



玉米 AGO 基因在籽粒发育过程中的表达分析

张 丹, 王 玲, 刘 晓, 阾云超, 李丹丹*

(南阳师范学院 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 河南南阳 473061)

摘 要:以玉米自交系‘昌 7-2’授粉后 4 个时间点(授粉后 7、10、14 和 20 d)的籽粒总 RNA 为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 对玉米中 5 个 Argonaute(AGO)蛋白家族基因(AGO1、AGO2、AGO4、AGO10 和 AGO18)在籽粒不同发育时期的表达谱进行了研究。结果表明: AGO1 和 AGO2 在籽粒发育过程中呈现一致的表达趋势, 在授粉后 7 d 的籽粒中表达量最高, 从授粉后 7 d 到 20 d 呈持续下降的趋势。AGO4、AGO10 和 AGO18 具有一致的表达趋势, 均呈现先下降后上升的趋势, 在授粉后 10 d 的籽粒中表达量最低。结合实验室前期获得的 miRNA 在玉米籽粒不同发育阶段的表达谱, 发现不同 AGO 家族基因可协助其靶标 miRNA 参与玉米籽粒发育调控。

关键词: 玉米; 籽粒; AGO 基因; 表达谱

中图分类号: Q789; Q946 **文献标志码:** A

Cloning and Expression Analysis of AGO Genes during Maize Seed Development

ZHANG Dan, WANG Ling, LIU Xiao, KAN Yunchao, LI Dandan*

(Henan Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Mountain, Nanyang Normal University, Nanyang Henan 473061, China)

Abstract: The expression profiles of 5 AGO genes (AGO1, AGO2, AGO4, AGO10 and AGO18) in different developmental stages of maize seed (*Zea mays* L. inbred line, ‘Chang 7-2’) after pollination were analyzed by the method of real-time quantitative PCR. Results showed that, the expression pattern of AGO1 and AGO2 were similar during maize seed development, showing a decline trend from the 7th day after pollination (DAP) to the 20th DAP, with much more accumulation at the 7th DAP. The expression pattern of AGO4, AGO10 and AGO18 were similar, with a trend of being decreased first then increased, with the lowest expression at the 10th DAP. With our previous results of expression pattern of miRNAs during maize seed development, we found that different AGO gene families together with their target miRNAs, can involved in the regulation of maize seed development.

Key words: *Zea mays* L.; seed; AGO gene; expression pattern

miRNA 可参与生物的生长、分化、增殖和胁迫反应等一系列生物学过程^[1]。miRNA 和 Argonaute(AGO)蛋白家族形成 RNA-induced silencing complex(RISC), 从而调节序列特异性靶基因沉默或翻译抑制^[2-3]。AGO 蛋白是 RISC 的功能核心, 具有高度保守性。AGO 蛋白由 N 末端、PAZ、MID

和 PIWI 4 个结构域组成。PAZ 区能非序列特异性识别结合双链小 RNA 3'端 2 个核苷酸, MID 与 PIWI 界面处的“保守口袋”识别结合小 RNA 5'端第一位核苷酸, PIWI 区具有切割 mRNA 的催化中心^[4]。植物中 AGO 蛋白和 miRNA 共同参与维持基因组的稳定、调控组织发育、响应逆境适应性应

收稿日期: 2016-05-03; 修改稿收到日期: 2016-07-06

基金项目: 河南省科技厅农业重点攻关项目(112102110158)

作者简介: 张 丹(1990—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物与昆虫互作研究。E-mail: 15514180175@163.com

* 通信作者: 李丹丹, 博士, 副教授, 主要从事植物与昆虫互作研究。E-mail: lidannytc@126.com

答、在 RNA 层面对入侵核酸(转基因质粒和植物病毒)的免疫、对靶 mRNA 进行切割或翻译水平的抑制,以及在转录或转录后水平上控制转座元件的移动等^[5-7]。目前,在拟南芥中发现 AGO 蛋白 10 个^[8],大豆中发现 22 个^[9],水稻中 19 个^[10],玉米中 18 个^[11-12]。所有的开花植物的 AGO 蛋白家族可以归为 3 个大类:AGO1/5/10 家族、AGO2/3/7 家族和 AGO4/6/8/9 家族,AGO18 是与 AGO1/5/10 大类亲缘关系较近的一个分支^[8,13]。

