作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2021, 47(8): 1417–1426 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.01071

小麦 *lncRNA27195* 及其靶基因 *TaRTS* 克隆及表达分析

王 娜[1,2,**] 白建芳[2,**] 马有志[1] 郭昊宇[2] 王永波[2] 陈兆波[2]
赵昌平[2,*] 张立平[2,*]

[1] 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100087; [2] 北京市农林科学院北京杂交小麦工程技术研究中心 / 杂交小麦分子遗传北京市重点实验室, 北京 100097

摘 要: 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)是一种大于 200 bp 的非编码 RNA, 大量存在于植物体中, 其可通过调节基因表达或蛋白功能, 在植物生长发育与胁迫应答中发挥重要作用。前期在研究光照和温度对小麦光温敏核雄性不育系 BS366 育性诱导中, 利用转录组测序筛选获得与育性相关的 lncRNA (*lncRNA2719*)。为研究小麦 *lncRNA27195* 的功能, 本研究在 BS366 中克隆 *lncRNA27195* 及其靶基因 *TaRTS*, 并对 *TaRTS* 进行生物信息学分析, 结果显示, *TaRTS* 基因全长 315 bp, 编码 104 个氨基酸, 且发现该 RTS 蛋白仅存在于禾本科植物中。通过实时荧光定量 PCR, 对 *lncRNA27195* 及 *TaRTS* 基因在不同组织不同光温处理及茉莉酸甲酯处理下进行表达模式分析, 发现 *lncRNA27195* 和 *TaRTS* 均在雄蕊中高表达, 呈显著的正相关, 且两者在不同光温条件下呈现出不同的表达模式。光照和温度均对 *lncRNA27195* 和 *TaRTS* 有调控作用, 适当浓度的 MeJA 促进两者的表达, SA 抑制两者表达。以上结果表明, 在光周期、温度和植物激素的诱导下, *lncRNA27195* 正向调节 *TaRTS* 基因表达, 进而影响花粉育性, 本研究结果有助于促进对小麦光温敏核型雄性不育系的机理研究和生产应用。

关键词: lncRNA; RTS 蛋白; 花药; 雄性不育

Cloning and expression analysis of *lncRNA27195* and its target gene *TaRTS* in wheat (*Triticum aestivum* L.)

WANG Na[1,2,**], BAI Jian-Fang[2,**], MA You-Zhi[1], GUO Hao-Yu[2], WANG Yong-Bo[2], CHEN Zhao-Bo[2], ZHAO Chang-Ping[2,*], and ZHANG Ling-Ping[2,*]

[1] Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100087, China; [2] Beijing Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences / Municipal Key Laboratory of the Molecular Genetics of Hybrid Wheat, Beijing 100097, China

Abstract: Long non-coding RNA (lncRNA) is a non-coding RNA length over 200 bp, which is abundant in plants. It plays important roles in plant growth, development, and stress response by regulating gene expression or protein function. In the previous study, a fertility-related lncRNA named *lncRNA27195* was screened and obtained by transcriptome sequencing from the anther of wheat Photoperiod-thermo Sensitive Genic Male Sterility (PTGMS) line BS366. To investigate the function of *lncRNA27195* in wheat, the *lncRNA27195* gene and its target gene *TaRTS* were cloned from BS366. Bioinformatics analysis were performed on *TaRTS*. The expressions of *lncRNA27195* and *TaRTS* in different tissues and their expression correlation between them were analyzed by qRT-PCR. Meanwhile, the expression patterns of *lncRNA27195* and *TaRTS* under different light and temperature treatments, and methyl jasmonate (MeJA) treatments were investigated. The results showed that the *TaRTS* gene with 315 bp length,

本研究由北京市自然科学基金项目(6182014), 北京市农林科学院杰出科学家项目(JKZX201907), 北京市农林科学院青年基金(QNJJ201916), 国家自然科学基金项目(31872881)和北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20180403)资助。

The work was supported by the Natural Science Foundation of Beijing (6182014), the Outstanding Scientist Cultivation Program of BAAFS (JKZX201907), the Foundation for Youths of BAAFS (QNJJ201916), the National Natural Science Foundation of China (31872881), and the Special Project of Science and Technology Innovation Ability Construction of BAAFS (KJCX20180403).

* 通信作者(Corresponding authors): 张立平, E-mail: lpzhang8@126.com; 赵昌平, E-mail: cp_zhao@vip.sohu.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 王娜, E-mail: wangna_00@sina.com

Received (收稿日期): 2020-09-02; Accepted (接受日期): 2021-01-13; Published online (网络出版日期): 2021-02-22.
URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210222.1051.004.html

encoded 104 amino acids. Additionally, RTS proteins were only found as anther-specific proteins in gramineae plants. Both *lncRNA27195* and *TaRTS* with a significantly positive correlation were highly expressed in stamens, and revealed different expression patterns in different fertility environments. The results demonstrated that the expression of *lncRNA27195* and *TaRTS* were also regulated by light and temperature. In addition, we found that the appropriate concentration of MeJA could promote the expression of *lncRNA27195* and *TaRTS* while SA could inhibit the expression. The results indicated that under the induction of photoperiod, temperature, and plant hormones, *IncRNA27195* positively regulated *TaRTS* gene expression, resulting in affecting pollen development and male fertility. This study contributed to the mechanism research and production application of PTGMS wheat.

Keywords: lncRNA; RTS protein; anther; male sterility

长链非编码RNA (long non-cording RNA), 是指长度超过200个核苷酸的非编码RNA, 通过RNA聚合酶Ⅱ转录[1]。研究表明lncRNA可与DNA、RNA或蛋白质分子相互作用, 从而调节基因表达, 并通过多种机制发挥功能。在转录水平上, lncRNA可以招募转录因子, 调控相邻基因的表达[2-3]; 在表观遗传水平上, lncRNA可以通过影响染色质结构域调节目的基因的表达[4-5]; 在转录后水平上, lncRNA可通过与靶mRNA的互补碱基配对调控mRNA各方面的功能, 类似于微小RNA, 如microRNA和snoRNA[6]。目前, 在拟南芥[7]、小麦[8]、水稻[9-10]、玉米[11]、番茄[12]等植物体内均发现了lncRNA, 并发现他们具有重要的作用, 可调控一系列重要生物途径, 包括生长代谢、激素信号、逆境胁迫响应、生殖发育和维护基因组完整性等。在水稻中, 研究人员发现可调控光敏雄性不育水稻的lncRNA (*LDMA*), 在长日条件下高表达可保持花粉正常发育。而*LDMA*突变体中, *LDMAR*的二级结构发生改变, 导致*LDMAR*启动子区域的甲基化程度提高, 从而降低*LDMAR*转录水平, 导致长日条件下花药绒毡层细胞提早发生程序性死亡, 进而引起光敏雄性不育[9-10]。二系杂交小麦主要是通过环境条件的改变可以调控植物的雄性育性转换[13]。光温敏核雄性不育小麦既可作为雄性不育系, 也可发挥保持系的作用, 是目前杂种优势利用的主要方式, 因此小麦光温敏核雄性不育基因的挖掘和研究具有重要意义。

