

苧麻线粒体基因 *Cox II* 和 *atpA* 与细胞质雄性不育相关性分析

段继强, 李建永, 杜光辉, 梁雪妮, 刘飞虎

(云南大学植物改良与应用实验室, 昆明 650091)

摘要: 【目的】探讨线粒体 *Cox II* 和 *atpA* 基因与苧麻 CMS 的关系。【方法】根据 GenBank 报道的双子叶植物线粒体 *Cox II* 和 *atpA* 基因编码区高度保守序列设计简并引物, 通过 PCR 技术从苧麻细胞质雄性不育系、保持系和恢复系(简称“三系”)mtDNA 中扩增目的基因片段; 采用 DNA Walking 策略从 3'端和 5'端扩增基因片段的未知侧翼序列, 分离完整的线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因; 基于全基因序列和基因表达(RT-PCR 法)分析这两个基因在苧麻“三系”间的差异。【结果】分离的苧麻 *Cox II* 和 *atpA* 基因片段与 GenBank 中一些双子叶植物同类基因的同源性分别高达 95%和 97%以上, 获得的 *Cox II*、*atpA* 全基因包含了完整的开放阅读框。“三系”的 *Cox II* 基因在 mtDNA 水平、转录水平、蛋白质水平上均无明显差异。雄性不育系 *atpA* 基因在 mtDNA 水平、氨基酸序列和蛋白质二级结构上与保持系和恢复系存在比较明显的差异; RT-PCR 分析还表明, 不育系 *atpA* 基因在现蕾期和开花后期的表达量明显低于可育系。【结论】*Cox II* 基因与苧麻 CMS 可能无关, 而不育系 *atpA* 基因的序列变异和/或异常表达可能与苧麻 CMS 关系密切。

关键词: 苧麻; 细胞质雄性不育; *Cox II* 基因; *atpA* 基因; RT-PCR

Relationship of Mitochondrial Genes *Cox II* and *atpA* with Cytoplasmic Male Sterility in Ramie

DUAN Ji-qiang, LI Jian-yong, DU Guang-hui, LIANG Xue-ni, LIU Fei-hu

(Laboratory of Plant Improvement and Utilization, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: 【Objective】This study aimed at probing into the correlation of mitochondrial genes *Cox II* and *atpA* with the cytoplasmic male sterility (CMS) in ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.]. 【Method】The CMS related *Cox II* and *atpA* gene fragments were cloned from the mitochondrial DNA of ramie CMS line and its maintainer and restorer lines (fertile lines) by using PCR and degenerated primer strategy. The primers were designed according to the reserved sequences in the encoding region of mitochondrial genes *Cox II* and *atpA* of some dicotyledons from GenBank. The complete *Cox II* and *atpA* genes were obtained by means of amplifying the 3' and 5' end unknown sequences of these gene fragments using DNA Walking method. Based on the complete gene sequences and gene expression patterns (RT-PCR), the differences of these two genes between ramie CMS line and the fertile lines were analyzed. 【Result】The amplified *Cox II* and *atpA* gene fragments showed 95% and 97% homology with the analogous genes from some dicotyledons. The complete *Cox II* and *atpA* genes each had an intact open reading frame. The *Cox II* gene showed no difference between ramie CMS line and fertile lines at the levels of mtDNA sequence, transcription and protein. However, compared to the fertile lines, *atpA* gene from CMS line showed obvious difference at the levels of mtDNA, amino acid sequence and the secondary structure of protein. And an abnormal low expression of *atpA* gene in CMS line at the budding stage and late-blooming stage was revealed by RT-PCR analysis. 【Conclusion】The correlation of *Cox II* gene with ramie CMS could be excluded, but the result suggested a close relationship of ramie CMS with the variation in DNA sequence and / or abnormality in expression of *atpA* gene in CMS line.

Key words: ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.]; cytoplasmic male sterility (CMS); *Cox II* gene; *atpA* gene; RT-PCR

收稿日期: 2008-01-20; 接受日期: 2008-05-21

基金项目: 国家自然科学基金(30360058)

作者简介: 段继强(1981—), 男, 白族, 云南泸水人, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程与遗传育种。Tel: 0871-5035256; E-mail: duanjiqiang@yahoo.com.cn。通信作者刘飞虎(1958—), 男, 湖南株洲人, 教授, 博士, 研究方向为植物遗传育种。Tel: 0871-5035256; E-mail: plantbreed2004@yahoo.com.cn

0 引言

【研究意义】高等植物的细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是普遍存在的, 到目前为止已在 300 多种植物中发现^[1]。植物雄性不育在杂种优势利用中占有极为重要的地位, 长期以来, 人们一直在对其机理进行探讨。【前人研究进展】高等植物的 CMS 与其线粒体遗传系统关系密切, 最早关于 mtDNA 与 CMS 关系的研究是 1976 年 Levings 等^[2]开展的。他们分别提取了玉米 T 型 CMS 系 (cms-T) 和正常品系的 mtDNA, 用一系列限制性核酸内切酶消化, 通过琼脂糖凝胶电泳比较酶切图谱, 发现两系 mtDNA 的酶切电泳图谱存在明显的差异, 从而提出了 CMS 的形成与线粒体的结构变异有关的猜想。随后大量的研究表明, CMS 与线粒体基因组的结构变化和新的嵌合基因的产生有关, 而其中已经鉴定的与 CMS 相关的嵌合基因大多与 ATP 合成酶或细胞色素 c 氧化酶有关^[3]。在很多植物中, 构成 ATP 合成酶的 *atpA* 亚基和构成细胞色素 c 氧化酶的 *Cox* 亚基 2 (*Cox II*) 的基因位点及它们上、下游 DNA 序列的变化与雄性不育密切相关^[4-13]。苎麻雄性不育特性早在 20 世纪 60—70 年代就被发现存在于若干地方品种之中^[14]。苎麻以收获营养体为目的, 其杂种优势利用比其它收获种子的作物更为便利, 因此备受育种工作者重视^[15-16]。【本研究切入点】从苎麻雄性不育特性被发现以来, 人们对其机理的研究主要集中在生理生化方面^[17-20], 在分子生物学方面的研究国内外还未见报道。【拟解决的关键问题】高等植物线粒体基因组的编码序列保守性很强, 因此可利用某些植物的已知线粒体基因研究其它植物线粒体基因的多态性变化。笔者通过比较油菜、甜菜、大豆、拟南芥等多种植物线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因的开放阅读框, 发现两个基因内都存在着一个保守的核心编码区。本研究拟根据这两个基因的保守核心编码区序列设计简并引物, 扩增苎麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因片段; 再采用 DNA Walking 步移法分离基因全序列。并基于基因序列和基因表达 (RT-PCR 法) 分析这两个基因在“三系”间的差异, 探讨这两个基因与苎麻 CMS 的相关性, 为揭示苎麻 CMS 的分子遗传学机制积累资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为苎麻 [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] 细

胞质雄性不育系 SS370, 相应的保持系 GS13-X₁ 和恢复系细叶青 (Xiyeqing)。其中不育系和保持系为项目组成员在前期工作中从同一品种的孤雌生殖诱导后代中培育获得, 恢复系则通过测交获得; 不育系经遗传分析推测为核-质互作型不育^[18]。

1.2 试验试剂

试验所用引物由上海生工 (Sangon) 合成; dNTP、Taq 酶为 MBI 公司产品; pGEM-T 载体及 T₄ 连接酶购自 Promega 公司; DNA 分子量标准和胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存; DNA Walking 试剂盒购自纽罗西敏生物有限公司; 总 RNA 提取试剂盒和 cDNA 第一链合成试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 苎麻 mtDNA 提取