在拟南芥中,AGO1 主要参与植物的生长发育调控和胁迫反应^[14],AGO2 参与植物的抗菌和病毒防御活动^[15],AGO4 调控 RNA 介导 DNA 甲基化信号通路以及和内源的 siRNAs 结合导致基因沉默^[16],AGO5 调控雌配子体发生和 RNA 沉默^[17],AGO6 参与调控 tasiRNA 的甲基化、转座子的转录活性和分生组织的根除^[18],AGO7 主要参与植物叶的发育以及维持分生组织以及植物从幼嫩到成熟生长阶段的过渡^[19],AGO9 和韧皮部生殖细胞的分化抑制和 DNA 修复有关^[6],AGO10 调控植物的顶端分生组织^[20]。玉米 18 个 AGO 家族蛋白可归属在 5 个大类中,AGO1、MEL1/AGO5、ZIPPY/AGO7、AGO4 和 AGO18^[11]。AGO9 归在 AGO4 家族中,参与生殖细胞中体壁细胞的分化^[21],AGO18 参与生殖细胞的发展^[12]。

玉米是世界上重要的粮食作物和饲料作物,目前在 miRbase 数据库中收录的玉米成熟 miRNA 序列有 321 条,它们参与到玉米的新陈代谢的各个过程中^[22-28]。对 miRNA 功能的解析离不开对 AGO 基因功能的探索。但是目前关于玉米 AGO 基因的表达谱及功能研究并不多。因此,我们在前期对玉米籽粒发育过程的 miRNA 深入研究的基础上^[29],选取河南省普遍种植的玉米自交系‘昌 7-2’为研究对象,选取 5 个 AGO 蛋白大类中的代表性 AGO 基因(AGO1、AGO2、AGO4、AGO10 和 AGO18),研究其在玉米授粉后不同天数(7、10、14 和 20 d)的表达谱,为探索 AGO 基因和 miRNA 协同调控玉米籽粒的形成机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以河南农业大学农学院提供的玉米自交系‘昌 7-2’为试验材料,分别取授粉后 7、10、14 和 20 d 的籽粒,置于液氮中研磨,TRIzol(ThermoFisher Scientific)法提取总 RNA。

表 1 Real-time PCR 所用引物
Table 1 Primer sets for real-time PCR

名称 Name	序列 Sequence(5'→3')
AGO1-F	TCCTCAGGCAACACAACAG
AGO1-R	ACCAGGATGCTGTGAAGGT
AGO2-F	GTCTAATGCTTCGGGCAA
AGO2-R	CAGGCAGTTCAGCAGAAGTAT
AGO4-F	CACCAGATGTGATTCCCA
AGO4-R	CCTTTACCATCAACGGGT
AGO10-F	GGTTTCACCATTACAGCATC
AGO10-R	TGTAACCTTTAGCAGCGATG
AGO18-F	TCACCAGAGACGACGCTAA
AGO18-R	CCAGACAAGGTGACAACGA
tubulin-F	ACATCTGCCGCCGTCCCTT
tubulin-R	GCGCTGTTGGTGATTTCG

1.2 方法

1.2.1 AGO 基因的克隆与测序 取玉米籽粒总 RNA 2 μg,使用反转录试剂盒(Takara)进行 cDNA 的合成。利用表 1 所列引物及高保真酶扩增 6 个 AGO 基因。PCR 产物采用 DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen)回收,将回收的目的片段连接 PMD-19 T easy 载体(Takara),转化大肠杆菌,挑取阳性克隆,送北京奥科鼎盛生物技术有限公司进行测序,测序结果用 DNAMAN 进行序列比对。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 取玉米授粉后不同时期籽粒的总 RNA 2 μg,使用反转录试剂盒(Takara)进行 cDNA 的合成。采用 FastStart Universal SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(Roche)进行 Real-time PCR。PCR 反应条件为:95 ℃ 变性 15 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。PCR 引物如表 1 所示,tubulin 为内参基因,灭菌双蒸水模板为阴性对照。PCR 结果采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。