RTS蛋白, 是一个花药特异性蛋白, 只在绒毡层细胞中特异性表达。研究发现水稻*OsRTS*基因的下调表达会导致花粉败育, 从而引起水稻雄性不育[14]。绒毡层位于四层花药细胞的最内层, 对花粉的发育至关重要[15]。在绒毡层发育过程中绒毡细胞的程序性死亡对原染色体的形成、孢粉素的合成至关重要[16]。绒毡层结构破损会导致花粉失活, 引起雄性不育。例如, 拟南芥的*SERK1*、*SERK2*双突变体的花药缺乏绒毡层的生成, 导致小孢子母细胞无法在减数分裂后正常发育, 导致小孢子败育和雄性不育[17]。前期通过对光照和温度诱导的可育环境和不育环境的BS366光温敏核雄性不育小麦的花药进行lncRNA测序, 并对育性相关差异表达的lncRNA进行筛选。转录组结果发现*lncRNA27195*及其靶基因*TaRTS* (*TraesCS3D02G436700.1*)在可育和不育环境中表达差异较明显。因此, 本研究克隆*lncRNA27195*及其靶基因*TaRTS*, 通过对其进行生信分析、组织特异性和时空表达分析, 并分析其在不同育性条件下和非生物胁迫下的表达模式, 为进一步阐明长链非编码RNA在光温敏雄性不育小麦育性转换过程中的调控模式提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为光温敏核雄性不育系冬小麦 BS366, 由北京市农林科学院北京杂交小麦工程技术研究中心提供。BS366 表现出光温敏感性育性, 在不育环境(花粉发育阶段日平均温度 12℃, 12 h 光照/12 h 黑暗)下, 花粉失活, 结实率<5%; 在可育环境(花粉发育阶段日平均温度 20℃, 14 h 光照/10 h 黑暗)下, 花粉发育正常, 育性恢复至 40%~55%。所有植物均种植于花盆, 放置在北京的实验田, 并进行常规管理, 至四叶一心期放入人工气候箱。

1.2 试验方法

1.2.1 *lncRNA27195* 基因及 *TaRTS* 基因的克隆

各组织 RNA 提取按照 TRIzol Reagent (Invitrogen)说明书进行。RNA 经浓度和纯度鉴定后合格放置–80℃备用。利用 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。根据前期转录组学的分析结果, 根据 *lncRNA27195* 基因序列和 *TaRTS* 基因(*TraesCS3D02G436700.1*)序列利用 Primer premier 5 软件设计引物(表 1), 以 BS366 花药组织样品 cDNA 为模板克隆 *lncRNA27195* 及 *TaRTS* 基因全长。

扩增体系为: 2× Phanta Max Buffera 25 μL, dNTP Mix (10 mmol L^{-1} each) 1 μL, 上游引物(10 μmol L^{-1}) 1 μL, 下游引物(10 μmol L^{-1}) 1 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL, cDNA 2 μL, ddH_2O 19 μL。PCR 扩增程序为: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 15 s, 55℃退火 15 s, 72℃延伸 15 s; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。按照 pBackZero-T Vector Cloning Kit 说明书, 将 *lncRNA27195* 全长序列与 *TaRTS* 基因的 CDS 序列克隆至 pBackZero-T 载体上。转化大肠杆菌 DH-5α, 挑取阳性单克隆菌, 对目标片段进行测序, 并将甘油菌保存于–80℃冰箱。

表 1　引物设计
Table 1　Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′–3′)	产物大小 Product length (bp)
lncRNA27195-F	TTTAATCTTCCGAGCTCACCCA	396
lncRNA27195-R	TTTAAATGTTAAAACATGTTATATTTTTGA	
TaRTS-F	TTTAAATGGCACGCACCGGC	315
TaRTS-R	TTTAATCAGAGCCCCTGGGTGGT	
lncRNA27195-qRT-F	GCATACGCACCGCATGTATAAT	109
lncRNA27195-qRT-R	CTAGTCGCACAGGTCGACTGAA	
TaRTS-qRT-F	AGGTCGCATCGTGCCTCCT	114
TaRTS-qRT-R	CCCCTGGGTGGTGCAGT	
Actin1-F	TTGGCATCTCTCAGCACCTTC	138
Actin1-R	TCAGCCTTCGCAATCCACA	

1.2.2　*TaRTS* 基因生物信息学分析　　利用 ExPASy ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) 在线预测软件对 *TaRTS* 基因进行一级结构和理化性质分析。利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线预测软件对 *TaRTS* 基因进行二级结构预测分析。利用 SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/)在线预测软件对 *TaRTS* 基因进行三级结构预测分析。利用 Prot Scale (http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl)在线预测软件对 *TaRTS* 基因进行亲疏水性分析。利用 TargetP 1.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/index.php) 在线预测软件进行亚细胞定位的预测。利用 PlantCARE 在线预测软件 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)预测其启动子元件。利用 NCBI 网站(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)和 Ensembl Plant 网站(http://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast)进行同源基因的查找。通过 DNAMAN 软件进行多序列比对。利用 MEGA6.0 软件进行系统进化树的构建, 采用邻接法(neighbor joining method), 其中, Bootstrap 值设置为 1000, 其余均为默认参数。

1.2.3　*TaRTS* 基因亚细胞定位　　将 *TaRTS* 的 ORF 序列克隆到 *16318-GFP* 载体上, 构建 *TaRTS-GFP* 融合表达载体。将融合载体转化到新制备的小麦原生质体中, 以 *16318-GFP* 转化的小麦原生质体作为对照, 将融合载体 *TaRTS-GFP* 转化的小麦原生质体细胞在激光共聚焦显微镜(Leica, 德国)下观察绿色荧光信号在原生质体中的分布。

