

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.24268

烟草细胞质雄性不育系 K326 *MADS-box* 和 *SUPERMAN* 基因的特征

崔芳芳¹ 孟林峰¹ 刘苗苗² 张建强² 王建革^{2,*} 刘齐元^{1,*}

¹ 江西农业大学农学院 / 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室, 江西南昌 330045; ² 江西农业大学林学院, 江西南昌 330045

摘要: 细胞质雄性不育是杂种生产的重要工具, 也是研究细胞核与细胞质互作的良好系统, 但其机制仍不清楚。本研究以细胞质雄性不育系 K326 为材料, 研究了烟草细胞质不育系雄蕊异常与花发育基因表达的关系。细胞质雄性不育系 K326 源于普通烟草天然不育株, 用烤烟品种 K326 连续回交培育而成, 不仅具有心皮化雄蕊现象, 同时也有花瓣化雄蕊现象, 异常雄蕊基部融合为一体。本研究首先用生信手段对控制普通烟草花发育的 *MADS-box* 基因和边界基因 *SUPERMAN* 进行了全基因组鉴定, 分析了它们染色体定位和共线性, 预测了 B 类基因和 *SUPERMAN* 基因的顺式作用元件, 并研究了它们在不育系和保持系不同时期花蕾中的表达特征。结果表明, 烟草共鉴定出 160 个 *MADS-box* 基因和 5 个 *SUPERMAN* 基因。这些 *MADS-box* 基因中有 7 个 B 类基因(4 个 *PI* 基因, 3 个 *AP3* 基因), 79 个 *MADS-box* 基因定位于 22 条染色体上, 3 个 *SUPERMAN* 基因定位于 3 条染色体上。共线性分析表明, 串联和片段 DNA 重复、倍加作用是 *MADS-box* 基因家族扩张的驱动力。观察发现, 细胞质雄性不育系 K326 异常雄蕊在小蕾期就已出现, 暗示细胞质雄性不育 K326 中雄蕊异常是早期分生组织发育缺陷的结果。qPCR 检测表明, 细胞质雄性不育系及保持系中可以检测到 7 个 B 类基因和 1 个 *SUPERMAN* 基因表达。*PI* 基因表达水平 *NitMADS115* 在保持系各个时期均高于不育系; *AP3* 基因 *NitMADS72*、*NitMADS100* 表达水平在保持系各个时期均低于不育系; 其他基因呈现小蕾期和大蕾期下调, 中蕾期上调。*SUPERMAN* 基因只在保持系小蕾和中蕾期可以检测到, 而不育系各个时期中均无法检测到; 顺式作用元件分析表明, *NitMADS115* 具有生长素响应元件 AuxRR。因此, 生长素可能在烟草细胞质逆行调控细胞核起重要作用。
关键词: 烟草; 细胞质雄性不育; *MADS-box*; *SUPERMAN*; 生长素

Characteristics of *MADS-box* and *SUPERMAN* genes in tobacco cytoplasmic male sterile line K326

CUI Fang-Fang¹, MENG Lin-Feng¹, LIU Miao-Miao², ZHANG Jian-Qiang², WANG Jian-Ge^{2,*}, and LIU Qi-Yuan^{1,*}

¹ Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education / College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China; ² College of Forestry, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

Abstract: Cytoplasmic male sterility (CMS) is an important tool for hybrid production and a good system for studying the interaction between nucleus and cytoplasm, but its mechanism is still unclear. The relationship between stamen abnormality and the relative expression levels of flower development genes in tobacco CMS line K326 was studied. The CMS line K326 was derived from a natural variation in *Nicotiana tabacum* and was bred by continuous backcross of flue-cured tobacco variety K326. It has not only stamens with carpelloid, but also stamens with petaloid, and the base of abnormal stamens is fused into a whole. In this study, we identified *MADS-box* genes and *SUPERMAN* genes of whole genome, which controlled the flower development in *N. tabacum* and analyzed their chromosomal localization and collinearity. The *cis*-acting elements of B genes and *SUPERMAN* genes were predicted, and their expression characteristics in flower buds at different stages in both CMS line and its maintainer line were studied. The results showed that 160 *MADS-box* genes and 5 *SUPERMAN* genes were identified in the genome of tobacco,

本研究由国家自然科学基金项目(3196150292)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (3196150292).

* 通信作者(Corresponding authors): 王建革, E-mail: wjgsd@126.com; 刘齐元, E-mail: qi yuanl@126.com

第一作者联系方式: E-mail: 804994421@qq.com

Received (收稿日期): 2022-12-03; Accepted (接受日期): 2023-05-24; Published online (网络出版日期): 2023-05-31.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/11.1809.S.20230530.1545.006.html>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

including 4 *PI* genes, 3 *AP3* genes, and 7 *B* genes. There were 79 *MADS-box* genes scattered on 22 chromosomes, and 3 *SUPERMAN* genes distributed on 3 chromosomes. Collinearity analysis showed that tandem and fragment DNA duplication and multiplication were the driving forces of the expansion of *MADS-box* gene family in tobacco. The abnormal stamens of CMS line K326 appeared at small bud stage, suggesting that the abnormal stamens in CMS line K326 were the result of early meristem development defects. The qRT-PCR showed that 7 *B* genes and 1 *SUPERMAN* gene were expressed both in CMS line K326 and its maintainers. The relative expression level of *PI* gene *NitMADS115* in the maintainer line was higher than that in CMS line at all stages. The relative expression levels of *AP3* genes *NitMADS72* and *NitMADS100* in maintainer lines were lower than those in CMS lines. Other genes were down-regulated at small bud stage and large bud stage, and up-regulated at middle bud stage. The *SUPERMAN* gene could only be detected at small bud and middle bud stage of the maintainer line, but not at bud stages of CMS line. Analysis of cis-acting elements showed that *NitMADS115* had an auxin response element AuxRR. The study indicates that auxin might play an important role in cytoplasmic retrograde regulation of nucleus in tobacco.

Keywords: tobacco; cytoplasmic male sterility; *MADS-box*; *SUPERMAN*; auxin

在植物长期进化过程中, 基因的正确表达有赖于核质协调, 核质失调会导致植物生长发育异常, 细胞质雄性不育是核质互作失调典型例子之一^[1]。细胞质雄性不育是指无法产生功能花粉或产生的花粉败育但雌蕊正常的现象。从表型上看, 细胞质雄性不育表现一系列变异: 花粉败育、花药退化、雄蕊心皮化、雄蕊花瓣化^[2]。这种现象表现为母系遗传, 在开花植物中广泛存在, 是一些作物杂种优势利用的重要工具^[1-2]。

细胞质雄性不育的机制已进行过大量研究。在玉米^[3-4]、水稻^[5]、番茄^[6]、萝卜^[7]、油菜^[2]、辣椒^[8]、小麦^[9]、烟草^[10]等许多物种研究表明, 细胞质不育与线粒体 DNA 重排、产生新开放阅读框(open reading frame, ORF)或嵌合开放阅读框有关。但需要注意的是, 并非所有细胞质雄性不育机制的研究都支持这个结论, 因为有些与 CMS 相关的 ORF 是假定的, 那些 ORF 变异与细胞质雄性不育表型不能关联在一起^[11-12]。烟草细胞质雄性不育中检测到了线粒体 DNA 重排, 但未检测到新或嵌合 ORF 产生^[10]。这反映了细胞质雄性不育机制的复杂性。

