

DOI: 10.1360/yc-007-0621

白菜 *OguCMS* 相关 MYB 家族新基因 *BcMYBogu* 的克隆与特征分析

向珣¹, 曹家树¹, 叶纨芝¹, 崔辉梅², 俞建浓¹

1. 浙江大学蔬菜研究所, 农业部重点实验室园艺植物生长与发育调控实验室, 杭州 310029;
2. 新疆石河子大学园艺系, 新疆 832003

摘要: 为研究 CMS 核质互作的分子机理, 将甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 和白菜 (*B. campestris* L. ssp. *chinensis* Makino) 杂交并连续回交 6 代获得白菜 *OguCMS*, 在与保持系花药细胞学比较的基础上, 运用 cDNA-AFLP 筛选得到白菜 *OguCMS* 早、中期花蕾提前表达的 MYB-like 差异片段, 利用 RACE 克隆得到该片段的 cDNA 全长, 命名为 *BcMYBogu* (GenBank 登录号: EF127861), 对其氨基酸序列和表达特征进行研究。结果表明, 白菜 *OguCMS* 绒毡层在四分体后增生, 高度液泡化, 导致小孢子花粉外壁异常, 细胞质同外壁分离并降解; 花药变白; *BcMYBogu* 具有典型的 MYB DNA 结合域—W 残基和 SH[AL]QKY[RF] 基序; 系统进化分析显示 *BcMYBogu* 与 AtMYB26, AtMYB32 和 AtMYB4 等聚类在同一分枝; RT-PCR 分析表明 *BcMYBogu* 在莲座叶、花茎和花蕾中均有表达, 但在 *OguCMS* 花蕾中表达量显著上升。由此推测 *BcMYBogu* 是一个新的与白菜 *OguCMS* 相关的 MYB 家族新成员。

关键词: 白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*); *OguCMS*; *BcMYBogu*; 绒毡层

Molecular cloning and characterization of *BcMYBogu*, a novel member of the MYB family involved in *OguCMS* in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*

XIANG Xun¹, CAO Jia-Shu¹, YE Wan-Zhi¹, CUI Hui-Mei², YU Jian-Nong¹

1. Key Laboratory on Growth and Development of Horticulture and Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. Department of Horticulture, Shihezi University, Xinjiang 832003, China

Abstract: In the attempt to elucidate the molecular mechanism of CMS, *Ogura* cytoplasmic male sterile (*OguCMS*) lines were obtained in Chinese cabbage after interspecific hybridization between *Brassica napus* L. *OguCMS* and *B. campestris* ssp. *chinensis* followed by recurrent backcross with *B. campestris* ssp. *chinensis* as the pollen donor. The CMS lines were significantly characterized by the whitish anther and indehiscence of anther. The tapetal hypertrophy with excess vacuolation was the first observed defective soon after the tetrad stage, subsequently the microspores defected in pollen wall formation, and later the cytoplasm detached from the exine wall and underwent degeneration. With aid of cDNA-AFLP and RACE approaches, we cloned the *BcMYBogu* (GenBank accession No: EF127861) in Chinese cabbage, which is premature expressed in early and middle stage floral buds of *OguCMS* lines, and predicted to encode a novel protein with a DNA

收稿日期: 2006-09-18; 修回日期: 2006-11-27

基金项目: 浙江省自然科学基金(编号: Y304180)和浙江省重大科技项目(编号: 2005C12019-02)资助[Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. Y304180) and the Key for Sci-technology Project of Zhejiang Province, China (No. 2005C12019-02)]

作者简介: 向珣(1973—), 女, 四川达州人, 在读博士, 研究方向: 分子与生物技术育种。E-mail: xxiang@zju.edu.cn

通讯作者: 曹家树(1958—), 男, 湖南芷江人, 博士, 教授, 研究方向: 植物基因组与分子调控。Tel: 0571-86971188; E-mail: jshcao@zju.edu.cn

binding domain: SH[AL]QKY[RF] motif at the N-terminus. Phylogenetic comparison revealed that the *BcMYBogu* was clustered with *AtMYB32*, *AtMYB26* and *AtMYB4*, which were indicated to be involved in male sterility in *Arabidopsis thaliana*. The *BcMYBogu* transcript was detected in rosette leaves, floral buds and stems by RT-PCR analysis. Compared with the maintainer, the expression level of *BcMYBogu* was increased in these organs, especially in floral buds of *OguCMS* lines. Our investigation suggests that *BcMYBogu* is a new member of the MYB family involved in male sterility in Chinese cabbage.

