

苎麻雄性不育相关基因的克隆和表达分析

摘 要

雄性不育在植物界广泛存在,在生产上有重要的利用价值。有关雄性不育以及雄性不育杂种优势产生的分子机理仍然远未得到阐明,这在很大程度上妨碍了杂种优势利用的深入发展。苎麻雄性不育杂种优势已经在生产上得到利用,但相关理论研究还远远不够。苎麻雄性不育相关基因的克隆和表达、利用分子标记方法对苎麻雄性不育的研究等,国内外尚无报道,

植物线粒体基因组和叶绿体基因组被认为与细胞质雄性不育性有直接关系。更多的证据表明植物胞质雄性不育性是由线粒体 DNA 分子突变和重组产生新的功能区(嵌合基因)造成的。ATP 合成酶在能量产物的形成过程中起着重要作用,可能对花粉细胞能量代谢等方面起着重要作用。*atp6*、*atp9*、*atpA* 等几个 ATP 合成酶亚基基因的研究受到普遍重视。本实验以项目组在前期工作中培育的苎麻“三系”为材料,开展了“三系”材料总 DNA 和线粒体 DNA 的提取方法的优化和 ISSR 标记分析、雄性不育相关基因 *atp6* 和 *atp9* 的克隆、序列分析和 RT-PCR 表达研究,为弄清苎麻雄性不育性的分子机理积累资料。同时,所克隆的不育相关基因将为今后利用基因工程方法培育新的不育系和研究不育形成机制奠定基础。获得如下主要结果:

1. 由于苎麻组织中,酚类、粘状物及黄酮类等次生代谢物质的含量较多,纤维含量也较高,DNA 的提取与纯化相当困难。本实验对苎麻总 DNA 和线粒体 DNA 的提取方法进行了适当的改进。利用 ISSR 方法分析了苎麻“三系”总 DNA 和线粒体 DNA,检测到了在总 DNA 水平和线粒体 DNA 水平上的 ISSR 多态性。苎麻“三系”之间存在明显的多态性,苎麻中保持系与不育系的差异比与恢复系的差异要小,其中不育系和保持系之间的多态性差异可能与育性相关。

2. 苎麻分子生物学方面的研究国内外还没有见到报道,没有现成可用的引物。本研究根据线粒体 DNA 序列具有保守性的特点,通过在 Genbank 上比对一些双子叶植物的 *atp6*、*atp9* 基因而合成简并引物,钓取了苎麻“三系”线粒体 *atp6*、*atp9* 基因的部分片段。在简并引物扩增序列基础上设计苎麻 *atp6*、*atp9* 基因特异引物,利用 DNA walking 策略扩增苎麻“三系”线粒体 DNA 的 *atp6*、*atp9* 基因 3' 和 5' 端,获得了苎麻“三系”*atp6*、*atp9* 基因的全长序列,并进行了相关的序列分析。通过与 Genbank 中的同源性核苷酸和蛋白质一、二级结构等方面的比较分析,发现苎麻 *atp6* 基因与某些植物同类基因

的相似性很高，而苎麻 *atp9* 基因则与其他植物同类基因的相似性略低。

3. 用 Trizol 试剂提取苎麻“三系”生殖生长不同阶段的叶片总 RNA，采用 RT-PCR 策略分析 *apt6*、*apt9* 基因的表达模式，结果显示 *atp6*、*atp9* 基因在苎麻“三系”中都是组成型表达，但 2 个基因在不同取样时期出现表达量的差异。

通过对苎麻“三系”的总 DNA 和线粒体 DNA 的分子标记分析，都得到苎麻中保持系与不育系的差异比与恢复系的差异要小的结果，印证了影响雄性不育性的因素不仅表现在细胞质上，而且受核基因的影响也比较大，暗示了对雄性不育性的研究不能只局限在不育系和保持系材料之间，应该拓宽研究材料，同时考虑细胞核的影响。根据线粒体基因组较为保守性的特点，设计简并引物扩增的思路证明是可行的。本实验首次克隆到了苎麻“三系”的 *apt6*、*apt9* 基因，同源性比较分析发现，苎麻 *atp6* 基因与某些植物同类基因的相似性很高，而苎麻 *atp9* 基因则与其他植物同类基因的相似性略低。推测所克隆的苎麻 *atp6* 基因可能与雄性不育性相关，*atp9* 基因可能与育性的关系不大。利用 RT-PCR 策略分析 *apt6*、*apt9* 基因的表达模式，表明在不同时期的叶片中苎麻“三系”都是组成型表达。

关键词：苎麻；ISSR 标记；雄性不育；*atp6* 基因；*atp9* 基因；基因克隆；表达分析

Cloning and expression of genes related to male sterility in Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.)

Abstract

Cytoplasmic male sterility (CMS) with its great value for utilization extensively exists in plants. The theories concerning CMS and heterosis have not been demonstrated clearly by far, which greatly limits the further utilization of the heterosis. The research of the cloning and expression on ramie (*Boehmeria nivea*) has not been retrieved yet at home and abroad, neither has any research of CMS on ramie with the methods of molecular biology.

Plant mitochondria genome and chloroplast genome are considered revised to be associated with CMS. More evidences proved that plant CMS resulted from mitochondrial DNA molecule mutation and rearrangement which produced new functional region (chimeric genes). ATPase plays a vital role in the energy-forming process, and might have significant functions in energy metabolism in pollen cells. Recent years more researches are focusing on *atp6*, *atp9* and *atpA*, genes encoding subunits of ATPase. In this experiment, the analysis of total DNA and mitochondrial DNA with ISSR molecular marker, gene cloning and RT-PCR expression of gene *atp6* and *atp9* in the CMS line, maintainer line and restorer line of *Boehmeria nivea* were revealed. These studies would provide a theoretical basis for using cytoplasmic male sterility to create new sterile line and studying their developmental system of CMS in ramie. The main results are as follows:

1. Extraction and purification of total DNA and mtDNA of *Boehmeria nivea* was difficult due to its richness in such secondary metabolites as polyphenols, sticky substances and flavone. The optimized protocol was used to extract the total DNA and mtDNA of *Boehmeria nivea*. The variation of total DNA and mtDNA was detected and analyzed in the CMS line, maintainer line and restorer line in *Boehmeria nivea* with ISSR molecular. It was showed that the polymorphism obviously existed in the above three lines not only in total DNA but also in mtDNA and the variation between the maintainer line and restorer line was greater than that between the maintainer line and CMS line. The variation especially existing between the CMS line and the maintainer line might be related to sterility.

2. The research of molecular biology and gene cloning on *Boehmeria nivea* has not been retrieved at home and abroad. The degenerate primers were designed to amplify the mtDNA of *Boehmeria nivea* based on the characteristics of conservation of mtDNA by comparing the alignment sequences of some dicotyledons. The fragments of gene *atp6* and *atp9* of the above three lines were obtained by using the degenerate primers according to the methods of cloning and sequencing. The gene specific primers were then designed on the basis of sequences amplified by the degenerate primers. The 3' and 5' terminus sequences were amplified in the templates of mtDNA of the three lines in *Boehmeria nivea* with the strategy of DNA walking. Thus the whole length sequences of gene *atp6* and *atp9* of the above three lines in *Boehmeria nivea* were obtained and analyzed. According to the comparative analysis of nucleotides, the deduced primary and secondary structure of proteins among the three lines were also analyzed with the software DNAMAN and compared in Genbank, it was shown that *atp6* gene was highly similar to certain *atp6* genes found related to CMS in some plants, while *atp9* gene was slightly low in their similarity.

3. The total RNAs were extracted with Trizol agent from leaves in various stages of *Boehmeria nivea*, the expression of *atp6* and *atp9* was analyzed according to the RT-PCR strategy. The results showed that both of them are constructive expression genes, but the variation of concentration existed for gene *atp6* and *atp9* in leaves of various stages.

That the results showed the variation between the maintainer line and restorer line was greater than that between the maintainer line and CMS line in total DNA and mtDNA revealed the effecting factors to CMS not only involved cytoplasm but cell nucleus, which indicated that the research materials should not be only focus on CMS line and maintainer line. It was feasible to design degenerate primers to amplify the fragments of gene *atp6* and *atp9* of the three lines of *Boehmeria nivea*. Gene specific primers were designed to amplify the whole length genes with the strategy of DNA walking. The sequences of *atp6* gene first reported in *Boehmeria nivea*. were highly similar to certain *atp6* genes found related to CMS in some plants by alignment analysis in Genbank, while the similarity of *atp9* gene was not so high. It is deduced that *atp6* gene might be related to CMS, and *atp9* gene might has no relation with CMS in *Boehmeria nivea*. The expression of *atp6* and *atp9* was constructive in

leaves of various stages by RT-PCR strategy.

Key words: ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud); ISSR molecular marker; male sterility; *atp6* gene; *atp9* gene; gene cloning; expression analysis

目 录

·└┐	文摘	
·└┐	英文文摘	
·└┐	声明	
·└┐	第一章文献综述	
·└┐└┐	1 植物雄性不育性概述	
·└┐└┐└┐	1.1 植物雄性不育的概念	
·└┐└┐└┐	1.2 植物雄性不育的表现	
·└┐└┐└┐	1.3 植物雄性不育的类型	
·└┐└┐└┐	1.4 雄性不育性在杂种优势中的利用	
·└┐└┐	2 植物雄性不育机理研究概况	
·└┐└┐└┐	2.1 叶绿体基因组与植物雄性不育	
·└┐└┐└┐	2.2 线粒体基因组与植物雄性不育	
·└┐	第二章苧麻“三系”总 DNA 提取方法优化及 ISSR 分析	
·└┐└┐	1 材料与方法	
·└┐└┐└┐	1.1 实验材料	
·└┐└┐└┐	1.2 实验试剂及主要仪器	
·└┐└┐└┐	1.3 引物序列	
·└┐└┐└┐	1.4 实验方法	
·└┐└┐	2 结果与分析	
·└┐└┐└┐	2.1 优化 CTAB 法提取苧麻 DNA 的效果	
·└┐└┐└┐	2.2 总 DNA 的 ISSR 扩增效果比较	
·└┐└┐└┐	2.3 “三系”总 DNA 的 ISSR 分析	
·└┐└┐	3 讨论	
·└┐	第三章苧麻“三系”线粒体 DNA 的提取及 ISSR 分析	
·└┐└┐	1 材料与方法	
·└┐└┐└┐	1.1 实验材料	
·└┐└┐└┐	1.2 实验试剂及主要仪器	
·└┐└┐└┐	1.3 试剂配制	
·└┐└┐└┐	1.4 引物序列	
·└┐└┐└┐	1.5 方法	
·└┐└┐	2 结果与分析	
·└┐└┐└┐	2.1 蔗糖衬垫法提取 mtDNA 的可行性	
·└┐└┐└┐	2.2 线粒体 DNA 的 ISSR 分析	
·└┐└┐	3 讨论	
·└┐	第四章苧麻雄性不育相关基因 atp6 和 atp9 片段克隆	
·└┐└┐	第一部分苧麻 atp6 基因片段的克隆	
·└┐└┐└┐	1 材料与方法	
·└┐└┐└┐	2 结果与分析	
·└┐└┐	第二部分苧麻 atp9 基因片段的克隆	
·└┐└┐└┐	1 材料与方法	
·└┐└┐└┐	2 结果与分析	
·└┐└┐	小结	

第五章	雄性不育相关基因 atp6 的全序列克隆与序列分析
1	材料与方法
1.1	材料
1.2	方法
2	结果与分析
2.1	苧麻“三系” atp6 基因测序结果
2.2	苧麻不育系 atp6-A 基因与其他植物 atp6 基因比较分析
2.3	苧麻“三系” atp6 基因的比较
3	讨论
第六章	雄性不育相关基因 atp9 的全序列克隆与序列分析
1	材料与方法
1.1	材料
1.2	方法
2	结果与分析
2.1	苧麻“三系” atp9 基因测序结果
2.2	苧麻不育系 atp9-A 基因与其他植物 atp9 基因比较分析
2.3	苧麻“三系” atp9 基因的比较
3	讨论
第七章	苧麻雄性不育相关基因的表达分析
1	材料与方法
1.1	实验材料
1.2	实验试剂及主要仪器
1.3	逆转录引物
1.4	实验方法
2	结果与分析
2.1	提取的总 RNA 检测
2.2	逆转录结果检测
2.3	atp6 和 apt9 基因的表达
2.4	4RT-PCR 检测条带的比较
3	讨论
4	小结
5	参考文献
6	附录
7	致谢

声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得云南大学或其他教育机构的学位或证明而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：侯思名 日期：2007.6.8

论文使用和授权说明

本人完全了解云南大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅或借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

（保密的论文在解密后应遵循此规定）

研究生签名：2007.侯思名 导师签名：刘宁 日期：2007.6.5

第一章 文献综述

雄性不育在植物界广泛存在,已经成为农作物杂种优势利用的物质基础。植物雄性不育已作为防止自交的有效手段被广泛地用于作物的杂交育种中,因此受到了极大的重视。雄性不育是研究植物的线粒体遗传、叶绿体遗传和核质互作遗传的极好材料,可以把性状遗传、细胞遗传和分子遗传相结合进行研究。同时雄性不育与育性基因的表达有密切关系,可以作为突变体进行植物发育生物学研究,研究育性基因的表达调控。雄性不育机理研究是近年来植物遗传学研究的热点,是一个十分活跃的领域(朱英国等2000)。

1 植物雄性不育性概述

1.1 植物雄性不育的概念

植物雄性不育是指植株的雄性生殖系统不能正常发育产生有功能的花粉,而其雌性生殖系统正常发育和营养生长完全正常的一种生物学现象。

1.2 植物雄性不育的表现

植物雄性不育有多种表现,根据雄性败育发生的早晚,可分为下列几种(刘忠松等2001)。

(1) 雄蕊退化或变形

如果败育发生在雄性器官分化的早期,可使整个雄蕊的发育失败,造成雄蕊严重退化,使其只留痕迹,或雄蕊变成花瓣,或花丝缩短花药弯曲畸形等。

(2) 花药异常

雄蕊除花药外形态正常或基本正常,但花药较瘦小干缩,或有非正常色泽而变白或变褐,或花药不正常开裂或不开裂,花药内一般无花粉,少数有败育花粉或少数正常花粉。

(3) 孢子囊退化

花药外形接近正常,但由于花药内没有造孢细胞,或孢母细胞减数分裂不正常,或在四分体时期败育,从而使花药内没有花粉或只有极少量花粉。

(4) 小孢子退化

一般花药近于正常,花药内有败育花粉。根据花粉败育程度不同,常常又分为三种:①典败,即典型败育型,小孢子在单核期败育,花粉瘦小而皱瘪,形态很不规则。②圆败,小孢子在单核中后期至双核早期发生败育,花粉稍小或大小正常,呈圆形,无淀粉积累,对碘液无蓝色反应。③染败。花粉在双核后期发生败育,花粉内已有淀粉积累,能和碘液发生染色反应。

(5) 花粉功能缺陷

花粉形态正常，也能染色，但在正常条件下不能萌发，只在某些特定条件下才可能萌发，形成花粉管。

1.3 植物雄性不育的类型

导致雄性不育的因素是多种多样的，因此，在分类上也因标准不同出现不同的分类系统。

1.3.1 根据遗传方式分类

早期对植物雄性不育的研究不够深入，仅根据雄性不育的一些遗传方式进行解释和分类（秦泰辰 1978）。主要有：

1.3.1.1 三型学说

谢尔斯（Sears, E.R.）于 1947 年在总结前人工作的基础上，将雄性不育性概括为三种类型。

（1）细胞质雄性不育类型（简称质不育型，又称母体遗传型）

细胞核内不带雄性不育基因，其雄性不育的遗传完全受细胞质遗传物质控制。这种类型的不育株与细胞质可育的父本交配，其子代总是不育的，在理论上是找不到恢复系的。

（2）细胞核不育类型（简称核不育类型，又称孟德尔遗传型）

该类型的雄性不育性是由细胞核不育基因控制，不受细胞质影响，没有正、反交遗传效应。根据不育基因与对应的可育基因之间的显隐性关系，又可分为隐性核不育和显性核不育，大多数的雄性核不育却属于隐性核不育。一般认为是由一对隐性基因控制的，其不育性很难保持而极易恢复，即没有保持系。其后代的育性分离符合孟德尔分离规律。

近年来，随着在水稻、玉米、小麦等作物中相继发现光（温）敏感雄性核不育系及其研究的深入，核不育类型又因对光（温）反应的不同而划分为不同类型。

（3）质核互作类型（细胞质—核相互作用类型）

雄性不育性由核不育基因和细胞质不育基因相互作用而产生的，为了与核雄性不育对应，称为细胞质雄性不育（Cytoplasmic male sterility, CMS）。其保持系和恢复系都能找到，有利于“三系”配套配制杂交种。

1.3.1.2 二型学说

1956 年爱德华生（Edwardson, J.R.）在玉米雄性不育性的研究中，结合前人的工作，对谢尔斯的三型学说提出了质疑，首创二型学说。认为细胞质作用类型在自然界中是不存在的，应归入质核互作类型。为了统一名称，把原来叫做细胞质作用类型与质核互作类型并为一类，称之为细胞质作用类型，特指由细胞质和细胞核两类遗传物质共同控制；另一类型就是细胞核作用类型。

现在的研究对植物雄性不育的划分采用的就是二型学说。其中 CMS 在杂种优势

(Heterosis)利用方面具有极其重要的意义。

1.3.1.3 一型学说（协调学说）

核质协调学说认为，二型学说中的细胞核作用类型是不存在的。所谓核基因控制的雄性不育系，都属于质核互作类型，即一型学说。

此外，也有人认为雄性不育性不是质量性状而是数量性状或质量-数量性状，因为有些杂交试验的杂种后代其育性的分离呈连续性变异（邓启云等 2001；谢建坤等 2002）。

1.3.2 根据雄性不育的机理分类

随着科技的发展，对植物雄性不育的研究越来越深入和广泛。根据引起雄性不育的主要原因，可将植物的雄性不育分为以下三种类型。

1.3.2.1 遗传性雄性不育

遗传性雄性不育是以遗传因素为主控制的不育类型。根据其是否可以遗传又可分为两类：

(1) 不能遗传类型 如染色体组不平衡，非整倍体等引起的不育，这类不育不只限于雄性，雌性也有。

(2) 可以遗传类型 它既可能纯粹由核基因突变所致，也可能由雄性育性基因处在不利的胞质条件下不能正常表达所引起。因此，往往把遗传的雄性不育类型又分为核不育（NMS）和细胞质—核互作不育（CMS）两种类型。

1.3.2.2 生理性雄性不育

具有正常可育基因型的植株在雄性发育过程中遇到不利条件（如极端温度、光照不足、干旱、化学药剂处理等）而引起雄性不育，这类雄性不育可随不利条件的消失而恢复育性。这类不育性是不遗传的。

1.3.2.3 生态性雄性不育

具有不育基因型的植株在一定条件下雄性不育，而在适当条件下雄性可育的不育类型。其不育性是由特定基因型决定的，是可以遗传的，也叫生境敏感型雄性不育。

此外，根据核质基因互作的方式和引起花粉败育的途径，植物雄性不育可分为孢子体不育和配子体不育。

1.4 雄性不育性在杂种优势中的利用

杂种优势是指两个遗传性不同的亲本杂交，杂种一代性状表现有较强的生活力、生长势、抗性、适应性和丰产性的超亲现象。杂种优势是生物界的一种普遍现象，在许多农作物上广泛利用并取得了显著的效果。而杂种优势利用的基础在于雄性不育的利用。植物的雄性不育性是一个与农业生产有密切关系的植物学性状，是基因型与环境相互作用在发育过程中表达的结果。雄性不育因免去了去雄的麻烦可作为遗传工具用于开发利用作物杂种优势和进行轮回选择、回交等育种研究，因此受到遗传育种家的高度重视。

视。利用植物的雄性不育性培育雄性不育系，再借助遗传工具来大量生产杂交种子，从而能使许多作物特别是自花传粉作物的杂种优势得以在生产上应用，这是农业科学最主要的成就之一。这也是为什么研究杂种优势要研究雄性不育的原因。

利用雄性不育性进行杂种优势的利用在一些作物上取得了成功。水稻自从 1970 年发现野败型不育株后，于 1973 年实现“三系”配套，1974 年选配出强优势籼型杂交水稻组合并试种成功，1975 年攻克制种技术关，1976 年开始大面积推广。至此水稻杂种优势的利用在全国越来越普及。利用杂种优势技术也选育出了高粱的杂交种，该杂交种的不育系 7050A 为自选系，具有 A1、A2 两种细胞质，配合力高，抗丝黑穗病，抗倒伏、抗叶病；恢复系 9198 也为自选系，具有恢复 A1、A2 细胞质不育性能，一般配合力高、高抗丝黑穗病、抗蚜虫。该杂交种是利用杂种优势技术选育的集高产、多抗、优质于一身的新的优良杂交种，有很强的杂种优势。大豆杂种优势的利用研究在我国也取得了突破，已发现 4 个不育细胞质供体，并育成了大批“三系”。小麦也具有明显的杂种优势，利用化学杀雄方式选育出不育系，配制出了 XZ1 小麦强优势组合，定名为“西杂一号”。它具有高产、优质、早熟、抗倒、落黄好、综合抗性强等特点。

作物雄性不育杂种优势的利用使作物生产力显著提高，目前几乎所有主要农作物上都已经或正在开始利用雄性不育杂种优势，雄性不育杂种优势已经是并且还会是作物育种的主要手段和发展方向。尽管多年来人们对植物雄性不育现象进行了遗传学、细胞学和生理生化研究，为阐明植物雄性不育的形成机理作了有益的探讨，尽管现代分子生物学研究成果也证明，因线粒体 DNA 序列的重复和重排而形成的异常嵌合基因参与控制雄性不育性，但雄性不育以及雄性不育杂种优势产生的分子机理仍然远未得到阐明，这在很大程度上妨碍了杂种优势利用的深入发展。因此，在分子水平上揭示雄性不育现象的遗传机理已成为植物分子生物学的重要课题之一。

2 植物雄性不育机理研究概况

随着分子生物学的发展，20 世纪 70 年代以来在玉米、矮牵牛、高粱、水稻、油菜、小麦、甜菜、向日葵、萝卜等作物上开展了细胞质雄性不育的分子机理的研究。在细胞质中，能进行自我复制的有线粒体 DNA (mitochondria DNA, mtDNA) 和叶绿体 DNA(chloroplast DNA, cpDNA)，而细胞质雄性不育性状是通过细胞质遗传的，所以人们认为叶绿体基因组和线粒体基因组及其表达产物与细胞质雄性不育有直接联系。

2.1 叶绿体基因组与植物雄性不育

植物的叶绿体 DNA 基因组较小，一般为 120~217 kb，相对比较稳定，不易发生重组。叶绿体是绿色植物细胞所特有的细胞器。叶绿体最主要的生物学功能是进行光合作用。叶绿体基质中有自身的基因组，它和线粒体一样具有自主性，能自主遗传和复制，是高等植物核外的另一类遗传系统，但受核基因的影响，所以也是一个“半自主性的细

胞器”。

研究发现, mtDNA 相对容易产生变异, 而 cpDNA 的变异较小, 进化较缓慢, 叶绿体基因组具有很高的保守性。因而研究者们将更多的精力放在了 mtDNA 对 CMS 影响的研究上, 而有关 cpDNA 对 CMS 的影响的研究并不完全, 结论也存在较多的分歧。

对于叶绿体和雄性不育的关系, 也有不少人在做这方面的工作。人们在鉴定细胞质雄性不育相关基因(位点)时多从 CMS 系与可育系间叶绿体基因组和线粒体基因组的比较入手, 寻找两者之间的差异。Vedel 等(1983)在对油菜雄性不育系和正常可育系的叶绿体基因组物理图谱进行比较后发现, 二者的物理图谱几乎相同。Clark 等(1995)对矮牵牛体细胞杂种的叶绿体基因组研究后发现, 可育杂种的细胞质中可以具有不育亲本的叶绿体基因组, 不育杂种的细胞质中也可具有可育亲本的叶绿体基因组, 这排除了矮牵牛的叶绿体基因组与 CMS 的关系。后来, 对其它植物体细胞杂种的细胞质研究发现, 在没有外加选择压力下, 杂种的叶绿体基因组往往是亲本之一型, 即杂种在选择亲本的叶绿体基因组类型上没有倾向性, 是随机的。而线粒体的基因组相反, 体细胞杂种的线粒体基因组往往是两个亲本的重组型, 即不同于任一亲本(Waltes 等 1993; Mulhopadhyay 等 1994; Aviv and Galun 1980; Primard 等 1988)。刘炎生等(1988)比较了水稻珍汕 97A 与珍汕 97B 叶绿体基因组的酶切图谱, 发现不育系和保持系之间没有多态性。Wang 等(1989)通过线粒体亚微结构、小分子量核酸及 RFLP 分析, 推测水稻 CMS 与线粒体有关, 与叶绿体的关系不大。赵世民等(1994)比较了野败型(WA 型)、D 型不育系和保持系叶绿体基因组的体外翻译产物, 结果没有找到差异多肽。Levings(1990)对玉米, Kadowaki 等(1990)对水稻的 cpDNA 酶切后电泳未发现不育系与保持系之间存在多态性。

