



王一帆,王韞慧,李金红,等.大豆 *GmMS1* 雄性不育分子机制与功能分化研究[J].黑龙江农业科学,2022(9):14-19.

大豆 *GmMS1* 雄性不育分子机制与功能分化研究

王一帆,王韞慧,李金红,蔺佳雨,冯湘池,曹振林,姚士恩,李美娜

(广州大学 生命科学院,广东 广州 510006)

摘要:为探究本实验室克隆的大豆 *msl* 突变体位点编码基因(*GmMS1*)调控雄性育性的分子机制,通过原核表达分别获得 *GmMS1* 和其马达结构域单氨基酸置换突变体(*GmMS1A263L*) *urmsl* 的马达结构域(Motor Domain, MD)与 His 标签融合蛋白,*GmMS1* MD-His 和 *URMS1* MD-His 蛋白。体外微管结合实验揭示 *urmsl* 与微管结合能力显著降低,表明 *GmMS1* 第 263 位精氨酸是参与微管结合的关键氨基酸,因此 *urmsl* 由于微管结合能力减弱从而影响其驱动蛋白功能,导致雄性不育;为解析 *GmMS1* 与其拟南芥同源基因 *AtNACK2*(NPK1-activating kinesin)在进化上是否出现功能分化,利用 CRISPR/Cas9 技术创制 *AtNACK2* 马达结构域功能丧失型突变体,对育性表型进行观察,结果表明,*AtNACK2* 功能丧失导致植株半不育,因此从遗传上证明 *GmMS1* 与 *AtNACK2* 的确出现了基因功能分化。

关键词:大豆;雄性不育;*GmMS1*;驱动蛋白;杂种优势

大豆(*Glycine max*)是世界上最重要的粮食作物之一,我国大豆耕种面积有限、单产水平远低于世界平均水平^[1],现已成为全球最大的大豆进口国,因此快速提高我国大豆产量已成为大豆生产中最紧要的任务^[2]。杂种优势利用是提高作物单产最有效的途径之一,在玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)等作物中已被成功应用,产量可增加 15%~200%^[3-5]。大豆中没有大规模应用杂种优势的主要原因是杂交种子的生产需要具有遗传多样性的亲本异花授粉,而目前大豆雄性不育系受遗传背景狭窄、杂交种制种困难等因素制约。大豆 *msl* 突变体是自然条件下突变导致的核基因控制的雄性不育系,其营养生长正常,但只结荚,不结种,是理想的不育材料^[6]。因此,本试验对大豆雄性不育基因 *GmMS1*(Glyma.13G114200)分子机制与功能分化进行研究,以期为助力雄性不育系的改良,实现大豆杂种优势的大规模应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆材料为 Williams 82(Wm 82),拟南芥材料为 Col-0 生态型,均由广州大学分子

遗传与进化创新研究中心实验室保存;大豆单片段代换系群体 *msl*-Urbana×Jilin21(BC₅F₅)(下文由 *urmsl* 表示)来自吉林省农业科学院大豆国家工程研究中心。

1.1.2 主要载体及菌株 大肠杆菌感受态 DH5α 和 DE3 菌株购买于深圳康体生命科技有限公司;农杆菌 GV3101 菌株购买于上海唯地生物技术有限公司;pTF101、pHEE401 和 pET-28a 载体由广州大学分子遗传与进化创新研究中心实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥种子消毒及种植条件 将拟南芥种子置于 1.5 mL 离心管中,吸取 1 mL 70%乙醇于离心管中,吹打混匀后倒掉进行初步消毒;加入 1 mL SSS 消毒液(50%漂白剂+50% ddH₂O+0.02% TritonX-100),旋转摇床低速转动消毒 15 min,后弃消毒液,使用 ddH₂O 冲洗至无味后移至超净台;将种子平铺于 1/2 MS 平板,将平板上的水晾干,封透气膜,将铺好的种子于 4℃冰箱遮光放置。

在 3 d 后转入光照培养箱(22℃,16 h 光照,8 h 黑暗)直至可以移到土中。

1.2.2 大豆种植条件 将大豆种子播于草炭土中,按照 2:1 比例加入蛭石,移至温室中培养(25℃,16 h 光照,8 h 黑暗)。

1.2.3 大豆 *MS1* 及 *urmsl* 马达结构域克隆 按照上述种植条件,待大豆生长至开花,分别取野生型 Wm 82 和突变体 *urmsl* 的授粉前花苞于液

