

## 胚乳自主发生型龙须草 *FIE* 基因部分 cDNA 序列克隆和分析

旷乐<sup>1</sup>, 胡春根<sup>2</sup>, 姚家玲<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

**摘要:** 根据拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)等物种的 *FIE* 序列的保守区域设计简并引物, 以龙须草(*Eulaliopsis binata*)的花序为材料, 抽提 RNA, 用 RT-PCR 的方法扩增到 800 bp 左右的片段, 将其克隆到 pGEM-T 载体上并测序。结果表明该片段与已报道的玉米、高粱(*Sorghum halepense*)和水稻等 *FIE* 同源基因具有较高的相似性, 为龙须草 *FIE* 基因特异片段。

**关键词:** *FIE*; 无融合生殖; 基因克隆

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)06-0631-05

## Cloning and Analyzing of Partial cDNA Sequences of *FIE* in Autonomous Endosperm Type *Eulaliopsis binata*

KUANG Le<sup>1</sup>, HU Chun-Gen<sup>2</sup>, YAO Jia-Ling<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Horticultural and Forest, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** RNA was extracted from inflorescence of *Eulaliopsis binata* and used as template for cloning by RT-PCR with degenerate primers which were designed according to the *FIE* homologous sequences of *Arabidopsis*, rice and maize. As a result, one about 800 bp fragment was obtained and then cloned and sequenced. Analysis with partial cDNA sequence and deduced amino acid sequence suggested that the fragment was similar to the reported *FIE* homologous genes of maize, sorghum and rice. The partial cDNA is a part of *FIE* gene in *Eulaliopsis binata*.

**Key words:** *FIE*; Apomixis; Gene clone

双受精是被子植物所特有的生殖方式, 授粉后, 一个精子与卵细胞融合形成受精卵(合子)进而发育为胚, 而另一个精子与中央细胞融合形成受精极核并发育为胚乳。胚乳的发生、发育直接关系到禾谷类种子籽实的饱满程度。

无融合生殖避开了双受精的有性生殖途径, 使被子植物不经雌雄配子的融合也能形成种胚。其胚乳的发生具有两种类型: 假受精类型和自主发生类型。假受精类型, 即极核或次生核需要受精才能发育形成胚乳; 自主发生类型, 即极核或次生核不经受精自主分裂形成胚乳<sup>[1]</sup>。前者在无融合生殖植物中占绝大多数, 只有少数几个无融合生殖植物, 如蒲公英属的二倍体孢子生殖种类(*Taraxacum officinalia*)<sup>[1]</sup>、山柳菊属(*Hieracium*)<sup>[2]</sup>, 以及雌雄异株植物(*Commiphora wightii*)<sup>[3]</sup>等, 其胚乳为自主发生类型。

胚乳作为胚发育和种子萌发营养的主要来源, 是植物体的重要组织, 而胚乳发生发育机理的阐明对于提高禾谷类作物的结实率和籽实饱满程度也具有重要意义。Ohad 等先后报道从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离了系列 *fis* 基因、*fis1/mea*、*fis2*、*fis3/FIE*, 它们都与胚乳的发育相关<sup>[4,5]</sup>。其中 *FIE*(fertilization independent endosperm)基因能编码产生具有 WD40 motif 的 polycomb 蛋白质。这类蛋白质可同时与多种多肽(特别是 MEA 编码的具有 SET domain 的蛋白质多肽)结合, 形成稳定的复合物, 在受精前抑制雌配子体中央细胞核复制基因的转录<sup>[4]</sup>。Ohad 称, *FIE* 可能通过与控制细胞周期元件 pRb 的互作, 从而抑制中央细胞核复制所需基因的表达, 影响胚乳的发育<sup>[6]</sup>。近年来, 人们又从水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、高粱(*Sorghum*

收稿日期: 2007-05-08, 修回日期: 2007-09-11。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30670127)。

作者简介: 旷乐(1981-), 男, 植物学硕士, 主要从事分子生物学研究。

\* 通讯作者(E-mail: yaojlm@ mail. hzau. edu. cn)。

*halepense*)等禾谷类作物和非禾谷类作物(如桉树 *Eucalyptus* spp.)以及动物中分离到胚乳自主发生相关突变型基因 *FIE*,且同源性较高。

