

魏强燕, 葛晓宇, 赵伦, 等. 油菜细胞质雄性不育基因 *orf138*, *orf288* 的功能分析 [J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(3): 131~138.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.03.015

油菜细胞质雄性不育基因 *orf138*、*orf288* 的功能分析

魏强燕, 葛晓宇, 赵伦, 文静, 易斌, 涂金星, 傅廷栋, 沈金雄

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家油菜工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 为确定油菜 *ogu* CMS 不育基因 *orf138* 编码蛋白的毒性与雄性不育的关系以及 *hau* CMS 不育基因 *orf288* 的核心功能区域, 对 2 个不育基因进行不同长度的截短, 进行原核表达和拟南芥、油菜遗传转化。不育基因 *orf138* 截短研究结果显示, IPTG 诱导后, 转入含有跨膜螺旋的 pET32a^{1~138} 和 pET32a^{1~93} 的大肠杆菌生长受到了明显的抑制, 而转入去掉跨膜螺旋的 pET32a^{45~138} 的大肠杆菌生长不受影响, 表明 ORF138 的毒性区域位于包含跨膜螺旋的 N 端; 遗传转化结果证实 PS:Rfp138^{35~138} 和 PS:Rfp138^{45~138} 均不能引起拟南芥和油菜雄性不育, 说明 N 端的毒性区域是 ORF138 引起植物雄性不育所必需的。不育基因 *orf288* 不同长度截短的超表达载体拟南芥转化结果显示, PS:Rfp288^{104~288}、PS:Rfp288^{134~288} 和 PS:Rfp288^{164~288} 的转基因阳性苗出现雄性不育表型, PS:Rfp288^{104~288} 的转基因阳性苗则全部可育, 初步证明 *orf288* 的核心功能区域是 *orf288*^{164~288}, ORF288 的 164~194 aa 可能与 *hau* 细胞质雄性不育密切相关。

关键词 油菜; 细胞质雄性不育; *orf138*; *orf288*; 毒蛋白

中图分类号 S565.403.51 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)03-0131-08

油菜是我国栽培面积最大的油料作物, 是第一大自产食用植物油来源。利用杂种优势提高油菜产量和抗性等, 对油菜生产发展和我国食用油供应安全有着重要意义^[1]。细胞质雄性不育(CMS)是杂种优势利用的重要途径, 油菜中已经发现和创制了 10 多个 CMS 类型^[2], 但对于不育基因作用机制的认识还很有限。目前关于 CMS 的分子机制主要有毒蛋白、能量缺陷和异常的 PCD 假说等 3 种主流的假说^[3]。多数 CMS 类型存在能量缺乏和 PCD 异常的现象^[4~8], 部分不育基因编码的蛋白被证实具有毒性, 但进一步的研究发现部分蛋白如水稻 WA CMS 的 WA352^[9] 和油菜 *hau* CMS 的 ORF288^[10], 其毒性与雄性不育无关。因此, 毒蛋白假说的合理性还需要在更多的 CMS 类型中进行验证。

油菜中的 *ogu* CMS 胞质来源于日本萝卜^[11], 是目前世界上研究和应用较为广泛的一种胞质不育类型。其不育相关基因 *orf138*^[12] 编码的 ORF138 是毒蛋白, 通常以寡聚体形式存在^[13], 可能通过在线粒体内膜上形成大的复合物来发挥作用^[14]。核恢复基因 *Rfo* 编码的线粒体蛋白通过阻止 ORF138 蛋白翻译

的延伸过程, 从而恢复油菜的育性^[15]。*hau* CMS 胞质是傅廷栋教授发现的芥菜型油菜胞质不育材料, 后被转入甘蓝型油菜^[16]。其雄性不育性彻底稳定, 适用于杂交育种。*hau* 胞质不育基因 *orf288* 编码的 ORF288 同样是毒蛋白^[17], 但其毒性区域位于含有 3 个跨膜螺旋的 N 端, 截去 N 端后, 剩余的 C 端无毒性的 ORF215 仍可以引起植物雄性不育^[18]。

orf138 和 *orf288* 均是较长的线粒体基因, 其中可能存在一些功能域, 其关键的作用区域是基因的全长还是其中的一段不得而知。本研究进行不同截短片段的原核表达和拟南芥、油菜遗传转化, 确定油菜 *ogu* CMS 不育基因 *orf138* 编码蛋白的毒性与雄性不育的关系以及 *hau* CMS 不育基因 *orf288* 的核心功能区域, 旨在为解析植物细胞质雄性不育基因的作用机制及植物细胞质雄性不育分子设计育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的载体包括 pMD18-T、pET-32a、pCAMBIA2300, 其中 pMD18-T 为 TA 克隆载体, 用

收稿日期: 2022-01-05

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31930032)

魏强燕, E-mail: 1817815169@qq.com

通信作者: 沈金雄, E-mail: jxshen@mail.hzau.edu.cn

于外源片段的整合及测序;pET-32a为原核表达载体,用于目标片段的原核表达;pCAMBIA2300作为表达载体用于插入目标片段进行拟南芥和油菜遗传转化。研究中所用的菌株包括大肠杆菌宿主菌DH5 α 、BL21(DE3)pLysS,农杆菌菌株GV3101。植物材料包括哥伦比亚型拟南芥(*Col, Columbia*)、甘蓝型油菜*hau*胞质不育系6-102A、*ogu*胞质不育系浙油50A、*ogu* CMS的保持系浙油50B以及*pol* CMS的恢复系丙409。