收稿日期:2022-06-02

基金项目:国家自然科学基金(32072084)。

第一作者:王一帆(1997-),女,硕士研究生,从事大豆杂种优势利用研究。E-mail:yifanwang0611@163.com。

通信作者:李美娜(1977-),女,博士,副教授,从事大豆杂种优势利用和生物钟与环境互作研究。E-mail:limeina@gzhu.edu.cn。

氮中速冻。参照 RNA 提取试剂盒 (RNA pure Plant Kit, Cwbio) 说明书提取 RNA。参照反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit, Takara) 说明书将上述 RNA 反转录成 cDNA。

将上述花苞 cDNA 作为模板,利用带有 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点的特异性引物 *GmMSI* / *urmsl* MD-F/R 对 *MSI* / *urmsl* 马达结构域 (Motor Domain, MD) 所在区间 cDNA 进行扩增 (表 1)。

表 1 *MSI* 及 *urmsl* 马达结构域扩增引物列表

引物	引物序列 (5'-3')	功能
<i>GmMSI</i> / <i>urmsl</i> MD-F	GGAATTCAAAATTTCGAGTCACGGTTCGGAT	<i>GmMSI</i> / <i>urmsl</i> MD CDS 扩增引物
<i>GmMSI</i> / <i>urmsl</i> MD-R	ACGCGTCGACGACTTCCTTTGCACTGGT	

1.2.4 重组蛋白 *MS1MD-His* 及 *URMS1MD-His* 表达及纯化 通过 *EcoR* I 和 *Sal* I 对原核表达载体 pET28a (with His Tag) 和扩增片段 *GmSM1MD* 及 *URMS1MD* 进行酶切后分别连接,获得 pET28a-*MS1MD* 和 pET28a-*msl* MD 重组载体,转化至 DE3 表达菌株,以空载为阴性对照,在 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG, 37 ℃ 诱导条件下,1 h 后重组蛋白开始表达。

对诱导后的细胞沉淀裂解液进行超声,将超声后诱导细胞 4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心,取上清与沉淀制样,在上清中检测到目的蛋白。利用 Ni-agrose 亲和层析纯化目的蛋白,用于后续微管共沉淀试验。

1.2.5 微管共沉淀试验 取 0.01 mg 固体微管 (MT) 置于冰上解冻,加入 90 μL PEMT (PIPES 100 mmol·L⁻¹, EGTA 1 mmol·L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol·L⁻¹, Taxol 20 μmol·L⁻¹, GTP 1 mol·L⁻¹), 轻轻吹打混匀,置于 37 ℃ 水浴箱水浴 30 min。

取马达结构域蛋白 25 μL (0.5 mg·mL⁻¹) 加入 25 μL 上述含有 MT 的 PMET 溶液,轻轻混匀后,室温下平衡 30 min。

加入 50 μL 甘油垫子,室温下 50 000 g 离心

30 min,取 40 μL 上清加 10 μL 5×Loading Buffer, 沉淀加 20 μL 1×PBS 缓冲液和 5 μL 5×Loading Buffer,利用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.2.6 拟南芥 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的构建与转化 根据网站 <http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>, 在 *AtNACK2* 保守序列中筛选 2 个靶点,将该段序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,排除非特异性的靶点 (表 1)。

参考 Chen 等^[7] 的方法,构建双靶点 pHEE401-2gR 克隆载体,转化 DH5α 感受态细胞,挑取单克隆通过引物 U626-IDF/R (表 2) 进行菌落 PCR 验证,挑取验证成功的单克隆送至北京天一辉远生物科技有限公司测序,将构建成功的载体转入农杆菌 GV3101。

接菌至 250 mL 液体培养基中,在 28 ℃, 220 r·min⁻¹ 条件下过夜摇菌,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,收集沉淀,加入 250 mL 侵染液 (MS Medium 0.55 g, Sucrose 12.5 g, Silwet L-77 50 μL, 蒸馏水 250 mL) 重悬沉淀,将盛花时期拟南芥的花浸入到侵染液中保持 3 min 后取出,室温避光培养 24 h 后再转入温室培养。

