

花椰菜细胞质雄性不育基因特异 PCR 标记的筛选

王春国, 宋文芹

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 基于同源序列的候选基因法 (homology-based candidate gene method), 通过检索 NCBI 核酸及蛋白数据库, 获得细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility CMS) 相关的基因或开放读码框。生物学软件分析, 根据保守区设计 5 对特异引物, PCR 扩增, 其中引物 P9/P10 在花椰菜细胞质雄性不育系 knxd612 中特异扩增出 313 bp 的片段。单株检测, RT-PCR 分析, 斑点杂交鉴定, 确定此片段为花椰菜细胞质雄性不育系 knxd612 所特有。序列分析表明该片段与 Ogura 型胞质不育萝卜, 不育相关开放读码框 *orf138* 的同源性高达 98%。初步结果显示实验所用不育花椰菜胞质亦可能为 Ogura 型, 为进一步从分子水平研究花椰菜细胞质雄性不育打下了坚实的基础。

关键词: 花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*); 细胞质雄性不育; CMS; 候选基因

中图分类号: S36

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)02-0236-05

Identification of PCR Markers Associated with Cytoplasmic Male Sterility in *Brassica oleracea* var. *Botrytis*

WANG Chun-Guo, SONG Wen-Qin

(The College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The homology-based candidate gene method was used to identify the specific PCR markers linked to cytoplasmic male sterility (CMS) in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*). By searching the DNA and protein data-base of NCBI, correlative genes or open reading frames were identified. Through analysis of biosoft, based on the conservative regions, five primers were designed. Among them, only primer P9/P10 produced a 313-bp specific fragment. Identified by individual plant testing, analysis of RT-PCR and dot blot, this fragment was only found in CMS cauliflower knxd612. Analysis of the sequence indicated it was high homologous (98%) with *orf138* of Ogura CMS radish. Preliminary results suggested that the cytoplasmic type of CMS cauliflower knxd612 might belong to Ogura type. This research offered a good foundation to further investigate the CMS mechanism of cauliflower at molecular level.

Key words: cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*); cytoplasmic male sterility (CMS); candidate gene

细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, 简称 CMS) 是广泛存在于高等植物中的一种自然现象, 迄今已在 150 多种植物中发现了 CMS^[1], 其在农作物的杂种优势利用上具有重要的价值。利用 CMS 培育不育系进行杂交制种, 可免去人工去雄, 节省人力物力, 并可提高杂交种子的纯度, 增加农作

物的产量。同时它又是遗传学研究中一个颇有争议的理论问题。由于在实际应用及理论研究上的双重意义, 长期以来该研究备受国内外学者的关注。

对细胞质雄性不育高粱、玉米、油菜、水稻、矮牵牛、菜豆、萝卜等^[2~6]的研究取得了重大进展, 从中找到了一些与不育相关的基因或嵌合体。这对进一

收稿日期: 2004-02-19; 修回日期: 2004-05-27

作者简介: 王春国 (1979—), 男, 山东日照人, 博士研究生, 专业方向: 分子细胞遗传学。E-mail: htg1979@eyou.com

通讯作者: 宋文芹 (1953—), 女, 教授, 博士生导师, 专业方向: 分子细胞遗传学。E-mail: songwq@eyou.com

步阐明细胞质雄性不育发生的分子机制,指导新不育系的培育奠定了坚实的基础。而有关花椰菜细胞质雄性不育分子机制的研究却少有报道。花椰菜属十字花科,芸薹属,是重要的蔬菜作物之一,具有明显的杂种优势^[7],杂种一代已广泛用于生产。但目前可利用的不育系还比较少,且胞质单一,基于此本研究采用同源序列的候选基因法(homology-based candidate gene method),充分利用 Genbank 数据库中丰富的信息资源及相关的生物学软件,设计特异引物,获得与花椰菜细胞质雄性不育相关的区段,为下一步深入研究其发生机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

花椰菜(*Brassica oleracea* var. *Botrytis*)细胞质雄性不育系 knxd612,保持系 knxm526,由天津蔬菜研究所孙德岭研究员提供。一份置于暗室待其长成 2~5 cm 黄化苗备用;另一份种于该所温室中。

1.2 混合 DNA 及单株 DNA 的提取

各取 0.2 g 黄化苗及单株(10 株)开花时期的嫩叶,CTAB 法^[8]提取总 DNA。风干后溶于 50 μ L TE (pH=8.0)中,RNase 37 $^{\circ}$ C 处理 24 h, -20 $^{\circ}$ C 储存。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