1.2 载体构建

根据TMHMM网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测的ORF138的跨膜区域,以浙油50A的gDNA为模板,扩增*orf138*不同长度的截短片段,选择*Bam*H I和*Hind* III酶切位点,将截短片段连接到原核表达载体pET-32a上;分别以浙油50A和6-102A的gDNA为模板,扩增*orf138*和*orf288*不同长度的截短片段,并通过重叠延伸PCR在截短片段前加上线粒体信号肽(*pol* CMS恢复基因*Rfp*的前159 bp),内切酶*Bam*H I和*Pst* I酶切PCR回收产物,并将其连接到含有双35S启动子的超表达载体pS2300上。连接产物转化大肠杆菌DH5 α 挑取单克隆测序,序列正确的单克隆质粒于-20℃保存,质粒命名为pET32a¹⁻¹³⁸、pET32a¹⁻⁹³、pET32a⁴⁵⁻¹³⁸和PS:*Rfp*138³⁵⁻¹³⁸、PS:*Rfp*138⁴⁵⁻¹³⁸、PS:*Rfp*288¹⁰⁴⁻²⁸⁸、PS:*Rfp*288¹³⁴⁻²⁸⁸、PS:*Rfp*288¹⁶⁴⁻²⁸⁸、PS:*Rfp*288¹⁹⁴⁻²⁸⁸。

1.3 原核表达

将构建好的原核表达载体连同对照空载质粒转化大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)pLysS,涂皿,挑取单克隆,摇菌,PCR检测阳性的单克隆菌液加灭菌甘油于-80℃保存备用。按1:1000的比例取100 μ L菌液加入到100 mL含终质量浓度50 μ g/mL氨苄青霉素和30 μ g/mL氯霉素的液体LB培养基中,37℃摇床(200 r/min)培养至OD值达到0.6时,将菌液分成2等份,向其中1份加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG诱导目的蛋白表达,另1份不加IPTG;之后每隔30 min用UV1601紫外分光光度计检测1次菌液OD值。

1.4 SDS-PAGE凝胶电泳

将经IPTG诱导10 h的菌液离心,弃上清,用PBS缓冲液重悬菌体,再用超声破碎仪(ZQST-150,上海争巧科学有限公司)进行破碎,离心,向上清和沉淀(沉淀用PBS缓冲液重悬)中分别加入5×SDS-PAGE Loading Buffer(CWBIO,货号:01411/

50426),98℃孵育10 min进行蛋白变性。样品处理好后取10 μ L上样进行SDS-PAGE凝胶电泳。本研究采用12%分离胶和5%浓缩胶。电泳完成后,对凝胶进行染色、脱色,观察蛋白条带。

1.5 拟南芥的遗传转化

利用农杆菌蘸花法进行拟南芥的遗传转化。将转化的农杆菌进行培养,采用浸花法侵染野生型拟南芥植株。将所收种子干燥春化后消毒播于含50 μ g/mL卡那霉素的1/2 MS培养基上,置于光照培养室中培养10 d左右,选取生长正常的植株移栽于温室培养。

1.6 油菜的遗传转化

采用农杆菌介导的方法进行油菜的遗传转化,具体操作参考高长斌^[19]的方法。

1.7 阳性苗鉴定

用CTAB(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵)法提取转基因油菜和拟南芥幼苗叶片基因组DNA。以提取的DNA为模板,1条载体上的引物、1条基因内部的引物进行PCR鉴定(引物序列见表1)。PCR体系包含1 μ L模板、3 μ L ddH₂O、引物各0.5 μ L、5 μ L PCR Mix(擎科)。PCR程序为95℃5 min;95℃30 s;55℃30 s;72℃1 min,共34个循环;72℃5 min。使用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.8 RNA提取

采用Eastep® Super总RNA提取试剂盒(普洛麦格(北京)生物技术有限公司,货号:0000465711)提取拟南芥花蕾总RNA。

1.9 反转录及定量PCR

采用PerfectStart Uni RT&qPCR Kit(北京全式金生物技术有限公司,货号:#P30618)进行反转录,反转录产物稀释50倍作为模板,然后设计特异引物,在Bio-Rad CFX96仪器上进行目的基因的qPCR(quantitative real-time PCR)反应,以*Actin*基因作为内参。qPCR具体操作步骤参考钱佳丽^[20]的方法。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[21]计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 ORF138的毒性区域

1)蛋白毒性检测。在TMHMM网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对油菜*ogu* CMS的不育基因*orf138*编码的ORF138进行跨膜螺旋预测,发现其22~44 aa处存在1个跨膜螺旋