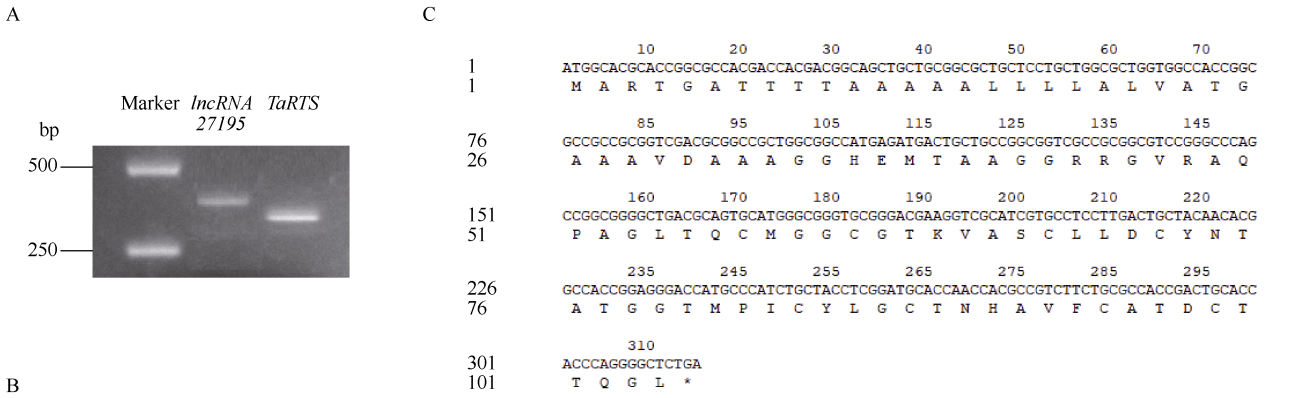
1.2.4　表达模式分析　　组织特异性分析: 在抽穗期采集 BS366 小麦的根、茎、叶、颖壳、雄蕊和雌蕊样品, 置于–80℃冰箱保存备用, 进行组织特异性表达分析。不同育性环境对基因表达模式影响分析: 在四叶期结束后(育性敏感期), 将长势良好且一致 BS366 植株分为两组, 分别在可育环境(20℃, 14 h L/10 h D; L/D 为光照/黑暗)和不育环境(12℃, 12 h L/12 h D)条件下, 相对湿度为 60%~80%的人工气候培养箱(CLC-BIV-M/CLC404-TV, MMM, 德国)中培养。根据叶龄和花药长度, 采集 BS366 在两个不同生育条件下的孢子母细胞时期(S1)、二分体时期(S2)、四分体时期(S3)和单核期(S4)的花药组织, 置于–80℃冰箱保存备用。不同光温对基因表达模式影响分析: 将育性敏感期长势良好且一致 BS366 植株分为 4 组, 分别在低温长日环境(12℃, 14 h L/10 h D)、低温短日环境环境(12℃, 12 h L/12 h D)、高温长日环境(20℃, 14 h L/10 h D)、和高温短日环境(20℃, 12 h L/12 h D)条件下中培养约 2 周, 至抽穗期, 采集花药组织, 置于–80℃冰箱保存备用。茉莉酸甲酯对基因表达模式调控分析: BS366 正常生长

20℃ (12 h L/12 h D)至抽穗期，每天喷施茉莉酸甲酯(MeJA)，浓度分别为 0、0.5、2 和 4 mmol L^{-1}，连续 5 d 后，同时用 10 mmol L^{-1} 水杨酸(SA)喷施 MeJA 处理后的小穗，采集花药组织，置于–80℃冰箱保存备用。根据 *lncRNA27195* 基因和 *TaRTS* 基因的序列设计 qPCR 引物(表 1)，以上述样品 RNA 反转录的 cDNA 为模板，以 *TaActin1* 为内参基因，在(CFX96; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)平台使用 TB Green Premix Ex *Taq* (Tli RNaseH Plus)试剂盒进行 qPCR 分析。反应体系为：TB Green-Premix Ex *Taq* (Tli RNaseH Plus) (2×) 5 μL, cDNA 1 μL，上游引物(10 μmol L^{-1}) 0.5 μL，下游引物(10 μmol L^{-1}) 0.5 μL, ddH_2O 3 μL。反应程序为：预变性 95℃5 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 45 个循环；溶解曲线分析 95℃ 15 s, 55℃ 1 min, 95℃ 15 s。数据按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量，生物学重复和技术重复均为 3 次。

2 结果与分析

2.1 *lncRNA27195* 及 *TaRTS* 基因的克隆

以 BS366 的花药 cDNA 为模板克隆 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因的 CDS 序列，电泳结果与网上公布的同序列大小基本一致，分别为 396 bp 和 315 bp (图 1)。将克隆至 pBackZero-T 载体上，转化大肠杆菌 DH5α，挑取阳性单克隆菌，并进行测序，结果同前期转录组测序结果(图 2)。




```
1    TCTTCCGAGCTCACCCAGGGGCTCTGATTCCCAATCAATCCATCCGGCTAGCGATGAACT
61   ATACATGGCCTCGAAATGTATGACATCATATGGAGTATCAACGCATACGCACCGCATGTA
121  TAATCCGTTCACCGCGCACATTCCACCCCCGGACCCTCTCACGTATGAATAAGATCGGTTG
181  TAAGTACTTCGTTTCAGTCGACCTGTGCGACTAGACACGAGCCTGTATGCTGAAGTGGTG
241  AATATACACAGCTTGCTACTATATATATGCTTACATAATAATGATTCCGTCCCACTCTCT
301  GTTTATGTGGTTCTAACTTCAAATAACCAGATATATGATGGAACAGCGAGAGAATGTAGT
361  ACTGCCTCGGTTCAAAAATATAACATGTTTTAACAT
```

图 1 *lncRNA27195* 基因和 *TaRTS* 基因扩增片段(A)和序列(B, C)

Fig. 1 Amplified fragment of *lncRNA27195* and *TaRTS* (A) and sequence of *lncRNA27195* (B), and *TaRTS* (C)

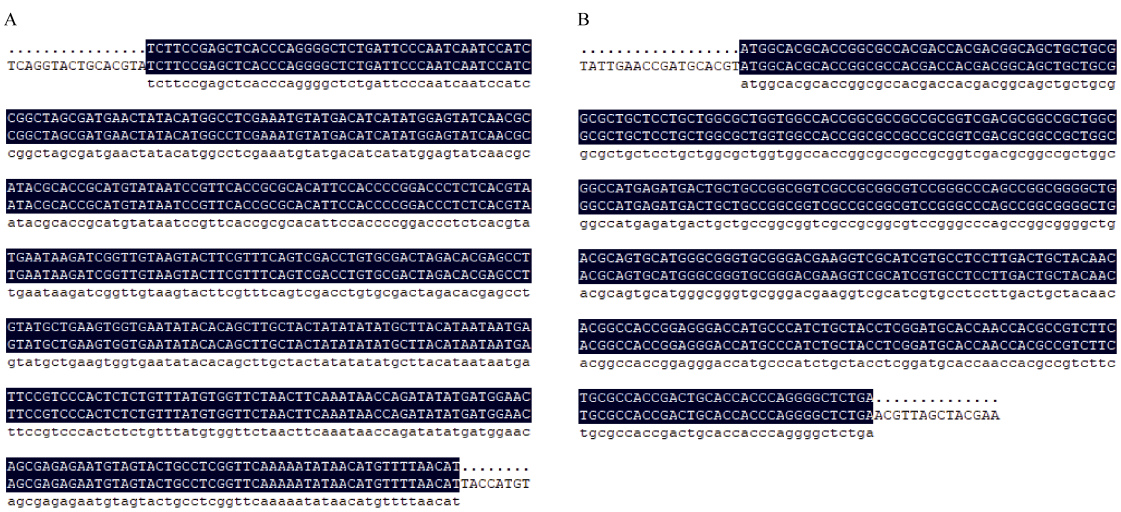


图 2 *lncRNA27195* 基因(A)和 *TaRTS* 基因(B)序列比对

Fig. 2 Comparison of the prokaryotic expression sequence of *lncRNA27195* (A) and *TaRTS* (B)

