

胞质雄性不育白菜叶绿体 *ndhJ-trnF* 区域序列发生变异*

蒋 明 曹家树**

(浙江大学蔬菜研究所细胞与分子生物学实验室, 杭州 310029)

摘要 以来自 Polima 胞质甘蓝型油菜雄性不育源转育获得的不育白菜 ‘Bpol97-05A’ 和其回交亲本即保持系 ‘Bajh97-01B’ 为材料, 利用 cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)技术获得一条长约 330 bp 的特异片段 P1708, RT-PCR 验证确认该序列为不育白菜材料所特有, 经测序和 BLAST 比对, 发现该片段除 54 bp 的插入序列外, 其余部分与大白菜和甘蓝叶绿体 *ndhJ-trnF* 基因之间的一段序列完全一致. 根据基因区域两端的保守部位设计引物, 以 Polima 不育白菜 DNA 和可育甘蓝型油菜的 DNA 为模板, 分别获得了长约 1 900 bp 的序列, 比较序列发现: 不育白菜与可育白菜、甘蓝型油菜的 DNA 序列存在一定差异, ‘Bpol97-05A’ 中除多个位点发生变异外, 另有 108 bp 的插入序列, 该插入由 2 个长度为 54 bp 的重复序列组成, 重复序列中除 5’端 3 个碱基 CTT 外, 其余部分均与 *trnF* 基因 3’端 51 bp 完全相同.

关键词 白菜, cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP), *ndhJ-trnF* 区域, 序列变异, 细胞质雄性不育, 叶绿体基因

学科分类号 Q78

植物胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)是高等植物中的一种自然现象, 表现为细胞质与细胞核基因互作遗传, 不育株的花粉异常或不产生花粉粒, 但雌蕊正常, 能接受外来花粉并正常结实, 从而产生有遗传优势的杂种后代. CMS 普遍存在于被子植物中, 已在 150 多个物种中发现了这种雄性不育现象^[1], 其中包括油菜(*Brassica napus*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、洋葱 (*Allium cepa*)、芥菜 (*B. juncea*)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、水稻 (*Oryza sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum*)等农作物. 由于 CMS 不育特性的保持比较容易, 又可减少人工去雄的麻烦, 在作物杂种优势利用、群体遗传改良等方面有着巨大的应用价值, 因此对 CMS 的研究一直是热点问题, 已在细胞学、生理生化和经典遗传学等方面展开了大量研究并取得了很大进展.

近年来, 随着分子生物学理论和技术的快速发展, 国内外对植物 CMS 分子机理进行了深入的研究并取得了重大成果. 采用限制性片段长度多态性 (RFLP)、简单重复序列 (SSR)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)等技术获

得了一些与 CMS 相关的分子标记或差异片段, 并借助 cDNA 差别显示、染色体步行、转座子和同源基因克隆等方法分离得到了一些与雄性不育相关的基因^[2~5]. 线粒体和叶绿体是 CMS 研究的重点所在, 由线粒体基因变异、嵌合或不完全编辑等原因导致 CMS 已逐渐得到大家的共识, 同时, 在 CMS 作物的叶绿体中也发现了基因组水平上的差异或基因变异^[6], 但是, 是否与 CMS 直接相关仍然没有直接证据.

我们在利用 cDNA-AFLP 技术研究以来自 Polima 胞质甘蓝型油菜雄性不育源转育获得的白菜雄性不育系及其保持系花粉发育基因表达差异的过程中, 获得一差异片段 P1708, RT-PCR 结果证实, 该片段仅在不育材料中表达. 由于不育白菜 ‘Bpol97-05A’ 的细胞质来自 Polima 甘蓝型雄性不育油菜, 为进一步研究该差异是否为不育材料所特有, 我们分别以不育白菜的 DNA 和可育甘蓝型油

*浙江省重大科技项目(2005C12019-02)和国家自然科学基金资助项目(30370975).