但李继耕(1983; 1992)在菠菜、玉米、小麦、高粱、水稻等多种作物中, 利用 DNA 双相电泳技术对叶绿体与雄性不育性的关系进行研究的结果表明, 不育系的叶绿体基因组与其相应的保持系之间存在明显的差异。李继耕也对叶绿体蛋白质、叶绿体超微结构进行了研究, 都发现不育系和保持系之间存在差异。因此他认为高等植物的胞质雄性不育性同 cpDNA、叶绿体蛋白质以及叶绿体超微结构之间存在某些联系是肯定的; cpDNA 的突变引起它所编码的一系列特性的变化, 使雄性不育性受到影响也是可能的。Ishii 等(1993)和 Dally and Second(1990)对水稻的叶绿体 DNA 进行 RFLP 分析, 发现稻属内各个种之间存在较大差异, 栽培稻之间也有一定差异。周长久(1994)对萝卜胞质雄性不育系与可育系的 cpDNA 的研究也发现两者有差异。Chen 等(1993)在高粱研究中发现, 5 个可育系的叶绿体基因组中均存在 3.8 kb 的 HindIII 酶切片段, 而 3 个不育系中只有 3.7 kb 的 HindIII 酶切片段。他后来应用原位杂交技术证实, 高粱雄性不育系和保持系的 cpDNA 的 HindIII 酶切片段确实不同, 并且克隆到 rpoC2 这一基因片段, 通过测序再和其他作物如水稻、玉米、烟草、梨等同源序列比较, 证实了 rpoC2 是编码

RNA 聚合酶亚单位的基因。但他对这一基因片段究竟是否同 CMS 有关没有作出肯定的结论。

迄今为止,还没有在任何细胞质雄性不育植物的叶绿体基因组中找到一个可能与其育性密切相关的、且表达产物受恢复基因影响的 DNA 片段。相对于线粒体基因组而言,高等植物的叶绿体基因组在大小和结构上要稳定得多,同种或种间的不同植物其叶绿体 DNA 限制性图谱相同或基本相同,远源植物之间有一些差异,但即使是无关植物,其同源性也可达 30%以上(陈章良等 1999)。这种遗传结构稳定的特征是高等植物的线粒体基因组所无法比拟的。另外,它的重复序列较少,由此介导的重组率也较低。正因为叶绿体基因组和线粒体基因组在结构上的各自特点,在考虑它们与细胞质雄性不育关系时,人们更容易想到线粒体。因此,从现有的研究资料来看,虽然没有足够的证据完全排除 cpDNA 与 CMS 有关的可能性(李继耕 1992),但是确切认为 cpDNA 一定同 CMS 有关的结论并不多。

2.2 线粒体基因组与植物雄性不育

2.2.1 植物线粒体基因组结构

高等植物线粒体基因组较之于动物和真菌复杂得多。线粒体基因组的大小,因植物种类不同而异,大小范围为 200~2500 kb,基本为单一顺序碱基序列。线粒体基因组的复杂性表现在(凌杏元等 2000):(1)不同种植物的线粒体基因组大小区别较大,但编码的基因量差别较小;(2)高等植物线粒体基因组可编码一些在其它生物中仅由细胞核编码的蛋白;(3)环状 DNA 的多型性,植物 mtDNA 经长链 DNA 参与的重组机制,可形成大小不同的环状 DNA 分子。

2.2.2 线粒体基因组与植物雄性不育

植物的线粒体 DNA 具有复杂性和不均一性,线粒体基因组变化很大,存在基因组不均一性、分子间和分子内重排的现象。在 CMS 细胞质的线粒体基因组中发现受核恢复基因调控的 ORF (open reading frame)、URF(unassigned reading frame)阅读框及嵌合基因,使人们认识到 CMS 与线粒体存在密切关系,并集中在 mtDNA、mtRNA 和蛋白质三个水平进行研究。众多的实验证据表明(Kadowaki 等 1990; Dewey 等 1986; Yong 等 1993; 杨金水等 1993),雄性不育的胞质因子主要在线粒体上,植物雄性不育与线粒体基因组关系十分密切,而且胞质育性相关基因也存在于 mtDNA 上,因而普遍认为线粒体基因组是 CMS 相关基因的载体(Levings 等 1976; Levings 等 1989),随后的一些研究也倾向于这种观点(许仁林 1995; 李小明等 2000; 梅启明等 1990)。因此,通过线粒体基因组结构分析,可以提供寻找 CMS 相关基因的线索。

高等植物线粒体基因组非常庞大,但所编码的功能基因有限。针对高等植物线粒体

基因组的编码序列保守性很强,但编码区以外的序列保守性很低这个特点,可利用已知基因研究其它各种植物线粒体基因的多态性变化。例如小麦和玉米的 COXII 基因,编码区核苷酸同源率达到 99% (其中内含子 99.3%, 外显子 98.9%), 但是编码区以外的部分保守性很低,非编码区即 COXII 基因在 ATG 前面几乎没有什么同源性(陈章良等 1999)。在植物 mtDNA 中还含有一些开放的阅读框架 ORF, 它们能转录,但其功能和编码蛋白还不清楚。这些阅读框有的是通过线粒体基因重排而形成的嵌合基因;在不同植物中已发现的近 20 个不同嵌合基因中有的与植物雄性不育性有关 (Hanson1991)。

基于植物线粒体基因组的复杂性和不均一性、线粒体分子间和分子内出现的重排现象以及在 CMS 胞质的线粒体基因组中发现的表达受核恢复基因调控的 OFR、URF 及嵌合基因等使人们认识到植物细胞质雄性不育与线粒体有密切关系。确定与细胞质雄性不育相关基因或基因片段,可采用以下几种材料: 1) 不育系和保持系; 2) 不育系和育性自发回复突变体; 3) 组培或原生质体融合分化产生的不育和可育植株。通常采用如下方法: 1) 用已知线粒体基因作探针针对上述材料线粒体 DNA 进行 RFLP 分析或 Northern 分析, 寻找二者存在差异的原因; 2) 用限制性内切酶消化不育和正常胞质 mtDNA, 直接从分离胶上回收并克隆不育或正常 mtDNA 特异片段; 3) 用 RAPD 或 AFLP 等方法比较正常和不育胞质 mtDNA 差异, 克隆不育系特异的扩增片段; 4) 用差异展示的方法, 寻找不育与正常胞质线粒体差异 RNA。以上 4 种方法获得的差异片段可直接作为探针从 mtDNA 文库中筛选阳性克隆, 进而确定与细胞质雄性不育有关的阅读框。

研究者通过对多种材料的 CMS 的研究发现, 导致 CMS 形成的原因在 mtDNA 水平、转录和翻译调控水平和线粒体离体翻译产物——蛋白质水平上都有可能发生。

2.2.2.1 线粒体基因 (mtDNA) 与雄性不育

目前 mtDNA 水平上的研究多从下列几个方面开展: 通过 RFLP、RAPD、AFLP 等分子标记技术分析比较不育系和保持系 mtDNA 酶切图谱上的差异 (Boeshore 等 1984; 杨金水等 1995; 黄占景等 1997; 凌杏元等 1999; 凌杏元等 2000); 比较不育系和 F₁ 杂种 mtDNA 间酶切图谱上的差异; 根据功能基因的保守序列设计引物, 随后利用 PCR 方法钓取基因后再进行测序, 比较不育株与可育株功能基因的编码序列 (Soferman 等 1993); 构建不育系和保持系 mtDNA 文库, 克隆基因进行分析等 (Fauron 等 1990)。

对植物线粒体基因组的研究表明, 线粒体基因组中含有同向或反向的重复顺序, 而重复顺序间发生重组在植物线粒体中是非常普遍的。功能基因如果位于重复顺序的边缘, 就有可能在重组时受到影响而引起基因结构的变化, 从而影响其功能。迄今为止的各种 CMS 材料研究都表明胞质不育和 mtDNA 的突变有关 (Kadowaki 等 1990)。这些突变体常产生能表达的 ORF。异常的线粒体以及与雄性不育有关的序列大多是由于 DNA 的重排、插入、缺失所造成的, 而这极可能是 CMS 的主要原因 (Levings 等 1989)。

最早关于 mtDNA 与 CMS 关系的研究是 1976 年, Levings 等 (1976) 在 “Science” 上发表了关于 mtDNA 与 CMS 关系的研究成果。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, 这说明不育系和保持系线粒体基因组不同。

卓德良等 (1988) 对水稻野败 (WA)、红莲 (HL)、包台 (BT) 型 3 种不同细胞质源的不育系和保持系的酶切图谱进行比较后发现, 在不同细胞质中确实存在不同的 mtDNA, 且在不同保持系中亦存在一定差异, 这种差异表明 mtDNA 发生了变异或重组, 从而支持了水稻 CMS 的线粒体遗传的假设。刘炎生等 (1989) 亦通过类似方法指出, 可利用 mtDNA 酶切带型对水稻 CMS 的细胞质源进行分类。

近几年来, 已应用限制性片段长度多态性 (RFLP) 技术, 从基因水平上比较了 CMS 系和正常品系 mtDNA 的差异, 也对 CMS 细胞质进行了分类。目前, 已对水稻 (刘忠松等 2001; 李小明等 2000)、小麦 (李传友等 1995; 姚方印等 2000; 仇艳光等 2001)、油菜 (田志宏等 1998) 等多种作物的 CMS 系和正常品系的 mtDNA 开展了 RFLP 分析, 发现 CMS 系和正常品系的 mtDNA 存在显著差异。

Kadowaki 等 (1988) 用合成的线粒体基因序列 *Cox I*, *Cox II*, *atpA*, *atp9*, *Cob*, *atp6* 作探针, 用 RFLP 和分子杂交法比较了不育水稻 BT 型不育系和保持系 mtDNA 的差异。结果表明, 6 种探针中, *atp6* 和 *Cob* 的分子杂交带谱在两种细胞质中有差异, 而其余 4 种则相同。*atp6* 和 *Cob* 基因在不育系中存在两个拷贝, 而在保持系中只有一个拷贝。深入的研究发现, 不育系中除了一个正常的 *atp6* 基因外, 还存在一个额外的嵌合 *atp6* 基因。他们将嵌合 *atp6* 基因命名为未定阅读框 (unidentified reading frame of rice mitochondria associated with CMS, urf-rmc)。这个 urf-rmc 基因与正常的 *atp6* 基因有 997bp 完全同源序列。Southern 杂交证明, urf-rmc 来源于 mtDNA 分子内重组。将 urf-rmc 下游的核苷酸片段作探针和 mtRNA 作 Northern 杂交, 当引入育性恢复基因 Rf 后, 能改变 urf-rmc 的转录本长度, 使其由一个 2.7kb 的线粒体 RNA 变为一个 2.8 kb 的线粒体 RNA (mtRNA), 但并不改变正常的 *atp6* 基因转录本长度为 1.5 kb。Kadowaki 等认为, 不育系中 urf-rmc 的表达产物可能作为一种拮抗物, 抑制 *atp6* 基因的正常表达, 导致小孢子发育过程中 ATP 合成受影响, 致使花粉败育; 而在恢复基因 Rf 的作用下, urf-rmc 转录本延长了, 从而解除了对正常 *atp6* 基因的抑制, 保证了 ATP 的合成。这暗示嵌合基因与细胞质雄性不育有关。1994 年, Akagi 等将 BT 型 CMS 胞质与粳稻品种进行不对称细胞融合, 发现 CMS 杂种的 mtDNA 均在 *atp6* 基因终止密码子下游的 49 位核苷酸处发生歧化, 并在第 206 位核苷酸处开始出现 1 个新的 orf79, orf79 的 5' 端和 *coxI* 序列高度同源; orf79 和 *atp6* 基因之间的间隔区则与 *cox II* 基因上游的非编码区高度同源。

Northern 分析发现, 在 CMS 系中 *atp6* 基因的下游均产生 *atp6* 基因的反义转录本, 但在恢复基因复育杂种中, 这种反义转录本的量大大降低。1995 年, Akagi 等 (1995) 又用 12 个梗稻品种与 BT 型 CMS 系 MTC-5A 进行不对称细胞融合, 结果发现所有 CMS 体细胞杂种的 mtDNA 均含 *orf79*, 因此 *orf79* 可能与 BT 型 CMS 有关。但要鉴定出与 CMS 有关的 mtDNA 片段, 还要做大量的工作。

田志宏等 (1998) 对 9 份甘蓝型油菜细胞质雄性不育系及相应的 9 份保持系的 mtDNA 的 RFLP 分析, 在 18 份材料中共检测到 71 条放射自显影带, 其中 21 条具有多态性, 占 29.6%。其中标号 JN223 的 CMS 材料带型与其它 8 份 CMS 材料的带型有很大的差别, 在 *atp6*、*atp9*、*atpA-5'* 及 *atpA-3'* 探针的 8 种探针/酶组合上表现出多态性。不育系与保持系之间主要表现在 *atp6* 与 *atp9* 这两个探针的酶切位点上的差异, 推测可能与其雄性不育有关。

刘军等 (1998) 利用 RFLP 分子标记技术和分子杂交技术研究了水稻马协型和 WA 型不育系珍汕 97A 线粒体基因组的组成, 用 *EcoRI*、*BamHI* 和 *HindIII* 三种内切酶和 *CoxI*、*Cox II*、*atpA*、*atp9*、*rrn26S* 5 种基因探针构成不同的组合。在 *EcoRI/Cox II* 组合中, 马协 A 有 4.8 kb 和 4.0 kb 的两条杂交带, 珍汕 97A 只有一条 4.0 kb 的杂交带, 无 4.8 kb 的带。在同样的 *EcoRI/Cox II* 组合中, 马协 A 有 4.8 kb 和 4.0 kb 的两条杂交带, 马协 B 只有一条 4.0 kb 的带。但在 *HindIII/CoxI* 组合中, 马协 A 的杂交带为 5.8 kb 的一条, 马协 B 为 7.8 kb 的一条。以上结果表明, 不育系与保持系线粒体基因组存在差异。姚方印等 (2000) 利用 RFLP 技术对细胞质不同来源的三种普通小麦雄性不育系—K 型、V 型、T 型及相应的保持系、杂种 F₁ 代的 mtDNA 进行的比较分析发现: 在 mtDNA 组织结构上三种不育系之间、不育系与保持系之间均呈现差异; 在不同的探针与酶组合中, 检测到 K 型、T 型不育系与其相应的 F₁ 代之间的多态性。李小明等 (2000) 应用 RFLP 技术, 研究了水稻 HL 型不育系、保持系、杂种 F₁ 代及 WA 型、马协型不育系的线粒体基因组。结果表明, HL 型不育系与保持系线粒体基因组之间存在显著差异; HL 型不育系、马协型不育系、WA 型不育系线粒体基因组之间也存在差异, 在分子水平揭示了不育胞质的多样性。

此外, AFLP、RAPD、AP-PCR 等技术的应用, 在细胞质雄性不育研究方面, 也取得了一些进展。

凌杏元等 (1999) 利用 AFLP 技术对水稻 WA 型不育系 (珍汕 97A)、保持系 (珍汕 97B) 和 F₁ 杂种 (汕优 63) mtDNA 进行了比较, 从 M/P_A 引物对选择扩增产物中找到了不育系和保持系差异条带 ZA₁、ZA₂ 和 ZA₃。之后, 凌杏元等 (2000) 又对水稻 HL 型雄性不育系和保持系 mtDNA 进行了 AFLP 分析, 在不育系中找到一特异条带, 命名为 TA1, 在保持系中发现 3 条差异条带, 分别命名为 TB1、TB2、TB3。以上结果表明

HL 型不育系和保持系 mtDNA 在这些片段位点附近存在差异。

孙兰珍等 (2001) 利用 RAPD 技术对细胞质不同来源的三种普通小麦雄性不育系—K 型、V 型、T 型及相应的保持系、恢复系以及杂种 F₁ 代的 mtDNA 进行的比较分析发现, 在 mtDNA 组织结构上三种不育系之间以及保持系之间均呈现差异。对两个特异多态性 DNA 片段进行了回收、克隆, 并以此为探针, 进行 Southern 杂交, 结果表明, 不育系与保持系之间存在多态性, 有两个片段可能与育性有一定的联系。杨剑波等 (2002) 利用 RAPD 技术对水稻 WA 型、矮败型和 BT 型细胞质雄性不育系和保持系 mtDNA 分别进行了扩增, 分离到 6 条不育系特有的扩增片段, 并对 WA 型、矮败型不育系共有的片段进行了 Southern 分析、DNA 测序和 SCAR 验证, 证明该片段全长 1979 bp, 包含 6 个 orf 和 8 对重复序列, BLAST 分析表明, 该片段部分区域与小麦线粒体 Tma-Asp 基因上游一段序列同源。王永飞等 (2003) 利用 RAPD 技术从大白菜细胞质雄性不育系 CMS3411-7 的 mtDNA 中得到了 1 个特异扩增片段 CMSOPL01₆₇₀, 进一步以该片段为探针进行 Dot 和 Southern 杂交证实了该片段为不育系所特有。

许仁林等 (1995) 应用 AP-PCR 从水稻 WA 型雄性不育系的 mtDNA 中得到一个特异的扩增片段 R₂₋₆₃₀WA, 序列测定表明该片段全长 629 bp, 碱基组成为 A+T=54.16%。同源性比较结果显示, 该片段与 1236 个已报道的植物基因 (包括 16 个水稻线粒体基因) 序列的同源性均小于 50%, 序列内含有一个长度为 10 bp 的反向重复序列。表明 R₂₋₆₃₀WA 片段与水稻 WA 型雄性不育密切相关, 并推测该片段内的反向重复序列在 CMS 性状形成中, 可能起着重要的作用。

2.2.2.2 线粒体基因转录和翻译调控与雄性不育

在线粒体基因转录产物 (mtRNA) 水平上探讨细胞质雄性不育分子机理的研究可从两方面进行 (Pruitt 等 1991; Iwahashi 等 1993): 一是通过把从 mtDNA 水平上获得的差异片段与 mtRNA 进行 Northern 杂交, 或直接把线粒体的功能基因作为探针与 RNA 杂交, 研究 DNA 水平上的差异片段或功能基因在不育系和可育系之间的表达特性, 以及这些差异表达是否与育性存在一定的关系等。二是直接研究 mtRNA 在编辑、剪切和加工等方式上是否在不育系和可育系之间存在差异, 这些差异和核恢复基因的关系等。

凌杏元等 (1999) 对水稻 WA 型不育系 (珍汕 97A)、保持系 (珍汕 97B) 和 F₁ 杂种 (汕优 63) mtDNA 进行了 AFLP 比较, 从 M/P_A 引物对选择扩增产物中找到了不育系和保持系差异条带 ZA₁、ZA₂ 和 ZA₃。Northern 分析表明, 片段 ZA₁ 黄化苗期无转录产物, 可能是非编码序列; 而 ZA₂、ZA₃ 两片段在不育系、保持系和 F₁ 杂种中的转录有差异, 其中片段 ZA₂ 在黄化苗期保持系转录, 不育系和 F₁ 杂种无转录产物; 片段 ZA₃ 在黄化苗期保持系和 F₁ 杂种转录, 表明 ZA₃ 转录受核恢复基因 Rf 影响。之后, 凌杏元等 (2000) 又对水稻 HL 型雄性不育系和保持系 mtDNA 进行了 AFLP 分析, 在不育系中

找到一特异条带 TA1。以该条带 DNA 为探针与不育系、保持系、F₁ 杂种线粒体总 RNA 杂交, 结果显示该片段黄化苗期三者均转录一个 RNA 分子, 但转录产物分子量各不相同, 说明三者该片段框架不同。经测序, 该片段长 202 bp, 序列内含密码子 ATG、ATT、AGA、AGG 以及正向重复序列和倒转重复序列。上述特点表明该片段可能是某一蛋白编码序列, 并可能与 HL 型水稻雄性不育性状形成有关。

Iwahashi (1993) 在研究水稻 BT 型不育系与保持系 *atp6* 基因表达结果后认为 RNA 加工和编辑在控制 BT 型水稻细胞质雄性不育的表达和育性的恢复上具有重要的意义。王学德等 (1998) 用 mRNA 差别显示技术, 对水稻孢子体型细胞质雄性不育系马协 A、保持系马协 B、F₁ 杂种马协 63 和配子体不育系丛广 41A、保持系丛广 41B、F₁ 杂种的花药 mRNA 和叶片的 mRNA 进行了比较和分析, 以研究雄性不育花药在花粉败育时期的基因表达方式。结果表明, 花药中育性基因的表达比叶片中活跃和充分; 不同类型花药的基因转录方式既与花药育性程度有关也与花药败育早晚有关。并以回收的 cDNA 差异片段为探针进行 Northern 杂交, 发现其中 2 个片段与雄性不育有关。

2.2.2.3 线粒体基因翻译产物与雄性不育

蛋白质是基因表达的最终产物, 引起细胞质雄性不育的基因转录成 RNA 后要翻译成蛋白质才能发挥作用。在这一水平上进行研究的方法有: 采用 SDS-PAGE 方法分析不育系和可育系线粒体的离体翻译产物, 利用双向电泳或单向电泳分析线粒体编码的总蛋白 (Ford 等 1987); 利用特定抗体采用 Western blotting 方法研究线粒体基因编码蛋白的表达特点 (Wise 等 1987); 根据原位杂交的方法和组织化学的方法研究线粒体编码的蛋白质在植物不同组织中的表达情况 (Smart 等 1994)。

刘祚昌等 (1989) 采用线粒体体外蛋白的合成技术, 发现水稻 WA 型不育系线粒体基因外翻译产物比保持系和恢复系均多出一个 20KD 的多肽。随后, 刘祚昌等 (1994) 又发现水稻 BT 型不育系线粒体基因组体外翻译产物比保持系少一个 22KD 的多肽, 但其恢复系和 F₁ 中具有核编码的 22KD 的多肽, 它补偿了不育系细胞质中 22KD 多肽的缺失而使育性恢复, 因此, 他们将编码的 22KD 线粒体基因称为育性基因。不久, 赵世民 (1994) 在 D 型不育系也发现一个特异的 70.8KD 的多肽, 认为其与不育有关, 是不育基因的产物。据此, 赵世民等提出了水稻细胞质雄性不育及育性恢复的两种假说, 一种是 BT 型的缺陷型不育及补偿性恢复; 另一种是包括野败型, D 型在内的附加型不育和抑制型恢复, 并推测水稻 CMS 的机制可能是由于核质互作使某些调控基因启动或关闭, 因而合成了抑制酶活性的物质, 或不合成或仅合成少量花粉发育中某些酶或酶亚基, 使可育转为不育, 而恢复系核基因组的恢复基因则起了抑制作用。对此假说, 尚需更多的实验来验证。

王学德 (2000) 以哈克尼西棉细胞质不育系和保持系的花药及黄化苗为材料, 对线

粒体蛋白质进行了 SDS-PAGE 分析。蛋白质 SDS-PAGE 分析表明, 黄化苗线粒体蛋白质的电泳带型和带数在不育系、保持系、恢复系间无明显差异。但是, 在处于败育期的不育系花药线粒体内缺少一种约 31KD 的多肽, 这条带的缺失可能是不育系线粒体基因发生变异所致, 但也不排除不育系核基因的表达产物抑制了线粒体基因的正常表达的可能性。与保持系或恢复系比较, 不育系蛋白质的表达不在黄化苗中而在花药中显示出差异, 可能是育性基因只在花药中表达所致。恢复系的细胞质与不育系一样也是哈克尼西棉细胞质, 只因恢复系核内具有恢复基因才显示出的电泳带型与保持系相同, 均有 31KD 的带。由此推断, 恢复系线粒体内出现的 31KD 的蛋白质可能是核内恢复基因与核外线粒体基因互作的表达产物。

