

甘蓝型油菜隐性核不育两用系 S45AB 中与 *M S 2B nap* 基因同源片段的克隆及序列分析

李德谋 侯磊 罗小英 裴炎 杨光伟*

(西南农业大学生物技术研究中心, 重庆 400716)

摘要 以甘蓝型油菜隐性核不育两用系 S45AB 的可育株和不育株为材料, 提取减数分裂期与单核期的花粉 mRNA, 反转录合成 cDNA, 并以其为模板扩增花粉特异基因 *M S 2B nap*。结果减数分裂期能扩出产物, 而单核期无任何产物。将减数分裂期的扩增产物克隆、测序。同源性分析表明: 在 S45AB 上克隆的 *M S 2B nap* 基因与 Gene Bank 公布的拟南芥控制核育性基因 *M S 2* 和已报道的甘蓝型油菜的 *M S 2B nap* 基因的同源性分别为 88% 和 99%。可育株 S45B 与不育株 S45A 在 *M S 2B nap* 基因序列上有 4 处碱基存在差异, 其中 3 处为同义突变, 编码氨基酸未发生变化: 1 处为错义突变, 可育株为 AAA, 不育株为 A GA。其三联体密码对应的氨基酸也发生了变化, AAA 编码赖氨酸, A GA 编码精氨酸。该变化可能与 S45A 的不育有关。

关键词 甘蓝型油菜 (*B rassic a napus*); 隐性核不育; *M S 2B nap*; 序列分析

中图分类号: S565 文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis of Fragment Homologous to *M S 2B nap* Gene in Rapeseed Recessive Genic Male Sterile Line S45AB (*B rassic a napus* L.)

L I De Mou HOU Lei LUO Xiao-Ying PEI Yan YANG Guang-Wei

(*B iotechnology Research Center, SWAU, Chongqing 400716, China*)

Abstract Cloning by RT-PCR and analyzing of sequence of fragment homologous to *M S 2B nap* gene from recessive genic male sterile line S45AB of *B rassic a napus* are immensely important. It helps to understand of gene regulation in sexual reproduction of flowering plants, potential application in agriculture such as male-sterility. In this paper, fragment homologous to *M S 2B nap* gene was amplified and sequenced by PCR with template cDNA of S45AB male sterility and male fertility. The major results are followed: fragment homologous to *M S 2B nap* gene was steadily amplified from meiosis stage, but there was no PCR products using cDNA of single nucleus stage as template, which suggested that the fragment homologous to *M S 2B nap* gene was not expressed at this stage. cDNA fragment homologous to *M S 2B nap* sequence of S45AB shows 88% identity to *A rabidopsis thaliana* *M S 2* sequence, and 99% identity to *B rassic a napus* *M S 2B nap* sequence gene reported previously. Sequence comparison showed that there were four diverged nucleotides dispersed in the code region of the fragment homologous to *M S 2B nap* cDNA of S45AB i.e., AAC/AAT, TCC/TCT, AAT/AAC and A GA /AAA. Fragment homologous of AAC/AAT, TCC/TCT and AAT/AAC were synonymous mutations. While A GA /AAA was missense mutation, A GA encoding arginine and AAA encoding lysine.

Key words *B rassic a napus*; Recessive nucleus male sterility; *M S 2B nap*; cDNA sequence

目前, 虽已克隆到许多与花粉发育相关的基因^[1,2], 但迄今为止, 拟南芥 *M S 2* 基因是分离克隆

到的第一个控制核不育的基因, 全长 2126 bp。当在其 ACAAAC 区段中的 AAA 中任一位置插入 A

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39570467)

作者简介: 李德谋 (1972 9-), 男, 贵州遵义人, 助教, 硕士, 研究方向: 植物分子育种

* 通讯作者。 Author for correspondence

Received on (收稿日期): 2000-11-21, Accepted on (接受日期): 2001-03-25

或 T 时,就会导致花粉败育^[3]。*M S 2B nap* 基因是从甘蓝型油菜花药 cDNA 文库中克隆的与 MS2 有很高同源性的基因^[4],该基因的不育位点未见报道。甘蓝型油菜隐性核不育系 S45A 是花粉败育突变体^[5],其不育株的败育彻底,不受环境影响;自交不能结实,授以同群体可育株的花粉,能正常结实, F₁ 代可育与不育分离比稳定为 1 : 1^[6]。