龙须草为禾本科拟金茅属多年生草本植物<sup>[7]</sup>,本课题组经多年研究发现,龙须草的无融合生殖为无孢子生殖,对龙须草不同居群自然结实种子的流式细胞检测发现,有2C:4C胚和胚乳的相对C值比的胚乳自发产生类型,结合胚胎学、细胞学和遗传学研究证明,龙须草中存在胚乳自主发生型无融合生殖<sup>[8]</sup>。

本研究以龙须草胚乳自主发生的生物型为材料,分离胚乳自主发生基因 *FIE*,以进一步研究其胚乳发生发育的分子机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

本试验所用的胚乳自发类型龙须草(*Eulaliopsis binata*)株系为本课题组收集和保存的星子居群红杆型龙须草,种植编号为星子T3。2005年5月20日取开花前和开花后的花序。

Trizol试剂盒(Invitrogen)、*Taq* DNA聚合酶(TaKaRa Japan)和dNTPs(AMresco分装)。pGEM-T载体购自Promega公司,X-gal和IPTG购自Sigma公司。其它试剂如培养基的各种成分等均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 *EbFIE* 部分序列的分离方法

用于RNA提取、逆转录溶液均用0.1%的DEPC处理水配制;所用玻璃器皿经180℃烘烤8h,塑料制品均用0.1% DEPC浸泡过夜、高压灭菌并烘干后备用。操作过程应尽量避免RNase污染。

#### 1.2.1 RNA提取和RT-PCR

采用Trizol试剂盒提取开花前和开花后花序的RNA(操作参照试剂盒说明书)。取2 μg总RNA,用反转录试剂盒(Amersham biosciences)合成1st-strand cDNA。根据拟南芥、玉米、水稻等 *FIE* 基因序列的保守区域设计简并引物。上游引物P1:5'-GCIAGCAAGGATGAATCT-3';下游引物P2:5'-AAGIATIGTGCTTCCITC-3'。引物由Invitrogen公司合成,其中I表示次黄嘌呤。RT-PCR反应体系为20 μL,其中10×buffer 2 μL、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1 μL、dNTPs 1 μL、*Taq* 酶0.2 μL(1 U)、cDNA模板0.5 μL、上游引物1 μL、下游引物1 μL、ddH<sub>2</sub>O 13.3 μL。

PCR扩增程序为:94℃变性5 min,94℃ 40 s,40℃ 40 s,72℃ 50 s,35个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。取5 μL PCR产物电泳检测,其余-20℃保存备用。胶回收试剂盒(上海生工)纯化PCR产物,电泳检测。

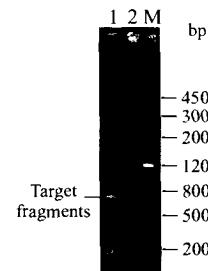
### 1.2.2 TA克隆和测序、分析

纯化的PCR产物与pGEM-T载体连接,转化大肠杆菌,在含IPTG、X-gal、Amp的LB平板上筛选阳性克隆。随机挑取白斑单菌落提取质粒酶切鉴定并测序。将所测序列在NCBI上通过Blastn和Blastp进行序列相似性分析,最后用DNASTAR和GENEDOC软件进行序列的比较分析。

## 2 研究结果

### 2.1 RNA提取及*EbFIE* cDNA部分序列扩增

以开花后花序分离得到总RNA,通过RT-PCR的方法扩增到800 bp左右的cDNA片断。电泳结果见图1。胶回收试剂盒纯化PCR产物。



1. Pre-flowering; 2. Post-flowering; M. DNA marker

图1 RT-PCR电泳图

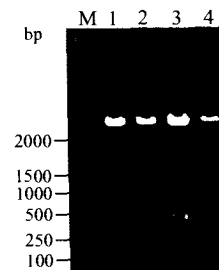
Fig. 1 RT-PCR electrophoresis

### 2.2 *EbFIE* 部分cDNA克隆与测序

将通过PCR反应扩增的龙须草 *FIE* 基因特异性条带连接到pGEM-T载体上,并转化到大肠杆菌中。经过蓝白斑筛选,选取3个白斑和1个蓝斑,分别提取质粒DNA。

因为pGEM-T载体两端含有 *Pst* I (CTGCA<sub>Δ</sub>G/G<sub>Δ</sub>ACGTC)和 *Nco* I (C<sub>Δ</sub>CATGG/GGTAC<sub>Δ</sub>C)酶切位点,所以对质粒DNA进行酶切鉴定。酶切电泳见图2。图2中,1、2、3道为白斑所提质粒的酶切条带,4道为蓝斑对照质粒的酶切条带,可见T载体中有外源片段的插入,该片段大小为250~500 bp。