表1 本研究所用的引物序列
Table 1 Primers used in this study

用途 Function	载体或基因名称 Name	序列 Sequence(5'-3')
载体构建 Vector construct	pET32a ¹⁻¹³⁸	5' CGCGGATCCATGATTACCTTTCGAAAAATTGTCCAC 3' CCCAAGCTTTATTTCTCGGCCATTTCACCTC
	pET32a ¹⁻⁹³	5' CGCGGATCCATGATTACCTTTCGAAAAATTGTCCAC 3' CCCAAGCTTTAAATGATAAGGTGAGACTTTTCGTC
	pET32a ⁴⁵⁻¹³⁸	5' CGCGGATCCATGAACAACCAACATTGTTACGAACCAGAG 3' CCCAAGCTTTATTTCTCGGCCATTTCACCTC
	PS:Rfp138 ³⁵⁻¹³⁸	PXF AACTGCAGATGGTGTGAGGACACAGAGAT PXR35 TATGGGCCATTCTATCGCTGGTGAGACCAGA PX35F CAGCGATAGAACATGGCCCATATTGGCTAAGCTGGT PX138R CGGGATCCTTATTTCTCGGCCATTTCACCTC
	PS:Rfp138 ⁴⁵⁻¹³⁸	PXR45 GTTGTTCATTCTATCGCTGGTGAGACCAGA PX45F CAGCGATAGAACACAAACATTGTTACGAACCA PXR104 ACGAACCCATTCTATCGCTGGTGAGACCAGA PX104F CAGCGATAGAACATGGCTCTGGGAGATAGTG PX288R CGGGATCCTCAGTCTAGATAATGCCGGG
	PS:Rfp288 ¹⁰⁴⁻²⁸⁸	PXR134 GCCCAGACATTCTATCGCTGGTGAGACCAGA PX134F CAGCGATAGAACATGGCTCTGGGAGATAGTG PXR164 CTGCTGGCATTCTATCGCTGGTGAGACCAGA PX164F CAGCGATAGAACATGCCAGCAGCTAACAGCAGAAC
	PS:Rfp288 ¹³⁴⁻²⁸⁸	PXR194 TCCTTTCCATTCTATCGCTGGTGAGACCAGA PX194F CAGCGATAGAACATGGAAAGGATTATGGCGGCCTG
	PS:Rfp288 ¹⁶⁴⁻²⁸⁸	qRT-5' primer AGCAGAACCTAGATCAACCAGC qRT-3' primer CATCCTCGAGAGTTATGCCAAGTTG
	PS:Rfp288 ¹⁹⁴⁻²⁸⁸	qRT-5' primer TCAGCACTTCCAGCAGATG qRT-3' primer CTGTGGACAATGCCCTGGAC
	<i>Actin</i>	

(图1)。根据跨膜螺旋的位置对 $orf138$ 进行不同长度的截短,构建3个原核表达载体:pET32a¹⁻¹³⁸(全长)、pET32a¹⁻⁹³(截去C端部分序列但保留跨膜螺旋)和pET32a⁴⁵⁻¹³⁸(不含有跨膜螺旋),利用BL21(DE3)pLysS菌株进行原核表达。通过测定菌液OD值发现,未加入IPTG诱导蛋白表达时,所有转入不同长度截短的 $orf138$ 的大肠杆菌的生长趋势与空载对照基本相同,但加入IPTG后,转入包含跨膜螺旋的pET32a¹⁻¹³⁸和pET32a¹⁻⁹³的大肠杆菌的生长受到了明显的抑制,而转入去掉跨膜螺旋的pET32a⁴⁵⁻¹³⁸的大肠杆菌的生长基本不受影响(图2)。表明ORF138的毒性区域位于包含跨膜螺旋的N端,而非C端。

2)蛋白表达验证。为验证大肠杆菌生长的抑制是由诱导表达的目的蛋白所引起的,利用SDSPAGE凝胶电泳检测蛋白的表达(图3)。空载pET-32a经IPTG诱导后,表达TrxA、S-tag和2个His-tag的标签蛋白,大小约20.4 ku,用ExPASy ProtParam tool(<http://web.expasy.org/protparam/>)计算不同截

短长度蛋白的分子质量,pET32a¹⁻¹³⁸、pET32a¹⁻⁹³和pET32a⁴⁵⁻¹³⁸分别表达大小约36.4、31.4和31.2 ku的融合蛋白。上清中检测到的蛋白是可溶性蛋白,而沉淀中检测到的是包涵体形式的蛋白。PAGE胶经染色、脱色,能观察到加入IPTG后,无毒性的pET-32a和pET32a⁴⁵⁻¹³⁸被大量诱导表达,且它们既有可溶性表达,也有包涵体形式的表达;而无论是上清还是沉淀,凝胶上都没有观察到明显的pET32a¹⁻¹³⁸和pET32a¹⁻⁹³对应大小的蛋白条带,可能是因为它们具有毒性,大肠杆菌体内存在某种机制抑制其表达,以致表达量过低,不足以形成肉眼可见的蛋白条带。

2.2 不同长度截短 $orf138$ 的转基因验证

ORF138的第35个氨基酸处存在1个起始密码子(ATG),结合毒性检测结果,本研究以 pol CMS恢复基因 Rfp 的前159 bp作为线粒体信号肽构建2个截短载体PS:Rfp138³⁵⁻¹³⁸和PS:Rfp138⁴⁵⁻¹³⁸,转化拟南芥和甘蓝型油菜浙油50B。转基因阳性苗中并未出现不育表型,用亚历山大染色液和醋酸洋红染液分别对拟南芥和油菜的花粉进行染色,花粉粒均被