Keywords: Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*); *OguCMS*; *BcMYBogu*; Tapetum

细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是一种在高等植物中普遍存在的、不能产生有活力花粉的母性遗传性状, 已在超过 150 个物种中发现这一现象^[1]。CMS 材料既是农作物利用杂交优势、进行轮回选择和群体改良的重要工具, 又是研究花药和花粉发育过程中核质互作的遗传特性的最佳材料。因此, 植物 CMS 机理的研究具有重要的理论意义和生产应用价值。

目前, CMS 的基本机制尚不清楚, 但研究发现存在一个普遍现象: 大多数与 CMS 相关的基因在植物的所有组织中都有表达^[2]。雄性可育的获得是很多不同发育步骤共同作用的结果, 其中任何一个或多个步骤发生突变都将会导致雄性不育。许多影响因素在这一互作的过程中发挥作用, 植物 MYB (myeloblastosis) 转录因子家族是其中之一^[3~6]。MYB 是植物转录因子中最大的家族之一。MYB 结构域含有 51~53 个氨基酸, 且每隔 18~19 个氨基酸就有一个保守的色氨酸 (W) 残基, 起疏水核心的作用。

Steiner-Lange 等^[7]研究表明 *AtMYB26* 突变体由于花药内壁细胞缺少必要的次生加厚, 导致花药不能开裂散粉, 但花丝长度和花粉粒发育正常, 推测 *AtMYB26* 参与调控苯酚合成途径, 由此影响内壁细胞中木质素的沉积, *AtMYB4*、*AtMYB21* 和 *AtMYB86* 也参与了这一调控途径^[8,9]。编码一个 MYB 结构域的水稻 *OsAD11* 基因调控花药不开裂, 产生雄性不育^[10]。抑制或过量表达 *AtMYB32* 或 *AtMYB4* 影响苯丙烷代谢途径中关键酶 C4H、DFR、ANS、COMT 的转录, 致使花粉粒外壁孢粉素沉积异常, 表现部分雄性不育^[8,11]。拟南芥 *AtMYB103* 是早期小孢子发育和花粉外壁形成所必需, 表达量下调导致绒毡层细胞分裂异常, 出现多倍化且提早降解, 大多数花粉粒缺失细胞质而产生雄性不育^[12]。水稻 *gamyb* 突变体花瓣和花药颜色变白, 小孢子母细胞不进行减数分

裂, 导致雄性不育^[13]。MYB 转录因子对苯丙烷代谢的调节还表现在对靶基因的转录抑制上, 抑制性 MYB 包括 *AtMYB4*、*AmMYB308*、*AmMYB330*、*FaMYB1*^[14]。*AmMYB308* 过表达导致烟草木质素合成途径的基因表达被抑制, 木质素含量降低^[15]。*AtMYB4* 敲除突变体中, 编码木质素和芥子酯类化合物合成酶基因表达升高^[16]。这些研究结果证实植物 MYB 转录因子涉及调控绒毡层细胞苯丙烷代谢途径, 导致花粉外壁的孢粉素或类黄酮物质或木质素等物质合成异常, 最终植株雄性不育。

迄今未见在白菜等芸薹属植物中发现与 *OguCMS* 雄性不育相关的 MYB 转录因子的报道。本研究发 现白菜‘矮脚黄’*OguCMS* 花药变白, 四分体后绒毡层细胞异常增生, 导致小孢子败育。运用 cDNA-AFLP 和 RACE 技术获得与一个与白菜 *OguCMS* 育性相关的 *BcMYBogu* 转录因子, 并对其氨基酸序列和表达特征进行了分析, 为深入研究 *BcMYBogu* 在白 菜‘矮脚黄’*OguCMS* 核质互作引发雄性不育这一复杂调控网络中的功能提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 白菜‘矮脚黄’*OguCMS* 材料的选育

以白菜‘矮脚黄’可育株‘ZUBajh97-01B’为父本与甘蓝型油菜 *OguCMS* 杂交, 在 BC₁ 代选出表现完全雄性不育的株系继续与保持系‘ZUBajh97-01B’回交, 至 BC₆ 代得到白菜‘矮脚黄’*OguCMS* ‘ZUBogu97-06A’株系 (表 1)。田间实验都在浙江大学蔬菜研究所实验基地中进行。

1.2 花器官体式显微和切片观察

现蕾期和初花期分别采集 1~5 朵完整花序, FAA 固定, 参见崔辉梅等^[17]常规石蜡切片程序包埋, Leica RM2135 横切花蕾, 厚度 5 μm, 铁矾-苏木精染

表1 供试材料的遗传特性

Table 1 The genetics of materials

材料名称 Lines	材料代码 Code	细胞质组成 Cytoplasm	细胞核组成 Nuclear	不育来源 Origin
白菜‘矮脚黄’可育株‘ZUBajh97-01B’	B	<i>ajh</i>	<i>ajh</i>	□□
白菜‘矮脚黄’ <i>OguCMS</i> ‘ZUBogu97-06A’	G	<i>Ogura</i>	<i>ajh</i>	甘蓝型油菜 <i>OguCMS</i>

