

马协型水稻细胞质雄性不育系线粒体基因组的变异与功能的研究

张 鸿, 陈祖玉, 李阳生, 朱英国*

(武汉大学生命科学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘 要: 马协型水稻细胞质雄性不育系是近年培育并广泛应用的一种新型不育系。利用 Southern blot、Northern blot 和 Blue-native PAGE 电泳等技术对其线粒体基因组的变异和功能进行研究, 分析其雄性不育的分子机理。发现其不育系线粒体基因组中除有一个正常的 *cox2* 基因外还存在一个多余的拷贝, 且分别转录成不同的转录本。Blue-native PAGE 电泳显示, 不育系线粒体呼吸链复合物 IV 的活性明显低于保持系。

关键词: 水稻; 细胞质雄性不育; 细胞色素 c 氧化酶

中图分类号: Q943; S511

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0313-03

The Mitochondria Genomic Mutation and Function in the Cytoplasmic Male Sterile Line of Maxie Rice

ZHANG Hong, CHEN Zu-Yu, LI Yang-Sheng, ZHU Ying-Guo*

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

Abstract: Maxie is a newly inbred cytoplasmic male sterile (CMS) systems in rice (*Oryza sativa* L.). Our experiments showed that there existed an extra copy of *cox2* gene in the CMS line except for the normal one. The two copies transcribed into different transcripts. In-gel activity assay showed that the mitochondria complex IV presented significant reduction in activity compared with the fertile line.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.); Cytoplasmic male sterile (CMS); Cytochrome c oxidase

植物细胞质雄性不育 (CMS) 是自然界一种普遍存在的现象, 属母系遗传。大量研究证明 CMS 与线粒体基因组突变导致的线粒体的功能异常有关。细胞质雄性不育植物的育性可由核恢复基因恢复, 自然群落中, CMS 系与携带恢复基因的恢复系杂交, 其 F_1 代育性恢复正常, 这是作物杂种优势利用的基础。通常 CMS 与线粒体基因组内的嵌合基因有关。如 *T-urf13* 在玉米 T 型不育系中编码一个 13 kD 的线粒体内膜孔蛋白, 在花药发育时导致雄配子的败育^[1]。刘耀光等对包台型水稻 CMS 的研究证实, CMS 相关位点 *orf79* 编码一个毒蛋白, 当保持系植株的线粒体导入这个蛋白后花粉败育。而在恢复基因存在的情况下, 这个蛋白被降解^[2]。在一些物种中, 线粒体异常更直接与线粒体内呼吸链相关基因的异常表达有关。如高粱 CMS 系中 *atp6* 转录本的编辑比可育系显著减少^[3]。呼吸链包括 5 个复合物, 被分为电子传递链 (复合物 I ~ IV), 以及

ATP 合成酶 (复合物 V)^[4]。多数情况下, CMS 与这些复合物亚基基因的异常有关^[5]。

马协型水稻是近年来我国南方广泛应用的一种细胞质雄性不育系。花粉败育开始于单核早期。关和新等^[6]对花药超微结构的观察发现单核期不育花药绒毡层提前解体。但不育的分子机理目前尚未见报道。我们比较了马协型不育系和保持系线粒体在 DNA、RNA 及蛋白质水平上的差异, 提出了关于马协型细胞质雄性不育机理的一种假设。

1 材料与方法

1.1 材料

马协型水稻 (*Oryza sativa* L.) 不育系 MA, 保持系 MB 黄化苗。

1.2 线粒体分离

根据 Heazlewood 等^[7]的方法, 经差速离心获得线粒体。

收稿日期: 2006-10-24, 修回日期: 2007-02-08。

作者简介: 张鸿 (1969 -), 女, 博士, 主要从事植物发育遗传研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: zhuyg@public.wh.hb.cn)。

1.3 Southern blot 分析

DNA 的提取参照 Kawai 和 Uchimiya^[8] 的方法。用 *EcoR* I 内切酶消化线粒体 DNA (5 μ g), 电泳后转膜, 然后用 *cox2* 探针进行杂交。*cox2* 探针由 cDNA 经 PCR 扩增得到, 以 [³²P] dNTP 标记。

1.4 Northern blot 分析

RNA 经由 Trizol mix (Invitrogen, USA) 提取获得。10 μ g RNA 电泳后转膜, 与 *cox2* 探针杂交。

1.5 Blue-native PAGE 电泳

样品的纯化、电泳、凝胶、固定及染色采用 Jansch 等^[9] 和 Schagger 等^[10] 的方法, 略加改动。200 μ g 线粒体蛋白用 5% ~ 13% 的连续梯度胶进行电泳, 去污剂与线粒体蛋白的终比例为 3 g : 1 g。