细胞质雄性不育中雄蕊退化、雄蕊花瓣化、雄蕊心皮化现象与核基因引起的同源异型现象非常相似。在转育到不同细胞核背景下时, 这些现象仍然表现稳定^[1,9]。它们具有相同的细胞质, 但细胞核不同, 由于它们细胞核中花发育基因是完整的, 清楚地表明它们的花发育基因表达受到了影响。上述现象清楚地表明细胞核不仅可以对细胞质进行调控, 细胞质也可以逆向调控细胞核^[13]。

细胞质基因如何逆向调控细胞核基因, 目前还不是特别清楚, 但也取得了一些进展。雄蕊异常细胞质雄性不育系的花雄蕊异常出现在器官原基形成的早期^[2,14], 这表明花分生组织发育出现了缺陷。因此, 核质互作不仅影响到花器官发生, 而且负责第 2

轮和第 3 轮器官分化的基因表达调控也受到影响。许多雄蕊异常细胞质雄性不育系出现了雄蕊与雌蕊边界消失^[2], 说明边界基因的表达也受到了影响。在许多雄蕊心皮化和雄蕊花瓣化细胞质雄性不育系中, 不仅检测到了线粒体 DNA 重排, 同时也检测到了 B 类或 C 类 *MADS-box* 基因表达下调^[13]。此外, 雄蕊心皮化细胞质雄性不育系常发生第 3 轮雄蕊与第 4 轮雌蕊边界消失, 边界基因 *SUPERMAN* 表达下调^[13]。细胞质雄性不育系烟草 Nta(rep)具有异常雄蕊, 过表达拟南芥 *SUPERMAN* 基因植株花器官第 3 轮和第 4 轮之间的边界得以恢复, 雄蕊形态得到显著改善, 并能产生少量但有功能的花粉^[15]。由此看来, 边界基因 *SUPERMAN* 应在 B 基因下游起作用。

sup 突变体研究表明, 雄蕊发育异常并非源自雌雄蕊相互转化, 而是第 4 轮干细胞过度增殖^[16]。*SUPERMAN* 基因编码一个 C2H2 型锌指蛋白, 以细胞自主方式阻止 *AP3* 基因在第 4 轮中表达, 促进花第 4 轮干细胞终止^[16], 它通过控制生长素合成来调控花第 3 轮和第 4 轮的边界^[17]。许多过表达 *SUPERMAN* 基因植株变小, 可能与生长素缺陷有关^[18]。

烟草细胞质雄性不育中, 雄蕊退化、雄蕊心皮化和雄蕊花瓣化现象均有发现, 但都来源于异细胞质和胞质融合。我们课题组从普通烟草(*Nicotiana tabacum*)晒烟品种“铁骨烟”中发现天然不育株, 用烤烟品种 K326 连续回交, 培育出了细胞质雄蕊异常雄性不育系 K326。从表型上看, 烟草细胞质雄性不育系 K326 与异细胞质及胞质融合造成的细胞质雄性不育烟草异常雄蕊发育相同, 它们是否具有同样机制是值得研究的一个问题。通过对普通烟草花发育基因全基因组鉴定和特征分析, 利用 qPCR 技术检测了不同花发育时期细胞质雄性不育系 K326 中 B 类和 *SUPERMAN* 基因的表达。研究结果将为揭示烟草细胞质雄性不育机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

烟草细胞质雄性不育系 K326 及保持系种植于江西农业大学科技园试验田内。盛花期分别取小蕾(<3 mm)、中蕾(3~5 mm)和大蕾(>5 mm)期细胞质雄性不育系 K326 和保持系花蕾,一部分用 FAA (50% 酒精:冰醋酸:甲醛=18:1:1)固定,另一部分立刻投入液氮中后于-80℃冰箱中保存,用于 RNA 提取,3 次生物学重复。FAA 固定的花蕾 24 h 后于 75% 酒精中 4℃ 保存,Optec SZ780 体视显微镜观察。

1.2 *MADS-box* 和 *SUPERMAN* 基因鉴定

从茄科基因组网站(<https://solgenomics.net/>)下载普通烟草(*N. tabacum*)、渐狭叶烟草(*Nicotiana attenuata*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)基因组数据,从 PFAM 网站(<http://pfam.xfam.org/>)下载 *MADS-box* 基因种子文件 PF00319 和 PF01486。利用种子文件对所有蛋白数据进行扫描,E-value 值为 1e-10,候选基因利用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)^[19]进行鉴定,最终确认的 *MADS-box* 基因用 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)进行注释、分类。利用拟南芥 SUP 蛋白对下载蛋白数据进行 blast 比对,E-value 为 1e-10,利用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)^[19]鉴定,用 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)进行注释、分类,获得烟草 *SUPERMAN* 基因。

1.3 烟草 *MADS-box* 基因和 *SUPERMAN* 基因染色体定位和共线性

染色体定位、共线性分析是研究基因家族扩张的重要手段。根据烟草基因组注释文件,利用 MG2C

(http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)^[20]对烟草 *MADS-box* 和 *SUPERMAN* 基因进行了染色体定位分析,利用 TBtools^[21]对烟草 *MADS-box* 基因进行了物种内共线性分析。烟草属中只有普通烟草(*N. tabacum*)和渐狭叶烟草(*N. attenuata*)进行了染色体定位,因此进行物种间共进化分析时,以番茄(*S. lycopersicum*)为外类群,对普通烟草及渐狭叶烟草进行了物种间共线性分析。

1.4 烟草 B 类和 *SUPERMAN* 基因顺式作用元件分析

根据基因注释文件,利用 TBtools^[21]提取了烟草 B 类和 *SUPERMAN* 基因上游 2 kb 序列,并利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[22]分析了相应基因启动子上游顺式作用元件。

1.5 细胞质雄性不育系 K326 及保持系不同花蕾期 B 类及 *SUPERMAN* 基因表达的 qPCR 检测

细胞质雄性不育雄蕊异常与 B 类及 *SUPERMAN* 基因表达有关^[2,13],因此以细胞质雄性不育系 K326 及其保持系不同发育时期花蕾为材料,利用 qPCR 技术检测了相应基因的表达。RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (No. 9769)、反转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (No. RR036A)、qPCR 试剂盒 TaKaRa TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (No. RR420A)、均购自 TAKARA 公司。RNA 提取、反转录参照试剂盒说明进行。反转录得到的 cDNA 产物稀释 5 倍后作为 qPCR 模板,用 Oligo 7.0 设计 qPCR 引物(表 1),qPCR 参照试剂盒说明进行,3 次重

表 1 qPCR 所用引物

Table 1 Primers for qRT-PCR used in this study

基因 Gene name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>NitMADS100</i>	TTTGCCAATGGAGTACACA	TTAACCCCATACCAAATTGC
<i>NitMADS72</i>	CAGGCAAGTCACTTACTCCA	CAAGCGTCTCTGATACTGA
<i>NitMADS23</i>	AAATTGAACTCAAGCACCT	TTACGGATACTAGTTAGTCCA
<i>NitMADS105</i>	ATGGACTCACTAGTATCCGTA	TGGTGAAACACTTCCCCTA
<i>NitMADS152</i>	GCATATTAGCCTTACGCCTT	TTCACTTTGCGTAGATTGACT
<i>NitMADS22</i>	TGCATGAATATTGTAGCCCTT	GCTTAACCTGCATACTGTCA
<i>NitMADS115</i>	TGCATGAATATTGTAGCCCTT	GCTTAACCTGCATACTGTCA
<i>NitSUP1</i>	TCGAATAACAACGACGACAAC	GGCACATCTGAATTCCCTT
<i>NitSUP2</i>	AGCAGCCCATTTAAGTTACCG	GCTTAAACTCACACGCCAA
<i>NitSUP3</i>	CCTAGTTTGTTCATCCCC	CAAATCTCCATTCTTAGCTGA
<i>NitSUP4</i>	CCATTAAATCACTTGAGCC	CTAAGCAATCCAATTCCCAA
<i>NitSUP5</i>	GGCAGCTCATTTAAGTTTCCG	CACGCCAATCATCTCCGAA
<i>Actin</i>	CCGCTTTTGCTATTATGTCC	GCACCTCACAAATATGCTG