本实验以 S45A 及其表型正常的姊妹系 S45B 为材料,对控制花粉育性的 *M S 2B nap* 基因同源片段进行克隆与序列分析研究,以进一步了解该基因的功能,并探究 S45A 核不育与 *M S 2B nap* 基因的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

甘蓝型油菜隐性核不育系 S45A 及其表型正常的姊妹系 S45B 由西南农业大学油菜育种研究室提供,种植在西南农业大学农场。

1.2 减数分裂期和单核期的细胞学鉴别

细胞学鉴定按照余凤群等^[7]的方法略有改动,

在油菜现蕾后,取一整枝花序用卡诺氏固定液固定 2 h,转入 70% 乙醇,贮存在 4 °C 冰箱中。按蕾长由小到大依次用改良卡宝品红染色和压片,进行显微观察。统计蕾长与雄配子发育时期的关系。

1.3 油菜花蕾 mRNA 的制备

在提取 RNA 的当日上午,到田间分取可育株和不育株花蕾,测量两者的花蕾长度,根据蕾长选取减数分裂期和单核期的花蕾各 5 g,加入液氮迅速研磨成粉状,按照 mRNA Isolation System (LIFE TECHNOLOGY Inc) 的步骤操作,纯化 mRNA。

1.4 cDNA 的合成

用 Mannheim Boehringer 公司的 cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.5 引物设计及扩增程序

根据 Gene Bank (基因编号 X99922) 提供的 *M S 2B nap* 基因的全长序列,为便于测序将 *M S 2B nap* 基因分成互有部分序列重叠的三段,长度依次为 799 bp、761 bp、487 bp。按此三段的序列分别设计特异引物进行扩增(表 1)。

表 1 引物序列及其在 *M S 2B nap* 基因全序列中的位置
Table 1 Sequence of primers and its place in the *M S 2B nap* complete sequence

引物编号 No. of primer	引物序列 Sequence of primers	在 <i>M S 2B nap</i> 基因中的位置 Primers place in the sequence of <i>M S 2B nap</i> (bp)
Primer1	5'-AATGGAA TGGACA GTTTACTGTC-3	1~ 23
Primer2	5'-GAA GGT TGT A TTGGCA GCTGA G-3	778~ 799
Primer3	5'-CA GA TTCA GA GGA GA TTGC-3	732~ 753
Primer4	5'-GAA GCTCA GCTAA GTCCTCG-3	1483~ 1502
Primer5	5'-CGTGTA TCA GA TCGCTTC-3	1441~ 1458
Primer6	5'-TTTGACCTAAGCCCTTCC-3	1909~ 1927

本试验的扩增产物将用于测序,为提高 PCR 的保真性,降低其误掺率,所有扩增体系均采用大连宝生物工程有限公司的高保真扩增试剂盒(TAKARA LA PCR Kit Ver2.1)。扩增循环参数为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 35 cycles; 72 °C, 10 min。

1.6 PCR 产物的克隆

经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下用刀片挖取含目的片段的凝胶,用试剂盒(GFX™ PCR DNA and Gel Band purification Kit)进行 PCR 产物回收。回收的 PCR 产物克隆到 pGEM^R-T vector 上。

1.7 测序与基因数据分析

经酶切验证后的克隆,寄到大连宝生物工程有

限公司测序。测序结果的同源性比较采用 BLAST 分析程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/nucleotide.html>)。基因序列比较采用 DNASTAR 软件。

2 结果与分析

2.1 MS2Bnap 的扩增结果

以可育株与不育株的 cDNA 为模板进行扩增,单核期 cDNA 均未扩出任何产物,而减数分裂期 cDNA 都能扩出稳定的条带(图 1)。造成该现象的原因可能是 *M S 2B nap* 的 mRNA 只在减数分裂期转录表达,而在单核期不转录表达。以可育株和不育株减数分裂期的 cDNA 为模板扩增,均扩出预期长度的三段产物(图 2),分别将其命名为 Fragment

