jie, WANG Chun-Tai**

Key Laboratory for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: The expression mode of the three adenine nucleotide translocase (ANT) genes in roots, stems and leaves at the 3-leaf stage, and in spikes at the different developmental phases of sterile line ‘Yuetai A’ (‘YTA’) and its maintainer line ‘Yuetai B’ (‘YTB’) of Honglian-type cytoplasmic male sterile (HL-CMS) rice was studied in this paper. The results showed that the expression of *ANT1* and *ANT2* was obviously higher in roots, stems, leaves at the 3-leaf stage than in the spikes at the reproductive stage in both ‘YTA’ and ‘YTB’. Compared with the higher *ANT1* expression at spike development stage III in ‘YTB’, the lower expression of *ANT1* was observed during the whole reproductive phases in ‘YTA’, and the lower expression of *ANT2* was present only after the spike development stage II. The expression of *ANT3* at all the detected stages of both ‘YTA’ and ‘YTB’ was lower than *ANT1* and *ANT2*, although a relatively high expression was observed at the spike development stage V in ‘YTA’. There were the preponderant expressions of *ANT2* at the spike development stage I and spike development stage VI in ‘YTA’, while *ANT3* had the preponderant expression at the spike development stage III and spike development stage V in ‘YTB’. The expression mode differences among the three *ANTs* between ‘YTA’ and ‘YTB’ may be involved in the developmental control of sterile line and its maintainer line of HL-CMS rice.

Key words: rice (*Oryza sativa*); *ANTs*; real-time quantitative PCR; gene expression

植物细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)现象普遍存在于高等植物中,花粉的败育是雄性不育的典型特征,是一种早期的细胞凋亡(Young和Hanson 1987; Balk和Leaver 2001)。红莲型CMS(HL-CMS)水稻的不育系‘粤泰A’(‘YTA’)的小孢子形成时期发生典型的细胞凋亡现象,在花粉败育过

收稿 2010-04-02 修定 2010-05-20

资助 国家“863”计划(2008AA10Z118)、国家自然科学基金(30771163和30871318)和中南民族大学科研基金(YZY07007)。

* 同等贡献。

** 通讯作者(E-mail: chuntaiwang@yahoo.com.cn; Tel/Fax: 027-67843239)。

程中‘YTA’的线粒体内膜可能出现了崩解, ‘YTA’花粉的败育与活性氧的过剩以及超氧化物歧化酶活性下调有关(Li等2004)。

线粒体是真核生物细胞的能量工厂, 同时也是细胞死亡的调节和控制中心。腺苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase, ANT)的主要作用是介导细胞溶质ADP与线粒体ATP的交换(Riccio等1975; Klingenberg 1980, 1985; Palmieri 2004), 在维持细胞能量平衡/稳态中发挥着重要作用(Dolce等2005), 该酶由氧化磷酸化产生的ATP的亚细胞供应, 是维持真核细胞不同线粒体功能所必需的(Giraud等1998; Pebay-Peyroula等2003; Nury等2006)。除了作为ATP/ADP转运酶, ANT也被认为是细胞凋亡的正调节蛋白和负调节蛋白(Luciakova等2008)。尽管ANT在细胞凋亡中的关键作用还存在相当争议(Vyssokikh等2001), 但有证据表明ANT可能是线粒体渗透性转换孔的重要调控子, 而线粒体渗透性转换孔能调控细胞凋亡(Halestrap和Brenner 2003; Lemasters等1998)。

尽管多数物种都含有不止一个ANT家族成员, 但是他们在发育过程的具体作用还有待深入研究。我们实验室前期用HMMER (Eddy 1998)对粳稻‘日本晴’全基因组进行扫描, 鉴定出在‘日本晴’基因组中至少存在3个ANT基因, 并通过实验证明了这3个ANT基因的存在。本文用实时荧光定量PCR比较分析ANTs基因在红莲型水稻不育系‘YTA’与保持系‘粤泰B’(‘YTB’)三叶期幼苗的不同组织及不同发育时期幼穗的表达特性, 以探索ANT在水稻发育过程中的作用及其与水稻CMS的潜在关联性。

材料与方 法

水稻(*Oryza sativa* L.) HL-CMS不育系‘YTA’和保持系‘YTB’(籼稻)种子由武汉大学生命科学院植物发育生物学教育部重点实验室遗传研究所提供, 种植于中南民族大学网室, 常规方法种植。根据幼穗长度及稃壳颜色采集不同发育时期幼穗: 穗生长期I为1.0~2.9 cm长幼穗; 穗生长期II为3.0~4.9 cm长幼穗; 穗生长期III为5.0~5.4 cm长幼穗; 穗生长期IV为7.0~7.9 cm长幼穗; 穗生长期V为稃壳半绿的幼穗; 穗生长期VI为稃壳变绿的幼穗。

总RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司,

反转录试剂盒(ReverTra Ace- α -TM)和荧光定量试剂盒(SYBR Green Realtime PCR Master Mix QPK-201)购自TOYOBO(日本), Taq DNA聚合酶和DNA Marker-DL2000购于TaKaRa公司, DEPC购自Promrga(美国), PCR引物由上海赛百盛生物技术公司合成, 其余试剂均为国产分析纯产品。

根据GenBank上已公布的水稻内参基因 β -actin序列设计合成引物actinF/actinR, 根据夏春皎(2006)搜索得到的水稻‘日本晴’ANT基因的基因组DNA序列以及cDNA序列, 使用Premier 5.0分别设计引物。引物由上海赛百盛生物技术公司合成。

总RNA提取采用Trizol法。分别称取约80 mg新鲜‘YTA’和‘YTB’三叶期根、茎、叶和不同发育时期的幼穗, 按陈为等(2009)采用的方法提取RNA, 然后用20 μ L DEPC水溶解, 电泳检测RNA质量后, 利用反转录试剂盒ReverTra Ace- α -TM按其说明进行反转录合成cDNA。

以上述操作获得的cDNA为模板, 并以Actin作内标进行实时荧光定量PCR分析。试验方法按照仪器Rotor-Gene 2000说明书进行, PCR反应体系(10 μ L)由5.0 μ L SYBR[®] Green PCR Master Mix、引物各0.2 μ L、cDNA模板1.0 μ L组成; 采用三步法40个循环, 在72 $^{\circ}$ C延伸时收集荧光信号。PCR完成后设置57~99 $^{\circ}$ C的溶解温度, 每1 $^{\circ}$ C采集1次信号。每个反应重复3次。

用对数模式图显示PCR全过程, 在指数期内, 根据仪器使用指南及实际情况, 设定参数值, 得到每个PCR反应的循环域(cycle threshold, Q)值。本文采用统一的参数(域值为0.018), 依据2^{- $\Delta\Delta$ C_t}方法, 将原始数据经转换后进行统计学分析。

实验结果

1 ANTs基因的RT-PCR扩增

分别提取‘YTA’和‘YTB’三叶期幼苗的根、茎、叶以及不同发育时期幼穗的RNA, 反转录后以等量cDNA为模板进行PCR扩增, 以Actin检测RNA的质量, 结果(图1)表明, ANTs基因在‘YTA’和‘YTB’发育的各时期均有表达。

2 ANTs基因的定量表达分析

为进一步确定ANTs基因在‘YTA’和‘YTB’不

同生长发育时期的表达特异性,提取各组织的RNA后进行实时荧光定量PCR分析,以 *Actin* 基因作为持家基因参照,以‘YTB’三核期幼穗中 *ANT1* 的表达量为1,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法比较目的基因与 *Actin* 的相对表达量(图2)。从图2可以看出, *ANT3* 在不同组织中表达量都很低, *ANT1*和*ANT2*在‘YTA’和‘YTB’三叶期幼苗的根、茎、叶中的表达量都较高,而

在生殖生长不同时期的幼穗表达量较低。‘YTA’中 *ANT1* 在三叶期幼苗的叶中表达水平最高,生殖生长不同发育时期的幼穗中表达量都非常低,而 *ANT2*在茎中表达量最高,穗生长期I的幼穗表达量还很高,但到穗生长期II的幼穗则表达量很低。在‘YTB’中 *ANT1*和*ANT2*都是在茎中表达量最高,但 *ANT1* 在穗生长期III有很高的表达。与 *ANT1* 和

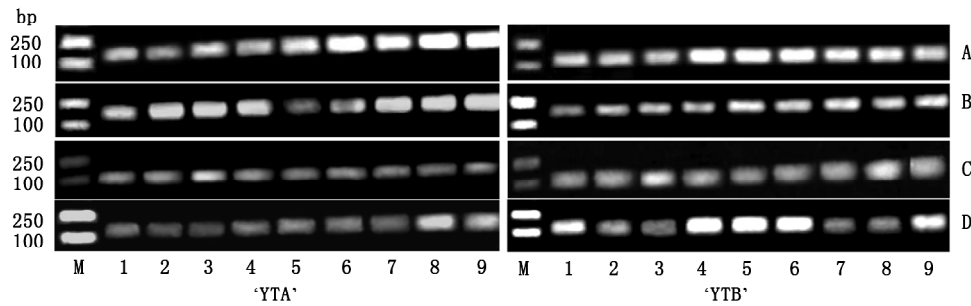


图1 ‘YTA’和‘YTB’不同组织 *ANTs* cDNA 质量检测

Fig.1 Quality checking for cDNA of *ANTs* in different tissues of ‘YTA’ and ‘YTB’