表 2 *AtNACK2* 靶点序列及靶点检测引物列表

引物	引物序列 (5'-3')	功能
<i>AtNACK2</i> MD-DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTTGGAGGAAGTGGTAGAAAGCGTT	<i>AtNACK2</i> -靶点 1
<i>AtNACK2</i> MD-DT1-F0	TTGGAGGAAGTGGTAGAAAGCGTTTATAGACTAGAAATAGC	
<i>AtNACK2</i> MD-DT2-R0	AACGCTTTCTACCACTTCCTCCAAATCTCTTAGTCGACTCTAC	<i>AtNACK2</i> -靶点 2
<i>AtNACK2</i> MD-DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACGCTTTCTACCACTTCCTCCA	
U626-IDF	TGGTCCCAGGATTAGAATGATTAG	鉴定骨架
U626-IDR	GCAGCCCTCTTCTTTTCGATCCATCAAC	
<i>AtNACK2</i> -JDF1	TACCAATAAAACCGTTTTTGG	靶点 1 检测引物
<i>AtNACK2</i> -JDR1	GTCCCGATGATGAGACTATCG	
<i>AtNACK2</i> -JDF2	GTGCAACTCAAGAGGTGTATG	靶点 2 检测引物
<i>AtNACK2</i> -JDR2	GCAGTCTCAGGGAAATAGCAGGC	

2 结果与分析

2.1 GmMS1MD-His 及 URMS1MD-His 与微管体外结合能力检测

早期研究发现 *urms1* 突变体不能进行减数分裂后的胞质分裂,导致其花粉粒变大,体内不能萌发,雄性育性完全丧失^[6]。前期 Fang 等^[8]通过正向遗传学手段对大豆核雄性不育基因 *GmMS1* 进行了克隆,通过烟草瞬时转化、拟南芥微管标记株系 pTUB6::mCherry-TUB6 共转化以及大豆花药免疫荧光等实验对 *GmMS1* 蛋白进行初步功能研究,发现 *GmMS1* 与微管共定位,这提示 *GmMS1* 很可能具有与微管互作的性质。*URMS1* 的突变形式为基因编码序列第 263 位精氨酸置换为半胱氨酸,由极性氨基酸置换为非极性氨基酸,结合之前研究已经揭示微管马达结构域基序 VDLAGE 是潜在的微管结合位点,因此推测这种突变可能影响了 *URMS1* 与微管结合能力。

2.1.1 *GmMS1* MD 及 *urms1* MD 的克隆 将 Wm 82 和 *urms1* 花苞 cDNA 作为模板,对 *MS1* 和 *urms1* 马达结构域所在区间 cDNA 进行扩增。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示在 965 bp 处均扩增出条带,条带清晰且特异(图 1)。利用该产物构建 pET28a-*GmMS1* MD 和 pET28a-*urms1* MD 重

组载体,转化至 DE3 表达菌株,以获得原核表达的 *GmMS1* MD 和 *URMS1* MD 蛋白。

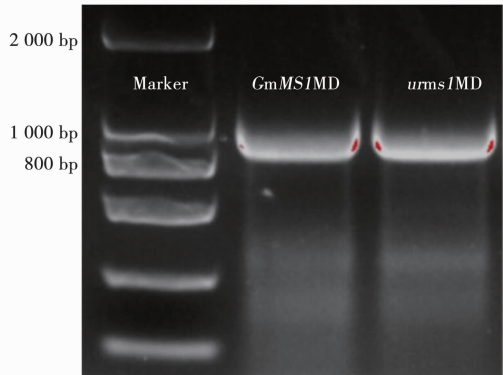


图 1 *GmMS1* MD 及 *urms1* MD 扩增结果

2.1.2 *GmMS1* MD-His 及 *URMS1* MD-His 表达、纯化及定量 为了对 *GmMS1* MD-His 和 *URMS1* MD-His 重组蛋白进行表达和纯化,首先以空载和诱导前(0 h)菌液为阴性对照,在 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG,37 ℃ 诱导 1 h 后重组蛋白开始表达,4 h 后表达量达到峰值(图 2)。取诱导 4 h 细胞沉淀裂解液进行超声破碎,4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心后,取上清与沉淀制备蛋白样品,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示在上清中可以检测到目的蛋白(图 3)。

