

高丹草杂种和亲本叶片基因差异表达研究

董 婧¹, 逯晓萍¹, 米福贵², 王树彦¹, 何丽君¹, 韩平安¹, 薛春雷¹, 丛梦露¹, 李俊伟¹

(¹ 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019; ² 内蒙古农业大学生态与环境学院, 呼和浩特 010019)

摘要:以4份高粱不育系和5种类型苏丹草为亲本,按照NC II设计配制成20个杂交组合,分析各组合及亲本的表型值和中亲及超亲优势并筛选出8个优势强的组合为试材,利用cDNA-AFLP技术,分析杂种与亲本苗期叶片基因差异表达类型与主要产量性状的杂种表现及杂种优势的关系。研究表明:(1)12对引物共扩增出315条TDFs,杂种与亲本间基因表达类型有:单亲表达一致型(P1F1型)和二型(P2F1型)、杂种特异表达类型(F1型)、单亲表达沉默一型(P1型)和二型(P2型)、双亲共沉默类型(P1P2型)和杂种亲本表达一致型(P1F1P2型)7种。(2)在差异展示类型与产量构成因素的相关分析中,有效分蘖数与P1F1型(0.726**)呈极显著正相关,单株鲜重与P1P2型(0.659*)、叶长与P2型(0.647*)呈显著正相关,成株期叶片数与F1型(-0.81**)呈极显著负相关。在与中亲优势相关分析中发现,单株鲜重与P1(0.695*)、P2(0.637*)呈显著正相关,单株鲜重与P1F1P2型(0.743**)呈极显著正相关,叶宽与P1P2型(-0.619*)呈显著负相关。在与超亲优势进行相关分析后发现,穗长与P2F1型(0.732**)呈极显著正相关,叶宽与P2F1型(-0.731**)以及P1P2型(-0.731**)呈极显著负相关。(3)差异展示类型P1F1、P2F1、P1和P2是显性效应类型,共占总检测的91.4%。差异展示类型F1和P1P2表现超显性,共占总检测的4.8%,说明各个性状的杂种表现主要受到的是(超)显性效应影响。(4)对8个与高丹草杂种优势相关的TDFs进行回收及BLAST分析均得到同源核苷酸,并且找到7个同源蛋白,这些蛋白质在控制植物生长发育方面具有重要作用。(5)将克隆测序获得差异片段的核苷酸序列,采用半定量RT-PCR进行了验证。本研究为进一步揭示高丹草杂种优势的分子机制和提高高丹草强优势组合的筛选效率以及种质资源的创建提供依据。

关键词:高丹草; cDNA-AFLP; 半定量 RT-PCR; 杂种优势

Relationship Between Differential Gene Expression Patterns in Leaves of the Hybrids and Their Parents of *Sorghum sudanense* (Piper) Stapf

DONG Jing¹, LU Xiao-ping¹, MI Fu-gui², WANG Shu-yan¹, HE Li-jun¹,

HAN Ping-an¹, XUE Chun-lei¹, CONG Meng-lu¹, LI Jun-wei¹

(¹ College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019; ² College of Ecology and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019)

Abstract: Four collections of the sorghum sterile lines and five types of Sudan grass as parents, according to the NC II design, formulated 20 hybrid combinations. Eight hybrid combinations of strong heterosis were selected with evaluation of the phenotypic value and heterobeltiosis. Using cDNA-AFLP technology, differentially expressed genes from hybrid and parental seedling leaves were analyzed and correlated with hybrid performance and the heterosis of main yield traits. Results showed that: (1) a total of 315 TDFs were amplified with 12 pairs of primers, the gene expression types of sorghum-sudan grass were classified into 7 catagries: single parent expression of the same type I (P1F1 type), single parent expression with type II (P2F1 type), hybrid specific expression type (F1), single parent expression silence type I (P1), a single expression silence type II (P2), and parents silent type (P1P2 type) and hybrid-parents joint expression type (P1F1P2 type). (2) correlation analysis between the expression types and yield

收稿日期: 2015-07-29 修回日期: 2015-09-28 网络出版日期: 2016-06-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160608.1421.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160302, 31460375); 呼和浩特市科技计划项目(2012-重-计-8-2)

第一作者研究方向为植物遗传育种。E-mail: 984012971@qq.com

通信作者: 逯晓萍, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: lxp1960@163.com

components showed significant positive correlation between effective tiller number and P1F1 type(0.726 **), fresh weight per plant and P1P2 type(0.659 *), leaf length and P2 type(0.647 *); it showed significant negative correlation between leaf number and F1 type(-0.81 **). The correlation analysis between mid-parent heterosis and gene types showed significant positive correlation between the spike length and the P2F1 type(0.785 **), fresh weight per plant with P1(0.695 *), P2(0.637 *), P1P2(0.661 *) and P1F1P2(0.743 **); significant negative correlation between leaf width and P1P2(-0.619 *). After correlation analysis with the super parent heterosis, the spike length was significantly positively correlated with P2F1(0.732 **), and the leaf width was significantly negatively correlated with P2F1(-0.731 **), P1P2(-0.731 **). (3) differentially display types of P1F1, P2F1, P1 and P2 were dominant effects, which accounted for 91.4% of the total. Differential display type F1 and P1P2 performed super dominance, accounted for 4.8%. It indicated that the hybrid performance of each trait was mainly influenced by the (super) dominant effect. (4) 8 TDFs associated with heterosis were retrieved and found homologous nucleotides with BLAST analysis, and seven homologous proteins were found important in control of plant growth and development. (5) nucleotide sequence was obtained by cloning and sequencing, and semi quantitative RT-PCR was used to verify the nucleotide sequence. The molecular mechanisms of heterosis were revealed, and the selecting efficiency should be improved in screening strong advantage combinations and providing basis for the creation of germplasm resources in *Sorghum-sudan* grass.