** 通讯联系人. Tel/Fax: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

收稿日期: 2006-11-12, 接受日期: 2006-12-13

菜的 DNA 为模板, 克隆到了包含 *ndhJ* 和 *trnF* 基因全长的完整序列, 经比对, 发现不育系 *ndhJ-trnF* 区域中除多出一段长 108 bp 的重复序列外, 另有多处碱基发生变异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

白菜胞质雄性不育 ‘*Bpol97-05A*’ 和保持系细胞核不育 ‘*Bajh97-01B*’ 系来自 Polima 胞质甘蓝型油菜雄性不育源, 白菜 ‘*Bajh97-01B*’ 为受体, 经 6 代回交转育获得, 均由浙江大学蔬菜研究所细胞与分子生物学实验室保存、种植, 于抽薹开花期取叶片、小花蕾(直径 < 0.5 mm, 一级)、中花蕾(1.0~1.5 mm, 三级)和大花蕾(>2.0 mm, 五级), 用液氮速冻后, 保存在 -70℃ 低温冰箱备用。可育甘蓝型油菜(原保持系)叶片于幼苗期采自浙江大学实验农场, 保存于 -70℃ 低温冰箱备用。

1.2 总 RNA 提取、cDNA 合成及基因组 DNA 提取

总 RNA 提取采用 TRIzol 法, TRIzol® 试剂购自 LIFE TECHNOLOGIES 公司; cDNA 合成试剂盒 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 购自 TaKaRa 公司, cDNA 第一链和第二链的合成按其提供的说明书进行; 基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[7]。

1.3 PCR 相关引物的设计

cDNA-AFLP 所用的接头、相关引物以及 RT-PCR 所用的引物均由上海生工生物技术有限公司合成, 相关序列如下: Taq I 接头, 5' GACGATGAGTCCTGAC 3', 5' CGGTCACGGACTCAT 3'; Taq I 预扩增引物, 5' GACGATGAGTCCTGACCGA; Taq I 选择性扩增引物, 5' GATGAGTCCTGACCGANN (N 代表 A、T、C、G 任一碱基的一种, T4~T19 共 16 条引物); Ase I 接头, 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'; 5' TAGGTACGCAGTC 3'; Ase I 预扩增引物, 5' CTCGTAGACTGCGTACCTAAT 3'; Ase I 选择性扩增引物, 5' GACTGCGTACCTAATNN (A4~A19 共 16 条引物)。RT-PCR 验证差异片段所用的引物(P1/P2)和扩增 *ndhJ-trnF* 基因区域序列的引物(P3/P4)如下: P1, 5' AATAAATTCCCGGTCCA 3', P2, 5' CTGGTGGCACGAGGATT 3', P3, 5' ATTGATTGAGCCTTGATG 3', P4, 5' CAGGGCACTTTGTCCTT 3'。

1.4 cDNA-AFLP 和 RT-PCR

cDNA-AFLP 操作参照 Bachem 等^[8]的方法进

行。cDNA 稀释成相同浓度后进行酶切、连接和扩增等操作, 采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶, 于 1× TBE 缓冲液, 1 700 V 恒压下进行电泳。

RT-PCR 分别以不育系和保持系的三级花蕾 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增体系为 25 μl, 含 1×PCR 缓冲液, 0.2 μmol/L 的 dNTPs, 各 0.2 μmol/L 引物, 50 ng cDNA 模板, 1 U 的 Taq 酶。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 33 个循环; 72℃ 继续延伸 7 min, 最后 4℃ 保存。PCR 扩增结束后, 分别取 10 μl PCR 反应产物点样于 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳、拍照、记录。

全长序列扩增分别以不育白菜和可育油菜的 DNA 为模板, 扩增体系与 RT-PCR 相同, 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 33 个循环; 72℃ 继续延伸 7 min, 最后 4℃ 保存。

1.5 PCR 产物回收和测序

实验所用的限制性内切酶和 p-GEM T-easy 载体克隆试剂盒均购自 Promega 公司, PCR 产物回收纯化试剂盒购自 V-gene 公司, 回收操作按说明书进行。PCR 产物回收后, 克隆到 T-easy 载体, 置于 4℃ 过夜, 后转入 DH-5α 大肠杆菌中, 挑取单个白色菌落于 LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养 8 h, 碱裂解法抽提质粒, 用 *EcoR* I 进行单酶切鉴定, 各取 5 个阳性克隆送上海博亚生物技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 B1708 差异片段的回收、测序和 RT-PCR 验证