参考 Scotti 等^[21]的蔗糖衬垫法提取苎麻 mtDNA, 略有改动^[22]。

1.4 苎麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因片段的克隆及序列分析

根据 GenBank 报道的与 CMS 相关的一些双子叶植物线粒体 *Cox II* 和 *atpA* 基因序列, 依据 Primer 设计优化原则, 通过 DNAMAN 引物设计和 Oliga 引物分析软件, 设计用于扩增苎麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因的简并引物 (序列见表 1)。

依照前期的 PCR 优化结果设定 20 μ l PCR 反应体系: 1 \times Taq 酶配套缓冲液, 2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1.5 U Taq 酶 (MBI), 25 ng 模板 DNA, 上、下游简并引物各 0.75 μ mol·L⁻¹, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.15 mmol·L⁻¹。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 40 次循环; 72 $^{\circ}$ C 完全延伸 10 min。

使用胶回收试剂盒纯化和回收扩增片段; 用 pGEM-T 克隆载体连接并转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 涂布于加有氨苄青霉素、IPTG 及 X-gal 的抗性 LB 平板上进行蓝白斑筛选; 挑取白色菌落, 在液体 LB 培养基中扩大繁殖。用碱裂解法^[23]从菌液中提取重组质粒, 以通用测序引物 T7 和 SP6 进行常规 PCR 检测。对阳性克隆进行序列测定 (由上海生工完成)。

测序得到的核苷酸序列用开放阅读框 (open reading frame, ORF) 分析软件 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) 分析其编码区是否完整; 登录 GenBank, 用 BLAST 程序 (<http://www.ncbi>。

表 1 试验中所用引物序列

Table 1 Primers used in the study

引物 Primers	序列 Sequence	用途 Usage
Cox II -F	5'-CTCCTTGATGCAGCGGA-3'	<i>Cox II</i> gene sense degenerate primer
Cox II -R	5'-T(C/T)TCACTGCACTGACCATAG-3'	<i>Cox II</i> gene antisense degenerate primer
atpA-F	5'-GTGT(C/G)TATGTAGCGATTGGAC-3'	<i>atpA</i> gene sense degenerate primer
atpA-R	5'-(T/A)GGCAT(T/A)CGATCACAGAATC-3'	<i>atpA</i> gene antisense degenerate primer
Cox II 3'-Tsp1	5'-GCTTTATGGCATTTCCTACT-3'	<i>Cox II</i> gene DNA Walking 3' Tsp1 primer
Cox II 3'-Tsp2	5'-TTCCGATGAACAGTCACTCACT-3'	<i>Cox II</i> gene DNA Walking 3' Tsp2 primer
Cox II 3'-Tsp3	5'-AGAGGTGGACAATAGAGTGGTTG-3'	<i>Cox II</i> gene DNA Walking 3' Tsp3 primer
Cox II 5'-Tsp1	5'-CAGCCCAACTATGAAGTACAT-3'	<i>Cox II</i> gene DNA Walking 5' Tsp1 primer
Cox II 5'-Tsp2	5'-GCTTTGATAGTAATGGCTGGAT-3'	<i>Cox II</i> gene DNA Walking 5' Tsp2 primer
Cox II 5'-Tsp3	5'-GAGCAAATGAGGGTATAGCAATG-3'	<i>Cox II</i> gene DNA Walking 5' Tsp3 primer
atpA3'-Tsp1	5'-CCCCTCATTGAAACACAAG-3'	<i>atpA</i> gene DNA Walking 3' Tsp1 primer
atpA3'-Tsp2	5'-GCTATGAAACAAGTCTGCGGTAG-3'	<i>atpA</i> gene DNA Walking 3' Tsp2 primer
atpA3'-Tsp3	5'-TTGATGCTGCGACTCAGG-3'	<i>atpA</i> gene DNA Walking 3' Tsp3 primer
atpA5'-Tsp1	5'-GGCTTGTTTCAATGACG-3'	<i>atpA</i> gene DNA Walking 5' Tsp1 primer
atpA5'-Tsp2	5'-GTGGTTCGGCGTAACAATAATG-3'	<i>atpA</i> gene DNA Walking 5' Tsp2 primer
atpA5'-Tsp3	5'-GCGGTGGCTGCTACAAGAATAG--3'	<i>atpA</i> gene DNA Walking 5' Tsp3 primer
Cox II -RTf	5'-CTCCTTGATGCAGCGGA-3'	<i>Cox II</i> gene RT-PCR sense primer
Cox II -RTr	5'-TCTCACTGCACTGACCATAG-3'	<i>Cox II</i> gene RT-PCR antisense primer
atpA-RTf	5'-GTGTCTATGTAGCGATTGGAC-3'	<i>atpA</i> gene RT-PCR sense primer
atpA-RTr	5'-TGGCATTTCGATCACAGAATC-3'	<i>atpA</i> gene RT-PCR antisense primer
Cox II -Tpf	5'-AAGTGGATCAAGGCAGTGG-3'	<i>Cox II</i> gene sense test primer
Cox II -Tpr	5'-TATCCTAACCGTCTCCTCTG-3'	<i>Cox II</i> gene antisense test primer
atpA-Tpf	5'-AGTTGGAGATGGGATTGCAC-3'	<i>atpA</i> gene sense test primer
atpA(MS)-Tpr	5'-CGCTTGCAAGTAATGATGAGTG-3'	male sterile line <i>atpA</i> gene antisense test primer
atpA(M/R)-Tpr	5'-GGTTCCCTTTTCAGCTACTC-3'	maintainer(restorer) line <i>atpA</i> gene antisense test primer

nlm.nih.gov/BLAST) 对其核苷酸序列及编码的氨基酸序列进行同源性检索分析, 以确定获得的序列是否为苧麻 *Cox II*、*atpA* 基因。

1.5 苧麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因全序列的克隆、序列分析和验证

根据测知的 *Cox II*、*atpA* 基因部分序列, 按照 DNA Walking 试剂盒的要求分别设计特异引物 Tsp1、Tsp2 和 Tsp3 (表 1), 用于从 3' 端和 5' 端方向扩增苧麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 全基因。

采用 DNA Walking 步移法扩增 *Cox II*、*atpA* 基因未知的 3' 端和 5' 端侧翼序列。第 1 轮半巢式 PCR 以提取的 mtDNA 为模板, 用试剂盒提供的 4 个目标核心引物库的引物 DW-ACP1 (5'-ACP-AGGTC-3')、DW-ACP2 (5'-ACP-TGGTC-3')、DW-ACP3 (5'-ACP-GGGTC-3')、DW-ACP4 (5'-ACP-CGGTC-3') 和设计的基因特异引物 Tsp1 进行扩增。第 2 轮半巢式 PCR 以第 1 轮 PCR 产物为模板, 用试剂盒提供的调节子引物 DW-ACP1 (5'-ACP-AGGTC-3') 和设计的基因特异引物 Tsp2 进行扩增。第 3 轮半巢式 PCR 以第 2 轮 PCR 产物为模板, 用试剂盒提供的 5' 端非目标尾部引

物 Uni-primer (5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3') 和设计的基因特异引物 Tsp3 进行扩增。具体操作参照 DNA Walking 试剂盒说明书进行。

从 4 个目标核心引物库的 PCR 产物中, 选取长度合适的特异扩增条带, 回收、克隆, 然后测序。测序结果用序列拼接软件 Sequencher 进行拼接。

根据序列拼接结果在 *Cox II*、*atpA* 基因编码区外侧设计特异的检测引物 (Test primer) (序列见表 1), 以苧麻 mtDNA 为模板进行 PCR 扩增, 程序与简并引物 PCR 扩增程序相同。产物经回收、克隆、测序, 将测序结果与 DNA Walking 获得序列进行比较, 验证 DNA Walking 获得序列的正确性。对经验证的 DNA Walking 获得序列, 使用 ORF Finder、DNAMAN、DNASIS 等软件进行序列分析。