复。以 *Actin* 作为内参, 根据 Ct 值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因相对定量结果计算, 按照扩增效率为 100% 计算表达量差异。

2 结果与分析

2.1 不同时期细胞质雄性不育系 K326 及其保持系花雄蕊形态差异

为了便于烟草细胞质雄性不育系 K326 和保持系进行比较, 将它们不同发育时期花蕾形态差异进行了初步归纳(图 1)。小蕾期, 雌雄蕊发育仍在进行之中(图 1-A, D), 不育系雄蕊小蕾期就呈现异常, 许多雄蕊与雌蕊基部融合为一体, 顶端分化不明显, 也有少数雄蕊离生(图 1-D)。此期保持系 K326 雄蕊完全离生, 雄蕊顶端也在分化之中(图 1-A)。在中蕾期, 雄蕊明显分化。许多不育系雄蕊顶端柱头化, 呈心皮化; 也有雄蕊变为叶片状, 呈花瓣化(图 1-E)。与此同时, 保持系雄蕊顶端花药形态形成(图 1-B)。大蕾期雄蕊分化已经完成, 体积更大(图 1-C, F)。最终, 不育系不能形成正常的雄蕊, 无法产生有功能花粉。形态观察表明, 不育系雄蕊异常在花蕾发育早期就已出现。

2.2 普通烟草 B 类和 *SUPERMAN* 基因家族鉴定

MADS-box 基因中 B 类基因参与决定花瓣和雄蕊形成, *SUPERMAN* 基因是花第 3 轮和第 4 轮边界基因, 花瓣化或雌蕊化细胞质雄性不育中发现这些基

因表达异常^[2,13]。烟草中共鉴定出 160 个 *MADS-box* 基因(附表 1), 这些基因中有 4 个 *PI* 基因(*NitMADS22*、*NitMADS23*、*NitMADS105*、*NitMADS115*), 3 个 *AP3* 基因(*NitMADS72*、*NitMADS100*、*NitMADS152*), 共 7 个 B 类基因。烟草中共鉴定出 5 个 *SUPERMAN* 基因 *NitSUP1*、*NitSUP2*、*NitSUP3*、*NitSUP4*、*NitSUP5* (表 2)。

2.3 烟草 *MADS-box* 基因和 *SUPERMAN* 基因染色体定位

根据烟草染色体定位信息, 烟草 160 个 *MADS-box* 基因中 79 个在染色体上具有明确的定位(图 2)。这些 *MADS-box* 基因分布于 22 条染色体上, 但不均匀, 在 4 号、15 号、17 号、19 号染色体上分布较多, 在 9 号、18 号染色体上无分布, 在 2 号、5 号、6 号、8 号、10 号染色体上仅有 1 个。此外, 19 号染色体上存在 *MADS-box* 基因簇。7 个 B 类基因中 4 个定位在染色体上, 其中 *PI* 基因 *NitMADS105* 定位在 1 号染色体上, *NitMADS22* 定位在 22 号染色体上, *NitMADS23* 定位在 23 号染色体上, *AP3* 基因 *NitMADS72* 定位在 17 号染色体上。5 个 *SUPERMAN* 基因中只有 3 个定位在染色体上, 其中 *NitSUP1* 定位在 8 号染色体上, *NitSUP2* 定位在 19 号染色体上, *NitSUP3* 定位在 14 号染色体上。基因簇分布说明该区段基因发生了串联重复。

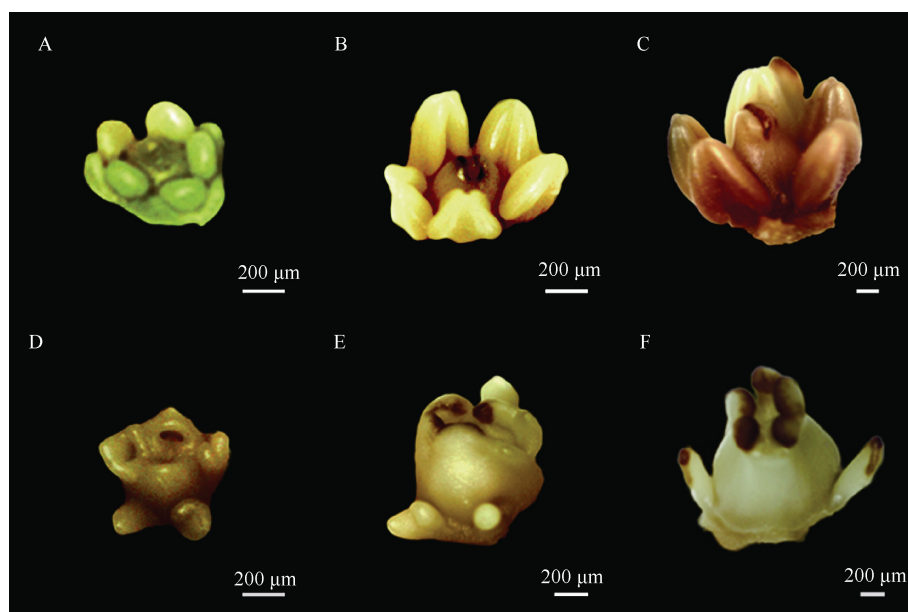


图 1 细胞质雄性不育系 K326 及保持系不同花蕾期雄蕊形态

Fig. 1 Morphological observation of stamen in CMS line K326 and its maintainer line at different bud stages

