

大白菜细胞质雄性不育保持系 3411-7 —— RAPD 特异扩增片段的克隆测序

王永飞¹, 马三梅¹, 张鲁刚²

(1. 暨南大学 生物工程学系, 广东 广州 510632; 2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 利用 RAPD 技术从大白菜细胞质雄性不育保持系 3411-7 的 DNA 中得到一个特异扩增片段 MOPB04₆₀₀。回收该特异扩增片段并将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上进行序列测定。结果表明该片段全长 600bp, 其碱基组成为 A+T=72.33%。通过与 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 中的 455,972 个序列进行同源性比较, 同源性均小于 30%, 表明该片段为一新发现的序列。并对该特异片段的来源及其可能的作用进行探讨。

关键词: 大白菜; 细胞质雄性不育; RAPD; 克隆; 测序

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2006)03-0300-04

Cloning and sequencing of a specific amplified DNA fragment from cytoplasmic male sterility maintainer line 3411-7 of Chinese cabbage

WANG Yong-fei¹, MA San-mei¹, ZHANG Lu-gang²

(1. Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: A specific amplified DNA fragment was obtained from cytoplasmic male sterility maintainer line "3411-7" of Chinese cabbage by RAPD technique. This specific fragment was cloned into pGEM-T Easy vector and DNA sequence was determined. The result showed that it was consisted of 600bp and the base component of A+T was 72.33%. Comparison between MOPB04₆₀₀ and 455,972 sequences from GenBank+EMBL+DDBJ+PPB revealed that the homology were low (less than 30%). This implied that it was a newly found DNA sequence. The origin of MOPB04₆₀₀ and its possible effects were discussed.

Key words: Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*); CMS; RAPD; cloning; sequencing

植物细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是一种不能产生有活力或可育花粉的母性遗传现象 (Hanson, 1991)。自 1921 年 Bateson 和 Gairdant 在亚麻中发现第一例 CMS 以来, 人们对 CMS 从形态学、组织学、遗传学和分子生物学等方面进行深入研究, 为揭示 CMS 的机制和选育 CMS 系奠定了理论基础 (Budar 等, 2003)。植物 CMS 由胞质遗传物质和细胞核遗传物质的共同作用控制

(Schnable 等, 1998)。不育系 (A 系) 的育成和保持均依赖于其相应的保持系 (B 系)。A 系的育成通常是由亲缘关系较远的两个亲本杂交和多代回交, 将一个亲本的核置换到另一个亲本的细胞质中引起核质不亲和性即核质互作而产生的 (Pearson, 1981)。例如大白菜细胞质雄性不育系 CMS3411-7 就是由甘蓝型油菜波里马 (Polima) 不育系和大白菜自交系 3411-7 杂交后, 以 3411-7 为轮回亲本经多代回交选

收稿日期: 2005-01-17 修回日期: 2005-07-22

基金项目: 暨南大学引进人才启动基金 (692017) [Supported by the Initial Foundation to Ph. D. of Jinan University (692017)]

作者简介: 王永飞 (1972-), 男, 山西壶关县人, 博士, 副教授, 主要从事植物遗传育种与分子生物学的研究, (E-mail) wyfmsm@163.com.

育得到的,3411-7 就为其相应的保持系(柯桂兰等,1992)。故认为 A 系和 B 系的细胞核在遗传上完全一致,育性的差别是由于二者在胞质基因的差异引起的。因此,在 CMS 的机理研究中,A 系和 B 系间胞质 DNA 的差异倍受关注(Schnable 等,1998)。