1.6 酶活性测定

呼吸链复合物活性的测定: 根据 Zerbetto 等^[11] 的方法, 电泳后的凝胶用蒸馏水冲洗, 然后把胶放入染色液中, 37℃ 过夜。复合物 I 的染色液组成为: 0.1 mg/mL NADH, 2 mmol/L Tris-Cl, 1 mg/mL NBT, pH 7.4; 复合物 IV 染色配方为: 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 加 1 mg/mL DAB, 20 U/mL 过氧化氢酶, 1 mg/mL 细胞色素 c, 75 mg/mL 蔗糖。染色后用 40% 甲醇 + 10% 乙酸固定脱色。胶由凝胶成像系统 (Bio-rad, USA) 扫描, 每条带的丰度值由每平方毫米 OD 值表示, 通过 Quantity one (Biorad) 软件计算得到。数据为两次实验的平均值。

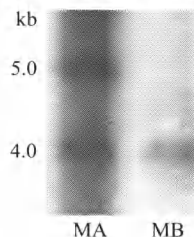
2 结果

2.1 以 *cox2* 为探针的 Southern blot 及 Northern blot 分析

复合物 IV 即细胞色素 c 氧化酶, 在植物中由 10 个亚基组成^[10]。其中最大的 3 个亚基 COX1、COX2、COX3 由线粒体基因组编码, 其余的亚基由核基因编码。以线粒体基因 *cox1*、*cox2* 为探针的 RFLP 结果显示, *cox2* 在不育系和保持系间存在差异。

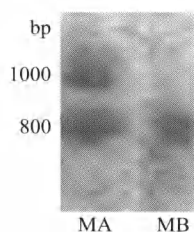
线粒体 DNA 用 *EcoR* I 消化后与 *cox2* 探针杂交, Southern blot 结果表明, 在不育系线粒体中有 2 条带, 分别是 4.0 kb 及 5.0 kb 的片段, 而在保持系中只有 4.0 kb 的片段 (图 1)。这说明 *cox2* 基因在不育系中可能有 2 个拷贝或是其 DNA 序列发生突变, 使其存在 *EcoR* I 的酶切位点。为了探讨这两种可能性, 我们又以 *cox2* 作探针对于不育系及保持系的线粒体 RNA 作了分析, Northern blot 结果表明, 不育系中存在 2 个转录本, 分别约为 900 bp 及 1000 bp; 而保持系中只有 900 bp 的转录本 (图 2)。这说明

cox2 在不育系中还存在一个多余的拷贝。但这是一个怎样的阅读框还需要进一步研究。



MA: 马协不育系; MB: 马协保持系
MA: Sterile line; MB: Maintainer line

图 1 以 *cox2* 为探针的线粒体 DNA 的 Southern blot 分析
Fig. 1 The Southern blot of mt DNA, *cox2* as the primer

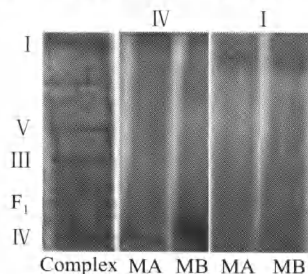


MA: 马协不育系; MB: 马协保持系
MA: Sterile line; MB: Maintainer line

图 2 以 *cox2* 为探针的线粒体 RNA 的 Northern blot 分析
Fig. 2 The Northern blot of mt RNA, *cox2* as the probe

2.2 线粒体复合物活性分析

为了检测 *cox2* 基因的异常是否导致细胞色素 c 氧化酶 (复合物 IV) 的改变, 我们分析了复合物 I、IV 的酶活性。以温和去污剂 16-烷基麦芽糖苷处理线粒体蛋白, 通过 Blue-native PAGE 电泳分离线粒体膜复合物, 然后经底物显色反应分析酶活性。结果显示在不育系中复合物 IV 的活性显著低于保持系 (图 3), 而作为对照, 复合物 I 在不育系及保持系中的活性没有明显差异 (图 4), 这说明马协不育系线粒体的电子传递链复合物 IV 存在变异。



I: 复合物 I; III: 复合物 III; IV: 复合物 IV; V: 复合物 V;
F₁: 复合物 V 的 F₁ 部分。MA: 马协不育系; MB: 马协保持系
I: Complex I; III: Complex III; IV: Complex IV; V: Complex V;
F₁: The F₁ sector of complex V. MA: Sterile line; MB: Maintainer line

图 3 线粒体呼吸链复合物活性的测定
Fig. 3 In-gel enzyme activities of mitochondria respiratory complexes

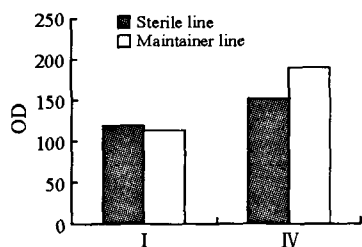


图4 测定复合物 I、IV 的活性

Fig.4 Quantification of histochemical reactions with respiratory complex activities