Forde 等 (1980; 1987) 用线粒体体外翻译方法发现 T-CMS 玉米不育系能合成特异的 13KD 的蛋白, 但当引入核恢复基因后, 这个 13KD 多肽的合成受到抑制。当 Dewey 等 (1986) 发现 *urf-13* 基因以后, Dewey 用人工合成的该基因寡聚多肽以及 Wise 等 (1987) 用 *urf-13* 导入大肠杆菌合成的蛋白制备抗体, 均证明该基因合成 13KD 的多肽。将 *urf-13* 转化烟草, 也在转化植株中检测到 13KD 蛋白的存在。

Hom 等 (1991; 1996) 发现在向日葵中与 CMS 有关的 *orf522* 基因编码 16KD 的多肽, 该基因的表达也有组织特异性, 产物主要集中在雄性小花中, 恢复基因可显著降低其表达量。

Song 和 Hedgcoth 等 (1994) 认为 T-CMS 小麦与 CMS 相关基因 *orf256* 表达可产生 7KD 的线粒体内膜蛋白, 而在普通小麦和可育杂种均未检测到该多肽的存在。He 等 (1996) 在研究大豆与 CMS 有关基因时发现 *orf239* 可编码 27KD 的蛋白, 且只存在于与生殖有关的组织中。另外, 在对高粱、胡萝卜以及虾蕒草线粒体体外翻译研究时均发现有特异多肽的合成, 其多肽分别为 42KD、17KD 和 18KD, 不过这些多肽与基因的关系不明确。

以上结果显示, 大多数材料不育系线粒体能合成一特异的多肽, 这些多肽有的已经证明是与 CMS 有关的基因编码的, 并主要集中在小孢子发生组织中, 而恢复基因的存在则可降低其表达。但是也有的不育系缺少一特异多肽的合成, 这表明不同材料其雄性不育机理可能不同。

高等植物细胞内三大遗传系统之间并不是孤立的, 存在着遗传物质的交换。已在线粒体基因组中发现了叶绿体基因片段和核基因片段; 在核基因组中也发现了叶绿体和线粒体基因片段。越来越多的研究发现, cpDNA 和 mtDNA 之间, cpDNA、mtDNA 与核基因之间存在明显的遗传渗透, 从而构成了叶绿体基因组、线粒体基因组与核基因组彼此之间存在 DNA 序列的同源性。因此, 不应忽略它们之间的相互关系。cpDNA 与 CMS

之间、cpDNA 和 mtDNA 之间是否存在一定的相互作用及这种相互作用是否对 CMS 有影响等问题都有待于进一步的深入研究。

苧麻作为最优良的纤维作物之一，在国民经济中占有重要地位，尤其是在我国加入 WTO 后，苧麻这一中国特色产业可望有更大发展。苧麻雄性不育杂种优势的利用正受到普遍重视，而且已有优势组合用于生产。苧麻雄性不育作为一种优良生物性状，虽对其开展过生理生态特性和遗传分析(刘飞虎等 2000a, b, c)，但其生化机理尚待进一步探讨。而要阐明这一现象，重要的是从有关基因组中克隆雄性不育相关基因。目前所掌握的苧麻雄性不育系绝大多数来自于地方品种的自然变异，它们还存在生长势弱、纤维产量低、配合力不高等问题(刘飞虎等 2002)，亟待培育更理想的不育系，才能使苧麻雄性不育杂种优势利用进入新的高度，而通过基因工程培育全新的不育系是今后的发展方向之一。

到目前为止，有关苧麻分子生物学方面的研究很少，分子生物学技术在苧麻上的应用刚有起步(揭雨成等 1999)，而苧麻雄性不育的分子基础研究国内外还未见报道。基于此，本研究采用苧麻[*Boehmeria nivea* (L.) Gaud]雄性不育系(A)、保持系(B)和恢复系(R)为材料，以线粒体 DNA 为中心，克隆雄性不育相关基因(片段)并分析其表达特点，为弄清苧麻雄性不育性的分子机理积累资料。同时，所克隆的不育系相关基因将为今后利用基因工程方法培育新的不育系和研究不育性发育机制奠定基础。

第二章 苧麻“三系”总 DNA 提取方法优化及 ISSR 分析

DNA 的提取, 是分子实验中的关键步骤之一。只有高质量的 DNA, 才可能为后续实验操作的成功提供保证。目前已报道的 DNA 提取与纯化方法很多(郭传友等 2004; 邱英雄等 2002; 姚庆荣等 2004; 乔玉山等 2004; 曾强成等 2004), 但由于各自的研究目的和选取的研究材料不同, 很难有一种通用的提取与纯化方法。苧麻组织中, 由于含有较高含量的酚类、粘状物(其成分还不太清楚, 可能是丹宁、果胶和多糖等)及黄酮类等次生代谢物质, DNA 的提取与纯化相对较为困难。本实验以 CTAB 法为基础, 根据苧麻自身材料的特殊性, 参照 SDS 法中利用高盐去除蛋白质和多糖的做法, 对苧麻 DNA 提取的 CTAB 法进行了优化, 改进重点在提取过程中的抗氧化和对多糖的去除。采用该优化方案所提取的 DNA 的纯度和浓度已能满足 PCR 的要求, 为后续研究奠定了必要基础。

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) 分子标记是在 SSR 标记基础上发展起来的一种新技术。其基本原理是在 SSR 引物的 5' 或 3' 端加锚 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基, 然后以此为引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的一段基因组 DNA 序列进行扩增。重复序列和锚定碱基是随机选择的。在基因组上只有那些与锚定的核苷酸匹配的位点才能被靶定, 因而避免了 SSR 在基因组上的滑动, 大大提高了 PCR 扩增的专一性。其优点是: ISSR 技术所用的 PCR 引物长度在 20 个核苷酸左右, 可以采用常规的 PCR 反应条件, 稳定性和多态性比 RAPD 好, 呈孟德尔式遗传, 具显性或共显性的特点, DNA 用量少、技术要求低、成本低廉、重复性好。利用 ISSR 技术检测植物线粒体 DNA 顺序在不育系和保持系之间的多态性, 并进一步讨论这一多态性的分子基础, 有助于揭示 CMS 的形成机制。

ISSR 标记在保留了 SSR 标记优点的同时, 有效地克服了 SSR 标记中引物设计困难的缺点。因此, ISSR 标记是一种快速、可靠、可以提供有关基因组丰富信息的 DNA 指纹技术。ISSR 标记呈孟德尔式遗传, 在多数物种中是显性的, 目前已广泛用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究中。

本研究以苧麻“三系”为材料, 探讨苧麻总 DNA 提取的可行方法, 获得高质量的总 DNA, 分析总 DNA 的 ISSR 标记差异, 为揭示苧麻雄性不育性的分子机理积累资料。

1. 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验材料为项目组在前期工作中培育的苧麻[(*Boehmeria nivea* (L.) Gaud)] “三系”材料: 不育系 GS14-1 (A), 保持系 13-X₂ (B) 和恢复系湘 5 (R), 取植株幼嫩叶片。

1.2 实验试剂及主要仪器

(1) 主要试剂

MgCl₂, 10×Buffer, Taq 酶购自上海生物工程公司, 为 Promega 产品; dNTPs, Tris-HCl, EDTA-Na₂, PVP, β-巯基乙醇购自杰辉生物技术有限公司, 为 Bebcos 分装产品; ISSR 引物由上海博亚公司合成; 其它试剂为国产分析纯。

(2) 主要仪器

Eppendorf 高速冷冻离心机, 北京六一仪器厂电泳槽, Bio-Rad 电泳仪, Eppendorf PCR 仪, WD-9403F 型紫外分析仪, UV-1600 型紫外分光光度计等。

1.3 引物序列

本研究共用 ISSR 单引物 38 个, 按 1-40 的顺序编号。所选用的引物是本实验室在过去的工作中经过筛选后认为是特异性较好的一些引物, 由上海生工工程公司合成。引物序列如下。

表 1 使用的 ISSR 引物

Tab. 1 ISSR primers used in this study

引物 Primer	序列 sequence	引物 Primer	序列 sequence
ISSR-1	5'-(GCT)(AGT)(GCT)(CA) ₆ -3'	ISSR-22	5'-(CT) ₈ T-3'
ISSR-2	5'-(AGC)(ACT)(AGC)(GT) ₇ -3'	ISSR-23	5'-(CT) ₈ (AG)G-3'
ISSR-3	5'-(AGT)(GCT)(AGT)(GA) ₇ -3'	ISSR-24	5'-(CT) ₈ (AG)C-3'
ISSR-4	5'-G(CA) ₄ C-3'	ISSR-25	5'-(AG) ₈ CG-3'
ISSR-5	5'-(CT) ₈ (AG)G-3'	ISSR-26	5'-(GA) ₈ (CT)G-3'
ISSR-6	5'-(CT) ₈ (AG)C-3'	ISSR-27	5'-(AT) ₈ C-3'
ISSR-7	5'-CCC(GT) ₆ -3'	ISSR-28	5'-(GT) ₈ (CT)C-3'
ISSR-8	5'-G(GC)G(GT) ₆ -3'	ISSR-29	5'-CGCC(GA) ₆ -3'
ISSR-10	5'-GC(AT)(GA) ₆ G-3'	ISSR-30	5'-(TG) ₈ (AG)G-3'
ISSR-11	5'-CCA(GAG) ₄ -3'	ISSR-31	5'-(CAG) ₅ -3'
ISSR-12	5'-GCG(AC) ₆ A-3'	ISSR-32	5'-CCA(GAG) ₄ -3'
ISSR-13	5'-(TAT) ₅ -3'	ISSR-33	5'-GGA(GTG) ₄ -3'
ISSR-14	5'-(GGC) ₅ -3'	ISSR-34	5'-CCA(GTG) ₄ -3'
ISSR-15	5'-(AGC) ₅ -3'	ISSR-35	5'-(GAA) ₅ -3'
ISSR-16	5'-(ACTG) ₄ -3'	ISSR-36	5'-GCGCATATG(GACA) ₃ GC-3'
ISSR-18	5'-(TGCA) ₄ -3'	ISSR-37	5'-(GGAT) ₅ -3'
ISSR-19	5'-(GGGGT) ₃ -3'	ISSR-38	5'-(GATA) ₄ -3'
ISSR-20	5'-(AT) ₈ T-3'	ISSR-39	5'-(GGGGT) ₃ -3'
ISSR-21	5'-(CA) ₈ (AG)T-3'	ISSR-40	5'-(GGAGA) ₃ -3'

1.4 实验方法

1.4.1 苎麻总 DNA 提取的 CTAB 法的优化

1.4.1.1 CTAB-0 法

苎麻总 DNA 的提取采用 CTAB 法(王关林等 2002), 按相应的操作说明进行(简称 CTAB-0)。

(1) 50ml 离心管中加入 10ml 2×CTAB 提取缓冲液(2g/100ml CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-Cl, pH8.0), 65℃ 预热。

(2) 取 1~2g 新鲜幼嫩叶片, 去除叶脉, 加入少许石英砂于液氮中迅速研磨成粉。将冻粉迅速转入提取缓冲液中, 尽快用细玻璃棒搅匀, 于 65℃ 保温 50min, 期间轻柔搅动 2~3 次。

(3) 取出离心管, 冷却至室温, 过滤, 取滤液。加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1), 轻缓颠倒混匀, 室温放置 10 min, 10000rpm/min 离心 10 min。

(4) 取上清液于另一离心管中, 加入 2/3 倍体积的异丙醇, 轻缓颠倒混匀, 使异丙醇与上清液充分混匀, 可见白色絮状 DNA, 室温放置 15min, 10000r/min 离心 10 min, 去上清液。此步骤中也可用带钩的小棒缠绕绞出。

(5) 用 2ml 70%的乙醇洗涤沉淀 2 次, 并转移至 1.5ml 离心管中, 室温下微干, 溶于 500~700 μ l TE 缓冲液中。加入终浓度为 50 μ g/ml 的 RNase A, 37℃ 保温 1 h, 期间轻缓颠倒混匀几次。

(6) 用等体积的氯仿/异戊醇(24: 1) 抽提 1~3 次。

(7) 上清液中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaCl (终浓度为 0.2~0.4 mol/L)、2 倍体积的无水乙醇, 放置 1h 左右, 12000 rpm /min 离心 10min, 取沉淀。

(8) 用 70%乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 自然干燥后溶于 50~100 μ l TE 中。

(9) 取少许 DNA, 1.0%的琼脂糖凝胶上样检测。并用紫外分光光度计进行 DNA 量的标定。DNA 浓度(μ g/ μ l) = $OD_{260} \times$ 稀释倍数 $\times 50/1000$ 。根据计算结果将 DNA 浓度稀释至 50 ng/ μ l 作为工作液, 其余 DNA 样品保存在 -20℃ 备用。

1.4.1.2 CTAB-1 法

在 CTAB-0 法的基础上, 参照 SDS 法中利用高盐去除蛋白质和多糖的做法, 于步骤(3) 之后, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24: 1) 和 1 ml 10%的 CTAB 及 4%的 NaCl, 10000 rpm/min 离心 10min。此步骤为利用高盐溶液去除多糖。

1.4.1.3 CTAB-2 法

在 CTAB-0 法的基础上, 为了减少 DNA 提取过程中的降解和变褐, 于提取缓冲液中加入终浓度为 6%的 PVP 和 4%的 β -巯基乙醇, 并且在液氮研磨过程中也加入少量的 10% PVP。

1.4.1.4 CTAB-3 法

在 CTAB-0 法的基础上, 总合 CTAB-1 和 CTAB-2 的操作。此种改进方法可提高 DNA 的纯度, 防止提取过程中苎麻材料变褐和降解, 但没有加入 RNase A。

1.4.1.5 CTAB-4 法

基本同 CTAB-3 法, 但在步骤 (8) 之后加入了 RNase A。

1.4.2 总 DNA 的 ISSR-PCR 扩增

(1) 反应体系

PCR 条件的优化和确定, 需要经过摸索。最终的每一个参数都是在其它条件不变而只改变其中的单一因素探求确定的。

PCR 扩增体系如下 (总体积为 20 μ l):

10 \times PCR 反应缓冲液	2.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 μ l
dNTPs (10 mM)	0.25 μ l
Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l)	0.25 μ l
引物 (2.5 μ M)	2.0 μ l
总 DNA (50 ng/ μ l)	1.0 μ l
ddH ₂ O	12.5 μ l
总体积	20.0 μ l

(2) 扩增程序

在 Eppendorf PCR 仪上进行扩增, 反应条件为:

94 $^{\circ}$ C 5 min	} 40 Cycles
94 $^{\circ}$ C 30 sec	
52 $^{\circ}$ C 45 sec	
72 $^{\circ}$ C 80 sec	
72 $^{\circ}$ C 10 min	

(3) 扩增产物的检测

取反应混合物 5 μ l, 上样缓冲液 (含 0.25% 的溴酚蓝, 0.25% 的二甲苯青 FF, 40% 的蔗糖水溶液) 3 μ l, 混匀, 点入含 0.5 μ g/ml 的 1.0% 的琼脂糖凝胶中, 1 \times TBE 缓冲液, DYC-33B 型电泳槽, 100V 电压下电泳 80min, 紫外分析仪下观察照相。

1.4.3 “三系”总 DNA 的 ISSR 结果的统计分析

用于比较分析的两个材料总 DNA 扩增带间的差异百分率 D 用下列公式计算 (Wang 等 1989):

$$D=d_{xy}/(N_x+N_y)$$

其中 d_{xy} 为 X 材料和 Y 材料间的 DNA 差异条带数。 N_x 、 N_y 分别为 X 材料和 Y 材料各自具有的 DNA 条带数。

2. 结果与分析

2.1 优化 CTAB 法提取苎麻 DNA 的效果

由于苎麻组织中富含酚类，酚类物质极易氧化且易与 DNA 结合，使 DNA 呈现褐色。苎麻组织在离体后，在研磨过程中无论速度多快，材料很容易变褐色；苎麻组织中又含有较多的纤维，研磨很困难，在提取过程中即使加入了提取缓冲液，但由于不含抗氧化剂，提取过程中仍会变褐。常用的 CTAB 法（CTAB-0 法）中没有加入抗氧化物质，所提取的 DNA 颜色为褐色，且 DNA 有拖尾，表明有部分降解（图 1-A）。CTAB-1 法中加入了高盐溶液去多糖，可降低多糖的含量；所提取的 DNA 模板浓度较高，虽有拖尾，但没有 CTAB-0 法提取时明显（图 1-B）。CTAB-0 法和 CTAB-1 法提取的 DNA 样品均为褐色。

本实验中所提取的 DNA 样品，没有添加抗氧化剂的均为褐色；添加抗氧化剂的均为清亮的白色。这表明苎麻组织 DNA 的提取过程中，防止酚类物质的氧化和与 DNA 结合是更值得改进的步骤。CTAB-2 法中在提取缓冲液里加入了抗氧化性物质，在整个提取 DNA 的过程中都不会有褐色出现，而且在用液氮研磨时，加入了少量的 PVP 抗氧化，所提取的 DNA 带型完整，无拖尾现象（图 1-C）。

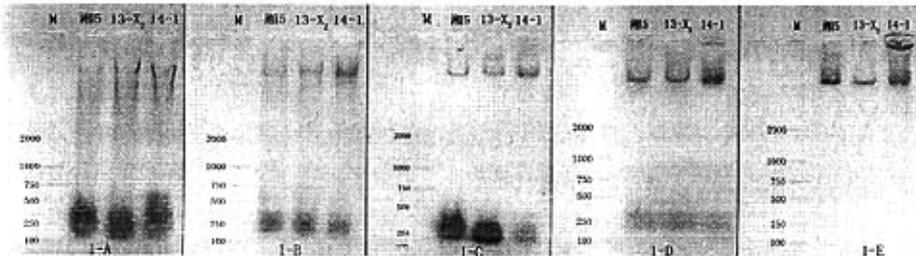


图 1 基于 CTAB 法提取的苎麻总 DNA。GS14-1 为不育系，13-X₂ 为保持系，湘 5 为对应的恢复系。图 1-A 为不加抗氧化剂和高盐溶液；图 1-B 为加入高盐溶液；图 1-C 为加入抗氧化剂；图 1-D 为加入抗氧化剂和高盐溶液但不加 RNase A；图 1-E 为加入抗氧化剂、高盐溶液和 RNase A。

Fig. 1 Genomic DNA patterns of *Boehmeria nivea* based on CTAB. GS14-1, 13-X₂ and SS370 are sterile line, maintainer line and restorer line, respectively. DNA for Fig. 1-A was extracted with typical CTAB protocol. DNA for Fig. 1-B was extracted with high concentration of salt solution added. DNA for Fig. 1-C was extracted with antioxidant added, while DNA for Fig. 1-D and Fig. 1-E was extracted with high concentration of salt solution and antioxidant added, but RNase A only added for Fig. 1-E.

多糖与 DNA 容易共沉淀，DNA 中混入多糖后，会抑制 PCR 反应中酶的活性，影响扩增效果。CTAB-3 法中，同时加入了抗氧化性物质和去多糖物质，液氮研磨过程中也加入了少量的 PVP，DNA 提取效果得到明显改善（图 1-D）。图 1-E 是在 CTAB-3 法基础上加入了 RNase A，提取的 DNA 质量进一步得到提高。从图 1-D 和图 1-E 可看出，多因子改进后提取 DNA 的效果明显比单因子更好，所提取的 DNA 带型整齐且无拖尾，DNA 带的亮度加深，表明 DNA 的得率相对较高，能满足后续实验的要求。

2.2 总 DNA 的 ISSR 扩增效果比较

我们先用两个引物 ISSR-25 和 ISSR-26（见表 1）对提取的 DNA 进行扩增，以检测不同方法提取到的苎麻总 DNA 的质量。

从图 2-A 可以看出，利用 CTAB-0 法提取的总 DNA 为模版，扩增出来的条带较少，且带型较为模糊。带型较为模糊可能是提取过程中 DNA 存在部分降解所致；而扩增条带较少的原因可能是酚类物质与 DNA 结合后，降低了模板的质量。图 2-B 为利用 CTAB-1 法提取的 DNA 的扩增结果。扩增出来的条带比 CTAB-0 法提取的 DNA 的条带相对要多，开始出现一些大片段。这是因为此方法加进了去多糖处理，避免了多糖与 DNA 共沉淀，提高了 DNA 的纯度。图 2-C 为利用 CTAB-2 法提取的 DNA 的扩增结果。由于整个提取过程中抗氧化剂的存在，DNA 降解较少，作为模板的 DNA 质量较高，扩增出来的条带相对图 2-B 要清晰些。图 2-D 使用的是 CTAB-4 法（CTAB-3 法加入 RNase A）提取的 DNA，其扩增结果明显优于前面几种，所得到的条带明显增多。前面几种方法区分不出的带在这种提取方法之下已能区分出来，这说明 DNA 模板的质量已显著提高。利用 CTAB-3 法所得 DNA 的扩增与结果几乎与图 2-D 相同（图略）。从本实验可以看出，对于苎麻总 DNA 的提取来说，使用 CTAB-3 法可以得到较高质量的 DNA，能满足 PCR 扩增的要求，RNA 的去除与否似乎不影响 PCR 扩增结果。

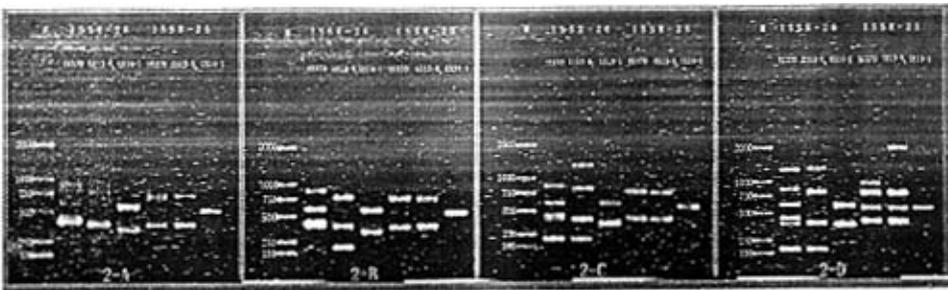


图 2 改良 CTAB 法提取苎麻总 DNA 的 ISSR 扩增。图 2-A、2-B、2-C、2-D 显示不同方式提取的 DNA 的扩增结果

Fig. 2 ISSR-PCR products of *Boehmeria nivea* DNA extracted with modified CTAB protocols. Figure 2-A, 2-B, 2-C, 2-D show the difference in ISSR-PCR products of template DNA extracted using different CTAB protocols.