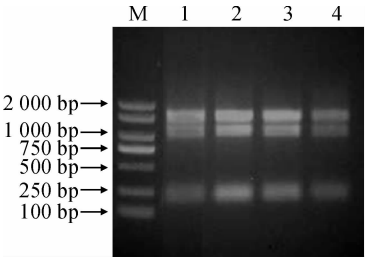
2 结果与分析

选择玉米自交系‘昌 7-2’授粉后 7、10、14 和 20 d 的籽粒为研究对象,利用 TRIzol 法提取总 RNA,通过琼脂糖凝胶检测 RNA 质量(图 1)。结果显示,所提 RNA 无基因组污染,28S 和 18S 条带清晰,OD₂₆₀/OD₂₈₀在 1.8~2.0 之间,表明 RNA 完整,蛋白污染较少,可用于后续实验。

利用玉米 B73 基因组数据库中得到的 5 个 AGO 基因序列设计引物,通过高保真酶在玉米自交

系‘昌 7-2’中扩增相应的 *AGO* 基因,得到 *AGO1*、*AGO2*、*AGO4*、*AGO10* 和 *AGO18* 均有单一的扩增产物,且无引物二聚体污染(图 2),通过测序鉴定发现,‘昌 7-2’中扩增到的 *AGO2* 和 *AGO10* 基因片段与 B73 中对应的基因序列完全相同,*AGO4* 和 *AGO18* 与 B73 仅差别 1 个碱基,*AGO1* 扩到的为 *AGO1a-like* 基因 AC199001.3_FG005,与 *AGO1* 一致性为 88.8%,与 B73 中对应的基因差别仅 1 个碱基(图 3)。表明在‘昌 7-2’中扩增的为真实的 *AGO* 家族目的基因。

为了获得 *AGO* 基因在玉米授粉后籽粒中的表达谱,选取授粉后 7、10、14 和 20 d 的籽粒总 RNA 为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 方法检测不同 *AGO* 基因在籽粒发育过程中的表达水平。结果如图 4 所示,*AGO1*、*AGO2*、*AGO4*、*AGO10* 和 *AGO18* 在玉米籽粒形成过程中均有表达。*AGO1* 和 *AGO2* 在籽粒发育过程中呈现一致的表达趋势,在授粉后 7 d 的籽粒中表达量最高,从授粉后 7 d 到 20 d 呈持续下降的趋势。*AGO4*、*AGO10* 和 *AGO18* 存在一致的表达趋势,均呈现先下降后上升的趋势,在授粉

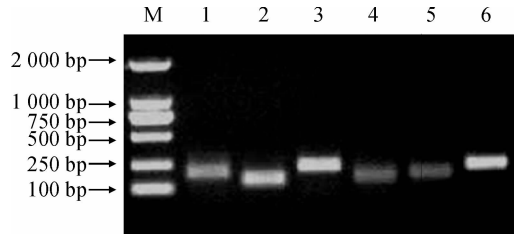


M. DL2000;1~4 分别为授粉后 7、10、14 和 20 d 的玉米籽粒 RNA

图 1 不同发育时间点玉米籽粒 RNA 电泳结果

M. DL2000;1~4 represented RNAs of 7,10,14 and 20 d

Fig. 1 RNAs being extracted from different developmental stages of maize seed after pollination



