

辣椒‘9704A’雄性不育特异基因 *hsf* 的克隆及表达分析

胡双发¹, 彭彦¹, 赵燕¹, 刘峰^{2*}, 张学文^{1*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省农业科学院蔬菜研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要: 对辣椒细胞质雄性不育系‘9704A’和其同核保持系‘9704B’早期花蕾转录组的 Solexa 测序结果进行分析, 发现 1 个差异性表达基因, 其在不育系中的表达比在保持系中的表达高 10 倍, 该基因与番茄、葡萄、拟南芥中的 *hsf* 基因同源性分别为 87%、73% 和 70% 推测该基因为辣椒的 *hsf* 基因。根据该基因序列设计引物, 从辣椒‘9704A’中克隆该基因的全长及核心 cDNA 序列, 克隆到的 *hsf* 全长与核心序列与转录组测序获得的序列一致, 进一步分析表明, 该基因属于 *hsf* 基因家族成员。用定量 PCR 分析 *hsf* 基因在‘9704A’和‘9704B’2 种辣椒的根、茎、叶和晚期花蕾中的表达情况, 结果表明, 该基因在不育系叶组织的表达量为其在保持系叶组织表达量的 13.7 倍, 在不育系晚期花蕾中的表达量也为其在保持系晚期花蕾的 3 倍, 而在 2 种辣椒系的茎中的表达量都很低, 在 2 种辣椒系的根中的表达量均较高。

关键词: 辣椒; 雄性不育; 热激转录因子; 定量分析

中图分类号: S641.3; Q781

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)03-0257-05

Cloning and expression analysis of a CMS specific *hsf* in *Capsicum annuum* L. ‘9704A’

HU Shuang-fa¹, PENG Yan¹, ZHAO Yan¹, LIU Feng^{2*}, ZHANG Xue-wen^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Institute of Vegetables, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: Transcriptome Solexa sequencing was conducted on pepper early flower buds of the CMS line ‘9704A’ and its correspondence homonuclear maintainer line ‘9704B’ previously. A gene that expressed 10 times higher in pepper cytoplasm male sterile (CMS) line ‘9704A’ than it is in the maintainer line ‘9704B’ was identified. Gene homology analysis of the cloned *hsf* gene showed that the gene shares 87% homology with the *hsf* in *Solanum lycopersicum*, 73% in *Vitis vinifera* and 70% in *Arabidopsis thaliana*. According to the gene sequence we designed the primers and cloned the core sequence and *hsf* cDNA in pepper ‘9704A’. Sequence analysis showed that the cloned *hsf* cDNA was consistent with transcriptome Solexa sequencing. Gene analysis showed that the gene is one of the plants *hsf* gene family members. The real-time fluorescence quantitative RT-PCR primers were designed and the RT-PCR of the gene was carried out with the compared tissues in ‘9704A’ and ‘9704B’, using actin as reference gene. The result showed that the *hsf* gene expression in ‘9704A’ leaf is 13 times higher than it is in the maintainer line and in ‘9704A’ later flower bud is 3 times higher. The gene expressed very low in the stems of the two materials while high in the roots.

Key words: *Capsicum annuum* L.; male sterility; heat shock transcription factor; quantitative analysis

辣椒细胞质雄性不育系‘9704A’是湖南省蔬菜研究所培育的一个不育性状稳定、在杂交育种中有

良好应用的辣椒不育品系^[1]。何长征等^[2]从细胞水平对其进行了研究,观察到‘9704A’属于孢子体败育

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101425)

作者简介: 胡双发(1988—), 男, 湖南邵东人, 硕士研究生, 主要从事细胞分子遗传研究, hushangfa@sina.com; *通信作者, liufengrich@126.com; xwzhang@hunau.edu.cn

型,花粉母细胞不能完成减数分裂形成正常四分体。为从分子水平研究‘9704A’不育的机理,湖南省农业科学院蔬菜研究所采用 Solexa 高通量测序法,对辣椒不育系‘9704A’和其同核保持系‘9704B’早期花蕾总 RNA 进行了转录组测序(数据未发表);陈遥等^[3]根据转录组数据,从不育系中鉴定了一个差异表达的 *chs* 基因。本研究对转录组测序数据进行进一步分析,选择表达差异显著的另一基因进行克隆,并分析该基因在辣椒不育系‘9704A’和保持系‘9704B’的根、茎、叶以及晚期花蕾中的表达情况,以进一步探讨辣椒雄性不育的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试辣椒