I、II 和 III。

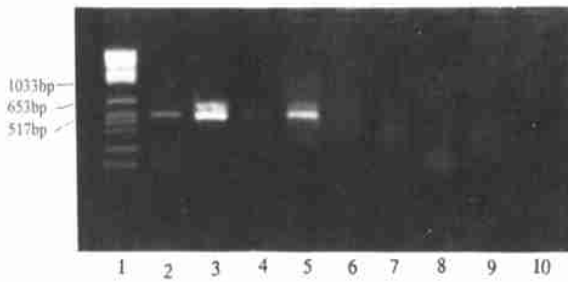


图 1 Primer5、Primer6 以减数分裂期和单核期 cDNA 为模板的扩增结果

1: DNA 分子量标记; 2、3、4、5: 以减数分裂期 cDNA 为模板的扩增结果; 6、7、8、9: 以单核期为模板的扩增结果; 2、4、6、8 为可育株; 3、5、7、9 为不育株; 10: 空白对照

Fig 1 A gel electrophoresis pattern using meiosis and single nuclear stage cDNA as PCR template. Lane 1: Marker; Lane 2, 3, 4 and 5: meiosis stage cDNA; Lane 6, 7, 8 and 9: single nuclear stage cDNA; Lane 2, 4, 6, 8: male fertile line; Lane 3, 5, 7, 9: male sterile line; Lane 10: blank control

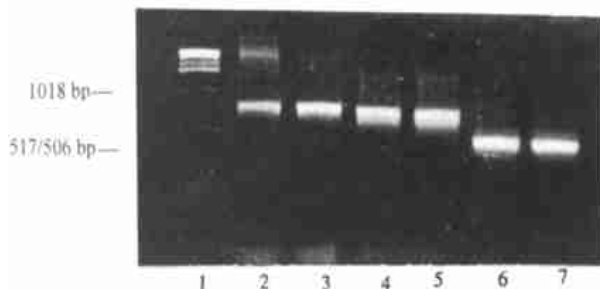


图 2 三对引物的扩增结果

1: DNA 分子量标准; 2、4、6: 可育株扩增产物; 3、5、7: 不育株扩增产物; 2、3: 引物 Primer1 和 Primer2 扩增产物 (Fragment I); 4、5: 引物 Primer3 和 Primer4 扩增产物 (Fragment II); 6、7: 引物 Primer5 和 Primer6 扩增产物 (Fragment III)。

Fig 2 A gel electrophoresis pattern of three pair primers. Lane 2 and 3: The products of PCR with Primer 1 and Primer 2 for fragment I (1~ 799 bp); Lane 4 and 5: The products of PCR with Primer 3 and Primer 4 for fragment II (732~ 1502 bp); Lane 6 and 7: the products of PCR with Primer 5 and Primer 6 for fragment III (1441~ 1927 bp); Lane 1: Marker; Lane 2, 4, 6: products of male fertile line; Lane 3, 5, 7: products of male sterile line

2.2 序列比较与分析

把 S45A (不育株) 和 S45B (可育株) 的 *M S 2B nap* 基因同源序列进行比较时发现, S45A 和 S45B 的 *M S 2B nap* 基因同源序列间存在差异 (两次扩增

与测序的结果相同)。将来自甘蓝型油菜核不育两用系材料 S45A 和 S45B 中的与 *M S 2B nap* 基因同源序列分别称为 m s 和 m f, 并将它们同 Gene Bank 已登录拟南芥控制核育性的基因 *M S 2* 和甘蓝型油菜可育基因 *M S 2B nap* 进行比较。结果显示: 从 S45B 克隆的同源序列 m f 和 *M S 2* 与 *M S 2B nap* 的同源性分别为 88% 和 99%。由此表明: m f 和 *M S 2*、*M S 2B nap* 基因具有相同的序列结构。并且在两个地域相差甚远的甘蓝型油菜不同材料中克隆的 *M S 2B nap* 基因碱基间差异较小。说明 *M S 2B nap* 基因存在较强的保守性, 这种较强的保守性也表明 S45A 和 S45B 在 *M S 2B nap* 基因上存在的差异很可能造成了 S45B 育性的变化。