Key words: *Sorghum*; cDNA-AFLP; semi-quantitative RT-PCR; heterosis

高丹草是由苏丹草 [*Sorghum sudanense* (Piper Stapf)] 和高粱 [*Sorghum bicolor* L. (Moench)] 杂交而成的种间杂交种, 杂交种结合了亲缘关系较远的父母本优点, 表现出强的杂种优势^[1-2], 可作青贮也可用于青饲, 在畜牧业生产上具有重要的应用价值^[3]。

目前, 以 cDNA-AFLP 差异显示技术为基础, 进行杂种优势相关机制研究已成为一个热点课题, 主要涉及玉米、水稻、大麦等多种主要作物。在国外, R. A. Swanson-wagner 等^[4]利用芯片技术研究玉米自交系 B73、MO17 以及它们的杂交种 F₁ 的苗期基因表达, 发现有 1367 个 EST(9.8%) 在双亲和杂种间表现显著的差异表达; S. Meyer 等^[5]用玉米授精后 6d 的胚为研究材料, 在转录水平上发现了明显的杂种基因表达变化。在我国, 张小蒙等^[6]应用差异显示技术, 以水稻扬稻 6 号、明恢 63、特青配置的 9 个杂种 F₁ 为材料, 分别分析了分蘖期(叶片)、孕穗期(幼穗)、抽穗期(剑叶)的基因差异表达模式, 结果发现水稻不同组合 F₁ 在不同生育期基因的表达模式存在着很大不同; 张新忠等^[7]认为在大麦杂种亲本的等位基因组合中, 导致等位基因表达模式的改变产生新的等位基因互作以及更强的适应性, 可能是杂种优势产生的机制; 王章奎等^[8]通过研究小麦根系基因, 发现与杂种优势产生密切相关的差异表达类型为单亲表达一致型; 李金辉等^[9]以抗黑星病黄瓜为材料, 研究发现了大量差异表达基因, 这些

基因在能量和基础代谢、信号转导、蛋白和核酸代谢、光合作用及逆境中特异表达等方面具有重要作用。

本研究是在对高丹草遗传图谱构建、产量性状 QTL 定位以及重组自交系构建与高产种质的创新、杂种表现遗传模型等^[10-17]研究的基础上, 为进一步探明杂交种与亲本间基因差异表达的规律, 明确基因差异表达类型、分类、功能与杂种优势形成的关系, 丰富高丹草种质资源, 因而采用 mRNA 差异显示技术研究高丹草转录水平上的变异, 以期更加全面系统地认识高丹草杂种优势产生的分子机制, 进而为其基因组研究提供新的思路和经验, 同时也为高丹草种质资源的创建与育种研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013 年选用 4 份高粱不育系(包括配套的保持系)和 5 种类型苏丹草(不同类型即黑壳苏丹草、白壳苏丹草、红壳苏丹草、棕壳苏丹草、21 号苏丹草)杂交并经过 6 代以上自交即各位点基本纯合的高丹草材料为亲本, 按照 NC II 设计配制成 20 个杂交组合。田间设计 3 重复, 4 行区, 行长 5.0 m, 行距 0.4 m。

2014 年在两处不同地点(内蒙古农业大学科技园区和呼和浩特市合创农业科技研究中心)将各个杂交种和亲本进行种植。在高丹草成熟时期, 每个

材料取 10 株测定其株高、有效分蘖数、穗长、成株期叶片数、叶长、叶宽、单株鲜重 7 个农艺性状指标,并分析各材料的表型平均值和中亲优势以及超亲优势。

相关分析采用 SAS8.0 软件。

杂种优势分析:中亲优势 = $(2 \times F1 - P1 - P2) / (P1 + P2) \times 100\%$

超亲优势 = $(F1 - \text{双亲高产亲本}) / \text{双亲高产亲本} \times 100\%$

其中 P1, P2 为亲本表现, F1 为杂种表现。

1.2 cDNA-AFLP 分析与统计

(1) 以 3 叶期叶片为材料, 采用 TIANGEN 公司 RNAPrep Pure PLANT Kit(离心柱型)试剂盒提取其总 RNA。(2) cDNA 合成采用 Thermo 公司试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(k1621)。(3) 酶切连接反应体系如下: DNA (50ng/μL) 5 μL, *EcoR* I (20U/μL) 0.4 μL, *Mse* I (10U/μL) 0.4 μL, NEB Buffer 2 2.5 μL, 100 × BSA 0.2 μL, ddH₂O 8.6 μL, *EcoR* I 接头 (2.5 pmol/μL) 0.4 μL, *Mse* I 接头 (25pmol/μL) 0.4 μL, T4 DNA-ligase (3U/μL) 0.4 μL, T4 DNA-ligase Buffer 2 μL, 混匀离心后 37 °C 酶切 4 h, 16 °C 连接 9 h。(4) 预扩增反应体系: 酶切连接液 5.0 μL, 10 × PCR Buffer 2.0 μL, dNTP (2.5 mM) 1.6 μL, MgCl₂ (2.5 mM) 1.2 μL, E0 (50ng/μL) 0.6 μL, M0 (50ng/μL) 0.6 μL, Taq 酶 (1U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 8.8 μL。预扩增 PCR 反应程序: 94 °C 变性 30 s; 56 °C 退火 30s; 72 °C 延伸 1 min; 25 个循环; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保存。(5) 选择性扩增体系: 模板(预扩增产物稀释 30 倍) 5.0 μL, 10 × PCR buffer 2.0 μL, dNTP (2.5 mM) 1.6 μL, Mg²⁺ (2.5 mM) 1.2 μL, Taq 酶 (1 u/μL) 0.2 μL, *EcoR* I + NNN (50 ng/μL) 引物 1.0 μL, *Mse* I + NNN (50 ng/μL) 引物 1.0 μL, ddH₂O 8.0 μL。PCR 扩增程序如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 65 °C 退火 30 s, -0.7 °C/cycle; 72 °C 延伸 1 min; 12 个循环; 94 °C 变性 30 s; 65 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min + 1s/cycle; 25 个循环; 72 °C 充分延伸 5 min; 4 °C 保存。将 PCR 扩增产物 94 °C 变性 5 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染等步骤, 具体方法参照 X. P. Lu 等^[10]研究。

1.3 TDF 的回收与测序

采用水煮法回收从凝胶中分离出的差异基因片段; 再以回收产物为模板进行扩增, 所用试剂、对应引物、反应程序均按照选择性扩增条件进行; 选择全式金公司 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 试剂盒

EG101-01 进行再扩增产物的纯化回收, 回收产物由北京华大基因科技有限公司进行专业测序。利用 GenBank 的 BlastN 和 BlastX 对 TDF 测序后结果分别在核苷酸数据库及蛋白质数据库中进行在线同源性比较分析。