2.2　*TaRTS* 基因的蛋白质结构分析

小麦的 *TaRTS* 基因位于 3D 染色体上, CDS 序列长 315 bp, 编码 104 个氨基酸。通过 Ensambl 搜索比对, 发现其在 3A 和 3B 上存在等位基因 *TraesCS3A02G444400.1* 和 *TraesCS3B02G477900.1*。TaRTS 蛋白分子量为 10.08 kD; 等电点为 7.54, 为碱性蛋白质; 共 1389 个原子; 半衰期为 30 h; 不稳定指数为 30.16, 为稳定蛋白; 脂肪族指数为 77.31; 总平均疏水指数(grand average of hydropathicity)为 0.497; 有 4 个带负电荷的氨基酸残基, 包括 3 个天冬氨酸(Asp)和 1 个谷氨酸(Glu), 有 5 个带正电荷的氨基酸残基, 包括 4 个精氨酸(Arg)和 1 个赖氨酸(Lys)。利用 Prot Scale 在线软件测得 TaRTS 蛋白的氨基酸残基整体为疏水性, 同理化性质分析一致, 推测为疏水性蛋白(图 3-A)。蛋白二级结构分析显示, 该蛋白由 41 个 α-螺旋(39.42%)、12 个延伸链(11.25%)、9 个 β-转角(8.65%)和 42 个无规则卷曲(40.38%)组成(图 3-B)。蛋白三级结构结果显示主要结构为 α-螺旋(图 3-C)。亚细胞定位预测结果显示 TaRTS 蛋白为分泌蛋白。此外, 小麦原生质体亚细胞定位显示, 绿色荧光蛋白 GFP 在小麦原生质体中瞬时高效表达, 表明 TaRTS 蛋白定位于原生质体的细胞质部分, 符合预测结果(图 4)。

2.3　*TaRTS* 基因编码蛋白的系统发育分析

研究结果显示仅在水稻(*Oryza sativa japonica* Group)、粟(*Setaria italica*)、山羊草(*Aegilops tauschii*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、哈氏黍(*Panicum hallii*)和狗尾草(*Setaria viridis*)这些禾本科植物中发现同源基因, 表明 *RTS* 基因家族是一种禾本科特有基因。多序列比对结果显示, *RTS* 基因家族的保守性较差, 但具有保守的半胱氨酸位点(图 5-A)。利用 MEGA 6.0 软件用邻接法构建系统进化树, 显示 *TaRTS* 基因与二穗短柄草的同源性较高, 同粟、狗尾草同源性较低(图 5-B)。

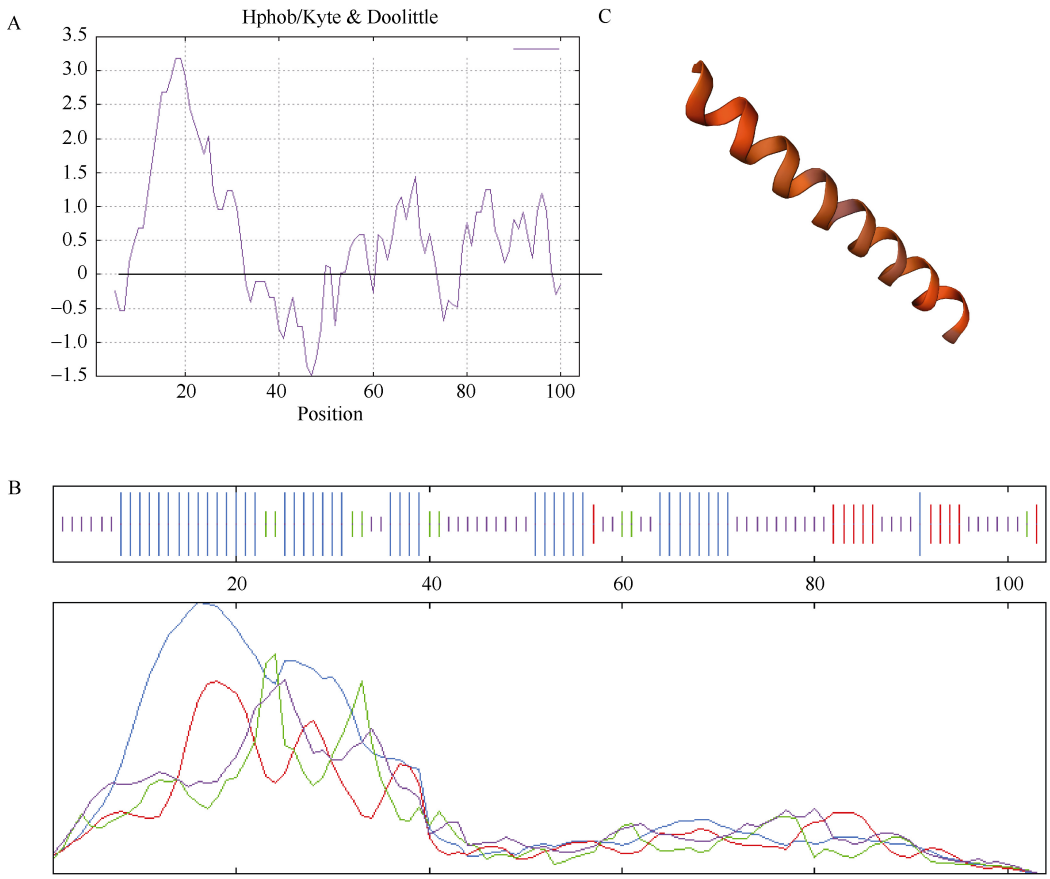


图 3　TaRTS 蛋白的亲水性(A)、二级结构(B)和三级结构(C)

Fig. 3　The hydrophilicity (A), secondary structure (B), and tertiary structure (C) of TaRTS

蓝色为 α-螺旋, 绿色为 β-转角, 红色为延伸链, 紫色为无规则卷曲。

Blue line means alpha helix, green line means beta turn, red line means extended strand, and purple line means random coil.

