

玉米叶序对生候选基因筛选及克隆

束苏波¹, 李 猛², 谈应权¹, 马 庆^{1*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 宿州市农业科学研究所, 宿州 234000)

摘 要: 根据近等基因系对生叶序玉米 H4D 与互生叶序玉米 H4d 的转录组测序数据筛选出的差异基因, 结合玉米对生基因 *OPP-1* 和 *OPP-2* 的 SSR 分子标记定位, 将 19 个玉米对生叶序差异基因进行了染色体定位。利用比较基因组学和生物信息学分析对染色体定位的差异基因进行了详细分析, 发现 11 个对生叶序差异基因具有同源基因报道, 对其进行荧光定量 PCR 验证后发现基因表达量变化与转录组数据较为一致, 其中 8 个基因在对生中表达量显著提高, 3 个基因在对生中表达量下降。结合差异基因染色体定位与同源性分析, 筛选确定了 SSR 标记定位之间的 5 个差异基因作为候选基因。启动子分析表明这些基因启动子区域发现了多个与激素和光信号诱导相关的作用元件。以对生玉米近等基因系 H4D 和 H4d 的四叶期茎尖生长点 cDNA 为模板, 对候选基因进行克隆, 成功克隆出 *GRMZM2G077744_T01*, *GRMZM2G064845_T01* 和 *GRMZM2G348959_T01* 基因。经测序和氨基酸序列比对, 发现在 H4D 和 H4d 中, *GRMZM2G077744_T01* 基因氨基酸序列同源性为 97.30%, *GRMZM2G064845_T01* 同源性为 98.85%, *GRMZM2G348959_T01* 同源性为 98.50%。氨基酸序列上的差异可能与玉米叶序对生变异具有密切关系。

关键词: 玉米; 对生叶序; 差异基因; 候选基因; 克隆

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)03-0333-08

Screening and cloning the opposite phyllotaxy genes in maize

SHU Subo¹, LI Meng², TAN Yingquan¹, MA Qing¹

(1. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 2. Suzhou Academy of Agricultural Science, Suzhou 234000)

Abstract: Opposite phyllotaxy (two opposite leaves at the same stem node) is a new variation type in maize. Opposite phyllotaxy maize has high yield potential and is an important germplasm for plant breeding. It is also an important genetic resource for researching developmental biology. In this study, the transcriptome data of the opposite phyllotaxy maize H4D and the alternate phyllotaxy maize H4d were compared. The chromosomal locations of the DEGs were confirmed according to the SSR result of the opposite phyllotaxy-related *OPP-1* and *OPP-2* genes and 19 putative opposite phyllotaxy-related genes were located in chromosome. Using comparative genomics and bioinformatics analysis, the chromosomal locations of the DEGs were analyzed. The result showed that 11 putative opposite phyllotaxy-related genes have homologous genes in GenBank, which were further detected by qRT-PCR. The expression levels of these genes were found to be consistent with the transcriptome data. Of the 11 genes, the expression levels of eight genes significantly increased in opposite phyllotaxy maize, while the expression levels of other 3 genes decreased. Using differential gene chromosomal location and homology analysis, five differential genes between SSR marker positioning were screened as candidate genes. The promoter analyses showed that the promoter regions of these genes have multiple functional elements related to hormone (auxin, gibberellin, etc.) signal recognition and light signal conduction. Using opposite/alternate maize cDNA as templates, three candidate genes, *GRMZM2G077744_T01*, *GRMZM2G064845_T01* and *GRMZM2G348959_T01*, were successfully cloned. Analysis of the amino acid sequences showed that the similarity of *GRMZM2G077744_T01*, *GRMZM2G064845_T01*, and *GRMZM2G348959_T01* between H4D and H4d is 97.30%, 98.85%, and 98.50%, respectively, indicating that the difference in amino acid sequences may have close relationship with the maize phyllotaxis mutation.

Key words: maize, opposite phyllotaxy; differential gene; candidate gene; clone

收稿日期: 2015-03-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31101159) 和教育部博士点基金 (20113418120001) 共同资助。

作者简介: 束苏波, 硕士。E-mail: 410752084@qq.com

* 通信作者: 马 庆, 博士, 副教授。E-mail: mqqqmqq@126.com

玉米是一种禾本科单子叶植物,已成为我国重要的三大粮食作物之一,在我国工农业生产中占有举足轻重的地位。对生叶序玉米在玉米中极为少见,表现为叶序、雄穗、果穗等部分相对着生,是玉米一个新的突变体,是发育生物学研究的好材料,蕴藏着高产的潜力^[1]。