A: *ANT1*; B: *ANT2*; C: *ANT3*; D: *Actin*. M: 分子量标准 DL2000; 1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4~9: 分别为穗生长期 I~VI 的幼穗。

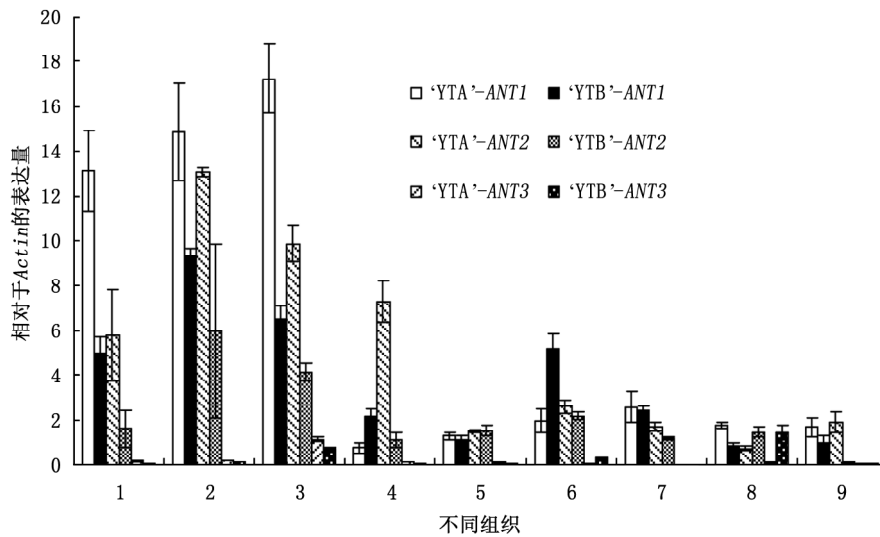


图2 *ANTs* 基因在‘YTA’和‘YTB’不同组织中定量表达分析

Fig.2 Quantitative expression analysis of *ANTs* in different tissues of ‘YTA’ and ‘YTB’

1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4~9: 分别为穗生长期 I~VI 的幼穗。

ANT2 不同, *ANT3* 在所有研究的组织中表达都较低。

3 *ANTs* 基因在‘YTA’和‘YTB’中表达趋势的比较分析

为了比较分析 *ANTs* 基因在‘YTA’和‘YTB’中

的表达趋势,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析了3个 *ANTs* 基因在水稻‘YTB’和‘YTA’不同组织中的相对表达量(图3),相对表达超过3倍则认为基因优势表达。结果表明,相对于‘YTA’,在‘YTB’中 *ANT1* 和 *ANT2* 基