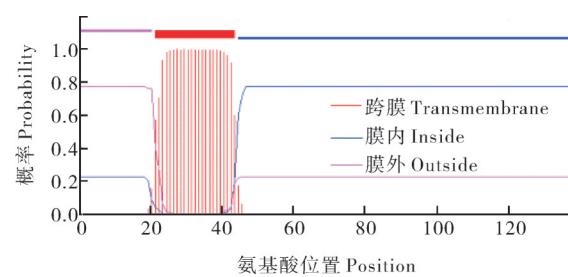
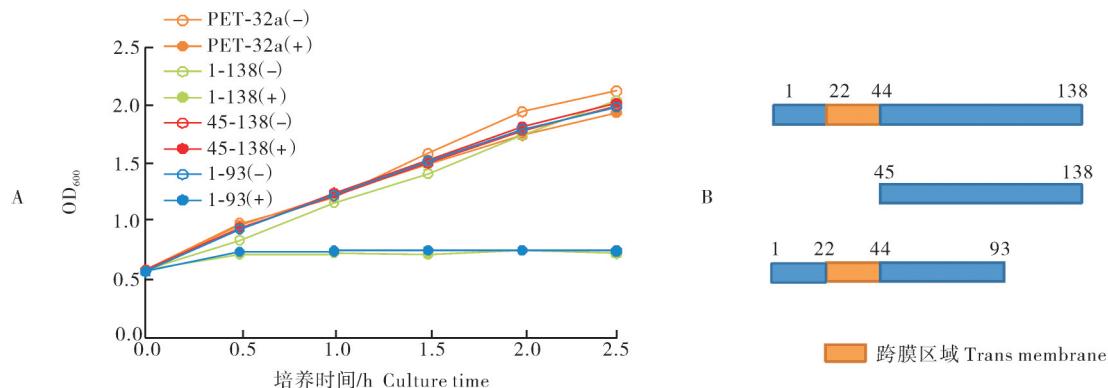


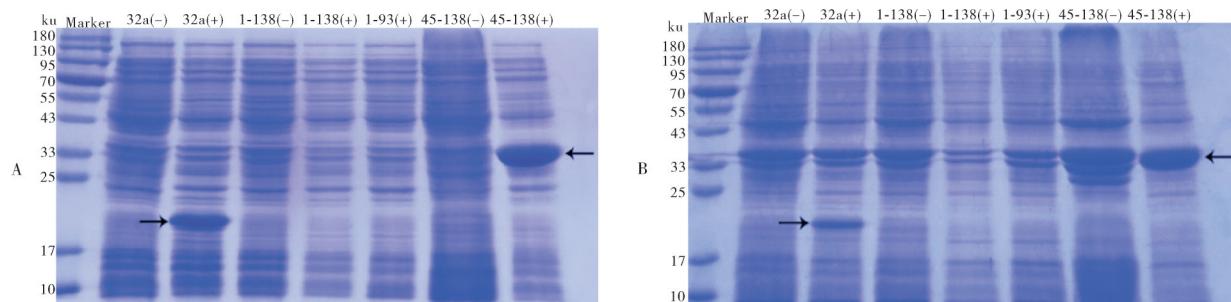
图1 ORF138 跨膜螺旋预测

Fig.1 Prediction of transmembrane helix in ORF138

染成深红色,表明花粉具有活力。因此,ORF138包



A:大肠杆菌生长趋势;B:不同截短的 $orf138$;(+):加入IPTG;(-):未加入IPTG。A: The growth trend of *E. coli*; B: Different truncated *orf138*; (+): IPTG was added; (-): No IPTG was added.

图2 表达不同截短 $orf138$ 的大肠杆菌的生长趋势Fig.2 Growth trend of *E. coli* expressing different truncated *orf138*

A:蛋白在上清中的表达;B:蛋白在沉淀中的表达(+):加入IPTG;(-):未加入IPTG;箭头指目的蛋白。A: Protein expression in supernatant; B: Protein expression in precipitation (+): IPTG was added; (-): No IPTG was added. The arrow points to target proteins.

图3 不同截短ORF138的蛋白表达情况

Fig.3 Protein expression of different truncated ORF138

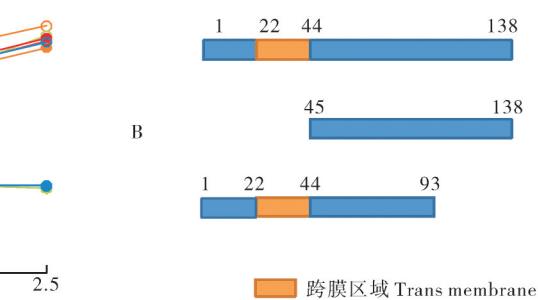
表2 不同截短 $orf288$ 转基因拟南芥阳性苗的育性鉴定Table 2 Fertility identification of transgenic *Arabidopsis thaliana* of different truncated *orf288*

载体 Vector	抗生素筛选/株 Antibiotics screening	阳性苗/株 Positive seedlings	雄性不育/株 Male sterile
PS:Rfp288 ¹⁰⁴⁻²⁸⁸	36	31	12
PS:Rfp288 ¹³⁴⁻²⁸⁸	48	45	7
PS:Rfp288 ¹⁶⁴⁻²⁸⁸	45	31	4
PS:Rfp288 ¹⁹⁴⁻²⁸⁸	24	14	0

含跨膜螺旋的毒性区域是其引起植物雄性不育所必需的。

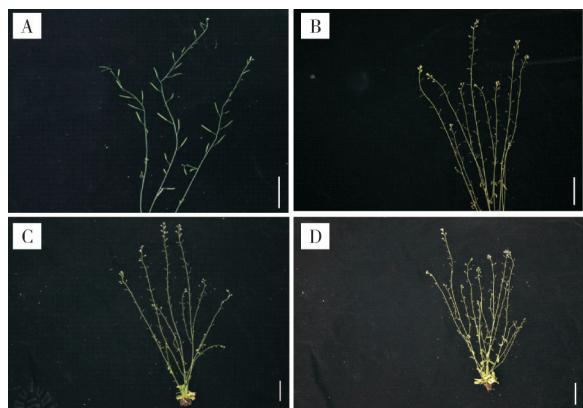
2.3 不同长度截短 $orf288$ 的转基因验证

本研究构建了4个不同长度截短 $orf288$ 的超表达载体:PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸、PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸、PS:Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸和PS:Rfp288¹⁹⁴⁻²⁸⁸,将它们分别通过农杆菌介导的方法转化拟南芥。其中转PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸、PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸和PS:Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸的阳性植株中出现雄性不育表型,转PS:Rfp288¹⁹⁴⁻²⁸⁸的阳性植株全部可育(表2)。



