文章编号：1005-0906(2015)05-0026-07 DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20150506

玉米*opaque2*近等基因系中相关基因的表达量分析

颜 娜[1],宋丽雅[2],夏仁培[1],周志强[1],张世煌[1],李新海[1],郝转芳[1],
翁建峰[1],张德贵[1],雍洪军[1],李明顺[1]
(1.中国农业科学院作物科学研究所/农业部遗传育种重点实验室,北京 100081;
2.北京工商大学/北京市植物资源研究开发重点实验室,北京 100048)

摘 要：*Opaque2*(*O2*)基因编码产生OPAQUE2蛋白,该蛋白为碱性亮氨酸拉链家族的一种转录因子,可作用于基因的启动区,调控基因的转录。辽2345/*o2*为本实验室构建的辽2345的*opaque2*(*o2*)基因回交导入系,蛋白组学分析表明,辽2345与辽2345/*o2*在授粉后18 d的胚乳细胞中表达蛋白的种类和数量存在很大差异,从中筛选出差异较明显的9种蛋白质。为了进一步验证*O2*与9种蛋白间的作用关系,应用相对荧光定量PCR的方法对9种蛋白进行了RNA水平表达量的检测。结果表明,在胚乳发育过程中*Chfi*很可能受到*O2*的抑制作用,*O2*很可能对*Ubc*、*Lgl*、*Sdh*、*LOC541920*、*Shmt*、*Ppdk*等基因存在某种促进或激活作用。

关键词：玉米;近等基因系;*Opaque2*;相对表达量
中图分类号：S513.035.3 **文献标识码**：A

Transcription Analysis of Gene Expression in Near Isogenic Lines of *opaque2* in Maize

YAN Na[1], SONG Li-ya[2], XIA Ren-pei[1], ZHOU Zhi-qiang[1], ZHANG Shi-huang[1], LI Xin-hai[1],
HAO Zhuan-fang[1], WENG Jian-feng[1], ZHANG De-gui[1], YONG Hong-jun[1], LI Ming-shun[1]
(1. *Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/*
Key Laboratory of Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100081;
2. *Beijing Technology and Business University/*
Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing 100048, China)

Abstract: OPAQUE2, encoding by gene *Opaque2*, is one member of alkaline leucine zipper transcription factor family, and can regulate the expressions of several related genes by combining with the promoter region. Liao2345/*o2* is the gene backcross import department of *o2* constructed by the laboratory. Obvious differences between protein expressions were verified by analyzing protein expressions in the endosperm of 18 days after pollination(DAP) using the method of two-dimensional electrophoresis, and 9 proteins were screened out through the mass spectrometry analysis. In order to determine the relationship between *Opaque2* and the selected proteins, the amount of the RNA level expression of the selected proteins wasdetected using the relative fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The result showed that *Chif* may be suppressed by *O2*, whereas *Ubc*, *Lgl*, *Sdh*, *LOC541920*, *Shmt* and *Ppdk* were likely promoted or activated by *O2*.

Key words: Maize; NILs; *Opaque2*; Relative expression

玉米是重要的粮饲作物,在我国谷物生产中占有重要地位。我国玉米品种主要为普通玉米品种,但普通玉米品种的蛋白质含量低,一般约为10%;氨基酸含量不平衡,赖氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸和色氨酸的含量不足[1],尤其是必需氨基酸—赖氨酸含量低于0.3%[2]。玉米中*O2*基因发生突变产生*o2*突变体,突变体玉米胚乳中赖氨酸含量大幅度上升,能够

收稿日期：2015-04-28
基金项目：国家自然基金(31401390)、国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-02-01)
作者简介：颜 娜(1987-),女,山东济宁人,硕士,从事玉米分子育种研究。Tel:13161185357
E-mail:yanna19881204@163.com
李明顺为本文通讯作者。

极大地改善玉米子粒的蛋白质品质,利用*o2*突变体可以获得优质蛋白玉米(Quality protein maize,QPM)[3]。QPM的子粒中赖氨酸的含量在0.4%以上。在含*o2*基因突变体的玉米胚乳中,赖氨酸含量极低的醇溶蛋白的合成受到抑制,而赖氨酸和色氨酸含量相对较高的谷蛋白和球蛋白的合成被增强,从而提高了玉米子粒的营养品质[4~6]。