揭示对生叶序玉米的叶序对生突变机理,研究其生理及分子形成机制,不仅对植物叶序突变机理提供重要的参考价值,而且对对生玉米的对生性状的稳定遗传的研究以及分子育种,提高粮食产量等都具有重要的意义^[2]。目前国内外关于对生玉米形成机理的研究报道依然很少。美国冷泉港实验室的研究认为对生叶序玉米突变体的形成是由于 *ZmRR3* 基因转座引起的, *ZmRR3* 基因表达产物为 ABPH 蛋白,这是一类细胞分裂素调控蛋白,其表达受植物内源细胞分裂素的诱导,在内源细胞分裂素的作用下其在玉米顶端分生组织的空间表达改变迅速,因此会造成叶原基排布的改变^[3]。本实验室前期通过比较对生叶序玉米与互生叶序玉米内源激素含量,结合外源激素诱导实验,证实细胞分裂素含量变异以及由此引发的细胞分裂素含量与生长素含量比值改变是导致对生叶序突变体形成的关键因素,初步揭示了玉米对生叶序形成的生理机制^[4-5],但对对生叶序玉米细胞分裂素含量产生的变异的分子基础以及可能参与的调控基因并不清楚。

为了进一步揭示控制对生玉米形成的分子机制及关键调控基因,本研究通过以实验室筛选并稳定遗传的近等基因系对生叶序玉米 H4D 与互生叶序玉米 H4d 为材料,在通过转录组测序数据对其差异基因分析的基础上,结合前期对对生基因的 SSR 分子标记定位,利用转录组文库数据构建玉米对生叶序差异基因染色体定位,筛选候选基因并进行克隆,希望能够挖掘与玉米对生叶序性状可能存在调控基因,为创新和丰富植物叶序发育的理论,培育高产对生玉米新品种具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的植物材料以玉米 (*Zea mays*) 近等基因自交系 H4D 和 H4d 为原材料,均为本实验室保存,其中 H4D 为对生叶序, H4d 为互生叶序,选取 2 个玉米自交系的四叶期茎尖生长点组织做为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 对生/互生叶序玉米转录组差异分析 采用

改良 Trizol 法^[6]分别提取对生玉米近等基因系 H4D 和 H4d 的四叶期茎尖生长点组织总 RNA,一部分 RNA 用于 Illumina/Solexa 测序技术对其转录组进行了数字表达谱 (digital gene expression profile, DGE) 测序 (上海博奥生物科技有限公司),获得具有差异的转录组测序数据。剩余部分的 RNA 反转录而成的 cDNA,主要用于 RT-PCR 验证和候选基因克隆。

1.2.2 对生/互生叶序玉米差异基因染色体定位 本实验室前期通过分属不同类群的 8701D-8701d (P 群)、H4D-H4d (唐四平头群)、北 3D-北 3d (旅大红骨子群) 3 套稳定的对生互生近等基因系及其分析群体,构建了 F₂ 群体,通过遗传分析和 SSR 分子标记对 2 个具有互作效应的对生基因 (*OPP-1* 和 *OPP-2*) 进行了定位,其中, *OPP-1* 定位于第 2 连锁群 Bin2.01 区的 bnlgl1092 和 umc2094 标记之间,连锁距离分别为 12.2 cM 和 6.7 cM,而 *OPP-2* 定位于第 2 连锁群 Bin2.06 区的 umc1028 和 bnlgl1831 标记之间,连锁距离分别为 1.9 cM 和 6.1 cM。利用比较基因组学方法,把遗传距离转换为物理标记,其中, bnlgl1092 标记的第 2 连锁群物理位置大约定位在 1924340,位于短臂上, umc2094 标记的第 2 连锁群物理位置定位在 3063241, umc1028 标记的第 2 连锁群物理位置大约定位在 148630573,位于长臂上, bnlgl1831 标记的第 2 连锁群物理位置定位在 152208045^[7],基于该 SSR 标记根据玉米 B73 开发,不同自交系间的标记染色体位置可能存在一定的差异。为了更进一步增强对玉米对生叶序相关候选基因发掘的准确度,根据转录组测序基础数据在该区域差异基因的富集情况,将 Bin2.01 区 2 个 SSR 标记分别向上和向下各延伸 1000 kb,将位于第 2 连锁群 B2.06 区 2 个 SSR 标记向上和向下延伸各延伸了 500 kb,根据 4 个 SSR 标记在第 2 条染色体基因组上的相对位置,结合前期的转录组测序基础数据,获得在标记之间玉米对生互生叶序的差异基因,并将这些差异基因和 4 个标记的相对位置作图。

1.2.3 对生/互生叶序玉米差异基因的特征分析及玉米叶序对生候选基因的筛选 对定位在 SSR 分子标记之间和附近的差异基因在 NCBI 进行 Blastn 同源性分析,搜索其在其他物种中的同源基因,选取同源基因的蛋白质 *P-value* 值 $1e^{-10}$ 以上,明晰这些蛋白的结构和潜在的功能,筛选具有同源蛋白或功能的基因作为玉米叶序对生候选基因。

1.2.4 候选基因的 RT-PCR 验证 将对生玉米近等基因系 H4D 和 H4d 的四叶期茎尖生长点组织总 RNA 反转录,获得 H4D 和 H4d 的四叶期茎尖生长

点 cDNA 文库, 根据候选基因的已知序列设计引物, 进行 RT-PCR, 测定候选基因在对生叶序玉米和互生叶序玉米中的表达差异, 并验证其与转录组数据的一致性。