2.3 “三系”总 DNA 的 ISSR 分析

2.3.1 ISSR 扩增结果

在上述引物中, ISSR-1、ISSR-11、ISSR-13、ISSR-18 等共 13 个引物没有扩增出产物, 占引物总量的 34.4%。其余引物都有扩增产物, 每个引物扩增出 1~6 条较明显的主带, 还有若干条不很明显的弱带, 扩增产物的大小大多在 250~2000 bp 之间, 个别产物的大小可达 3000 bp 以上。25 个引物在不育系、保持系和恢复系间共扩增出 177 条主带, 平均每个引物对单个材料扩增出 2.36 条带。其中有 6 个引物在不育系、保持系和恢复系间没有出现多态性片段, 占 24.0%; 出现差异片段的引物有 19 个。

2.3.2 三系总 DNA 的 ISSR 多态性

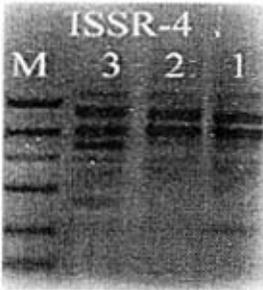


图 3 引物 ISSR-4 的扩增结果
Fig. 3 Pattern of amplification
with primer ISSR-4

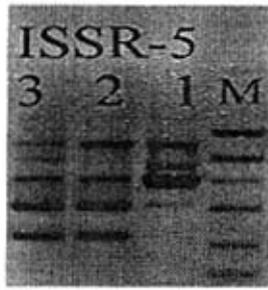


图 4 引物 ISSR-5 的扩增结果
Fig. 4 Pattern of amplification
with primer ISSR-5



图 5 引物 ISSR-12 的扩增结果
Fig. 5 Pattern of amplification
with primer ISSR-12



图 6 引物 ISSR-16 的扩增结果
Fig. 6 Pattern of amplification
with primer ISSR-16



图 7 引物 ISSR-21, 24 的扩增结果
Fig. 7 Pattern of amplification
with primer ISSR-21, 24



图 8 引物 ISSR-22, 23 的扩增结果
Fig. 8 Pattern of amplification
with primer ISSR-22, 23

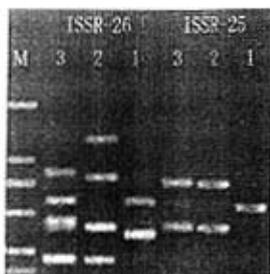


图9 引物ISSR-25, 26的扩增结果
Fig. 9 Pattern of amplification
with primer ISSR-25, 26



图10 引物ISSR-28, 29的扩增结果
Fig. 10 Pattern of amplification
with primer ISSR-28, 29



图11 引物ISSR-31, 32, 33的扩增结果
Fig. 11 Pattern of amplification
with primer ISSR-31,32,33



图12 引物ISSR-34, 36的扩增结果
Fig. 12 Pattern of amplification
with primer ISSR-34, 36

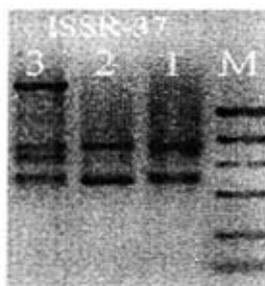


图13 引物ISSR-37的扩增结果
Fig. 13 Pattern of amplification
with primer ISSR-37

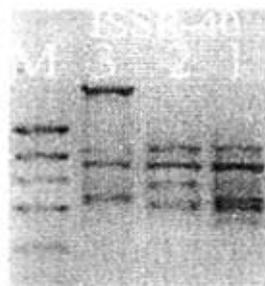


图14 引物ISSR-40的扩增结果
Fig. 14 Pattern of amplification
with primer ISSR-40

从以上引物扩增结果看，“三系”间的差异表现为两类。一类是质的差异，表现为带谱在某一系中有或无的差异；另一类是量的差异，即组织结构和拷贝数的差异，表现为某一位置的带在“三系”中都有，但扩增的带谱的亮度不一致，有的带谱很亮，而相应的带谱却很淡。如图中引物ISSR-5、ISSR-21、ISSR-23、ISSR-31、ISSR-32等显示的就属于第二类。

“三系”中质的差异有以下几种表现形式：

I 某两系中都有对应条带，另一系中缺少对应条带。

① 不育系不具有某条带，而对应的保持系和恢复系都有相应条带，如图中引物ISSR-5、ISSR-21、ISSR-23、ISSR-24、ISSR-36的扩增图谱所示。

② 保持系不具有某条带，而对应的不育系和恢复系都有相应条带，如图中引物ISSR-12、ISSR-22、ISSR-34、ISSR-40的扩增图谱所示。

③ 恢复系不具有某条带，而对应的不育系和保持系都在某位置有相应条带，如图中引物ISSR-36、ISSR-40的扩增图谱所示。

II 某一系中独有某条带，另两系中缺少该条带。

- ① 不育系中独有的条带。如引物ISSR-5、ISSR-23、ISSR-31扩增图谱所示。
- ② 保持系中独有的条带。如引物ISSR-33、ISSR-40扩增图谱所示。
- ③ 恢复系中独有的条带。如引物ISSR-4、ISSR-5、ISSR-37扩增图谱所示。

2.3.3 “三系”总 DNA 的 ISSR 差异带分析

对“三系”总 DNA 的扩增带按主带和总带分别统计差异条带数（统计数据略），然后再计算差异百分率。

总带数的差异中，不育系与保持系的差异率为 15.5%，恢复系和保持系的差异率为 18.9%；主带的差异中，不育系与保持系的差异率为 16.3%，恢复系和保持系的差异率为 19.8%。从以上数值可以看出，分析主带与分析总带得到的差异百分率结果基本相同，总带数和主带数的变化趋势基本一致。

2.3.4 “三系”总 DNA 的遗传差异

19 条引物产生的 ISSR 标记，经 POPGENE 软件对苎麻“三系”总 DNA 进行分析，根据遗传距离进行 UPGMA 聚类分析，从图中可以看出，苎麻“三系”间，保持系与不育系的遗传关系较近；与恢复系的遗传关系较远。

表 2 苎麻“三系”的遗传距离

Tab. 2 Genetic distance of CMS line, maintainer line and restorer line in *Boehmeria nivea*

pop ID	R	B	A
R	****	0.7059	0.6353
B	0.3483	****	0.7647
A	0.4537	0.2683	****

注：A, B, R 分别代表不育系、保持系和恢复系，下同。

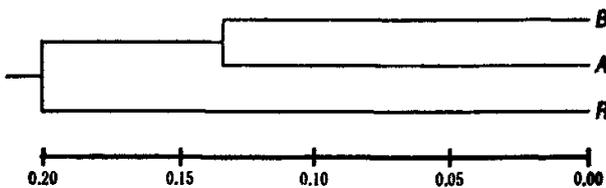


图 15 苎麻“三系”的遗传关系

Fig. 15 Genetic relationship of CMS line, maintainer line and restorer line in *Boehmeria nivea*

3. 讨论

苎麻组织中, 酚类、粘状物(其成分还不太清楚, 可能是丹宁、果胶和多糖等的复合物)及黄酮类等次生代谢物质的含量较多, 纤维含量也较高, DNA 的提取与纯化相当困难。由于组织中大量纤维的存在, 即使在液氮冷冻条件下研磨时仍然比一般植物要困难。研磨不充分时, 短碎纤维类物质会悬浮于液体中, 离心取沉淀时往往会带走部分沉淀, 影响 DNA 的得率。研磨很充分时, 细胞内裂解出的粘状物就很多。此时最好用至少 4 层纱布过滤, 以除去粘性物质, 否则沉淀中会混有许多粘性物质, 导致沉淀无法分开。提取步骤中第(2)步在添加提取缓冲液于 65℃保温之后进行下一步过滤时, 除了沉淀和需吸取的液体外, 最上面往往有一小层粘性如焦油类的物质, 需要小心去除, 否则会混入下一次沉淀。

研磨时尽量置于较低温度条件下, 同时添加少量具有稳定作用和抗氧化性的 PVP, 可避免苎麻组织变褐。通常提取的 DNA 颜色为褐色是由于 DNA 结合了酚类物质所致。提取缓冲液中加入了较高浓度的 PVP 和 β -巯基乙醇, 它们都是抗氧化剂。PVP 是酚类的络合物, 能与多酚形成一种不溶的络合物, 从而减少酚的污染; β -巯基乙醇的作用是与多酚物质竞争氧, 能有效地防止苎麻组织中的酚类物质被氧化成醌类(李宗菊等 2004)。减少了酚类物质的污染, 能够得到洁净的 DNA。多糖类的污染也是影响 DNA 纯度的主要因素。多糖常与 DNA 共沉淀, 形成胶状物。这些酸性多糖或改变 PCR 缓冲液的 pH 值或抑制 Taq 酶的活性, 从而影响 PCR 的扩增, 因此必须彻底去除。本实验中加入高盐溶液沉淀蛋白质并消除多糖污染, 获得了良好的效果。

ISSR 方法因其简便、灵活等优点, 受到较普遍的应用。但由于它受实验条件影响较大, 稳定性较差, 因此在实验中要严格控制反应条件并进行多次重复, 以得到稳定的结果。

在进行 ISSR 分析时, 分析主带得到的结果与分析总带得到的结果近似。这说明主带所反映出的信息已足够用于分析。主带通常重复性较好, 而弱带有时重复性较差且难以分辨, 因此, 当所分析的材料差异足够大并且扩增产物数目足够多时, 可以只分析主带, 从而减少工作量。以上的统计分析印证了这点。

从这些结果中可以看出, 苎麻“三系”总 DNA 之间确实存在 ISSR 多态性差异, 这些差异表现为质和量的差异。这种差异程度与所选用的引物有关, 且必须以恰当的引物才能反应出来。质的差异很可能是由于 DNA 的缺失而失去了引物结合的部位而造成的, 这种缺失可能与生长发育所必须的区段无关或者是可能发生在“无功能区”。但保持系有而不育系没有的质的差异很可能与苎麻的育性有关, 如引物 ISSR-33、ISSR-40 所示的差异带。量的差异可能是由于碱基的改变使引物的结合能力发生变化而造成的。这种碱基的改变可能发生在“功能区”也可能发生在“无功能区”(黄占景等 1997)。“功能区”的改变有可能是错义突变或无义突变; 也有可能是同义突变。只有在“功能区”

发生的错义突变或无义突变可能与苎麻的育性有关。对于上述质的或量的差异，究竟哪种可能与育性相关，还需做进一步研究。这方面的工作也在进行当中。

第三章 苧麻“三系”线粒体 DNA 的提取及 ISSR 分析

雄性不育在植物界广泛存在,植物雄性不育已作为防止自交的有效手段被广泛地用于作物的杂交育种中,在研究上也受到了极大的重视。高等植物细胞质雄性不育(CMS)基因对作物杂种优势利用有重要价值,也是研究细胞质基因多态性和核质互作分子生物学基础的良好材料。CMS 与细胞质基因组有关,因此人们将研究重点放在线粒体和叶绿体两种细胞器上。目前,已在玉米、矮牵牛、萝卜、油菜、向日葵和水稻等不育胞质的线粒体基因组上找到了可能与 CMS 有关的基因座位(Hanson 1991)。分子生物学的最新研究成果表明,叶绿体基因组(cpDNA)和线粒体基因组(mtDNA)及其表达产物与细胞质雄性不育有直接关系,其中更多的证据表明雄性不育的胞质因子主要在线粒体基因组上(李小明等 2000;仇艳光等 2001;Lonsdale 等 1987;Levings 等 1989;Kadowaki 等 1990;Yong 等 1993;许仁林 1995;梅启明等 1990)。

作为最优良纤维作物之一的苧麻,其雄性不育杂种优势利用正受到普遍重视,而苧麻雄性不育的分子基础研究还未见报道。

对植物胞质雄性不育材料进行分子生物学研究,首先要获得细胞质系统遗传物质 DNA(cpDNA 和 mtDNA),而提取 cpDNA 和 mtDNA 的传统方法都比较复杂,要经过破碎细胞、差速离心、梯度离心和盐沉淀等过程(顾红雅等 1995;Clark 等 1995),成本高,耗时长,对设备的要求也高。因此有必要探讨一种方便、快速、成本低和对设备要求不高的提取方法。有关 mtDNA 提取与纯化的报道很多(刘杰等 2004;王学德 2000;盖树鹏等 2000;陈学军等 2003),但由于各自的研究目的和选取的研究材料不同,很难有一种通用的提取与纯化方法。苧麻组织中,由于含有较高含量的酚类、粘状物及黄酮类等次生代谢物质,mtDNA 的提取与纯化相对较为困难。本文用蔗糖衬垫法(sucrose-mediated sedimentation, SMS)提取苧麻中 mtDNA,由于苧麻材料容易氧化变褐,所以提取过程中添加了抗氧化性物质,以求能得到较高纯度的 DNA。所提取的 mtDNA 经 ISSR-PCR 电泳扩增检测结果显示,苧麻“三系”的 mtDNA 之间存在差异。

本研究探讨苧麻 mtDNA 简便、有效的提取方法,比较苧麻“三系”mtDNA 的 ISSR 多态性,为揭示苧麻雄性不育性与 mtDNA 之间的关系积累资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

选用材料为苧麻[(*Boehmeria nivea* (L.) Gaud)]的雄性不育系 GS14-1 (A),对应的保持系 13-X₂ (B) 和恢复系湘 5 (R),取苧麻黄化苗叶片,用于提取线粒体 DNA。采用扦插繁殖方法培育幼苗,成苗后分栽,种植于云南大学植物改良与应用实验室育种基地(昆明)。于营养生长期对植株打顶,去除顶部的 3-5 片叶,套上 20cm × 30cm 的黑色

布袋, 20 天左右可采黄化苗。黄化苗用无菌水冲洗干净, 用无菌纸吸干水分, -70°C 下保存备用。

1.2 实验试剂及主要仪器

DNaseI 购自杰辉生物技术有限公司, 为 Bcbco 分装产品; 其余试剂同第二章 1.2。

1.3 试剂配制

缓冲液 A: 10 mmol/L Tris·Cl (pH7.5), 300 mmol/L 蔗糖, 4 mmol/L EDTA, 0.2% BSA, 0.05% 半胱氨酸, 6% 的 PVP, 4% 的 β -巯基乙醇。

缓冲液 B: 10 mmol/L Tris·Cl (pH7.5), 600 mmol/L 蔗糖; 6% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。

裂解液 L: 50 mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA, 0.2% SDS, 0.012% 蛋白酶 K。

其它试剂如平衡酚的配制等参考《分子克隆实验指南》(第三版)。

1.4 引物序列

同第二章 1.3。

1.5 方法

1.5.1 mtDNA 的提取与纯化

苎麻 mtDNA 用蔗糖衬垫法提取, 参考 Nunzia Scotti 等 (2001) 和陈学军等 (2003) 的方法, 略有改动。

(1) 取一定鲜重 (FW) 的黄化苗剪成 2-3cm 小段, 放入预冷研钵中, 然后加入 5 ml/g FW 的缓冲液 A, 冰水浴 (除特别说明外, 操作温度均为 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$) 中手工研磨 10-15min, 研磨过程中加入少许 10% 的 PVP。研磨液以 8 层纱布过滤, 滤液以 1000g 离心 10min。

(2) 取上清液, 以 17000g 离心 10min, 弃上清液, 加入 0.1 ml/g FW 的缓冲液 A, 用毛笔轻轻悬浮后以 1000g 离心 10min。

(3) 取上清液, 加入 DNaseI 和 Mg Cl_2 , 使两者的终浓度分别为 $10\mu\text{g/g FW}$ 和 10 mmol/L, 在 4°C 下反应 1h。再加入 EDTA 至 100 mmol/L, 以终止 DNaseI 反应。

(4) 利用蔗糖衬垫法纯化线粒体, 即在 (3) 中的离心管底缓缓加入 2 ml/g FW 的提取缓冲液 B, 再以 17000g 离心 10min。

(5) 弃上清, 加入 0.1 ml/g FW 缓冲液 A, 离心管底部再缓缓加入 0.2 ml/g FW 的缓冲液 B, 17000g 离心 15min。所得沉淀即为纯化的线粒体。

(6) 向纯化后的线粒体加入 0.1 ml/g FW 裂解液, 轻轻混匀沉淀, 再加入蛋白酶 K (10 mg/ml) 和 10% 的 SDS (用裂解液配), 使两者的最终浓度分别为 10 $\mu\text{g/g}$ FW 和 2%。线粒体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解 4h, 往裂解液中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇 (25: 24: 1), 轻轻混匀, 静置 5min。4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 11000g 离心 10min。吸出上清, 再用酚-氯仿-异戊醇抽提 1-2 次, 吸取上清液, 加入 1/10 体积的乙酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2h 或过夜。之后, 沉淀有 mtDNA 的离心管于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 11000g 离心 16min。回收 DNA 沉淀, 再用 70% 乙醇漂洗沉淀 1-2 次。沉淀以室温凉干, 溶于适当体积的 TE 缓冲液或无菌去离子水中待用, 低温保存。

1.5.2 溴化乙锭染色法检测模板 mtDNA 的浓度

其原理是: 嵌入 DNA 中的溴化乙锭分子受紫外线照射而产生荧光, 荧光的强度与 DNA 的总质量成正比, 通过比较样品与标准样品的荧光强度, 可检测 DNA 的浓度。对提取的 DNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 并排设置 20-200ng 未经酶解的 λ DNA, 比较样品 DNA 条带与 λ DNA 标准条带的亮度, 初步估测样品 DNA 的浓度。最后把 mtDNA 浓度调至 50 ng/ μL 待用。

1.5.3 “三系” mtDNA 的 ISSR-PCR 扩增

首先对 PCR 反应体系和扩增程序进行优化。PCR 条件的优化, 是在其它条件不变而逐渐改变其中单一因素以探求最佳的反应参数才最后确定。

(1) 反应体系

总体积为 20 μl , PCR 扩增体系如下:

10 \times PCR 反应缓冲液	2.0 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 μl
dNTPs (10 mM)	0.3 μl
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μl)	0.3 μl
引物 (2.5 μM)	2.0 μl
mtDNA (50 ng/ μl)	2.0 μl
ddH ₂ O	11.4 μl
总体积	20.0 μl

(2) 扩增程序

在 Eppendorf PCR 仪上进行扩增, 反应条件为:

94℃ 5 min
 94℃ 40 sec
 52℃ 50 sec } 40 Cycles
 72℃ 80 sec
 72℃ 10 min

(3) 扩增产物检测

取反应混合物 5μl, 上样缓冲液 (含 0.25% 的溴酚蓝, 0.25% 的二甲苯青 FF, 40% 的蔗糖水溶液) 3μl, 混匀, 点入 1.0% 的琼脂糖凝胶中, 1×TAE 缓冲液, DYC-33B 型电泳槽, 100V 电压下电泳 60min, 于紫外分析仪下观察照相, 并记录实验结果。

1.5.4 “三系”总 DNA 间 ISSR 结果的统计分析

同第二章 1.4.3。

1.5.4 “三系”总 DNA 间 ISSR 结果的统计分析

同第二章 1.4.3。

2 结果与分析

2.1 蔗糖衬垫法提取 mtDNA 的可行性

mtDNA 的提取方法中, 黄化苗培养和裂解、去蛋白为常规操作。线粒体和叶绿体可以利用其沉淀系数的较大差异, 通过差速离心而得以分离。提取方法的关键是要彻底除去细胞核 DNA 对线粒体的污染, 才能获得较纯的 mtDNA。由于苎麻组织中纤维含量较高, 往往要用较强烈的机械方法才能破碎细胞。当然, 在这过程中会打碎较多的细胞核, 释放出的细胞核会污染线粒体。针对这个问题, 通常采用手工研磨或用组织搅碎器以比较温和的匀浆强度研磨, 尽量减少细胞核的破碎。通过差速离心和蔗糖密度梯度离心, 把细胞核和线粒体分离开。在裂解线粒体前用较高浓度 (100 μg/mL) 的 DNaseI 处

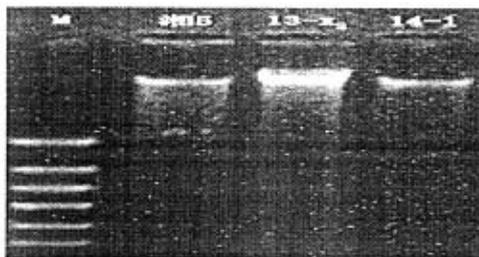


图1 蔗糖衬垫法提取的苎麻 mtDNA

Fig. 1 *Boehmeria nivea* mtDNA extracted using sucrose-mediated sedimentation

理, 除去线粒体外的核 DNA 的污染。另外, 组织破碎时也会引起叶绿体的破裂, 破碎叶绿体释放的 DNA 也可通过 DNaseI 去除。提取的 mtDNA 见图 1, M 为 DL2000。

用蔗糖衬垫法提取 mtDNA, 较之 CsCl 密度梯度离心或蔗糖密度梯度离心方法提取 mtDNA 而言, 用分步的离心步骤取代了密度梯度的较难操作过程, 省时省钱, 较为可取。实验证明, 以上 mtDNA 提取方法步骤简便, 结果稳定 (图 1)。用酚去蛋白, 省去了耗钱耗时的 CsCl 超速离心步骤, 大大缩短了试验周期。采用较温和的匀浆强度, 可以减少细胞核的破碎, 保证释放出的线粒体膜的完整性, 避免了在多次离心过程中线粒体的提前裂解, 抽提到的苜蓿 mtDNA 得率高, 纯度好, 能满足后继操作的要求。一般每 100 g 黄花苗可以得到 20~30 μg 的 mtDNA。

2.2 线粒体 DNA 的 ISSR 分析

2.2.1 ISSR 扩增结果

本研究共用单引物 38 个, 引物序列同第二章中的表 1。

在上述引物中, ISSR-3、ISSR-13、ISSR-18、ISSR-20、ISSR-27、ISSR-35、ISSR-38 共 7 个引物没有扩增出产物, 占引物总量的 18.4%。其余引物都有扩增产物, 每个引物扩增出 1~6 条较明显的主带, 还有若干条不很明显的弱带, 扩增产物的大小大多在 250~2000bp 之间, 个别产物的大小可达 3000bp 以上。31 个引物在不育系、保持系和恢复系间共扩增出 221 条主带, 平均每个引物对每个材料扩增出 2.46 条带。其中有 11 个引物在不育系、保持系和恢复系间没有出现多态性片段, 占 35.6%; 出现差异片段的引物有 20 个。

2.2.2 三系 mtDNA 的 ISSR 多态性



图 2 引物 ISSR-1, 2 的扩增结果
Fig. 2 Amplification patterns
using primer ISSR-1, 2



图 3 引物 ISSR-10, 11 进行的扩增结果
Fig. 3 Amplification patterns
using primer ISSR-10, 11



图 4 引物 ISSR-15 进行的扩增结果
Fig. 4 Amplification patterns
using primer ISSR-15



图 5 引物 ISSR-16 进行的扩增结果

Fig. 5 Amplification patterns

using primer ISSR-16



图 6 引物 ISSR-19 进行的扩增结果

Fig. 6 Amplification patterns

using primer ISSR-19



图 7 引物 ISSR-21, 22 进行的扩增结果

Fig. 7 Amplification patterns

using primer ISSR-21, 22



图 8 引物 ISSR-23, 24 进行的
扩增结果

Fig. 8 Amplification patterns

using primer ISSR-23, 24



图 9 引物 ISSR-25, 26 进行的
扩增结果

Fig. 9 Amplification patterns

using primer ISSR-25, 26



图 10 引物 ISSR-29, 30 进行的
扩增结果

Fig. 10 Amplification patterns

using primer ISSR-29, 30

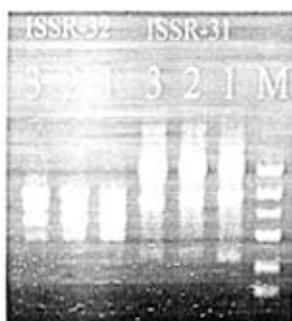


图 11 引物 ISSR-31, 32 进行的
扩增结果

Fig. 11 Amplification patterns

using primer ISSR-31, 32



图 12 引物 ISSR-33, 34 进行的
扩增结果

Fig. 12 Amplification patterns

using primer ISSR-33, 34



图 13 引物 ISSR-28, 37 进行的
扩增结果

Fig. 13 Amplification patterns

using primer ISSR-28, 37

从图中可以看出, 这些片段分为无差异类型和有差异类型。

无差异类型是指苎麻“三系”中都能产生相同的主扩增片段, 如图 13 中引物 28, 37 所示, 反映了线粒体 DNA 在进化上的保守性。

“三系”间的差异表现为两类, 一类是质的差异, 表现为带谱在某一系中有或无的差异; 另一类是量的差异, 即组织结构和拷贝数的差异, 表现为某一位置的带在三系中都有, 但扩增的带谱的亮度不一致, 有的带谱很亮, 而相应的带谱却很淡。如图中的 ISSR-21、ISSR-24 和 ISSR-25 等的扩增图谱所示。

“三系”中质的差异有以下几种表现形式:

I 某两系中都有对应条带, 另一系中缺少对应条带。

① 不育系不具有某条带, 而对应的保持系和恢复系都有相应条带, 如引物 ISSR-23、ISSR-25、ISSR-33、ISSR-34 的扩增图谱所示。

② 保持系不具有某条带, 而对应的不育系和恢复系都有相应条带, 如引物 ISSR-12、ISSR-15、ISSR-19、ISSR-22、ISSR-25 的扩增图谱所示。

③ 恢复系不具有某条带, 而对应的不育系和保持系都在某位置有相应条带, 如引物 ISSR-10、ISSR-16、ISSR-21、ISSR-23、ISSR-24、ISSR-29 的扩增图谱所示。