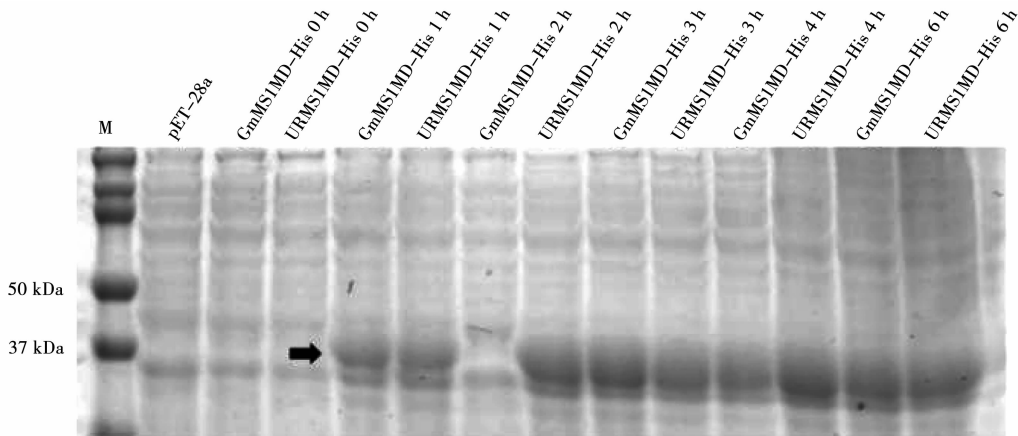


图 2 *GmMS1* MD-His 及 *URMS1* MD-His 重组蛋白诱导表达

注:箭头指示 *GmMS1* MD-His 或 *URMS1* MD-His 重组蛋白目的带。

对亲和纯化后 4 次洗脱样本进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,其结果如图 4 所示,在对应样本的泳道,均有考马斯亮蓝显色反应,对照蛋白 Marker,重组蛋白 *GmMS1* MD-His 及 *URMS1* MD-His 分子量大小均为 40 kDa,主带清晰。BCA 法蛋白定量测得纯化后的蛋白浓度为 0.5 mg·mL⁻¹,*R*² > 0.95 表示标准样浓度检测结果可信(图 5),可以用于共沉淀试验。

2.1.3 *GmMS1* MD-His 及 *URMS1* MD-His 与微管体外结合能力分析 为揭示 *GmMS1* 及 *URMS1* 马达结构域是否能在体外与微管结合,进行体外高速共沉淀试验。首先检测 *GmMS1* MD-His 及 *URMS1* MD-His 是否存在自沉淀现象,将 *GmMS1* MD-His 及 *URMS1* MD-His 与不加微管的缓冲液在室温下孵育 30 min,孵育后超速离心,分别取沉淀和上清制样,聚丙烯酰胺凝胶电泳

检测结果显示 *GmMS1MD-His* 不会自沉淀,而 *URMS1MD-His* 存在自沉淀现象(图 6 泳道 3~6)。

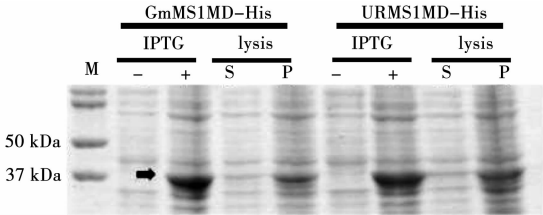


图 3 *GmMS1MD-His* 及 *URMS1MD-His* 重组蛋白超声裂解

注:*GmMS1MD-His* 及 *URMS1MD-His* 重组蛋白 IPTG 诱导 4 h 后细胞沉淀进行超声裂解;S 为上清;P 为沉淀;箭头指示 *GmMS1MD-His* 或 *URMS1MD-His* 重组蛋白目的带。下同。