*O2*基因定位在玉米7号染色体短臂上,编码一个含有碱性结构域的亮氨酸拉链家族的转录因子OPAQUE2[7,8]。该蛋白质的N末端有一个酸性活性结构域[9],该结构域通过识别不同基因启动子中的顺式作用因子,调控胚乳中各种相关基因的表达[10],并能反馈抑制自身基因的表达[11],研究较为清楚的有醇溶蛋白基因、丙酮酸磷酸双激酶、山梨醇脱氢酶、*LKR/SDH*基因、乙酰羟基酸合成酶基因*AHAS*、*b-32*基因等[12~19]。不同的研究表明,*O2*基因突变为*o2*后,胚乳发育过程中的各种代谢途径会发生相应的改变,具有多效性[20~26]。*O2*可能确保不同代谢途径的基因同步表达,协同胚乳的发育。前人对*O2*和*o2*近等基因系(NILs)中基因表达模式进行研究发现,NILs在mRNA水平和蛋白质水平上存在许多不同[27,28],但产生这些差异的分子机理尚有待进一步阐明。

NILs间遗传背景相对一致,以NILs为实验材料研究基因表达的差异可消除遗传背景的影响,集中反映由个别基因的差异所引起的全基因组水平的表达变化[29,30]。辽2345/*o2*是以辽2345为受体材料、CA339为供体材料,通过回交5代后自交获得的*o2*导入系,赖氨酸含量为0.49%,遗传背景回复率(相似系数)为91%。前期本实验室用蛋白组学的方法进行分析,发现辽2345与辽2345/*o2*在授粉后18 d的胚乳细胞中蛋白的表达在种类和数量上存在很大差异,从中筛选出差异较明显的蛋白点9个。9种蛋白的编码基因相关信息见表1。

表1　目标候选基因及其相关信息

Table 1　The candidate genes and related information

蛋白点 Protein spot	得 分 Score	登录号 Accession	蛋白名称 Protein name	基因简写 Gene abbreviation
5	1 167	gil157830250	Chain A,Bifunctional Hageman Factor Amylase Inhibitor	*Chfi*
6	109	gil162458113	ubiquitin conjugating enzyme	*Ubc*
9	391	gil134598	RecName: Full=Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4AP	*Sod4ap*
11	3653	gil195639070	lactoylglutathionelyase	*Lgl*
15	560	gil162464283	homocysteine S-methyltransferase 3	*Hmt3*
19	524	gil77378040	sorbitol dehydrogenase	*Sdh*
20	1396	gil162458022	LOC541920 precursor	*LOC541920*
21	574	gil195622500	serine hydroxymethyltransferase	*Shmt*
23	564	gil168586	pyruvate,orthophosphatedikinase	*Ppdk*

为了进一步验证*Opaque2*与这些蛋白间是否存在着作用关系,本研究选用玉米品种辽2345和辽2345/*o2*近等基因系,利用相对荧光定量(qRT-PCR)的方法,对不同发育时期胚乳中9种蛋白编码基因的表达量的变化进行RNA水平的检测,分析野生型*O2*基因突变成隐性*o2*基因后,玉米胚乳中的相关基因在mRNA水平上的变化。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验材料:辽2345/*o2*和辽2345,辽2345/*o2*为以CA339为供体亲本的*o2*导入系。材料种植于中国农业科学院东门试验田,分别在授粉后10、14、18、22、26 d进行取样,每个材料至少取3穗,在冰上快速剥取胚乳,混装于2.0 mL EP管中,液氮速冻后放于-80℃超低温冰箱暂时保存。

试剂:Taq酶、dNTP和Buffer,购自北京天根生物技术有限公司的RNA提取试剂盒、第一链cDNA合成试剂盒与荧光定量试剂盒。

主要仪器:电泳槽、照胶仪、浓度测定仪、Bio-Rad普通PCR仪与荧光定量PCR仪。

1.2　实验方法

1.2.1　基因组RNA的提取

在预冷的已高压灭菌的研钵中加入液氮使其快速降温至结霜,然后从超低温冰箱中取出玉米胚乳迅速放于液氮中,用研锤将胚乳在装有液氮的研钵中迅速研磨至粉末状,待液氮挥发后迅速装至2.0 mL EP管中,加入试剂盒中提供的裂解液HL,之后按照