表2 本文中所用到的引物

Table 2 The primers used in this investigation

引物 Primer	序列(5' 3') Sequence(5' 3')	引物 Primer	序列(5' 3') Sequence(5' 3')
A1	GCGTAGACTGCGTACC	T1	GACGATGAGTCTTGAC
A2	TAGGTACGCAGTC	T2	CGGTCAGGACTCAT
A3	CTCGTAGACTGCGTACCTAAT	T3	GACGATGAGTCTTGACCGA
A15	GACTGCGTACCTAATTC	T8	GATGAGTCCAGACCGAAG
5 MD	GTATCAACGCAGAGTGGCCATTAC	3 MD	GAGGCGGCCGACATGTTTT
Actin-up	TCTCTATGCCAGTGGTCGTA	Actin-dn	CCTCAGGACAACGGAATC
RT-up	AACTCGCTATGAGCAACA	RT-dn	ACCACCACCAAACAACAC
5 GPS1	TGAGTGACCACCACCAACAACA	5 GPS2	GATCGTCTTCGGTTTCAGAAAGCTA
3 GPS1	TCTCTGCCTCAGCCTTCATCATCTG		

色, 加拿大中性树胶封片, Leica DMLB观察照相。盛花期采集不育系和保持系花朵, Leica-MZ体式显微镜观察。

1.3 RNA 提取、cDNA-AFLP 和 RACE、RT-PCR 分析

田间分别取保持系和*OguCMS*植株早、中、晚期三级花蕾, 相应花蕾大小: <1.5 mm、2.5~3.5 mm、4.5~5.8 mm。采用INVITROGEN公司的Trizol试剂提取total RNA。合成cDNA用Clotech公司Power Script逆转录试剂盒, 运用cDNA-AFLP技术筛选获得差异片段, 具体方法参见王永勤等^[18]。扩增cDNA全长用SMART RACE cDNA试剂盒。V-gene DNA Gel Extraction 试剂盒回收纯化, 用Promega公司的pGEM-T-easy-vector连接, 送上海博亚公司测序。所用生化试剂购于上海生工生物工程技术服务有限公司和北京鼎国公司。提取花茎、莲座叶和混合花蕾提取总RNA、合成cDNA (同上)用于RT-PCR分析。所用引物见表2。各实验步骤及反应体系参照说明书进行。

1.4 生物信息学分析

查找网上基因组数据库, 用MYB结构域的氨基酸对数据库进行多重序列联配搜索, 数据库包括: GenBank、SwissPort、The Institute for Genomic Research (TIGR)等。在PSORT服务器对MYB蛋白进行亚细胞定位分析; MYB结构域比对用ClustaW软件执行^[19], 结合PHYLP^[20]和Treeview软件形成进

化树, MEGA软件编辑进化树, 自展值分析用Bootstrap。

2 结果与分析

2.1 白菜‘矮脚黄’*OguCMS*花药发育

与保持系(B)相比, 白菜‘矮脚黄’*OguCMS*(G)花丝显著短缩, 柱头显著伸长(图1: b), 测交实验显示雌蕊功能正常。由于G与B是异质细胞质(图1: a下), *OguCMS*核质互作对花器官发育的影响主要体现在雄蕊。*OguCMS*花药皱缩, 颜色由黄变白, 不开裂, 没有任何可见的花粉粒(图1: a中)。萼片、花瓣等同保持系相比无明显差异(图1: a上)。

为更好探明白菜‘矮脚黄’*OguCMS*花药异常的差异, 进行了花药切片观察, 发现B和G在小孢子母细胞时期和四分体时期没有差异, 花药壁的四层细胞发育正常, 成熟的孢囊有正常的胼胝质沉积, 小孢子母细胞减数分裂完成, 形成四分体(图2: a, b)。随后小孢子母细胞外围的胼胝质降解, 释放游离小孢子, 这时的小孢子已有花粉外壁前体的沉积。这一时期G的绒毡层细胞和小孢子开始出现异常(图2: c, f)。绒毡层增生, 细胞内含物少, 出现大的液泡, 占据药室的大部分空间, 不能分泌足够的胼胝酶分解包裹小孢子的胼胝质, 小孢子相互之间有粘连现象, 花粉外壁薄且不完整。小孢子的细胞质与未发育成熟的花粉外壁发生分离, 同时细胞核仍位于中央