1.4 半定量 RT-PCR

分别提取高丹草杂种及其父母本叶片总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第 1 链作为材料, 选择 *GAPDH* 为内参, 利用 NCBI 核酸数据库和 primer3.0 软件针对测序得到的 TDF 保守序列进行引物设计, 将 TDF 进行 PCR 标记化, PCR 体系如下: Taq 酶 (1U/μL) 0.2 μL, 10 × PCR Buffer 2 μL, dNTP (10mM each) 0.2 μL, cDNA 1 μL, Primers (10μM each) 1 μL, ddH₂O 15.6 μL。特异 PCR 反应程序: 94 °C 变性 3min; 94 °C 变性 30s, 62 °C 退火 30s, 72 °C 延伸 1min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5min。

2 结果与分析

2.1 杂种优势分析

对 29 (包括 9 个亲本) 份材料的 7 个性状进行了测定分析, 按照公式进一步分析处理得到 20 份材料的中亲优势(表 1)。表 1 以单株鲜重作为产量指标, 经分析可以看出 20 份高丹草杂交种中表现出较强优势的杂交组合有: 11A × 21 号、314A × 白壳苏丹草、11A × 黑壳苏丹草、11A × 白壳苏丹草、314A × 黑壳苏丹草、2397A × 黑壳苏丹草、2397A × 白壳苏丹草、2397A × 21 号壳苏丹草。其中 11A × 21 号和 314A × 白壳苏丹草分别为本研究室选育并已通过审定的品种“内杂饲一号”和“GB-4-2”, 两个审定品种的确表现出了较强的产量优势。

2.2 高丹草 cDNA-AFLP 分析

根据杂种优势表现分析, 筛选出 8 个优势表现较强的杂交组合及其父母本为实验材料进行 cDNA-AFLP 分析(图 1)。从 124 对引物中筛选得到 12 对 (*E*₄₁*M*₅₀、*E*₄₁*M*₅₄、*E*₃₂*M*₅₉、*E*₃₄*M*₄₇、*E*₄₅*M*₆₁、*E*₃₂*M*₄₇、*E*₄₀*M*₄₉、*E*₄₂*M*₆₂、*E*₃₄*M*₅₇、*E*₄₅*M*₅₇、*E*₄₅*M*₄₉、*E*₄₃*M*₅₄) 效果较好的引物对参试材料进行选择性扩增(图 2), 由图可见, 产物的电泳条带清晰、分辨率较高、具有较好的多态性, 表明 cDNA-AFLP 技术适合高丹草杂种优势的差异性分析。

2.3 高丹草杂种及其亲本间的基因表达谱分析

(1) 基因组间杂种及其亲本间的基因表达谱分析。

应用 cDNA-AFLP 进行基因表达差异显示分析,

表 1 20 份材料的中亲和超亲优势值

Table 1 Mid-parent heterosis and high-parent heterosis of 20 materials

品种名称	株高	有效分蘖数	穗长	成株期叶片数	叶长	叶宽	单株鲜重	
Variety name	Plant height	Effective tiller number	Ear length	Leaf number of mature stage	Leaf length	Leaf width	Plant fresh weight	
13A × 21 号	MPH	35d	-33.33e	-35.06g	-36.36f	9.09g	20.00d	-20.64 h
	BPH	-10.66c	-50.00c	-55.36g	-61.11f	15.79c	50.00c	-46.02 l
13A × 白壳	MPH	64.71b	-66.67g	25.42c	-61.76g	25.37d	40.00b	32.56 ef
	BPH	5.00b	-75.00e	-2.63c	-76.79g	20.00b	75.00b	-7.84 h
2397A × 21 号	MPH	94.27a	-60.00f	46.43a	-3.45e	20.93d	20.00d	44.43 de
	BPH	26.01a	-66.67d	17.14b	-39.13e	20.00b	50.00c	14.37 de
13A × 红壳	MPH	55.56c	-66.67g	-6.67e	-11.48e	1.41h	-9.09g	-0.35g
	BPH	-0.63b	-75.00e	-28.21e	-44.9e	-7.69e	0f	-30.86 jk
13A × 棕壳	MPH	35.75d	-50.00f	41.82b	108.7a	8.40g	20.00d	-1.60g
	BPH	-12.08a	-50.00c	14.71b	41.18a	5.97d	50.00c	-25.85j
2397A × 黑壳	MPH	66.99b	20.00b	1.27e	10.77d	32.77b	27.27c	51.72d
	BPH	-46.32d	-75.00e	-58.93g	-79.63h	8.77c	75.00b	-70.43m
11A × 黑壳	MPH	47.64d	-20.00d	44.26b	-25.37f	33.33b	27.27c	98.89b
	BPH	7.50b	-50.00c	15.79b	-55.36f	25.71a	75.00b	31.29c
11A × 21 号	MPH	58.37c	0c	37.93b	-5.26e	25.98c	9.09e	149.33a
	BPH	18.24a	-33.33b	14.29b	-41.3e	23.08b	50.00c	84.35a
11A × 白壳	MPH	35.64d	-20.00d	16.13d	-3.33e	20.00e	16.67d	80.04c
	BPH	-0.95b	-50.00c	-7.69c	-40.82e	7.69c	40.00d	18.64d
2397A × 白壳	MPH	34.23e	33.33a	57.89a	15.56d	13.18f	9.09e	44.81 de
	BPH	0b	0a	32.35a	-23.53d	8.96c	50.00c	2.52 fg
13A × 黑壳	MPH	38.86d	-60.00f	-51.28i	-66.2h	38.74a	9.09e	17.81f
	BPH	7.72b	-75.00e	-66.07h	-77.78g	35.09a	50.00c	-16.78i
11A × 棕壳	MPH	36.17d	-20.00d	-20.00f	-17.81f	33.87b	27.27c	28.31 ef
	BPH	0b	-50.00c	-36.84e	-46.43f	18.57b	75.00b	-7.16h
314A × 黑壳	MPH	39.46d	0c	22.81c	42.86c	15.97e	27.27c	54.94d
	BPH	5.07b	-33.33b	0c	-2.17c	6.15d	75.00b	29.25c
2397A × 红壳	MPH	45.61d	-60.00f	-37.70h	12.12d	10.61g	-16.67h	-16.20 gh
	BPH	7.26b	-75.00e	-51.28f	-24.49d	-6.41e	0f	-39.50 kl
2397A × 棕壳	MPH	41.52d	33.33a	-7.14e	5.88e	17.36e	27.27c	30.85 de
	BPH	6.38b	0a	-23.53d	-20.59d	5.97d	75.00b	11.30l
314A × 21 号	MPH	60.22c	-66.67g	-6.67e	-16.42f	12.28f	0f	-15.54 gh
	BPH	9.56a	-75.00e	-37.5e	-48.15f	12.28c	25.00d	-42.13l
314A × 白壳	MPH	58.57c	0c	43.86b	-10.14e	29.13c	20.00d	104.71b
	BPH	4.06b	-25.00b	7.89b	-44.64e	17.14b	50.00c	43.41b
11A × 红壳	MPH	52.02c	-20.00d	-25.93g	72.88b	24.59d	40.00b	32.69 ef
	BPH	1.69b	-33.33b	-42.86f	10.87b	16.92b	75.00b	6.13 efg
314A × 红壳	MPH	39.09d	-66.67g	6.90d	-9.68e	0.74i	9.09e	-1.60 lg
	BPH	-8.52b	-75.00e	-20.51d	-42.86e	-12.82f	20.00e	-31.22 jk
314A × 棕壳	MPH	64.32b	-50.00f	35.85b	-44.68g	20.97d	60.00a	33.21 ef
	BPH	9.73a	-50.00c	5.88b	-61.76f	11.94c	100.00a	1.29g