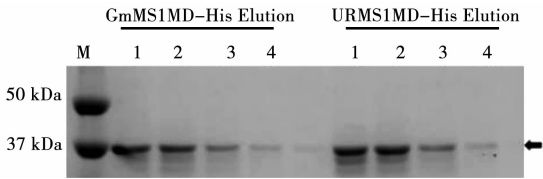
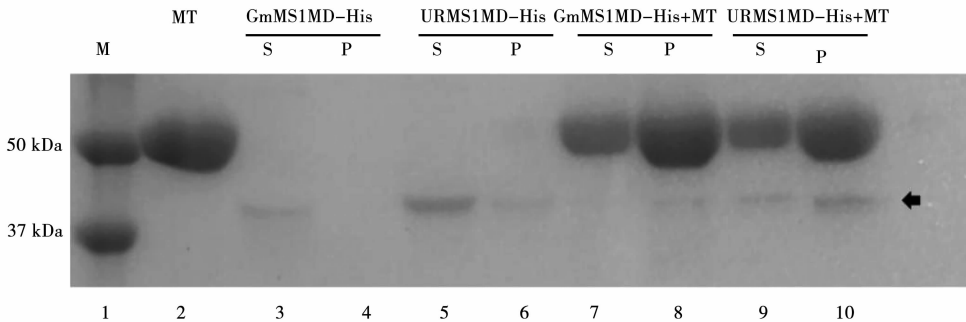


图 4 *GmMS1MD-His* 及 *URMS1MD-His* 重组蛋白纯化

注:超声裂解上清过镍柱 250 mmol·L⁻¹咪唑分 4 次洗脱。



泳道 1. Marker; 泳道 2. 微管(MT; Microtubule); 泳道 3~4. *GmMS1MD-His* 自沉淀离心后上清与沉淀; 泳道 5~6. *URMS1MD-His* 自沉淀离心后上清与沉淀; 泳道 7~8. *GmMS1MD-His* 微管共沉淀离心后上清与沉淀; 泳道 9~10. *URMS1MD-His* 微管共沉淀离心后上清与沉淀。

图 6 *GmMS1MD-His* 及 *URMS1MD-His* 重组蛋白与微管体外共沉淀分析

2.2 CRISPR/Cas9 创制 *AtNACK2* 突变体及育性表型观察

大豆 *urms1* 突变体突变位点位于马达结构域上,植株显示完全不育的表型,已报道的拟南芥多

个突变位点均不在马达结构域上,且位于蛋白质的中间或 C-末端(图 7),推测可能因为现有突变位点均未造成马达结构域结构缺失,蛋白质功能未完全丧失,因此只产生半不育表型。

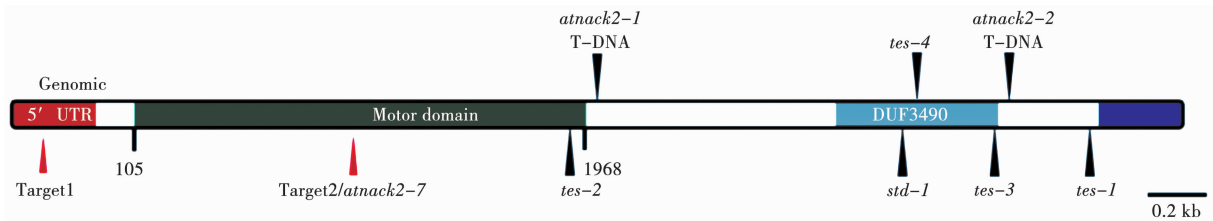


图 7 *AtNACK2* 基因组结构示意图

为探究 *GmMS1* 基因功能在进化中是否出现分化,在 *AtNACK2* 基因 5'UTR 区及马达结构域

区分别选取了一个特异的靶点序列(表 2,图 7),通过 CRISPR/Cas9 技术创制 *AtNACK2* 马达结构

域功能丧失型突变体并观察其育性表型。目前共获得 26 株 T_1 代转基因阳性苗,其中有 10 株转基因植株靶点有编辑,突变类型纯合的共 4 株,突变类型杂合的共 6 株(表 3)。其中 *atnack2-7* 株系在 *AtNACK2* 基因组第 1 427 位插入 T 碱基,导