1.2.5 候选基因启动子顺式作用元件分析 根据候选基因在基因组中的位置, 获取这些基因起始密码子上游 2000 bp 的启动子区域序列, 通过 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 在线分析工具, 对获得的序列进行作用原件鉴定。

1.2.6 候选基因的克隆及氨基酸序列差异分析 根据玉米 B73 数据库公布的基因序列获得候选基因编码序列, 根据玉米 B73 数据库公布的基因序列设计候选基因的特异性引物, 分别以 H4D 和 H4d 的四叶期茎尖生长点 cDNA 文库为模板, PCR 扩增获得全长基因, 测序后在 NCBI 比较其在对生叶序玉米 H4D 和互生叶序玉米 H4d 中的氨基酸序列差异。使用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增编码序列全长引物。所用引物的合成由上海生工生物工程有限公司完成; DNA 测序工作由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成; 测序结果使用 Sequencher 4.5 软件校对。

2 结果与分析

2.1 对生玉米 H4D 与互生玉米(H4d)叶片总 RNA 的提取

按照 Trizo1 法分别提取对生叶序和互生叶序玉米四叶期生长点总 RNA, 并使用 *DNase I* 对总 RNA 进行了去基因组处理。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示(如图 1), RNA 样品电泳条带清晰, 并且 28S rRNA 与 18S rRNA 亮度接近 1:1, 表明总 RNA 没有发生降解。通过微型分光光度计检测, 显示所提的玉米总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间, A_{260}/A_{230} 比值大于 2, RNA 纯度合格, 2 个样品 RNA 的浓度均大于 $400 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 总量均大于 $20 \mu\text{g}$, RNA 总量和浓度均合格, 纯度和完整性完全符合实验要求。

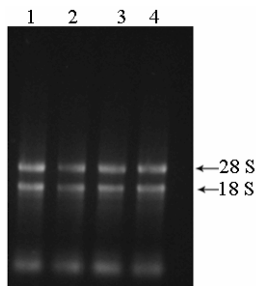


图 1 互生玉米 H4d (1,2) 与对生玉米 H4D (3,4) 总 RNA 琼脂糖电泳检测结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from alternate maize H4d (1, 2) and opposite maize H4D (3, 4)

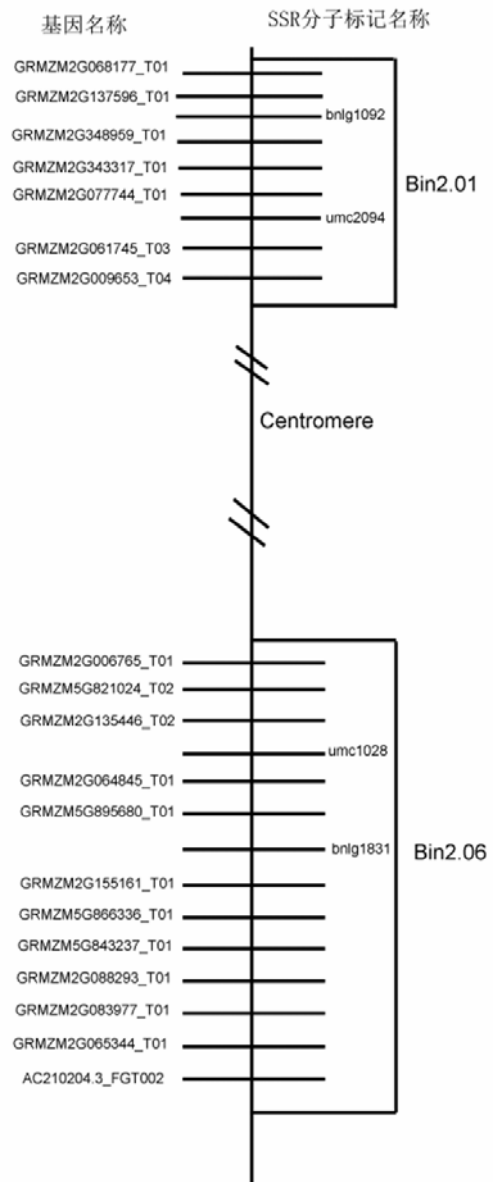


图 2 对生/互生叶序玉米差异基因定位图谱(第 2 连锁群)
Figure 2 DEGs location of gene with different expression in opposite and alternate maize (the second linkage group)

2.2 对生/互生叶序玉米转录组差异分析

经上海博奥生物对生叶序和互生叶序玉米四叶期生长点总 RNA 样本进行转录组测序, 共获得 63920 个转录本信息, 其中具有差异表达的转录本信息共有 2342 个, 构成对生互生叶序玉米差异表达的转录组基础数据。

2.3 对生/互生叶序玉米差异基因染色体定位

根据转录组测序基础数据, 位于这两个标记之间的差异基因共有 3 个, 考虑到该 SSR 标记根据玉米 B73 开发, 不同自交系间的标记染色体位置可能存在一定的差异, 为了更进一步增强对玉米对生叶序相关候选基因发掘的准确度, 根据测序在该区域