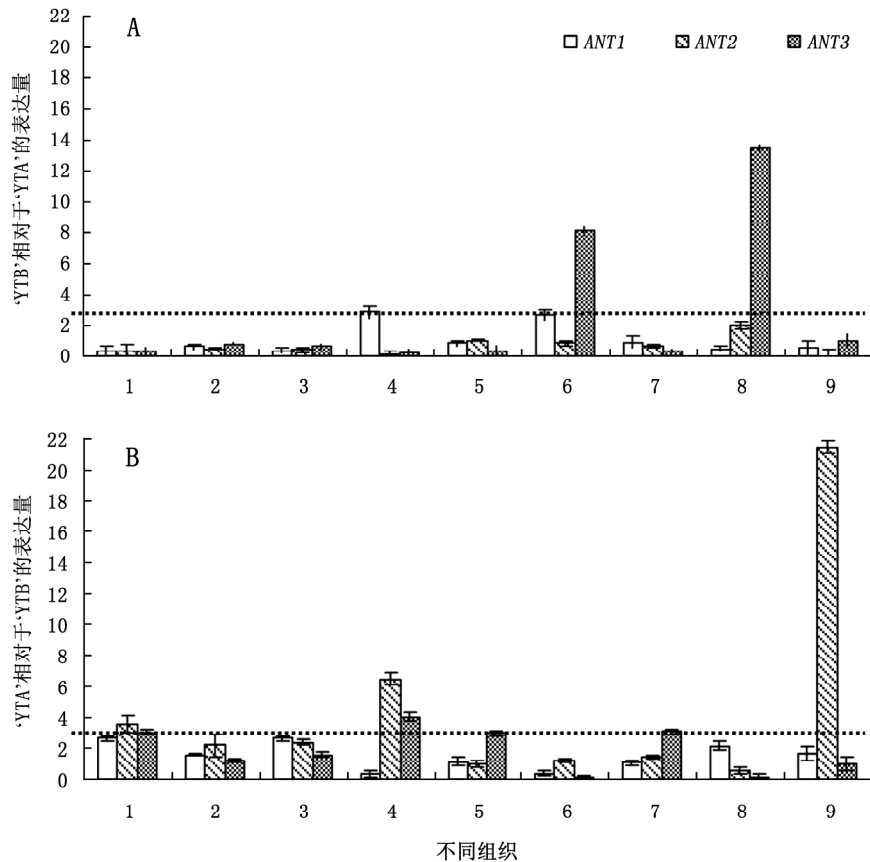


图3 *ANTs* 基因在 'YTB' 与 'YTA' 不同组织中的相对表达分析

Fig.3 Relative expression analysis of *ANTs* in different tissues of 'YTB' and 'YTA'

1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4~9: 分别为穗生长期 I~VI 的幼穗。

本上没有表现出优势表达; 尽管 *ANT3* 在 'YTA' 和 'YTB' 中的总体表达水平较低, 但 *ANT3* 在 'YTB' 穗生长期 III 和穗生长期 V 的幼穗中呈现明显的优势表达(图 3-A)。相对于 'YTB', 'YTA' 中只有 *ANT2* 在穗生长期 I 和穗生长期 VI 的幼穗具有明显的优势表达(图 3-B)。推测 *ANT2* 和 *ANT3* 的表达与 HL-CMS 水稻花粉发育关系更密切, 3 个 *ANTs* 基因可能在水稻 HL-CMS 中发挥不同的功能, 还有待进一步研究。

讨 论

HL-CMS 水稻的小孢子形成时期发生典型的细胞凋亡现象(Li 等 2004)。线粒体 ANT 是双功能蛋白, 负责跨线粒体内膜 ADP 和 ATP 的运输, 以及调控能启动细胞凋亡的线粒体渗透性转换孔

(Brown 和 Wallace 1994)。

本文用实时荧光定量 PCR, 发现 *ANT1* 和 *ANT2* 在 'YTA' 和 'YTB' 中的表达模式相似, 即在三叶期营养器官表达强而在生殖生长阶段的生殖器官表达弱; 而 *ANT3* 表达模式较前两者明显不同。这与我们实验室前期生物信息学研究得出 *ANT1* 和 *ANT2* 位于同一簇而 *ANT3* 位于单独一簇的结论一致(夏春皎 2006)。

本文证实 3 个 *ANTs* 基因在 HL-CMS 不育系 'YTA' 和保持系 'YTB' 中存在表达差异, *ANT1* 和 *ANT2* 均在 'YTA' 和 'YTB' 三叶期的根、茎、叶中的表达量较高, 而在生殖生长阶段发育不同时期的小穗中的表达量较低。 *ANT3* 在 'YTA' 和 'YTB' 的不同时期均表现为低水平表达, 且表达水平明显低于 *ANT1* 和 *ANT2*, *ANT3* 在 'YTB' 穗生长期 V 的

表达量高于其他发育时期。3个 *ANTs* 基因在 HL-CMS不育系‘YTA’和保持系‘YTB’不同组织及发育时期的表达差异, 暗示它们在水稻HL-CMS中可能行使不同的功能。在‘YTA’和‘YTB’营养生长中可能是 *ANT1* 和 *ANT2* 在起主要生理作用, *ANT3* 的表达过低说明 *ANT3* 可能是应对某种特殊环境应激性或生物特殊需求存在的。HL-CMS水稻‘YTA’和‘YTB’中3个 *ANTs* 基因所表现出来的这种表达特性与目前在其他物种中发现的 *ANTs* 基因的表达特性有相似之处。研究发现, 人类、老鼠及秀丽隐杆线虫的不同 *ANTs* 基因之间也存在着功能分工 (Torrioni等1990; Giraud等1998; Chevrollier等2005; Farina等2008)。人类 ANT 蛋白表现为复杂的组织特异性表达形式, 并在维持线粒体功能方面发挥着必不可少的作用, *ANT* 基因的双突变和调控失调与一些人类疾病相关 (Farina等2008)。