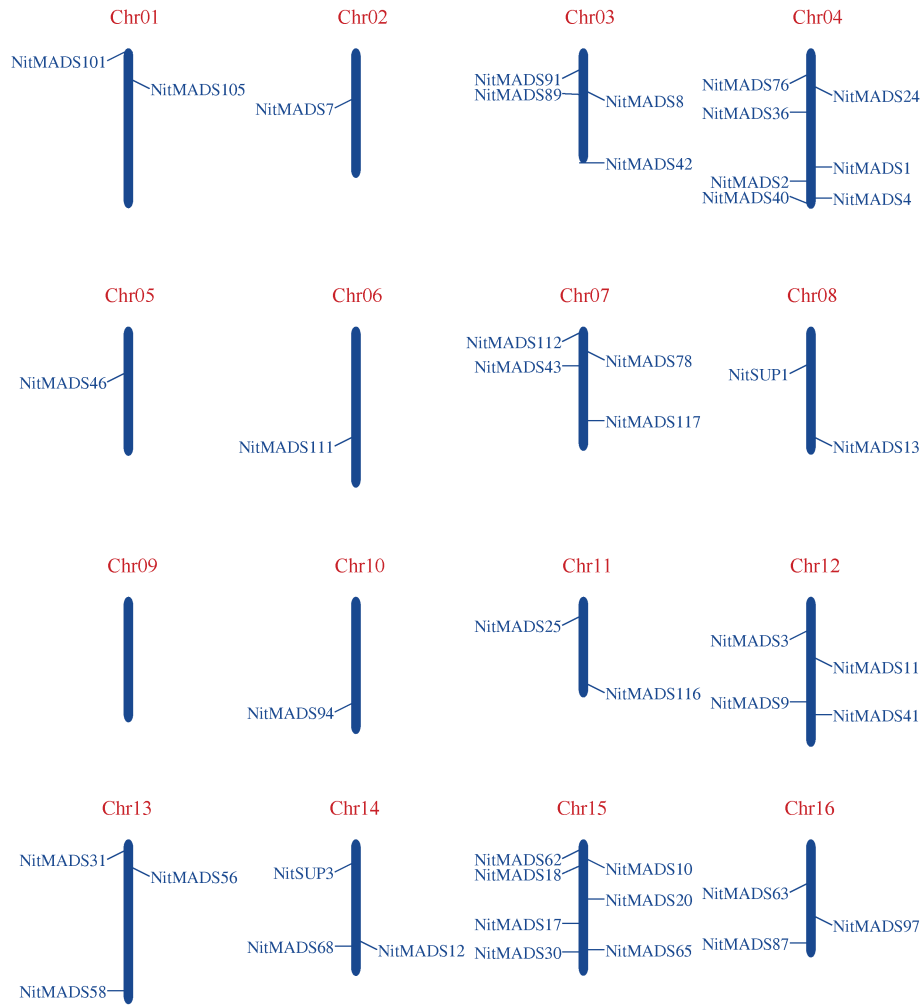
A: 保持系小蕾期; B: 保持系中蕾期; C: 保持系大蕾期; D: 不育系小蕾期; E: 不育系中蕾期; F: 不育系大蕾期。

A: maintainer line buds at small bud stage; B: maintainer line buds at mid-size bud stage; C: maintainer line buds at big bud stage; D: CMS line buds at small bud stage; E: CMS line buds at mid-size bud stage; F: CMS line buds at big bud stage.

表 2 烟草 B 类 *MADS-box* 基因和 *SUPERMAN* 基因

Table 2 *MADS-box* and *SUPERMAN* genes of *Nicotiana tabacum*

基因 Gene name	转录本 Transcript	蛋白长度 Protein length (aa)	TAIR10_描述 TAIR10_description
<i>NitMADS22</i>	Nitab4.5_0000418g0050.1	212	<i>PI</i>
<i>NitMADS23</i>	Nitab4.5_0000508g0030.1	209	<i>PI</i>
<i>NitMADS72</i>	Nitab4.5_0002266g0050.1	118	<i>AP3</i> , ATAP3 K-box region and <i>MADS-box</i> family protein
<i>NitMADS100</i>	Nitab4.5_0004086g0040.1	237	<i>AP3</i> , ATAP3 K-box region and <i>MADS-box</i> family protein
<i>NitMADS105</i>	Nitab4.5_0004346g0030.1	209	<i>PI</i>
<i>NitMADS115</i>	Nitab4.5_0005166g0020.1	212	<i>PI</i>
<i>NitMADS152</i>	Nitab4.5_0014584g0010.1	270	<i>AP3</i> , ATAP3 K-box region and <i>MADS-box</i> family protein
<i>NitSUP1</i>	Nitab4.5_0003721g0010.1	183	<i>SUPERMAN</i>
<i>NitSUP2</i>	Nitab4.5_0000086g0190.1	174	<i>SUPERMAN</i>
<i>NitSUP3</i>	Nitab4.5_0000342g0280.1	234	<i>SUPERMAN</i>
<i>NitSUP4</i>	Nitab4.5_0009537g0030.1	227	<i>SUPERMAN</i>
<i>NitSUP5</i>	Nitab4.5_0011666g0020.1	175	<i>SUPERMAN</i>



(图 2)