天根公司的RNAprep Pure Plant Kit说明书进行严格操作。待RNA从柱子上洗脱后，分装到0.2 mL小管里用于浓度测定与琼脂糖电泳，其他均放入超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 第一链cDNA的合成

采用FastQuant RT Kit (with gDNA)合成单链cDNA。根据RNA浓度测定结果进行精确计算，每20 μL体系中加入1 000 ng的RNA，反应条件为42℃ 15 min，95℃ 3 min，反转录后cDNA浓度在800 ng/μL左右。取少量cDNA等倍数稀释，使终浓度在50 ng/μL左右，将cDNA置于-20℃冰箱中保存备用。

1.2.3 PCR引物的设计

以*Actin*为内参基因，从MaizeSequence.org数据库中检索9个目标基因及内参*Actin*的cDNA序列，以此为序列信息，应用引物设计软件Beacon Designer7.0设计引物，并由北京奥科鼎盛公司进行合成。以cDNA为模板，进行普通的PCR扩增，利用琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳进行引物特异性的筛选(表2)。

表2 qRT-PCR引物信息

Table 2 Primer information of qRT-PCR

基 因 Gene	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence	扩增长度 Length	Tm (℃)
Chfi	CTCCTCCATCTTCCAAGT	GACGACGCCATTAATTCC	84	60
Ubc	ATTTCCCGCCAGATTACCCC	AATCTCCGGGACAAGAGGGT	206	60
Sod4ap	AACATTCGGAGACATCGT	AGCATAATCCAGCACAGT	110	60
Lgl	TACACCAATGCCTTCCTT	CATACTTGTCAACGCCATAG	84	60
Hmt3	AATCCACTCCTATACAGCAT	AGAGCCATCAGCAAGATAA	76	60
Sdh	CAAGATCATGCCCTTCAAG	CATCTCCCTGAGGTAGTG	105	60
LOC541920	AGTAGCTGCCAGGTATTG	TGTAGATTGCTTGGTGAATG	81	60
Shmt	GCCTCATAACCATACCATTAC	CACCAGAGACGAGTTCATA	149	60
Ppdk	GTGCAGGACAGGGAAACGTA	TCTACCATCTTGATCGCCGC	102	60
O2	GCCACAGAGTGGACCTTTGA	GGTCCCCTACTACGGCACTA	184	60
Actin	TGGCTCCAATTCCTGAAG	CAAACTCTGAGGCAACAC	109	60

1.2.4 内源基因的定性PCR检测

PCR总反应体系为20 μL，其中，10×扩增缓冲液2.0 μL、dNTP混合物1.6 μL、TaqDNA聚合酶0.3 μL、20 μmol/L引物0.3 μL、50 ng/uL模板cDNA 1.5 μL和灭菌双蒸水14 μL。

PCR反应程序为，95℃预变性3 min，95℃变性30 s，60℃退火30 s，72℃延伸30 s，共进行35个循环；72℃延伸5 min，4℃保存。向PCR产物中加入6×Loading buffer 4 μL，瞬时离心以混匀，用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 特定内源基因的qRT-PCR检测

采用SuperRealPreMix Plus (SYBR Green)进行PCR扩增反应，采用20 μL体系，整个体系中cDNA模板的总量控制在100 ng以下。PCR反应液的配置按照操作说明进行，PCR循环采用"两步法"，参数为，95℃预变性15 min，95℃变性10 s，60℃退火20 s，72℃延伸20 s，共进行40个循环；55℃退火30 s，共进行81个循环。反应管采用96孔PCR平盖薄壁管(Axygen)。

PCR反应及数据采集在Bio-Rad iQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System上进行。通过融解曲线分析反应产物特异性。以*Actin*为内对照基因对所有样品进行归一化处理，同时设置无模板对照(No template control，NTC)。每个反应设置3次重复。每个反应的荧光信号达到设定的阈值时所进行的循环数即为Ct值，根据初始模板量的对数值与Ct值之间呈线性关系的原理，运用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对定量分析，计算出基因的相对表达量。