从图3可以看出 *EbFIE1* 中存在 *Pst* I (CTGCA<sub>Δ</sub>G/G<sub>Δ</sub>ACGTC)和 *Nco* I (C<sub>Δ</sub>CATGG/GGTAC<sub>Δ</sub>C)酶切



1-3: Positive clone; 4: Negative clone; M: DNA marker

图2 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of enzyme restriction

位点,所以酶切检测电泳条带位于 250 ~ 500 bp 之间,而非我们预料当中的 800 bp 左右。

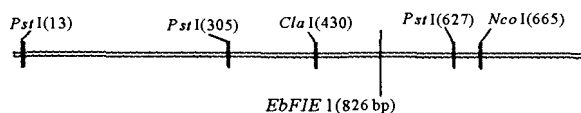
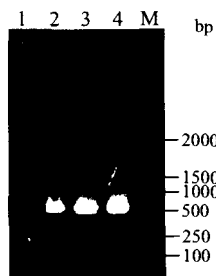


图 3 *EbFIE1* 酶切位点示意图

Fig. 3 The site of enzyme restriction in *EbFIE1*

以 P1 和 P2 为引物,质粒 DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增到长度为 500 ~ 800 bp 的片断(见图 4)。说明目的片断 *EbFIE1* 已连接 T 载体。



1: Positive clone; 2-4: Negative clone; M: DNA marker

图 4 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification by PCR

由 ABI3730 DNA Analyzer 进行测序,结果见图 5。特异性片段长度为 826 bp,命名为 *EbFIE1*。

## 2.3 *EbFIE1* 与部分植物 *FIE* 基因同源比对和进化分析

### 2.3.1 *EbFIE1* 核苷酸序列同源性分析

将本实验所得序列通过同源搜索 (Blastn) 与其他物种的 *FIE* 序列进行同源比较。结果表明,龙须草 *EbFIE1* 与禾本科植物玉米、水稻、小麦 *FIE* 基因同源性分别达 95%、87%、84%,同源性都在 80% 以上,同时 GENEDOC 上做出 cDNA 序列比对图(图 6)都说明在禾本科中 *FIE* 的保守性较高,进化过程中核苷酸差异不大。

### 2.3.2 *EbFIE1* 氨基酸序列同源性分析

经 DNASTAR 软件将 *EbFIE1* 序列翻译成氨基酸(大小为 275 个氨基酸)后与 GenBank 上登陆的玉米 *FIE1* (AA061682)、玉米 *FIE2* (AA061684)、水稻 (AAS13489)、高粱 (AAS82596)、拟南芥 (AAD23584)、桉树 (AAN85568)、梓树 (AAN85567) 的 *FIE* 进行同源性比对 (Blastp) 和聚类分析 (进化树)。

同源性比对结果(图 7)表明龙须草 *EbFIE1* 片断的氨基酸与玉米、水稻、高粱、拟南芥、桉树、梓树的同源性分别为 95%、88%、94%、72%、84%、80%。

从进化树(图 8)来看,无融合生殖龙须草的 *EbFIE1* 依次与高粱、玉米和水稻的亲缘关系较近。同时 Blastp 比对分析发现 *EbFIE1* 也含有 *FIE* 基因的特征保守区域 WD40 motif。在 GENEDOC 上采用 Clustal W 的方法比对(图 7)可直观看出氨基酸序列十分保守。同源性分析表明本实验得到的 *EbFIE1* 片断是无融合生殖龙须草胚乳发育相关的 *FIE* 候选基因片断。

## 3 讨论

通过同源序列克隆法,我们从龙须草中成功分离了 *FIE* 基因的同源序列 *EbFIE1*,它与禾谷类作物水稻、小麦、玉米 *FIE2*、*FIE1* 同源性在 80% 以上,氨基酸序列的同源性与水稻、高粱、玉米 *FIE1* 的同源性也在 85% 以上,聚类分析表明 *EbFIE1* 与高粱、玉米和水稻的亲缘关系更为接近,表明该片断为龙须草 *FIE* 基因特异片断,也说明 *FIE* 基因在禾本科植物中的高度保守性。