差异基因的富集情况,将2个SSR标记分别向上和向下各延伸1000 kb,再各获得2个差异基因。根据同样原理和方法,首先将位于第2连锁群B2.06区的标记umc1028标记的第2连锁群物理位置大约定位在148630573,位于长臂上,bnlg1831标记的第2连锁群物理位置定位在152208045,其间共有2个显著差异基因存在,由于该区域富集差异基因较为

丰富,向上和向下延伸分别延伸了500 kb,再获得了10个差异基因。从而,根据4个SSR标记在第2条染色体基因组上的相对位置,结合前期的转录组测序基础数据,在标记之间和附近累计获得了19个差异基因,并将这些差异基因和4个标记的相对位置作图(图2)。这些基因在后续的分析中可作为玉米叶序对生的重要候选基因。

表1 *Opp-1*和*Opp-2*位点附近差异基因同源性分析结果
Table 1 Homologous alignment of differentially expressed genes nearby *Opp-1* and *Opp-2*

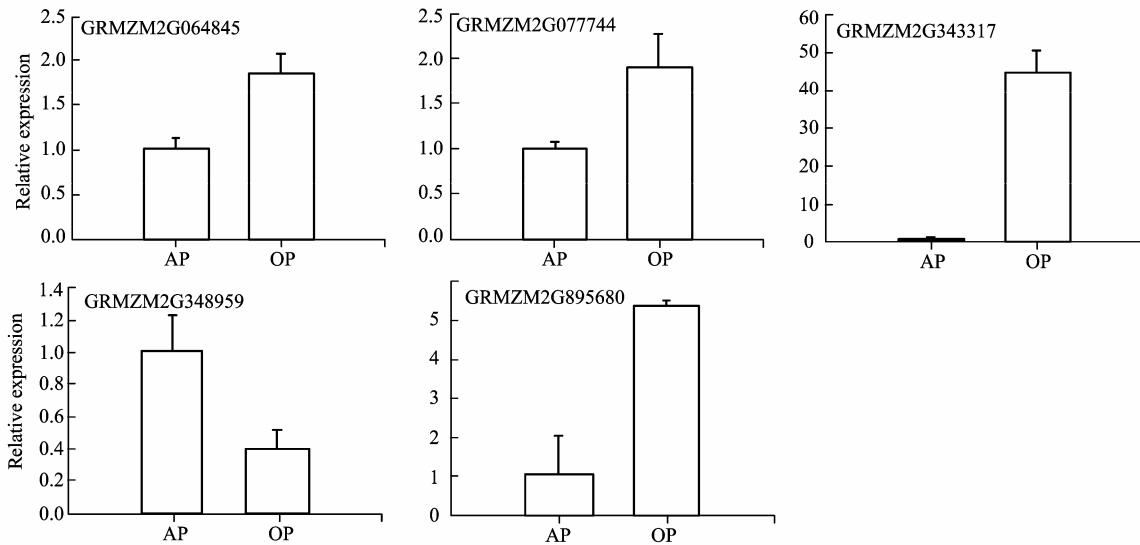
基因号 Gene number	比例* Ratio	蛋白长度 Protein length	同源基因 Homologous gene	相似性 E-value
<i>GRMZM2G077744_T01</i>	2.2	146	Signal recognition particle 19 kDa protein from <i>Oryza sativa</i> (Os06g0342100)	9e-79
<i>GRMZM2G343317_T01</i>	15.9	298	Putative protein from <i>Setaria italica</i> (<i>Setaria italica</i>)	9e-52
<i>GRMZM2G068177_T01</i>	-2.1	354	DHHC zinc finger domain containing protein	0.0
<i>GRMZM2G348959_T01</i>	1.3	134	Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g033150 [<i>Sorghum bicolor</i>]	8e-87
<i>GRMZM2G065344_T01</i>	5.0	63	Putative serine peptidase S28 family protein	1e-04
<i>GRMZM2G088293_T01</i>	-15.4	738	Transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class <i>Oryza sativa</i> , ABA98854.1	2e-66
<i>GRMZM2G064845_T01</i>	-2.2	261	PREDICTED: two-component response regulator protein (<i>Setaria italica</i>), ADO51647.1	8e-180
<i>GRMZM5G821024_T02</i>	1.7	250	bZIP transcriptional activator RSG from <i>Oryza sativa</i> (Os12g0162500)	1e-101
<i>GRMZM2G135446_T02</i>	-1.4	402	Putative PIFa transposase (<i>Zea mays</i>), AEJ07903.1	0.0
<i>GRMZM2G061745_T03</i>	-1.5	304	26S proteasome regulatory particle non-ATPase subunit8 [(<i>Oryza sativa</i>), BAB78487.1	8e-58
<i>GRMZM2G137596_T01</i>	-4.6	143	Translation protein SH3-like domain containing protein [(<i>Oryza sativa</i>), Os02g0481000	2e-56
<i>AC210204.3_FGT002</i>	1.5	331	Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g012580 (<i>Sorghum bicolor</i>)	3e-122
<i>GRMZM2G083977_T01</i>	1.3	103	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-3 (<i>Zea mays</i>), ACG35589.1	1e-23
<i>GRMZM5G843237_T01</i>	15.5	60	None	
<i>GRMZM5G866336_T01</i>	2.8	71	Hypothetical protein (<i>Oryza sativa</i>), NP_001176304.1	1e-36
<i>GRMZM2G155161_T01</i>	-13.9	60	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g027763 (<i>Sorghum bicolor</i>)	8e-21
<i>GRMZM5G895680_T01</i>	-14.4	37	None	
<i>GRMZM2G009653_T04</i>	15.5	28	None	
<i>GRMZM2G006765_T01</i>	1.6	63	Putative actin family protein, maize ,DAA39085.1	7e-100