II 某一系中独有某条带, 另两系中缺少该条带。

① 不育系中独有的条带。如引物 ISSR-10、ISSR-26、ISSR-31 扩增图谱所示。

② 保持系中独有的条带。如引物 ISSR-2、ISSR-19、ISSR-26、ISSR-30、ISSR-33、ISSR-34 扩增图谱所示。

③ 恢复系中独有的条带。如引物 ISSR-26、ISSR-30 扩增图谱所示。

2.2.3 “三系” mtDNA 的 ISSR 差异带分析

对“三系”mtDNA 的扩增带按主带和总带分别统计差异带数(统计数据略), 然后再计算差异百分率。

总带数的差异中, 不育系与保持系的差异率为 17.1%, 恢复系和保持系的差异率为 21.3%; 主带的差异中, 不育系与保持系的差异率为 19.4%, 恢复系和保持系的差异率为 24.8%。从以上数值可以看出, 分析主带与分析总带得到的差异百分率结果基本相同, 总带数和主带数的变化趋势基本一致。

2.2.4 “三系”的 mtDNA 的遗传差异

20 条引物产生的 ISSR 标记, 经 POPGENE 软件对苎麻“三系”mtDNA 进行分析, 根据遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 从图中可以看出, 苎麻“三系”中, 不育系与保持系的遗传关系较近; 与恢复系的遗传关系较远。

表 1 苧麻“三系”的遗传距离

Tab. 1 Genetic distance of CMS line, maintainer line and restorer line in *Boehmeria nivea*

pop ID	R	B	A
R	****	0.6452	0.6129
B	0.4383	****	0.6667
A	0.4895	0.4055	****

注：A, B, R 分别代表不育系、保持系和恢复系。下同。

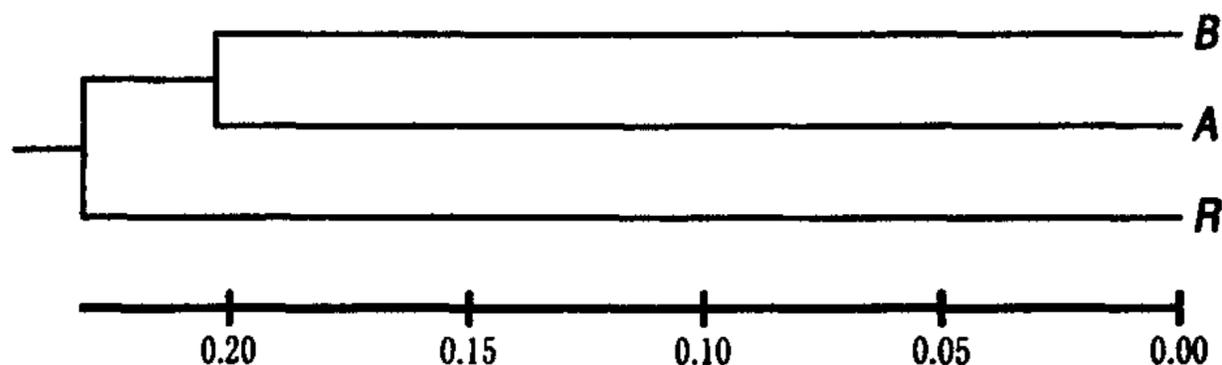


图 14 苧麻“三系”的聚类图

Fig. 14 Dendrogram of CMS line, maintainer line and restorer line in *Boehmeria nivea*

3 讨论

苧麻组织中酚类、粘状物及黄酮类等次生代谢物质的含量较多；纤维含量也较高，即使在液氮冷冻条件下研磨仍然较一般植物困难，耗时较长。这些因素使得提取过程中材料易于褐化，所得 DNA 往往呈现褐色，在用作 PCR 模板时难以获得满意的结果。为了防止褐化，常用的办法是在提取缓冲液中添加抗氧化剂。黄小英等（2001）在提取苧麻总 DNA 的过程中添加了 6% 的 PVP 和 2% 的 β-巯基乙醇，得到了较好的 DNA。李明芳（2003）在提取荔枝 DNA 的过程中，在 CTAB 提取液中加入 1% 的 PVP 和 2% β-巯基乙醇，所得基因组 DNA 为无色透明状，并认为，虽然 PVP 和 β-巯基乙醇单独作用效果不好，但如将两者结合起来使用，则能得到较好的结果。本实验在试剂配制时同时添加了适量的抗氧化性物质 PVP 和 β-巯基乙醇，而且在液氮研磨时添加少量具有稳定作用和抗氧化性的 PVP，可防止提取过程中材料氧化变褐。

很多人认为植物 CMS 是由线粒体 DNA 分子突变和重组产生新的功能区（嵌合基因）造成的（Levings 等 1988；Hanson 和 Folkerts 1992；Iwahashi 等 1993），那么，通过 ISSR 技术所揭示的不育系与保持系间的差异，就有可能与新的功能区（如育性相关基因）有关。“三系”mtDNA 之间的差异主要有两类。第一种差异表现为组织结构和拷贝数的差异，如 Kadowaki 等（1990）发现 BT 型水稻不育系、保持系线粒体 *atp6* 和 *cob* 基因 Southern 杂交带型有差异；李大东等（1990）发现 *atpA* 基因不育系和保持系拷贝数不同等。这些量的差异可能是由于碱基的改变使引物的结合能力或机会发生变化而造成

的,如碱基的错义突变、无义突变或同义突变等。第二种差异是有与无的关系,即某一片段不育系或保持系或恢复系仅有。如 Yamaguchi 等(1983)发现 BT 型水稻不育系特有、而保持系缺乏共价闭合分子 B1(1.5 kb)与 B2(1.2 kb)。质的差异很可能是由于 DNA 的缺失而失去了引物的结合部位而造成的,这种缺失可能与植物的生长发育所必须的区段无关或是发生在“无功能区”;也有可能和植物的雄性不育性有关。无论是质的差异还是量的差异,都反映了不育系和保持系在 mtDNA 水平上的差异。我们的实验结果属于第二种情况的较多。

本实验中出现了同一引物不同材料扩增条带相同的现象,说明了不同材料间 mtDNA 具有同源性。实验结果中还出现了同一位置都有的带有强弱的差异,可能反映了线粒体 DNA 序列与所用引物互补区段的多少及结合能力的强弱。凡是互补区段多,结合能力强的引物扩增产物的数量就多;反之,扩增产物的数量就少(赵存宝等 1998)。同时,用 ISSR 方法也找到了些不育系和保持系 mtDNA 组织结构上的差异,这表明在苎麻雄性不育系与保持系同核异质关系中,不同的细胞质来源的线粒体基因组也会形成一定程度的差异。

本实验中,用 ISSR 分析找到了苎麻“三系”间线粒体 DNA 的差异,理论上讲,这些差异都可能与 CMS 的发生有关。但面对这么多的差异,鉴定不育因子或其相关因子的工作仍是相当的困难,因为我们不可能对所有的差异片段逐条鉴定,这也是同类研究中遇到的共同难题(李传友等 1998)。由于线粒体存在于真核生物的所有细胞中,提供细胞内生命活动所需的大部分能量,同时又是 TCA 循环、氧化磷酸化及脂肪氧化的唯一部位。线粒体在遗传上有自主性,含有一套能自我复制、转录和翻译的基因组。但线粒体中的大部分蛋白质是由核基因编码的,只有约 10%的蛋白质是由线粒体基因编码。质-核关系的协调或亲和性对线粒体执行正常功能是必需的。因此,有关 CMS 的机理的研究,不应该只停留在不育系和保持系的同核异质关系的研究上,必须对研究材料加以改进。研究雄性不育关系时,应该以不育系、保持系和恢复系及杂种 F1 代(即相当于引进了恢复基因后的不育系)为研究对象,并应该特别注重不育系和杂种 F1 代 mtDNA 的差异(李传友等 1998)。这正是我们下一步工作要考虑的内容。

通过分析苎麻“三系”mtDNA 的扩增带型的差异和遗传距离,发现不育系与保持系扩增产物的差异小于保持系与恢复系的差异。比较不育系、保持系和恢复系的差异,是在 CMS 性状与不育基因间建立联系的初步工作。但是,这种差异是否也会表现在 mtDNA 的转录和翻译水平上,是否与核基因关联,有待进一步研究。

第四章 苧麻雄性不育相关基因 *atp6* 和 *atp9* 片段克隆

雄性不育在植物界广泛存在, 植物雄性不育在植物杂种优势的利用上有重要的价值。因为 CMS 与细胞质基因组有关, 所以人们将 CMS 机理研究重点放在线粒体和叶绿体两种细胞器上。但众多的实验证据指向了线粒体, 认为雄性不育的胞质因子主要在线粒体上, 而且胞质育性相关基因也存在于 mtDNA 上 (Hanson 等 1991)。因此, 通过线粒体基因组结构分析, 可以提供寻找 CMS 相关基因的线索。目前, 已经在玉米、矮牵牛、萝卜、油菜、向日葵和水稻等作物的不育胞质线粒体基因组上找到了可能与 CMS 有关的基因。

植物的各种生命活动是一个耗能过程, 三磷酸腺苷 (ATP) 是能量的贮存者和携带传递者, 是细胞各种物质合成和代谢活动的直接能源。ATP 本身是核酸合成的前体物质之一, 而其它几种核苷酸也只能从 ATP 中转化而来。ATP 合成酶是普遍存在于线粒体膜上的一种“外在”蛋白质, 可能对花粉细胞能量代谢和物质吸收、运输等生理现象起着重要作用。ATP 合成酶活性降低导致氧化磷酸化效率低, 从而降低细胞的能量形成 (朱英国等 2000)。ATP 合成酶由 F(0) 和 F(1) 两部分构成, F(0) 是酶蛋白的膜内区域, 具有质子跨膜传输功能, 共有 4 个不同的亚基: *orf25*、*orfB*、亚基 6 和亚基 9; F(1) 是酶蛋白的膜外区域, 具有催化 ATP 合成的功能, 包括 5 个亚基: *a*、*β*、*γ*、*d*、*e*, 它们一起共同配合, 完成 ATP 的生物合成。Dieterich 等 (2003) 认为, 可能是由于单个基因或多个基因产物干扰了线粒体 F(0)、F(1)-ATP 合成酶的功能或组装, 从而削弱和影响高耗能的花粉发育过程。

Kadowaki 和 Harada (1989) 用合成的线粒体基因探针 *Cox I*、*Cox II*、*atpA*、*atp6*、*atp9*、*cob* 对水稻 BT 型不育系 (A) 和保持系 (B) 的 mtDNA 进行 RFLP 分析, 发现 *atp6* 与 *cob* 基因在 A 和 B 的杂交带型不一致, *atp6* 和 *cob* 基因在不育系中存在两个拷贝, 而在保持系中只有一个拷贝。杨金水等 (1992; 1995) 采用酶切后分子杂交方法, 在水稻 BT 型不育系中发现有 2 个 *atp6* 基因拷贝, 保持系中只有 1 个, 这表明 *atp6* 基因很可能与水稻雄性不育性有关。在萝卜胞质雄性不育系中, *atp6* 基因编码区打乱, 并产生了新的编码区 (Makaroff 等 1989)。油菜中胞质雄性不育性也被认为与其线粒体 *atp6* 基因有关 (Landgren 等 1996)。这些都表明 *atp6* 基因与植物的雄性不育性有着密切的关系。杨金水和 Walbot (1995) 采用酶切后分子杂交方法, 在水稻野败型不育系中发现只有 1 个 *atp9* 拷贝, 而保持系中却有 2 个 *atp9* 拷贝, 这表明 *atp9* 基因很可能与水稻野败型不育性有关。已知有超过 150 个物种的 CMS 是由于线粒体基因异常编码从而阻止花粉发育, mRNA 在介导细胞信息从 DNA 编码的基因到功能蛋白质的传递过程中起关键作用 (Bentolila 等 2002)。Walbot (1991) 报道了在一个小麦的 CMS 品系中, *atp9* 的 RNA 编辑不完全并发生了偏离, 其中在 37 位密码子处, 一个 C→U 的改变, 产生了一

个终止密码子,截断了阅读框架,这种畸变的编辑产物可能妨碍了正常功能的进行,从而导致了 CMS,而当引入核恢复基因后,正常的编辑得到恢复,而使育性恢复正常。

苎麻的雄性不育杂种优势利用正受到普遍重视。分子生物学技术在苎麻上的应用刚有起步(揭雨成等 1999),而苎麻雄性不育的分子基础研究还未见报道。苎麻雄性不育作为一种优良生物性状,目前的研究还在其生理生态特性和遗传分析方面,而目前所掌握的苎麻雄性不育系绝大多数来自于地方品种的自然变异,它们还存在生长势弱、纤维产量低、配合力不高等问题(刘飞虎等 2002),亟待培育更理想的不育系,才能使苎麻雄性不育杂种优势利用进入新的高度,而通过基因工程培育全新的不育系是今后的研究方向之一。

我们的研究工作企望揭示苎麻线粒体基因 *atp6*、*atp9* 在“三系”中是否有差异并成为导致 CMS 的关键因子,或者探讨它们与苎麻雄性不育性之间的某些关系。本章通过在 Genbank 上比对一些双子叶植物的 *atp6*、*atp9* 基因而合成简并引物,首先钓取苎麻“三系”线粒体 *atp6*、*atp9* 基因的部分片段。下一章通过 DNA walking 扩增、克隆及测序等步骤,获得苎麻“三系”*atp6*、*atp9* 基因的完整序列并做深入分析。

第一部分 苎麻 *atp6* 基因片段的克隆

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为项目组在前期工作中培育的苎麻“三系”材料:不育系 GS14-1 (A),保持系 13-X₂ (B) 和恢复系湘 5 (R),选取培育的黄化苗的幼嫩叶片提取线粒体 DNA。

1.2 实验试剂及主要仪器

1.2.1 主要试剂

线粒体 DNA 提取试剂同第三章 1.2。

分子克隆试剂:胶回收试剂盒,购自捷瑞生物工程公司。克隆载体试剂盒购自 Promega 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2.2 主要仪器

Eppendorf 高速冷冻离心机, Eppendorf PCR 仪,北京六一仪器厂电泳槽, Bio-Rad 电泳仪, WD-9403F 型紫外分析仪, HZQ-C 空气浴振荡器, LRH-250-G 光照培养箱等。

1.3 方法

1.3.1 “三系” mtDNA 的提取

同第三章 1.5.1.

1.3.2 “三系” *atp6* 基因的克隆

1.3.2.1 质粒及菌种

克隆载体 pGEM-T Vector 试剂盒购自 Promega 公司; 大肠杆菌受体菌株 DH5a 由云南省农业科学院生物研究所的程在全研究员提供。

1.3.2.2 *atp6* 基因简并引物的设计及合成

由于苎麻雄性不育性的分子方面的研究很少, 没有现成的引物可用。本实验根据 Genbank 上已报道的一些双子叶植物的与雄性不育相关的 *atp6* 基因序列, 通过 PC/Gene 软件分析和依据 Primer 设计优化原则, 设计苎麻 *atp6* 基因的简并引物, 由上海生工生物工程公司合成, 简并引物序列如下。

P1: 5'-CC(CA)AATGC(TA)TGGCAATCCT-3'

P2: 5'-GAGCTTGT(GA)ATATAGCTACAC-3'

1.3.2.3 PCR 扩增

(1) 反应体系

总体积为 20 μ l, PCR 扩增体系如下:

10 \times PCR 反应缓冲液	2.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 μ l
DNTPs (10 mM)	0.4 μ l
Taq. DNA polymerase	0.4 μ l
P1 (25 μ M)	2.0 μ l
P2 (25 μ M)	2.0 μ l
mtDNA (50 ng/ μ l)	2.0 μ l
ddH ₂ O	9.2 μ l
总体积	20.0 μ l

(2) 扩增程序

在 Eppendorf PCR 仪上进行扩增, 反应条件为:

94°C 5 min
 94°C 40 sec
 52°C 50 sec
 72°C 80 sec
 72°C 10 min

} 40 Cycles

(3) 扩增产物的检测

用 1X 的 TBE 缓冲液配制 1% 的琼脂糖凝胶，微波炉融化以后在通风橱中自然降温，待温度降至 60°C 时，加入 1 μ l 的 EB 溶液，混匀，把胶倒在插好梳子的胶板上，冷却以后就可以用于检测 PCR 产物，一般 PCR 样品的上样体积为 8-10 μ l，电压 60-120 伏，直到溴酚蓝迁移到凝胶的末端。在紫外检测仪上观察 PCR 扩增结果，用数码相机拍照记录实验结果。

1.3.2.4 PCR 产物的回收与纯化

PCR 产物经电泳检测后，将含目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶块切下，用捷瑞生物工程公司的小量胶回收试剂盒（目录号：0326G06）进行纯化。图 1 中的 1, 2, 3 分别代表不育系、保持系和恢复系，M 为 DL2000。

(1) 将琼脂糖胶块称重后按每 100 mg 胶块 300 μ l 的比例加入溶液 A，于 65-70°C 水浴中 6-8 分钟融化所有的凝胶。

(2) 加入 15 μ l 溶液 B，混匀后静止 2 分钟，将混合液吸入有外套管的纯化柱内。

(3) 10000rpm 离心 15 秒，弃滤液。

(4) 加入 500 μ l 溶液 C 于纯化柱内，10000rpm 离心 15 秒，弃滤液。重复两次洗涤 DNA，10000rpm 离心 1 分钟去除所有的洗涤液。

(5) 将纯化柱置入一干净的 1.5 ml 离心管内，按 PCR 产物的浓度加入 20-30 μ l 的溶液 D 于纯化柱的吸附膜上，静止 2 分钟。

(6) 10000rpm 离心 1 分钟洗脱纯化柱内的 DNA。

(7) 纯化的 PCR 产物可直接进行连接、转化，或保存在 -20°C 备用。

1.3.2.5 感受态细胞的制备 (Joseph Sambrook 等 2003)

(1) 从 -70°C 保存的大肠杆菌 DH5a 菌株中挑取部分菌于 LB 平板上划线培养。

(2) 挑取单菌落于 100 ml LB 液体培养基中振摇 (37°C) 培养过夜。

(3) 取 1 ml 培养过夜的菌液加入 100 ml 液体 LB 培养基中，于摇床中以 37°C 300rpm 振荡活化 2-3 小时，至 OD₅₉₀ 值为 0.375。

(4) 分装于 10 ml 的离心管中，置于冰上 10 分钟。4°C，10000rpm，离心 10 分钟。

(5) 弃上清液, 用 2 ml 冰冷的 0.1 mol/L 的 CaCl_2 重悬沉淀, 冰浴 30 分钟。4℃, 10000rpm, 离心 5 分钟。

(6) 再用 2 ml 冰冷的 0.1 mol/L 的 CaCl_2 重悬沉淀, 冰上放置 30 分钟。4℃, 10000rpm, 离心 5 分钟。

(7) 去上清, 用 400 μl 冰冷的含 15% 甘油的 0.1 mol/L 的 CaCl_2 重悬, 按每管 100 μl 的量分装于预冷的 0.5 ml 灭菌离心管中, 置于 -70℃ 保存备用。

1.3.2.6 PCR 产物的连接与转化

(1) PCR 产物的连接

目的 DNA 片段的连接采用 Promega 公司的 pGEM-T 克隆载体试剂盒进行。

连接体系如下:

2X 快速连接缓冲液	5 μl
外源 DNA *	3 μl
pGEM-T 克隆载体	1 μl
T4 DNA 连接酶	1 μl

*外源 DNA 和载体的比例一般为 3: 1 或者更高。

以上配好的连接体系, 16℃ 连接过夜即可用于转化。

(2) 连接产物的转化

① 在 1.5 ml 灭菌管中, 将制备好的感受态细胞 (菌株: 大肠杆菌 DH5a) 100 μl 置于冰上, 再把 10 μl 连接产物吸入感受态细胞内轻旋混匀, 冰浴 30min。

② 42℃ 中热激 90 秒后 (不要摇动管) 快速放入冰中 1-5min。每管中加入 1 ml 液体 LB 培养基, 37℃ 300rpm 振荡活化 1 小时。

③ 3000rpm 离心 1 分钟, 无菌条件下倒去大部分的培养基后, 将菌体悬浮, 制备 LB 附加相应抗生素 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素) 的固体平板。取 100 μl 菌液与 4 μl 200 mg/ml 的 IPTG (异丙基硫代-B-D-半乳糖苷) 及 40 μl 20 mg/ml 的 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-B-D-半乳糖苷) 混匀。

④ 用无菌吸头将混合液移至 LB 平板上, 再用无菌三角头棒将菌液均匀涂满整个平板表面。

⑤ 平板于 37℃ 正向放置半小时左右, 待菌液被培养基吸收后倒置培养皿, 于 37℃ 培养 12-16 h (过夜)。挑选白色菌落进行扩增, 并进一步进行重组子鉴定。

1.3.2.7 小量质粒的快速抽提

(1) 从转化平板上随机挑取 5-10 个单克隆菌落 (同时挑取蓝色菌落做对照) 接种

到 5ml LB 培养基中(内含 100 $\mu\text{g/ml}$ 的氨苄青霉素),于 37°C 300 r/min 振荡过夜培养;

(2) 12000 rpm 离心 1min, 去上清, 收集菌体;

(3) 加入 0.3 ml 溶液 P₁ (50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L 的 Tris-Cl (pH8.0), 10 mmol/L 的 EDTA, 4 mg/ml 的溶菌酶), 剧烈振荡, 重新悬浮菌体;

(4) 加入 0.3 ml 溶液 P₂ (0.2 mol/L NaOH, 1% SDS), 轻轻摇匀(颠倒离心管 4~6 次), 于室温放置 5min;

(5) 加入 0.3 ml 4°C 预冷的溶液 P₃ (KAc 29.4 g, 冰醋酸 11.5 ml, 用蒸馏水定容至 100 ml), 轻轻摇匀(颠倒离心管 4~6 次), 冰浴 5min;

(6) 12000 rpm, 离心 10min, 吸取上清;

(7) 用 1 ml Buffer QBT 平衡 QIAGEN-tip20 纯化柱; 将前一步离心所得的上清加入纯化柱, 使液体在重力作用下流入柱中, 待柱的下端不再有液体滴出后, 用 1 ml Buffer QC 洗涤纯化柱 4 次, 每次洗涤时, 待上一次的 1 ml Buffer QC 完全流尽(柱下端不再有液体滴出), 再加入下一次的 1 ml Buffer QC;

(8) 将纯化柱置于一新的 1.5 ml 离心管上, 加入 0.8 ml Buffer QF, 收集流出的液体;

(9) 加入 0.56 ml 异丙醇, 摇匀后于 12,000 rpm, 室温离心 30min;

(10) 用 1 ml 70%乙醇洗涤沉淀, 在空气中干燥 5min, 溶于适当体积 TE 中。

1.3.2.8 重组克隆的筛选与鉴定

在含氨苄青霉素、IPTG 及 X-gal 的 LB 琼脂平板上依据菌落颜色进行重组克隆的初筛, 挑取平板上的白色克隆于含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中振荡培养过夜。重组克隆可通过质粒酶切验证或通过应用通用引物 PCR 反应扩增插入片段等多种方式鉴定目的基因是否插入到测序载体中。重组克隆可应用小量质粒快速抽提试剂盒提取质粒或将保存于 15% 的 LB 培养基中的菌体送测序公司进行测序。反应体系如下。

10× PCR 反应缓冲液	2.0 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.0 μl
dNTPs (25 μM)	0.3 μl
Taq DNA polymerase	0.3 μl
T7 (10 μM)	2.0 μl
SP6 (10 μM)	2.0 μl
重组质粒 DNA	1.0 μl
ddH ₂ O	11.4 μl
总体积	20.0 μl

PCR 扩增程序同本章 1.3.2.3②。

1.3.2.9 序列测定与序列分析

序列测定委托上海生工公司进行。DNA 序列采用生物学分析软件 DNAMAN5.2.2 和 BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行比较和分析。

2 结果与分析

2.1 简并引物扩增的苎麻 *atp6* 基因图谱

图中 1, 2, 3 分别代表不育种系、保持系和恢复系, M 为 DL2000。



图 1 简并引物扩增的苎麻 *atp6* 基因图谱

Fig.1 Amplification patterns of *atp6* in *Boehmeria nivea* using degenerated primers

2.2 “三系”重组质粒的 PCR 检测结果

利用通用引物 PCR 反应检测重组质粒。图 2~4 中的数字为自编的(重组)质粒样号, M 为 DL2000。图中不育系、保持系和恢复系 *atp6* 基因分别简称为 *atp6*-A、*atp6*-B、*atp6*-R。