M. DL2000;1~6 分别为 *AGO1*、*AGO2*、*AGO4*、*AGO10*、*AGO18* 和 *tubulin*

图 2 5 个 *AGO* 基因 RT-PCR 扩增结果

M. DL2000;1~6 represented the amplification results of *AGO1*,*AGO2*,*AGO4*,*AGO10*,*AGO18* and *tubulin*

Fig. 2 RT-PCR results of amplification of five *AGO* genes

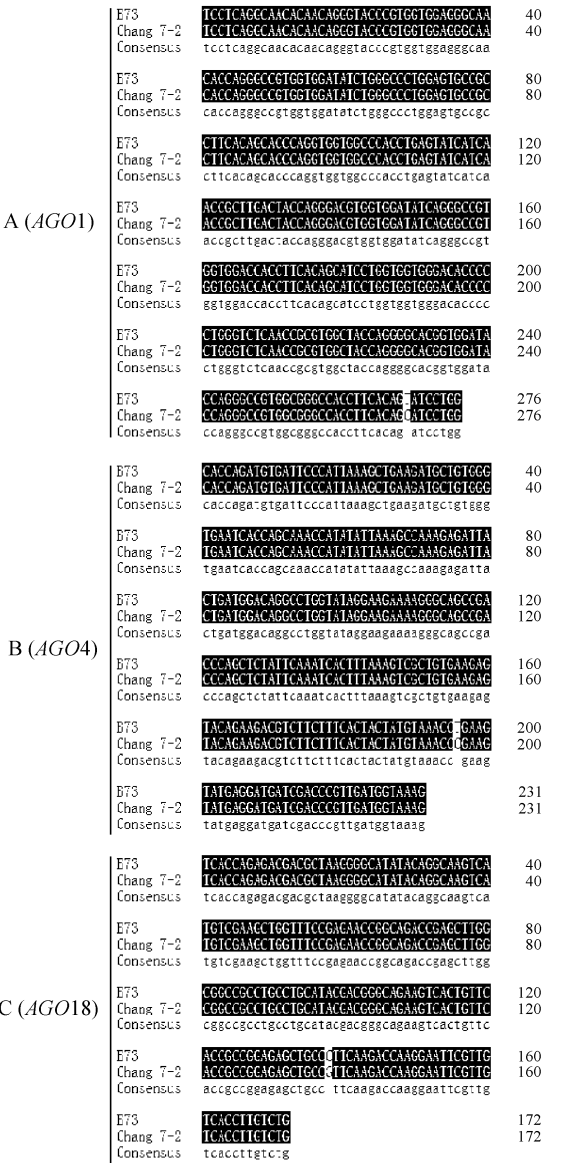


图 3 昌 7-2 和 B73 中 *AGO1*(A)、*AGO4*(B)、*AGO18*(C)基因比对结果

Fig. 3 Alignment results of *AGO1*(A),*AGO4*(B),*AGO18*(C)between Chang 7-2 and B73

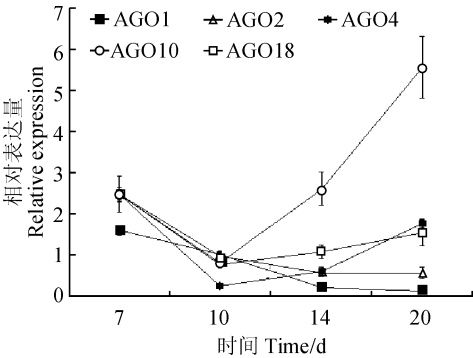


图 4 *AGO* 家族基因在玉米授粉后不同天数籽粒中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression of *AGO* genes in different developmental stages of maize seed after pollination

后 10 d 的籽粒中表达量最低。AGO4 和 AGO18 在授粉后 7 d 的籽粒中表达量最高,到 10 d 降至最低,随后逐渐上升。而 AGO10 在授粉后 7 d 的籽粒中表达量与 14 d 基本持平,10 d 时最低,在籽粒发育后期,至 20 d 时表达量最高。表明不同的 AGO 基因可能在玉米籽粒发育的不同阶段发挥作用。

3 讨 论

在 RISC 中,miRNA 作为向导引导 AGO 蛋白在特定的部位发挥相应的功能,AGO 蛋白是 RISC 的核心元件^[30]。本研究以河南省推广种植的玉米自交系‘昌 7-2’为研究对象,首次探索了玉米授粉后(7、10、14 和 20 d)不同时间点 AGO 基因的表达谱。结果显示:AGO1 和 AGO2 在授粉后 7 d 的籽粒中表达量最高,随后呈持续下降的趋势。而 AGO4、AGO10 和 AGO18 则呈现先下降后上升的趋势,在授粉后 10 d 的籽粒中表达量最低。表明这些不同的 AGO 基因可能在玉米籽粒形成的不同阶段发挥各自特殊的功能。

在籽粒发育早期主要进行细胞分裂、胚胎发生和组织器官形成等活动,该阶段高表达的 miRNA 主要为 miR159、miR165/166 等家族^[29,31],而 AGO1 可通过扣押 miR165/166,促进 miRNA miR165/166 靶基因 Class III homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP III)转录因子的表达,HD-ZIP III 家族基因在茎顶端分生组织建立、维管发育和侧生器官的极性形成过程中发挥重要作用,突变 HD-ZIP III 家族