* 互/对生表达水平 Expression ratio of H4D to H4d

2.4 对生/互生叶序玉米差异基因的特征分析及候选基因筛选

对上述19个定位在SSR分子标记附近的差异基因在NCBI进行Blast同源性分析结果(表1)显示:19个基因中目前有同源基因报道的11个,分别存在于水稻、高粱、谷子等单子叶植物中,主要分为4种类型,*GRMZM2G064845_T01*与细胞分裂素代谢和信号传导相关,该基因与谷子二元反应调节蛋白ADO51647.1具有较高的同源性,属于激素代谢相关基因;*GRMZM2G077744_T01*蛋白与水稻的信号识别颗粒(SRP)相关蛋白有较高同源性;*GRMZM2G065344_T01*与水稻中的丝氨酸蛋白酶有较高的同源关系;*GRMZM2G061745_T03*与水稻26S蛋白酶体基因有较高同源性;*GRMZM2G137596_*

*T01*与水稻中一个包含SH3结构域的蛋白质有较高同源性;*GRMZM2G083977_T01*属于肽基顺反异构酶家族,目前在玉米中有其同源基因,该家族蛋白主要参与到免疫抑制、蛋白质折叠、细胞信号传导等多种生物学过程这5个基因属于酶活性蛋白基因;*GRMZM2G068177_T01*和*GRMZM5G821024_T02*基因隶属于不同的转录因子,前者是一个DHHC类型的锌指蛋白转录因子,后者是属于bZIP蛋白家族的转录因子,*GRMZM2G006765_T01*基因属于actin蛋白家族,这3个基因属于转录因子调控基因;*GRMZM2G088293_T01*属于En/Spm转座子家族,*GRMZM2G135446_T02*属于PIF转座酶家族,这2个基因属于转座相关基因。

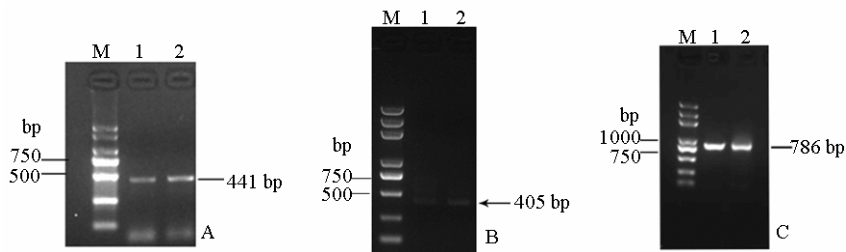


AP: 互生叶序玉米 H4d; OP: 对生叶序玉米 H4D
 AP: alternate phyllotaxis maize H4d; OP: opposite phyllotaxis maize H4D
图 3 5 个候选基因在对生/互生叶序玉米中的相对表达量
 Figure 3 Relative expression levels of five candidate genes in AP and OP

表 2 5 个候选基因启动子顺式作用元件分析
 Table 2 Analysis of promoter original cis-acting about the five candidate genes

	<i>GRMZM2G348959_T01</i>	<i>GRMZM2G343317</i>	<i>GRMZM2G077744</i>	<i>GRMZM5G895680</i>	<i>GRMZM2G064845_T01</i>
S000270	728 (+)	1328 (+)	316 (+), 623 (+), 639 (+), 1823 (+)	/	681 (+), 1806 (+), 1407(-)
S000024	698 (-) 1111 (-) 306 (+), 892 (+), 1715 (+), 1905 (+), 695 (+), 709 (+), 1707 (+), 1907 (+)	1744 (-), 1789 (-)	953 (-), 1770 (-), 1813 (-)	/	/
S000501	1996 (+), 306(-), 892 (-), 1715 (-), 1905(-), 695(-), 709(-), 1707 (-), 1907 (-), 1996 (-)	1748(+), 1754 (+), 1730(+), 1849 (+)	1996 (+), 1996 (-)	/	/
S000439	1366 (-), 658 (-), 1452 (-)	1294 (+)	1579 (+), 1669 (+)	173 (-)	615 (-), 846 (-)
S000499	729(-), 932(-), 1446(-), 1894 (-), 1950 (-)	487(+), 1725(+), 1329 (-)	143(+), 317(-), 624(-), 640(-), 683 (-), 1824 (-)	673 (+), 1955 (-)	534(+), 1407(+), 682 (-), 1807 (-)

Note : S000270: ARFAT; S000024: ASF1MOTIFCAMV; S000501: CGCGBOXAT; S000439: GAREAT; S000499: SURECOREATSULTR11.