试验辣椒(*Capsicum annuum* L.)不育系‘9704A’和同核保持系‘9704B’为湖南省农业科学院蔬菜研究所培育的辣椒品系。材料种植于蛭石、黑土、沙子体积比为 1:1:1 的营养钵中,置于白天 24℃、夜晚 18℃,每天光照时间为 16 h 的培养室中生长。

1.1.2 菌株

大肠杆菌(*E.coli*) DH5 α 为湖南农业大学细胞生物学实验室保存。

1.1.3 主要试剂

Trizol 试剂(Invitrogen 公司); RevertAidTM First Strand Synthesis Kit 反转录试剂盒(Fermentas 公司); 琼脂糖凝胶回收试剂盒(维尔生物公司); pMD18-T 载体(Takara 公司); 荧光定量试剂盒(Takara 公司); 质粒提取试剂盒(长沙天根生物技术公司); 限制性内切酶 *Pst* I 和 *Sac* I (Fermentas 公司)。

1.2 方法

1.2.1 表达差异显著基因生物信息学分析

利用 Stekel 等^[4]的 *R* 统计值分析‘9704A’和‘9704B’中的表达差异基因,通过 NCBI 对表达差异显著基因进行 BLAST 同源性比对分析。

1.2.2 辣椒 RNA 的提取

用 Trizol 试剂,按照其说明书分别提取‘9704A’和‘9704B’辣椒系的根、茎、叶及晚期花蕾的总

RNA,并将提取好的 RNA 溶于 DEPC 处理过的水中,按照反转录试剂盒说明书对 RNA 进行反转录,获得 cDNA。

1.2.3 表达差异显著基因克隆

根据表达差异显著基因序列,设计克隆核心区域和全长基因的引物。扩增全长的引物为 Up1 (5'-G AAGTCTAGAACCTTCCACCTA-3')和 Dn1(5'-AA ACAAGAAGGGGATTTTC-3')。扩增核心区域序列的引物为 Up2(5'-GCTCTAGAATGATGAATAATA ATCCATTG-3')和 Dn2(5'-AACTGCAGACTAAGG GCTCGAATCC-3')。PCR 反应总体体系均为 25 μ L,其中‘9704A’cDNA 模板 1 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物(Up1/Dn1 或 Up2/Dn2)各 1 μ L,10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L,5 U/ μ L *Taq* 酶 0.25 μ L,10 \times Buffer 2.5 μ L,ddH₂O 18.75 μ L。PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min(全长基因 53℃退火),72℃延伸 90 s(全长基因延伸 150 s),25 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

扩增的全长和核心序列 PCR 产物分别经 1% 琼脂糖凝胶电泳,利用琼脂糖凝胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行回收和纯化。将回收的两段 PCR 扩增片段克隆到 pMD18-T,转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,均匀涂布在含 Amp(氨苄青霉素)LB 平板,37℃过夜培养,挑取阳性克隆菌,经 LB 液体培养基小量摇菌培养,常规提取质粒,进行酶切检测。全长序列和核心序列双酶切体系一致,均为 20 μ L,其中质粒模板 13 μ L,*Pst* I 酶 0.5 μ L,*Sac* I 酶 0.5 μ L,10 \times Buffer(Y) 2 μ L,ddH₂O 4 μ L。将双酶切检测呈阳性质粒送铂尚生物公司测序。

测序结果用 NCBI 的 ORF finder、ExpASy 网站、SignalP 4.1、DNAMAN 进行分析。

1.2.4 荧光定量 RT-PCR 检测表达差异显著基因

以辣椒不同组织的 cDNA 为模板,辣椒 *actin* 基因为内标基因进行荧光定量 PCR 反应,以检测辣椒 *hsf* 基因的表达情况。辣椒 *hsf* 基因荧光定量检测引物为 Up(5'-AGTGGTCGTACAACCTGGTATTG-3')和 Dn(5'-GCAAGATCCAAACGAAGAATGG-3')。辣椒 *actin* 扩增引物为 *actin*-up (5'-GAAGCACCTCT CAACCCTAAG-3')和 *actin*-down (5'-GACCACTAG CATACAAGGAAAGA-3')。定量 PCR 的反应体系