基因将造成单针形子叶的形成^[32-33]。玉米 AGO1 在授粉后 7 d 的籽粒中高表达,随后持续下降,这与其负向调控的 miR165/166 家族的表达趋势是相符的,表明在籽粒发育早期的胚胎形成过程中,AGO1 可通过 miR165/166 等小分子 RNA 发挥调控作用。与 AGO1 同家族的 AGO10,可作为 miR166/165 的诱饵,阻止 miR166/165 进入 AGO1 复合体,从而抑制 HD-ZIP III 转录因子的表达^[34]。拟南芥中研究也表明,AtZLL/AtAGO10 在顶端分生组织的维持过程中发挥作用^[35-36]。AGO10 基因在玉米籽粒发育早期组织器官形成过程的低表达和营养物质积累时期的高表达,可能与其功能的发挥密切相关。

玉米授粉后 10~15 d 为籽粒从细胞分裂和组织器官形成到营养物质积累的过渡阶段,AGO4 和 AGO 18 均在授粉后 10 d 的籽粒中表达量最低,随后在籽粒营养物质积累过程中持续升高。拟南芥中 AtAGO4 主要作用于 siRNA,发挥表观遗传沉默作用^[37-38]。而 AGO18 只存在于草本植物中,在植物繁殖生长和病毒防御过程中发挥作用^[12],玉米 AGO18 有两个转录本,其中的一个 ZmAGO18b 在雄性减数分裂期间绒毡层和生殖细胞富集,这与 24-nt phasiRNA 表达趋势一致,因此预测玉米 ZmAGO18b 可能结合 24-nt phasiRNAs 发挥作用^[39],AGO4 和 AGO18 在籽粒发育过渡期的低表达及营养物质累积期的高表达可能与其功能的实现密切相关。本结果为深入探索不同的 AGO 基因对玉米籽粒发育的作用机制奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] IWAKAWA H, TOMARI Y. The functions of MicroRNAs: mRNA decay and translational repression[J]. *Trends in Cell Biology*, 2015, **25**(11): 651-665.

[2] KOBAYASHI H, TOMARI Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, **1** **859**(1): 71-81.

[3] ARIYOSHI J, MOMOKAWA D, EIMORI N, *et al.* Development of novel antisense oligonucleotides for the functional regulation of RNA-Induced Silencing Complex (RISC) by promoting The release of microRNA from RISC[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2015, **26**(12): 2 454-2 460.

[4] HUTVAGNER G, SIMARD M J. Argonaute proteins; key players in RNA silencing[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, **9**(1): 22-32.

[5] MEISTER G. Argonaute proteins: functional insights and e-

merging roles[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, **14** (7): 447-459.

[6] OLIVER C, SANTOS J L, PRADILLO M. On the role of some ARGONAUTE proteins in meiosis and DNA repair in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**: 177.

[7] ZHAI J, ZHAO Y, SIMON S A, *et al.* Plant microRNAs display differential 3' truncation and tailing modifications that are ARGONAUTE1 dependent and conserved across species[J]. *Plant Cell*, 2013, **25**(7) : 2 417-2 428.

[8] VAUCHERET H. Plant ARGONAUTES[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, **13**(7): 350-358.

[9] LIU X, LU T, *et al.* Identification of RNA silencing components in soybean and sorghum [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, **15**: 4.

[10] KAPOOR M, ARORA R, LAMA T, *et al.* Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-