两次测序结果均显示: S45B 和 S45A 序列间有 4 个核苷酸存在差异 (图 3)。涉及到 4 个密码子, 其中有 3 个密码子虽然发生了变化 (AAC/AAT、TCT/TCC、AAC/AAT), 但它们所编码的氨基酸并未发生变化, 为同义突变。另 1 个密码子的变化 (AAA/A GA) 为错义突变, 其编码氨基酸由赖氨酸变为精氨酸, 均为碱性带正电荷氨基酸, 为同类型氨基酸间的变化。发生错义突变的位点处, S45B (可育株) 的碱基 (AAA) 与 *M S 2B nap* 相同位置的碱基序列 (AAA) 相同, 而 S45A (不育株) 碱基在相同位点 AAA 产生点突变成为 A GA。

M S 2、*M S 2B nap*、m f 和 m s 基因编码的氨基酸序列同源性比较表明 (图 4): *M S 2*、*M S 2B nap*、m f 和 m s 均编码 616 个氨基酸。在 616 个氨基酸中, *M S 2* 和 *M S 2B nap* 之间共有 59 个氨基酸存在差异, 其两者编码氨基酸的同源性为 90.4%^[6]。m f 编码的氨基酸和 *M S 2* 编码氨基酸之间共有 65 个氨基酸的差异, 同源性为 89.44%; 与 *M S 2B nap* 编码氨基酸相比只存在 4 个氨基酸差异, 同源性高达 99.35%。m s 和 *M S 2*、*M S 2B nap* 编码的氨基酸之间的差异除第 312 位氨基酸 (* 标记处) 外, 其余差异均和 m f 与 *M S 2*、*M S 2B nap* 的差异相同。在第 312 位氨基酸处 m s (S45A 不育株的 *M S 2B nap* 同源序列) 编码的氨基酸精氨酸 (R), 而 *M S 2*、*M S 2B nap* 和 m f (S45B 可育株的 *M S 2B nap* 同源序列) 编码的都是赖氨酸 (K)。 *M S 2*、*M S 2B nap* 和 m f 均表现为可育, 而 m s 表现为不育, 可能正是由于这一氨基酸的变化使 S45B 可育性状发生突变而表现为不育性状。 *M S 2*、*M S 2B nap*、m f 和 m s 编码的氨基酸与希蒙德木 (*j j o b a*) 的脂肪酰还原酶显示