2.1.1 差异片段的回收、测序. 在引物组合 A17T08 中, 发现一长度约 330 bp 的片段在不育白菜 ‘*Bpol97-05A*’ 的大蕾、中蕾、小蕾中均有表达, 而在保持系 ‘*Bajh97-01B*’ 的三级花蕾中均未见表达, 将该片段命名为 P1708。经回收、测序和序列比对, 发现除 54 bp 的插入序列外, 其余部分与大白菜和甘蓝叶绿体的 *ndhJ-trnF* 基因区域一段完全一致(图 1)。

2.1.2 半定量 RT-PCR 验证. 根据 P1708 序列, 设计引物对 P1/P2, 分别以 ‘*Bpol97-05A*’ 和 ‘*Bajh97-01B*’ 的三级花蕾 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 获得预期大小一致的电泳条带, 电泳结果与 cDNA-AFLP 结果一致(图 2)。

GATGAGTCCAGACCGAAGATCCAATAAATCCCGGTCCAAAACCTTTTTCATTACTACTTTTGCGTTTCTTTTAATTGACATA
GACCTAAGTCATCTCATAAAATGAGAATGATACTTCGGTAATGGCCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAAAT
CCTCGTGTCAACAGTTCAAATCTGGTTCCTGGCATAGGGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGTCACCAGTTCAAATCTGGTTC
TTGGCATAGGGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGCCACCAGTTCAAATCTGGTTCCTGGCATAGGATTGATTAGGTACGCAGT
C

Fig. 1 The cDNA-AFLP fragment sequence of P1708
The blackened area indicates the 54 bp insertion.

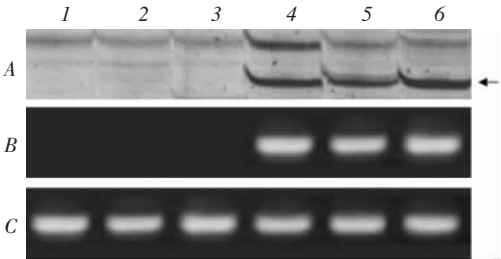


Fig. 2 The results of cDNA-AFLP and RT-PCR
1~3 and 4~6 indicate stage I, stage III and stage V flower buds of male fertile cabbage ‘*Bajh97-01B*’ and Polima male fertile Chinese cabbage-pak-choi ‘*Bpol97-05A*’ respectively. A: The results of cDNA-AFLP, B: The result of RT-PCR, C: The internal control of actin.

2.2 全长序列的克隆、测序和比对

参照 GenBank 中发表的 *ndhJ* 与 *trnF* 基因之间序列, 设计全长引物 P3/P4, 分别以 ‘*Bpol97-05A*’ 的 DNA 和可育甘蓝型油菜的 DNA 为模板进行 PCR, 最终获得长约 1 900 bp 与预期大小一致的条带(图 3), 条带分别命名为 MS 和 MF.

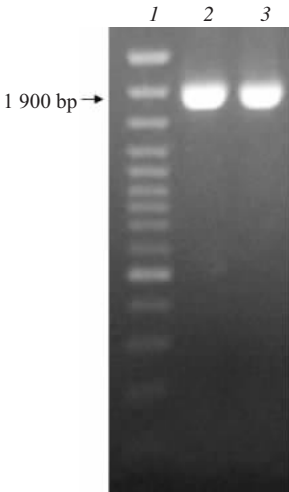


Fig. 3 RT-PCR amplification results of *trnL-ndhJ* region
Lane 1 indicates 100 bp ladder DNA marker. Lane 2 and lane 3 indicate amplified products of Polima male sterile Chinese cabbage-pak-choi ‘*Bpol97-05A*’ and male fertile oilseed rape.