1.6 苧麻总 RNA 提取和 RT-PCR 检测苧麻 *Cox II*、*atpA* 基因表达

由于所用苧麻不育系植株上的雄蕾在能够分辨时就已经枯黄, 随即变褐脱落, 以至不育系的雄蕾采集十分困难或没有雄蕾 (如现蕾前), 因此本试验只能以叶片为样品提取 RNA, 进行 RT-PCR 试验。采用异

硫氰酸胍/苯酚法提取苎麻生殖生长期 4 个不同阶段(蕾前期、现蕾期、盛花期、开花末期)总 RNA, 具体操作参照 RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒说明书进行。

以提取的苎麻总 RNA 为模板、Oligo (dT) 为引物, 使用 TIANScript RT Kit cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA 第一链, 具体操作参照试剂盒说明书进行。

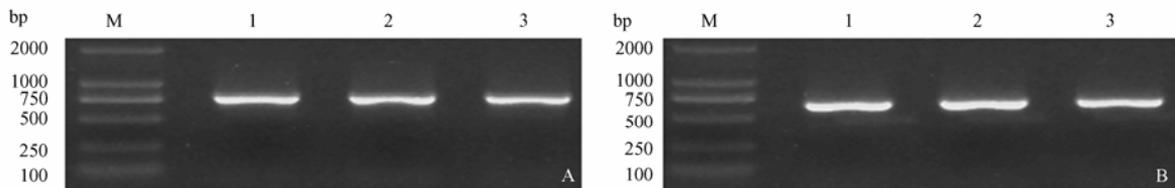
根据序列分析结果设计扩增苎麻 *Cox II*、*atpA* 基因 cDNA 序列的特异性 RT-PCR 引物(直接将简并引物序列转化成特异引物序列)(序列见表 1), 以合成的苎麻生殖生长期 4 个阶段的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序与简并引物 PCR 扩增程序相同。

使用 Glyko Bandscan5.0 对电泳图进行条带密度扫描, 获得苎麻“三系”生殖生长期 4 个阶段 *Cox II*、*atpA* 基因的条带光密度值, 对这两个基因的表达情况进行量化分析。

2 结果与分析

2.1 苎麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因片段的分离与克隆

以苎麻 mtDNA 为模板, 用简并引物扩增出大小约为 640 bp 的 *Cox II* 基因片段和 780 bp 的 *atpA* 基因片段, 大小与预期结果相符(图 1)。以通用测序引物 T7 和 SP6 对重组质粒进行常规 PCR 检测, 选取其中的阳性克隆进行序列测定(3~5 个重复)。



M: DL2000 DNA 标准分子量; 1: SS370 (雄性不育系); 2: GS13-X₁ (保持系); 3: 细叶青(恢复系); A: *Cox II* 基因片段; B: *atpA* 基因片段

M: DL2000 DNA marker; 1: SS370 (male sterile); 2: GS13-X₁ (maintainer); 3: Xiyeqing (restorer); A: *Cox II* gene fragments; B: *atpA* gene fragments

图 1 简并引物 PCR 扩增的苎麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因片段

Fig. 1 Ramie *Cox II* and *atpA* gene fragments PCR amplified from mtDNA using degenerated primers

2.2 苎麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因片段序列分析

扩增得到的苎麻 *Cox II* 基因片段全长 639 bp, 均为编码区序列, 但开放阅读框(ORF) 3'端和 5'端均不完整(图 4 上、下游简并引物之间的序列)。BLAST 分析表明, 该片段序列与甜菜(*Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris*) (GenBank 登录号: X57694, 下同)、油菜(*Brassica napus*) (AP006444)、萝卜(*Raphanus sativus*) (AF036387)、大豆(*Glycine max*) (X04825)、豌豆(*Pisum sativum*) (X02433)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Y08502) 等多种植物的线粒体 *Cox II* 基因同源性高达 95% 以上, 说明扩增产物的是苎麻线粒体 *Cox II* 基因片段。

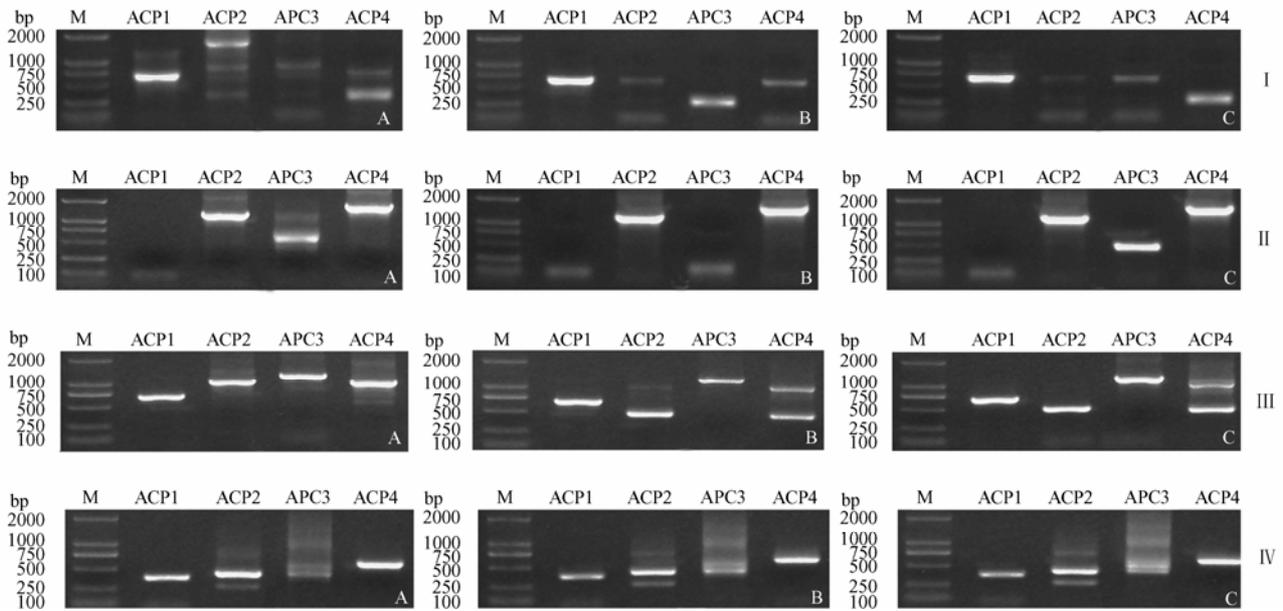
扩增得到的苎麻 *atpA* 基因片段全长 770 bp, 均为编码区序列, 但开放阅读框 3'端和 5'端均不完整(图 5 上、下游简并引物之间的序列)。BLAST 分析表明, 该片段序列与甜菜(*B. vulgaris* subsp. *Vulgaris*) (BA000024)、油菜(*B. napus*) (AP006444)、大豆(*G. max*) (Z14031)、豌豆(*P. sativum*) (X05366)、

胡萝卜(*Daucus carota*) (AF301604)、拟南芥(*A. thaliana*) (EF488887) 等多种植物的线粒体 *atpA* 基因同源性高达 97% 以上, 说明扩增产物的是苎麻线粒体 *atpA* 基因片段。

2.3 苎麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 全基因分离与克隆

用 DNA Walking 步移法经 3 轮半巢式 PCR 扩增后, 从苎麻 *Cox II*、*atpA* 基因 3'端和 5'端的 4 个目标核心引物库中分别扩增出特异条带(图 2)。