M: *Trans2K* DNA Marker; lane 1: H4D; lane 2: H4D
 A, *GRMZM2G077744_T01*; B, *GRMZM2G348959_T01*; C, *GRMZM2G064845_T01*

图 4 3 个候选基因 PCR 扩增的电泳分析
 Figure 4 Electrophoresis analyses of three candidate genes by PCR amplification

在 19 个基因中没有同源蛋白或功能未知的共有 8 个, 分别为 *GRMZM2G343317_T01*, *GRMZM2G-*

348959_T01, *AC210204.3_FGT002*, *GRMZM5G 843-237_T01*, *GRMZM5G866336_T01*, *GRMZM2G1551-*

61_T01, GRMZM5G895680_T01 和 GRMZM5G8432-37_T01。其中 GRMZM5G895680_T01 和 GRMZM5G-843237_T01 除了在玉米中有该基因外,其他基因组中基本没有同源基因,另外 6 个基因除了玉米中有之外,在高粱,谷子,水稻等基因组中发现了同源蛋白,但是目前尚不知道其潜在功能。

结合染色体定位结果,11 个具有同源基因报道的基因中共有 5 个位于 2 对 SSR 标记之间,分别为 GRMZM2G077744_T01, GRMZM2G343317_T01, GRMZM2G348959_T01, GRMZM2G064845_T01 和 GRMZM5G895680_T01, 选定其作为候选基因。

2.5 玉米叶序对生候选基因荧光定量 PCR 分析

5 个候选基因在对互生中表达量都有差异, GRMZM2G077744_T01, GRMZM2G343317_T01, GRMZM2G064845_T01 和 GRMZM5G895680_T01 基因在对生叶序玉米 H4D 中上调表达, GRMZM2G348959_T012 基因在互生叶序玉米 H4d 中下调表达(图 3), 荧光定量 PCR 检测基因表达的变化与转录组数据高度一致。

2.6 玉米叶序对生候选基因启动子顺式作用元件分析

通过 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 在线分析结果显示,在候选基因的启动子区域发现了多个与激素(生长素、赤霉素等)和光信号诱导相关的作用元件(表 2)。特别是在 GRMZM2G348959_T01 和 GRMZM2G343317 2 个基因启动子序列中,发现了信号识别反应位点分布富集的特点,它们在植物激素信号识别及传导过程中具有重要作用。

2.7 玉米叶序对生候选基因的克隆

5 个候选基因, GRMZM2G077744_T01、GRMZM2G348959_T01 和 GRMZM2G064845_T01 在对生和互生中都获得了目的条带,大小分别为 441 bp、405 bp 和 786 bp(图 4A、图 4B 和 图 4C),而其他 2 个基因在扩增中并未获得结果。

氨基酸序列分析结果显示,克隆的 GREMZM2G077744_T01-H4D 基因编码一个由 146 个 aa 组成的蛋白,分子量为 16.57 kDa,而在互生玉米中克隆的 GREMZM2G077744_T01-H4d 编码一个由 147 个 aa 组成的蛋白,分子量为 16.16 kDa;其氨基酸序列同源性分析显示对生玉米的 GREMZM2G077744_T01-H4D 与互生玉米 GREMZM2G077744_T01-H4d 在第 3 和第 4 的氨基酸位置发生变异,分别由互生玉米 GREMZM2G-077744_T01-H4d 上天冬酰胺(N)、丙氨酸(A)变成了苏氨酸(T)、亮氨酸(L),并且在第 146 的氨基酸位置上对生玉米上的赖氨酸(K)缺失(图 5)。两者的氨基酸序列相似性为 97.30%。该蛋白属于信号肽识别颗粒(signal recognition particle),可能对其他蛋白具体重要的调控作用,目前该基因并无功能报道。

GRMZM2G348959_T01 及 GRMZM2G064845_T01 基因 DNA 序列在 H4D 和 H4d 上也有一定差异(图 6 和图 7)。克隆的 GRMZM2G064845_T01-H4D 和 GRMZM2G064845_T01-H4d 均编码一个由 261 个 aa 组成的蛋白,分子量分别为 29.90 kDa 和 29.92 kDa;其氨基酸序列同源性分析结果显示对生玉米的 GRMZM2G064845_T01-H4D 与互生玉米 GRMZM2G064845_T01-H4d 在第 18 及第 131 的氨基酸位置发生变异,分别由互生玉米 GRMZM2G064845_T01-H4d 上甲硫氨酸(M)、亮氨酸(L)变成了缬氨酸(V)、谷酰胺(Q)。两者的氨基酸序列相似性为 98.85%。该蛋白可能对其他蛋白具体重要的调控作用,是一个重要的候选基因。目前对该基因并无功能报道。而基因 GRMZM2G348959_T01 在对生玉米 H4D 和互生玉米 H4d 中只有 2 个氨基酸位置发生变异,其编码 133 个 aa 的蛋白,氨基酸序列相似性达到 98.50%,该蛋白可能具有重要调控作用,其基因功能目前尚未报道。



图 5 GREMZM2G077744_T01-H4D 与 GREMZM2G077744_T01-H4d 氨基酸序列比对
Figure 5 Alignment of amino acid sequence of GREMZM2G077744_T01-H4D and GREMZM2G077744_T01-H4d