测序结果表明, MS 长度为 1 980 bp, 而 MF 的长度为 1 874 bp, 两者相差 106 bp, 所克隆的序列均包含 *trnF*、*ndhJ* 的全长和 *trnL* 基因的部分序列, Blast 搜索比对发现, MF 的序列与 *B. oleracea* (AB213010.1)及 *Raphanus sativus*(AB213012.1)的同源性为 99%, 而 MS 与它们则存在较大差异. 用 CLUSTAL W 软件作序列比对, 结果表明(图 4), MS 序列有几处发生碱基替换、插入或缺失, MS 的 543 bp 处 T 替换成 C, 789 bp 处插入一碱基 G, 901 bp 至 903 bp 处缺失 3 个 T 碱基, 此外, MS 的 1 123 bp 至 1 230 bp 处有一个长度为 108 bp 的插入序列 ATGCCAAGAACCAGATTTGAACTGGTG-ACACGAGGATTTTCAGTCCTCTGCCCTATGCC-AAGAACCAGATTTGAACTGGTGACACGAGGA-TTTTCAGTCCTCTGCCCT, 比对后发现, 该序列由 2 个相同的 54 bp 重复序列组成, 而且该重复序列中除最后 3 个碱基 CCT 外, 其余的均与 *trnF* 基因 3’端 54 bp 相同, 重复序列具有起始密码子 ATG, 位于 *trnF* 基因前面与其相邻连接, 并形成新的开放阅读框(open reading frame, ORF).

3 讨 论

对 CMS 分子机理的研究, 国内外做了大量研究. 线粒体基因组的突变与 CMS 有直接关系^[9], 线粒体嵌合基因的形成是造成 CMS 的基础^[10,11], 另外, 线粒体基因编辑不完全也能导致细胞质雄性不育^[12~14], 如不完全编辑的 ATP9 基因导入烟草细胞, 最后造成雄性不育^[15], 而通过导入反义片段, 抑制了不完全编辑的 ATP9 基因的表达, 从而使雄性不育烟草恢复育性^[16].

也有学者认为 CMS 与叶绿体基因有关, 但争议较多, 主要原因是叶绿体基因相对保守, 不像线粒体基因那样容易发生变异、重组而导致基因结构或功能的改变. 但是, 叶绿体是光合作用的重要部位, 它为绿色植物提供重要的合成原料和其他物



差异. Pring 等^[9]借助 RFLP 技术研究高粱保持系和不育系叶绿体 DNA 时, 发现两者存在差异; Chen 等^[17]研究向日葵保持系和不育系时发现, 不育系高

梁叶绿体的 *rpoC2* 基因均缺失 165 bp 片段; 范昌发等研究发现的高粱不育系叶绿体 *ndhD* 基因序列发生改变, 但是否与 CMS 直接相关, 仍待研究. He 等^[18]利用 AFLP 技术研究野生败育细胞质雄性不育系“珍汕 97A”与它的保持系“珍汕 97B”时发现, 不育系在叶绿体 *trnL* 基因区域比保持系多出 6 bp 片段, 认为该片段可能与胞质雄性不育相关.

本研究借助 cDNA-AFLP 技术发现 *ndhJ-trnF* 基因区域之间存在变异, 其变异幅度较大, 有多处碱基发生变化, 这些变异位点均位于基因非编码区(non-coding regions), 非编码区非常保守, 也不生成相应的基因产物, 但可能在细胞生命活动中发挥一定的作用. 由于 108 bp 碱基的介入, 插入序列与 *trnF* 基因形成了一个新的 ORF, 使 *trnF* 基因的功能得不到发挥, 最终影响叶绿体蛋白质的合成. 此外, 新产生的 ORF 可能编码新的蛋白质. 当然, 这些变异是否跟 CMS 有着一定关系, 还需作进一步的研究.