MPH 为中亲优势值;BPH 为超亲优势值。同列不同字母表示在 0.05 水平差异显著

MPH for mid-parent heterosis, BPH for heterobeliosis. Different letters in the same column represent significant at 5% level

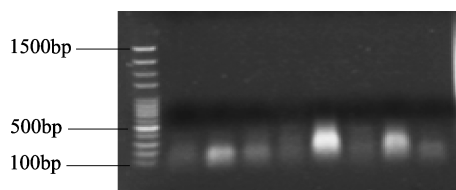


图1 部分材料选择性扩增产物检测结果

Fig.1 Part of the material test results of selective amplification products

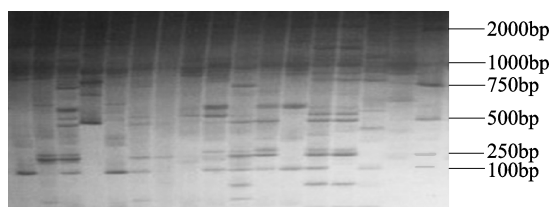


图2 部分材料聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2 Part of the material of polyacrylamide gel electrophoresis

将每个扩增带 (TDF, transcript-derived fragment) 代表一种特异的 mRNA。利用筛选出的 12 对引物进行分析,得到 1537 条条带,其中片段长度范围在 50 ~ 600 bp 的 TDFs 共 315 条,平均每对引物可扩增出 26.25 条 TDFs,并且每个杂交种及其亲本的片段数和差异片段比例均不同。

通过对各 TDF 差异展示类型的统计分析,将其划分为 7 种:1) P1F1 型,即该条带仅在父本和杂种中出现,而在母本中不出现;2) P2F1 型,即该条带仅在母本和杂种中出现,而在父本中不出现;3) F1 型,

即该条带仅在杂种中出现,而在双亲中不出现;4) P1 型,即该条带仅出现在父本中,而在母本和杂种中没有出现;5) P2 型,即该条带仅出现在母本中,而在父本和杂种中没有出现;6) P1P2 型,即该条带在双亲中有,而杂种中没有;7) P1F1P2 型,即该条带在杂种和双亲中均出现(图 3)。

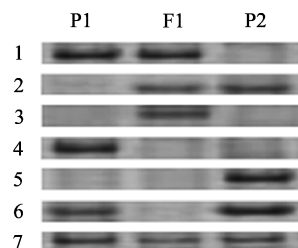


图3 各差异条带类型

Fig.3 The different band types

从图 4 可知,P1F1 型、P2F1 型两种类型是数量最多的,分别占总检测 TDF_s 的 35.2% 和 29.5%,这两种展示类型可归为显性效应类型;P1 型、P2 型是第二大差异展示类型,共占总检测数的 26.7%,其展示类型也可归为显性效应类型;差异展示类型 F1 和 P1P2,共占总检测数的 4.8%,且表现出正向或负向的超显性;P1F1P2 型是第四大差异显示类型,包含显性效应与加性效应,占检测总数的 3.8%。虽然 cDNA-AFLP 差异显示技术不能鉴定这些 TDF_s 的精确表达量,但可以得出杂种各性状的表现主要受到的是显性效应的影响,而受到加性效应和基因互作效应的影响程度相对较小。

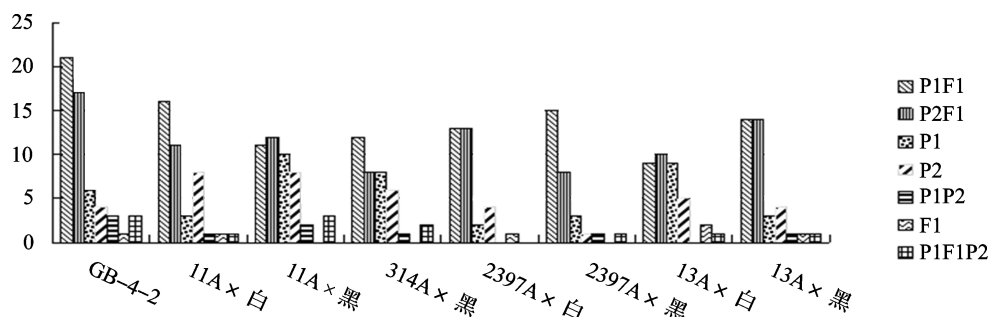


图4 杂交组合中各差异显示类型出现次数

Fig.4 The number of different types between the combinations

(2) TDF 差异类型与杂种表现和杂种优势的相关分析。

将 7 个差异基因表达类型视为 7 个变量,以该变量在不同组合中出现的次数作为参数,与 7 个农艺性状的杂种表现平均值及中亲优势和超亲优势进行相关分析(表 2、3)。从差异基因表达模式