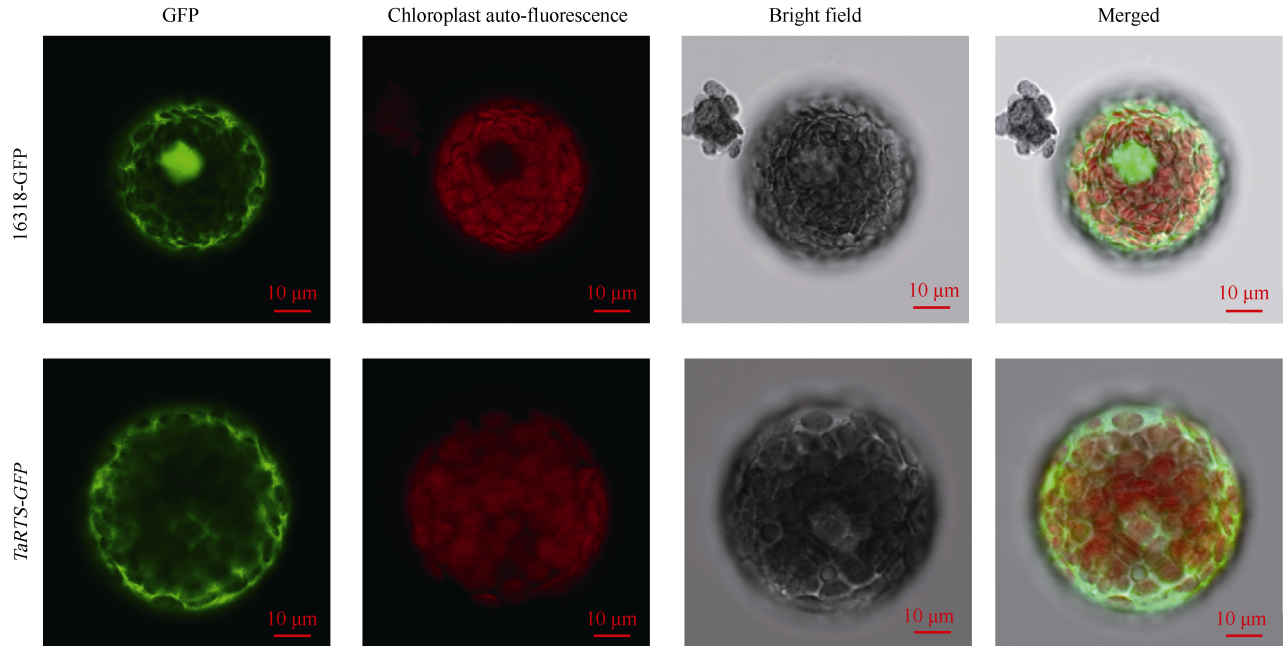


图 4 TaRTS 蛋白的小麦原生质体亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of TaRTS in wheat protoplasts

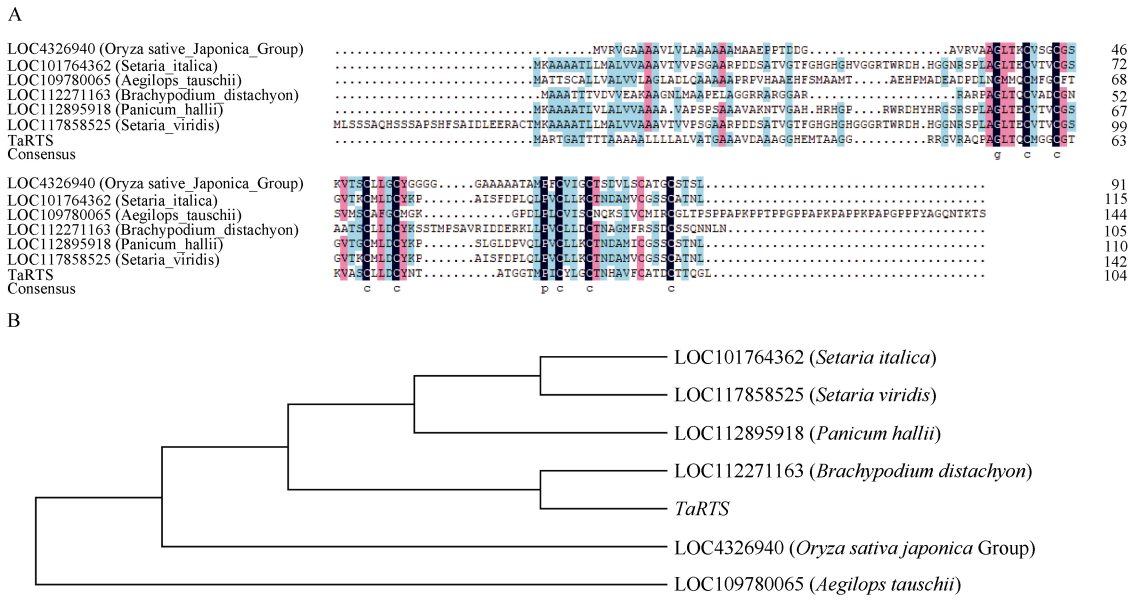


图 5 *TaRTS* 的多序列比对(A)和进化树分析(B)

Fig. 5 Multiple alignments of protein sequences (A) and phylogenetic tree analysis (B) of *TaRTS*

2.4 *TaRTS* 基因启动子元件分析

对 *TaRTS* 基因启动子区前 2000 bp 序列的转录因子的预测分析发现，基因的启动子序列中包含：光响应元件(ACE, G-box, GT1-motif, T-box, Sp1)、分生组织表达有关(CAT-box)、MYBHv1 结合位点(CCAAT-box)、茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif, TGACG-motif)、低温响应元件(LTR)、细胞周期调控元件(MSA-like)等元件。推测 *TaRTS* 基因与光、温胁迫，调节细胞周期相关(表 2)。

2.5 *lncRNA27195* 及 *TaRTS* 组织特异性分析

本实验研究了 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因在小麦孕穗期(挑旗)根、茎、旗叶、颖壳、雄蕊和雌蕊不同组织的表达谱。结果显示，*lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因在小麦雄蕊中表达量最高，显著高于其他组织($P<0.01$)，而其他组织中的表达量极低，表明 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 在雄蕊上特异性表达，主要参与花药发育的调控(图 6)。

表 2　启动子元件分析
Table 2　The information of promoter elements

上游启动子元件 Upstream promoter elements	功能 Function
CAAT-box, TATA-box	核心启动子元件 Core promoter element
ACE, G-box, GT1-motif, T-box, Sp1	光响应元件 Light responsiveness element
ABRE	脱落酸响应元件 Abscisic acid responsiveness element
CAT-box	分生组织表达相关元件 Related to meristem expression element
CCAAT-box	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
CGTCA-motif, TGACG-motif	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA-responsiveness responsiveness element
LTR	低温响应元件 Low-temperature responsiveness element
MSA-like	细胞周期调控元件 Cell cycle regulation element

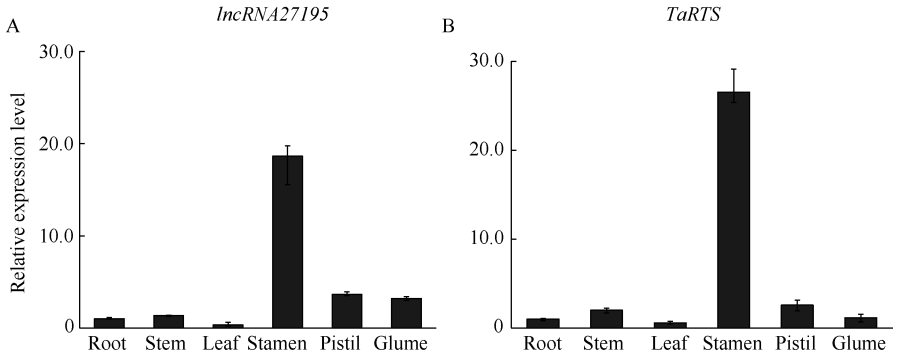


图 6　*lncRNA27195* 基因(A)及 *TaRTS* 基因(B)组织特异性表达分析
Fig. 6　Relative expression levels of *lnc27195* (A) and *TaRTS* (B) in different tissues