的配置及反应程序设置均按照荧光定量试剂盒的说明进行。

2 结果与分析

2.1 表达差异显著基因同源性分析

利用 *R* 统计值分析‘9704A’和‘9704B’中的 Solexa 测序数据,发现具有表达显著的基因中,有一个基因在不育系‘9704A’中的表达量为保持系‘9704B’的 10 倍。结合 BLAST 分析表明,该表达差异显著基因属于热激转录因子家族,与番茄 *hsf*(GenBank 登录号 XM 004247151)、葡萄 *hsf*(GenBank 登录号 XM 002280582)和拟南芥 *hsf*(GenBank 登录号 NM 113182)的同源性分别为 87%、73%和 70%,因此,推测该基因为辣椒的 *hsf* 基因。

2.2 *hsf* cDNA 克隆与分析

用辣椒 *hsf* 基因全长及核心序列引物从辣椒‘9704A’中分别扩增到 2 000 bp 左右的全长 cDNA 片

段和 1 000 bp 左右的核心 cDNA 片段。将全长及核心片段进行 TA 克隆及测序。测序结果表明克隆的辣椒 *hsf* 基因全长及核心序列与‘9704A’转录组 Solexa 测序中的全长和核心序列结果一致,说明该基因在 Solexa 测序中拼接获得的全长及核心序列是正确的。克隆得到的 *hsf* 基因(GenBank 登录号 KC1638907)全长 cDNA 为 2 018 bp,包含 1 个 1 083 bp 的核心序列开放阅读框(ORF)、1 个 207 bp 未正常剪切的内含子序列、1 个 339 bp 的 5'UTR 和 1 个 389 bp 的 3'UTR。

根据蛋白质库中登录的 Hsf 序列,通过 Mega 软件分析了该 Hsf 同源性关系(图 1),结果显示辣椒热激转录因子在蛋白质水平上与黄瓜(*Cucumis sativus*)XM_004146947.1 的亲缘关系最近,可分为 1 个分支。这一分支与毛果杨(*Populus trichocarpa*)、高粱(*Setaria italica*)及番茄(*Solanum lycopersicum*)中的 Hsf 聚成一类。

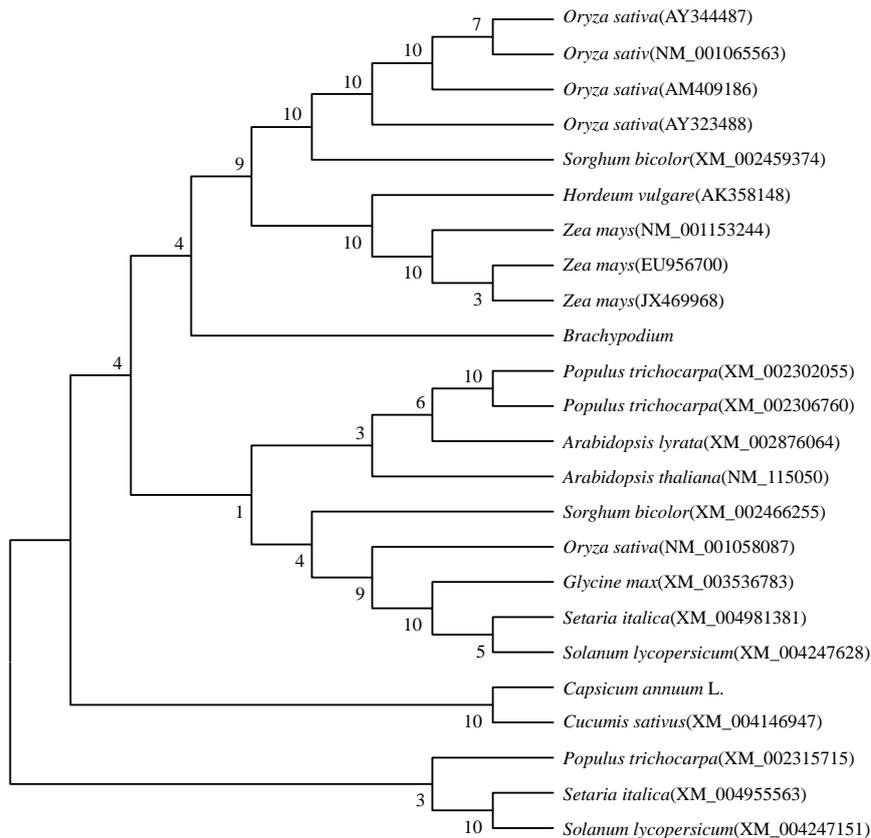


图 1 辣椒热激转录因子(Hsf)氨基酸序列的同源性分析结果

Fig.1 Phylogenetic analysis of amino acid sequence of Hsf protein

2.3 *hsf* 基因在辣椒不同组织中的表达分析

荧光定量表达结果(图 2)显示,在 2 种辣椒的

茎中,*hsf* 基因的表达水平都很低;在 2 种辣椒的根中,*hsf* 基因的表达水平均较高。在 2 种辣椒叶组织中,*hsf* 基因的表达存在显著性差异,即在不