ANTs 基因在‘YTA’和‘YTB’的相对表达模式也表现差别, ‘YTB’相对‘YTA’的比较分析显示, *ANT3* 在‘YTB’中穗生长期III和穗生长期V中呈现明显的优势表达, 而相对于‘YTB’, ‘YTA’中则是 *ANT2* 在穗生长期I和穗生长期VI具有明显的优势表达。这再次证明在水稻 HL-CMS 中, *ANT2* 在营养生长可能发挥着基础作用, 满足细胞的基本需求, 而在生殖生长阶段 *ANT2* 和 *ANT3* 的差异表达则满足植物细胞的特殊功能需求。由于 HL-CMS 的不育系‘YTA’在小孢子形成时期小孢子母细胞发生典型的细胞凋亡现象 (Li等2004), 在二胞花粉晚期花药表现出败育 (徐树华1980), 根据冯九焕等 (2001) 的水稻幼穗发育时期划分法, 穗生长期I和穗生长期VI可能分别对应于小孢子母细胞形成期和二胞花粉晚期 (其确切的发育时期尚需作进一步的细胞学观察), 而这两个时期中不育系‘YTA’中 *ANT3* 的表达明显低于保持系‘YTB’, 这是否暗示 *ANT3* 可能在‘YTB’的花粉正常发育中发挥着某种重要作用, 还有待进一步研究。

参考文献

陈为, 周杰, 谭艳平, 程钢, 刘新琼, 王春台, 刘学群 (2009). 水稻 HL-CMS 中 2 个雄性不育候选基因表达模式的初步研究. 华中农业大学学报, 28 (4): 394~397

- 冯九焕, 卢永根, 刘向东, 徐雪宾 (2001). 水稻花粉发育过程及其分期. 中国水稻科学, 15 (1): 21~28
- 夏春皎 (2006). 水稻线粒体渗透性转换的鉴定及其相关基因家族的系统发育分析 [学位论文]. 武汉: 中南民族大学
- 徐树华 (1980). 同核异质水稻雄性不育系花粉和花药发育的细胞形态学观察. 作物学报, 6 (4): 225~230
- Balk J, Leaver CJ (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell*, 13: 1803~1818
- Brown MD, Wallace DC (1994). Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *J Bioenerg Biomembr*, 26: 273~289
- Chevrollier A, Loiseau D, Chabi B, Renier G, Douay O, Malthiery Y, Stepien G (2005). ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J Bioenerg Biomembr*, 37: 307~316
- Dolce V, Scarcia P, Iacopetta D, Palmieri F (2005). A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett*, 579: 633~637
- Eddy SR (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*, 14: 755~763
- Farina F, Alberti A, Breuil N, Bolotin-Fukuhara M, Pinto M, Culetto E (2008). Differential expression pattern of the four mitochondrial adenine nucleotide transporter *ant* genes and their roles during the development of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dynam*, 237: 1668~1681
- Giraud S, Bonod-Bidaud C, Wesolowski-Louvel M, Stepien G (1998). Expression of human *ANT2* gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J Mol Biol*, 281: 409~418
- Halestrap AP, Brenner C (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem*, 10: 1507~1525
- Klingenberg M (1980). The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membrane Biol*, 56: 97~105
- Klingenberg M (1985). Principles of carrier catalysis elucidated by comparing two similar membrane translocators from mitochondria, the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *Ann NY Acad Sci*, 456: 279~288
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA et al (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1366: 177~196
- Li S, Wan C, Kong J, Zhang Z, Li Y, Zhu Y (2004). Programmed

- cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Funct Plant Biol*, 31: 369~376
- Luciakova K, Kollarovic G, Barath P, Nelson BD (2008). Growth-dependent repression of human adenine nucleotide translocator-2 (ANT2) transcription: evidence for the participation of Smad and Sp family proteins in the NF1-dependent repressor complex. *Biochem J*, 412: 123~130
- Nury H, Dahout-Gonzalez C, Trezeguet V, Lauquin GJM, Brandolin G, Pebay-Peyroula E (2006). Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu Rev Biochem*, 75: 713~741
- Palmieri F (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch*, 447: 689~709
- Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trezeguet V, Lauquin GJM, Brandolin G (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, 426: 39~44
- Riccio P, Aquila H, Klingenberg M (1975). Purification of the carboxy-atractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett*, 56: 133~138
- Torroni A, Stepien G, Hodge JA, Wallace DC (1990). Neoplastic transformation is associated with coordinate induction of nuclear and cytoplasmic oxidative phosphorylation genes. *J Biol Chem*, 265: 20589~20593
- Vyssokikh MY, Katz A, Rueck A, Wuensch C, Dorner A, Zorov DB, Brdiczka D (2001). Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochem J*, 358: 349~358
- Young EG, Hanson MR (1987). A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell*, 50: 41~49