二十世纪 80 年代以来,分子生物学的快速发展为比较 A 系和 B 系的 DNA 差异提供了有力的技术手段和工具。尤其是 RAPD 技术诞生后,因其快速、经济、有效而得到了广泛应用,从而促进了对 CMS 分子机理的研究(王永飞等,2001)。在以 A 系和 B 系的线粒体 DNA(mitochondrial DNA)为模板的 RAPD 扩增反应中,已发现了许多扩增片段在 A 系和 B 系之间表现出差异,并找到了一些两系的特异片段(许仁林等,1995)。大量的实验结果表明,利用 RAPD 技术,检测 mtDNA 在不育系和保持系之间的多态性,并进一步探讨这些多态性的分子基础,有助于揭示 CMS 的形成机制(Budar 等,2003)。

但是,A 系和 B 系的胞质大多分别来自完全不同的种属,甚至更为远缘,也就是说,A 系和 B 系的胞质 DNA 在遗传上是完全异质的。尽管 A 系和 B 系间的育性差别可能是由于胞质的差别引起的,但对遗传上远缘且无交流的两个系统进行比较,会发现二者的差异太多,而很难找出真正导致 CMS 的 DNA 片段(范昌发等,2001)。同时,恢复系(C 系)核恢复基因(nuclear restorer gene)的引入,会导致 A 系育性的恢复,认为这是由于 C 系的核恢复基因“弥补或矫正”A 系胞质基因的“缺陷”,从而导致花粉育性的恢复;并且 A 系的保持也必须在 B 系核基因的作用下才能保持。显然,核基因组在 CMS 中是起重要作用的(徐秉芳,2000)。那么,A 系和 B 系间在核基因组上会不会有差异?范昌发等(2001)以高粱 CMS 不育系和其保持系为材料,利用 RAPD 技术对总 DNA、mtDNA 及叶绿体 DNA(chloroplast DNA,cp DNA)进行分析比较,结果发现,A 系和 B 系的核 DNA 上存在差异。郭晓才(2001)对核基因组在 CMS 中作用进行了综述。

利用 RAPD 技术对大白菜细胞质雄性不育系 CMS3411-7 和其保持系 3411-7 的 DNA 进行扩增,通过对扩增图谱的比较研究,证实不育系和保持系的 DNA 组织结构存在一定差异,并检测到不育系和保持系的特异扩增片段 CMSOPL01₆₇₀ 和 MOPB04₆₀₀(王永飞等,2003)。本研究将 MOPB04₆₀₀ 片段克隆到 pGEM-T Easy 载体上进行序列测定。并对该特异片

段的来源及其可能的作用进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料:所用的植物材料为大白菜细胞质雄性不育系 CMS3411-7 和其保持系 3411-7。菌株和质粒:转化受体菌为 *E. Coli* DH_{5α},克隆载体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司。主要生化试剂及酶类:限制性核酸内切酶、修饰酶、dNTPs 和 DNA 分子量参照物购自华美生物工程公司;随机引物购自 Operon 公司;X-Gal、IPTG 购自 Promega 公司;PEG8000 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的制备 采用改良 SDS 法(王永飞等,2000)进行大白菜总 DNA 提取。

1.2.2 RAPD 扩增及扩增产物的检测方法 RAPD 扩增反应在 PE 公司生产的 DNA Thermal Cycler 480 型 PCR 仪上进行,具体反应条件以我们优化的体系进行(王永飞等,2002),即在 25 μL 反应体系中含有 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.3),50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,0.001% 明胶,0.15 mmol/L dNTPs,1.0 μmol/L 随机引物,20~60 ng 的基因组 DNA,1.0U 的 Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司产品)。反应程序:94℃ 预变性 5 min 后执行 94℃ 变性 1 min,37℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,35 个循环,最后 72℃ 再延伸 5 min。

1.2.3 特异扩增片段的回收和克隆测序 特异扩增片段经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收,克隆到 pGEM-T Easy 载体上,并转化 *E. coli* DH_{5α},具体方法参考文献(Sambrook 等,1998)。DNA 序列测定采用 ABI 公司的 PRISM™ Ready Reaction Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing 试剂盒反应,通过 ABI 全自动序列分析仪进行测序分析。