1.2.6 数据统计与分析

采用Microsoft Excel 2010、SAS 9.1等软件进行数据处理和统计分析。

2 结果与分析

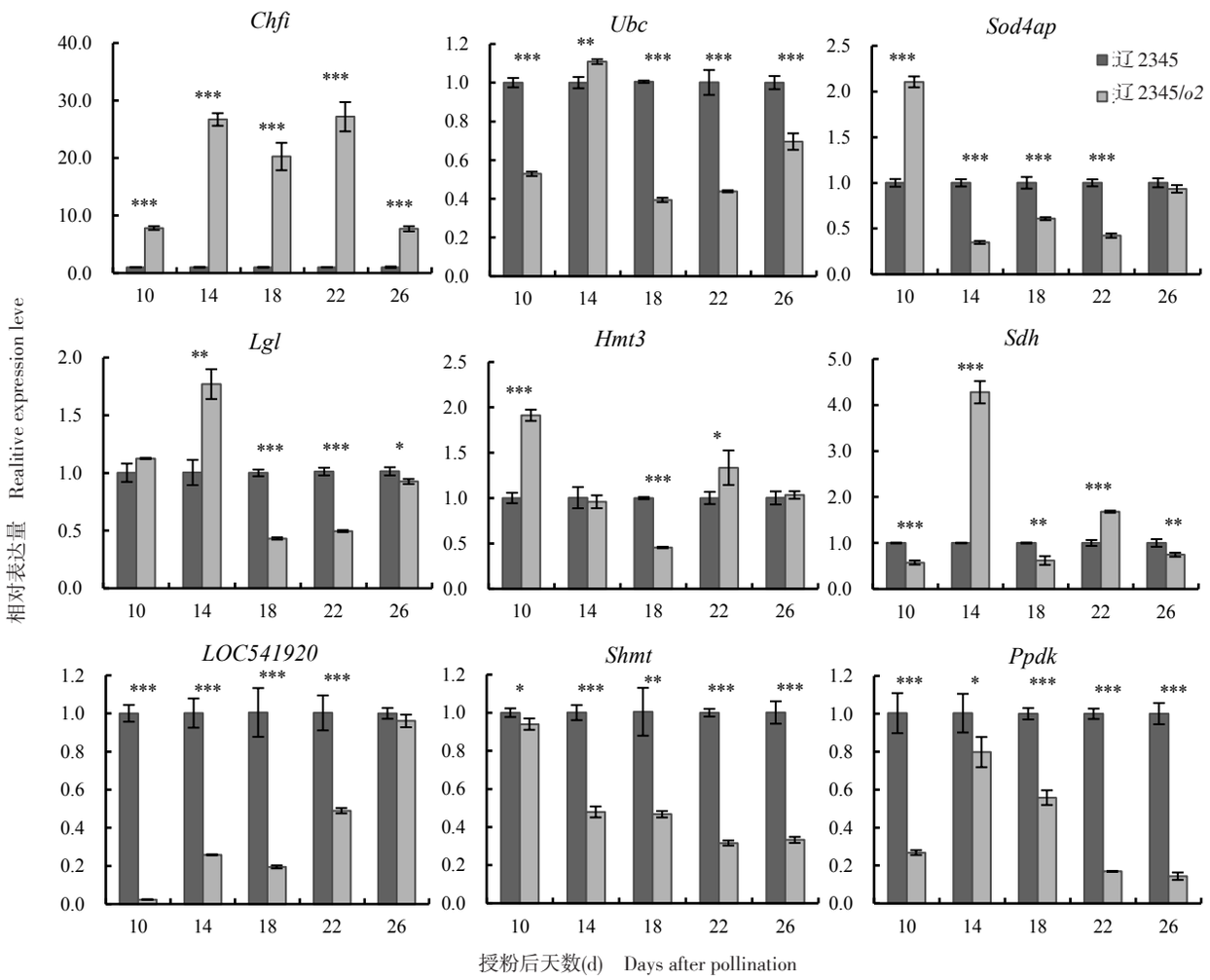
2.1 辽2345和辽2345/*o2*中候选基因在不同时期的相对表达量

各时期以辽2345中基因表达量为对照，对12个基因的荧光定量结果进行数据处理，得到授粉后各时期辽2345/*o2*中相关各基因相对于辽2345的表达

量(图1),用于实时荧光定量的12个候选基因在近等基因系材料间表达量均有差异。

双官能接触因子淀粉酶抑制剂基因*Chfi*各时期表达量分别为F_{10D}=7.82、F_{14D}=26.70、F_{18D}=20.25、F_{22D}=27.18、F_{26D}=7.69,均极显著高于辽2345($P_{10D\sim26D}$≤0.000 2)。

泛素结合酶基因*Ubc*在14DAP表达量为F_{14D}=1.11,极显著高于辽2345(P_{14D}<0.000 1);在其他4个时期表达量依次为F_{10D}=0.53、F_{18D}=0.39、F_{22D}=0.44、F_{26D}=0.70,均极显著低于辽2345($P_{10D、18D\sim26D}$<0.000 1)。



注:***、**、*分别表示0.001、0.01、0.05水平显著。下图同。

Note: ***, ** and * indicated significance at 0.001, 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same below.