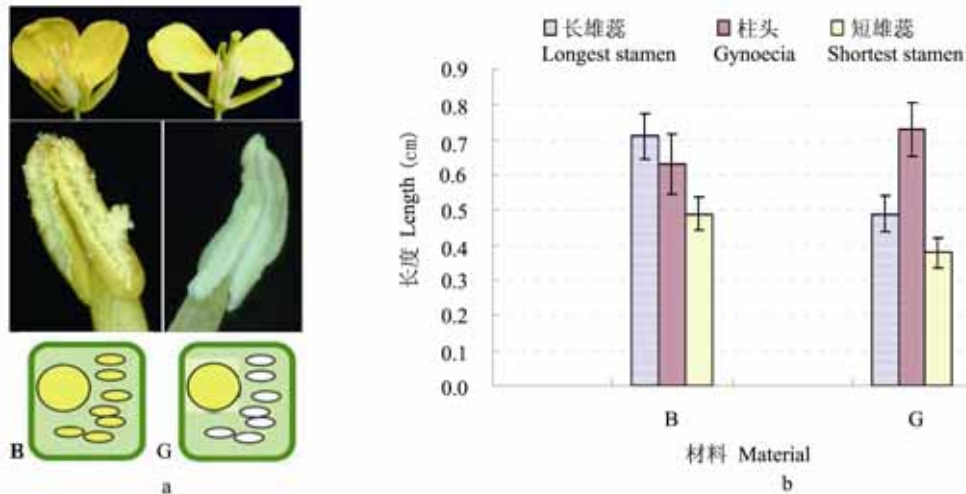


图1 白菜‘矮脚黄’保持系(B)和*OguCMS* (G)核质组成示意及花器官长度比较

a: 上部是去除部分花瓣和萼片的成熟花朵的比较。中部是雄蕊的局部放大, G花药颜色变白, 皱缩, 不开裂无粉, 柱头伸长, 花丝变短。下部是细胞核和细胞质组成, 黄色代表白菜‘矮脚黄’细胞质和细胞核, 白色代表甘蓝型油菜细胞质; b: B和G的雄蕊和柱头长度的示意图。

Fig. 1 Schematic presentation of the nuclear-cytoplasmic composition and the phenotype of the plant materials

B and G are isogenic in respect of the nuclear genome (yellow), whilst they are alloplasmic in respect of cytoplasm: *OguCMS* is white, *ajh* is yellow (lower row). Comparison of different parts of B and G mature flowers shown the pollen grains of B anther white and no pollen grains in G anther (white) (middle row). G anthers lie beneath the receptive gynoecia due to a reduced filament length and increased gynoecia length (b).

(图 2: d, g)。成熟花粉时期, 与 B 相比(图 2: e), G 的小孢子和绒毡层细胞继续降解, 最终药室收缩变小, 药室中央只剩下染色深且致密的细胞残留物, 内壁细胞虽完整, 但是没有必需的次生增厚, 隔膜没降解, 裂腔无法形成, 花药不开裂(图 2: h)。

2.2 *BcMYBogu* cDNA 全长的克隆与序列分析

对白菜‘矮脚黄’*OguCMS*(G)和保持系(B)早期花蕾(横径<1.5 mm)、中期花蕾(横径 2.5 ~ 3.5 mm)和晚期花蕾(横径 4.5 ~ 5.8 mm)进行 cDNA-AFLP 分析基因表达差异, 在 A15T8 引物中发现一个感兴趣的、长度为 264 bp 差异片段。该差异片段在 B 早期和中期花蕾不表达, 晚期花蕾中表达量极高, 但在 G 整个花蕾发育期都有表达, 晚期花蕾表达强度最强(较 B 晚期花蕾的弱), 早期花蕾表达量次之, 中期花蕾的表达量最弱(数据待发表)。采用 RACE 技术扩增得到 855 bp cDNA 全长, 命名为 *BcMYBogu* (GenBank 登录号: EF127861)。该基因有一 630 bp ORF(open reading frame), 推导编码 209 位氨基酸(图 3), 有预测的核定位序列, 酸性氨基酸区域, 亚细胞定位在细胞核中, 初步确定 *BcMYBogu* 是一个具有 DNA 结合功能的核转录调控蛋白(图 4)。该蛋白分子量为 24.2 kDa, 等电点 6.99。BLAST_p搜索发

现, *BcMYBogu* 与 At1g14600(putative MYB family transcription factor)MYB 结构域有 68%的氨基酸同一性。图 5 显示 *BcMYBogu* 是 N 端含有 SH[AL]QKY[RF]模块的 MYB-like 蛋白。序列分析表明, *BcMYBogu* 除 DNA 结构域保守外, 非保守区则呈现高度的多样性, 没有发现有直系同源或旁系同源的基因, 推测分离得到的 *BcMYBogu* 是一个新的白菜 MYB 转录因子。

2.3 *BcMYBogu* 与其他 MYB 蛋白序列的关系

NJ法构建系统进化树(图 6), 发现 *BcMYBogu* 同 AtMYB32、AtMYB26、AtMYB4、AtMYB3、AtMYB6和AtMYB7聚在同一分枝, 与AtMYB102亲缘关系次之, 表明他们具有共同的起源, 存在功能相似的可能。进化树的结果(图6)同Kranz等^[21]研究报告中第1、2、4、6、9、20亚组的分类结果一致, 证实进化树构建结果可信。部分分组结果不一致的现象, 这与选用的候选基因不完全一致有关。

转录因子基因家族常常含有高度保守的DNA结合域。除此以外的序列同源性很低, 因此在亲缘关系较远的物种中, 基因序列分歧较大。蛋白质的结构域的分组对功能分析很重要^[22]。为了检验进化树构建的效果, 进行1,000次重复的自展分析。那些自

展值低(>500)的亚组及分支,可能是由于MYB结构域的分歧较大,如图6下部的AtMYB77、AtMYB44、AtMYB73和AtMYB70;另外一个原因是自展值的测试方法不支持这种显著的分歧,自展值没有真实反映各分枝的关系,所以不必给出原始的自展值,这一现象在分析拟南芥bHLH 转录因子家族时也出现过^[23]。