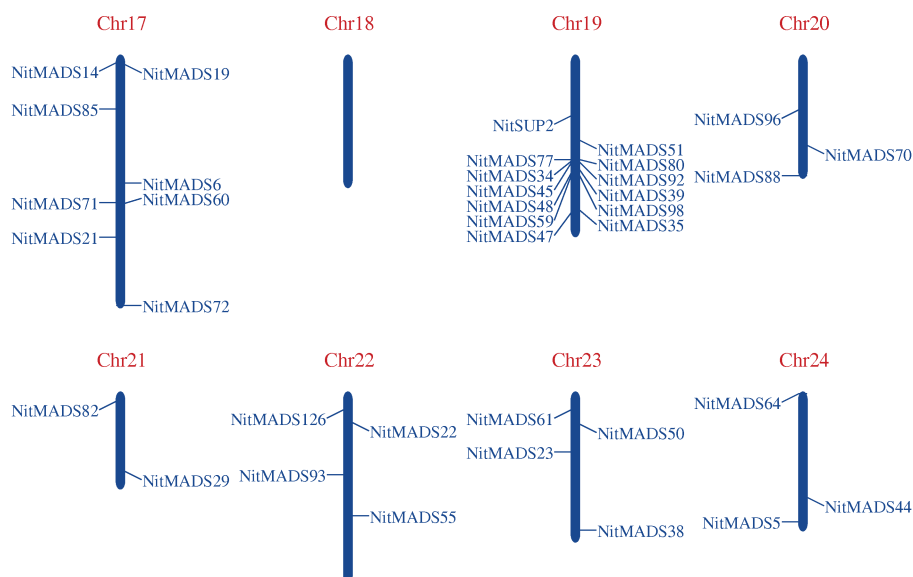


图 2 烟草 *MADS-box* 和 *SUPERMAN* 基因染色体定位

Fig. 2 Chromosomal locations of *MADS-box* and *SUPERMAN* genes in tobacco

2.4 共线性分析

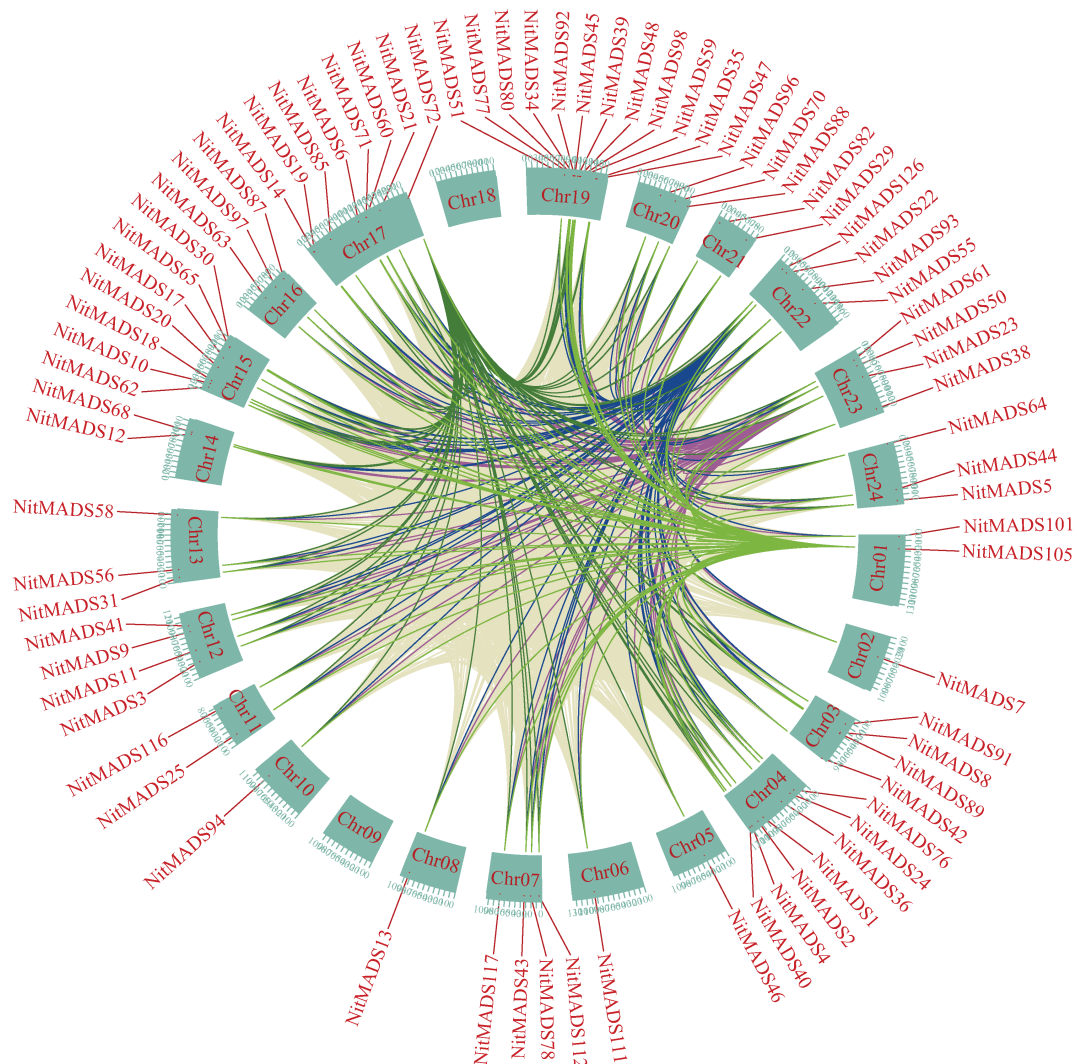
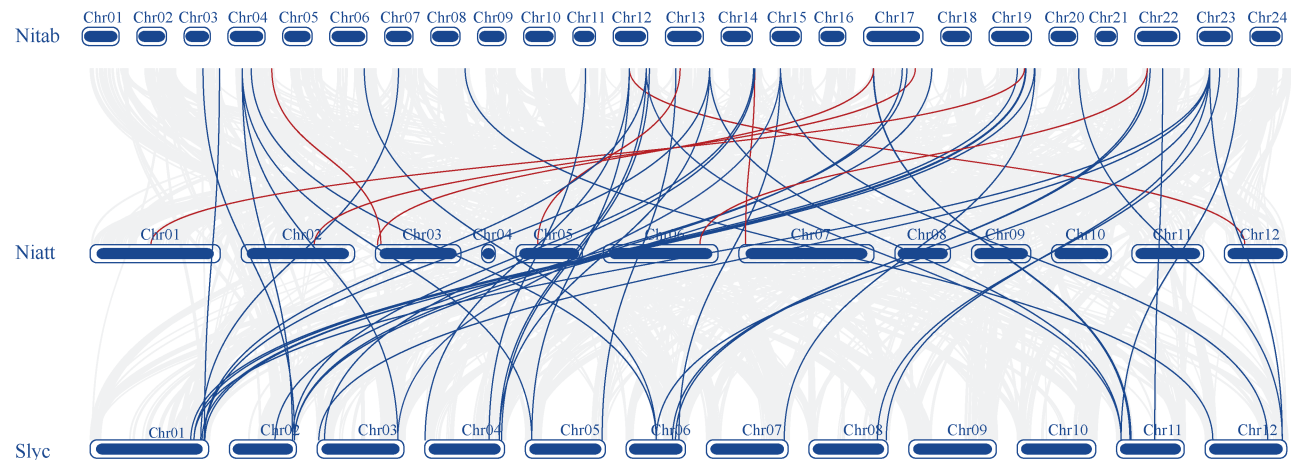
在进化过程中, 串联和片段 DNA 重复驱动基因家族扩张, 进而推动基因组进化。共线性分析表明, 所有烟草 *MADS-box* 基因之间具有较高的共线性, 表明 *MADS-box* 基因所在片段在进化过程中发生了较多的重复 (图 3), 说明片段重复可能是烟草 *MADS-box* 基因家族扩张的驱动力。

烟草属中只有普通烟草 (*N. tabacum*)、渐狭叶烟草 (*N. attenuata*) 进行了基因组测序。普通烟草是四倍体, 渐狭叶烟草是二倍体, 为了深入认识 *MADS-box* 基因的进化关系, 以茄科研究得较为深入的番茄 (*S. lycopersicum*) 作为外类群, 进行了比较分析了它们 *MADS-box* 基因间的共线性关系 (图 4)。它们的物种间共线性分析表明, 普通烟草与渐狭叶烟草间有 8 个 *MADS-box* 基因存在共线。渐狭叶烟草 3 号染色体上的 1 个基因, 在普通烟草染色体上有 2 个共线基因。普通烟草和番茄间有 45 个 *MADS-box* 基因存在共线。烟草 4 号、13 号、15 号、23 号染色体有 5 个基因分别在番茄上有 3 个共线基因, 12 号、17 号、19 号、22 号染色体上有 6 个基因在番茄上分别有 2 个共线基因。番茄 1 号、2 号、4 号、6 号、11 号的 7 个基因分别在普通烟草染色体上有 3 个共线基因, 此外, 番茄 3 号、5 号、12 号染色体上还有 3 个基因分别在普通烟草染色体上有 2 个共线基因, 这说明烟草基因组在进化过程中发生了大量易位、重复。大多数番茄基因在烟草上有 2 个以上共线基因, 反映了烟草基因组在进化过程中也发生了倍加作用。

SUPERMAN 共线性分析表明, 烟草 3 个基因和渐狭叶烟草间只有 1 个共线基因, 与番茄有 8 个基因共线 (图 5)。烟草上 1 个基因与番茄有 2 个共线基因, 2 个基因在番茄上有 3 条共线基因, 番茄上的只有 7 个 *SUPERMAN* 基因与烟草中有 2 个以上共线, 这进一步说明烟草基因组在进化过程中发生过易位、重复和倍加。

2.5 烟草 B 类基因和 *SUPERMAN* 基因顺式作用元件

为了解烟草 B 类基因和 *SUPERMAN* 基因不同成员在细胞质雄性系 K326 和保持系中的差异表达调控, 分析了它们的顺式作用元件。顺式作用元件一般分光响应、胁迫响应、激素响应元件, 在花发育过程中, 激素起着重要作用, 因此在分析上述基因顺式作用元件时, 重点分析了激素响应元件。PI 基因 *NitMADS115* 顺式作用元件 22 个, 激素响应元件有 5 个: AuxRE、CGTCA-motif、ERE、TGA-element、TGACG-motif; PI 基因 *NitMADS22*、*NitMADS23*、*NitMADS105* 共同顺式作用元件 13 个, 激素响应元件有 3 个: ABRE、ERE、TGACG-motif。AP3 基因 *NitMADS72*、*NitMADS100* 共同顺式作用元件 16 个, 与激素响应元件有 4 个: ABRE、CGTCA-motif、TGACG-motif、TCA (表 3); PI 基因 *NitMADS115* 与其他 3 个 PI 基因不同的是有生长素响应元件 AuxRR, 缺少脱落酸响应元件 ABRE; 与 2 个 AP3 基因相比, 有生长素响应元件 AuxRR 和乙烯响应元件 ERE, 缺少脱落酸响应元件 ABRE。 *NitMADS72*、*NitMADS100*