和产量构成因素相关分析的结果中可以看出,有效分蘖数与 P1F1 呈极显著正相关,单株鲜重与 P1P2、叶长与 P2 差异基因表达模式呈显著正相关,成株期叶片数与 F1 差异基因表达模式呈极显著负相关。

对不同差异表达类型与中亲优势相关分析的结

表 2 基因差异表达模式与产量构成因素相关性

Table 2 The correlation between F1 gene differentially expressed patterns and yield components

类型 Type	株高 Plant height	有效分蘖数 Effective tiller number	穗长 Ear length	成株期叶片数 Leaf number of mature stage	叶长 Leaf length	叶宽 Leaf width	单株鲜重 Plant fresh weight
P1F1 型	0.02	0.726 **	0.344	0.216	0.027	-0.332	0.568
P2F1 型	0.542	0.246	0.422	-0.394	0.427	-0.431	0.561
P1 型	-0.039	-0.179	-0.021	-0.153	0.055	-0.218	0.111
P2 型	0.302	0.243	0.184	-0.321	0.647 *	-0.118	0.452
P1P2 型	0.166	0.572	0.428	0.18	-0.075	-0.431	0.659 *
F1 型	0.361	-0.267	0.291	-0.81 **	0.564	0.098	0.118
P1F1P2 型	0.076	0.354	0.262	0.135	-0.069	-0.545	0.512

* 表示 $P \leq 0.05$ 水平下显著; ** 表示 $P \leq 0.01$ 水平下显著。下同
* and ** indicated significant at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively. The same as below

表 3 基因差异表达模式与 7 个性状中亲和超亲优势相关性

Table 3 The correlation between F1 gene differentially expressed patterns and high-parent heterosis

差异表达模式 Different expression pattern		产量相关性状 Yield related traits						
		株高 Plant height	有效分蘖数 Effective tiller number	穗长 Ear length	成株期叶片数 Leaf number of mature stage	叶长 Leaf length	叶宽 Leaf width	单株鲜重 Plant fresh weight
P1F1 型	MHR	-0.096	0.481	0.251	-0.004	0.395	-0.326	0.262
	BHR	-0.159	0.449	0.17	-0.025	-0.006	-0.332	0.165
P2F1 型	MHR	0.411	0.15	0.785 **	-0.1	-0.278	-0.583	0.488
	BHR	0.407	0.272	0.732 **	-0.104	-0.165	-0.731 **	0.514
P1 型	MHR	0.162	-0.197	-0.062	-0.105	0.041	0.04	0.695 *
	BHR	0.022	0.063	-0.073	-0.144	0.332	-0.218	0.283
P2 型	MHR	0.112	0.361	0.396	0.034	0.01	-0.161	0.637 *
	BHR	0.299	0.143	0.44	-0.016	0.485	-0.118	0.593
P1P2 型	MHR	0.119	0.4	0.276	-0.02	0.401	-0.619 *	0.661 *
	BHR	0.126	0.573	0.22	-0.075	0.318	-0.731 **	0.594
F1 型	MHR	0.345	-0.418	0.537	-0.553	-0.227	0.319	-0.188
	BHR	0.044	-0.567	0.478	-0.526	-0.059	0.098	-0.283
P1F1P2 型	MHR	0.153	0.233	0.126	0.01	0.316	-0.445	0.743 *
	BHR	0.111	0.5	0.085	-0.054	0.402	-0.645 *	0.594

MHR 为差异表达模式与中亲优势相关系数;BHR 为差异表达模式与超亲优势相关系数
MHR for correlation coefficients between different expression and mid-parent heterosis, BHR for correlation coefficients between different expression and heterobeltiosis

果中发现,穗长与 P2F1 型呈极显著正相关,叶宽与 P1P2 型呈显著负相关,单株鲜重与 P1 型、P2 型、P1P2 型、P1F1P2 型呈显著正相关。在不同差异表达类型与超亲优势相关分析的结果中表明,穗长与 P2F1 型呈极显著正相关,叶宽与 P2F1 型、P1P2 型呈极显著负相关。

由以上结果可知,穗长和 P2F1 差异基因表达模式在与中亲和超亲优势相关性分析中都呈极显著相关,但与 F1 表达型并未表现出显著相关性,这表明杂交组合中可能保留了母本的穗长有利基因。另外,单株鲜重与 P1、P2、P1P2 和 P1F1P2 多种差异基因表达模式都表现出显著的相关性,说明高丹草单

株产量性状杂种优势是双亲间性状互补和基因及基因效应等多种因素相互影响共同作用的结果。

(3) 单个差异展示的 TDF 与杂种表现和杂种优势的关系。

以某个 TDF 在杂种或双亲中出现与否, 分别对 7 个产量相关性状的三种数据类型(杂种和亲本表现平均值、中亲优势和超亲优势)共 21 个变量分组并作相关分析。因为单个 TDF 在双亲和杂种中存在差异表达, 所以将 8 个杂交组合中检测到的 315 个差异 TDF 与杂种和双亲的 7 个性状表现进行分析, 在 15×315 次显著测验中, 有 189 次显著或极显著, 约占总数的 4.0%, 其中正相关 85 次, 负相关 104 次。在单个 TDF 与中亲优势和超亲优势的相关分析中, 在 $2 \times 8 \times 315$ 次显著测验中, 有 96 次显著或极显著, 占总数的 1.9%。中亲优势的有 65 次, 其中正相关 42 次, 负相关 23 次; 超亲优势的有 31 次, 其中正相关 19 次, 负相关 12 次。这些有显著差异的 TDF 在 3 种数据类型中的分布是不一样的, 其分布特点为: 1) 在所有显著差异的 TDF 中, 对杂种和亲本表现有显著效应的最多, 中亲优势其次, 超亲优势次之; 2) 与三种数据类型都相关的差异 TDF 只有 1 个。重复的仅占其中很少一部分, 说明控制杂种和亲本表现的基因与产生杂种优势的基因绝大部分是不同的。