致蛋白翻译提前终止,造成马达结构域结构缺失(图 8)。与 *tes-4* 突变体一致,*atnack2-7* 果荚较短,表现出半不育的表型(图 9)。试验结果表明 *AtNACK2* 马达结构域破坏只导致拟南芥半不育。

表 3 *atnack2* 突变体靶点编辑情况

编号	靶点 1 编辑情况	靶点 2 编辑情况	突变类型
1	WT	TGGTAGAA--GCAGGCC	杂合
	CGGATGAT-CGCCGG	TGGTAGAATAGCAGGT	
2	WT	WT	杂合
	WT	GGTAGAAAAGCAGGC	
7	WT	GGTAGAATAGCAGGC	纯合
	WT	GGTAGAATAGCAGGC	
8	WT	TAGAAAAGCAGG	纯合
	WT	TAGAAAAGCAGG	
10	WT	GGTAGAAAAGCAGGCA	杂合
	WT	WT	
13	WT	WT	杂合
	GGCGAATCCTCCGGCCGT	WT	
15	WT	GAGAATAGAAAA-GAA	纯合
	WT	AGAATAGAAAA-GAA	
19	WT	WT	杂合
	WT	TAGAAAAGCAGG	
21	GCGAAATCATCC	GAAAAAGCAGGCA	纯合
	GCGAAATCATCC	GAAAAAGCAGGCA	
24	WT	GTGGTAGAA--GCAGG	杂合
	WT	TGGTAGAAAAGCAGG	

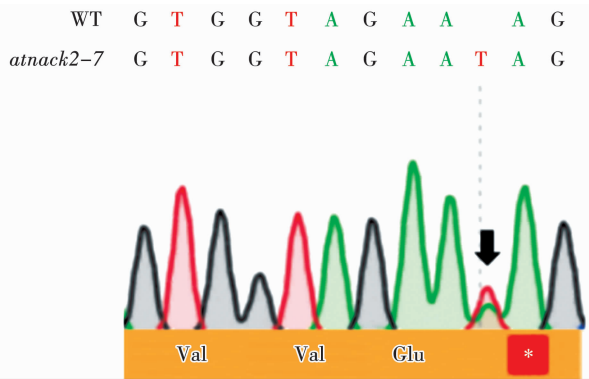


图 8 *atnack2-7* 靶点突变形式

注:突变靶点单峰,表示纯合突变,
红色方框内 * 代表蛋白翻译提前终止。



图 9 *atnack2-7* 果荚中部分种子半不育表型

3 讨论与结论

GmMS1 第 263 位精氨酸突变将大幅度抑制其微管结合能力,未导致完全丧失,原因可能是 GmMS1 马达结构域上还存在其他结合能力较弱的微管结合位点,这需要未来对 GmMS1 马达结构域分段式进行微管结合实验进行探索。其次,URMS1 可能影响其作为驱动蛋白运动性^[9]。精氨酸为极性蛋白,其置换为非极性半胱氨酸极有可能也影响到 GmMS1 依赖微管的运动能力,从而影响到其货物分子的运输具体作用规律、机制还需要进一步的实验验证。胞质分裂过程中需要微管稳定蛋白 MAP65 磷酸化实现成膜体区域微管解聚^[10],推测在大豆花粉四分体分裂过程中,URMS1 与微管结合能力降低将影响招募货物分子的运输,导致 MAP65 无法磷酸化或 MAP65 磷酸化的数量不足以使四分体完成胞质分裂,进而无法形成正常花粉。

GmMS1 拟南芥同源基因 *AtNACK2* 已报道多个突变位点,其表型均为半不育^[11-14],通过氨基酸序列比对结果显示这些突变位点均未造成其

关键马达结构域的功能丧失,最初推测其蛋白可能仍有活性,发挥部分功能。本论文通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对拟南芥 *AtNACK2* 进行定点敲除,创制马达结构域功能丧失型突变体 *atnack2-7*,与野生型 Col-0 相比,植株育性仍表现为半不育,结果说明 *AtNACK2* 马达结构域功能丧失只会导致植株半不育,其原因可能是其同源基因 *AtNACK1* 部分弥补 *AtNACK2* 在调控育性缺失的功能^[11]。而在大豆中,*GmMSI* 在大豆中有 3 个同源拷贝,但 *GmMSI* 的功能出现了不可替代性,这表明 *GmMSI* 与 *AtNACK2* 调控育性的分子功能出现了分化。