图1　近等基因系中9个相关基因在各时期的相对表达量

Fig.1　Relative expression of nine related genes in every period in NILs

铜锌超氧化物歧化酶基因*Sod4ap*在10DAP基因表达量为F_{10D}=2.11,极显著高于辽2345(P_{10D}<0.000 1);在14DAP~22DAP基因表达量依次为F_{14D}=0.348、F_{18D}=0.61、F_{22D}=0.42,都显著低于辽2345($P_{14D\sim22D}$≤0.000 4);授粉后26 d与辽2345差异不显著(P_{26D}=0.163 2)。

乳酰谷胱甘肽裂解酶基因*Lgl*在10DAP表达量与辽2345中差异不显著(P_{10D}=0.055 6),在14DAP基因表达量为F_{14D}=1.77,极显著高于辽2345(P_{14D}=0.001 5);在26DAP基因表达量(F_{26D}=0.926)在0.05水平上显著低于辽2345(P_{26D}=0.021 3);在18DAP和22DAP基因表达量依次为F_{18D}=0.43、F_{22D}=0.50,极显著低于辽2345($P_{18D\sim22D}$≤0.000 1)。

同型半胱氨酸S-甲基转移酶3基因*Hmt3*在10DAP基因表达量为F_{10D}=1.91,极显著高于辽2345(P_{10D}<0.001);在22DAP基因表达量(F_{22D}=1.34)在0.05水平上显著高于野生型(P_{22D}=0.047 3);在18DAP基因表达量为F_{18D}=0.46,极显著低于辽2345(P_{18D}=0.000 1);在14DAP和26DAP基因表达量差异不显著(P_{14D}=0.590 4,P_{26D}=0.517 5)。

山梨醇脱氢酶基因*Sdh*在14DAP和22DAP表达量分别为F_{14D}=4.28和F_{22D}=1.68，极显著高于辽2345(P_{14D}<0.000 1，P_{22D}=0.000 1)，其中，14 d时差异水平达4倍以上，其他时期均极显著低于辽2345(P_{10D}=0.000 1，P_{18D}=0.002 7，P_{26D}=0.009 2)。

50kDγ- *zein* 前体LOC541920 precursor基因*LOC541920*，在10DAP～22DAP基因的表达量依次为F_{10D}=0.02、F_{14D}=0.26、F_{18D}=0.20、F_{22D}=0.49，极显著低于辽2345($P_{10D\sim22D}$≤0.000 7)；授粉后26 d差异不显著(P_{26D}=0.154 5)。

丝氨酸羟甲基转移酶基因*Shmt*在授粉后5个时期的表达量依次为F_{10D}=0.94、F_{14D}=0.48、F_{18D}=0.47、F_{22D}=0.32、F_{26D}=0.33，均显著低于辽2345，其中，在10DAP基因表达差异达0.05水平显著(P_{10D}=0.044 9)，14DAP～26DAP基因表达量差异达极显著水平($P_{14D\sim26D}$≤0.001 8)。

丙酮酸磷酸双激酶基因*Ppdk*授粉后5个时期的相对表达量依次为F_{10D}=0.27、F_{14D}=0.80、F_{18D}=0.56、F_{22D}=0.17、F_{26D}=0.14，均显著低于辽2345；在14DAP基因表达量达0.05水平显著(P_{14D}=0.049 8)，其他4个时期达极显著水平(P_{10D}=0.000 3，$P_{18D\sim26D}$<0.000 1)。