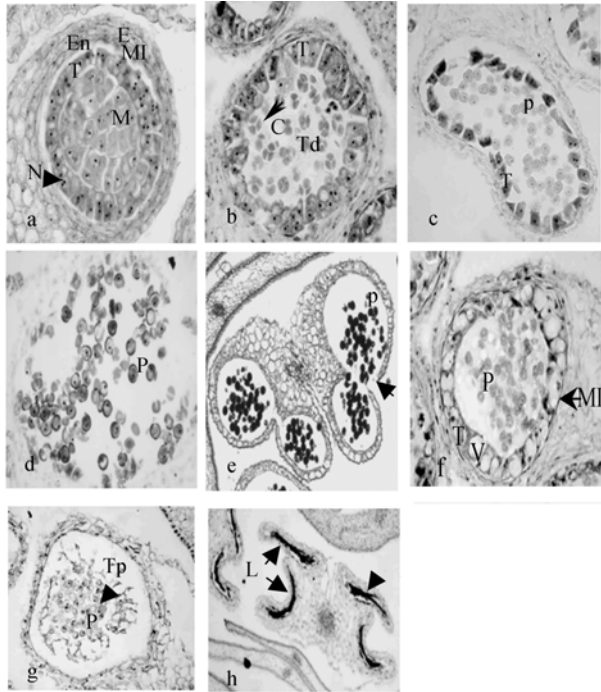


图2 白菜‘矮脚黄’保持系(B)和*OguCMS*(G)花药发育 a~e: B小孢子母细胞时期、四分体时期、小孢子发育早期、小孢子发育晚期、成熟花粉期; f~h: G小孢子早期,绒毡层细胞开始液泡化(f);到小孢子晚期绒毡层细胞高度液泡化,细胞内含物充满小孢子周围,小孢子发生细胞质壁分离,小孢子发育异常(g); G小孢子和绒毡层细胞继续降解,最终药室收缩变小,在药室中央只剩下色深且致密的细胞残留物,隔膜没降解,裂腔不能形成,花药不开裂(h)。

Fig. 2 Cross-sections of anther development in the maintainer (B) and *OguCMS* lines (G)

Anther development of B (a to e). a, pollen mother cell stage; b, tetrad stage, tetrad (Td) surrounded by callose (C); c, early microspore stage; d, late microspore stage; e, mature pollen stage, the interlocule septum is dehiscid (arrow); anther development of G (f-h). f, early microspores stage, following callose dissolution and microspore release from the tetrad. The tapetum (T) has become abnormally expanded with large vacuoles (V); g, late microspore stage, the tapetum has dissolution occupied the majority of the anther locule and the tapetal protoplast (Tp) surround the microspores. The cytoplasm (arrowhead) of the microspores detaches from the exine wall and undergoes degeneration; h, mature pollen stage, the microspores continue to degenerate and the exines are completely crashed and are represented by a compact mass (arrow-

head) in the centre of the locule(L) bounded by an intact En and E. E, epidermis; En, endothecium; MI, middle layer; T, tapetum; N, nucleus; Bars (a - d, f, g) =10 μ M; Bars (e, h)=50 μ M.

2.4 *BcMYBogu* 在白菜‘矮脚黄’*OguCMS* 花蕾中表达水平显著上升

以上分析得知 *BcMYBogu* 与拟南芥 *AtMYB26* 和 *AtMYB32* 是同源基因。在不含 MYB 结构域的 3 编码区设计 RT 引物,采用 PT-PCR 分析该基因的表达模式。结果表明 *BcMYBogu* 在白菜‘矮脚黄’保持系莲座叶、花蕾和花茎中都有表达,花蕾中表达量相对较低,花茎和莲座叶中表达量较高。同保持系相比,白菜 *OguCMS* 莲座叶、花茎和花蕾中的表达量均上升,但花蕾中表达量上升最为显著(图 7)。*Actin* 在这些组织中的转录量说明 RT-PCR 反应体系中各组织总 RNA 的量几乎一致。

3 讨论

通过种间杂交和连续回交的方式我们获得了白菜‘矮脚黄’*OguCMS*株系及其保持系。同保持系相比,白菜‘矮脚黄’*OguCMS*不育的表型是花药变白,不开裂,没有可见的花粉粒。保持系类黄酮含量随着花蕾的发育而增加,而*OguCMS*小蕾类黄酮含量较保持系低,且随花蕾的发育呈现下降趋势(数据有待发表),导致*OguCMS*花药由黄变白(图 1)。发育异常的有孢子体如绒毡层细胞、花丝、柱头、花药内壁和隔膜等连接组织,也有雄配子体小孢子(图 2),同拟南芥*ms1* 突变体败育表型相似^[24]。绒毡层在四分体后高度液泡化,细胞内含物少,随后花粉外壁形成异常,花粉畸形败育(图 2)。玉米和矮牵牛存在雄性不育植株白花药的现象,研究证实这是由于缺少CHS,苯丙烷代谢的第一个关键酶,绒毡层细胞中的苯丙烷代谢途径受到抑制,花粉粒类黄酮积累减少而产生雄性不育^[25~27]。在拟南芥中发现 *AtMYB32* 和 *AtMYB4* 能调控苯丙烷代谢途径中 *C4H*、*DFR*、*ANS*、*COMT* 基因的转录,致使花粉粒外壁孢粉素沉积异常,花粉粒畸形,缺失细胞质,表现部分雄性不育^[8, 11]。PAL, C4H等几个苯丙烷代谢的关键酶是由绒毡层细胞合成并分泌到药室的,在药室或发育的小孢子外壁参与苯丙烷代谢。花药中的类黄酮主要存在于花药外壁中,在花药减数分裂后花药发育的不同时期合成的。绒毡层细胞与小孢子母细胞之间良好的互作是对形成具有功能的花粉是至