观察温室中不育株及可育株的生长情况,各选 10 株同一时期开花的植株,取其花,Trizol 试剂(In-vitrogen)提取总 RNA,风干后溶于 DEPC 处理的 50 μ L ddH₂O 中。取 5 μ L 测 OD 值,其他 -70 $^{\circ}$ C 储存。cDNA 的合成采用 cDNA 合成试剂盒(Roche)。

1.4 CMS 相关基因特异引物的设计

对 NCBI 核酸及蛋白数据库进行全面检索,共获得 1 085 个与 CMS 发生相关的核酸序列,对这些序列分类,共确定 5 个 CMS 相关候选基因:*atpA*, *atp6*, *atp9*, *cox II*, *orf1*。OMIGA, Primer premier 5.0 等生物学软件对序列进行同源性分析,根据序列的保守区进行引物设计,合成引物如下:

P1/P2: 5' GAATTTGCCAGCGGTGTGA3'/5' TGGTCGGCGTATAACAATAATGA3' (*atpA*);

P3/P4: 5' ATGATTTTCGTGCTGAACCTGG3'/5' ATATAGCTACACCTAATTCCAGACC3' (*atp6*);

P5/P6: 5' CATGTCAATGCTATGTGCGATC3'/5' TCAGTAATGCATCGGATGAGT3' (*atp9*);

P7/P8: 5' GCTTACTAGTATGTCTGTATCG3'/5'

ATGCAACATGCAATGCTGAATGGT3' (*cox II*);

P9/P10: 5'CCATATTTGGCTAAGCTGGTTTTC-T3'/5'TATCATCTCGGTCCATTGTCCAC3' (*orf1*)。

1.5 CMS 相关候选基因的 PCR 扩增

分别以不育系及保持系的总 DNA 为模板,利用设计的引物进行 PCR 扩增。PCR 体系为 25 μ L,其中含有 1 μ L 模板 DNA(50 ng/ μ L),0.5 μ L dNTP(0.2 mmol/L)(上海生工生物工程有限公司),1 μ L 引物(0.5 μ mol/L),2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液,1 μ L *Taq* DNA 聚合酶(2 U)(联星生物)19 μ L ddH₂O。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,后进入 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s 循环,共 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完后各取 5 μ L PCR 反应液进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外观察,照相。

1.6 特异引物的单株检测

将获得的特异引物分别以不育系和保持系单株 DNA 为模板进行特异性检测,PCR 反应体系及条件同上。

1.7 RT-PCR

以反转录所得 cDNA 为模板,检测候选基因在开花时期的表达,PCR 反应体系及条件同上。

1.8 斑点杂交鉴定

探针标记:PCR 法直接标记探针。PCR 体系 25 μ L,其中 0.5 μ L dNTP(0.2 mmol/L),0.1 μ L DIG-11-dUTP(50 μ mol/L)(Roche),18.9 μ L ddH₂O,其他条件同上;膜制备:将不育系及保持系总 DNA 及总 RNA 分别取 1 μ L(50ng)点到尼龙膜上,紫外交联(254 nm)3 min;杂交,显色^[9]。

1.9 序列分析

PCR 产物直接测序(上海生工生物工程有限公司),对测序结果进行 blast 分析。

2 结果

2.1 相关引物的 PCR 筛选

实验中为了便于一次 PCR 能对多对引物进行筛选,设计引物时使 *T_m* 值尽可能相近。分别以不育系及保持系总 DNA 为模板,5 对引物同时进行 PCR 扩增。结果(图 1)引物 P5/P6, P7/P8,在两系中没有扩增产物;引物 P1/P2, P3/P4 有扩增产物,但没有表现出差异;只有引物 P9/P10 在不育系及保持系中分别获得一条差异条带。不育系中特异条带约 300 bp,保持系中特异条带约为 600 bp。