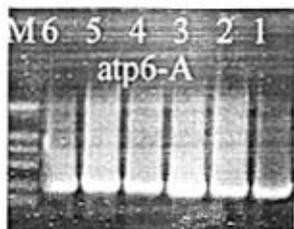


图 2 不育系扩增的 *atp6* 基因重组质粒 PCR 检测

Fig.2 Detection of recombinated plasmid of *atp6* in CMS line

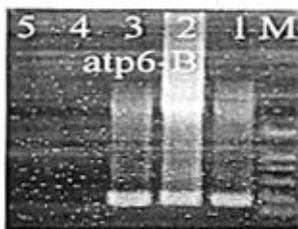


图 3 保持系扩增的 *atp6* 基因重组质粒 PCR 检测

Fig.3 The detection of recombinated plasmid of *atp6* in maintainer line



图 4 恢复系扩增的 *atp6* 基因重组质粒 PCR 检测

Fig.4 The detection of recombinated plasmid of *atp6* in restorer line

2.3 *atp6* 基因片段测序结果

2.3.1 不育系 *atp6* 基因片段测序结果 (下画线标示的是简并引物位置, 方框中標示的是用于 DNA walking 扩增的特异引物, 下同)

```
CCCACTGCCGTTAGCACCCCTTTTITAGTACTCCTTGAGCTAATTCCTTATTGTTTTCGC
GCATTAAGCTTAGGAATACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTTAGTAA
AGATTTTAAAGTGGGTTCGCTTGGACTATGTTATGTATGAATGAGATTTTGTATTTTAT
AGGAGATCTTGGTCCTTTATTTAITAGTTCTTGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGT
AGCTATATCACAAGCTC
```

2.3.2 保持系 *atp6* 基因片段测序结果

```
CCCACTGCCGTTAGCACCCCTTTTITAGTACTCCTTGAGCTAATTCCTTATTGTTTTCGC
GCATTAAGCTTAGGAATACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTTAGTAA
AGATTTTAAAGTGGGTTCGCTTGGACTATGTTATGTATGAATGAGATTTTGTATTTTAT
AGGAGATCTTGGTCCTTTATTTAITAGTTCTTGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGT
AGCTATATTACAAGCTC
```

2.3.3 恢复系 *atp6* 基因片段测序结果

```
CCCACTGCCGTTAGCACCCCTTTTITAGTACTCCTTGAGCTAATTCCTTATTGTTTTCGC
GCATTAAGCTTAGGAATACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTTAGTAA
AGATTTTAAAGTGGGTTCGCTTGGACTATGTTATGTATGAATGAGATTTTGTATTTTAT
AGGAGATCTTGGTCCTTTATTTAITAGTTCTTGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGT
AGCTATATTACAAGCTC
```

2.4 “三系” *atp6* 基因片段的序列比较

从图 5 中可以看出, 利用设计的简并引物克隆到的苎麻“三系”*atp6* 基因的部分片段中, 除了第 240 个位置的核苷酸序列有些不同外, 其如的序列完全一致。因此可以根据这些同源性较高的序列设计基因特异性引物, 用于下一步的 DNA walking 3' 和 5' 扩增。

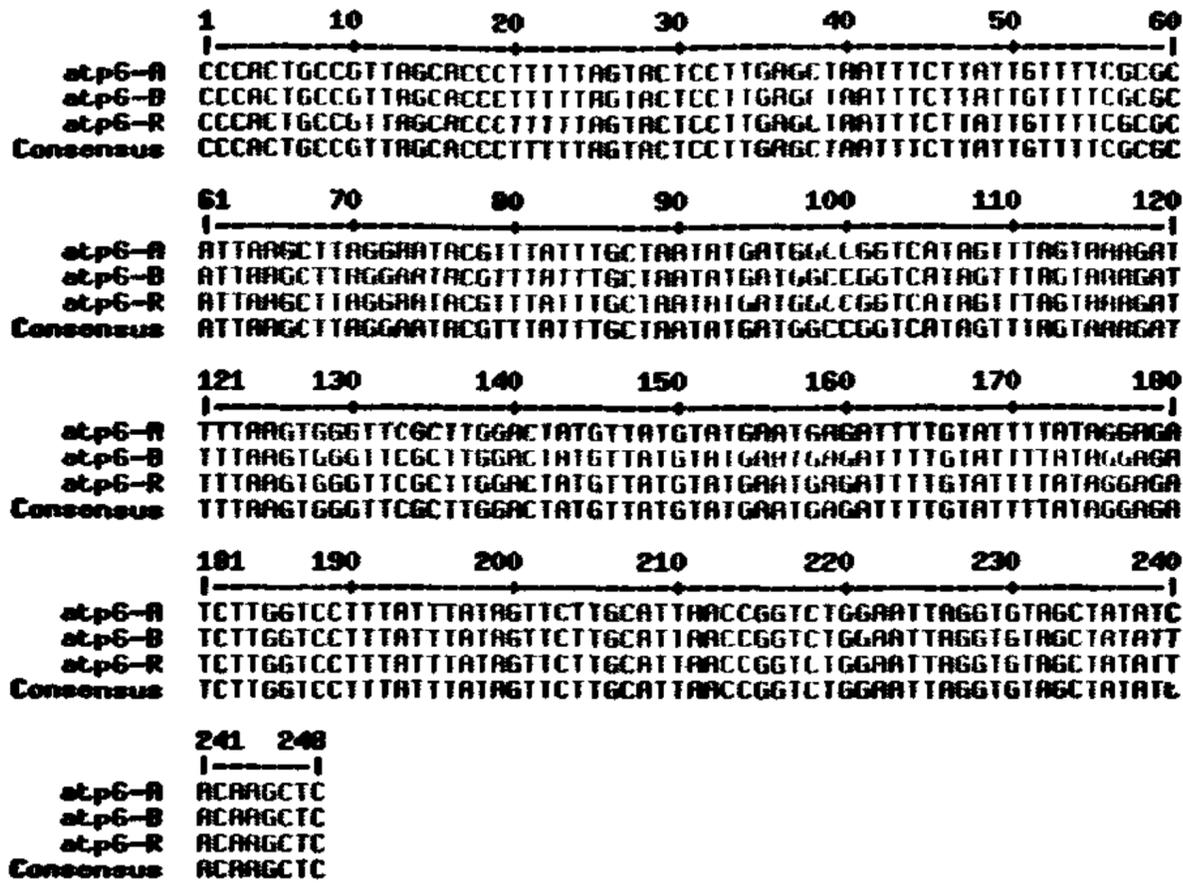


图 5 “三系” *atp6* 基因部分序列的比较

Fig.5 Sequence comparison of *atp6* gene among “three lines” in *Boehmeria nivea*

第二部分 苎麻 *atp9* 基因片段的克隆

1 材料与方法

1.1 实验材料

同本章第一部分中的 1.1.

1.2 实验试剂及主要仪器

同本章第一部分中的 1.2.

1.3 方法

1.3.1 “三系” mtDNA 的提取

同本章第一部分中的 1.3.1

1.3.2 “三系” *atp9* 基因的克隆

1.3.2.1 质粒及菌种

同本章第一部分中的 1.3.2.1.

1.3.2.2 *atp9* 基因简并引物的设计及合成

由于苎麻雄性不育性的分子方面的研究很少，没有现成的可用引物。本实验根据 Genbank 上已报道的一些双子叶植物的与雄性不育相关的 *atp9* 基因序列，通过 PC/Gene 软件分析和依据 Primer 设计优化原则，设计苎麻 *atp9* 基因的简并引物，由上海生工生物工程公司合成，简并引物序列如下。

P1: 5'-GCGCATGTTAGAAGGTGCA-3'

P2: 5'-GCAATAGC(TC)TCGGTTAGAGCA-3'

1.3.2.3 PCR 扩增

(1) 反应体系

同本章第一部分中 1.3.2.3 的①。

(2) 扩增程序

在 Eppendorf PCR 仪上进行扩增，反应条件为：

94℃ 5 min

94℃ 40 sec

54℃ 50 sec

72℃ 80 sec

72℃ 10 min

} 40 Cycles

(3) 扩增产物的检测

同本章第一部分中 1.3.2.3 的③。

1.3.2.4 PCR 产物的回收与纯化

同本章第一部分中的 1.3.2.4。

1.3.2.5 感受态细胞的制备

同本章第一部分中的 1.3.2.5。

1.3.2.6 PCR 产物的连接与转化

同本章第一部分中的 1.3.2.6。

1.3.2.7 小量质粒的快速抽提

同本章第一部分中的 1.3.2.7。

1.3.2.8 重组克隆的筛选与鉴定

反应体系和 PCR 扩增程序同本章第一部分中的 1.3.2.8。利用通用引物 PCR 反应检测重组质粒。

1.3.2.9 序列测定与序列分析

同本章第一部分中的 1.3.2.9。

2 结果与分析

2.1 简并引物扩增的苎麻 *atp9* 基因图谱

图中 1, 2, 3 分别代表不育种系、保持系和恢复系, M 为 DL2000。

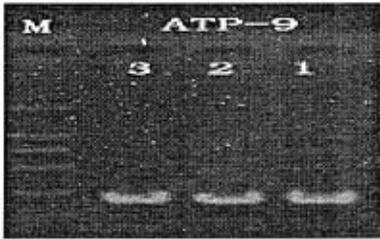


图 6 简并引物扩增的苎麻 *atp9* 基因图谱

Fig.6 Amplification patterns of *atp9* in *Boehmeria nivea* with degenerate primers

2.2 “三系”重组质粒的 PCR 检测结果

利用通用引物 PCR 反应检测重组质粒。图 7-9 中的数字为自编的(重组)质粒样号, M 为 DL2000。图中不育系、保持系和恢复系 *atp9* 基因分别简写为 *atp9*-A、*atp9*-B、*atp9*-R。

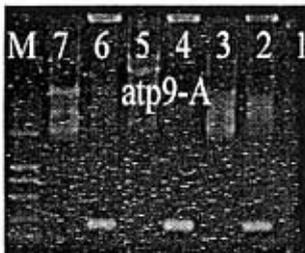


图 7 不育系扩增的 *atp9* 基因重组质粒 PCR 检测

Fig.7 Detection of recombined plasmid of *atp9* in CMS line



图 8 保持系扩增的 *atp9* 基因重组质粒 PCR 检测

Fig.8 The detection of recombined plasmid of *atp9* in maintainer line



图 9 恢复系扩增的 *atp9* 基因重组质粒 PCR 检测

Fig.9 The detection of recombined plasmid of *atp9* in restorer line

2.3 *atp9* 基因片段测序结果

2.3.1 不育系 *atp9* 基因片段测序结果（下划线标示的是简并引物位置，方框中標示的是用于 DNA walking 扩增的特异引物，下同）

GCGCATGTTAGAAGGTGCAAAATTAATGGGTGCCGGAGCTGCTACAATTGCTTCAGCG
 GGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTTTCAGTTCTTTGATCCATTCCGTGGCACGAA
 ATCCATCATTGGCTAAACAATCATTGGTTACGCCATCTTAGGATTGCTCT
AACCGAGGCTATTGC

2.3.2 保持系 *atp9* 基因片段测序结果

GCGCATGTTAGAAGGTGCAAAATTAATGGGTGCCGGAGCTGCTACAATTGCTTCAGCG
 GGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTTTCAGTTCTTTGATCCATTCCGTGGCACGAA
 ATCCATCATTGGCTAAACAATCATTGGTTACGCCATCTTAGGATTGCTCT
AACCGAAGCTATTGC

2.3.3 恢复系 *atp9* 基因片段测序结果

GCGCATGTTAGAAGGTGCAAAACTCATAGGTGCCGGAGCTGCAACTATAGCATTAGCT
 GGGGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTTTTAGTTTCATTAATTCAATCAGTAGCTCGAA
 ATCCGTCATTAGCAAAACAGTTGTTTGGTTACGCCATCTTAGGATTGCTCTAACCGAA
GCTATTGC

2.4 “三系” *atp9* 基因片段的测序结果比较

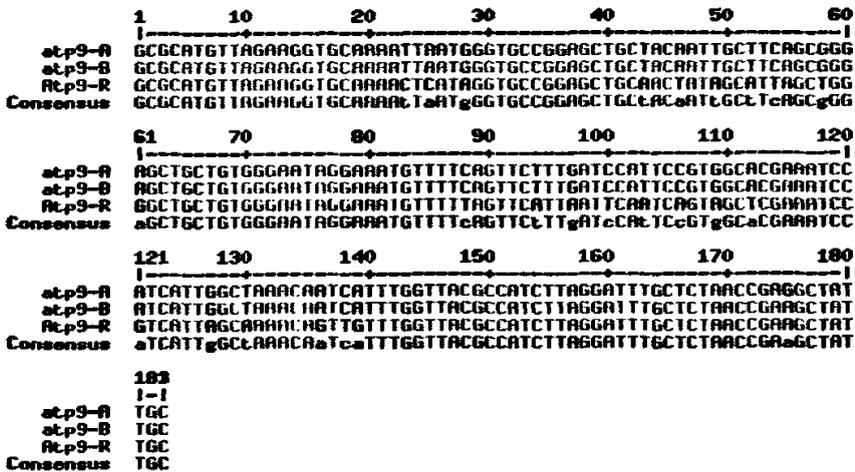


图 10 “三系” *atp9* 基因部分序列的比较

Fig. 10 Comparison of *atp9* gene among the “three lines” in *Boehmeria nivea*

从图 10 中可以看出, 利用设计的简并引物克隆到的苎麻“三系”*atp9* 基因的部分片段中, 核苷酸序列的同源性较高。我们所得到的苎麻“三系”有关 *atp9* 基因部分片段中, 不育系与保持系仅在 175 位有差异; 它们与恢复系的差异稍微大些。结合引物设计的原则, 我们选择同源性完全一致的区段第 61~87 和第 140~174 的位置设计基因特异性引物, 用于下一步的 DNA walking 3' 和 5' 扩增。

小结

苎麻雄性不育作为一种优良的生物性状, 虽对其开展过生理生态特性和遗传方面的分析 (刘飞虎等 2000a, b, c), 但苎麻雄性不育相关基因的克隆和表达研究国内外还没有见到报道; 利用分子生物学方法对苎麻雄性不育的研究也无报道。在有些植物如玉米、水稻、高粱、油菜、菜豆和矮牵牛等雄性不育材料 mtDNA 中克隆到了不育相关基因, 为植物雄性不育的分子机理研究积累了有价值的资料。随着相关研究的不断深入, 人们发现控制植物雄性不育性的某些线粒体基因在不同生物之间具有惊人的相似性。如菜豆、向日葵和水稻的 *atpA*, 高粱、玉米和矮牵牛的 *atp9* 以及油菜和水稻的 *atp6* 等等。基于不同物种间相同基因的类似性原理, 根据已知不育相关基因设计 (简并) 引物, 有望发现并克隆苎麻雄性不育相关基因。

陈军方等 (2005) 首先根据拟南芥中克隆出的雄性核不育基因 MS2 和水稻中假定雄性不育蛋白的保守区域, 设计一对简并引物, 对太谷不育小麦可育株花药进行扩增, 先得到了一条 134 bp 的片段, 以该片段为基础, 通过电子延伸方法得到一个长为 1604 bp 的序列, 经过对这个序列的验证, 最终证明这种研究技术路线是可行的。我们通过 Genbank 中序列比对结果设计简并引物用于扩增相关基因片段, 也是基于这种考虑。由于植物线粒体基因具有高度的同源性, 本章通过基于其它植物同类基因序列设计的简并引物扩增, 获得了 *atp6*、*atp9* 基因的部分序列, 并进行了“三系”同类序列的初步比较。

在下面两章, 拟利用 DNA walking 扩增出全长 *atp6*、*atp9* 基因, 进行有关的深入分析。

第五章 雄性不育相关基因 *atp6* 的全序列克隆与序列分析

胞质雄性不育性 (CMS) 在高等植物界普遍存在, 系细胞质基因与细胞核基因相互作用的结果, 由于线粒体功能紊乱导致花粉发育遭到破坏, 从而引起雄性不育 (凌杏元等 2000; He 等 1996; 季静等 1998)。线粒体的主要功能是为细胞产生能量, 其内膜上的 ATP 合成酶在能量产物的形成过程中起重要作用。有研究认为, 可能是由于某个基因或多个基因产物干扰了线粒体 F(0)、F(1)-ATPase 的功能或合成, 从而削弱和影响高耗能的花粉发育过程 (Dieterich 等 2003)。线粒体 *atp6* 基因编码着 F(0)、F(1)-ATP 合成酶的第 6 亚基, 而它本身又是由线粒体 DNA 编码的, 在线粒体基因组中与呼吸作用有关, 影响着能量代谢的基因, 被认为是与 CMS 相关的基因 (Kaleiku 等 1992; Kohler 等 1991; Landgren 等 1996; Makaroff 等 1989)。

本章选用苧麻雄性不育系、保持系和恢复系为材料, 以 mtDNA 为中心, 利用简并引物扩增所得的特异片段克隆测序后的结果设计特异引物, 用 DNA walking 方法扩增、克隆苧麻不育相关 *atp6* 基因全序列并分析其表达特点, 为弄清苧麻雄性不育性的分子机理积累资料。同时, 所克隆的不育系相关基因将为今后利用基因工程方法培育新的不育系和研究不育性发育机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

同第三章 1.1。

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的提取与纯化

同第三章 1.5.1。

1.2.2 特异引物设计

根据简并引物 P1、P2 扩增 DNA 片段的测序结果设计 *atp6* 基因 3' 和 5' 方向的基因特异性引物 Tsp1, Tsp2 和 Tsp3, 委托上海生工公司合成, 引物序列如下。

3' 方向特异引物:

Tsp1: 5'-GCCGGTCATAGTTTAGTAAAGA-3'

Tsp2: 5'-GGGTTCGCTTGGACTATGTTATGT-3'

Tsp3: 5'-TAGTTCCTTGCAATTAACCGGTCTG-3'

5' 方向特异引物:

Tsp1: 5'-CATACATAACATAGTCCAAGCGAAC-3'

Tsp2: 5'-CCTAAGCTTAATGCGCGAAAACA-3'

Tsp3: 5'-CTCAAGGAGTACTAAAAAGGGTGCT-3'

1.2.3 DNA walking 扩增原理

DNA walking 扩增的原理参见 DNA Walking *SpeedUp*TM Premix kit 说明书 (目录号: K1501), 其技术路线可以归纳为图 1. 分为 3' 和 5' 扩增。

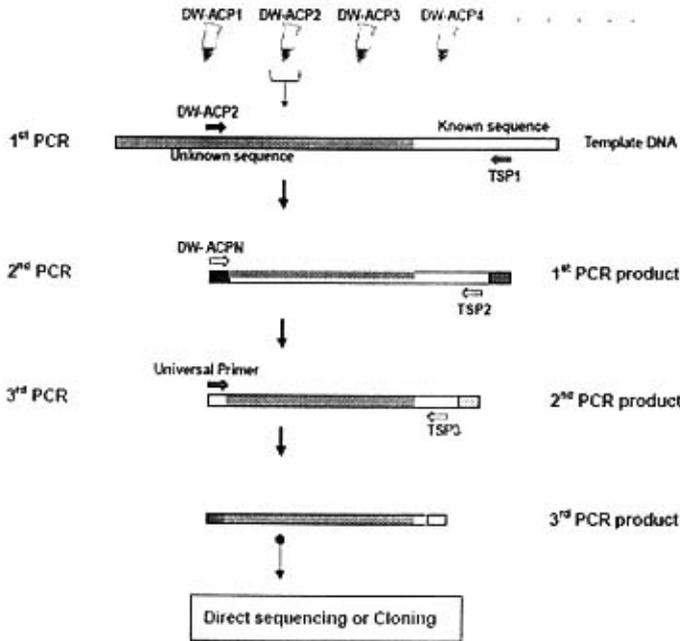


图 1 DNA walking 扩增原理

Fig. 1 The general strategy of DNA walking ACP™ PCR Technology

1.2.4 扩增 3' 端

(1) 不育系 3' 端扩增

以下各步的 PCR 反应在进行前均要把 PCR 仪预热到 94 ℃。3 次 PCR 扩增实验步骤如下。

A. 第一次 PCR 反应

第一次 PCR 反应分别在 4 支独立的管中进行, 引物为 Tsp1 分别与 DW-ACP 1, 2, 3, 4 组成的引物对。

PCR 扩增体系:

mtDNA	2.0 μ l
2.5 μ M DW-ACP	4.0 μ l
10 μ M Tsp1	1.0 μ l
ddH ₂ O	18.0 μ l
2x <i>SeeAmp</i> TM <i>ACP</i> TM <i>Master Mix II</i>	25.0 μ l
总体积	50.0 μ l

PCR 扩增条件: 为了增强 PCR 反应的特异性, 本实验采用了降落 PCR (Touch-down) 程序。

94 °C	5 min	
42 °C	1 min	
72 °C	2 min	
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
54 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
53 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
52 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
51 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	2 cycles
94 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	10 cycles
94 °C	30 sec	
49 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	8 cycles

94 °C	30	sec	
48 °C	30	sec	
72 °C	100	sec	6 cycles
72 °C	7	min	

使用 PCR 产物纯化试剂盒 (TIANGEN, 目录号: DP203/204) 对第一次的 PCR 扩增产物进行纯化, 以去除其中的 DW-ACP 和 Tsp1。利用纯化后的产物当模板做第二次 PCR 扩增。

B. 第二次 PCR 反应

PCR 扩增体系:

纯化后的第一次 PCR 产物	2.0 μ l
10 μ M DW-ACPN	1.0 μ l
10 μ M Tsp2	1.0 μ l
Dd H ₂ O	6.0 μ l
2xSeeAmp TM ACP TM Master Mix II	10.0 μ l
总体积	20.0 μ l

PCR 扩增条件: 为了增强 PCR 反应的特异性, 采用了降落 PCR (Touch-down) 程序。

94 °C	3	min
94 °C	30	sec
58 °C	30	sec
72 °C	100	sec
94 °C	30	sec
57 °C	30	sec
72 °C	100	sec
94 °C	30	sec
56 °C	30	sec
72 °C	100	sec
94 °C	30	sec
55 °C	30	sec
72 °C	100	sec
94 °C	30	sec

54 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
53 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	3 cycles
94 °C	30 sec	
52 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	12 cycles
94 °C	30 sec	
51 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	13 cycles
94 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	2 cycles
72 °C	7 min	

对第二次 PCR 产物取 8 μ L 于 1.0% 的琼脂糖中进行检测, 如有目的条带就进行第三次 PCR 反应。

C. 第三次 PCR 反应

PCR 扩增体系:

第二次 PCR 产物	2.0 μ l
10 μ M Unin-primer	1.0 μ l
10 μ M Tsp3	1.0 μ l
ddH ₂ O	6.0 μ l
2 \times SeeAmp TM ACP TM Master Mix II	10.0 μ l
总体积	20.0 μ l

PCR 扩增条件: 为了增强 PCR 反应的特异性, 同样采用了降落 PCR (Touch-down) 程序。

94 °C	3 min
94 °C	30 sec
58 °C	30 sec

72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
57 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
56 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
54 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
53 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	13 cycles
94 °C	30 sec	
52 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	12 cycles
94 °C	30 sec	
51 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	3 cycles
94 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	2 cycles
72 °C	7 min	

(2) 保持系 3' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4 中不育系 3' 端扩增。

(3) 恢复系 3' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4 中不育系 3' 端扩增。

1.2.5 扩增 5' 端

(1) 不育系 5' 端扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4。

(2) 保持系 5' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4。

(3) 恢复系 5' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4。

1.2.6 扩增产物的检测

用 1× 的 TAE 缓冲液配制 1% 的琼脂糖凝胶，微波炉融化以后在温度降至 60℃ 左右时，加入 3 μL 的 EB 溶液，混匀，把胶倒在插好梳子的胶板上，冷却后就可以用于检测 PCR 扩增产物，一般 PCR 样品的上样体积为 8-10 μL，电压为 100 伏，直到溴酚蓝迁移到凝胶的末端。用紫外检测仪观测 PCR 扩增结果，并用数码相机拍照记录实验结果（图 2~7）。图 2~7 中的 1, 2, 3, 4 分别对应 DNA walking 第一次扩增中的引物 DW-ACP1, 2, 3, 4; M 为 DL2000。