关重要的^[28]。花药切片观察发现, 同保持系相比, *OguCMS* 绒毡层细胞发生程序性死亡, 表现为液泡

```

33 atgagatggaccctgagctccacgaaagtttttgaagtcagtgacaactgaaggcctgaaaaggccacccaaaggctgttctc
M R W T P E L H E S F L K S V N K L E G P E K A T P K A V L
123 aagcttatgaatgttgaggccttgacgatctaccatgtaaaaagccacttgacagaatagactagcaaatatgccagagaaaaa
K L M N V E G L T I Y H V K S H L Q K Y R L A K Y M P E K K
213 gaagagaaaaagaatgttaactcagaggaagaaagaaactcgctatgagcaacagtgaaagctgatgagaaggaaggggcaatacaatta
E E K K N V N S E E K K L A M S N S E A D E K R K G A I Q L
303 actgaagctctgcgtatgcagatggaagtcaaaagcaactgcatgaacaactcgaggtgcaacgggtgcttcagctacgaatagaagag
T E A L R M Q M E V Q K Q L H E Q L E V Q R V L Q L R I E E
393 catgctaaatatttgagaagatgcttgaagaacaacgcaaagccggaaggctattttcttcttcttcttctcagactttgttatca
H A K Y L E K M L E E Q R K A G R L F S S S S S S S Q T L L S
483 cctagtgatgatgagactagaccagactctcaaacatgtccaagatcgaagcatctctgcctcagccttcatcatctgcaagaacata
P S D D E T R P D S Q N M S K I E A S L P Q P S S S A K N I
573 gcttctgaaaccgaagacgatcaatgtgagtcctccagaaacccgagcgttgaagaacaatactgaacctcaagactctgagaggtag 662
A S E T E D D Q C E S P Q K R R R L E N N T E P Q D S E R *

```

图3 *BcMYBogu* cDNA的核苷酸及推定的氨基酸序列

下划细黑线表明MYB结构域; 下划粗黑线表明核定位区域。终止密码子用星号符号标注。

Fig. 3 The full-length cDNA of Chinese cabbage *BcMYBogu* gene and its deduced amino acid sequence

The MYB domain is underlined region (thin line), nuclear local region is thick lined, the stop codons are marked by asterisks.



图4 推定的 *BcMYBogu* 结构示意图

MYB: MYB 结构域; NLS: 核定位信号; AR: 富含酸性氨基酸区域; S: 富含丝氨酸区域。

Fig. 4 Schematic of *BcMYBogu* structure

The serine-rich (S) and the acidic-rich (AR) regions, nuclear localization signal(NLS)and the MYB motif (MYB).



图5 白菜 *BcMYBogu* 结构域示意图

框内是色氨酸残基和 SH[AL]QKY[RF]模块, 形成 3 个螺旋, 螺旋 2 和 3 之间存在一转角。

Fig. 5 The MYB domains of *BcMYBogu*

The tryptophan residues and SH[AL]QKY[RF] motif were boxed. The position of the three hypothetical α helices are indicated.

化增生, 随后小孢子外壁形成异常, 小孢子发生质壁分离, 导致雄性不育(图 2)。由此推测白菜‘矮脚黄’*OguCMS* 花药变白与绒毡层细胞苯丙烷代谢途径调控有关。

*BcMYBogu*在白菜‘矮脚黄’*OguCMS*早、中期花蕾中提早表达。序列分析确定*BcMYBogu*是具有 DNA 结合域的核转录调控蛋白(图 3 ~ 图 5), 系统进化分析将*BcMYBogu*同功能已知的*AtMYBs*26、32、3、4、6 和 7 等转录因子聚在同一分枝中(图 6), 除

AtMYB26 调控苯丙烷代谢的木质素合成途径, 其余 5 个 MYB 转录因子都涉及到调控苯丙烷代谢途径, 最终表现为雄性不育^[8,11], 这为推测*BcMYBogu*分子功能提供了线索, 暗示白菜‘矮脚黄’*OguCMS* 早、中期花蕾中*BcMYBogu*的提早表达, 导致其调控的下游基因(苯丙烷代谢途径中类黄酮合成分支或孢粉素等合成分支的关键酶)的时空表达发生异常, 影响正常的花粉发育进程受阻, 产生雄性不育。由于*BcMYBogu*表达增加所导致的小孢子败育暗示在调