不同差异 TDF 的效应方向是不同的, 同一差异 TDF 对不同数据类型的相同性状方向是一致的, 但对不同的性状效应方向则不定。对于不同数据类型, 差异 TDF 的效应方向的比例也是不一样的, 在杂种和亲本的表现中, 差异 TDF 为负效应的多于正效应的, 负效应的占 56.5%; 在中亲优势和超亲优势中, 则是正效应的多于负效应的, 其中中亲优势正效应的占 61.5%, 超亲优势正效应的占 65.4%。由于亲本基因组成成分的渗入加大了高丹草杂种与亲本间的遗传差异, 渗入了某些对杂种优势有贡献的基因, 杂交种后代表现正效应的差异 TDF 较多, 杂种的中亲优势和超亲优势值也较高。

2.4 测序与功能预测

(1) TDFs 的测序分析。

将在两次选择性扩增反应中分子量及差异表达类型表现均一致同时将 7 种差异表达类型均包含在内的 25 条差异条带进行了回收。由于部分条带在回收过程中得率较小, 因而成功回收了 13 个基因差异表达片段。以回收产物为模板, 使用选择性扩增引物进行再扩增得到了 8 条纯化后片段(图 5)进行

测序, 全部测序成功。8 个差异基因片段中有 2 个属于杂种条带差异表达类型(F1 型), 其余 6 个分别属于 6 种不同的差异表达类型。



图 5 切胶回收产物琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 5 agarose gel electrophoresis for the recovery products of gel

(2) TDFs 的 BLAST 分析。

对转录衍生片段与在线核酸数据库的核苷酸序列同源性进行了比较, 列出序列同源性较高的两个比对结果(表 4)。从各 TDFs 同源序列比对结果得知, 同源性最高的物种为高粱和玉米, 较高的有谷子、小麦、大麦、毛竹、野生稻等, 绝大部分为禾本科作物。

表 4 转录衍生片段核苷酸同源性比较

Table 4 Homology of transcription-derived fragments(TD Fs) sequences

编号 No.	氨基酸一 致性(%) Identities of amino acid	Genbank ID	同源物种 Organism
TDF1	99	XM_002447646.1	[<i>Sorghum bicolor</i>]
	94	XM_004975307.2	[<i>Setaria italica</i>]
TDF2	98	XM_002438659.1	[<i>Sorghum bicolor</i>]
	95	KF184756.1	[<i>Saccharum</i>]
TDF3	88	LL958722.1	[<i>Schistosoma rodhaini</i>]
	87	CP009279.1	[<i>Paenibacillus</i>]
TDF4	100	XM_002442748.1	[<i>Sorghum bicolor</i>]
	88	XM_010241219.1	[<i>Brachypodium distachyon</i>]
TDF5	99	XM_002460642.1	[<i>Sorghum bicolor</i>]
	87	AK365095.1	[<i>Hordeum vulgare</i>]
TDF6	100	BT069645.2	[<i>Sorghum bicolor</i>]
	84	FP097685.1	[<i>Phyllostachys edulis</i>]
TDF7	100	NM_001154258.1	[<i>Zea mays</i>]
	80	AK330387.1	[<i>Triticum aestivum</i>]
TDF8	100	BT069323.2	[<i>Zea mays</i>]
	87	CU405666.144.1	[<i>Oryza rufipogon</i>]

同时, 将获得的转录衍生片段利用在线查询蛋白数据库进行了蛋白同源性比对。结果显示, 8 个转录衍生片段中, 除 TDF3 未找到同源性蛋白外, 其他 TDFs 都得到相应同源蛋白。对 TDF1 进行同源

性比较后发现同源蛋白为锚蛋白重复序列和山姆结构域蛋白。其中锚蛋白重复序列(ANK)是一种广泛存在于生物个体的序列模体,ANK 结构域介导蛋白质与蛋白质互存互作,其通过不同单体或各种配体联合或单体作用,使得生物个体的复杂功能得以不同展现^[18]。TDF2 片段同源序列是含 PB1 结构蛋白,PB1 结构域主要功能是一种介导专一蛋白质之间的相互作用的模块化结构域;TDF4 片段同源蛋白的功能与Ⅱ类染色质解旋酶 DNA 结合蛋白 2、锌离子结合位点和 H3 组蛋白的结合位点有关;与 TDF5 片段同源性最高的是溶酶体胱氨酸转运体;TDF6 片段同源序列是积分膜单 C2 结构域蛋白;TDF7 片段同源蛋白是细胞色素 C 蛋白。细胞色素 C 是线粒体呼吸链中电子传递的载体,基于这一功能,CytC 参与生物体内一系列重要的氧化还原反应^[19]。

表 5 半定量 RT-PCR 引物设计

Table 5 Semi quantitative RT-PCR primer design result

引物类型 Primer type	编号 No.	序列(5'->3') Sequence(5' - >3')	模板链 Template strand	长度(bp) Length	退火温度 (℃) T _m	GC 含量 (%) GC	产物长度(bp) Product length
Forward primer	D1	TGGTGTGCGTGATCTACGTG	Plus	20	60.39	55.0	80
Reverse primer		GCTTTCGCTTTGGAGGATCG	Minus	20	59.62	55.0	
Forward primer	D2	GTGGGCTTGTCTGTCTTGA	Plus	20	59.89	55.0	82
Reverse primer		AAGCTCGACCAGTTCGCATT	Minus	20	60.32	50.0	
Forward primer	D3	TCCACATTTTGTGCTGCGG	Plus	20	59.97	50.0	94
Reverse primer		GATGACTCCTGAGTAACAAGGC	Minus	22	58.47	50.0	
Forward primer	D4	GCTGCTTCAATCACCAGCAA	Plus	20	59.40	50.0	100
Reverse primer		GAATTGAGCGTGCTGCAAGA	Minus	20	59.13	50.0	
Forward primer	D5	GACACCAAGATCCCCGACAA	Plus	20	59.68	55.0	177
Reverse primer		TGTGTAGCCGACAACCTCAA	Minus	20	59.25	50.0	
Forward primer	D6	GATATCACGGAGGTGACGGT	Plus	20	58.97	55.0	127
Reverse primer		TATGTAGAGGAGCGCGACGA	Minus	20	60.53	55.0	
Forward primer	D7	AGTCCAAAGGCAAAGGGCAA	Plus	20	60.40	50.0	165
Reverse primer		TCCCGCAGAGTAGGAGTAGC	Minus	20	60.47	60.0	
Forward primer	D8	TTCGTGCGGTTTGATCTCGT	Plus	20	60.32	50.0	130
Reverse primer		GAAGAACCAGCTTGGCGTTG	Minus	20	60.04	55.0	