1.2.4 DNA 序列的计算机分析 用 PC gene 程序分析 DNA 序列中的碱基组成和开放阅读框架,并通过查询与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 中的 455,972 个序列(Altschul 等,1997)进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 大白菜细胞质雄性不育保持系 3411-7 的 RAPD

我们共用 269 个随机引物对 CMS3411-7 和

3411-7 的 DNA 进行 RAPD 扩增。通过对扩增图谱的比较研究,发现有 79 个引物的扩增结果在不育系和保持系之间存在差异。进一步对这 79 个引物进行筛选,筛选得到了引物 OPB04。用 OPB04 作引物时,扩增出了一条保持系 3411-7 所特有的条带,其大小约为 600bp(图 1),记为 MOPB04₆₀₀。

2.2 MOPB04₆₀₀ 片段的克隆测序

特异扩增片段经回收纯化后,将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上并转化大肠杆菌 DH_{5α}。经蓝白斑选择,酶切鉴定,筛选出含有插入片断的重组质粒 pGEMOPB04。重组质粒经 PEG 8000 纯化后,以 T7 和 SP6 为通用引物,在 ABI 全自动序列分析仪上进行正反双向测序,结果如图 2。

图 2 中的 GGACTGGAGT 和 ACTCCAGTCC

```

001 GGACTGGAGT GAAACTGGAC CTAACATAAC GTGTTAGGTT TTGTTAGGTA GGAAGCTTCT
061 TTA AACCTT TCTTTGTTT TTTGTATTTT CATTAGAAAC GGTAAAGAAA TAATGTTGGT
121 TGACAGTCAC CAACTAGATT GGCTCGGAAT GGTATAATGG ACGTAAAGCG TTTATTTTCT
181 GCGTCATCAA AGTAGCTTTA TTCCAACITTT TTCTATTACA AATTATTACA TCCGTCCAT
241 CAAGATATAT TTTTATAGAAA AAAAGTTTGT CTCGTATTCT TTTTGTGTT TCTATGAAAA
                                     M K
301 GATTGTAAAC TTCAAATAA TTAATTAATT TTATTGAATT ACTATTGATT AAAAGTTACT
   R L *
361 AAAGATTAAA AATTAAGGA AATGATATGG TAGTTTAATG TGTFTTATTA ATATGCATGA
                                     M V V *                               M
421 AAAATATTAA AAAGTTTATT TTTGTGAAAC AGACTGAGTA TGTCTTACG TAAAAGAATT
   K N T K K F I E V K Q S E Y V L T *
481 GTTTC AATGG AATGTGAAGA TTTGTAACCT AACAATAACA TGCCTATAAT CTAATCTATT
541 AAATAGGAGT AAAAAATTAG ATTATCCCTT AGTTTCCAC TATATTTACA ACTCCAGTCC
    
```

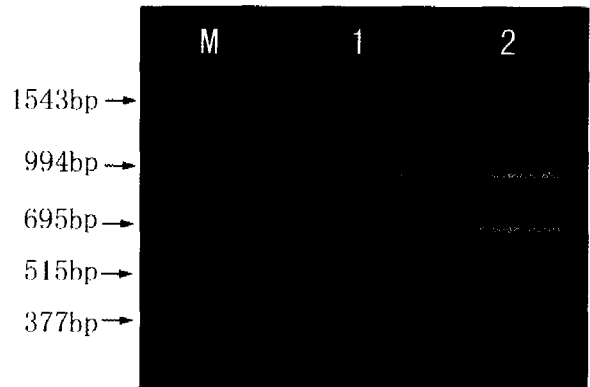


图 1 引物 OPB04 扩增的 3411-7 的特异片段
 Fig. 1 The specific fragment of 3411-7 amplified by primer OPB04
 M: PCR Markers; 1: CMS3411-7; 2: 3411-7.