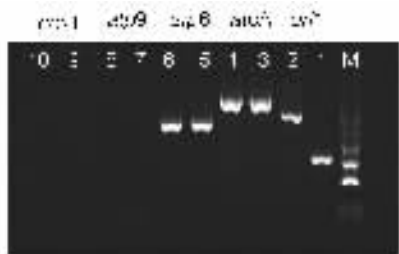


图 1 候选引物在不育系及保持系中的 PCR 分析

P1/P2, P3/P4, P5/P6, P7/P8, P9/P10 分别扩增 *atpA*, *atp6*, *atp9*, *cox II*, *orf1* 的片段; 1, 3, 5, 7, 9: CMS 系; 2, 4, 6, 8, 10: 保持系; M: 100 bp marker。

Fig. 1 PCR analysis of candidate primers in CMS line and maintainer line

P1/P2, P3/P4, P5/P6, P7/P8, P9/P10 were used to amplify the fragment of *atpA*, *atp6*, *atp9*, *cox II*, *orf1* respectively; 1, 3, 5, 7, 9: CMS line; 2, 4, 6, 8, 10: maintainer line; M: 100 bp marker.

2.2 特异引物的单株 PCR 检测

为了检测引物 P9/P10 的特异性, 分别各取 10 株不育系, 保持系单株 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果(图 2)进一步确认了引物 P9/P10 的特异性。



图 2 引物 P9/P10 单株 PCR 检测

1: CMS 系混合 DNA; 2: 保持系混合 DNA; 3~6: CMS 系单株 DNA; 7~10: 保持系单株 DNA; M: 100 bp marker。

Fig. 2 PCR test of individual plant using primer P9/P10

1: DNA pool of CMS line; 2: DNA pool of maintainer line; 3~6: individual DNA of CMS line; 7~10: individual DNA of maintainer line; M: 100 bp marker.

2.3 RT-PCR 分析花椰菜中 CMS 相关候选基因的表达及斑点杂交分析

实验中对候选基因 *orf1*, *atpA*, *atp6* 在开花时期的表达进行 RT-PCR 分析(图 3), 结果显示候选基因 *orf1* 在两系花中存在表达差异, 实验所选扩增区域在保持系中无表达。基因 *atpA* 及 *atp6* 没有表现出差异; 以 P9/P10 为引物 PCR 直接标记不育

系中所得的特异片段为探针斑点杂交, 基因组 DNA 点杂交显示该片段在两系中均有杂交信号; 而总 RNA 点杂交表明杂交信号只出现在不育系中(图 4), 该结果与上述 RT-PCR 的结果一致。

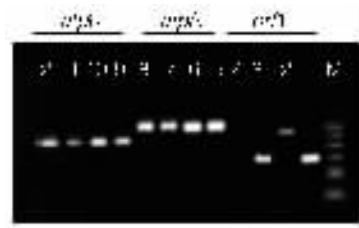


图 3 引物 P1/P2, P3/P4, P9/P10 的 RT-PCR 分析

P1/P2, P3/P4, P9/P10 分别扩增 *atpA*, *atp6*, *orf1* 的片段 1, 5, 9: CMS 系基因组 DNA; 2, 6, 10: 保持系基因组 DNA; 3, 7, 11: CMS 系 cDNA; 4, 8, 12: 保持系 cDNA; M: 100 bp marker。

Fig. 3 Analysis of RT-PCR by primers of P1/P2, P3/P4, P9/P10

P1/P2, P3/P4, P9/P10 were used to amplify the fragment of *atpA*, *atp6*, *orf1* respectively; 1, 5, 9: genomic DNA of CMS line; 2, 6, 10: genomic DNA of maintainer line; 3, 7, 11: cDNA of CMS line; 4, 8, 12: cDNA of maintainer line; M: 100 bp marker.

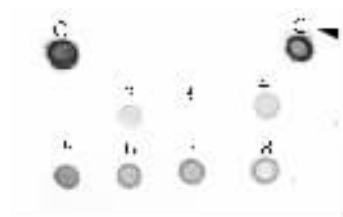


图 4 Southern 及 Northern 点杂交分析

1, 3: 保持系总 RNA; 2, 4: CMS 系总 RNA; 5, 7: 保持系总 DNA; 6, 8: CMS 系总 DNA; C: 对照(*orf1* 在 CMS 系中的部分扩增产物)。

Fig. 4 Analysis of Southern and Northern dot blot

1, 3: total RNA of maintainer line; 2, 4: total RNA of CMS line; 5, 7: total DNA of maintainer line; 6, 8: total DNA of CMS line; C: control (PCR product of partial *orf1* in CMS line).