GRMZM2G348959_P01 (H4d)	MFSGDWTPPOGSSCCTKKYASLVQIPWRFVCKKGCNADGDTWDECIGKCTEICYKDPVLED	60
GRMZM2G348959_P01 (H4D)	MFSGDWTPPOGSSCCTKKYASLVQIPWRFVCKKGCNADGDTWDECIGKCTEICYKDPVLED	60
Consensus	mf dwtppgsctkkyaslvqipwrvfckkgcnadgdtwdecigkcteicykdpvled	
GRMZM2G348959_P01 (H4d)	RQMSAYIDRSPGQDSYSLECFNACVSGCGFRFDIPTKEKVEEIKPNRPSKPSAPEPEVKQT	120
GRMZM2G348959_P01 (H4D)	RQMSAYIDRSPGQDSYSLECFNACVSGCGFRFDIPTKEKVEEIKPNRPSKPSAPEPEVKQT	120
Consensus	rqmsayidrspgqdsyslecfnacvsgcgfrfdiptekveeikpnrpskpsapepevkqt	
GRMZM2G348959_P01 (H4d)	RNADCNEDVPCPA	133
GRMZM2G348959_P01 (H4D)	RNADCNEDVPCPA	133
Consensus	rnadcnedvpcpa	

图 6 GRMZM2G348959_T01-H4D 与 GRMZM2G348959_T01-H4d 氨基酸序列比对

Figure 6 Alignment of amino acid sequence of GRMZM2G348959_T01-H4D and GRMZM2G348959_T01-H4d

GRMZM2G064845_P01 (H4d)	MATSDKKTRGYVFWNNEVDKVLDDTFVDYVYNGDRCCIGWAKSHVYTAAVKINCEKCNVTI	60
GRMZM2G064845_P01 (H4D)	MATSDKKTRGYVFWNNEVDKVLDDTFVDYVYNGDRCCIGWAKSHVYTAAVKINCEKCNVTI	60
Consensus	matsdkktrgyvwnnevdkvlldtfvdyvynkgdrccigwakashvytaavknvcekcnavti	
GRMZM2G064845_P01 (H4d)	TKENISSRSKTFDKHYNIINGLLSTSGFGWDEKKNKLVSDTVWDEYVERNKEAKGYRH	120
GRMZM2G064845_P01 (H4D)	TKENISSRSKTFDKHYNIINGLLSTSGFGWDEKKNKLVSDTVWDEYVERNKEAKGYRH	120
Consensus	tkenissrsktfdkhyniingllstsgfgwdeknkklvdsdtvwdeyverneakgyrh	
GRMZM2G064845_P01 (H4d)	KVVKFWDLLSIVYNKDQANGEGAKTAAESSKEMAKENDTGGKDA PYSVASSSSLKRQRSD	180
GRMZM2G064845_P01 (H4D)	KVVKFWDLLSIVYNKDQANGEGAKTAAESSKEMAKENDTGGKDA PYSVASSSSLKRQRSD	180
Consensus	kvvkfwlls vynkdqangegakt aesskemakendtgkdpypsvasssslkrqrsd	
GRMZM2G064845_P01 (H4d)	DSFNSMWCDFDMLTSALKDDGPKLPSSADVLAAALQVEVEGLDEDTELELYDILTSNARF	240
GRMZM2G064845_P01 (H4D)	DSFNSMWCDFDMLTSALKDDGPKLPSSADVLAAALQVEVEGLDEDTELELYDILTSNARF	240
Consensus	dsfnsmwcdkfdmltsalkddgpklpssadvlaalqvevegldeedteleylydiltsnarf	
GRMZM2G064845_P01 (H4d)	ESMMALPMERRKRWLMMQLRK	261
GRMZM2G064845_P01 (H4D)	ESMMALPMERRKRWLMMQLRK	261
Consensus	esmmalpmerrkrwlmmqlrk	

图 7 GRMZM2G064845_T01-H4D 与 GRMZM2G064845_T01-H4d 氨基酸序列比对

Figure 7 Alignment of amino acid sequence of GRMZM2G064845_T01-H4D and GRMZM2G064845_T01-H4d

3 讨论

尽管叶序发育的调控分子机理十分复杂, 人们对于植物叶序的形成机制的研究一直是热点。目前关于叶序调控基因的相关研究报道在多种植物上都有发现。这些调控基因多种多样, 如在拟南芥中 WUS 家族, PIN 家族, CLV3 家族和 YUCCA1 家族基因, 水稻中的 DEC 类型基因等都参与到叶序发育调控中。例如拟南芥 *pin1* 突变体的子叶常融合在一起或表现其他变形、部分叶片宽大、叶序紊乱而且花序呈针状排列, 它的表型是由生长素极性运输过程中的外运载体 PIN1 失活所造成的^[8]。叶序的发育和调控与植物激素有较密切的关系, 同时多种蛋白参与调控, 并不是唯一的一种途径, 其调控机理目前还没有明确的模式来解释。