图 3 烟草 *MADS-box* 基因共线性分析Fig. 3 Collinearity graph of tobacco *MADS-box* genomes图 4 普通烟草、渐狭叶烟草和番茄物种间 *MADS-box* 共线性分析Fig. 1 Collinearity of species within *MADS-box* genes in *N. tabacum*, *N. attenuata*, and *S. lycopersicum*

Nitab: 普通烟草; Niatt: 渐狭叶烟草; Slyc: 番茄。红色连线表示普通烟草和渐狭叶烟草 *MADS-box* 基因间的共线性; 蓝色连线表示普通烟草和番茄 *MADS-box* 基因间的共线性。

Nitab: *N. tabacum*; Niatt: *N. attenuata*; Slyc: *S. lycopersicum*. The red line indicates collinearity between *MADS-box* genes of *N. tabacum* and *N. attenuata*. The blue line indicates collinearity between *MADS-box* genes of *N. tabacum* and *S. lycopersicum*.

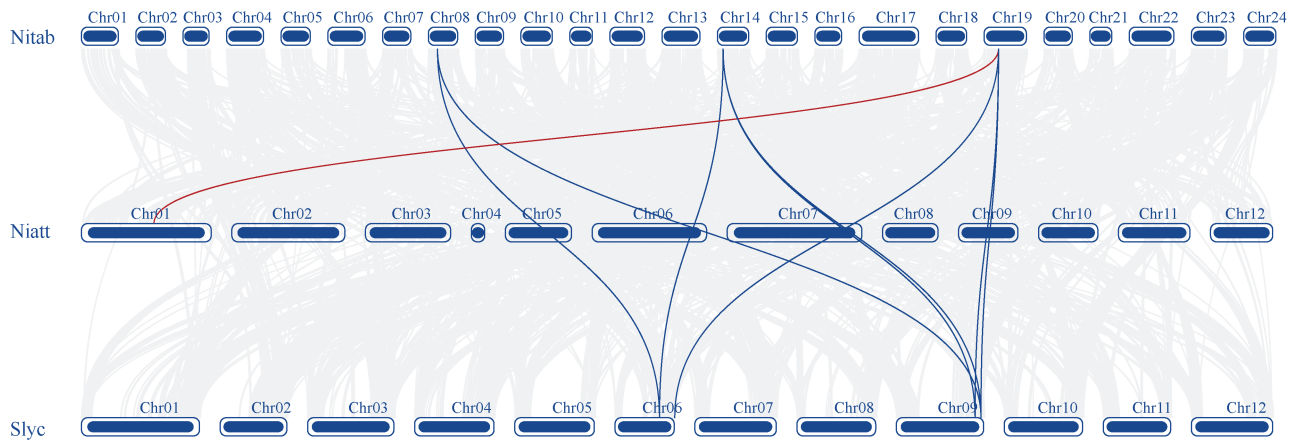


图 5 普通烟草、渐狭叶烟草和番茄物种间 *SUPERMAN* 基因共线

Fig. 5 Collinearity of species within *SUPERMAN* genes in *N. tabacum*, *N. attenuata*, and *S. lycopersicum*

Nitab: 普通烟草; Niatt: 渐狭叶烟草; Slyc: 番茄。红色连线表示普通烟草和渐狭叶烟草 *SUPERMAN* 基因间的共线性; 蓝色连线表示普通烟草和番茄 *SUPERMAN* 基因间的共线性。

Nitab: *N. tabacum*; Niatt: *N. attenuata*; Slyc: *S. lycopersicum*. The red line indicates collinearity between *SUPERMAN* genes of *N. tabacum* and *N. attenuata*. The blue line indicates collinearity between *SUPERMAN* genes of *N. tabacum* and *S. lycopersicum*.

表 3 烟草 *MADS-box* 基因的顺式作用元件

Table 3 Cis-acting element of *MADS-box* genes in tobacco

基因 Gene name	脱落酸响应元件 ABRE	生长素响应元件 AuxRR-core	茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif	乙烯响应元件 ERE	水杨酸响应元件 TCA-element	茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif
<i>NitMADS115</i>	0	1	1	3	1	1
<i>NitMADS72</i>	2	0	4	0	2	4
<i>NitMADS100</i>	3	0	1	0	1	1
<i>NitMADS22</i>	3	0	2	1	0	2
<i>NitMADS23</i>	1	0	0	4	1	3
<i>NitMADS105</i>	2	0	3	1	1	3

ABRE: abscisic acid response element; AuxRR-core: auxin response element; CGTCA-motif: methyl jasmonate response element; ERE: ethylene response element; TCA-element: salicylic acid response element; TGACG-motif: methyl jasmonate response element.

与其他B类基因相比, 缺少乙烯响应元件ERE。B类基因中只有*NitMADS115*表具有生长素响应元件AuxRR, 说明它可能受生长素调控。

*SUPERMAN*基因与激素相关顺式作用元件共有7个(表4), 但共同的作用元件只有1个, 为脱落酸响

应元件ABRE, 这说明*SUPERMAN*基因可能受脱落酸调控。

2.6 烟草 B 类基因和 *SUPERMAN* 基因表达分析

为了解细胞质同源异型雄性不育中B类基因表达, 在小蕾、中蕾、大蕾期通过qPCR技术对细胞质

表 4 烟草 *SUPERMAN* 基因的顺式作用元件

Table 4 Cis-acting element of *SUPERMAN* genes in tobacco

基因 Gene	脱落酸响应 元件 ABRE	茉莉酸甲酯响应 元件 CGTCA-motif	乙烯响应 元件 ERE	赤霉素响应 元件 TATC-box	水杨酸响应 元件 TCA-element	生长素响应 元件 TGA-element	茉莉酸甲酯响应 元件 TGACG-motif
<i>NitSUP1</i>	1	3	0	1	0	0	2
<i>NitSUP2</i>	1	0	0	0	1	3	0
<i>NitSUP3</i>	2	2	0	1	6	0	2
<i>NitSUP4</i>	2	3	3	0	3	1	3
<i>NitSUP5</i>	2	1	0	0	1	0	1

ABRE: abscisic acid response element; CGTCA-motif: methyl jasmonate response element; ERE: ethylene response element; TATC-box: gibberellin response element; TCA-element: salicylic acid response element; TGA-element: auxin response element; TGACG-motif: methyl jasmonate response element.