2.4 测序结果及 Blast 分析

PCR 产物直接测序, 片段长度为 313 bp (accession number: AY515496) 内部含有由 39 个碱基为一个单位构成的串联重复(图 5); Blast 分析表明该片段与 Ogura 型胞质不育萝卜线粒体开放读码框 *orf138* 高度同源。



图 5 测序结果及 blast 分析(阴影及箭头所示为 3 个串联重复序列)

Fig.5 The result of sequencing and analysis of blast (the shadow and underlines with arrows indicated the three 13 codon repeats)

3 讨 论

对植物细胞质雄性不育分子机制的研究国内学者也做了许多有益的尝试,采用 RFLP、RAPD、AFLP 等方法从一些重要作物中获得了一些与细胞质雄性不育相关的特异分子标记^[10~16],在一定程度上实现了分子标记辅助育种。但距获得确切的不育基因还有一段距离。这主要是获得的标记虽与之连锁但往往不重合,使采用图位克隆法获得不育基因变得更加困难。而这也正是我国相关研究的瓶颈所在。因此寻求新的途径提高标记选择的靶向性就更为重要。近年来随着人类基因组计划及其他模式生物基因组计划的实施使得相关的生物数据资料在以前所未有的速度积累。其中绝大部分数据是免费共享的,充分挖掘数据库中的信息资源,加以利用可以减少实验中的盲目性,缩短实验周期。本研究就基于这样一种思想,只采用 5 对引物就在花椰菜细胞质雄性不育系中找到了特异的标记。序列分析表明该标记与 Ogura 型胞质不育萝卜线粒体开放读码框 *orf138* 的同源性高达 98%,且在序列一致区内能编码一个由 91 个氨基酸构成的多肽(图 5)。因此初步结果表明实验所用的胞质不育花椰菜的胞质类型亦可能为 Ogura

型。大量对 Ogura 型胞质不育萝卜的研究已证明开放读码框 *orf138* 确可引起 Ogura 型胞质不育^[17,18]。其中编码区内一个由 39 个碱基构成的串联重复,被认为是线粒体基因组重组的结果,该重复的多少与胞质不育密切相关^[19]。在我们的研究中也观察到了这一重复(图 5)。*orf138* 在 Ogura 型胞质不育萝卜内能编码一个约 16kD 的线粒体膜蛋白,在引入恢复基因后,恢复基因可在转录及翻译水平对其进行调控。使育性得以恢复^[20]。因为 Ogura 胞质最早在萝卜中发现,因此有关萝卜 Ogura 型胞质不育及育性恢复研究的比较多。而这方面的研究在同属一个科的花椰菜中开展的比较少。是否实验所用的胞质不育花椰菜与 Ogura 型胞质不育萝卜具有共同的不育及育性恢复机制,还有待于进一步的研究,该研究将进一步加深对细胞内核质互作的认识。

参 考 文 献(References):

[1] Patrick S S, Roger P W. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*, 1998,3(5): 175~180.

[2] Johns C. A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile been

plants. *Plant Cell*, 1992, 4(4): 435~449.