2.2 近等基因系中*O2*的表达量变化趋势

应用设计的*O2*基因荧光定量引物，进行*O2*表达量的检测(图2)。由图2可知，10 DAP～14 DAP，*O2*基因相对表达量差异不显著(P_{14D}=0.229 6)；在14 DAP～26 DAP，表达量呈不断上升的趋势；26 DAP表达量达最高值(F_{26D}=13.18)；在18 DAP～26 DAP，*O2*基因表达量均极显著高于10 DAP($P_{18D\sim26D}$≤0.000 1)。辽2345/*o2*中，*O2*基因的相对表达量在0.002～0.012，基本检测不到*O2*的表达。

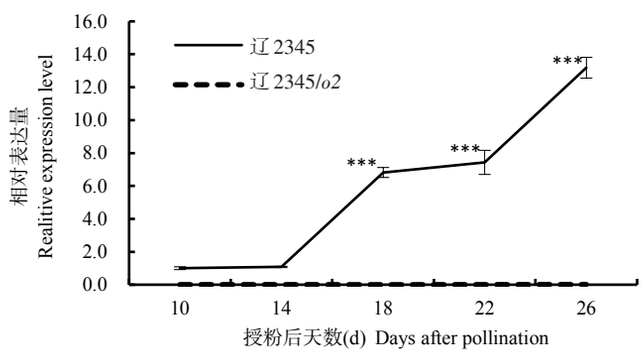


图2 近等基因系中*O2*相对表达量的变化趋势

Fig.2 Change trend of relative expression of *O2* in the NILs

3 结论与讨论

3.1 荧光定量PCR

荧光定量PCR技术是指在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累监测整个反应的进程，最后通过内参归一化处理进行相对定量的方法。本文所用染料SYBR Green I是一种非饱和菁类荧光素，利用与双链DNA小沟结合发光的理化特征指示扩增产物的增加，其处于游离状态时，检测不到荧光信号，当结合dsDNA后荧光强度明显增强，即被荧光探测系统检测到，荧光强度的增加与初始模板量相关。内参基因选用表达量不发生变化的*Actin*。

该方法简便易行、成本较低，但特异性较差，易与非特异性双链DNA结合，产生假阳性和引物二聚体。本实验在RNA提取和cDNA第一链的反转录中均加入了去DNA酶，以防止RNA中有DNA污染；根据荧光定量PCR的要求严格设计引物，并选择条带单一、大小正确的引物用于qRT-PCR，避免了引物二聚体的产生。该方法可以准确反映反应体系中反转录和扩增过程的效率，使结果更为可信。

3.2 辽2345中*O2*表达量及其变化趋势

Gallusci等研究发现，OPAQUE2蛋白是在胚乳中特异表达的，且在10 DAP表达开始增加[31]。本文检测发现，野生型材料辽2345中*O2*表达量在14 DAP到26 DAP表达量快速上升。本研究中*O2*表达量之所以在14DAP开始增加，很可能与取样年份气候干旱、取样地病虫害严重、玉米植株生长环境恶劣等实际情况造成玉米的胚乳发育速度减缓有一定关系。

3.3 近等基因系中候选基因的表达量分析

在辽2345/*o2*中，*Chfi*表达量为辽2345中的7.8～26.7倍，说明*O2*很可能抑制了该基因的表达，*O2*丧失后部分解除了对该基因转录的抑制，使得其转录本大大增加，但由于恶劣环境对不同试验材料的影响不同，不能排除环境因素对近等基因系间该基因表达量差异的影响。

在辽2345中,*Ubc*、*Sod4ap*和*Lgl*的表达量在18DAP到26DAP时期内较高,这与*O2*在14DAP表达量呈上升趋势相一致,说明*O2*能够促进*Ubc*、*Sod4ap*和*Lgl*的转录。宋任涛等研究发现,OPAQUE2可以结合在*Lgl*基因启动区从而调控其表达[32],与本研究结果相似。*Hmt3*在近等基因系中的表达差异不显著,分析认为其很可能不受*O2*基因的调控。*Sdh*的表达量变化趋势较复杂,前人研究表明,在*o2*突变体中山梨醇脱氢酶的活性较野生型有明显的提高[33]。本研究中*Sdh*在近等基因系中的相对表达量呈现高低相间的变化,在14DAP表达水平差异达4倍以上,说明在辽2345/*o2*中14DAP该基因的表达较高,有待进一步的研究验证。