<i>MS2Bnap</i> ...	GAT	TCA	GCA	GAG	GAG	ATT	GCA	AAA	GAA	GTT	GAT	GTG	ATT	ATC	AAC	TCA	780	
mf ...	GAT	TCA	GCA	GAG	GAG	ATT	GCA	AAA	GAA	GTT	GAT	GTG	ATT	ATC	AAC	TCA	780	
ms ...	GAT	TCA	GCA	GAG	GAG	ATT	GCA	AAA	GAA	GTT	GAT	GTG	ATT	ATC	AAC	TCA	780	
	D	S	A	E	E	I	A	K	E	V	D	V	I	I	N	S		
<i>MS2Bnap</i>	GCT	GCC	AAT	ACA	ACC	TTC	<u>AA</u> C	GAA	AGA	TAT	GAT	GTT	GCT	TTG	GAC	ATA	AAC	831
mf	GCT	GCC	AAT	ACA	ACC	TTC	<u>AA</u> C	GAA	AGA	TAT	GAT	GTT	GCT	TTG	GAC	ATA	AAC	831
ms	GCT	GCC	AAT	ACA	ACC	TTC	<u>AA</u> T	GAA	AGA	TAT	GAT	GTT	GCT	TTG	GAC	ATA	AAC	831
	A	A	N	T	T	F	<u>NN</u>	E	R	Y	D	V	A	L	D	I	N	
<i>MS2Bnap</i>	ACA	CGA	GGG	CCT	GGT	AAT	CTC	ATG	GGA	TTC	GCC	AAG	AAA	TGC	AAG	AAG	CTC	882
mf	ACA	CGA	GGG	CCT	GGT	AAT	CTC	ATG	GGA	TTC	GCC	AAG	AAA	TGC	AAG	AAA	CTC	882
ms	ACA	CGA	GGG	CCT	GGT	AAT	CTC	ATG	GGA	TTC	GCC	AAG	AAA	TGC	AAG	AAA	CTC	882
	T	R	G	P	G	N	L	M	G	F	A	K	K	C	K	K	L	
<i>MS2Bnap</i>	AAG	CTT	TTC	TTG	CAA	GTA	<u>TCT</u>	ACA	GCT	TAT	GTG	<u>AA</u> C	GGA	CAA	AGA	CAA	GGA	933
mf	AAG	CTT	TTC	TTG	CAA	GTA	<u>TCT</u>	ACA	GCT	TAT	GTG	<u>AA</u> C	GGA	CAA	AGA	CAA	GGA	933
ms	AAG	CTT	TTC	TTG	CAA	GTA	<u>TCC</u>	ACA	GCT	TAT	GTG	<u>AA</u> T	GGA	CAA	AGA	CAA	GGA	933
	K	L	F	L	Q	V	<u>SS</u>	T	A	Y	V	<u>NN</u>	G	Q	R	Q	G	
<i>MS2Bnap</i>	AGG	ATC	ATG	GAG	AAG	CCC	TTC	TCG	ATG	GGA	GAT	TGT	ATA	GCT	ACA	GAG	AAC	984
mf	AGG	ATC	ATG	GAG	AAG	CCC	TTC	TCG	ATG	GGA	GAT	TGT	ATA	GCT	ACA	GAG	AAC	984
ms	AGG	ATC	ATG	GAG	AAG	CCC	TTC	TCG	ATG	GGA	GAT	TGT	ATA	GCT	ACA	GAG	AAC	984
	R	I	M	E	K	P	F	S	M	G	D	C	I	A	T	E	N	
<i>MS2Bnap</i>	TTC	ATG	GAA	GGT	AAC	AGG	<u>AAA</u>	GCA	TTA	GAT	ATC	GAT	AAA	GAG	ATG	AAG	CTA	1035
mf	TTC	ATG	GAA	GGT	AAC	AGG	<u>AAA</u>	GCA	TTA	GAT	ATC	GAT	AAA	GAG	ATG	AAG	CTA	1035
ms	TTC	ATG	GAA	GGT	AAC	AGG	<u>AGA</u>	GCA	TTA	GAT	ATC	GAT	AAA	GAG	ATG	AAG	CTA	1035
	F	M	E	G	N	R	<u>K/R</u>	A	L	D	I	D	K	E	M	K	L	
<i>MS2Bnap</i>	GCT	CTT	GAT	GCT	GCA	AGA	AAA	GGG	ACT	CAA	GAT	CAA	GAT	GAG	GCG	CAG	...	1086
mf	GCT	CTT	GAT	GCT	GCA	AGA	AAA	GGG	ACT	CAA	GAT	CAA	GAT	GAG	GCG	CAG	...	1086
ms	GCT	CTT	GAT	GCT	GCA	AGA	AAA	GGG	ACT	CAA	GAT	CAA	GAT	GAG	GCG	CAG	...	1086
	A	L	D	A	A	R	K	G	T	Q	D	Q	D	E	A	Q		

图3 *MS2B nap*、S45B (mf) 与 S45A (ms) 差异部分 cDNA 序列及其编码氨基酸序列的比较 (氨基酸用单字母表示, 阴影和下划线表示核苷酸及其编码氨基酸的差异)

Fig. 3 A lignent of the partial cDNA and deduced amino acid sequence from *MS2B nap*, male fertile (mf) and male sterile (ms) line (Numbers at the right margin refer to the nucleotide position. The encoded amino acids are designated by single-letter codes. The differential nucleotide site and its deduced amino acid are underlined and been shadow.)

了较高的同源性, 脂肪酰还原酶与希蒙德木种子发育时蜡酯的合成有关^[6]。

MS2 编码的氨基酸序列与 *MS2B nap*、mf 和 ms 编码的氨基酸序列存在着相对较大的差异, 而

M S 2B nap、*mf* 和 *ms* 三者所编码氨基酸序列间差异较小。造成这种结果的原因可能就在于 *M S 2* 是来自于拟南芥属, 而 *M S 2B nap*、*mf* 和 *ms* 为芸薹属中不同的甘蓝型油菜品种, 属间的差异往往比种间、品种间的差异大。

```
MS2 ...RIMEKPFMSMGDCIATENFLEGNRKALDVDREM...
MS2Bnap ...RIMEKPFMSMGDCIATENFMEGNRKALDIDKEM...
mf ...RIMEKPFMSMGDCIATENFMEGNRKALDIDKEM...
ms ...RIMEKPFMSMGDCIATENFMEGNRKALDIDKEM...
```