回收并克隆“三系”*Cox II* 基因 3'端 DW-ACP1 库中的特异片段, 雄性不育系 *Cox II* 基因 5'端 DW-ACP4 库中的特异片段, 保持系 *Cox II* 基因 5'端 DW-ACP2 库中的特异片段, 恢复系 *Cox II* 基因 5'端 DW-ACP3 库中的特异片段; 雄性不育系 *atpA* 基因 3'端 DW-ACP3 库中的特异片段, 保持系和恢复系 *atpA* 基因 3'端 DW-ACP2 库中的特异片段, “三系”*atpA* 基因 5'端 DW-ACP4 库中的特异片段。克隆结果经重组检测后, 选取其中的阳性克隆进行序列测定(3~5 个重复)。



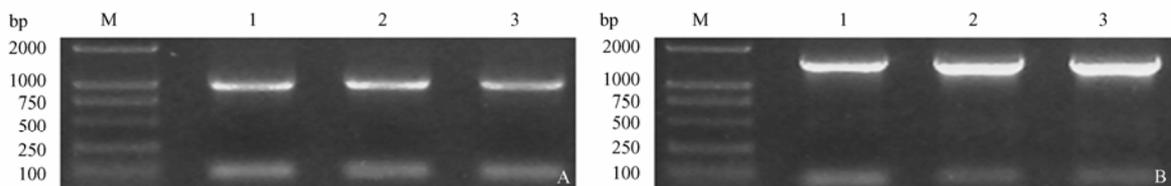
M: DL2000 DNA 标准分子量; A: SS370 (雄性不育系); B: GS13-X₁ (保持系); C: 细叶青 (恢复系)
M: DL2000 DNA marker; A: SS370 (male sterile); B: GS13-X₁ (maintainer); C: Xiyeqing (restorer)

图 2 苕麻线粒体 *Cox II* (I, II) 和 *atpA* (III, IV) 基因 DNA Walking 扩增

Fig. 2 DNA walking amplification of *Cox II* (I, II) and *atpA* (III, IV) gene from ramie mtDNA

使用特异性检测引物扩增后获得苕麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因特异性扩增条带, *Cox II* 基因大小为 1 050 bp, 雄性不育系 *atpA* 基因大小为 1 499 bp, 保

持系和恢复系 *atpA* 基因大小均为 1 490 bp, 与预期结果相符 (图 3)。克隆结果经重组检测后, 选取其中的阳性克隆进行序列测定 (3~5 个重复)。



M: DL2000 DNA 标准分子量; 1: SS370 (雄性不育系); 2: GS13-X₁ (保持系); 3: Xiyeqing (恢复系); A: *Cox II* 基因; B: *atpA* 基因
M: DL2000 DNA marker; 1: SS370 (male sterile); 2: GS13-X₁ (maintainer); 3: Xiyeqing (restorer); A: *Cox II* gene; B: *atpA* gene

图 3 根据 DNA Walking 结果设计特异检测引物 PCR 扩增的苕麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因

Fig. 3 Ramie *Cox II* and *atpA* gene PCR amplified from mtDNA using specific test primers based on DNA Walking amplification sequence

2.4 苕麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 全基因序列分析

基于 DNA Walking 扩增序列设计特异性检测引物, 从苕麻 mtDNA 中扩增的 *Cox II* 和 *atpA* 基因, 其序列与简并引物扩增序列和 DNA Walking 扩增序列完全一致 (图 4, 图 5 的 Tpf 与 Tpr 引物之间的序列), 说明 DNA Walking 扩增结果是正确的。

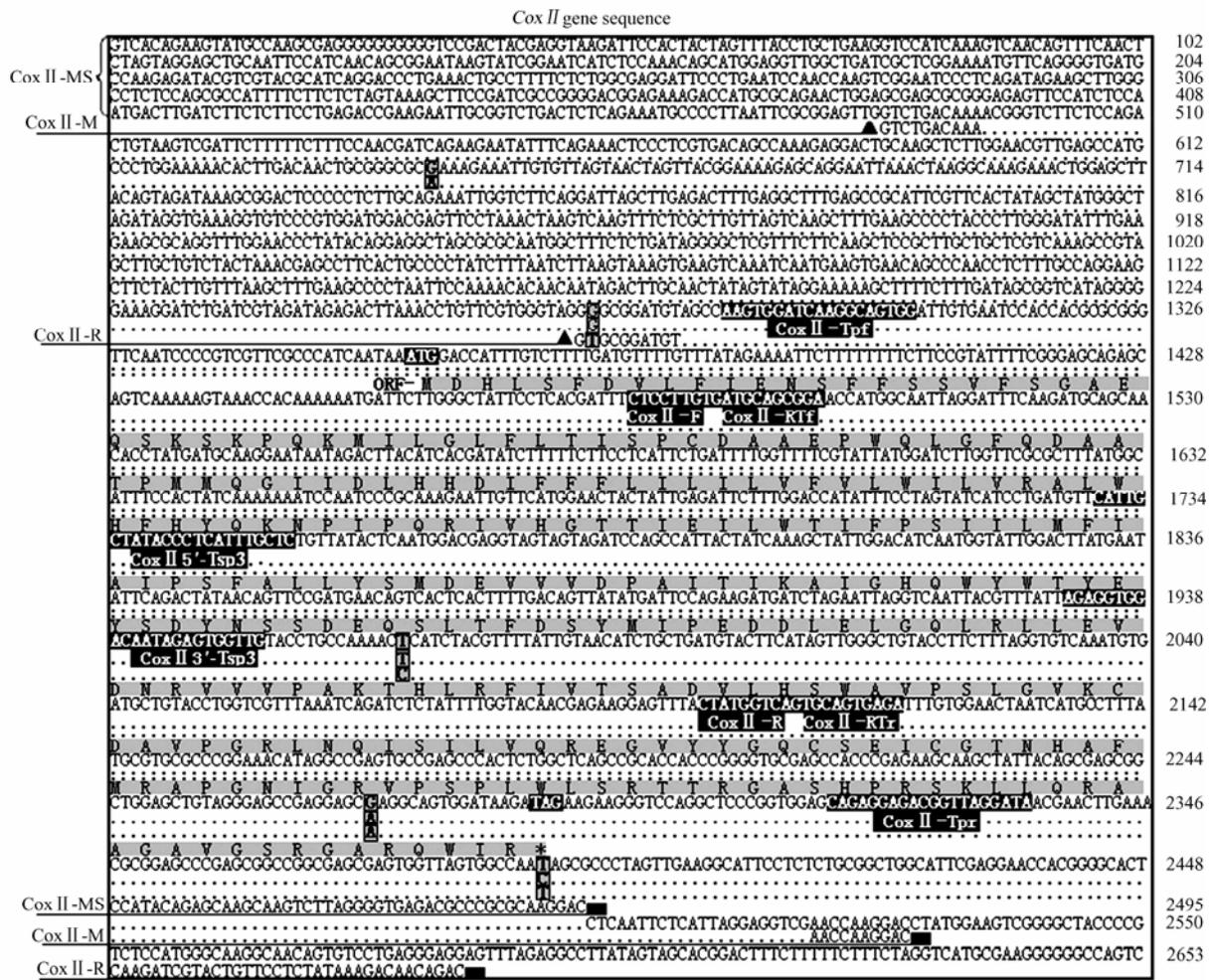
将 DNA Walking 扩增序列进行拼接和分析, 确定了苕麻 *Cox II* 和 *atpA* 基因的全序列。