- like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice[J]. *BMC Genomics*, 2008, **9**:451.
- [11] QIAN Y, CHENG Y, CHENG X, *et al.* Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, **30**(7):1 347-1 363.
- [12] ZHAI L, SUN W, ZHANG K, *et al.* Identification and characterization of Argonaute gene family and meiosis-enriched Argonaute during sporogenesis in maize[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, **56**(11):1 042-1 052.
- [13] ZHANG H, XIA R, MEYERS B C, *et al.* Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, **27**:84-90.
- [14] VAUCHERET H, VAZQUEZ F, CRÉTÉ P, *et al.* The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development[J]. *Genes & Development*, 2004, **18**(10):1 187-1 197.
- [15] JAUBERT M, BHATTACHARJEE S, MELLO A F, *et al.* ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2011, **156**(3):1 556-1 564.
- [16] HAVECKER E R, WALLBRIDGE L M, *et al.* The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci[J]. *Plant Cell*, 2010, **22**(2):321-334.
- [17] BROSSEAU C, MOFFETT P. Functional and genetic analysis identify a role for arabidopsis ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing[J]. *Plant Cell*, 2015, **27**(6):1 742-1 754.
- [18] MCCUE A D, PANDA K, *et al.* ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation[J]. *The EMBO Journal*, 2015, **34**(1):20-35.
- [19] HUNTER C, SUN H, POETHIG R S, *et al.* The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member[J]. *Current Biology*, 2003, **13**(19):1 734-1 739.
- [20] JI L, LIU X, YAN J, *et al.* ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Genetics*, 2011, **7**(3):e1001358.
- [21] SINGH M, GOEL S, MEELEY R B, *et al.* Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein[J]. *Plant Cell*, 2011, **23**(2):443-458.
- [22] ZHANG B, PAN X, ANDERSON T A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets[J]. *FEBS Letters*, 2006, **580**(15):3 753-3 762.
- [23] ZHANG L, CHIA J M, KUMARI S, *et al.* A genome-wide characterization of microRNA genes in maize[J]. *PLoS Genetics*, 2009, **5**(11):e1000716.
- [24] KANG M, ZHAO Q, ZHU D, *et al.* Characterization of microRNAs expression during maize seed development[J]. *BMC Genomics*, 2012, **13**:360.
- [25] LIU P, YAN K, *et al.* Transcript profiling of microRNAs during the early development of the maize brace root via Solexa sequencing[J]. *Genomics*, 2013, **101**(2):149-156.
- [26] DING D, LI W, HAN M, *et al.* Identification and characterization of maize microRNAs involved in developing ears[J]. *Plant Biology*, 2014, **16**(1):9-15.
- [27] LI X M, SANG Y L, ZHAO X Y, *et al.* High-throughput sequencing of small RNAs from pollen and silk and characterization of miRNAs as candidate factors involved in pollen-silk interactions in maize[J]. 2013, *PLoS One*, **8**(8):e72852.
- [28] GU Y, LIU Y, ZHANG J, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in the developing maize endosperm[J]. *Genomics*, 2013, **102**(5-6):472-478.
- [29] LI D, LIU Z, GAO L, *et al.* Genome-wide identification and characterization of microRNAs in developing grains of *Zea mays* L. [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(4):e0153168.
- [30] LEWKOWICZ P, Cwiklińska H, MYCKO M P, *et al.* Dysregulated RNA-Induced Silencing Complex (RISC) assembly within CNS corresponds with abnormal miRNA expression during autoimmune demyelination[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2015, **35**(19):7 521-7 537.
- [31] LIU X, FU J, GU D, *et al.* Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Genomics*, 2008, **91**(4):378-387.
- [32] PRIGGE M J, OTSUGA D, ALONSO J M, *et al.* Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development[J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(1):61-76.
- [33] TALBERT P B, ADLER H T, *et al.* The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 1995, **121**(9):2 723-2 735.
- [34] ZHU H, HU F, WANG R, *et al.* *Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development[J]. *Cell*, 2011, **145**(2):242-256.
- [35] MOUSSIAN B, SCHOOF H, HAECKER A, *et al.* Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis[J]. *EMBO Journal*, 1998, **17**(6):1 799-1 809.
- [36] LYNN K, FERNANDEZ A, AIDA M, *et al.* The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene[J]. *Development*, 1999, **126**(3):469-481.
- [37] ZILBERMAN D, CAO X, JACOBSEN S E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation[J]. *Science*, 2003, **299**(5 607):716-719.
- [38] ZILBERMAN D, CAO X, *et al.* Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats [J]. *Current Biology*, 2004, **14**(13):1 214-1 220.
- [39] ZHAI J, ZHANG H, *et al.* Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phase RNAs in maize anthers [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, **112**(10):3 146-3 151.

(编辑:宋亚珍)