参考文献:

- [1] 李顺萍. 世界大豆生产布局及中国大豆对外依存度分析[J]. 世界农业, 2018(11): 108-112.
- [2] 樊志明. 大豆杂种优势利用研究现状与前景[J]. 大豆科技, 2017(3): 30-32.
- [3] KIM Y, ZHANG D. Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23: 53-65.
- [4] WAN X Y, WU S W, LI Z W, et al. Maize genic male-sterility genes and their applications in hybrid breeding: Progress and perspectives[J]. Molecular Plant, 2019, 12:321-342.
- [5] WHITFORD R, FLEURY D, REIF J C, et al. Hybrid breeding in wheat: Technologies to improve hybrid wheat seed production[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64: 5411-5428.
- [6] BRIM C A, YOUNG M F. Inheritance of a male-sterile character in soybeans[J]. Crop Science, 1971, 11: 564-566.

- [7] CHEN Y Y, WANG Z P, NI H W, et al. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis* [J]. Science China Life Sciences, 2017, 60 (5): 520-523.
- [8] FANG X L, SUN X Y, YANG X D, et al. *MSI* is essential for male fertility by regulating the microsporocyte cell plate expansion in soybean [J]. Science China Life Sciences, 2021, 64 (9): 1533-1545.
- [9] VALE R D. The molecular motor toolbox for intracellular transport[J]. Cell, 2003, 112: 467-480.
- [10] SASABE M, MACHIDA Y. Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis [J]. Cytoskeleton, 2012, 69 (11): 913-918.
- [11] NISHIHAMA R, SOYANO T, ISHIKAWA M, et al. Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like Protein/MAPKKK complex[J]. Cell, 2002, 109: 87-99.
- [12] STROMPEN G, KASMI F E, RICHTER S, et al. The *Arabidopsis* *HINKEL* gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner[J]. Current Biology, 2002, 12 (2): 153-158.
- [13] YANG C Y, SPIELMAN M, COLES J P, et al. *TETRASPORE* encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2003, 34 (2): 229-240.
- [14] SUNG-AEONG O, VALÉRIE B, MADHUMITA D P, et al. *Arabidopsis* kinesins *HINKEL* and *TETRASPORE* act redundantly to control cell plate expansion during cytokinesis in the male gametophyte [J]. Molecular Plant, 2008, 1(5): 794-799.

Molecular Mechanism and Functional Differentiation of *GmMSI* Male Sterility in Soybean

WANG Yi-fan, WANG Yun-hui, LI Jin-hong, LIN Jia-yu, FENG Xiang-chi, CAO Zhen-lin, YAO Shi-en, LI Mei-na

(School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to explore the molecular mechanism of the locus coding gene (*GmMSI*) of soybean *msl* mutant cloned in our laboratory, we provided preliminary evidence in cell biology that *GmMSI* may affect fertility by regulating the depolymerization of phragmoplast. To explore the molecular mechanism of *GmMSI* in regulating male fertility, we produced the motor domain (MD) and His-tag fusion proteins of *GmMSI* and its mutant *urmsl* with single amino acid replacement (*GmMSI*A263L) in motor domain, named *GmMSI*MD-His and *URMSI*MD-His, respectively. *In vitro* microtubule binding experiment revealed that the binding ability of *urmsl* to microtubules was significantly reduced, indicating that the arginine at position 263 of *GmMSI* protein is the key amino acid involved in microtubule binding. Therefore, the male sterile phenotype of *urmsl* was assumed to weaken the microtubule binding ability. To compare whether *GmMSI* and its *Arabidopsis* homologous gene *AtNACK2* (NPK1 activating kinesin) had functional divergence during evolution, the *AtNACK2* motor domain loss of function mutant was generated using CRISPR/cas9 technology. The male fertility results showed that the loss of function led to semi-sterile phenotype. Therefore, we first revealed that *GmMSI* and *AtNACK2* have gene functional divergence in controlling male fertility.

Keywords: soybean; male sterility; *GmMSI*; kinesin; heterosis