2.6　*lncRNA27195* 及 *TaRTS* 不同花药发育时期表达分析

本研究对 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因在不同育性条件下的 4 个发育时期的花药中的表达模式进行了分析。结果表明, *TaRTS* 基因在二分体时期、四分体时期和单核期, 可育环境下的表达量均极显著高于不育环境(P<0.01)。*lncRNA27195* 在二分体时期可育环境下的表达量极显著高于不育环境(P<0.01); 在四分体时期和单核期, 可育环境下的表达量均显著高于不育环境(P<0.05); 在小孢子母细胞时期, 不育环境的表达量显著高于可育环境(P<0.05) (图 7-A)。皮尔逊相关性分析结果显示, *lnc27195* 同 *TaRTS* 基因的表达量在小麦花药中呈显著正相关(R^2=0.8724) (图 7-B)。

2.7　*lncRNA27195* 及 *TaRTS* 在不同光温处理下的表达模式分析

前期发现 BS366 的育性受光照和温度的影响, 且生信分析发现 *TaRTS* 基因启动子区包含光和低温响应元件(表 2), 因此对不同光照和温度条件下, *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因在花药中的表达水平进行分析。结果显示, 在高温长日条件(20℃, 14 h L/10 h D)、高温短日条件(20℃, 12 h L/12 h D)、低温长日条件(12℃, 14 h L/10 h D)和低温短日(12℃, 12 h L/12 h D)条件下, 小麦 *lncRNA27195* 的相对表达量依次下降, 四个条件下存在显著性差异; 小麦 *TaRTS* 基因的表达量依次下降, 高温长日条件、高温短日和低温长日条件、低温短日条件三组间存在显著性差异(图 8)。此外, 小麦 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因在不同温度(相同光照)和不同光照(相同温度)的组别间的数据分析中显示, 两者皆存在显著性差异, 且受温度影响较大。结果表明, 光照和温度均对小麦 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因的表达存在显著影响, 高温和长日照可以促进 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因的表达, 进而促进育性恢复。

2.8　*lncRNA27195* 及 *TaRTS* 在 MeJA 及 SA 处理下的表达模式分析

前期研究表明, MeJA 参与小麦雄性不育, 可促进花药开裂, 同时 SA 对该功能有一定的拮抗作用; 本文前期的生物信息学分析中发现 *TaRTS* 基因启动子区存在 MeJA 响应元件。为研究 MeJA 与 *TaRTS* 之间的调控方式, 以及对 *TaRTS* 的调控作用, 本研究利用不同浓度的 MeJA 对抽穗后开花前的花

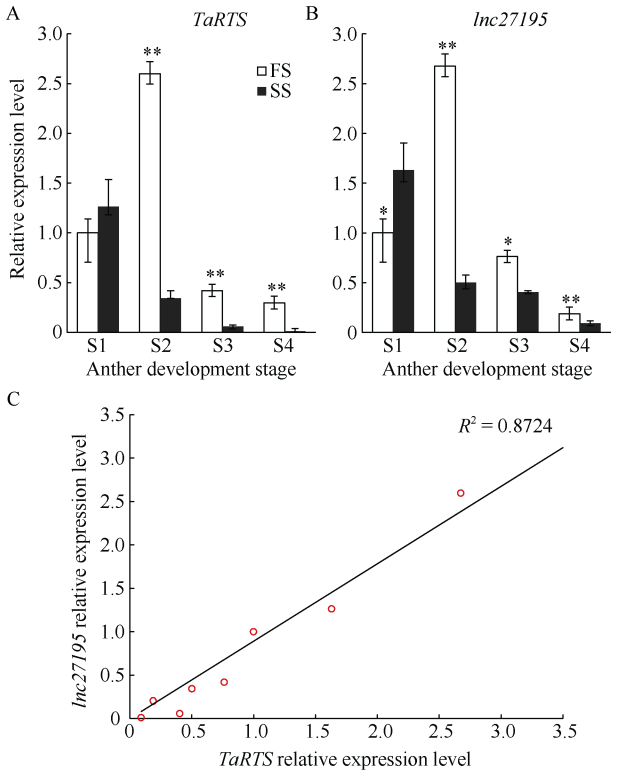


图 7 *TaRTS*(A)和 *lncRNA27195*(B)表达模式分析及两者表达量相关性分析(C)

Fig. 7 Relative expression levels of *TaRTS* (A), *lncRNA27195* (B), and the correlation analysis (C) of *TaRTS* and *lncRNA27195*

*代表显著差异(P<0.05), **代表极显著差异(P<0.01)。

* means significantly different at P<0.05, and ** means highly significant difference at P<0.01.

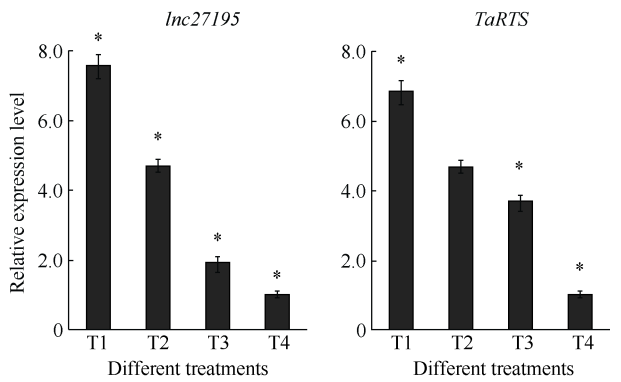


图 8 *TaRTS* 及 *lncRNA27195* 在不同光照温度条件下表达模式分析

Fig. 8 Relative expression levels of *TaRTS* and *lncRNA27195* in different environments

T1: 温长日环境(20℃, 14 h L/10 h D); T2: 高温短日环境(20℃, 12 h L/12 h D); T3: 低温长日环境(12℃, 14 h L/10 h D); T4 为低温短日(12℃, 12 h L/12 h D)环境。*代表各组间存在显著差异(P < 0.05)。

T1: long-light environment with high temperature (20℃, 14 h L/10 h D); T2: short-light environment with high temperature (20℃, 12 h L/12 h D); T3: long-light environment with low temperature (12℃, 14 h L/10 h D); T4: short-light environment with low temperature (12℃, 12 h L/12 h D). * means significantly different at P < 0.05.