苕麻雄性不育系 *Cox II* 基因 (命名为 *Cox II*-MS, GenBank 登录号: EU122339, 下同) 全长 2 528 bp, 包含 933 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 310 个氨基酸 (图 4)。保持系 *Cox II* 基因 (*Cox II*-M,

EU122338) 全长 2 203 bp, 包含 933 bp 的完整开放阅读框, 编码 310 个氨基酸 (图 4)。恢复系 *Cox II* 基因 (*Cox II*-R, EU122340) 全长 1 256 bp, 包含 933 bp 的完整开放阅读框, 编码 310 个氨基酸 (图 4)。同源性分析表明, “三系” *Cox II* 基因编码区核苷酸序列仅存在 2 个位点的差异; 由于密码子的简并性, 推导的氨基酸序列并无差异 (图 4)。BLAST 分析表明, 推导的苧麻 “三系” *Cox II* 基因氨基酸序列与萝卜 (*R. sativus*) (AAB88867)、拟南芥 (*A. thaliana*) (CAA69761)、油菜 (*B. napus*) (ABC98879)、

甜菜 (*B. vulgaris*) (AAK82658)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*) (ABB43241) 等多种双子叶植物线粒体 *Cox II* 基因同源性高达 93% 以上 (表 2)。

苧麻雄性不育系 *atpA* 基因 (*atpA*-MS, EU122336) 全长 2 136 bp, 包含 1 380 bp 的完整开放阅读框, 编码 459 个氨基酸 (图 5)。保持系 *atpA* 基因 (*atpA*-M, EU122335) 全长 1 576 bp, 包含 1 374 bp 的完整开放阅读框, 编码 457 个氨基酸 (图 5)。恢复系 *atpA* 基因 (*atpA*-R, EU122337) 全长 1 502 bp, 包含 1 374 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 457 个氨基酸 (图

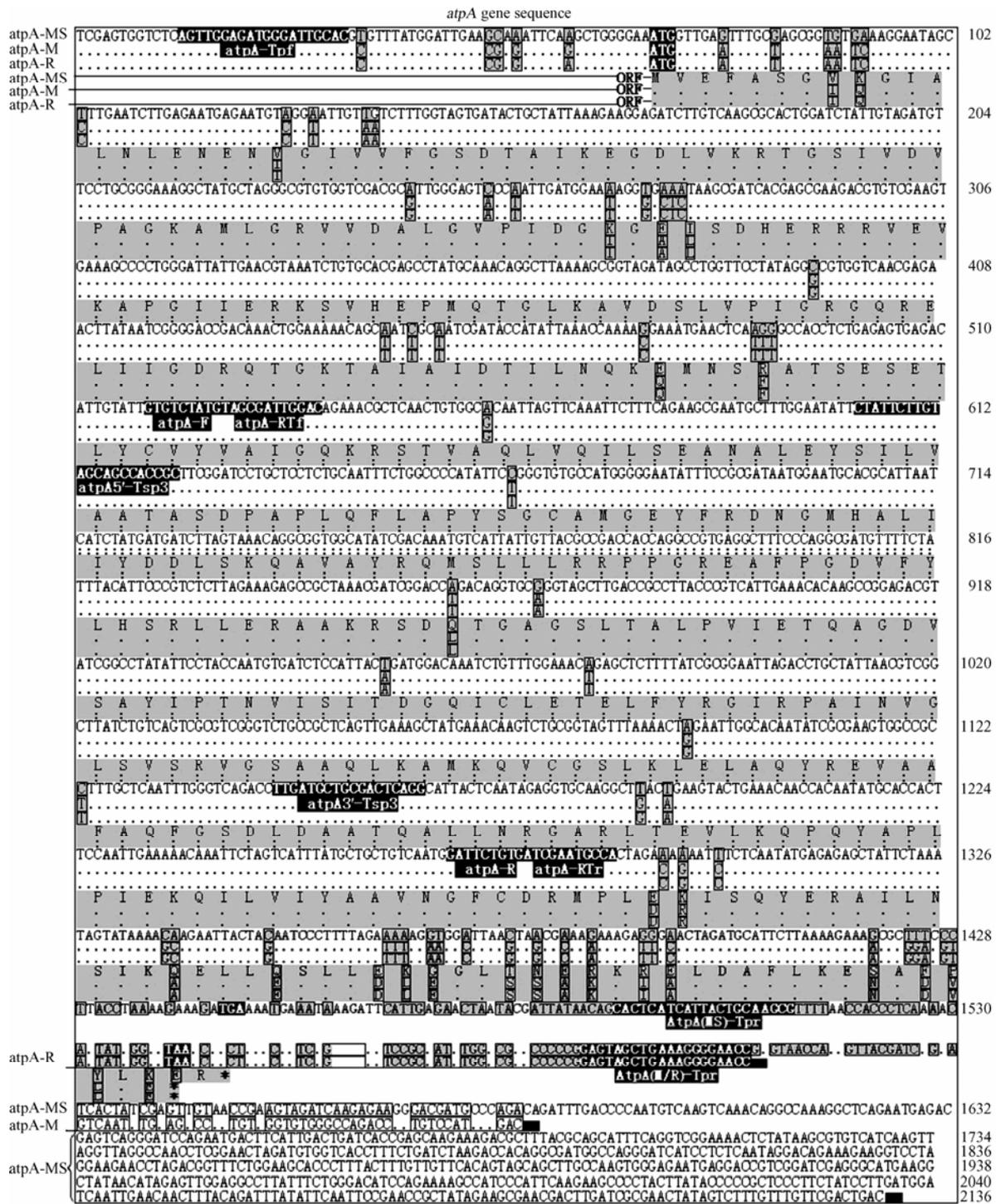


COX II-MS: SS370 序列 (雄性不育系); COX II-M: GS13-X₁ 序列 (保持系); COX II-R: 细叶青序列 (恢复系); 黑色长框指示引物序列; 黑色短框指示启动子和终止子; 灰色短框指示差异碱基; 灰色阴影指示由开放阅读框推导的氨基酸序列; “.” 表示相同的碱基; “▲” 表示序列的开始; “■” 表示序列的终止

COX II-MS: Sequence from SS370 (male sterile); Cox II-M: Sequence from GS13-X₁ (maintainer); Cox II-R: Sequence from Xiyeqing (restorer); Long black frames indicate the primer sequences; Short black frames indicate the start codon or stop codon; Short gray frames indicate the different nucleotides; Gray shade indicate the ORF deduced amino acid sequence; “.” means the same nucleotides; “▲” means the start of nucleotide sequence; “■” means the end of nucleotide sequence

图 4 苧麻线粒体 *Cox II* 基因核苷酸序列及其 ORF 编码的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of *Cox II* gene from ramie mtDNA and the amino acid sequence encoded by ORF



atpA-MS: SS370 序列 (雄性不育系); atpA-M: GS13-X₁ 序列 (保持系); atpA-R: 细叶青序列 (恢复系); 黑色长框指示引物序列; 黑色短框指示启动子和终止子; 灰色短框指示差异碱基和氨基酸; 灰色阴影指示由开放阅读框推导的氨基酸序列; “.” 表示相同的碱基; “■” 表示序列的终止

atpA-MS: Sequence from SS370 (male sterile); atpA-M: Sequence from GS13-X₁ (maintainer); atpA-R: Sequence from Xiyeqing (restorer); Long black frames indicate the primer sequences; Short black frames indicate the start codon or stop codon; Short gray frames indicate the different nucleotides and amino acids; Gray shade indicate the ORF deduced amino acid sequence; “.” means the same nucleotides; “■” means the end of nucleotide sequence

图 5 苕麻线粒体 *atpA* 基因核苷酸序列及其 ORF 编码的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleotide sequence of *atpA* gene from ramie mtDNA and the amino acid sequence encoded by ORF