Luo 等认为,*FIE* 基因会阻止胚乳的自发形成,使极核或次生核必须在受精后才能发育形成胚乳;而 *FIE* 突变体的胚乳则可自发形成<sup>[9]</sup>。Ohad 等认为拟南芥突变体 *fie* 等位基因相对于野生型 *FIE* 来说是隐性的,表明 *FIE* 在受精前抑制胚乳发育;终止突变使 *FIE* 的抑制作用丧失,从而不经受精作用胚乳可以自主发育<sup>[4]</sup>。Danilevskaya 等对玉米 *FIE* 表达模式的分析表明,*FIE* 是一个印记基因,与胚乳发育有关<sup>[10]</sup>。Rojek 等通过野生型拟南芥的未授粉胚珠离体培养试验,认为胚乳自主发育与印记作用相关,只有在母本基因组去甲基化和 *FIE* 功能缺失的条件下才能启动胚乳发育<sup>[11]</sup>。Koltunow 的研究小组从山柳菊 (*Hieracium panicalatum*) 中分离了 *FIE* 同源序列 *HFIE*,并发现无融合生殖山柳菊中的 *HFIE* 与有性生殖类型中的同源序列只有 3 个氨基酸的差异,但这微小的差异已足以使胚乳自发形成<sup>[12]</sup>。我们以水稻 *FIE* 部分序列制备 cRNA 探针,利用原位杂交技术检测到无融合生殖龙须草生殖发