药进行处理，同时研究 SA 喷施 MeJA 处理后的花药中，*lncRNA27195* 及 *TaRTS* 的表达模式。在 MeJA 处理后，随着浓度的上升，*lncRNA27195* 及 *TaRTS* 的表达量先上升后下降，在 MeJA 浓度为 0.5 mmol L^{-1}时达到峰值；通过 SA 喷施处理后，发现 *lncRNA27195* 及 *TaRTS* 的表达量较正常植株显著下降，且随着 MeJA 浓度的上升，*lncRNA27195* 及 *TaRTS* 的表达量不断下降(图 9)。实验表明，适量的 MeJA 可以促进 *lncRNA27195* 及 *TaRTS* 的表达，但过高浓度的 MeJA 反而会抑制其表达; SA 可以抑制 MeJA 的功能，从而抑制 *lncRNA27195* 及 *TaRTS* 的表达。

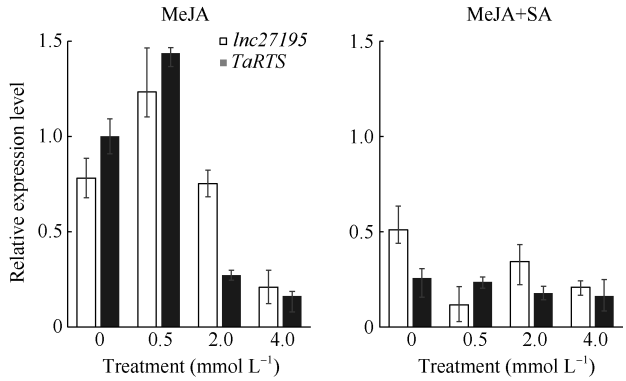


图 9 *TaRTS* 及 *lncRNA27195* 在 MeJA 和 SA 处理下的表达模式分析

Fig. 9 Relative expression levels of *TaRTS* and *lncRNA27195* under MeJA and SA treatments

3 讨论

在水稻中，研究表明*OsRTS*基因仅在绒毡层中表达，对花粉发育至关重要，且抑制其表达会导致雄性不育[14]。TaRTS蛋白结构分析发现，其丙氨酸含量较高(图1-A)，其他植物中发现的一些功能未知的花药特异性表达蛋白也具有这一特征，如水稻中的RA8蛋白[18]，拟南芥[19]和油菜花[20]中的Bcp1蛋白。拟南芥*Bcp1*基因，在绒毡层和小孢子中都有表达，也被证明是花粉发育所必需的，其在二倍体绒毡层或单倍体小孢子中的低表达或不表达会导致花粉发育停滞[19]。本文研究发现TaRTS蛋白中富含半胱氨酸，同家族蛋白也同样如此(图5)。半胱氨酸残基可以通过二硫键提供分子内和分子间的交联，从而形成蛋白质的三级和四级结构，表明该特征对蛋白质的功能的发挥具有重要作用。此外，RTS蛋白的N端存在较强的疏水结构域(图3)，这种结构域主要与蛋白靶向到膜部分或细胞外空间过程相关。这些特征也在其他一些花药特异性蛋白中被观察到，如水稻

的PS1[21]、玉米的Zmc13[22]和番茄的LAT52[23]。绒毡层主要参与孢粉素的合成和沉积进而释放到花粉中[24]，本研究中TaRTS蛋白被预测为分泌蛋白，亚细胞定位到细胞质中(图4)，因而TaRTS蛋白可能被绒毡层细胞分泌到花粉中，为花粉壁的形成提供必要的组分，或者为花粉的生长发育提供营养。本研究克隆的基因*TaRTS*，其开放阅读框(open reading frame，ORF) GC含量较高(72.7%)。Tsuchiya等[25]分离得到的花药特异性的水稻基因的ORF中显示出较高的GC含量(70.3%和69.6%)。ORF在其他花药特异性基因中是否存在GC含量高的现象尚不清楚。然而，可以推测高GC含量提高植物对环境胁迫的耐受性，因为GC之间的氢键比AT更稳定，而花药是环境胁迫下最脆弱的器官之一。

BS366属于光温敏型核雄性不育，在低温短日照条件下不育，高温长日下可育。本研究表明*TaRTS*的启动子序列同时存在光响应元件和低温响应元件(表1)，而*lncRNA27195*及*TaRTS*在不同光温处理下的表达模式显示，*lncRNA27195*及*TaRTS*的表达量存在显著性差异，高温和长日照可以促进*lncRNA27195*与*TaRTS*基因的表达(图8)，可见其同BS366的育性转换存在着密切的联系。

茉莉酸甲酯(MeJA)广泛分布在植物中，影响果实成熟、失活花粉的产生、根的生长、卷须卷曲、植物对伤害和非生物胁迫的反应，以及对昆虫和病原体的防御等过程[26]。Mandaokor等[27]的研究显示，控制拟南芥的雄蕊发育相关转录因子MYB21和MYB24受茉莉酸甲酯调控。在拟南芥*dad1*突变体中发现茉莉酸甲酯含量低，花药开裂异常，花丝伸长未能正常进行、花粉发育延迟，导致雄性不育[28]，表明茉莉酸与花药育性直接相关。同时，水杨酸(SA)和JA途径相互影响，SA的积累可以抑制JA的表达[29]，WIPK蛋白的转录和表达可以激活JA的生成，且抑制SA通路的信号传导[30]。本研究中利用MeJA和SA对抽穗期的小麦进行喷施处理的实验结果发现，0.5 mmol L^{-1}的MeJA可以促进*lncRNA27195*及*TaRTS*的表达，SA的喷施可以抑制MeJA的功能，从而抑制*lncRNA27195*及*TaRTS*的表达，表明了*lncRNA27195*及*TaRTS*受到MeJA介导的JA信号通路调控(图9)。

本研究通过系统进化树分析发现，RTS 蛋白目前仅在禾本科植物中有报道，其他的植物中无相关序列报道。其原因可能是由于，禾本科的进化路线是由虫媒传粉向风媒传粉演化并且高度特化,花被和雄蕊简化，因而推测 RTS 蛋白的出现是为了保证雄蕊的正常发育，但其具体功能机制尚不可知[31]。此外，*lncRNA27195*与 *TaRTS* 基因均在雄蕊中特异性表达(图6)，且两者间存在显著的正相关关系(图7-B)，说明两者参与花粉的生长发育。另外 *lncRNA27195* 与 *TaRTS* 基因在可育环境的表达量二分体时期，达到峰值后表达量下调；在不育环境则是在小孢子母细胞时期表达量达到峰值，之后表达量下调(图7-A)，表达峰值较正常植株提前一个时期。另外前人研究表明，绒毡层程序性死亡的提前和推迟会导致花粉失活，植株发生雄性不育[32-33]。光周期敏感基因雄性不育水稻(农研58)的花粉退化过程与绒毡层的异常行为密切相关，光敏雄性不育(PGMS)植株较正常植株提前进行绒毡层程序性死亡，但绒毡层退化进展缓慢，直到花粉分解才完全退化[34]。本研究表明，TaRTS 蛋白作为分泌蛋白，其基因表达峰值较正常植株提前，从而可能导致绒毡层提前降解，导致花粉败育。

4　结论

lncRNA27195 和其靶基因 *TaRTS* 是小麦花药特异性基因，通过生物信息学分析及表达水平分析显示，两者表达量呈正相关关系，参与花粉育性调节，为分泌蛋白，且受MeJA调控，可伴随绒毡层凋亡分泌到花粉中，为花粉壁的形成提供必要的组分，为花粉的生长发育提供营养。

References

[1] Espinoza C A, Goodrich J A, Kugel J F. Characterization of the structure, function, and mechanism of B2 RNA, an ncRNA repressor of RNA polymerase II transcription. *RNA*, 2007, 13: 583–596.