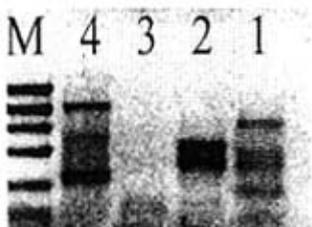


图 2 不育系 3'DNA walking 扩增图谱
Fig. 2 Patterns of 3' DNA walking
of CMS line

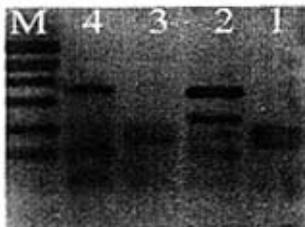


图 3 保持系 3'DNA walking 扩增图谱
Fig. 3 Patterns of 3' DNA walking
of maintainer line

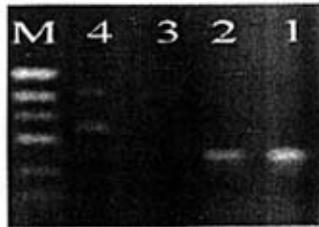


图 4 恢复系 3'DNA walking 扩增图谱
Fig. 4 Patterns of 3' DNA walking
of restorer line



图 5 不育系 5'端 DNA walking 扩增图谱
Fig. 5 Patterns of 5' DNA walking
of CMS line

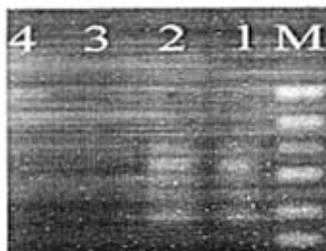


图 6 保持系 5'端 DNA walking 扩增图谱
Fig. 6 Patterns of 5' DNA walking
of maintainer line



图 7 恢复系 5'端 DNA walking 扩增图谱
Fig. 7 Patterns of 5' DNA walking
of restorer line

第三次的 PCR 产物可以直接用来测序，或克隆到合适的载体上测序。

3' DNA walking 扩增后，于琼脂糖凝胶中把目的条带切下，分别用 DNA 片段回收

和纯化试剂盒进行回收 (TIANGEN, 目录号: DP208/209)。

1.2.7 PCR 产物的回收与纯化

同第四章 1.3.2.4。

1.2.8 感受态细胞的制备

同第四章 1.3.2.5。

1.2.9 PCR 产物的连接与转化

同第四章 1.3.2.6。

1.2.10 小量质粒的快速抽提

同第四章 1.3.2.7。

1.2.11 重组质粒的筛选与鉴定

目的片段转化大肠杆菌后, 通过蓝白斑筛选、质粒 PCR、质粒酶切等方式来鉴定阳性克隆。

(1) 蓝白斑筛选

pGEM-T 载体上多克隆位点处含有 *lacZ* 基因, 可用 X-gal/IPTG 选择培养基初步筛选, 没有插入外源 DNA 片段的自身环化的质粒, 菌落为蓝色; 插入外源片段的重组质粒的转化子为白色菌落。

将转化后的大肠杆菌 DH5a 各取 100 μ l 涂布于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 经过夜培养均出现了蓝斑和白斑, 将蓝白斑平板放入 4°C 冰箱, 约 2 天后显色完全。随机挑取 8 个白斑分别接种到 5 ml 液体 LB 培养基中, 各加入 5 μ l 100 μ g/ml 氨苄青霉素, 37°C 摇菌, 过夜培养。次日, 取 2ml 培养好的大肠杆菌菌液, 从中提取重组质粒。

(2) PCR 检测

在 20 μ L 的 PCR 反应体系中, 以 0.2 μ L 的质粒 DNA 为模板, 以通用引物 T7、SP6 进行 PCR 反应检测重组质粒。反应体系如下。

10 \times PCR 反应缓冲液	2.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.0 μ l
dNTPs (25 μ M)	0.3 μ l
Taq DNA polymerase	0.3 μ l

T7 (10 μ M)	2.0 μ l
SP6 (10 μ M)	2.0 μ l
质粒 DNA	0.2 μ l
ddH ₂ O	12.2 μ l
总体积	20.0 μ l

PCR 扩增程序同第四章 1.3.2.3 (2)。

带有目的片段的重组子扩增出的条带应与 DNA walking 的第三次扩增所切下的条带一致。图 8 所示为不育系 3' 方向 DNA walking 扩增的目的条带，大小在约 0.56 kb 的位置。图中的数字 1~3 为自编的重组质粒样号，M 为 DL2000。

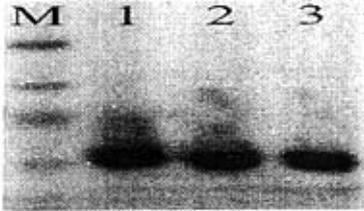


图 8 PCR 对不育系 3 个重组质粒的检测

Fig.8 PCR detection of plasmids as templates

(3) 酶切鉴定

对重组质粒用 *Pst* I 和 *Sac* II 双酶切，观察电泳中 DNA 条带位置以确定是否含有外源片段的插入以及插入片段的大小是否正确，从而初步判断是否为重组克隆。克隆载体 pGEM-T 约 3.0 kb，图 9 所示为不育系 3' 方向 DNA walking 扩增的目的条带，目的片段的大小约 0.56 kb。图中的数字 1~3 为自编的重组质粒样号，M 为 DL2000。双酶切体系如下。

10x buffer Tango TM	2.0 μ l
质粒 DNA	5.0 μ l
<i>Sac</i> II	1.0 μ l
<i>Pst</i> I	1.0 μ l
ddH ₂ O	11.0 μ l
总体积	20.0 μ l

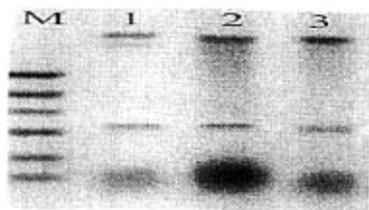


图 9 不育系重组质粒的酶切鉴定

Fig. 9 Restriction fragment identification for plasmid DNA of CMS line

每次随机挑取 8 个经鉴定为重组子的菌液送专业公司测序, 把几个质粒的测序结果进行比对。如果相同菌液测序结果出现有些地方步一致, 就要认真核对彩图对它们不一致的序列根据不同的峰值进行校正。

2 结果与分析

2.1 苎麻“三系”*atp6* 基因测序结果

2.1.1 不育系测序结果

2.1.1.1 不育系 3' 端 DNA walking 的测序结果 (下划线标示引物位置, 下同)

TAGTTCCTTGCAATTAACCGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTTT

Tsp3

TACGATCTTAATCTGTATTTACTTGAATGATGCTATAAAATCTCCATTAAAGTGGTTCT
TTATTTATAATTGAACAAAAGCACCTGTCAAATTAATAATAGTTAGTGTGCCGTGA
AAATCTCGAGATTGGTGCCCTTGAGTTTGCTAAGCAGTTCTGGGTTCAAGGTACTA
ACCTTTCTCCATTTCTGCTAAGGCGCTCCTTGCGGCTCAITCGTTAGTAGGCCTGT
GTCAGTTTGCAGACAAGTACAGTATTAGTCGAACTGCTACTTTGTTTTGTTTAGCTG
GCGCAGGATACCGTGTGAGAGCACGGCTCCAATCAAACACCTTTCTAGAAGGTG
GTTGCGAGTTGTGGCTCAACGGCCACCTGGGAAATCTCTACTACCTTTGGAGTGGT
GGATTGACAGAGGGAAACCGGGAAGATTGGTCCGTTCCGAGTGTAAAGCCTAAGGA
TTTACGGCTTGTACCGGACGACCCOCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

Uni-primer

2.1.1.2 不育系 5' 端 DNA walking 的测序结果

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTACTTCTGCTTATTTTGTAC

Uni-primer

TAAAAGGGAGGAACTTAGTTCCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTCTTT

ATTCTTTCGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGCCGAAAAGTGAAACAAA
 GTTTTCCCTTGCATCTTGTCACTTTTACTCTTTTGTATTTTGTAACTTCAGGGTAT
 GATACCTTATAGCTTCACAGTTACAAGTCATTTTATCATTACTTTGGGTCTCTCTTTT
 TCAATTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGACATGGGCCTTCATTTTTTAA
 GCTTTTTATTACCCGCTGGAGTCCCACTGCCGTTAGCACCCTTTTTAGTACTCCTTGAG

Tsp3

2.1.1.3 不育系序列拼接示意图

采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序对 3' 端 DNA walking、5' 端 DNA walking 与靶序列（简并引物扩增出的序列）拼接，序列拼接见图 10 所示。

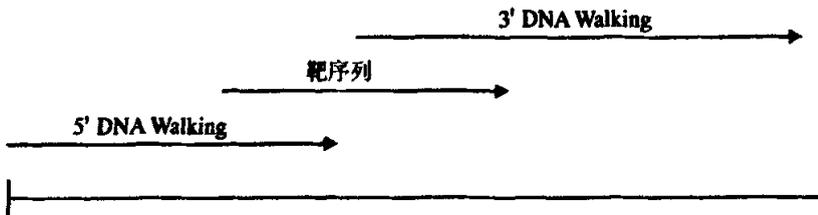


图 10 不育系 3'、5' 端 DNA walking 与靶序列拼接示意图

Fig. 10 Assembly of 3' and 5' DNA walking sequences with target sequence

2.1.1.4 不育系 *atp6* 基因的拼接结果（不育系 *atp6* 基因简称为 *atp6-A*，下同）

采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序进行拼接，方框示起始密码子和终止密码子。

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTACTTCTGCTTTATTTTGTAC
 TAAAAAGGGAGGAACTTAGTTCCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTCTTT
 ATTCTTTCGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGCCGAAAAGTGAAACAAA
 GTTTTCCCTTGCATCTTGTCACTTTTACTCTTTTGTATTTTGTAACTTCAGGGTAT
 GATACCTTATAGCTTCACAGTTACAAGTCATTTTATCATTACTTTGGGTCTCTCTTTT
 TCAATTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGACATGGGCCTTCATTTTTTAA
 GCTTTTTATTACCCGCTGGAGTCCCACTGCCGTTAGCACCCTTTTTAGTACTCCTTG
 AGCTAATTTCTTATTTGTTTTCGCGCATTAAAGCTTAGGAATACGTTTATTTGCTAATAT
 GATGGCCGGTCATAGTTTAGTAAAGATTTAAGTGGGTTTCGCTTGGACTATGTTATG
 TATGAATGAGATTTTGTATTTTATAGGAGATCTTGGTCCCTTATTTATAGTTCTTGCAT
 TAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTTTTACGATCTTAAT
 CTGTATTTACTTGAATGATGCTATAAATCTCCATTAAGTGGTTCCTTATTTATAATTG
 AACAAAAGCACCTGTCAAATTTAAATATAGTTAGTGTGCCGTGAAAATCTCGAGAT

TGGTGCCCTTGAGTTTGCTAAGCAGTTCTGGGTTCAAGGTAACCTTTCTCCCA
TTTCTGCTAAGGCGCTCCTTGCGGCTCATTGTTAGTAGGCCTGTGTCAGTTTGCA
GACAAGTACAGTATTAGTCGAACCTGCTACTTTGTTTTGTTTAGCTGGCGCAGGATA
CCGTGTGAGAGCACGGCTCCAATCAAAACACCTTTCTAGAAGGTGGTTGCGAGTT
GTGGCTCAACGGCCACCTGGGAAATCTCTACTACCTTTGGAGTGGTGGATTGACAG
AGGAAACCGGGAAGATTGGTCCGTTTCGCAGTGTAAGCCTAAGGATTTACGGCTT
GTACCGGACGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

2.1.2 保持系测序结果

2.1.2.1 保持系 3' 端 DNA walking 的测序结果

TAGTTCCTGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTTT

Tsp3

TACGATCTTAATCTGTATTTACTTGAATGATGCTATAAATCTCCATTAAGTGGTTCT
TTATTTATAATTGAACAAAAGCACCTGTCAAATTTAAATATAGTTAGTGTGCCGTGA
AAATCTCGAGATTGGTGCCCTTGAGTTTGCTAAGCAGTTCTGGGTTCAAGGTACTA
ACCTTCTOCCATTTCTGCTAAGGCGCTCCTTGCGGCTCATTGTTAGTAGGCCTGT
GTCAGTTTGCAGACAAGTACAGTATTAGTCGAACCTGCTACTTTGTTTTGTTTAGCTG
GCGCAGGATAACCGTGTGAGAGCACGGCTCCAATCAAAACACCTTTCTAGAAGGTG
GTTGCGAGTTGTGGCTCAACGGCCACCTGGGAAATCTCTACTACCTTTGGAGTGGT
GGATTGACAGAGGGAACCGGGAAGATTGGTCCGTTTCGCAGTGTAAGCCTAAGGA
TTTACGGCTTGTACCGGACGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

Uni-primer

2.1.2.2 保持系 5' 端 DNA walking 的测序结果

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGGTCCCCAGCCCACCTGAGCAATTT

Uni-primer

GAAATCTCCCATGATTCCTTTGAATATAGGAAACTTGTAATTTCTCATTCAAAATT
CATCTTTCTTTATGCTGTTCACTCTCAGTTTGGTCCCTACTTCTGCTTTATTTTGTACT
AAAAAGGGAGGAACTTAGTTCCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTCCTTA
TTCTTTCGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGCCGGAAGTGAACAAAAG
TTTTCCCTTGCATCTTGGTCACTTTTACTTTTTGTTATTTGTAATCTTCAGGGTAT
GATACCTTCTAGCTTCACAGTTACAAGTCAATTTIATCACTTTGGGTCTCTTTTT
TCAATTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTAA
GCTTTTTATTACCGCTGGAGTCCCACTGCCGTTAGCACCTTTTTTAGTACTCCTTGAG

Tsp3

2.1.2.3 保持系 *atp6* 基因的拼接结果 (保持系 *atp6* 基因简称为 *atp6*-B, 下同)

采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序进行拼接, 方框示起始密码子和终止密码子。

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCCCCAGCCCACTTGAGCAATTT
 GAAATTCCTCCATTGATTCCTTTGAATATAGGAAACTTGTATTTCTCATTACAAATT
 CATCTTTCTTTATGCTGTTCACTCTCAGTTTGGTCCTACTTCTGCTTTATTTTGTACT
 AAAAAGGGAGGAAACTTAGTTCCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTCCTTA
 TTCTTTTCGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGCCGGAAAAGTGAAACAAAAG
 TTTTCCCTTGCATCTTGGTCACTTTTACTTTTTTGTATTGTAATCTTCAGGGTAT
 GATACCTTCTAGCTTCACAGTTACAAGTCATTTTATCATTACTTTGGGTCTCTCTTTT
 TCAATTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTAA
 GCTTTTTIATTAACCGCTGGAGTCCCACTGCGGTAGCACCTTTTTIAGTACTCCTTG
 AGCTAATTTCTTATTGTTTTCGCGCATTAAAGCTTAGGAATACGTTTATTTGCTAATAT
 GATGGCCGGTCATAGTTTAGTAAAGATTTAAGTGGGTTTCGCTTGGACTATGTTATG
 TATGAATGAGATTTGTATTTTATAGGAGATCTTGGTCCTTTATTTATAGTTCTTGCAT
 TAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTTTTACGATCTTAAT
 CTGTATTTACTTGAATGATGCTATAAATCTCCATTAAGTGGTTCTTTATTTATAATTG
 AACAAAAGCACCTGTCAAATTAATAATAGTTAGTGTGCCGTGAAAATCTCGAGAT
 TGGTGCCCTTGAGTTTGCTAAGCAGTTCTGGGTTCAAGGTAACCTTTCTCCCA
 TTTCTGCTAAGGCGCTCCTTGGCGCTCATTCGTTAGTAGGCCTGTGTCAGTTTGCA
 GACAAGTACAGTATTAGTCGAAGTCTACTTTGTTTTGTTTAGCTGGCGCAGGATA
 CCGTGTGAGAGCACGGCTCCAATCAAACACCTTTCTAGAAGGTGGTTGCGAGTT
 GTGGCTCAACGGCCACCTGGGAAATCTCTACTACCTTTGGAGTGGTGGATTGACAG
 AGGGAAACCGGAAGATTGGTCCGTTTCGAGTGTAAGCCTAAGGATTTACGGCTT
 GTACCGGACGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

2.1.3 恢复系测序结果

2.1.3.1 恢复系 3' 端 DNA walking 的测序结果

TAGTTCTTGCATTAACCGGCTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTCT

Tsp3

TACGATCTCCATTAAGTGGTTCTTTATTTATAATTGAACAAAAGCACCTGTCAAAT
 TAAAATATAGTTAGTGTGCCGCGAAAATCTCGAGATTGGTGCCTTGAGTTTGCTA
 AGCAGTTCTGGGTTCAAGGTAACCTTTCTCCATTTCTGCTAAGGCGCTCCTT
 GCGGCTCATTCGTTAGTAGGCCTGTGTCAGTTTGCAGACAAGTACAGTATTAGTCG

AACTGCTACTTTGTTTTGTTTAGCTGGCGCAGGATACCGTGTGAGAGCACGGCTCC
AATCAAAACACCTTTCTAGAAGGTGGTTGCGAGTTGTGGCTCAACGGCCACCTGG
GGAATCTCTACTACCTTTGGAGTGGTGGATTGACAGAGGGAAACCGGGAAGATTG
GTCCGTTTCGACGTGTAAGCCTAAGGATTACGGCTTGTACCGGACGACCTGGCTTT
CGAGGGTGAAAGGGCAATGTTTGAATACACTTTGTATCATAATTGGTTGCAGTTATG
GTTAAAGTGGCTTTATTGGTATTGCTCGGTTCGCTCTTGGACCCCCCCCCCTCGCTTG
GCATACTTCTGTGA

Uni-primer

2.1.3.2 恢复系 5' 端 DNA walking 的测序结果

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCCCCAGCCCACTTGAGCAATTTGA

Uni-primer

AATTCTCCCATTTGATTCCTTTGAATATAGGAACTTGTATTTCTCAITCACAAATTCA
TCTTTCTTTATGCTGTTCACTCTCAGTTTGGTCCTACTTCTGCTTTAATTTGTIACIA
AAAAGGGAGGAAACTTAGTTCCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTCTTTAT
TCTTTTCGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGCCGAAAAGTGAAACAAAAGT
TTTTCCCTTGCATCTTGGTCACTTTTACTTTTTTGTIATTTTGTAAATCTCAGGGTATG
ATACCTTATAGCTTCACAGTTACAAGTCATTTTATCATTACTTTGGGTCTCTCTTTTT
CAATTTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTAAG
CTTTTTATTACCCGCTGGAGTCCCACTGCCGTTAGCACCCCTTTTTAGTACTCCTTGAG

Tsp3

2.1.3.3 恢复系 *atp6* 基因的拼接结果 (恢复系 *atp6* 基因简称为 *atp6-R*, 下同)

同样采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序进行拼接, 方框示起始密码子和终止密码子。

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCCCCAGCCCACTTGAGCAATTTGA
AATTCTCCCATTTGATTCCTTTGAATATAGGAACTTGTATTTCTCAITCACAAATTCA
TCTTTCTTTATGCTGTTCACTCTCAGTTTGGTCCTACTTCTGCTTTAATTTGTIACIA
AAAAGGGAGGAAACTTAGTTCCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTCTTTAT
TCTTTTCGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGCCGAAAAGTGAAACAAAAGT
TTTTCCCTTGCATCTTGGTCACTTTTACTTTTTTGTIATTTTGTAAATCTCAGGGTATG
ATACCTTATAGCTTCACAGTTACAAGTCATTTTATCATTACTTTGGGTCTCTCTTTTT
CAATTTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGACATGGGCTTCATTTTTTAAG
CTTTTTATTACCCGCTGGAGTCCCACTGCCGTTAGCACCCCTTTTTAGTACTCCTTGA

GCTAATTTCTTATTGTTTTTCGCGCATTAAGCTTAGGAATACGTTTTATTTGCTAATATGA
 TGGCCGGTCATAGTTTAGTAAAGATTTAAAGTGGGTTTCGCTTGGACTATGTTATGTA
 TGAATGAGATTTTGTATTTTATAGGAGATCTTGGTCCTTTATTTATAGTTCTTGCATTA
 ACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCTTATGTTCTTACGATCTCCATTA
 AAGTGGTTCTTTATTTAIAATTGAACAAAAGCAOCTGTCAAATTTAAAATATAGTTAG
 TGTGCCGCGAAAATCTCGAGATTTGGTGCCCTTGAGTTTGCTAAGCAGTTCTGGGTT
 CAAGGTAATAACCTTTCTCCCATTTCTGCTAAGGGCGCTCCTTTCGGGCTCATTTCGTTA
 GTAGGCCTGTGTACAGTTTGCAGACAAGTACAGTATTAGTCGAAGTCTACTTTGTT
 TTGTTTAGCTGGCGCAGGATAACCGTGTGAGAGCACGGCTCCAATCAAAACACCTTT
 CTAGAAGGTGGTTGCGAGTTGTGGCTCAACGGCCACCTGGGGAATCTCTACTACCT
 TTGGAGTGGTGGATTGACAGAGGGAAACCGGGAAGATTGGTCCGTTTCGCAGTGTA
 AGCCTAAGGATTTACGGCTTGTACCGGACGACCTGGCTTTCGAGGGTGAAAGGGC
 AATGTTTGAATACACTTTGTATCATAATTGGTTGCAGTTATGGTTAAAGTGGCTTTAT
 TGGTATTGCTCGGTTCGCTTTGGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

2.2 苎麻不育系 *atp6-A* 基因与其他植物 *atp6* 基因比较分析

根据 Genbank 上已报道的其它一些双子叶植物与雄性不育相关基因, 我们对所克隆的苎麻“三系” *atp6* 基因的开放阅读框以及它们所推导的氨基酸等相关方面进行了比较分析。

2.2.1 苎麻不育系 *atp6-A* 基因及其推测的氨基酸序列

1	ATGATACCTTATAGCTTCACAGTTACAACTCATTITATCATTACTTTCGGTCTCTCTTTT
1	M I P Y S F T V T S H F I I T L C L S F
31	TCAATTTTATTCGCATTACTATACTCCGATTTCAAAGACATCCGCTTCATTTTTTAAAC
21	S I F I C I T I V C F Q R K C L H F L S
121	TTTTTATTACCGCTCGAGTCCCACTCCCGTTAGCACCCCTTTTACTACTCCCTTCAGCTA
41	F L L P A C V P L P L A P F L V I L E L
101	ATTCTTATTCGTTTCGGCCATTAACTTAGCAATACGTTTATTTCGCTAATATCATGCCC
51	I S Y C F R A L S L C I R L F A N N M A
241	GGTCATAGTTTACTAAGATTTTAAGTCCGTTCCCTTCGACTATCTTATCTATGAAATGAC
81	C H S L V K I L S C F A W T N L C N H R
301	ATTTTGTATTTTATAGCAGATCTTCCCTCTTTTATTTATACCTCTGCATTAAACCCCTCTC
101	I L Y F I G D L C P L F I V L A L T C L
361	GAATTAGCTTACCTATATTACAGCTTATGTTTTTACCATCTTAACTCTGATTTACTTC
121	E L C V A I L Q A Y V F T I L I C I F L
421	AATGATCTATAAATCTCCATTA
141	N D A I N L H *

图 11 苎麻 *atp6-A* 基因的 ORF 及其推测的氨基酸序列

Fig. 11 ORF of *atp6-A* gene and its deduced amino acid sequence in *Boehmeria nivea*

由上图可以看出, 苜蓿 *atp6-A* 基因能编码通读的氨基酸序列, 说明我们已经克隆到了完整的基因。

2.2.2 苜蓿不育系 *atp6-A* 基因在 Genbank 中的同源性检索

用 Genbank 中的 Blast 工具对苜蓿不育系 *atp6* 基因 (简称 *atp6-A*, 下同) 进行了同源性检索 (图 12)。结果显示, 在 Genbank 中有 105 条与该序列具有 84~97% 同源的核苷酸序列, 而且这些序列都是报道的与雄性不育性相关的序列。与 *atp6-A* 同源性较高的序列是萝卜、油菜, 拟南芥, 同源性序列都达到 97%; 与向日葵同源性是 96%; 与大豆、烟草同源性是 94%; 与高粱同源性是 91%。