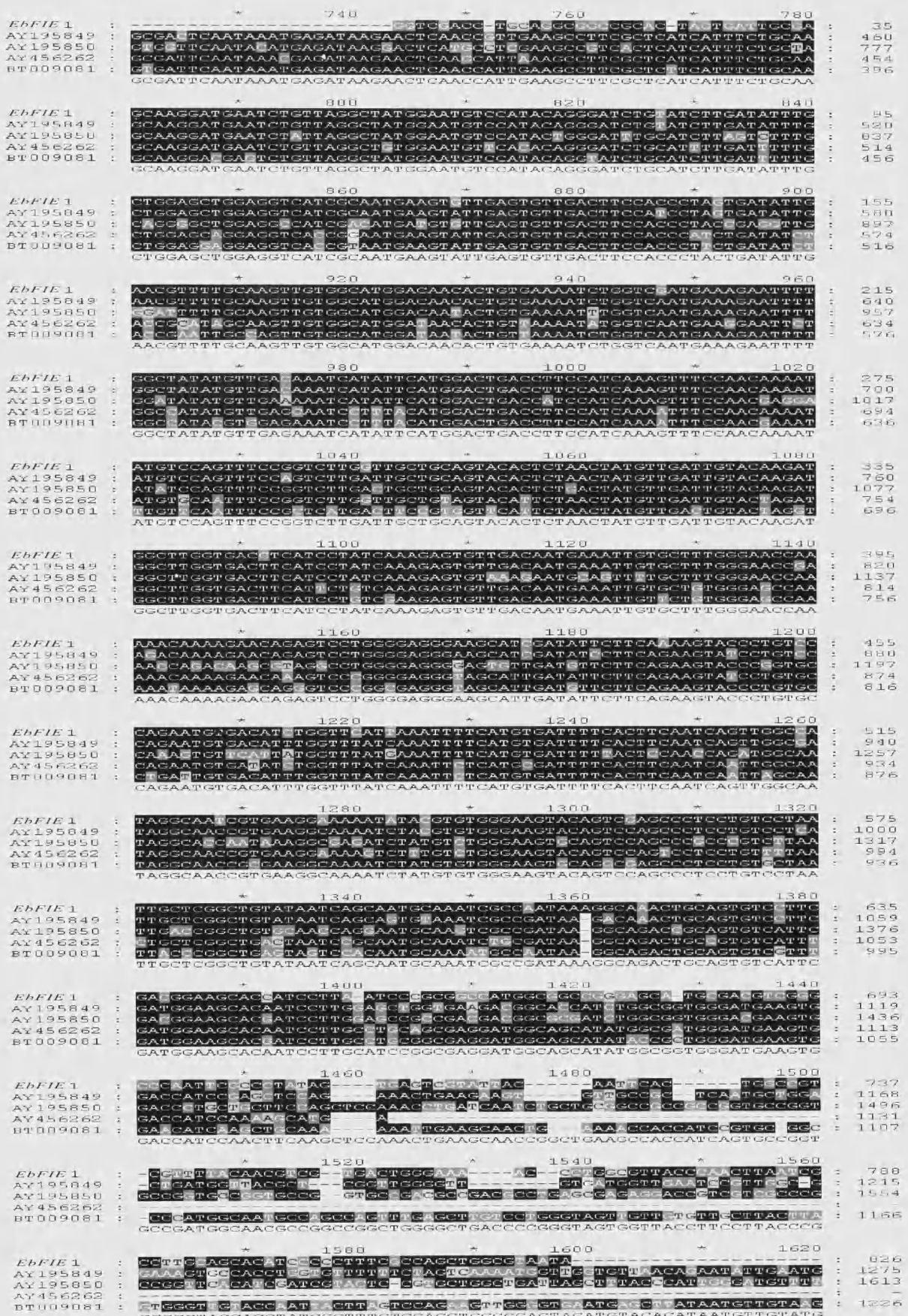
```

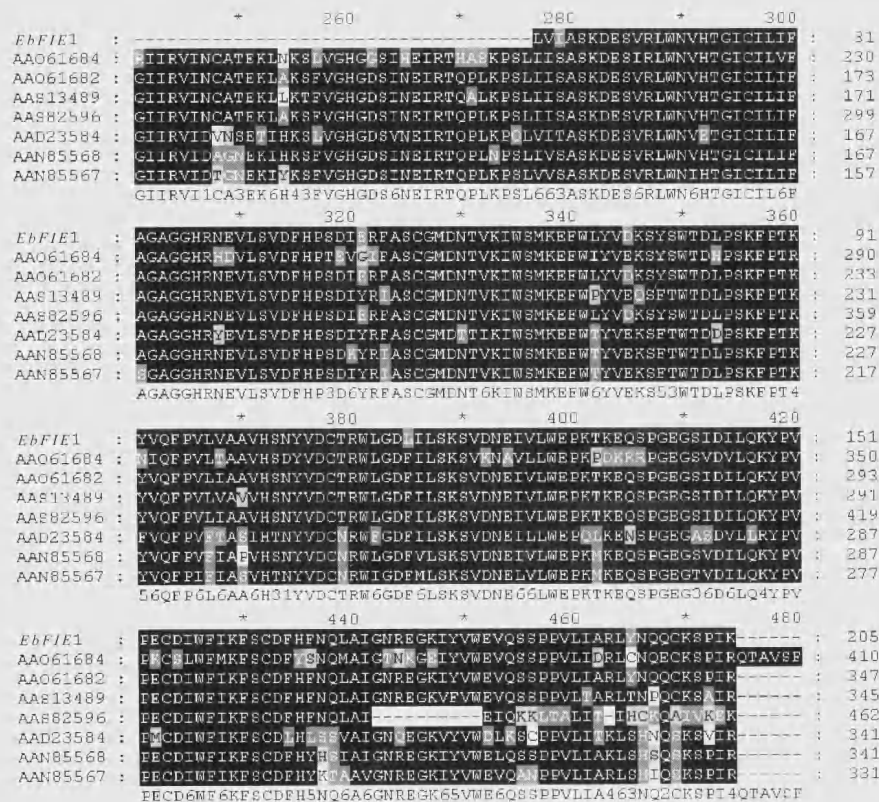
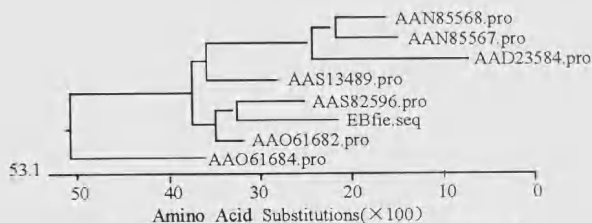
1 | GGTGACCTG CAGCGGCGG CACTAGTGAT TCCGAGCAAG GATGAATCTG TTAGGCTATG GAATGTCCAT ACAGGGATCT GTATCTTGAT
91 | ATTTGCTGGA GCTGGAGGTC ATCGCAATGA AGTGTTCAGT GTTGACTTCC ACCCTAGTGA TATTGAACGT TTGCAAGTT GTGGCATGGA
181 | CAACACTCTC AAAATCTGCT CGATGAAAGA ATTTTGGCTA TATGTTGACA AATCATATTC ATCGACTGAC CTTCATCAA AGTTTCCAAC
271 | AAAATATGTC CAGTTTCCGG TCTTGGTTGC TGCAGTACAC TCTAACTATG TTGATTGTAC AAGATGGGCT GGTGACCTCA TCCTATCAAA
361 | GAGTCTTGAC AATGAAATTG TGCCTTGGGA ACCAAAAACA AAAGAACAGA GTCCCTGGGA GGAAGCATC GATATTCTTC AAAAGTACCC
451 | TGTCCCAAGAA TGTGACATCT GCTTCATTA AATTTTCACT GATTTTCACT TCAATCAGTT GCGGATAGCC AATCCTGAAG GAAAAATATA
541 | CCGTGTGGAA GTACAGTCTGA GCGGCTCTGT CCTAATTGCT CGGCTGTATA ATCAGCAATG CAAATCGCCA ATAAAGGCAA ACTGCACTGT
631 | CCTTCGACGG AAGCACCATC CTTAATCCCG CGGCCATGGC GCGCGGAGC ATCGGACGTC GGGCCCAATT CGCCCTATAG TGAGTCGTAT
721 | TACAATTCAC TGGCGTCGCT TTTACAACGT CGTGACTGGG AAAACCCCTG CGTTACCCAA CTTAATCGCC TTGCAGCACA TCCCGCTTTC
811 | GCCAGCTGGC GTAATA