图 4 *M S 2*、*M S 2B nap*、*mf*(S45B) 和 *ms*(S45A) 编码氨基酸序列的比较 (方框和 * 标记处氨基酸为不育的推测位点)

Fig 4 Comparison of the predicted amino acid sequence of *M S 2*, *M S 2B nap*, *mf* (S45B) and *ms* (S45A) cDNA predicted amino acid sequence. A putative male sterility amino acid residues was marked with box and star

3 讨论

3.1 *M S 2B nap* 基因在 S45AB 上的差异与育性的关系

拟南芥的 *ms 2* 不育突变体是由于 ACAAAC 之间插入了一个或多个 A 或 T 造成^[2], 而 *M S 2B nap* 是从花粉特异 cDNA 文库中克隆到的序列, 是花粉特异性基因, 但它发生不育突变的位点未见相关报道。本实验克隆到的可育与不育的 cDNA 序列, 有 4 处发生了单个碱基的替换。在这 4 个单碱基的替换中, 其中 3 个单碱基的替换是同义突变, 1 个单碱基的替换为错义突变。错义突变致使原有的氨基酸顺序发生改变, 即蛋白质的一级结构发生改变, 一级结构的改变可能引起由它构成的蛋白质的二级结构或三级结构的变化, 影响蛋白质的活性, 甚至使活性丧失从而影响了表型。S45B 可育株和 S45A 不育株之间在 *M S 2B nap* 基因编码氨基酸上的差异, 可能使 S45B 可育株原有表现为正常可育的生物功能丧失, 而导致了不育的产生。 *M S 2B nap* 基因及其与之高度同源的 *M S 2* 基因编码产物和 *pollen* 的脂酰还原酶具有较高的同源性(41.4%), 推测其功能和形成花粉壁有关^[6]。可能是不育 cDNA 编码的氨基酸发生了变化, 改变了原有酶的活性, 使花

粉壁的形成受阻或不能正常形成花粉壁而导致不育。至于甘蓝型隐性核不育油菜 S45A 的不育性状是否确实由 *M S 2B nap* 基因的突变引起, 还需通过进一步的研究来确定。

3.2 *M S 2B nap* 基因表达的时间特异性

拟南芥的 *M S 2* 基因经原位杂交表明在小孢子发育早期的绒毡层中表达。进一步的启动子特异性分析表明, 其融合的 *GU S* 活性开始于四分体释放小孢子, 结束于小孢子的第一次有丝分裂^[3]。本实验扩增过程中发现, 只有以减数分裂期合成的 cDNA 为模板时, 才能扩增出产物, 而在单核期尽管扩增时退火温度降低到 48℃ 也仍然扩不出任何产物。其原因很可能是 *M S 2B nap* 基因只在减数分裂期表达, 而在单核期不表达或表达量极低。

References

- [1] Mariani C, DeBeuckeleer M, Truettner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, 347: 737~ 741
- [2] Li S-G (李胜国), Liu Y-L (刘玉乐), Tian B (田波). Advance of molecular biology in plant pollen development. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展) 1997, 17(2): 17~ 22
- [3] Aarts M G M, Dirkse W G, Stiekema W J, et al. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature*, 1993, 363: 715~ 717
- [4] Hodge R, Paul W, Draper J, et al. Cold-plaque screening: a simple technique for the isolation of low abundance, differentially expressed transcripts from conventional cDNA libraries. *Plant J*, 1997, 2, 257~ 260
- [5] Li S-L (李树林), Zhou Z-J (周志疆), Zhou X-R (周熙荣). Inheritance of recessive genic male sterile line "S45AB" of rape (*Brassica napus* L.). *Acta Agriculturae Shanghai* (上海农业学报), 1993, 9(4): 1~ 7
- [6] Aarts M. G. M., Hodge R., Kalantidis K., et al. The *Arabidopsis* MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductase in elongation/condensation complexes. *Plant J*, 1997, 12: 615~ 627
- [7] Yu F-Q (余凤群), Fu T-D (傅廷栋). Cytological research on anther development of several varieties in *Brassica napus* L. *China Journal of Oil Crop Science* (中国油料作物学报), 1988, 10(4): 23~ 25