前人研究结果表明,OPAQUE2可以识别醇溶蛋白基因启动区的特定序列[34~36]。*LOC541920*为50kD *γ-zein*相关前体蛋白,本实验结果表明,与野生型中相比,突变体中其转录本含量明显被抑制,与前人研究结果一致。在辽2345/*o2*中,*Shmt*的表达量在授粉后各时期均较辽2345显著下调,且其相对表达量差异随*O2*基因的表达量升高而加剧,说明*O2*基因的存在促进了其表达。Maddaloni等研究证明,玉米胚乳*cypdkZm1*基因的表达受OPAQUE2蛋白的调控[37]。本文中*Ppdk*在突变体中各时期表达量均显著低于辽2345,随着*O2*基因表达量上升,在14DAP~26DAP表达量差异加剧,说明辽2345中*Ppdk*基因受到了*O2*的调控,与前人结果一致。

本实验通过对相关基因荧光定量结果进行分析,推测认为在胚乳发育过程中双官能团淀粉酶抑制剂基因*Chfi*很可能受到*O2*基因的抑制作用,而*O2*很可能对泛素结合酶基因*Ubc*、乳酰谷胱甘肽裂解酶基因*Lgl*、山梨醇脱氢酶基因*Sdh*、50kD *γ-zein*前体LOC541920 precursor基因*LOC541920*、丝氨酸羟甲基转移酶基因*Shmt*和丙酮酸磷酸双激酶基因*Ppdk*等存在激活作用,其中,*Lgl*、*Sdh*、*LOC541920*和*Ppdk*与前人研究结果较一致。

参考文献:

[1] 杨晓辉,韩晓清,崔书会 . 中国优质蛋白玉米育种研究进展[J] . 北京农学院学报, 2005,20(1):71-75 .
Yang X H, Han X Q, Cui S H. Current situation of QPM breeding in China and forecast of the development and utilization[J]. Beijing Agric. Coll, 2005, 20(1): 71-75. (in Chinese)

[2] Bhan M K, Bhandarin N, Bahl R. Management of the severely malnourished child: perspective from developing countries[J]. British Medical Journal, 2003, 326(7381): 146-151.

[3] Azevedo R A, Arruda P. High-lysine maize: the key discoveries that have made it possible[J]. Amino Acids, 2010, 39: 979-989.

[4] Misra P S, Mertz E T. Studies on corn proteins. VL. Endosperm protein changes in single and double endosperm mutants of maize[J]. Cereal Chem., 1975, 52: 161-166.

[5] Delhaye S, Landry J. Protein-incorporated tryptophan accumulation in developing grain of maize[J]. J. Cereal Sci., 1986, 4: 117-123.

[6] Habben J E, Kirleis A W, Larkins B A. The origin of lysine-containing proteins in *opaque-2* maize endosperm[J]. Plant Mol. Biol., 1993, 23(4):825-8382.

[7] Hartings H, Maddaloni M, Lazzaroni N, et al. The *O2* gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators[J]. The EMBO journal, 1989, 8(10): 2795.

[8] Schmidt R J, Burr F A, Aukerman M J, et al. Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87(1): 46-50.

[9] Schmitz D, Lohmer S, Salamini F, et al. The activation domain of the maize transcription factor *Opaque-2* resides in a single acidic region [J]. Nucleic Acids Res., 1997, 25(4): 756-763.

[10] Yunes J A, Vettore A L, da Silva M J, et al. Cooperative DNA binding and sequence discrimination by the *Opaque2* bZIP factor[J]. Plant Cell, 1998, 10(11): 1941-1955.

[11] Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, et al. Translation of the mRNA of the maize transcriptional activator *Opaque-2* is inhibited by upstream open reading frames present in the leader sequence[J]. Plant Cell, 1993, 5(1): 65-73.

[12] Kodrzycki R, Boston R S, Larkins B A. The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription[J]. The Plant Cell Online, 1989, 1(1): 105-114.

[13] Wallace J C, Lopes M A, Paiva E, et al. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ-zein in modified *opaque-2* maize[J]. Plant physiology, 1990, 92(1): 191-196.

[14] Damerval C, Guilloux M L. Characterization of novel proteins affected by the *o2* mutation and expressed during maize endosperm development[J]. Molecular and General Genetics, 1998, 257(3): 354-361.

[15] Kemper E L, Neto G C, Papes F, et al. The role of *Opaque2* in the control of lysine- degrading activities in developing maize endosperm[J]. The Plant Cell Online, 1999, 11(10): 1981-1993.