表 2 推导的苧麻线粒体 *Cox II* 基因氨基酸序列与其它植物线粒体 *Cox II* 基因氨基酸序列同源性比较 (%)Table 2 Alignment (%) of the deduced amino acid sequence of mtDNA *Cox II* gene from ramie and other plants (%)

苧麻登录号 Accessions of ramie	GenBank 中其它植物的登录号 Accessions of other plants in GenBank					
	ABC98879	AAB88867	AAK82658	ABB43241	CAA37047	CAA69761
EU122339	96	96	93	94	96	93
EU122338	96	96	93	94	96	93
EU122340	96	96	93	94	96	93

GenBank 登录号 EU122339: SS370 (苧麻雄性不育系); EU122338: GS13-X₁ (苧麻保持系); EU122340: 细叶青 (苧麻恢复系); ABC98879: 油菜; AAB88867: 萝卜; AAK82658: 甜菜; CAA37047: 豌豆; ABB43241: 马铃薯; CAA69761: 拟南芥
GenBank accession number EU122339: SS370 (male sterile, ramie); EU122338: GS13-X₁ (maintainer, ramie); EU122340: Xiyeqing (restorer, ramie); ABC98879: *Brassica napus*; AAB88867: *Raphanus sativus*; AAK82658: *Beta vulgaris*; CAA37047: *Pisum sativum*; ABB43241: *Solanum tuberosum*; CAA69761: *Arabidopsis thaliana*

5)。同源性分析表明, 保持系与恢复系 *atpA* 基因编码区核苷酸序列存在 1 个位点的差异; 由于密码子的简并性, 推导的氨基酸序列并无差异 (图 5)。雄性不育系 *atpA* 基因编码区核苷酸序列与保持系和恢复系存在多个位点的差异, 同源性为 94.6%, 推导的氨基酸同源性为 93.7% (图 5)。BLAST 分析表明, 推

导的苧麻“三系”*atpA* 基因氨基酸序列与豌豆 (*P. sativum*) (CAA28964)、拟南芥 (*A. thaliana*) (NP_178788)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) (P05495)、油菜 (*B. napus*) (BAC98904)、胡萝卜 (*D. carota*) (AF301602) 等多种双子叶植物线粒体 *atpA* 基因同源性高达 90% 以上 (表 3)。

表 3 推导的苧麻线粒体 *atpA* 基因氨基酸序列与其它植物线粒体 *atpA* 基因氨基酸序列同源性比较 (%)Table 3 Alignment (%) of the deduced amino acid sequence of mtDNA *atpA* gene from ramie and other plants (%)

苧麻登录号 Accessions of ramie	GenBank 中其它植物的登录号 Accessions of other plants in GenBank					
	CAA28964	AF301602	P05495	CAA78407	BAC98904	NP_178788
EU122336	96	95	94	95	93	92
EU122335	94	92	93	94	91	90
EU122337	94	92	93	94	91	90

GenBank 登录号 EU122336: SS370 (苧麻雄性不育系); EU122335: GS13-X₁ (苧麻保持系); EU122337: 细叶青 (苧麻恢复系); CAA28964: 豌豆; AF301602: 胡萝卜; P05495: 烟草; CAA78407: 大豆; BAC98904: 油菜; NP_178788: 拟南芥
GenBank accession number EU122336: SS370 (male sterile, ramie); EU122335: GS13-X₁ (maintainer, ramie); EU122337: Xiyeqing (restorer, ramie); CAA28964: *Pisum sativum*; AF301602: *Daucus carota*; P05495: *Nicotiana tabacum*; CAA78407: *Glycine max*; BAC98904: *Brassica napus*; NP_178788: *Arabidopsis thaliana*

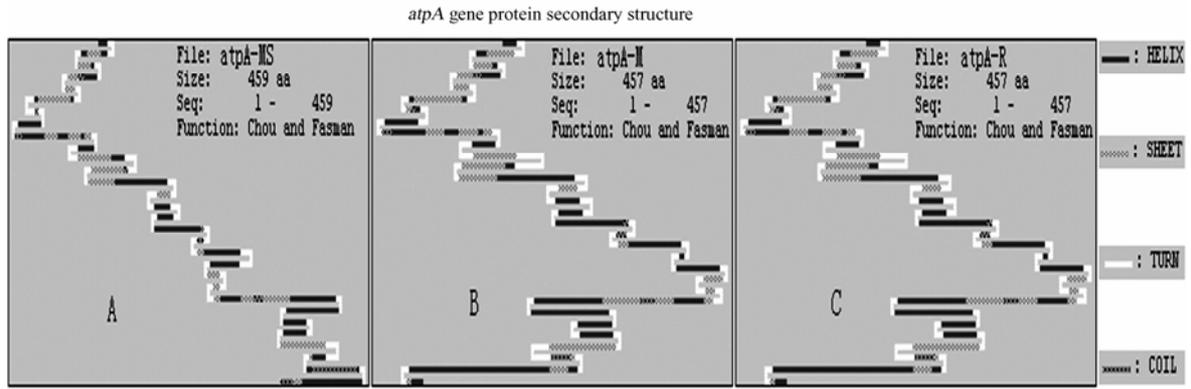
由于雄性不育系与可育系 (保持系和恢复系) 的 *atpA* 基因在蛋白质一级结构 (氨基酸序列) 上存在如上所述的差异, 进一步采用 DNASIS 软件对其蛋白质二级结构进行分析比较, 发现二者在蛋白质二级结构及其单元上存在比较明显的差异, 雄性不育系 *atpA* 基因蛋白质二级结构包含了 28 个 α -螺旋 (helix), 21 个 β -折叠 (sheet), 29 个 β -转角 (turn), 9 个卷曲 (coil) 结构; 保持系和恢复系 *atpA* 基因蛋白质二级结构完全一致, 均包含了 28 个 α -螺旋, 23 个 β -折叠, 30 个 β -转角, 7 个卷曲结构 (图 6)。蛋白质的功能与其空间结构有着密切的联系^[24], 由此推测雄性不育系的 *atpA* 基因的蛋白质功能发生了改变。

2.5 苧麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因表达情况

以提取的总 RNA 为模板, 以用于 RT-PCR 检测的引物进行常规 PCR 扩增, 并未扩增出产物, 说明所

提取的总 RNA 无 DNA 污染。

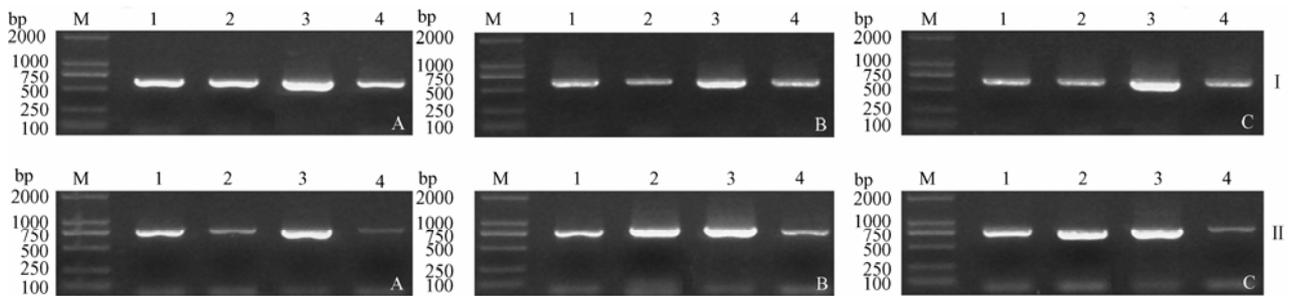
采用 RT-PCR 技术检测苧麻 *Cox II*、*atpA* 基因在生殖生长期 4 个阶段 (蕾前期、现蕾期、盛花期、开花末期) 的表达情况, 结果发现两基因在各个时期的叶片中都有表达, 为组成型表达。根据 Marker 所标示的浓度, 把 DL2000 中的 750 bp 条带的光密度作为基准浓度 (50.00 ng), 从而对不同阶段的基因表达进行量化分析。*Cox II* 基因在苧麻“三系”各个时期的表达量基本稳定, 盛花期略高, 但可育系在现蕾期的表达量似有降低。*atpA* 基因在“三系”中出现了表达量的差异, 保持系和恢复系在各个时期的表达量都呈现蕾前-现蕾期-盛花期依次增加, 开花末期呈明显降低态势, 而雄性不育系在现蕾期表达量明显偏低 (图 7, 表 4), 但在开花末期“三系”*atpA* 基因的表达量都很低, 是否说明此时 *atpA* 基因的作用退居次要。