控花蕾发育中*BcMYBogu*可能作为一个抑制因子。

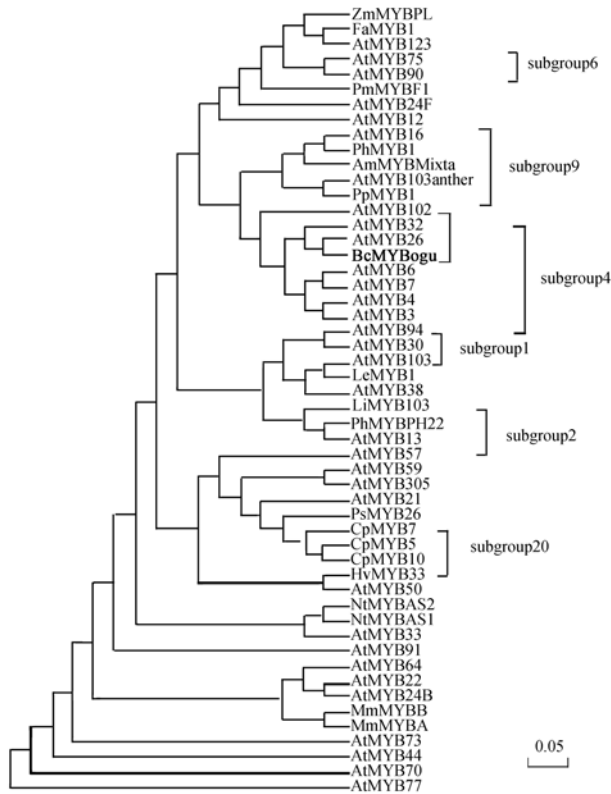


图 6 *BcMYBogu* MYB 结构域的系统进化树

*BcMYBogu*与来自 13 个物种的 52 个已知功能的MYB蛋白的MYB结构域, 基于 115 个氨基酸长度, 用NJ构建系统进化树。*BcMYBogu*属于第 4 亚组(Kranz等)^[21]。*BcMYBogu*用粗体示出。

Fig. 6 Phylogenetic of *BcMYBogu* and other MYB proteins

The data set (deduced aa sequences) contained 33 AtMYB genes and 19 MYB proteins from other species calculated on the basis of 115 aa long sequences. The plant MYB proteins used in this analysis were identical to those expressed in flower buds. Subgroups 1, 2, 4, 6, 9 and 20 are the same groupings employed by Kranz et al.^[21]. The bar indicates an evolutionary distance of 0.05. *BcMYBogu* is printed in bold face to indicate.

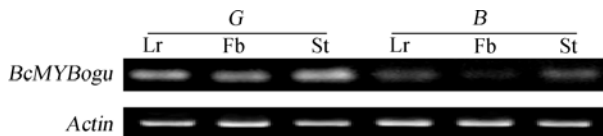


图7 *BcMYBogu* 的RT-PCR分析

BcMYBogu 在保持系(B)花蕾(Fb)中表达量最低, 花茎(St)和莲座叶(Lr)中表达丰度较高, 而在*OguCMS*(G)花蕾中表达丰度显著上升。

Fig. 7 RT-PCR analysis of *BcMYBogu* in tissues

Ethidium bromide staining of *Actin* (lower panel) shows equal loading. *BcMYBogu* expression (top panel) are detected in all the tissues of B and G, but higher level of transcript is present in the buds of G. Lr, rosette leaves; Fb, floral buds; St, stems.

认为在多数情况下, *CMS*相关基因在植物的所有组

有关 *CMS* 机制存在有 3 种假说, 其中细胞毒素假说组织中都有表达, 且在营养器官中表达量高, 生殖器官表达量少。是因为营养器官中没有特异的蛋白与之结合, 所以检测到的表达量较高, 在生殖器官中由于特异蛋白的降解作用, 导致*CMS*相关蛋白的表达量降低^[29]。RT-PCR分析显示*BcMYBogu*在白菜‘矮脚黄’营养器官(莲座叶和花茎)和生殖器官(花蕾)都有表达, 且花茎和莲座叶表达丰度较高(图 7)。与保持系相比, 白菜‘矮脚黄’*OguCMS*花茎和莲座叶中*BcMYBogu*表达量上升, 但在这些组织中没有观察到明显突变的表型(数据待发表), 这些结果说明 *BcMYBogu* 可能与花药的发育密切相关, 不是营养生长所必需的。

综上所述本文推定 *BcMYBogu* 这一转录调控基因白菜‘矮脚黄’*OguCMS* 相关, 该基因涉及花粉成熟和花药开裂的后期发育过程。随着拟南芥、水稻基因组测序相继完成, 一些代表性的基因组测序也在进行中, 大规模的突变体库已建立, 释放大量的基因组数据。通过生物信息学及比较基因组等方法将 *BcMYBogu* 与拟南芥及其他物种 MYB 基因家族比较分析, 有助于揭示 *BcMYBogu* 在白菜‘矮脚黄’*OguCMS* 核质互作引发雄性不育这一复杂调控网络中的功能。

参考文献(References):