[16] Fang L Y, Gross P R, Che-Hong C, et al. Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*[J]. Plant molecular biology, 1992, 18(6): 1185-1187.

[17] Bass H W, Webster C, OBrian G R, et al. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator *Opaque-2*[J]. The Plant Cell Online, 1992, 4(2): 225-234.

[18] Fonzo N D, Hartings H, Brembilla M, et al. The b-32 protein from maize endosperm, an albumin regulated by the *O2* locus: nucleic acid(cDNA) and amino acid sequences[J]. Molecular and General Genetics, 1988, 212(3): 481-487.

[19] Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, et al. The maizeregulatory locus *Opaque-2* encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the *b-32* gene[J]. The EMBO journal, 1991, 10(3): 617-624.

[20] Yunes J A, Cord N G, Leite A, et al. The role of the *Opaque2* tran-

scriptional factor in the regulation of protein accumulation and amino acid metabolism in maize seeds[J]. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 1994, 66: 227.

[21] Dalby A, Davies II. Ribonuclease activity in the developing seeds of normal and *opaque-2* maize[J]. Science, 1967, 155(769): 1573-1575.

[22] Giroux M J, Boyer C, Feix G, et al. Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in the maize endosperm[J]. Plant Physiol, 1994, 106(2): 713-722.

[23] Murphy J J, Dalby A. Changes in the protein fractions of developing normal and *opaque-2* maize endosperm[J].Cereal Chem., 1971, 48: 336-349.

[24] Loesch P J Jr, Foley D C, Cox D F. Comparative resistance of *Opaque-2* and normal inbred lines of maize to ear-rotting pathogens[J]. Crop Sci., 1976, 16: 841-842.

[25] Moro-t Gaudry J F, Farineau J, Jolivet E. Effect of leaf position and plant age in photosynthetic carbon metabolism in leaves of 8 and 16 day-old maize seedlings(W64A) with and without the gene *Opaque-2*[J]. Photosynthetica, 1979, 13: 365-375.

[26] Gupta D. Shortening of protandry by *Opaque-2* mutant gene[J]. Indian J. Genet Plant Breed, 1979, 106: 713-722.

[27] Damerval C, de Vienne D. Quantification of dominance for proteins pleiotropically affected by *opaque-2* in maize[J]. Heredity, 1993, 70: 38-51.

[28] Habben J E, Moro G L, Hunter B G, et al. Elongation factor 1A concentration is highly correlated with the lysine content of maize endosperm[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 8640-8644.

[29] Damerval C, Guilloux M L. Characterization of novel proteins affected by the *O2* mutation and expressed during maize endosperm development[J]. Mol. Gen. Genet, 1998, 257: 354-361.

[30] 柯枫英,石永刚,郑用琏,等 . 玉米淀粉修饰基因*du*的RAPD标记研究[J] . 作物学报,1999,25(1):1-7 .
Ke F Y, Shi Y G, Zheng Y L, et al. RAPD markers of starch-modified gene du in maize[J]. Acta Agronom Sin., 1999, 25(1): 1-7. (in Chinese)

[31] Gallusci P, Salamini F, Thompson R D. Differences in cell type-specific expression of the gene *Opaque2* in maize and transgenic tobacco[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 244(4): 391-400.

[32] Li C, Qiao Z, Qi W, et al. Genome-Wide characterization of cis-Acting DNA targets reveals the transcriptional regulatory framework of *Opaque2* in maize[J]. The Plant Cell, 2015, 27(3): 532-545.

[33] Gallusci P, Salamini F, Thompson R D. Differences in cell type-specific expression of the gene *Opaque2* in maize and transgenic tobacco[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 244(4): 391-400.

[34] Schmidt R J, Burr F A, Aukerman M J, et al. Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(1): 46-50.

[35] Schmidt R J, Ketudat M, Aukerman M J, et al. *Opaque-2* is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes[J]. The Plant Cell Online, 1992, 4(6): 689-700.

[36] Ueda T, Waverczak W, Ward K, et al. Mutations of the 22-and 27-kD zein promoters affect transactivation by the *Opaque-2* protein [J]. The Plant Cell Online, 1992, 4(6): 701-709.

[37] Maddaloni M, Donini G, Balconi C, et al. The transcriptional activator *Opaque-2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms[J]. Molecular and General Genetics, 1996, 250(5): 647-654.

(责任编辑:朴红梅)