A: SS370 (雄性不育系); B: GS13-X₁ (保持系); C: 细叶青 (恢复系)
A: SS370 (male sterile); B: GS13-X₁ (maintainer); C: Xiyeqing (restorer)

图 6 苕麻线粒体 *atpA* 基因蛋白质二级结构比较

Fig. 6 The secondary structure of protein deduced from ramie mtDNA *atpA* gene



M: DL2000 DNA 标准分子量; 1: 现蕾前期; 2: 现蕾期; 3: 盛花期; 4: 开花后期; A: SS370 (雄性不育系); B: GS13-X₁ (保持系); C: 细叶青 (恢复系)
M: DL2000 DNA marker; 1: Before budding; 2: Budding stage; 3: Full-bloom stage; 4: Late-bloom stage; A: SS370 (male sterile); B: GS13-X₁ (maintainer); C: Xiyeqing (restorer)

图 7 苕麻线粒体 *Cox II* (I)、*atpA* (II) 基因的 RT-PCR 表达情况

Fig. 7 Expression patterns of *Cox II* (I) and *atpA* (II) genes from ramie mtDNA detected by RT-PCR

表 4 苕麻线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因在生殖生长期不同阶段基于条带光密度的表达量比较

Table 4 Expression of *Cox II* and *atpA* genes from ramie mtDNA based on the band optical density at different stages during reproductive growth

苕麻品系 Ramie lines	<i>Cox II</i> 基因的表达 Expression of <i>Cox II</i> gene (ng)					苕麻三系 Ramie three lines	<i>atpA</i> 基因的表达 Expression of <i>atpA</i> gene (ng)				
	M	1	2	3	4		M	1	2	3	4
雄性不育系(A) Male sterile line (A)	50.00	242.35	241.51	297.48	178.82	雄性不育系(A) Male sterile line (A)	50.00	206.58	90.74	275.32	39.41
保持系(B) Maintainer line (B)	50.00	165.56	125.80	290.62	169.49	保持系(B) Maintainer line (B)	50.00	186.85	284.21	298.36	98.25
恢复系(C) Restorer line (C)	50.00	148.38	145.42	301.29	158.21	恢复系(C) Restorer line (C)	50.00	189.58	269.14	287.68	85.40

M: DL2000 DNA 标准分子量; 1: 现蕾前期; 2: 现蕾期; 3: 盛花期; 4: 开花后期; A: SS370 (雄性不育系); B: GS13-X₁ (保持系); C: 细叶青 (恢复系)
M: DL2000 DNA marker; 1: Before budding stage; 2: Budding stage; 3: Full-bloom stage; 4: Late-bloom stage; A: SS370 (male sterile); B: GS13-X₁ (maintainer); C: Xiyeqing (restorer)

3 讨论

简并引物实际上是一类由多种寡核苷酸组成的混合物, 彼此之间仅有一个或数个核苷酸的差异。它可以用来检测一个已知基因家族的新成员, 或用来检测种间的同源基因^[25]。由于目前对苧麻 CMS 的研究仍停留在生理生化阶段, 故没有现成的序列可供参考。笔者根据 GenBank 报道的双子叶植物线粒体 *Cox II* 和 *atpA* 基因编码区保守序列设计简并引物, 通过 PCR 技术从苧麻“三系”mtDNA 中扩增出相关的目的基因片段。BLAST 分析表明, 这些目的片段序列与油菜、烟草、拟南芥等多种植物的线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因同源性分别高达 95% 和 97% 以上, 说明扩增产物确实是苧麻线粒体 *Cox II* 和 *atpA* 基因片段。

DNA Walking 步移技术是根据已知 DNA 序列来获得基因组中与之相邻的未知侧翼 DNA 序列的一种简便有效的方法^[26-27] (http://www.see-gene.com/new_seegene/site_renewal/products/manual.html)。本试验在简并引物 PCR 扩增结果的基础上, 通过该技术成功的从苧麻 mtDNA 中克隆了 *Cox II* 和 *atpA* 全基因序列 (图 4, 图 5)。BLAST 分析表明, 推导的苧麻“三系”*Cox II* 和 *atpA* 基因氨基酸序列与拟南芥、烟草、萝卜等多种双子叶植物线粒体 *Cox II*、*atpA* 基因同源性分别高达 93% 和 90% 以上 (表 2, 表 3)。

许多研究者通过对多种材料 CMS 的研究发现, 在 mtDNA 水平、转录和翻译调控水平, 以及线粒体翻译产物——蛋白质水平上都有可能产生雄性不育^[2,9,13,28-30]。苧麻“三系”*Cox II* 基因在 mtDNA 水平存在微小差异 (图 4), 但蛋白质一级结构 (可以推测二级以上结构) 和基因表达水平上 (图 7, 表 4) 均无差异性, 因此可以排除 *Cox II* 基因导致苧麻雄性不育系 SS370 雄性不育的可能性, 但该基因是否与其它苧麻不育系的雄性不育有关尚待进一步研究。苧麻雄性不育系 *atpA* 基因与保持系和恢复系相比, 在编码区内存在若干个碱基的差异和缺失 (图 5), 这种结构上的变化暗示可能与苧麻 CMS 密切相关。RT-PCR 表达分析表明, 不育系 *atpA* 基因在现蕾期和开花后期表达量明显偏低 (图 7, 表 4), 而此时 *atpA* 基因的正常表达可能对小孢子发育至关重要。在蛋白质水平上, 雄性不育系 *atpA* 基因在蛋白质一级结构 (氨基酸序列) (图 5)、二级结构上与保持系和恢复系存在比较明显的差异 (图 6), 推测其功能亦有差异。因此

认为, *atpA* 基因序列差异引起翻译产物的差异和/或基因异常表达影响了细胞能量代谢, 使不育系小孢子不能正常发育, 从而导致雄性不育。

4 结论

本试验首次成功的从苧麻雄性不育系、保持系和恢复系 (简称“三系”) mtDNA 中克隆了 *Cox II* 和 *atpA* 全基因序列, 基于基因序列和基因表达 (RT-PCR 法) 分析了这两个基因在“三系”间的差异。“三系”的 *Cox II* 基因在 mtDNA 水平、转录水平、蛋白质水平上均无明显差异。不育系 *atpA* 基因在 mtDNA 水平、氨基酸序列和蛋白质二级结构上与可育系存在比较明显的差异; 而且不育系 *atpA* 基因在现蕾期和开花后期的表达量明显低于可育系。由此认为, *Cox II* 基因与苧麻 CMS 可能无关, 而不育系 *atpA* 基因的结构变异和/或异常表达与苧麻 CMS 的关系密切。