通过较为准确的引物设计,8 个差异基因片段普遍具有较高水平的表达,并且 RT-PCR 产物片段大小与设计相符(图 6)。半定量 RT-PCR 结果进一步证明了利用 cDNA-AFLP 筛选差异基因的可能性。

3 讨论

3.1 高丹草杂种与亲本之间的基因差异表达

杂种优势的产生是一个十分复杂的过程,由于

TDF8 片段同源序列是广泛存在于生物界的 Ras 蛋白,具有弱的 GTP 酶活性,结合 GTP 和 GDP 时分别为活化态和失活态,所以 Ras 蛋白也是 GTPase 开关蛋白。Ras 蛋白的活性状态对细胞的生长、分化、细胞骨架、蛋白质运输和分泌等过程都具有影响,PTK、Ras、Raf、MAPKK、MAPK 通过复杂的蛋白间的互作以及蛋白质磷酸化等机制,通过控制外界信号传入调控细胞生长,利用与 GTP 或 GDP 结合进行活性调节^[20]。许多真核细胞中,Ras 在 RTKs 介导的信号通路中也是一种关键组分。

2.5 RT-PCR 分析

为确保 cDNA-AFLP 结果的可靠性,将获得的 8 个特异表达的 TDFs 进行了 RT-PCR 验证。以 GAPDH 作为内参,根据 TDF 序列应用 NCBI 数据库及 primer 3 设计引物,见表 5。

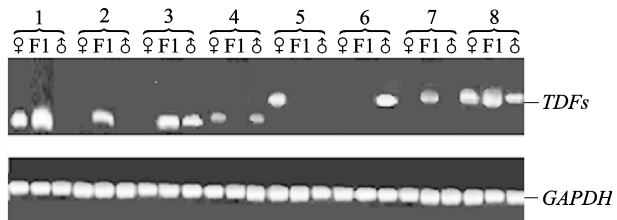


图 6 差异表达基因的半定量 RT-PCR 验证

Fig. 6 Expression validation of differentially expressed genes by RT-PCR

亲本基因间的促进或抑制影响决定了杂交后代的基因表达类型和表达量。本研究利用 cDNA-AFLP 基因差异显示技术对高丹草强优势组合双亲及杂交种进行差异表达检测,共得到 7 种基因差异表达类型:即共同表达型(P1F2P2)、P1 表达型(P1)、P2 表达型(P2)、F1 表达型(F1)、P2F1 表达型(P2F1)、P1F1 表达型(P1F1)和 P1P2 表达型(P1P2),除了第一种外,其余 6 种均为亲本与杂种间的差异表达类型。差异表达类型又可分为 4 种表达模式:单亲显性表达型包括 P2F1 和 P1F1 差异展示类型,分别占有差异表达基因的 35.2% 和 29.5%;单亲沉默表达型包括 P1 和 P2 差异展示类型,分别占有差异表达基因的 14.0% 和 12.7%;杂种下调表达型即 P1P2 差异展示类型仅占有差异表达基因的 2.9%;杂种上调表达型即 F1 差异展示类型量最少,占有差异表达基因的 1.9%。因此,研究发现显性表达和超显性表达类型占有差异表达基因的 96.2%,说明显性表达是主要形式,这与前人在高丹草中的研究结论相一致^[17],可能是亲本中有利基因在杂种后代中的累积表现。

通过对 8 个高丹草杂交组合及其双亲的表达谱分析,总计获得 315 个 TDFs,而且单亲显性表达型的两种差异展示类型为主要类型,另外 5 种差异表达类型在 8 个杂种和亲本差异基因中所占的比例存在一定的变化。研究发现显性和超显性是影响高丹草杂种优势形成的主要遗传效应,与加性效应在水稻^[21-22]、小麦^[23]等自花授粉作物中起主要作用不同,显性和超显性效应在玉米^[24]等异花授粉作物中对杂种表现贡献较大。高丹草是常异花授粉作物,其杂种后代含有大量外源基因,因而高丹草杂种的遗传杂合度就明显高于水稻、小麦等种内杂种,其杂合度与玉米相近。植物的杂种优势虽然是受加性、显性和超显性等多种效应影响,但与其他效应相比,在高丹草杂种中显性效应对杂种优势的贡献更加明显。

3.2 半定量 RT-PCR 的应用

半定量 RT-PCR 具有易操作、快捷和重复性好等特点,并且灵敏度高,尤其在样品量不足或基因的表达量低时,效果更加明显^[25]。目前,半定量 RT-PCR 作为一种快速检测、鉴定特异性基因表达的方法,被广泛应用于植物育种、植物病理、植物营养等研究领域中。利用该技术,张晓娟等^[26]研究了与小麦的抗旱性密切相关的脱水素基因的表达;丁国华等^[27]研究了黄瓜 *RGA* 基因的表达;邓

倩等^[28]研究了亚麻耐盐性关键基因 *NHX* 基因的表达;秦余香等^[29]研究了小麦 *TaHAK1* 基因的克隆及表达。

本研究利用 cDNA-AFLP 技术在杂交组合和双亲中进行基因差异表达分析并克隆、测定了部分 TDFs 的序列,而且对差异片段通过 cDNA 的克隆,对其功能进行推测,这些基因既可以作为筛选高产优质品种的候选种质资源,也可以作为后期进一步剖析杂种优势机制的理想材料。另外,经 RT-PCR 验证后的差异谱带可进一步发展为与高丹草强优势组合相关的分子标记,即将差异表达 cDNA 进行 PCR 标记化,可为提高高丹草强优势组合的筛选效率以及高丹草种质资源的研究与应用提供依据。随着技术手段的不断升级,植物杂种优势的理论也在不断得到补充和发展,有更多的杂种优势相关基因被发现或克隆。然而,杂种优势的形成是一个多种因素综合作用的结果^[30-36],要全面深入的认识这种重要的生物学现象,还需要从不同水平上进行大量的研究,才有可能最终揭示杂种优势的生物学机制。