图 2 大白菜细胞质雄性不育保持系 3411-7 DNA 特异片段 MOPB04₆₀₀ 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and the deduced amino acid residues of the specific fragment of remain line 3411-7

表示引物 OPB04 的碱基序列和其互补序列; * 表示终止密码子,起始密码子和终止密码子用黑体标出。从图 2 中看出, MOPB04₆₀₀ 的 DNA 序列全长为 600bp。两端有随机引物 OPB04 的序列 (5' GGACTGGAGT3') 和其互补序列 (5' ACTC-CAGTCC3'), 其碱基组成为 206 个 A, 72 个 C, 94 个 G, 228 个 T, A+T=72.33%, A+G=50%。通过查询发现它与 GenBank +EBML+DDBJ+PDB 中已报道的 455,972 个序列的同源性均低于 30%, 表现该片段为一新发现的大白菜 DNA 序列。该序列中不包含有长度在 200bp 以上的开放阅读框架 (open reading frame, ORF), 但在 +417~+473 的区域内, 含有一个以 ATG 为起始密码子, TAA 为终止密码子, 可编码 18 个氨基酸残基的编码区。从推断的氨基酸序列来看, 这个短肽富含赖氨酸、异亮

氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸等氨基酸。另外在 +294~+308 和 387~398 的区域内, 有两个以 ATG 为起始密码子, TAA 为终止密码子的编码区, 分别编码 4 和 3 个氨基酸残基小肽。

3 讨论

我们利用 RAPD 技术对大白菜细胞质雄性不育系 CMS3411-7 和其保持系 3411-7 的基因组 DNA 进行比较分析, 共使用了 269 个随机引物, 其中有 163 个引物在两系间都得到扩增产物, 79 个引物扩增结果在两系间表现出遗传多态性。并找到了保持系的特异扩增片段 MOPB04₆₀₀。

因为用改良 SDS 法提取的基因组 DNA 是由核 DNA、mtDNA 和 cpDNA 组成的, 所以 MOPB04₆₀₀

特异片段有可能来自核 DNA,也有可能来自 mtDNA 和 cpDNA。MOPB04₆₀₀ 特异片段的测序结果和序列同源性比较表明,该特异片段的序列和已发表基因序列的同源性都较小,相比较而言,和已发表的叶绿体和线粒体基因序列的同源性更小,因此我们推测该特异片段很可能来自核 DNA。如是这样,也就证实了范昌发等(2001)的观点,即 A 系和 B 系的核 DNA 上存在差异。这些差异也许在 A 系和 B 系的育性差异的形成过程中有重要的作用(郭晓才等, 2001)。但该特异片段是否与大白菜细胞质雄性不育系 CMS3411-7 和其保持系 3411-7 的育性有关,还是与其他的性状有关,这有待于进一步的深入研究。

参考文献:

- Altschul SE, Thomas L. 1997. Gapped BLAST AND PSI-BLAST: a new generation of protein database search program [J]. *Nucleic Acids Res*, **25**: 3 389—3 402.
- Budar F, Touzet P, De Paep R. 2003. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited [J]. *Genetica*, **117**: 3—16.
- Fan CF(范昌发), Sun CY(孙春昫), Guo XC(郭晓才), et al. 2001. Difference in nuclear DNA between cytoplasmic male sterile line A₂V₄ and its maintainer V₄ of sorghum (A₂ 型高粱细胞质雄性不育系与其保持系的胞质 DNA 和核 DNA 差异) [J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), **7**(3): 291—296.
- Guo XC(郭晓才). 2001. How to understand nuclear DNA in Cytoplasmic male sterility(核基因组在细胞质雄性不育中的作用研究,背景与性状) [J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), **7**(3): 297—301.
- Hanson MR. 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility [J]. *Annu Rev Genet*, **25**: 461—486.
- Ke GL(柯桂兰), Zhao ZY(赵稚雅), Song YZ(宋胭脂), et al. 1992. Breeding of alloplasmic male sterile line CMS3411-7 in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) and its application(大白菜异源胞质不育系 CMS3411-7 的选育及应用) [J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **19**(4): 333—340.
- Pearson OH. 1981. Nature and mechanisms of cytoplasmic male sterility in plant [J]. *Hort Sci*, **16**: 482—484.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning A laboratory manual* [M]. (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 756—783.
- Schnable PS, Wise RP. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration [J]. *Trends Plant Sci*, **3**: 175—180.
- Wang YF(王永飞), Ma SM(马三梅), Liu CP(刘翠萍), et al. 2001. Application of molecular markers in plant genetics and breeding(分子标记在植物遗传育种中的应用原理及现状) [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agri For (Nat Sci Ed)*(西北农林科技大学学报)(自然科学版), **29**(Suppl): 106—113.
- Wang YF(王永飞), Ma SM(马三梅), Zhang LG(张鲁刚), et al. 2003. Cloning and sequencing analysis of a specific DNA fragment related to cytoplasmic male sterility line of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) (大白菜细胞质雄性不育系 RAPD 特异片段的克隆及序列分析) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **23**(1): 49—53.
- Wang YF(王永飞), Wang M(王 鸣), Zheng XQ(郑学勤), et al. 2000. Comparison of genomic DNA extraction methods of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) (提取大白菜基因组 DNA 的几种方法比较) [J]. *Acta Univ Agri Boreal-Occident (Nat Sci Edi)*(西北农业大学学报)(自然科学版), **28**(4): 85—88.
- Wang YF(王永飞), Wang M(王 鸣), Zheng XQ(郑学勤). 2002. The molecular biology of cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) (大白菜细胞质雄性不育的分子生物学研究) [J]. *Hereditas (Beijing)*(遗传), **24**(4): 63—64.
- Xu BF(徐秉芳). 2000. Nuclear restorer gene for fertility (核编码的育性恢复基因) [J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **36**(6): 573—580.
- Xu RL(许仁林), Xie D(谢 东), Shi SY(师素云). 1995. Cloning and sequence analysis of a specific mitochondrial DNA fragment related to wild abortive type cytoplasmic male sterility in rice(水稻线粒体 DNA 雄性不育有关特异片段的克隆及序列分析) [J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **37**(7): 501—506.

(上接第 316 页 Continue from page 316)

参考文献:

- [J]. 广东林业科技, (1): 46.
- Makino H, Nakano T, Mae T. 1994. Response of Rubisco, cytf and sucrose synthesis in rice leaves to leaf nitrogen and their relationships to photosynthesis [J]. *Plant Physiol*, **105**: 173—179.
- Osmond CB. 1994. Photoinhibition molecular mechanism to the field [C] // Baker NR, Boyer JR. What photoinhibition? Some insights from comparison of sun and shade plants. Oxford: Bios Scientific Publications, 1—24.
- Su PX(苏培玺), Zhang LX(张立新), Du MW(杜明武), et al. 2003. Photosynthetic character and water use efficiency of different leaf shapes of *Populus euphratica* and their response to CO₂ enrichment(胡杨不同叶形光合特性、水分利用效率及其对加富 CO₂ 的响应) [J]. *Acta Phytoecol Sin*(植物生态学报), **27**(1): 34—40.
- UNEP World Conservation Monitoring Centre (UNEP-WCMC). 1997. Biodiversity profile of the Socialist Republic of Viet Nam: Appendix 5-Threatened Plant Species(online) (<http://www.wcmc.org.uk/infoserv/countryp/vietnam/app5.html>).
- Wen DZ(温达志), Ye WH(叶万辉), Feng HL(冯惠玲), et al. 2000. Comparison of basic photosynthetic characteristics between exotic invader weed *Mikania micrantha* and its companion species (外来入侵杂草甘菊及其伴生种基本光合特性的比较) [J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), **8**(2): 139—146.
- Zhang LY, Ye WH, Cao HL, et al. 2004. *Mikania micrantha* H. B. K. in China—an overview [J]. *Weed Res*, **44**: 42—49.