雄性不育系K326及其保持系花蕾检测了全基因组扫描到的7个B类基因表达(图6)。这表明,在花器官发生后,花器官分化过程中仍需要B类基因表达。B类基因成员表达在不育系和保持系花蕾不同发育时期表达存在不同,这可能与它们在花发育过程中有不同功能有关。从小蕾、中蕾、大蕾期3个时期来看,7个B类基因表达趋势分为3类:小蕾、中蕾、大蕾期保持系中表达高于不育系(*NitMADS115*);小蕾、大

蕾期保持系中表达高于不育系,中蕾期则相反(*NitMADS22*、*NitMADS23*、*NitMADS105*、*NitMADS152*);小蕾、中蕾、大蕾期保持系中表达低于不育系(*NitMADS72*、*NitMADS100*)。虽然B类基因成员在不育系和保持系中检测到表达有差异,但只有AP3基因*NitMADS72*、*NitMADS100*基因在不育系和保持系中表达差异达到显著水平,暗示这2个基因在花器官发生后分化过程中重要作用相对比较重要。

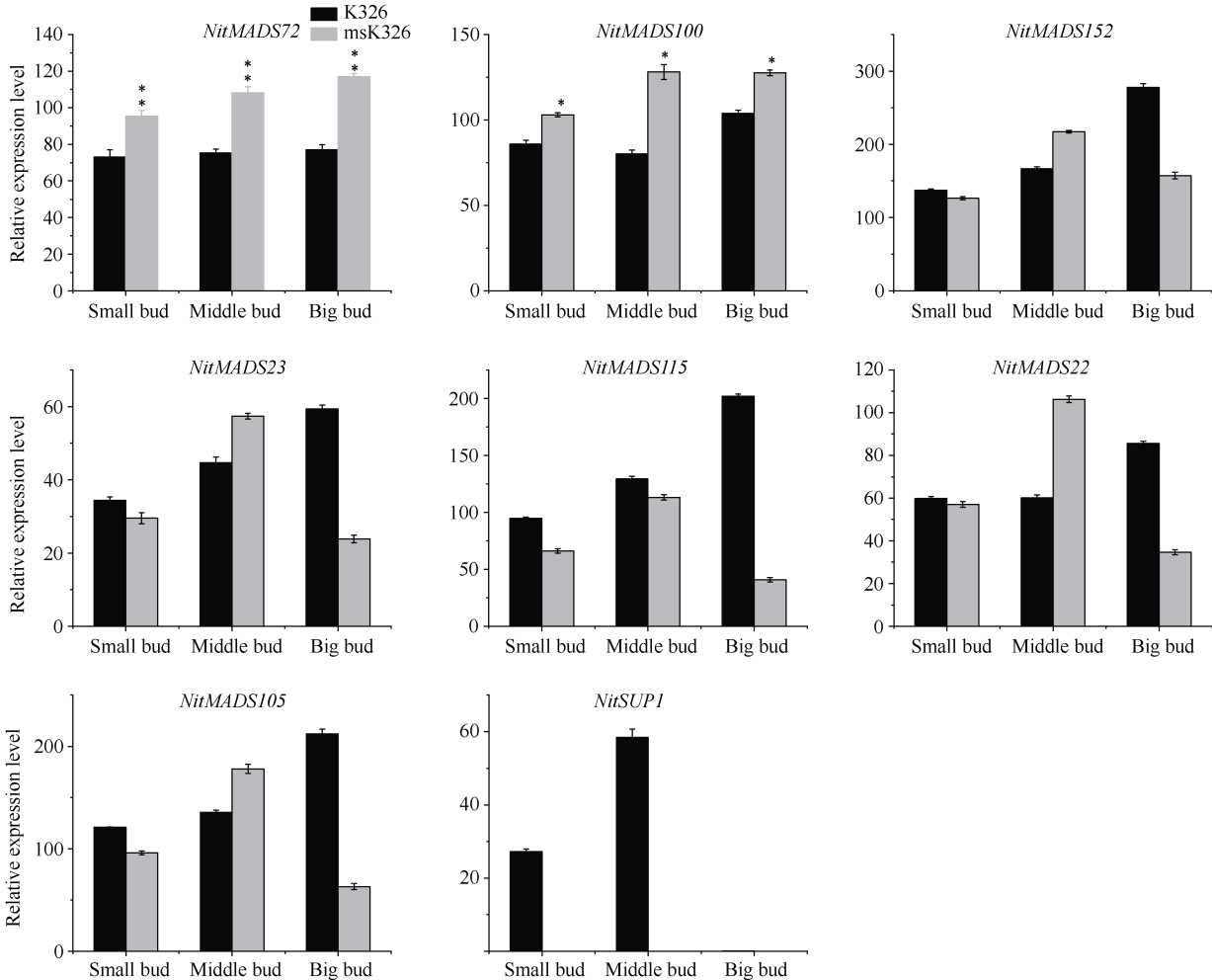


图 6 烟草不同花发育时期 B 类基因和 *SUPERMAN* 表达

Fig. 6 Relative expression profile of B genes and *SUPERMAN* in tobacco at different flower development stages

K326: 保持系 K326; msK326: 不育系 K326。误差线表示 $n = 3$ 的标准误。所有数据均为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。**在 $P = 0.01$ 水平差异显著, *在 $P = 0.05$ 水平差异显著。

K326: maintainer K326; msK326: CMS K326. Error bar represents the SD ($n = 3$). All data are means $\pm$ SDs ($n = 3$). **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

对全基因组扫描到的6个*SUPERMAN*基因进行了qPCR检测,只检测到一个基因表达(*NitSUP15*),小蕾、中蕾期在保持系K326中可以检测到,而所有时期中不育系中无表达。这可能是在花分化早期*SUPERMAN*基因有着比较重要的作用,不育系雄蕊异常与花发育早期*SUPERMAN*基因表达异常有关。大蕾期花分化已完成,就不再需要。细胞质雄性不

育系花器官第3轮雄蕊和第4轮雌蕊之间边界消失与*SUPERMAN*基因花分化期异常表达有关。

3 讨论

在植物发育过程中,细胞活动的精确调控对于正常器官形成至关重要,植物器官畸形与其细胞活动失调有关^[23]。在细胞质雄性不育中,无论雄蕊退

化、雄蕊心皮化还是雄蕊花瓣化等雄蕊异常, 其在花器官中的轮次位置并未改变。雄蕊异常与花器官决定基因有关, 上述情况表明, 花器官决定基因可以改变花器官特性, 但对花器官发生并不能产生影响。细胞质雄性不育中雄蕊异常是分化过程中相应花器官决定基因表达受到了干扰的结果^[14]。

细胞质雄性不育中雄蕊异常发生在花蕾形成早期, 表明其花器官发生受到了扰动。*sup* 突变体研究表明, 雄蕊异常并非是雌雄蕊相互转化, 而是第 4 轮干细胞的过度增殖^[16]。这表明在细胞质雄性不育花器官发生过程中雄蕊原基干细胞活动没有正确启动, 花器官分化过程中雌蕊原基干细胞活动没有正确结束。

鉴于生长素在花分生组织形成中起着中心作用^[24], *SUPERMAN* 基因也是通过调控生长素的合成来控制第 3 轮和第 4 轮边界^[17], 因此, 生长素可能在雄蕊异常细胞质雄性不育中扮演重要作用。至于生长素如何受细胞质调控仍需进一步研究。

我们的研究表明, 烟草细胞质雄性不育系 K326, 雄蕊不仅有心皮化现象, 而且同时有雄蕊花瓣化现象, 雄蕊基部也融合成了一体, qPCR 检测表明, B 类基因在保持系和不育系表现出差异表达, 研究结果与前人一致。