[2] Sigova A A, Mullen A C, Molinie B, Gupta S, Orlando D A, Guenther M G, Almada A E, Lin C, Sharp P A, Giallourakis C C, Young R A. Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 2876–2881.

[3] Miao S, Lee K W. From discovery to function: the expanding roles of long non-coding RNAs in physiology and disease. *Endocr Rev*, 2015, 36: 25–64.

[4] Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, Squazzo S L, Xu X, Brugmann S A, Henry Goodnough L, Helms J A, Farnham P J, Segal E, Chang H Y. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human *HOX* loci by noncoding RNAs. *Cell*, 2007, 129: 1311–1323.

[5] Kristina P S, Thomassen M, Tan Q, Martin B, Torben A K. Long non-coding RNA *HOTAIR* is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treeat*, 2013, 142: 529–536.

[6] Reis E M, Nakaya H I, Louro R, Canavez F C, Flatschart A V, Almeida G T, Egidio C M, Paquola A C, Machado A A, Festa F, Yamamoto D, Alvarenga R, da Silva C C, Brito G C, Simon S D, Moreira Filho C A, Leite K R, Camara Lopes L H, Campos F S, Gimba E, Vignal G M E, Dorry H, Sogayar M C, Barcinski M A, da Silva A M, Verjovski Almeida S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene*, 2004, 23: 6684–6692.

[7] Swiezewski S, Liu F, Magusin A, Dean C. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 2009, 462: 799–802.

[8] Xin M M, Wang Y, Yao Y Y, Song N, Hu Z, Qin D D, Xie C J, Peng H R, Ni Z F, Sun Q X. Identification and characterization of wheat long non-protein coding RNAs responsive to powdery mildew infection and heat stress by using microarray analysis and SBS sequencing. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 61.

[9] Ding J, Lu Q, Ou-Yang Y, Mao H, Zhang P, Yao J, Xu C, Li X, Xiao J, Zhang Q. A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2654–2659.

[10] Zhou H, Liu Q J, Li J, Jiang D, Zhou L, Wu P, Lu S, Li F, Zhu L, Liu Z, Chen L, Liu Y, Zhuang C. Photoperiod- and thermo-sensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA. *Cell Res*, 2012, 22: 649–660.

[11] Dai X Y, Yu J J, Zhao Q, Zhu D, Ao G. Non-coding RNA for *ZM401*, a pollen-specific gene of *Zea mays*. *Acta Bot Sin*, 2004, 46: 497–504.

[12] Liu C M, Muchhal U S, Raghothama K G. Differential expression of *TPS11*, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol Biol*, 1997, 33: 867–874.

[13] 赵昌平, 王新, 张风廷, 叶志杰, 戴惠君. 杂种小麦的研究现状与光温敏二系法. 北京农业科学, 1999, 17(2): 3–5.
Zhao C P, Wang X, Zhang F T, Ye Z J, Dai H J. Research status of hybrid wheat and the photosensitive two-system method. *Beijing Agric Sci*, 1999, 17(2): 3–5 (in Chinese with English abstract).

[14] Luo H, Lee J Y, Hu Q, Nelson-Vasilchik K, Eitas T K, Lickwar C, Kausch A P, Chandlee J M, Hodges T K. *RTS*, a rice anther-specific gene is required for male fertility and its promoter sequence directs tissue-specific gene expression in different plant species. *Plant Mol Biol*, 2006, 62: 397–408.

[15] Kelliher T, Walbot V. Hypoxia triggers meiotic fate acquisition in maize. *Science*, 2012, 337: 345–348.

[16] Shi J, Cui M, Yang L, Kim Y J, Zhang D B. Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 741–753

[17] Julian I S. *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinases1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell*, 2005, 17: 3350–3361.

[18] Jeon J S, Chung Y Y, Lee S, Yi G H, Oh B G, An G. Isolation and characterization of an anther-specific gene, *RA8*, from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 35–44.

[19] Xu H, Knox R B, Philip E T, Singh M B. *Bcp1*, a gene required for male fertility in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2106–2110.

[20] Theerakulpisut P. Isolation and developmental expression of *Bcp1*, an anther-specific cDNA clone in *Brassica campestris*. *Plant Cell*, 1991, 3: 1073–1084.

[21] Zou J T, Zhan X Y, Wu H M, Wang H, Cheung A Y. Characterization of a rice pollen-specific gene and its expression. *Am J Bot*, 1994, 81: 552–561.

[22] Hanson D D, Hamilton A D, Travis L J, Bashe D M, Mascarenhas J P. Characterization of a pollen-specific cDNA clone *Zea mays* and its expression. *Plant Cell*, 1989, 1: 173–179.

[23] Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S. Isolation and expression of an anther-specific gene form tomato. *Mol Gen Genet*, 1989, 217: 240–245.

[24] McCormick S. Male gametophyte development. *Plant Cell*, 1993, 5: 1265–1275.

[25] Tsuchiya T, Toriyama K, Nasrallah M E, Ejiri S. Isolation of genes abundantly expressed in rice anthers at the microspore stage. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 1189–1193.

[26] Creelman R A, Mullet J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Phys*, 1997, 48: 355–381.

[27] Mandaokar A, Thines B, Shin B, Lange B M, Choi G, Koo Y J, Yoo Y J, Choi Y D, Choi G, Browse J. Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J*, 2006, 46: 984–1008.

[28] Muruáis G, Lalioti V, Sandoval I V. The Cdk5 inhibitor roscovitine strongly inhibits glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without altering GLUT4 translocation from internal pools to the cell surface. *J Cell Physiol*, 2009, 220: 238–244.

[29] Seo S, Okamoto N, Seto H, Ishizuka K, Sano H, Ohashi Y. Tobacco map kinase: a possible mediator in wound signal-transduction pathways. *Science*, 1995, 270: 1988–1992.

[30] Seo S, Sano H, Ohashi Y. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, 1999, 11: 289–298.

[31] 韩建国, 樊奋成, 李枫. 禾本科植物的起源、进化及分布. 植物学报, 1996, 1: 10–14.
Han J G, Fan F C, Li F. Origin, evolution and distribution of the Gramineae. *Chin Bull Bot*, 1996, 1: 10–14 (in Chinese with English abstract).

[32] Yu J, Meng Z, Liang W, Behera S, Jörg K, Tucker M R, Luo Z, Chen M, Xu D, Zhao G, Wang J, Zhang S, Kim Y J, Zhang D. A rice Ca^{2+} binding protein is required for tapetum function and pollen formation. *Plant Physiol*, 2016, 176: 1772–1786.

[33] Kapoor S. Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene *TAZ1* causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in Petunia. *Plant Cell*, 2002, 14: 2353–2367.

[34] Shi Y, Zhao S, Yao J. Premature tapetum degeneration: a major cause of abortive pollen development in photoperiod sensitive genic male sterility in rice. *J Integr Plant Biol*, 2010, 51: 774–781.