1)转基因拟南芥植株表型。与野生型拟南芥(WT)相比,转基因拟南芥不能产生角果,彻底不育,其他部位生长发育状况与WT无明显差异(图4)。

2)转基因拟南芥花药形态观察。与WT相比,PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸的雌蕊发育正常,但雄蕊的花丝明显缩短,在物理距离上限制了花粉传到柱头上,且花药不开裂,花粉粒无法散出,不能完成授粉;PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸的雌蕊发育正常,但原本应该发育成由

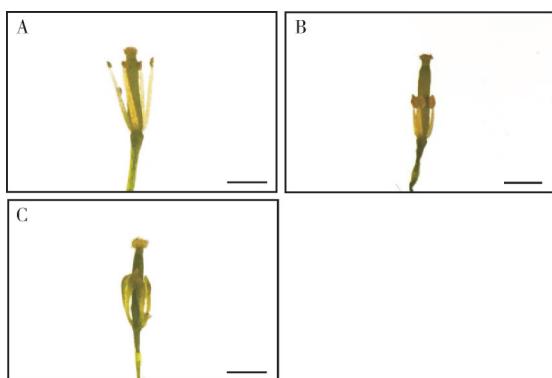


A:野生型拟南芥;B:PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥;C:PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥;D:PS:Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥。标尺=3.7 cm。A: Wild type *Arabidopsis thaliana*; B: Transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸; C: Transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸; D: Transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸. Scale bars=3.7 cm.

图4 不同截短 $orf288$ 转基因拟南芥

Fig.4 Transgenic *Arabidopsis thaliana* of different truncated *orf288*

花药和花丝组成的雄蕊变成了上宽下窄的片状结构,且上面稍膨大的类似于花药的地方没有开裂,无法正常授粉,最终导致雄性不育(图5)。



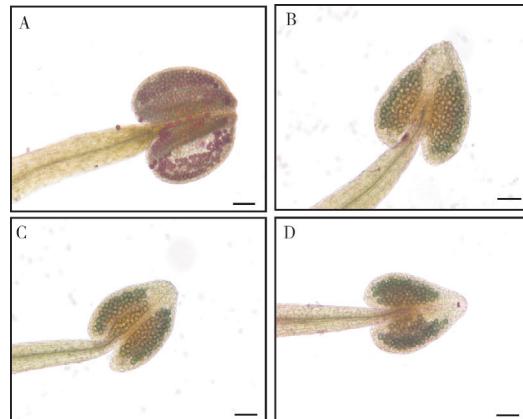
A:野生型拟南芥花药;B:PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥花药;C:PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥花药。标尺=1 mm。A: Anthers of wild type *Arabidopsis thaliana*; B: Anthers of transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸; C: Anthers of transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸. Scale bars=1 mm.

图5 不同截短 $orf288$ 转基因拟南芥花药

Fig.5 Anthers of transgenic *Arabidopsis thaliana* of different truncated *orf288*

3)转基因拟南芥花粉活力检测。本研究使用染色法对拟南芥的花粉活力进行检测。在载玻片上用亚历山大染色液对花粉进行染色,发现虽然转基因拟南芥的花药中含有大量清晰可见的花粉粒,但除WT的花粉粒能被染成紫红色外,PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸、

PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸和PS:Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸的花粉粒未被染成红色(图6)。表明3种转基因拟南芥中无法产生有活力的花粉,最终导致败育。

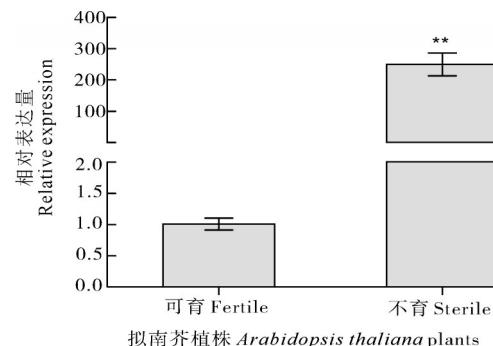


A:野生型拟南芥花粉染色;B:PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥花粉染色;C:PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥花粉染色;D:PS:Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸转基因拟南芥花粉染色。标尺=50 μm。A: Pollen staining of wild type *Arabidopsis thaliana*; B: Pollen staining of transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸; C: Pollen staining of transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸; D: Pollen staining of transgenic *Arabidopsis thaliana* of PS:Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸. Scale bars=50 μm.

图6 不同截短 $orf288$ 转基因拟南芥花粉染色

Fig.6 Pollen staining of transgenic *Arabidopsis thaliana* of different truncated *orf288*

4) $Rfp288^{104-288}$ 基因表达量验证。为验证雄性不育是由目的基因的表达所引起的,取PS:Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸不育和可育拟南芥的花蕾进行基因表达量检测。不育株中 $Rfp288^{104-288}$ 的表达量显著高于可育株(图7),结果表明, $Rfp288^{104-288}$ 在植株体内的表达可以引起雄性不育。



表示在0.01水平上显著。 shows significant at 0.01 level.