3 讨论

真核细胞中线粒体的主要功能是通过氧化磷酸化过程产能,即电子经呼吸链传递的同时,可将质子从线粒体内膜内侧泵到外侧,质子跨膜传递产生的电化学梯度推动 ATP 的合成^[12]。因为氧化磷酸化提供了细胞所需的大部分 ATP,所以呼吸链的改变会对组织的供能产生影响。

已有的研究表明,复合物IV的突变与某些植物的雄性不育相关。如在小麦中,*cox1* 转录本的减少可导致生长缓慢及不育^[13]。野生甜菜 G 型不育系中,COX2 缺失一段保守的 8 氨基酸序列,并导致复合物IV的活性降低 50%^[14]。细胞色素 c 氧化酶是电子传递链的末端酶,催化电子从细胞色素 c 到分子氧的传递,并与质子从线粒体基质泵出偶连。COX1 和 COX2 构成酶的催化位点,是氧化还原反应和质子传递的场所^[15]。根据对牛细胞色素 c 氧化酶的晶体衍射分析,COX2 的 C 端位于线粒体内外膜之间,是细胞色素 c 结合及电子传递的部位^[16,17]。因此 COX2 构象的改变可能导致与细胞色素 c 作用力的变化,使电子传递受阻。减数分裂期间及分裂后,绒毡层及小孢子中线粒体数量可增加数倍之多,线粒体基因表达量也大幅升高^[18]。说明小孢子发生需要大量能量。这也可以解释为什么 CMS 植物中线粒体基因组的突变可导致雄性不育而营养生长及雌配子发生不受影响。目前,一种被普遍接受的假说认为:在不育系中,花粉发育过程中对能量的高需求因为氧化磷酸化过程受到干扰而不能满足,因此导致花粉败育。电子传递链复合物亚基的突变可能影响氧化磷酸化。马协不育系中存在一个异常的 *cox2* 基因,这个基因可能含有部分 *cox2* 序列,它的表达产物在结构上与 COX2 蛋白相似,在复合物IV装配过程中这个异常蛋白与正常的 COX2 竞争,导致催化位点的改变,影响电子的传递和能量的产生,最后导致花粉败育。抑或是这个基

因产物的存在干扰了复合物IV亚基间的相互作用,也可能干扰了某些分子伴侣的作用,进而影响复合物IV的结构与功能。

参考文献:

- [1] Levings C S. Thought on cytoplasmic male sterility in cms-T maize [J]. *The Plant cell*, 1993, 15: 1285 - 1290.
- [2] Wang Z, Zou Y, Li X, Zhang Q, Chen L, Wu H, Su D, Chen Y, Guo J, Luo D, Long Y, Zhong Y, Liu Y G. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 676 - 687.
- [3] Howad W, Kempken F. Cell type-specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 11090 - 11095.
- [4] Hatefi Y. The mitochondria electron transport and oxidative phosphorylation system [J]. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 1015 - 1069.
- [5] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16: 154 - 169.
- [6] 关和新, 朱英国. 马协不育系花药超微结构观察 [J]. 作物学报, 2000, 26: 913 - 916.
- [7] Heazlewood J L, Howell K A, Whelan J, Millar A H. Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 230 - 242.
- [8] Kawai M, Uchimiya H. Coleoptile senescence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Ann Bot*, 2000, 86: 405 - 414.
- [9] Jansch L, Kruft V, Schmitz U K, Braun H P. New insight into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria [J]. *The Plant J*, 1996, 9: 257 - 368.
- [10] Schagger H, Jagow G V. Blue-native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form [J]. *Analytical biochemistry*, 1991, 199: 223 - 231.
- [11] Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F. Quantitation of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2059 - 2064.
- [12] Siedow J N, Umbach A L. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 821 - 831.
- [13] Ikeda T M, Tsunewaki K. Deficiency of *cox1* gene expression in wheat plants with *Aegilops columnaris* cytoplasm [J]. *Curr Genet*, 1996, 30: 509 - 514.
- [14] Ducos E, Touzet P, Boutry M. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes [J]. *The Plant J*, 2001, 26: 171 - 180.
- [15] Covello P S, Gray M W. RNA sequence and nature of the CuA-binding site in cytochrome c oxidase [J]. *FEBS lett*, 1990, 268: 5 - 7.
- [16] Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å [J]. *Science*, 1996, 272: 36 - 1144.
- [17] Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle [J]. *Science*, 1999, 283: 1488 - 1493.
- [18] Smart C J, Moneger F, Leaver C J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower [J]. *The Plant Cell*, 1994, 6: 811 - 825.