育系‘9704A’的表达量是保持系‘9704B’的13.7倍。在2种辣椒的晚期花蕾中, *hsf* 基因的表达也存在显著性差异, 在不育系中的表达量约为保持系的3倍。而 Solexa 测序结果中, *hsf* 基因在不育系早期花蕾中的表达量为保持系的10倍, 说明 *hsf* 基因随着花蕾的发育, 表达量也发生了显著的变化。*hsf* 基因在不育系叶和花蕾中的异常表达, 推测 *hsf* 基因与辣椒雄性不育相关。

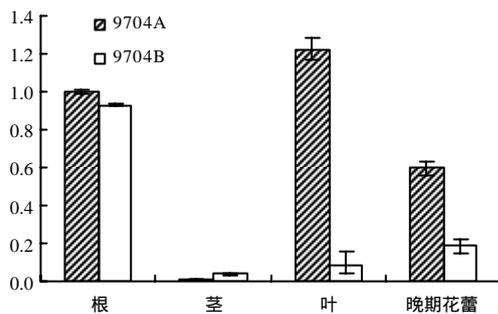


图2 *hsf* 在2种辣椒根、茎、叶和晚期花蕾组织中的实时荧光定量 RT-PCR 分析

Fig.2 The RT-PCR analysis of the *hsf* expression in root, stem, leaf and later flower bud in 9704A and 9704B

3 讨论

辣椒的杂种优势体现在增强长势、提高种子活力和抗病性等方面, 而且杂交能改善果实品质、增加产量。但在维持杂种优势的稳定性方面, 母本花粉授粉的自交会致种子严重混杂, 人工去雄是辣椒杂交制种的方式, 但难以避免自交混杂。利用雄性不育系进行杂交育种可以省去人工去雄的高额成本并阻断其自交, 因此, 研究辣椒雄性不育机制对选育不育亲本和杂交制种都有非常重要的意义。

目前分子生物学揭示的一些不育基因主要集中在叶绿体中, 已经报道的辣椒叶绿体不育相关基因有 *atp6-706*^[5]、*coxII-708*^[5]、*orf168*^[6]、*orf456-330*^[7]、*orf507*^[8]等, 但这些基因与‘9704A’的不育都没有直接关联, 因此, ‘9704A’的雄性不育可能有其独特的机制。

热激转录因子基因 *hsf* 首先在酵母中被发现^[9], 随后在番茄^[10]、果蝇^[11]、哺乳动物^[12-13]以及拟南芥^[14]、水稻^[15]等模式作物中相继发现了 *hsf* 基因。在酵母和果蝇中均只发现一个 *hsf* 植物作为不可移动生长生物, 在热激响应方面可能远比动物中复杂, 具有更大的 *hsf* 基因家族, 在拟南芥、番茄、

水稻等植物中分别鉴定出21、18和23个不等的 *hsf* 基因^[16]。这表明植物热激转录因子的多样化能使植物更好适应外界环境, 也可能使其参与更多的遗传现象, 如 CMS^[17]。

植物中的光温敏雄性不育现象间接证明雄性不育和热胁迫之间存在着密切关系^[18]。之后, 陈建南等^[19]将 *hsp70* 基因反义注入高粱, 使可育花粉变成了不育; 苏晴等^[20]发现 *hsp23.5* 基因在不育系小麦花药不育产生的3个关键时期表达量存在显著差异。这些研究表明 *hsp* 可参与不育性状调控, 但辣椒 *hsp* 基因与不育的相关性尚未见报道。

辣椒在受到高温胁迫时, 叶片作为主要响应器官, 在热激转录因子表达后, 可以启动受该因子调控的相关基因表达。而热激转录因子启动的下游基因为热激蛋白(Hsp)基因, 这些蛋白多为小分子的分子伴侣, 参与功能性蛋白的正确折叠和正常功能维护^[21]。本试验中获得的辣椒 *hsf* 基因不仅在‘9704A’不育系叶中高水平表达, 且与保持系的差异非常明显, 而且在花中随着花蕾的发育 *hsf* 基因的表达量也存在显著差异。这些显著差异表达, 可能启动下游(如细胞器靶向)的 Hsp 的表达, 这些 Hsp 又可能在细胞器如叶绿体和线粒体中发挥功能, 从而关联细胞质决定的性状 CMS^[22]。