图7 可育和不育拟南芥中 $Rfp288^{104-288}$

的相对表达量分析

Fig.7 Relative expression analysis of *Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸* in fertile and sterile *Arabidopsis thaliana* plants

3 讨 论

3.1 ORF138的蛋白毒性与雄性不育的关系

越来越多的不育基因被证明编码一种可以抑制大肠杆菌生长的毒蛋白,如玉米T-CMS的URF13^[22]、向日葵Pet1 CMS的ORF522^[23]、水稻Bt CMS的ORF79、HL CMS的ORFH79、WA CMS的WA352^[24]、Tetep-CMS的ORF312^[25]、油菜pol CMS的ORF224^[26]、hau CMS的ORF288^[27]、Nsa CMS的ORF346^[28]等。而线粒体是由与真核生物共生的原核生物进化而来^[24]。因此,研究者猜测不育基因编码的毒蛋白是以类似毒害大肠杆菌的方式对花药中的线粒体产生影响,进而引起植物雄性不育,即细胞质雄性不育分子机制的毒蛋白假说。但Luo等^[9]和Heng等^[18]的研究表明,WA352和ORF288去掉蛋白毒性部分后,余下的无毒部分仍可以引起转基因植株雄性不育,与毒蛋白假说相悖。本研究通过全长和截短ORF138蛋白的原核表达,确定了其毒性区域是位于包含跨膜螺旋的N端。由于蛋白的跨膜螺旋通常是由疏水氨基酸组成^[29],因此,本研究与Duroc等^[13]通过氨基酸的亲疏水性对ORF138进行截短研究出的非毒性区域大致相同。与WA352和ORF288不同,去掉ORF138的N端毒性部分后,余下的部分不能引起植物雄性不育,这与带有Rf恢复基因可育植株中orfl38转录本5'端缺失相符^[29]。本研究更直接地证明了N端毒性部分是ORF138导致雄性不育所必需的。ORF138的N端具有跨膜螺旋,以寡聚体形式存在,形成大复合物,在线粒体内膜上起着一个孔的作用^[14]。有研究表明,玉米T-CMS的URF13的寡聚体可以在线粒体膜上形成亲水孔,使内膜的透性受到影响,进而使膜两侧不能形成稳定的质子梯度,ATP合成速率降低,最终导致雄性不育^[31]。亲水孔的形成依赖跨膜螺旋的存在,ORF138的跨膜螺旋可能是导致不育的重要原因。本研究结果表明N端包含跨膜结构的毒性部分是ORF138引起雄性不育所必需的,因为这一区域具有毒性和跨膜结构特点,并不能简单地认为ORF138支持毒蛋白假说。另外,在大肠杆菌中观察到的蛋白毒性是否就是由跨膜螺旋造成尚没有明确的阐述。因此,ORF138是否支持毒蛋白假说以及跨膜螺旋结构与蛋白毒性之间的关系仍有待进一步的研究。

3.2 orf288的核心功能区域

我们前期的工作证明orf288是油菜hau CMS胞质的不育相关基因,且去掉N端毒性部分的ORF215

仍可以使转基因植株发生雄性不育^[10],但ORF215仍是较长的一段序列,是否由其整个序列引起雄性不育值得进一步研究。本研究通过不同长度截短载体的遗传转化试验,初步证明orf288引起植物雄性不育的核心功能区域是orf288¹⁶⁴⁻²⁸⁸,且164-194 aa可能是引起不育的一个关键作用区域。Luo等^[9]的截短实验表明水稻WA352中与COX11互作的2个部分均可单独引起转基因植株雄性不育。Tang等^[32]的研究表明WA352的序列中包含sc1、sc2和sc3三个部分,其中sc1负责与COX11互作,互作部分的氨基酸突变会影响互作的程度,sc2和sc3对这种互作起到一个开关的作用,从线粒体基因进化的角度说明了sc1序列的保留与功能保守的关系。Omukai等^[33]利用mitoTALENs技术对水稻RT102-type CMS的不育基因orf352进行编辑,发现ORF352的179-210 aa可能对雄性不育起关键作用。而Kasahara等^[34]则探讨了蛋白序列中更倾向于与其他蛋白发生互作的片段特性。这些研究都证明不育基因核心功能区段的存在。由于胞质不育相关基因大多是由基因组重组形成的嵌合基因,而一些不育基因的某些嵌合部分来源是相同的,导致它们之间存在一定的同源性。hau CMS的orf288和tour CMS的orf263^[35]以及pol CMS的orf224、shan 2A CMS的orf224^[36]高度同源。因此,植物中CMS的败育方式和不育分子机制间的差异可能是由其不育基因的核心功能区域所具有的功能差异导致。不育基因核心功能区段的确定可为利用CRISPR/Cas9和TALEN等技术进行基因编辑、创建亲和可育材料提供指导,有利于更高效地利用杂种优势。未来随着数据库日渐完善,对核心功能区段进行保守结构域预测分析,将可以为研究其引起雄性不育的分子机制提供思路。