参考文献

- 1 Wise R P, Pring D R. Nuclear-mediated mitochondrial gene regulation and male fertility in higher plants: Light at the end of the tunnel?. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (16): 10240~10242
- 2 凌杏元, 周培疆, 朱英国. 水稻红莲型细胞质雄性不育系与保持系 RNA 差异显示和差别片段的分析. *植物学报*, 2000, **42** (3): 284~288
Ling X Y, Zhou P J, Zhu Y G. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42** (3): 284~288
- 3 吴敏生, 高志环, 戴景瑞. 利用 cDNA-AFLP 技术研究玉米基因的差异表达. *作物学报*, 2001, **27** (3): 339~342
Wu M S, Gao Z H, Dai J R. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, **27** (3): 339~342
- 4 江树业, 陈启锋, 方宣钧. 利用 cDNA-RAPD 技术分析籼稻光敏核不育基因的差异表达. *科学通报*, 1998, **43** (23): 2521~2524
Jiang S Y, Chen Q F, Fang X J. *Chinese Science Bulletin*, 1998, **43** (23): 2521~2524
- 5 曹家树, 叶纨芝, 张明, 等. 白菜雄性不育两用系花蕾的 mRNA 差别显示及其 cDNA 差异片段分析. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, **27** (6): 596~600.
Cao J S, Ye W Z, Zhang M, *et al.* *J Zhejiang Univ (Agriculture and Life Sciences)*, 2001, **27**(6): 596~600.
- 6 范昌发, 孙春昀, 郭晓才, 等. 细胞质雄性不育高粱叶绿体 *ndh D* 基因的序列变异(英文). *遗传学报*, 2002, **29** (10): 907~914
Fan C F, Sun C Y, Guo X C, *et al.* *Acta Genetica Sinica*, 2002, **29** (10): 907~914
- 7 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, **8** (19): 4321~4325.
- 8 Bachem C W, Hoeven R S, Bruijn S M, *et al.* Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*, 1996, **9** (5): 745~753
- 9 Pring D R, Conde M F, Schertz K F. Organelle genome diversity in Sorghum: Male-sterile cytoplasm. *Crop Sci*, 1982, **22** (2): 414~421
- 10 Szklarczyk M, Oczkowski M, Augustyniak H. Organisation and expression of mitochondrial *atp9* genes from CMS and fertile carrots. *Theor Appl Genet*, 2000, **100** (2): 263~270
- 11 Dixon L K, Leaver C J. Mitochondrial gene expression and cytoplasmic male sterility sorghum bicolor. *Plant Mol Biol*, 1982, **1** (2): 89~102
- 12 Grelon M, Budar F, Bonhomme S, *et al.* Ogura cytoplasmic male sterility(CMS) associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male sterile Brassica hybrids. *Mol Gen Genet*, 1994, **243** (5): 540~547
- 13 Brennicke A, Marchfelder A, Binder S. RNA editing. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, **23** (3): 297~316
- 14 Wolfgang S, Bernd W, Rudolf H, *et al.* Between DNA and protein - RNA editing in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 1991, **81** (3): 437~445
- 15 Michel H, Sony S, Simon L, *et al.* Male sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, **3** (90): 2370~2374
- 16 Eduardo Z, Armand M, Michel H, *et al.* Transgenic male-sterile plant induced by an unedited *atp9* gene is restored to fertility by inhibiting its expression with antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **10** (93): 11259~11263
- 17 Chen Z, Muthukrishnan S, Liang G H. A chloroplast DNA deletion located in RNA polymerase gene *rpoC2* in CMS lines of sorghum. *Mol Gen Genet*, 1993, **236** (2~3): 251~259
- 18 He G H, Hou L, Xiao Y H, *et al.* A common sequence difference between cytoplasmic male sterile lines and their maintainer lines existing in rice (*Oryza sativa* L.) chloroplast tRNA-Leu gene region. *Euphytica*, 2003, **131** (3): 269~274

cDNA-AFLP Reveals Variation of Sequence Region *trnF-ndhJ* in Cytoplasmic Male Sterile Chinese Cabbage-pak-choi*

JIANG Ming, CAO Jia-Shu**

(Laboratory of Cell & Molecular Biology, Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract By means of cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) technique, a fragment P1708 was amplified from Polima cytoplasmic male sterile Chinese cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino, syn, *B. rapa* L. ssp. *chinensis*) 'Bpol97-05A'. RT-PCR showed that this fragment was specifically expressed in male sterile material. Sequencing and BLAST search in GenBank database indicated that P1708 had 100% homolog with chloroplast *ndhJ-trnF* gene region except a 54 bp insertion. Gene specific primer pairs were synthesized according to *ndhJ-trnF* gene region and two fragments about 1 900 bp were amplified respectively using genomic DNA templates of Polima cabbage and male fertile oilseed rape. The sequencing results showed that the gene region *ndhJ-trnF* of Polima cabbage contained two 54 bp repeats and some variation sites. The repeat part shared the same sequence as *trnF* gene except three bases at 5' ends. For the insertion of 108 bp sequence, a new open reading frame was created.

Key words Chinese cabbage-pak-choi, cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP), *ndhJ-trnF* gene region, sequence variation, cytoplasmic male sterility, chloroplast gene

*This work was supported by grants from Key Sci-technology Project of Zhejiang Province (2005C12019-02) and The National Natural Science Foundation of China (30370975).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

Received: November 12, 2006 Accepted: December 13, 2006