SUPERMAN 基因只在保持系 K326 小蕾期和中蕾期能检测到, 而在不育系 K326 所有时期都无法检测到, 可能该基因在雄蕊原基发生及雄蕊分化中起重要作用, 而不单单是个边界基因。鉴于该基因是通过调控生长素的合成来发挥作用, 支持生长素在细胞质逆行调控细胞核中起作用的猜测。*PI* 基因 *NitMADS115*, 其启动子上游顺式作用元件中, 含有生长素响应元件 *AuxRR*, 在不育系各个发育时期表达下调也与不育系早期花分生组织中可能出现了生长素异常一致。不育系 K326 不仅有雄蕊心皮化现象而且同时有雄蕊花瓣化现象, 这与参与花第 1 轮和第 2 轮决定基因 *AG* 是 *SUPERMAN* 基因的正调控因子研究是相符的^[25]。此外, *AG* 不仅是花器官决定基因, 同时也是花干细胞终止的重要基因^[25]。这从另一方面也说明了细胞质雄性不育中生长素可能的作用。大蕾期 *SUPERMAN* 基因在保持系花蕾中检测不到, 可能与雄蕊分化结束, 其作用已经完成有关。

AP3 基因 *NitMADS72*、*NitMADS100* 在不育系中表达上调, 达到显著水平, 可能与它们在雄蕊分化中的作用有关, 也说明它们受核质互作影响较大。

4 结论

细胞质雄性不育中雄蕊异常发生在花器官发育早期, B 类基因和 *SUPERMAN* 基因表达也出现异常, 表明核质互作不仅影响到了花器官发生, 而且也影响到了花第 2 轮和第 3 轮器官决定基因表达调控。鉴于生长素在花发育中的作用, 它可能在细胞质逆行调控细胞核中起重要作用。

附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.chinacrops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- [1] Crosatti C, Quansah L, Maré C, Giusti L, Roncaglia E, Atienza S G, Cattivelli L, Fait A. Cytoplasmic genome substitution in wheat affects the nuclear-cytoplasmic cross-talk leading to transcript and metabolite alterations. *BMC Genomics*, 2013, 10: 868.
- [2] Kang L, Li P, Wang A, Ge X, Li Z. A novel cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* (inap CMS) with carpelloid stamens via protoplast fusion with Chinese Woad. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 529.
- [3] Yang H, Xue Y, Li B, Lin Y, Li H, Guo Z, Li W, Fu Z, Ding D, Tang J. The chimeric gene *atp6c* confers cytoplasmic male sterility in maize by impairing the assembly of the mitochondrial ATP synthase complex. *Mol Plant*, 2022, 15: 872–886.
- [4] Xiao S, Zang J, Pei Y, Liu J, Liu J, Song W, Shi Z, Su A, Zhao J, Chen H. Activation of mitochondrial *orf355* gene expression by a nuclear-encoded DREB transcription factor causes cytoplasmic male sterility in maize. *Mol Plant*, 2020, 13: 1270–1283.
- [5] Takatsuka A, Kazama T, Arimura S I, Toriyama K. TALEN-mediated depletion of the mitochondrial gene *orf312* proves that it is a Tadukan-type cytoplasmic male sterility-causative gene in rice. *Plant J*, 2022, 110: 994–1004.
- [6] Kuwabara K, Arimura S I, Shirasawa K, Ariizumi T. *Orf137* triggers cytoplasmic male sterility in tomato. *Plant Physiol*, 2022, 189: 465–468.
- [7] Yamagishi H, Jikuya M, Okushiro K, Hashimoto A, Fukunaga A, Takenaka M, Terachi T. A single nucleotide substitution in the coding region of Ogura male sterile gene, *orf138*, determines effectiveness of a fertility restorer gene, *Rfo*, in radish. *Mol Genet Genomics*, 2021, 296: 705–717.
- [8] Wen J F, Zhao K, Lyu J H, Huo J L, Wang Z R, Wan H J, Zhu H S, Zhang Z Q, Shao G F, Wang J, Zhang S, Yang T Y, Zhang J R, Zou X X, Deng M H. *Orf165* is associated with cytoplasmic male sterility in pepper. *Genet Mol Biol*, 2021, 44: e20210030.
- [9] Zhu Y, Saraike T, Yamamoto Y, Hagita H, Takumi S, Murai K. *Orf260cra*, a novel mitochondrial gene, is associated with the homeotic transformation of stamens into pistil-like structures (pistillody) in alloplasmic wheat. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 1723–1733.
- [10] Wang R, Cai X, Hu S, Li Y, Fan Y, Tan S, Liu Q, Zhou W.

- Comparative analysis of the mitochondrial genomes of *Nicotiana tabacum*: hints toward the key factors closely related to the cytoplasmic male sterility mechanism. *Front Genet*, 2020, 11: 257.
- [11] Chase C D. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends Genet*, 2007, 23: 81–90.
- [12] Chen L, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 579–606.
- [13] Zubko M K. Mitochondrial tuning fork in nuclear homeotic functions. *Trends Plant Sci*, 2004, 9: 61–64.
- [14] Teixeira R T, Farbos I, Glimelius K. Expression levels of meristem identity and homeotic genes are modified by nuclear-mitochondrial interactions in alloplasmic male-sterile lines of *Brassica napus*. *Plant J*, 2005, 42: 731–742.
- [15] Bereterbide A, Hernould M, Farbos I, Glimelius K, Mouras A. Restoration of stamen development and production of functional pollen in an alloplasmic CMS tobacco line by ectopic expression of the *Arabidopsis thaliana* *SUPERMAN* gene. *Plant J*, 2002, 29: 607–615.
- [16] Prunet N, Yang W, Das P, Meyerowitz E M, Jack T P. *SUPERMAN* prevents class B gene expression and promotes stem cell termination in the fourth whorl of *Arabidopsis thaliana* flowers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 7166–7171.
- [17] Xu Y, Prunet N, Gan E S, Wang Y, Stewart D, Wellmer F, Huang J, Yamaguchi N, Tatsumi Y, Kojima M, Kiba T, Sakakibara H, Jack T P, Meyerowitz E M. *SUPERMAN* regulates floral whorl boundaries through control of auxin biosynthesis. *EMBO J*, 2018, 37: e97499.
- [18] Nandi A K, Kushalappa K, Prasad K, Vijayraghavan U. A conserved function for *Arabidopsis* *SUPERMAN* in regulating floral-whorl cell proliferation in rice, a monocotyledonous plant. *Curr Biol*, 2000, 10: 215–218.
- [19] Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire M K, Geer R C, Gonzales N R, Gwadz M, Hurwitz D I, Marchler G H, Song J S, Thanki N, Yamashita R A, Yang M, Zhang D, Zheng C, Lanczycki C J, Marchler-Bauer A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: D265–D268.
- [20] Chao J T, Li Z Y, Sun Y H, Aluko O O, Wu X R, Wang Q, Liu G S. MG2C: a user-friendly online tool for drawing genetic maps. *Mol Horticulture*, 2021, 1: 16.
- [21] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13: 1194–1202.
- [22] Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 325–327.
- [23] Meyerowitz E M. Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell*, 1997, 88: 299–308.
- [24] Zhang K, Zhang H, Pan Y, Niu Y, Guo L, Ma Y, Tian S, Wei J, Wang C, Yang X, Fu Y, Qu P, Liu L, Zhang Y, Sun H, Bai Z, Dong J, Li C, Liu X. Cell- and noncell-autonomous *AUXIN RESPONSE FACTOR3* controls meristem proliferation and phyllotactic patterns. *Plant Physiol*, 2022, 190: 2335–2349.
- [25] Uemura A, Yamaguchi N, Xu Y, Wee W, Ichihashi Y, Suzuki T, Shibata A, Shirasu K. Regulation of floral meristem activity through the interaction of *AGAMOUS*, *SUPERMAN*, and *CLAVATA3* in *Arabidopsis*. *Plant Reprod*, 2018, 31: 89–105.