参考文献 References

- [1] 沈金雄,傅廷栋. 我国油菜生产、改良与食用油供给安全[J]. 中国农业科技导报,2011,13(1):1-8.SHEN J X, FU T D. *Brassica* seed production, improvement and edible oil supply in China [J]. Journal of agricultural science and technology, 2011, 13(1): 1-8(in Chinese with English abstract).
- [2] DING B L, HAO M Y, MEI D S, et al. Transcriptome and hormone comparison of three cytoplasmic male sterile systems in *Brassica napus* [J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12):4022[2022-01-05].<https://doi.org/10.3390/ijms19124022>.
- [3] 雷刚,方荣,周坤华,等. 植物细胞质雄性不育与线粒体[J]. 西北植物学报,2020,40(9):1617-1626.LEI G, FANG R, ZHOU K H, et al. Cytoplasmic male sterility (CMS) and mitochondria in plants [J]. Acta botanica boreali occidentalia sinica, 2020, 40

- (9):1617-1626(in Chinese with English abstract).
- [4] PALUMBO F, VITULO N, VANNOZZI A, et al. The mitochondrial genome assembly of fennel (*Foeniculum vulgare*) reveals two different *atp6* gene sequences in cytoplasmic male sterile accessions[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13):4664 [2022-01-05].<https://doi.org/10.3390/ijms21134664>.
- [5] WANG B, FAROOQ Z, CHU L, et al. High-generation near-isogenic lines combined with multi-omics to study the mechanism of *polima* cytoplasmic male sterility[J/OL]. BMC Plant Biol, 2021, 21(1):130 [2022-01-05].<https://doi.org/10.1186/s12870-021-02852-7>.
- [6] ZHANG Y, SONG Q, ZHANG L, et al. Comparative proteomic analysis of developmental changes in P-type cytoplasmic male sterile and maintainer anthers in wheat[J/OL]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4):2012 [2022-01-05].<https://doi.org/10.3390/ijms22042012>.
- [7] LIU Z, SHI X, LI S, et al. Tapetal-delayed programmed cell death (PCD) and oxidative stress-induced male sterility of *aegilops uniaristata* cytoplasm in wheat[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6):1708 [2022-01-05].<https://doi.org/10.3390/ijms19061708>.
- [8] ZHENG S, LI J, MA L, et al. *OsAGO2* controls ROS production and the initiation of tapetal PCD by epigenetically regulating *OsHXK1* expression in rice anthers[J]. PNAS, 2019, 116(15):7549-7558.
- [9] LUO D, XU H, LIU Z, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. Nat Genet, 2013, 45(5):573-577.
- [10] 衡双平.油菜 hau CMS线粒体基因组和不育基因的研究[D].武汉:华中农业大学,2015.HENG S P. The mitochondrial genomes and functions of *hau* cytoplasm male sterility gene in *Brassica* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [11] KIRTI P B, BANGA S S, PRAKASH S, et al. Transfer of *Ogura* cytoplasmic male sterility to *Brassica juncea* and improvement of the male sterile line through somatic cell fusion[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91(3):517-521.
- [12] BONHOMME S, BUDAR F, LANCELIN D, et al. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 *Ogura*-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids[J]. Mol Gen Genet, 1992, 235(2/3):340-348.
- [13] DUROC Y, GAILLARD C, HIARD S, et al. Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for *Ogura* cytoplasmic male sterility in *Brassicaceae*[J]. Biochimie, 2005, 87(12):1089-1100.
- [14] DUROC Y, HIARD S, VRIELYNCK N, et al. The *Ogura* sterility-inducing protein forms a large complex without interfering with the oxidative phosphorylation components in rapeseed mitochondria[J]. Plant Mol Biol, 2009, 70(1/2):123-137.
- [15] WANG C, LEZHNEVA L, ARNAL N, et al. The radish *Ogura* fertility restorer impedes translation elongation along its cognate CMS-causing mRNA[J/OL]. PNAS, 2021, 118(35):e2105274118 [2022-01-05].<https://doi.org/10.1073/pnas.2105274118>.
- [16] WAN Z J, JING B, TU J X, et al. Genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system (*hau*) in *Brassica juncea* and its transfer to *B. napus*[J]. Theor Appl Genet, 2008, 116(3):355-362.
- [17] 景兵.芥菜型油菜胞质不育 Hau CMS不育相关基因的鉴定及其功能分析[D].武汉:华中农业大学,2012.JING B. Identification and function analysis of *Hau* CMS-associated gene in *Brassica juncea* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [18] HENG S P, GAO J, WEI C, et al. Transcript levels of $orf288$ are associated with the *hau* cytoplasmic male sterility system and altered nuclear gene expression in *Brassica juncea*[J]. J Exp Bot, 2018, 69(3):455-466.
- [19] 高长斌.甘蓝型油菜自交不亲和分子恢复机制研究及应用[D].武汉:华中农业大学,2013.GAO C B. Molecular mechanism of dominant self-compatibility and it's application in *Brassica napus* L.[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [20] 钱佳丽.基于转录组学和代谢组学挖掘油菜萌发期耐盐基因[D].武汉:华中农业大学,2020.QIAN J L. Mining salt-tolerance genes in the germination stage of brassicaseed based on transcriptomics and metabolomics[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25:402-408.
- [22] KORTH K L, KASPI C I, SIEDOW J N, et al. URF13, a maize mitochondrial pore-forming protein, is oligomeric and has a mixed orientation in *Escherichia coli* plasma membranes[J]. PNAS, 1991, 88(23):10865-10869.
- [23] NAKAI S, NODA D, KONDO M, et al. High-level expression of a mitochondrial *orf522* gene from the male-sterile sunflower is lethal to *E. coli*[J]. Japanese journal of breeding, 1995, 45(2):233-236.
- [24] SANG S F, CHENG H T, HAO M Y, et al. Mitochondrial localization of ORF346 causes pollen abortion in alloplasmic male sterility[J]. The crop journal, 2021, 9(6):1320-1329.
- [25] JIN Z, SEO J, KIM B, et al. Identification of a candidate gene for the novel cytoplasmic male sterility derived from inter-subspecific crosses in rice (*Oryza sativa* L.)[J/OL]. Genes (Basel), 2021, 12(4):590 [2022-01-05].<https://doi.org/10.3390/genes12040590>.
- [26] 赵荣敏,王迎春,范云六.油菜波里马胞质雄性不育相关线粒体基因 $orf224$ 在大肠杆菌中的克隆和表达[J].农业生物技术学报,1996,4(1):15-22.ZHAO R M, WANG Y C, FAN Y L. Cloning and expression of *Brassica polima* CMS related mitochondrial gene *orf224* in *Escherichia coli*[J]. Journal of agricultural biotechnology, 1996, 4(1):15-22 (in Chinese with English abstract).
- [27] JING B, HENG S, TONG D, et al. A male sterility-associated cytotoxic protein ORF288 in *Brassica juncea* causes aborted pollen development[J]. J Exp Bot, 2012, 63(3):1285-1295.
- [28] 包灿明.水稻不同类型细胞质雄性不育基因对大肠杆菌生长抑制的机制[D].南昌:南昌大学,2016.BAO C M. Mechanism of various cytoplasmic male sterility associated genes on inhibition of *E. coli* growth[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [29] SHAHIDULLAH K, LONDON E. Effect of lipid composition on the topography of membrane-associated hydrophobic helices:

- stabilization of transmembrane topography by anionic lipids[J]. *J Mol Biol*, 2008, 379(4): 704-718.
- [30] YASUMOTO K, TERACHI T, YAMAGISHI H. A novel *Rf* gene controlling fertility restoration of *Ogura* male sterility by RNA processing of *orf138* found in Japanese wild radish and its STS markers[J]. *Genome*, 2009, 52(6): 495-504.
- [31] LEVINGS C S, SIEDOW J N. Molecular basis of disease susceptibility in the Texas cytoplasm of maize[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 19(1): 135-147.
- [32] TANG H, ZHENG X, LI C, et al. Multi-step formation, evolution, and functionalization of new cytoplasmic male sterility genes in the plant mitochondrial genomes[J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 130-146.
- [33] OMUKAI S, ARIMURA S I, TORIYAMA K, et al. Disruption of mitochondrial *open reading frame 352* partially restores pollen development in cytoplasmic male sterile rice[J]. *Plant Physiol*, 2021, 187(1): 236-246.
- [34] KASAHARA K, MINAMI S, AIZAWA Y. Characteristics of interactions at protein segments without non-local intramolecular contacts in the Protein Data Bank[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0205052 [2022-01-05]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205052>.
- [35] LANDGREN M, ZETTERSTRAND M, SUNDBERG E, et al. Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein off[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32(5): 879-890.
- [36] 林宝刚, 黄海, 张龙, 等. 甘蓝型油菜 *Polima* 和 *Shan 2A* CMS 的 *orf224* 基因的序列分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(6): 1282-1286. LIN B G, HUANG H, ZHANG L, et al. Sequence comparison on gene *orf224* of *Polima* CMS and *Shan2A* CMS in *Brassica napus* L.[J]. *Scientia agricultura sinica*, 2006, 39(6): 1282-1286 (in Chinese with English abstract).

Functional analysis of cytoplasmic male sterility genes *orf138* and *orf288* in *Brassica*

WEI Qiangyan, GE Xiaoyu, ZHAO Lun, WEN Jing, YI Bin, TU Jinxing, FU Tingdong, SHEN Jinxiang

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/National Engineering Research Center of Rapeseed, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Two CMS genes were truncated in different lengths, expressed in prokaryotic cells and genetically transformed in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. to determine the relationship between the toxicity of the protein encoded by the *ogu* CMS sterility gene *orf138* and male sterility and the core functional region of the *hau* CMS sterility gene *orf288*. The results of truncated male sterile gene *orf138* showed that the growth of *E. coli* expressing pET32a¹⁻¹³⁸ and pET32a¹⁻⁹³ containing transmembrane helix was significantly inhibited after the IPTG was added, while the growth of *E. coli* expressing pET32a⁴⁵⁻¹³⁸ without transmembrane helix was not affected. It is indicated that the toxic region of ORF138 is located at the N-end containing the transmembrane helix. Results of genetic transformation showed that PS: Rfp138³⁵⁻¹³⁸ and PS: Rfp138⁴⁵⁻¹³⁸ did not cause male sterility in *Arabidopsis thaliana* and *B. napus*, indicating that the complete N end is necessary for ORF138 to induce male sterility in plants. The results of genetic transformation of different truncated *orf288* in *Arabidopsis thaliana* showed that positive seedlings transformed with PS: Rfp288¹⁰⁴⁻²⁸⁸, PS: Rfp288¹³⁴⁻²⁸⁸ and PS: Rfp288¹⁶⁴⁻²⁸⁸ were male sterile, while all the positive seedlings transformed with PS: Rfp288¹⁹⁴⁻²⁸⁸ were fertile. It is preliminarily proved that the core functional region of *orf288* is *orf288*¹⁶⁴⁻²⁸⁸, indicating that the 164th-194th aa of ORF288 may be closely related to the cytoplasmic male sterility in *hau*.

Keywords *Brassica*; cytoplasmic male sterility; *orf138*; *orf288*; toxic protein

(责任编辑:张志钰)