- [3] Dewey G, Leving S, Timothy D H. Novel recombination in the Maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male sterile cytoplasm. *Cell*, 1986, 44: 439~449.
- [4] H V Tang, W Chen D, R Pring. Mitochondrial orf107 transcription, editing and nucleolytic cleavage conferred by the Rf3 are expressed in sorghum pollen. *Sex Plant Reprod*, 1999, 12: 53~59.
- [5] F Budar, G Pelletier. Male sterility in plants; occurrence, determinism, significance and use. *Sciences delavie/Life Sciences*, 2001, 324: 543~550.
- [6] Handa H, Nakajima K. Different orgnization and altered transcription of the mitochondrial atp6 gene in the male sterile cytoplasm of rapeseed (*Brassica napus L.*). *Curr Genetics*, 1992, 2(2): 153~159.
- [7] HUANG Cong-Li, LI Chuan-Yong, PAN Ai-Min, XU Rui-De, XU Wei-Dong. RAPD analysis on the selfe-incompatibility of cauliflower. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2001, 16(4): 58~61.
黄聪丽, 李传勇, 潘爱民, 许瑞德, 许卫东. 花椰菜自交不亲和性的 RAPD 分析. 福建农业学报, 2001, 16(4): 58~61.
- [8] Fred Ausubel, Roger Brent, Robert E Kingston, David D Moore, J G Seidman, John A Smith, Kevin Struhl. Short Protocols in Molecular Biology (3rd Ed). John Wiley & Sons, Inc., 1998, 37~38.
F 奥斯伯, R 布伦特, R E 金斯顿, D D 穆尔, J G 塞德曼, J A 史密斯, K 斯特拉尔(颜子颖、王海林译, 金东雁校). 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, 37~38.
- [9] LU Sheng-Dong. Current Protocols for Molecular Biology (in Chinese). Beijing: Peking Union Medical College Press, 1993, 217~221.
卢圣栋. 现在分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993, 217~221.
- [10] 王永飞, 马三梅, 王 鸣, 郑学勤, 谷茂, 胡胜武. 油菜 Polima 和陕 2A 细胞质雄性不育相关基因的序列比较. 科学通报, 2001, 46(18): 1559~1563.
- [11] QIU Yan-Guang, SHEN Yin-Zhu, HUANG Zhan-Jing, ZHAO Bao-Cun, HE Cong-Fen, BI Cai-Li. Comparative studies of mitochondrial DNA of T-type cytoplasmic male sterile lines and their maintainer in wheat. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(2): 166~170.
仇艳光, 沈银柱, 黄占景, 赵保存, 何聪芬, 秘彩莉. 不同小麦 T 型细胞质雄性不育系及其保持系线粒体 DNA 的比较研究. 遗传学报, 2001, 28(2): 166~170.
- [12] FAN Chang-Fa, SUN Chun-Yun, GUO Xiao-Cai, ZHANG Fu-Yao, SUN Yi, NIU Tian-Tang, JIA Jing-Fen. Sequence variation of the chloroplast gene ndh D region in cytoplasmic male sterile sorghum. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(10): 907~914.
范昌发, 孙春韵, 郭晓才, 张福耀, 孙 毅, 牛天堂, 贾敬芬. 细胞质雄性不育高粱叶绿体 ndh D 基因的序列变异. 遗传学报, 2002, 29(10): 907~914.
- [13] WANG Xue-De, ZHANG Tian-Zhen, PAN Jia-Ju. Cytological observation of microsporogenesis and RAPD analysis of mitochondrial DNAs for cytoplasmic male sterile cotton lines. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, 31(2): 70~75.
王学德, 张天真, 潘家驹. 细胞质雄性不育棉花小孢子发生的细胞学观察和线粒体 DNA 的 RAPD 分析. 中国农业科学, 1998, 31(2): 70~75.
- [14] WANG Yong-Fei, WANG Ming, ZHENG Xue-Qin. The molecular biology of cytoplasmic male sterility in chinese cabbage (*Brassica campestris ssp. pekinensis*). *Hereditas* (Beijing), 2002, 24(1): 63~64.
王永飞, 王 鸣, 郑学勤. 大白菜细胞质雄性不育的分子生物学研究. 遗传, 2002, 24(1): 63~64.
- [15] LI Xiao-Ming, ZHENG Yong-Lian, ZHANG Fang-Dong, ZHU Ying-Guo. RFLP analysis for mitochondrial genome of CMS rice Honglian type. *Hereditas* (Beijing), 2000, 22(4): 201~204.
李小明, 郑用琏, 张方东, 朱英国. 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析. 遗传, 2000, 22(4): 201~204.
- [16] CHEN Xue-Jun, CHEN Zhu-Jun, ZHANG Yao-Zhou. Cloning and sequencing of a specific mitochondrial DNA fragment related to cytoplasmic male sterility in tuber mustard. *Chin Appl Environ Biol*, 2003, 9(5): 513~516.
陈学军, 陈竹君, 张耀洲. 榨菜线粒体 DNA 雄性不育相关片段克隆及序列分析. 应用与环境生物学报, 2003, 9(8): 515~516.
- [17] Characterization of the radish mitochondrial orfB locus: possible relationship with male sterility in Ogura radish. *Curr Genet*, 1993, 24(1-2): 156~163.
- [18] Intra- and inter-specific variations in the mitochondrial gene orf138 of Ogura-type male-sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum*. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 725~732.
- [19] Bellaoui M, Martin-Canadell A, Pelletier G, Budar F. Low-copy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. *Mol Gen Genet*, 1998, 257(2): 177~185.
- [20] Grelon M, Budar F, Bonhomme S, Pelletier G. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids. *Mol Gen Genet*, 1994, 243(5): 540~547.