- [1] Budar F, Pelletier G. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *C R Acad Sci III*, 2001, 324 (6): 543-550.
- [2] Budar F, Touzet P, de Paepa R. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica*, 2003, 117 (1): 3-16.
- [3] Riechmann JL. Transcriptional regulation: a genomic overview. In: Somerville CR, Meyerwitz EM, eds, 2002; *The Arabidopsis Book*, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- [4] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4 (4): 447-456.
- [5] Riechmann JL, Heard J, Martin G. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, 290 (5499): 2105-2110.
- [6] Jin HL, Martin C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol*, 1999, 41 (5): 577-585.
- [7] Steiner-Lange S, Unte US, Eckstein L, Yang C, Wilson

- ZA, Schmeizer E, Dekker K, Saedler H. Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to nondehiscent anthers. *The Plant Journal*, 2003, 34 (4) 519–528.
- [8] Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrtens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B, Martin C. Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2000, 19 (22): 6150–6161.
- [9] Shin B, Choi G, Yi H, Yang S, Cho I, Kim J, Lee S, Paek NC, Kim JH, Song PS. *AtMYB21*, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *The Plant Journal*, 2002, 30 (1): 23–32.
- [10] Zhu QH, Ramm K, Ramani S, Elizabeth SD, Narayana MU. The anther indehiscence1 gene encoding a single MYB domain protein is involved in anther development in rice. *Plant Physiol*, 2004, 135 (3): 1514–1525.
- [11] Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, Song FL, Parish RW. *AtMYB32* is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2004, 40(6): 979–995.
- [12] Higginson T, Li SF, Parish RW. *AtMYB103* regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2003, 35 (2): 177–192.
- [13] Kaneko M, Inukai Y, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Izawa T, Kobayashi Y, Hattori T, Miyao A, Hirochika H, Ashikari M, Matsuoka M. Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair α -amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell*, 2004, 16 (1): 33–44.
- [14] Broun P. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 202–209.
- [15] Tamagnone L, Merida A, Stacey N, Plaskitt K, Parr A, Chang C F, Lynn D, Dow J, Roberts K, Martin C. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 1998, 10 (11): 1801–1816.
- [16] Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 2002, 129 (2): 661–677.
- [17] CUI Hui-Mei, CAO Jia-Shu, ZHANG Ming-Long, YAO Xiang-Tan, XIANG Xun. Production of the ogura cytoplasmic male sterile(CMS)lines of Chinese cabbage-pak-choi(*Brassica campestris* L.ssp. chinensis var. communis) and turnip(*B. campestris* L. ssp. *rapifera*) and cytological observation of their sterile organs. *Acta Horticulture Sinica*, 2004, 31(4): 467–471.
崔辉梅, 曹家树, 张明龙, 姚祥坦, 向珣. 白菜和芜菁 Ogura 型不育系与保持系的获得及其细胞学观察. *园艺学报*, 2004, 31(4): 467–471.
- [18] WANG Yong-Qin, YU Xiao-Lin, CAO Jia-Shu. Isolation and characterization of BcMF3,a gene expressed only in maintainer line in Chinese cabbage-pak-choi(*Brassica campestris* L.ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee). *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(11): 1302–1308.
王永勤, 余小林, 曹家树. 白菜小孢子发育相关基因 BCMF3 的分离及其表达特征分析. *遗传学报*, 2004, 31(11): 1302–1308.
- [19] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 24 (24): 4876–4882.
- [20] Felsenstein J: PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.54c. Seattle: University of Washington, 1995.
- [21] Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1998, 16 (2): 263–276.
- [22] Chothia C, Gough J, Vogel C, Teichmann SA. Evolution of the protein repertoire. *Science*, 2003, 300 (5626): 1701–1703.
- [23] Toledo-Ortiz G, Enamul H, Peter HQ. The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix transcription factor family. *Plant Cell*, 2003, 15 (8): 1749–1770.
- [24] Wilson ZA, Morroll SM, Dawson J, Swarup R, Tighe PJ. The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *The Plant Journal*, 2001, 28 (1): 27–39.
- [25] Adèle van HA, Souer E, Spelt K, Kloos D, Mol J, Koes R. Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposon mutagenesis in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal*, 1998, 13 (1): 39–50.
- [26] Pollak PE, Hansen K, Astwood JA, Taylor LP. Conditional male fertility in maize. *Sex Plant Reprod*, 1995, 8: 231–241.
- [27] Napoli CA, Fahy D, Wang HY, Taylor LP. White anther a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene. *Plant Physiol*, 1999, 120 (2): 615–622.
- [28] Wada T, Ogawa K, Ito T, Suzuki H, Takeoka Y. Light microscopic observations on pollen and anther development in rice (*Oryza sativa* L.). I. Stages from pollen mother cells to tetrads. *Jpn J Crop Sci*, 1990, 59: 769–777.
- [29] LIU Zong-Song, GUAN Chun-Yun, CHEN She-Yuan. Study and Application on Plant Male Sterility Mechanism. Beijing: China Agricultural Press, 2001.
刘宗松, 官春云, 陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用. 北京: 中国农业出版社, 2001.