参考文献:

- [1] 邹学校, 侯喜林, 刘荣云, 等. 辣椒细胞质雄性不育基因对不育系及杂交一代农艺性状和生化特性的影响[J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 732-736.
- [2] 何长征, 刘志敏, 熊兴耀, 等. 辣椒细胞质雄性不育系 9704A 花药发育的细胞学观察[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 521-528.
- [3] 陈遥, 彭彦, 刘峰, 等. 辣椒 *CHS* 基因表达的定量分析及与雄性不育的相关性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 39(3): 259-264.
- [4] Stekel D J, Git Y, Falciani F. The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries[J]. Genome Research, 2000, 10(12): 2055-2061.
- [5] 邓明华, 邹学校, 霍金龙, 等. 辣椒核质互作雄性不育系线粒体不育基因 *coxII* 和 *atp6* 的克隆与序列分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(10): 1935-1940.
- [6] 邓明华. 辣椒胞质雄性不育的分子生理机制及亲缘关系研究[D]. 长沙: 中南大学隆平分院, 2011.
- [7] 邓明华, 文锦芬, 邹学校, 等. 辣椒核质互作雄性不育系 9704A 线粒体雄性不育基因片段分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(增刊): 2169.

- [8] Deng M H , Wen J F , Huo J L , et al . Molecular characterization and prokaryotic expression of *orf507* sterility-associated gene in chilli pepper cytoplasmic male sterility[J] . Pak J Bot , 2012 , 44(5) : 1497–1502 .
- [9] Wiederroeth G ,Seto D ,Parker C S . Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat stress transcription factor[J]. Cell , 1988 , 54(6) : 841–853 .
- [10] Scharf K D , Rose S , Zott W , et al . Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast *hsf*[J] . EMBO J , 1990 , 9 (13) : 4495–4501 .
- [11] Clos J , Westwood J T , Becker P B , et al . Molecular cloning and expression of a hexameric drosophila heat stress factor subject to negative regulation[J] .Cell ,1990 , 63(5) : 1085–1097 .
- [12] Rabindran S K ,Giorgi G ,Clos J ,et al .Molecular cloning and expression of a human heat stress factor[J] .Proc Natl Acad Sci , 1991 , 88(16) : 6906–6910 .
- [13] Sarge K D , Zimarino V , Holm K , et al . Cloning and characterization of two mouse heat stress factors with distinct inducible and constitutive DNA binding ability[J] . Genes Dev , 1991 , 5(10) : 1902–1911 .
- [14] Huhel A , Schottl F . *Arabidopsis* heat shock factor : Isolation and characterization of the gene and the recombinant protein[J] . Plant Mol Biol , 1994 , 26(1) : 353–362 .
- [15] Yamanouchi U ,Yano M ,Lin H ,et al .A rice spotted leaf gene , *Spl7* , encodes a heat stress transcription factor protein[J] .Proc Natl Acad Sci ,2002 ,99(11) :7530–7535 .
- [16] Nover L ,Scharf K D ,Cagliardi D ,et al .The *hsf* world : Classification and properties of plant heat stress transcription factors[J] . Cell Stress Chaperones , 1996 , 1(4) : 215–223 .
- [17] Kotak S , Port M , Ganguli A , et al . Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A *hsfs* with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization[J] . Plant J , 2004 , 39(1) : 98–112 .
- [18] 宋亚珍, 陈天佑, 雷国材, 等. 普通小麦 PTS 关温敏雄性不育的遗传分析[J]. 西北农林科技大学: 自然科学版, 2003, 31(3): 47–50 .
- [19] 陈建南, 傅鸿仪, 路子显, 等. 反义 hsp70 反义 RNA 对高粱花粉的正常形成的影响[J]. 科学通报, 1997, 42(18): 1994–1997 .
- [20] 苏晴, 茹振刚, 秦志英, 等. 小热激蛋白基因(*hsp23.5*) 在小麦 BNS 雄性不育和转换系差异表达[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(1): 29–37 .
- [21] Pelham H R . A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene[J] . Cell , 1982 , 30(2) : 517–528 .
- [22] Liu F ,Cui X ,Horner H T ,et al .Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize[J] . Plant Cell , 2001 , 13(5) : 1063–1078 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维