References

- [1] Kaul M L H. *Male Sterility in Higher Plants*. Berlin: Springer Verlag Press, 1988: 1-290, 845-883.
- [2] Levings III C S, Pring D R. Restriction endonuclease analysis of mtDNA from normal and Texas male sterile maize. *Science*, 1976, 193: 158-160.
- [3] Hanson M R and Bentolia S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *The Plant Cell*, 2004, 16: S154-S169.
- [4] Siculella L, Palmer J D. Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile male sterile sunflower CMS-associated alterations in structure and transcription of the *atpA* gene. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 3787-3799.
- [5] Kohler R H, Horn R, Lossl A, Zetsche K. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Molecular & General Genetics*, 1991, 227: 369-376.
- [6] Senda M, Mikami T, Kimoshita T. The sugar beet mitochondrial gene for the ATPase alpha-subunit: sequence, transcription and rearrangements in cytoplasmic male sterile plants. *Current Genetics*, 1993, 24: 164-170.
- [7] 季 静, 王 罡, Serieys H, Belhassen E, Berville A. 向日葵细胞质雄性不育系线粒体基因组 *atpA* 位点的研究. *遗传学报*, 1998, 25(4): 367-374.
- Ji J, Wang G, Serieys H, Belhassen E, Berville A. Characterization of *atpA* loci of CMS mitochondrial genome in sunflower. *Acta Genetica*

- Sinica*, 1998, 25(4): 367-374. (in Chinese)
- [8] Young E G, and Hanson M R. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell*, 1987, 50: 41-49.
- [9] Dewey R E, Timothy D H, Levings C S. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Current Genetics*, 1991, 20: 475-482.
- [10] Senda M, Harada T, Mikami T. Genomic organization and sequence analysis of the cytochrome oxidase subunit gene from normal and male sterile mitochondrial in sugar beat. *Current Genetics*, 1991, 19: 175-181.
- [11] Ducos E, Touzet P, Boutry M. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *The Plant Journal*, 2001, 26: 171-180.
- [12] 刘炎生, 汪训明, 王毓珠, 卓德良. 水稻细胞质雄性不育系和保持系的线粒体 *CoxI*、*CoxII* 基因组织结构差异的分析. *遗传学报*, 1988, 15(5): 348-351.
- Liu Y S, Wang X M, Wang Y Z, Zhuo D G. Structural variance analysis of mitochondria *CoxI* and *CoxII* genes from normal and cytoplasmic male-sterile varieties of rice (*Oryza sativa*). *Acta Genetica Sinica*, 1988, 15(5): 348-351. (in Chinese)
- [13] 张 鸿, 陈祖玉, 李阳生, 朱英国. 马协型水稻细胞质雄性不育系线粒体基因组的变异与功能的研究. *武汉植物学研究*, 2007, 25(3): 313-315.
- Zhang H, Chen Z Y, Li Y S, Zhu Y G. The mitochondria genomic mutation and function in the cytoplasmic male sterile line of maxie rice. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2007, 25(3): 313-315. (in Chinese)
- [14] 李宗道. 苧麻生理生化与遗传育种. 北京: 中国农业出版社, 1989: 158-167.
- Li Z D. *Physio-biochemistry and Genetic Breeding of Ramie*. Beijing: China Agriculture Press, 1989: 158-167. (in Chinese)
- [15] 刘飞虎, 梁雪妮, 黄海泉. 苧麻雄性不育系育性鉴定初报. *江西农业大学学报*, 1998, 20(2): 197-198.
- Liu F H, Liang X N, Huang H Q. Identification of fertility in ramie male sterile line. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 1998, 20(2): 197-198. (in Chinese)
- [16] 张中华, 魏 刚, 杨 燕, 舒忠旭. 苧麻优良雄性不育系“C26”的选育及利用研究. *中国麻业*, 2005, 27(3): 109-112.
- Zhang Z H, Wei G, Yang Y, Shu Z X. Breeding and utilization of ramie male sterility line "C26". *China's Fiber and Products*, 2005, 27(3): 109-112. (in Chinese)
- [17] 周瑞阳. 苧麻雌性不育性的遗传分析 I: 表现型分类. *中国学术期刊文摘*, 1999, 5(8): 1053-1054.
- Zhou R Y. Genetic analysis on female sterility in Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gand): The classification of phenotypes. *Chinese Science Abstracts*, 1999, 5: 1053-1054. (in Chinese)
- [18] 刘飞虎, 梁雪妮, 张寿文, 黄海泉. 苧麻雄性不育系育性鉴定和遗传分析. *中国麻业*, 2000, 22(1): 6-9.
- Liu F H, Liang X N, Zhang S W, Huang H Q. Identification and heredity analysis of sterility for ramie male sterile lines. *China's Fiber Crops*, 2000, 22(1): 6-9. (in Chinese)
- [19] 刘飞虎, 梁雪妮, 张寿文. 苧麻雄性不育系生化代谢和育性遗传研究. *植物遗传资源科学*, 2001, 2(4): 1-7.
- Liu F H, Liang X N, Zhang S W. Analyses for ecology, biochemistry and genetics of ramie (*Boehmeria nivea*) male sterile lines. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2001, 2(4): 1-7. (in Chinese)
- [20] 宋 军, 张中华, 潘光堂. 苧麻雄性不育材料的生理生化特性初探. *热带亚热带植物学报*, 2007, 15(5): 423-428.
- Song J, Zhang Z H, Pan G T. Physiological and biochemical characteristics in ramie male sterile lines. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2007, 15(5): 423-428. (in Chinese)
- [21] Scotti N, Card T, Marechal-Drouard L. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19: 67a-67h.
- [22] 段继强, 杜光辉, 李建永, 梁雪妮, 刘飞虎. 苧麻 *atp6* 和 *atp9* 基因的克隆表达及与细胞质雄性不育相关性分析. *遗传*, 2008, 30(11): 1487-1498.
- Duan J Q, Du G H, Li J Y, Liang X N, Liu F H. Cloning and expression of *atp6* and *atp9* genes from ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) and their relationship with cytoplasmic male sterility. *Hereditas*, 2008, 30(11): 1487-1498. (in Chinese)
- [23] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版). 北京: 科学出版社, 2002: 734-735.
- Wang G L, Fang H J. *Plant Gene Engineering*. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 2002: 734-735. (in Chinese)
- [24] 顾万君, 马建民, 周 童, 孙 啸, 陆祖宏. 不同结构的蛋白编码基因的密码子偏性研究. *生物物理学报*, 2002, 18(1): 81-86.
- Gu W J, Ma J M, Zhou T, Sun X, Lu Z H. Codon usage in genes coning for proteins with different tertiary structures. *Acta Biophysica Sinica*, 2002, 18(1): 81-86. (in Chinese)
- [25] 黄培堂. 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京: 科学出版社, 2002, 96-105.
- Huang P T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 96-105. (in Chinese)
- [26] 洪登峰, 万丽丽, 杨光圣. 侧翼序列克隆方法评价. *分子植物育种*,

- 2006, 4(2): 280-288.
- Hong D F, Wang L L, Yang G S. Estimation of techniques about cloning the flanking DNA sequence. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(2): 280-288. (in Chinese)
- [27] Hwang I T, Kim Y J, Kim S H, Kwak C I, Gu Y Y, Chun J Y. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques*, 2003, 35: 1180-1184.
- [28] Horn R, Kohler R H, Zetsche K. A mitochondrial 16kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17(1): 29-36.
- [29] Mart C J, Moneger F, Leaver C J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *The Plant Cell*, 1994, 6(6): 811-825.
- [30] Edqbist J, Bergman P. Nuclear identity specifies transcriptional initiation in plant mitochondria. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49(1): 59-68.

(责任编辑 于 竞)