```

图 5 测序结果

Fig. 5 Result of sequence

图6 *EbFIE1*与其他植物 *FIE* 基因核苷酸序列同源比对图Fig. 6 Alignment of the nucleotide sequences of *EbFIE1* and various other *FIE* genes in grass family

图7 *EbFIE1* 与其他植物 *FIE* 基因氨基酸序列同源比对Fig. 7 Alignment of the predicted amino acid *EbFIE1* and various other *FIE* genes图8 几种植物 *FIE* 氨基酸序列的聚类分析Fig. 8 Molecular phylogenetic trees based on the amino acid sequences of plant *FIE* using DNASTAR

育过程中 *FIE* 基因的表达情况,发现 *FIE* 基因在胚和胚乳的发育过程中直至种子成熟时期都有表达(未发表),说明 *FIE* 是控制和调节龙须草胚和胚乳发育的重要基因。

PCR 技术简单、高效、快速且易于操作,在现代分子生物学的实验中广泛使用。本次实验采用 PCR 的方法,成功克隆到无融合生殖龙须草 *FIE* 的部分 cDNA 片段,片段大小为 826 bp。引物设计上,我们参照拟南芥、玉米、水稻的 *FIE* 序列设计简并性引物,上游引物 P1: 5'-GCIAGCAAGGATGAATCT-3',下游引物 P2: 5'-AAGIATIGTGCTTCCITC-3',次黄嘌呤能与所有的碱基配对,从而可以降低引物的退火温度。*EbFIE1* 的获得为以后龙须草 *FIE* 基因全长序列和 *FIE* 基因在不同生殖类型龙须草中的表达调控奠定了一定的基础。

## 参考文献:

- [1] Koltunow A M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules [J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 1425 - 1437.
- [2] Koltunow A M, Ross A B, Abdul M C. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization [J]. *Plant physiology*, 1995, 108: 1345 - 1352.
- [3] Gupta P, Shivanna K R, Mohanram H Y. Apomixis and polyembryony in the guggul plant, *commiphora wightii* [J]. *Annals of Botany*, 1996, 78: 67 - 72.
- [4] Ohad N, Yadegari R, Fischer R. Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 407 - 415.
- [5] Ohad N, Margossian L, Fischer R L. A Mutation that allows endosperm development without fertilization [J]. *PNAS*, 1996, 93: 5319 - 5324.
- [6] Mosquana A, Ohad N. Interaction of *FIE*, a Polycomb protein, with pRb: a possible mechanism regulating endosperm development [J]. *Mol Gen Genomics*, 2004, 271: 651 - 657.
- [7] 张莉,毛雪,李润植. 种子发育相关基因的研究进展 [J]. *植物学通报*, 2004, 21(3): 288 - 295.
- [8] Yao J L. Embryological evidence of apomixis in *Eulaliopsis binata* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(1): 86 - 92.
- [9] Luo M. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 296 - 301.
- [10] Danilevskaya O N, Pedro H, Sabine H. Duplicated *FIE* genes in maize expression pattern and imprinting suggest distinct functions [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 425 - 436.
- [11] Rojek J, Kuta E, Bohdanowicz J. *In vitro* culture promotes partial autonomous endosperm development in unfertilized ovules of wild-type *Arabidopsis thaliana* var. *columbia* [J]. *Sex Plant Report*, 2005, 18: 29 - 36.
- [12] Koltunow A M, Grossniklaus U. Apomixis: A developmental perspective [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 547 - 574.