参考文献

- [1] 詹秋文,钱章强.高粱与苏丹草杂种优势利用的研究[J].作物学报,2004,30(1):73-77
- [2] 王和平,张福耀,程庆军,等.高粱-苏丹草杂交草的研究与利用[J].杂粮作物,2000,20(4):20-23
- [3] Chung J M, Lee B C, Kim J S. Fine-scale structure among genetic individuals of clone-forming monotypic genus *Echinophora koreensis* (Fabaceae) [J]. Ann Bot, 2006, 98: 165-173
- [4] Swanson-Wagner R A, Jia Y, DeCook R, et al. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1-hybrid and its inbred parents [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 6805-6810
- [5] Meyer S, Pospisil H, Scholten S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and over dominant pattern [J]. Plant Mol Biol, 2007, 63: 381-391
- [6] 张小蒙,肖宁,张洪熙,等.水稻基因差异表达与杂种优势的关系分析[J].中国农业科学,2012,45(7):1235-1245
- [7] 张新忠,吕亮杰,吕超,等.大麦农艺性状与产量性状的杂种优势分析[J].麦类作物学报,2013,33(1):39-43
- [8] 王章奎,倪中福,孟凡荣,等.小麦杂交种与亲本拔节期根系基因差异表达与杂种优势关系的初步研究[J].中国农业科学,2003,36(5):473-479
- [9] 李全辉,李锡香,王海平,等.黄瓜抗黑星病相关基因的差异表达分析[J].植物遗传资源学报,2013,14(3):501-506
- [10] Lu X P, Yun J F, Gao C P. QTL Analysis of economically important traits in *Sorghum bicolor* × *S. sudanense* hybrid [J]. Can J Plant Sci, 2011, 91: 81-90
- [11] 逯晓萍,云锦凤,张雅慧,等.高丹草重组自交系群体的遗传变异与高产种质的创新[J].华北农学报,2009,24(5):90-95
- [12] 逯晓萍,云锦凤,米福贵,等.基于性状和分子标记的高丹草近等基因系的分离研究[J].中国农业科学,2010,43(3):468-473

- [13] 逯晓萍,云锦凤,米福贵,等. 高丹草株高与叶片数主基因 + 多基因的遗传分析[J]. 草地学报,2009,17(6):713-717
- [14] 刘丹丹,逯晓萍,温莹,等. 高丹草种质资源 SRAP 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 华北农学报,2012,27(2):1-8
- [15] 温莹,逯晓萍,任锐,等. 高丹草 EST-SSR 标记的开发及其遗传多样性[J]. 遗传,2013,35(2):225-232
- [16] 逯晓萍,云锦凤,米福贵,等. 高丹草(高粱 × 苏丹草)产量及其构成因素的 QTL 分析[J]. 华北农学报,2007,22(4):80-85
- [17] 逯晓萍,刘丹丹,王树彦,等. 高丹草遗传效应与杂种表现预测模型[J]. 作物学报,2014,40(3):466-475
- [18] 杜海宁,胡红雨. 锚蛋白重复序列介导的蛋白质-蛋白质相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展,2002(1):6-9
- [19] 王海波. 植物细胞色素 C 家族蛋白的同源聚类分析[J]. 生物信息学,2010(4):334-335
- [20] 康小伟. Ras 蛋白与信号传导[J]. 生命科学,1996(2):24-26
- [21] 倪先林,张涛,蒋开锋,等. 杂交稻特殊配合力与杂种优势、亲本间遗传距离的相关性[J]. 遗传,2009,31(8):849-854
- [22] 游书梅,曹应江,郑家奎,等. 杂交水稻子粒 QTL 标记遗传距离与粒重、粒重杂种优势的相关性[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(6):1050-1054
- [23] Sun Q X, Wu L M, Ni Z F, et al. Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross[J]. Plant Sci, 2004,166:651-657
- [24] Hoecker N, Keller B, Muthreich N, et al. Comparison of maize (*Zea mays* L.) F1-hybrid and parental inbred line primary root transcriptomes suggests organ-specific patterns of nonadditive gene expression and conserved expression trends[J]. Genetics, 2008,179:1275-1283
- [25] 胡丹丹,顾金刚,姜瑞波,等. 定量 RT-PCR 及其在植物学研究中的应用[J]. 植物营养与肥料学报,2007,13(3):520-525
- [26] 张晓娟,张林生,杨颖. 水分胁迫下小麦类脱水素基因表达的半定量 RT-PCR 分析[J]. 西北植物学报,2007,27(11):2158-2162
- [27] 丁国华,许春梅,于虹,等. 黄瓜 RGA 基因的半定量 RT-PCR 表达分析[J]. 西北植物学报,2010,30(4):645-651
- [28] 邓倩,王艳,王伟,计巧灵. 盐胁迫下 3 种纤维亚麻 *NHX* 基因表达规律[J]. 中国农学通报,2014,30(6):154-158
- [29] 秦余香,田延臣,王军,等. 小麦耐盐相关基因 *TaHAK1* 的克隆与表达分析[J]. 麦类作物学报,2011(6):1014-1019
- [30] Birchler J A, Yao H, Chudalayandi S, et al. Heterosis[J]. Plant Cell, 2010,22(7):2105-2112
- [31] 刘红梅,刘建丰,邱颖波,等. 粳型杂交稻淀粉 RVA 谱特征值的杂种优势分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):434-439
- [32] Goff SA. A unifying theory for general multigenic heterosis: energy efficiency, protein metabolism, and implications for molecular breeding[J]. New Phytol, 2011,189(4):923-937
- [33] 许晨璐,孙晓梅,张守攻. 基因差异表达与杂种优势形成机制探讨[J]. 遗传,2013,35(6):714-726
- [34] Sanghera G S, Wani S H, Hussain W, et al. The magic of heterosis: New tools and complexities[J]. Nat Sci, 2011,9(11):42-53
- [35] Baranwal V K, Mikkilineni V, Zehr U B, et al. Heterosis: emerging ideas about hybrid vigour[J]. Exp Bot, 2012, 63(18):6309-6314
- [36] Kaeppler S. Heterosis: many genes, many mechanisms-end the search for an undiscovered unifying theory[J]. ISRN Bot, 2012:682-688