关于对生叶序玉米的研究, Giuliani 等^[9]认为对生玉米突变体的形成是由于细胞分裂素调控基因 *abphyl* (*ZmRR3*) 基因突变引起的。本实验室前期研究发现细胞分裂素、生长素都与对生叶序形成有

关, 生长点 CTK/AUX 值的稳定和变化是决定玉米叶原基分化的关键因素^[4-5]。通过对对生基因 SSR 标记多态性筛选及连锁遗传分析, 将其定位于 2 号染色体上。本研究结合分析 H4D/H4d 的转录组数据, 筛选出标记附近的 19 个基因, 这 19 个基因都是重要的候选基因。我们对其进化和结构功能进行了分析预测, 发现其中 11 个基因拥有同源蛋白的报道, 11 个功能基因分别与酶、转录因子及转座子等多种基因具有较明显的关系, 分别存在于水稻、高粱、谷子等单子叶植物中, 而其余 8 个基因没有任何有意义的同源基因, 也不能够确认这些基因参与的调控和信号传导途径。在这 11 个功能基因中, 一个是细胞分裂素代谢相关基因, 该基因属于细胞分裂素调控基因 *abphyl* (*ZmRR3*) 基因家族, 位于 *Opp-2* 位点较近的位置, 可能是参与玉米叶序发育调控的重要基因。有 5 个具有酶活性的基因, 分别参与到信号识别颗粒、丝氨酸蛋白酶等多种途径, 这些基因可能是间接影响叶序发育。另外有 3 个候选基因属于转录因子, 一个是 DHHC 类型的锌指蛋白转录因

子,一个是 bZIP 类转录因子,一个属于 actin 蛋白家族。DHHC 类型蛋白在分蘖、器官发育过程中有重要作用,其中与激素代谢调控也有较密切的关系^[9]。因此该基因也是一个重要的候选基因。bZIP 类转录因子基因往往与植物的抗逆相关,常与 ABA 信号传导途径相关,参与植物的一些光形态建成^[10]。Actin 蛋白涉及植物细胞的分裂机制、细胞运动、细胞器运动、细胞的极性、细胞空间形状的维持及物质运输等^[11]。此外,还有 2 个候选基因为重要的转录因子,En/Spm 转座子和 PIF 转座子。玉米是含转座子较为丰富的物种之一^[12],对生叶序的出现是否因为这 2 个转座子基因的插入失活或激发引起,还需深入研究。

4 结论

利用转录组数据并结合玉米对生基因 *OPP-1* 和 *OPP-2* 的 SSR 分子标记定位,筛选确定了 SSR 标记定位之间的 5 个差异基因作为候选基因,并成功克隆出 *GRMZM2G077744_T01*, *GRMZM2G064845_T01* 和 *GRMZM2G348959_T01* 基因。经测序和氨基酸序列比对,发现在对生叶序玉米 H4D 和互生叶序玉米 H4d 中, *GRMZM2G077744_T01* 基因氨基酸序列同源率为 97.30%, *GRMZM2G064845_T01* 同源率为 98.85%, *GRMZM2G348959_T01* 同源率为 98.50%。氨基酸序列差异上的可能与玉米叶序对生变异有着密切关系。

参考文献:

- [1] 刘正,程备久. 利用对生玉米进行相互全姊妹轮回选择的基础研究[J]. 作物品种资源, 1998(3): 13-17.
- [2] 王波,谷业理. 一种新玉米种质资源—对生玉米[J]. 作物品种资源, 1995(4): 31-32.
- [3] Giulini A, Wang J, Jackson D. Control of phyllotaxy by the cytokinin inducible response regulator homologue ABPHYL1[J]. Nature, 2004, 430(7003): 1031-1034.
- [4] 马庆,程郢,齐璐璐,等. 对生玉米互生玉米内源激素含量的差异分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(6): 995-1000.
- [5] 马庆,齐璐璐,李晓玉,等. 外源细胞分裂素对组培玉米叶原基分化的调控[J]. 作物学报, 2008, 34(11): 2053-2058.
- [6] 刘章雄,王守才,戴景瑞,等. 玉米 P_(25)自交系抗锈病基因的遗传分析及 SSR 分子标记定位[J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 64-71.
- [7] Tan Y Q, Xie C X, Jiang H Y, et al. Molecular mapping of genes for opposite leafing in maize using simple-sequence repeat markers[J]. Genetics Molecular Research, 2011, 10(4): 3472-3479.
- [8] 黄海. 植物叶发育调控机理的研究进展[J]. 植物学通报, 2003, 20(4): 416-422.
- [9] Busby M A, Gray J M, Costa A M, et al. Expression divergence measured by transcriptome sequencing of four yeast species[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 635.
- [10] Xin M, Yang R, Li G, et al. Dynamic expression of imprinted genes associates with maternally controlled nutrient allocation during maize endosperm development [J]. Plant Cell, 2013, 25(9): 3212-3227.
- [11] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 235-242.
- [12] Okada K, Ueda J, Komaki M K, et al. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of arabidopsis floral bud formation.[J]. Plant Cell, 1991, 3(7): 677-684.