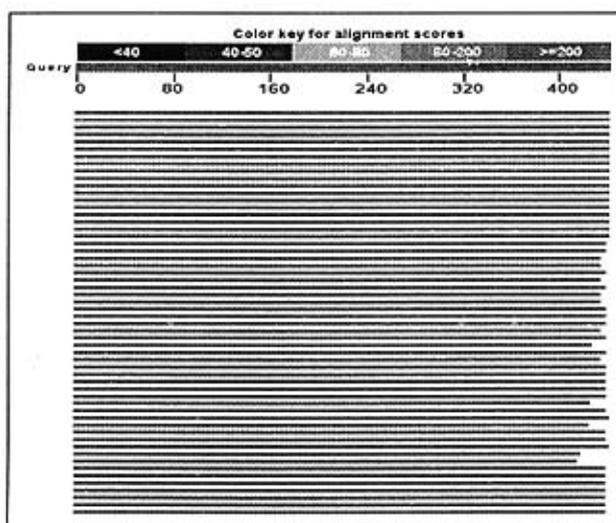


图 12 不育系 *atp6* 基因在 Genbank 中的同源性检索结果

Fig.12 Alignment of cloned *atp6-A* in Genbank

2.2.3 苜蓿不育系 *atp6-A* 基因开放阅读框 (ORF) 与其他植物比较

把苜蓿 *atp6-A* 基因与一些双子叶植物中雄性不育相关的 *atp6* 基因开放阅读框 (ORF) 进行比较 (图 13)。从图中可以看出, 苜蓿 *atp6-A* 基因与油菜 (登录号: DQ412559.1)、萝卜 (登录号: M24672.1)、向日葵 (登录号: X82387.1) 的雄性不育相关的 *atp6* 基因的同源性较高, 分别为 97%, 97%, 96%。由此可以看出, 我们所得到的序列为雄性不育基因的同源序列。

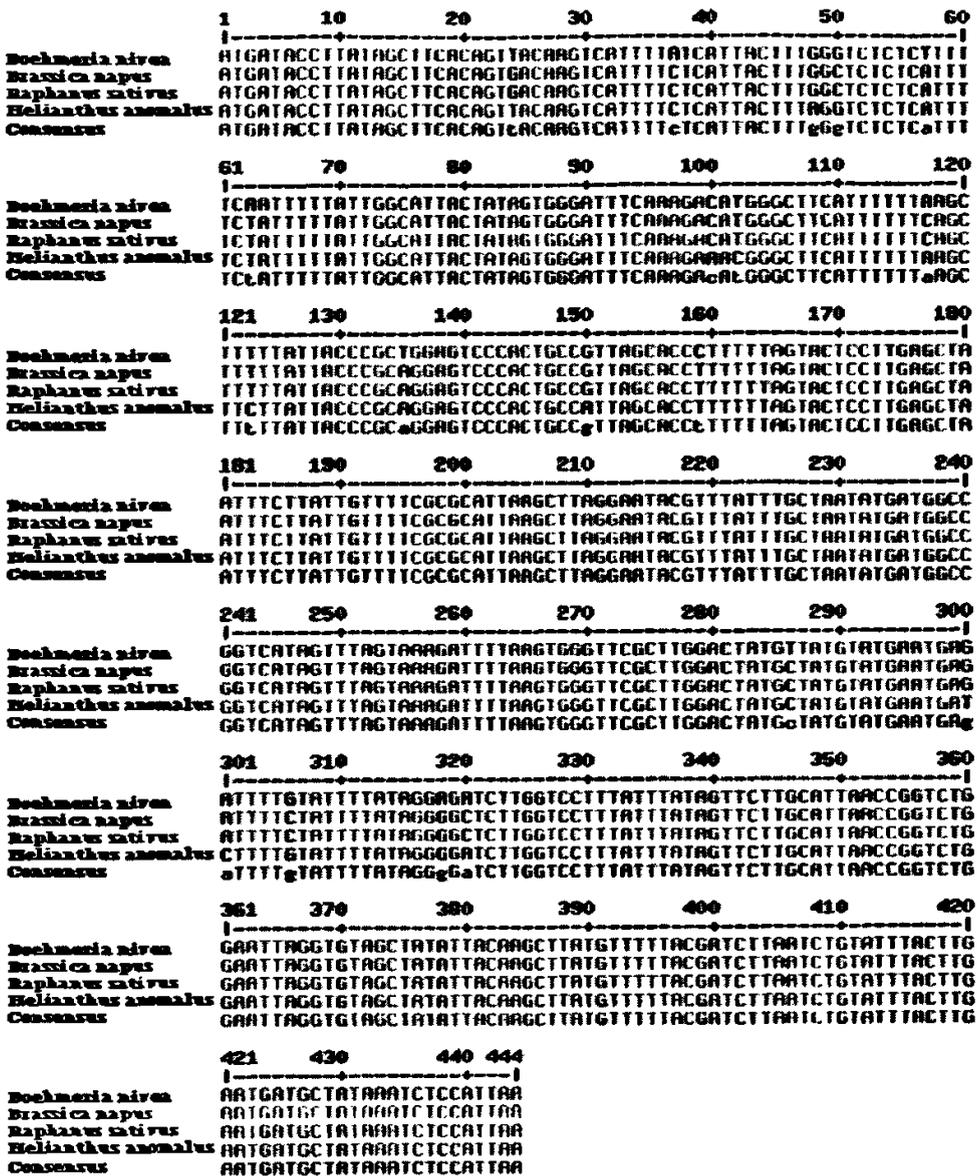


图 13 苎麻 *atp6-A* 基因与油菜、萝卜、向日葵 *atp6* 基因开放阅读框的比较

Fig.13 ORF comparison of *atp6-A* gene from *Boehmeria nivea* CMS line and those of CMS related *atp6* genes from *Brassica napus*, *Raphanus sativus* L. and *Helianthus annuus*

2.2.4 苎麻不育系 *atp6-A* 基因编码氨基酸的同源性检索

把苎麻不育系 *atp6-A* 基因翻译的氨基酸与一些雄性不育相关基因翻译的氨基酸进行比较, 发现了氨基酸水平上有 100 条相似性的序列 (图 14), 同源性在 88-97%。与向日葵的同源性达 97%, 与油菜、萝卜的同源性 96%, 与拟南芥的同源性 95%, 与高粱同源性为 94%, 与玉米、豌豆的同源性也达 93%。

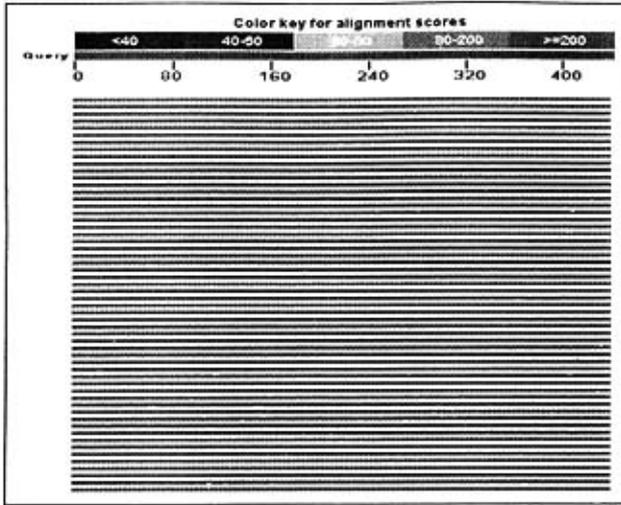


图 14 苧麻 *atp6-A* 基因推测的氨基酸序列在基因数据库中的同源性检索结果

Fig. 14 Alignment of the amino acid sequence deduced from *atp6-A* of *Boehmeria nivea* CMS line in Genbank

苧麻 *atp6-A* 基因同双子叶植物向日葵、油菜、萝卜的雄性不育相关基因 *atp6* 翻译的氨基酸序列进行比较 (图 15), 发现他们在氨基酸水平上有非常高的相似性。据此推测, 我们所克隆的苧麻 *atp6-A* 基因同其他植物同类基因具有相同或相似的功能。

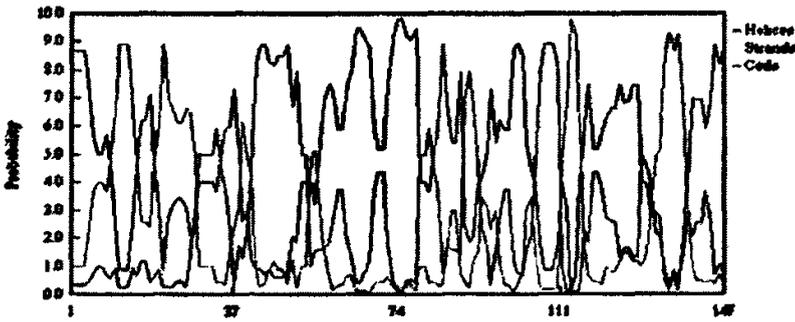
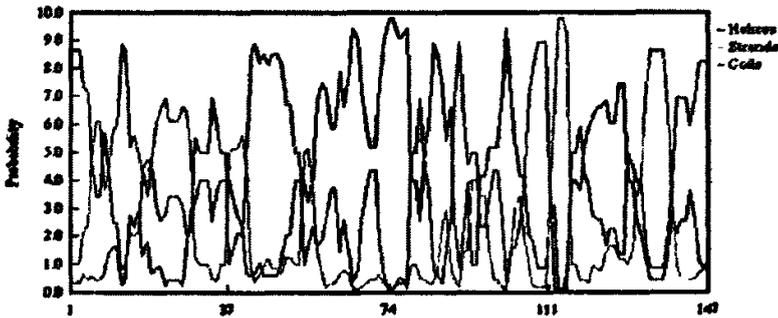


图 15 *atp6-A* 基因同向日葵、油菜、萝卜 *atp6* 基因翻译的氨基酸序列比较

Fig. 15 Comparison of amino acid sequences deduced from *atp6* genes in *Brassica napus*, *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus* and *Boehmeria nivea*

2.2.5 苎麻不育系 *atp6-A* 基因编码蛋白质的二级结构与油菜同类蛋白质二级结构的比较

用 DNAMAN 5.2.2 对蛋白质产物的二级结构进行了分析 (图 16, 17)。结果表明, *atp6-A* 的二级结构中 37.4% 为卷曲结构 (Coils), 22.5% 为线状结构 (Strands), 40.1% 为螺旋结构 (Helices)。卷曲结构和螺旋结构是苎麻 *atp6-A* 基因蛋白质产物二级结构的骨架。油菜的雄性不育相关 *atp6* 基因编码蛋白质产物的二级结构中, 40.1% 为卷曲结构 (Coils), 25.9% 为线状结构 (Strands), 34.0% 为螺旋结构 (Helices)。同样是卷曲结构和螺旋结构成为蛋白质产物二级结构的骨架。无论是 Coils, Strands 还是 Helices 结构, 苎麻 *atp6-A* 基因和油菜的雄性不育相关 *atp6* 基因在结构上有一定程度的相似性。可以推测苎麻的 *atp6-A* 基因与油菜的雄性不育基因在功能上也有有一定的相似性

图16 苎麻的 *atp6-A* 蛋白质的二级结构Fig. 16 Secondary structure of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-A* gene图17 油菜 *atp6* 基因蛋白质的二级结构Fig.17 Secondary structure of *Brassica napus atp6-A* product2.2.6 苎麻 *atp6-A* 基因编码蛋白质的疏水性与油菜同类蛋白质疏水性的比较

苎麻 *atp6-A* 基因编码的蛋白质疏水性与油菜雄性不育相关的 *atp6* 基因编码的蛋白质疏水性几乎没什么差异 (见图 18~19)。蛋白质平均疏水性值 (Mean hydrophobicity) 两者几乎相同, 苎麻为 0.6695, 油菜为 0.6705。说明我们从苎麻雄性不育系克隆到的 *atp6*

基因功能上与油菜 *atp6* 基因在性质上有一定程度的相似。

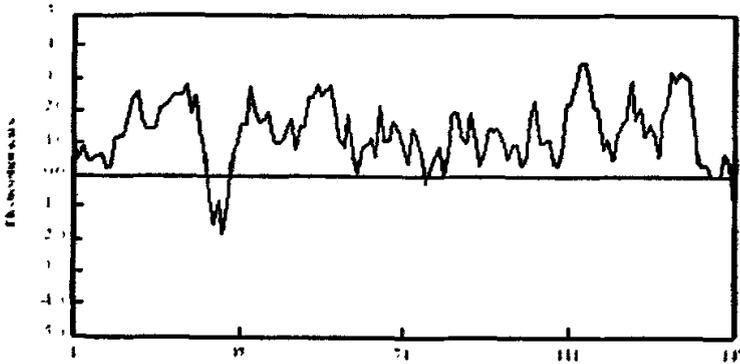


图 18 苎麻 *atp6-A* 基因编码蛋白质的疏水性

Fig.18 Hydrophobicity of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-A gene*

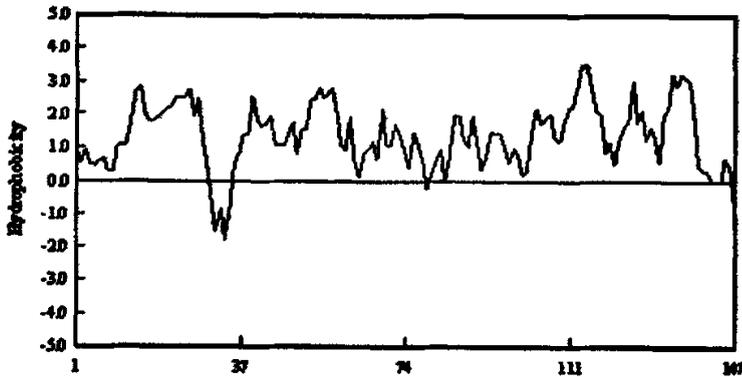


图 19 油菜雄性不育相关的 *atp6* 基因蛋白质疏水性

Fig.19 Hydrophobicity of protein of *atp6* related to CMS in *Brassica napus*

2.3 苎麻“三系”*atp6* 基因的比较

2.3.1 “三系”*atp6* 基因开放阅读框的比较

从图 20 中可以看出，所克隆到的苎麻 *atp6* 基因在苎麻“三系”中有较大的差异。不育系与保持系间的差异相对较小，与恢复系的差异相对较大。它们在核苷酸水平上的差异主要表现在碱基的缺失和某些位点上的突变等。保持系与不育系是同核异质关系，因此它们 mtDNA 的差异主要是由细胞质的差异引起的。

atp6-A	0
atp6-B	MPSEGGGVSPLEQFEILPLIPLNIGNLYFSFTNSSFFML	40
atp6-RML	2
Consensus		
atp6-A	0
atp6-B	FTLSLVLLLLLYFVTKKGGNLVPNAWQSLVELPYSFVNLNV	80
atp6-R	FTLSLVLLLLLYFVTKKGGNLVPNAWQSLVELLYSFVNLNV	42
Consensus		
atp6-AMIPMSFTVTS	10
atp6-B	NEQIAGKVKQKFFPCILVTFPILLFCNLQGMIPSSFTVTS	120
atp6-R	NEQIAGKVKQKFFPCILVTFPILLFCNLQGMIPMSFTVTS	82
Consensusmip sftvts	
atp6-A	HFITITLGLSFSIFIGITIVGFORHGLHFLSFLLPAGVPLP	50
atp6-B	HFITITLGLSFSIFIGITIVGFORHGLHFLSFLLPAGVPLP	160
atp6-R	HFITITLGLSFSIFIGITIVGFORHGLHFLSFLLPAGVPLP	122
Consensus	hfiititlglslsifigitivgforhglhflslp	
atp6-A	LAPFLVLELISYCFRALSLGIRLFANMMAGHSLVKILSG	90
atp6-B	LAPFLVLELISYCFRALSLGIRLFANMMAGHSLVKILSG	200
atp6-R	LAPFLVLELISYCFRALSLGIRLFANMMAGHSLVKILSG	162
Consensus	lapflvlelislisycfralslgirlfanmmaghsilvkilsg	
atp6-A	FAWTMLCMNEILYFIGDLGPLFIVLALTGLELGVAILQAY	130
atp6-B	FAWTMLCMNEILYFIGDLGPLFIVLALTGLELGVAILQAY	240
atp6-R	FAWTMLCMNEILYFIGDLGPLFIVLALTGLELGVAILQAY	202
Consensus	fawtmlcmneilyfigdlgplfivlaltglelgvailqay	
atp6-A	VFTILCIYNDAINL	146
atp6-B	VFTILCIYNDAINL	256
atp6-R	VLTISIKVVLYL...	214
Consensus	v t i 1 1	

图 21 苜蓿“三系”*atp6* 基因推测的氨基酸序列的比较

Fig.21 Comparison of amino acid sequences deduced from *atp6* genes in *Boehmeria nivea* “three lines”

苜蓿“三系”所克隆到的 *atp6* 基因，保持系核苷酸序列最长。*atp6* 基因推导的多肽链中，不育系除第 4 位氨基酸与保持系第 114 位氨基酸不同外，不育系其余序列都包含在保持系的开放阅读框内，但它们之间长度的差异很大。由此推测，不育系和保持系的差异主要是由于它们之间的氨基酸序列长度不同所造成的。恢复系在第 34 位、204 位、207 位、209 位、210 位、211 位、213 位、214 位分别与保持系对应的第 72 位、242 位、245 位、247 位、248 位、249 位 251 位和 251 位氨基酸不同，其余的氨基酸序列全部相同，而且同样包含在保持系的开放阅读框内。这些差异位点的存在，可能是导致功能差异的一个主要原因。

2.3.3 “三系”*atp6* 基因编码蛋白质的二级结构比较

用 DNAMAN 5.2.2 对蛋白质产物的二级结构进行了分析 (图 22~24)。结果表明，*atp6-A* 的二级结构中 37.4% 为卷曲结构 (Coils)，22.5% 为线状结构 (Strands)，40.1% 为螺旋结构 (Helices)。*atp6-B* 的二级结构中 47.8% 为卷曲结构 (Coils)，23.4% 为线状结构 (Strands)，28.8% 为螺旋结构 (Helices)。*atp6-R* 的二级结构中 36.9% 为卷曲结构 (Coils)，27.6% 为线状结构 (Strands)，35.5% 为螺旋结构 (Helices)。苜蓿“三系”中，保持系二级结构的 Coils 最高，Helices 最低，可以看出“三系”*atp6* 基因翻译的蛋白质二级结构上确实有一定的差异。“三系”蛋白质二级结构的差异，暗示了“三系”功能上的差异。

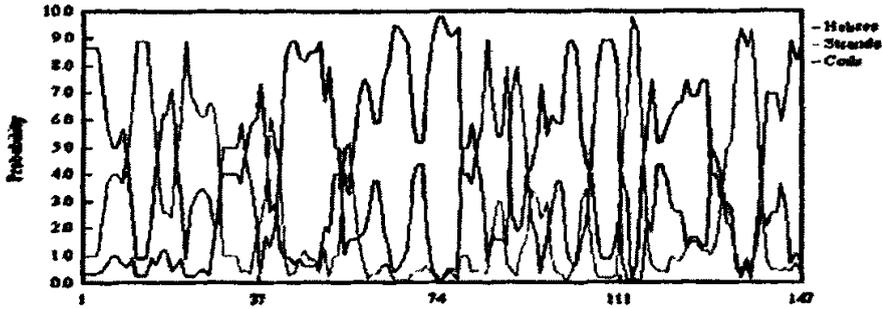


图 22 苕麻 *atp6-A* 基因编码蛋白质二级结构

Fig. 22 Secondary structure of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-A* gene

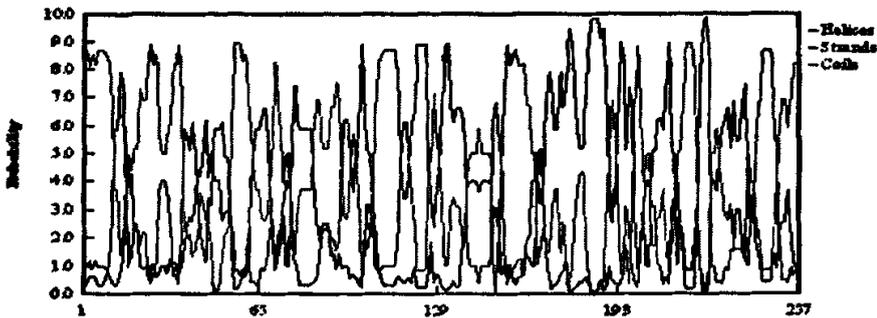


图 23 苕麻 *atp6-B* 基因编码蛋白质的二级结构

Fig. 23 Secondary structure of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-B* gene

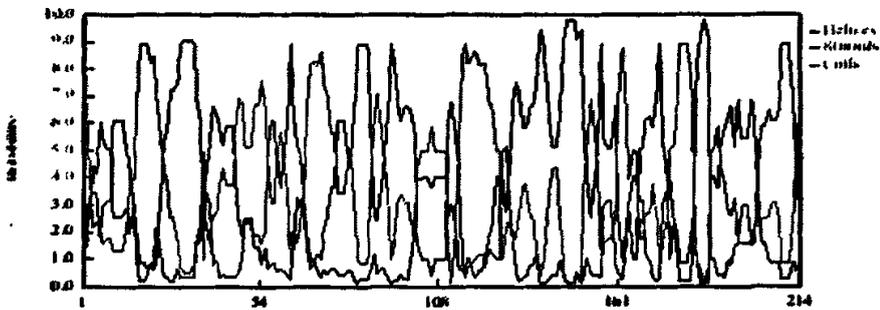


图 24 苕麻 *atp6-R* 基因编码蛋白质二级结构

Fig. 24 Secondary structure of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-R* gene

2.3.4 “三系” *atp6* 基因编码蛋白质的疏水性比较

苕麻“三系”*atp6* 基因编码的蛋白质平均疏水性值(Mean hydrophobicity)很接近, 不育系为 0.6695, 保持系和恢复系都为 0.6790。但从图中可以明显看出它们各自的蛋白

质疏水特性的不同 (图 25-27), 反映出苎麻“三系” *atp6* 基因翻译产物性质上确实存在一些差异。

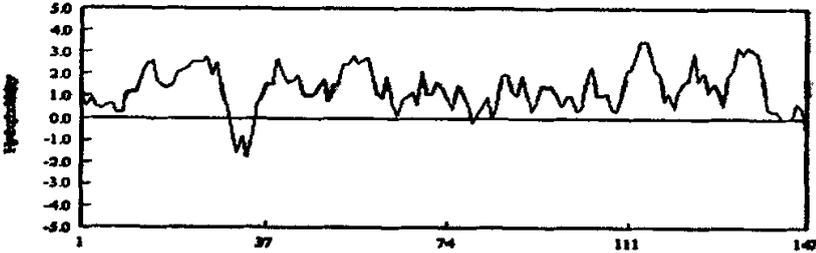


图 25 苎麻不育系 *atp6* 基因翻译的蛋白质的疏水性

Fig.25 Mean hydrophobicity of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-A* gene

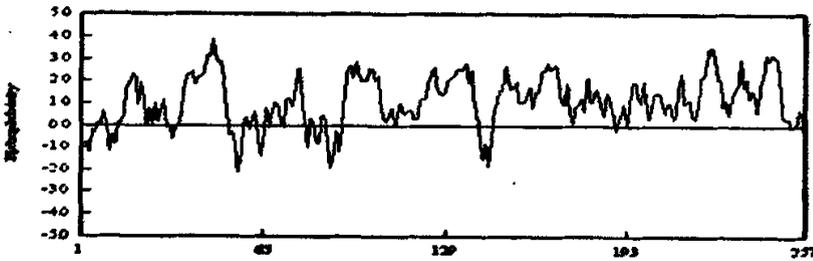


图 26 苎麻保持系 *atp6* 基因翻译的蛋白质的疏水性

Fig.26 Mean hydrophobicity of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-B*

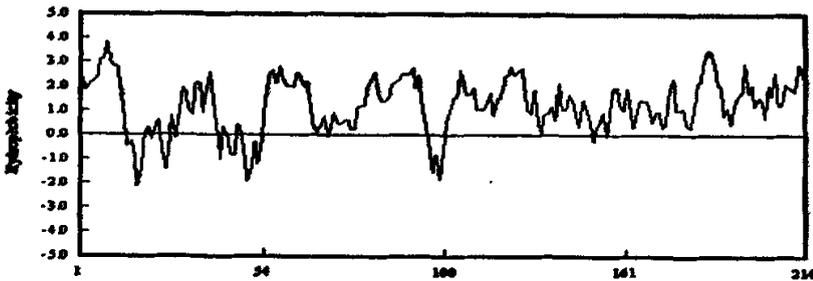


图 27 苎麻恢复系 *atp6* 基因翻译的蛋白质的疏水性

Fig.27 Mean hydrophobicity of protein deduced from *Boehmeria nivea atp6-R* gene

2.3.5 “三系”的遗传关系

根据苧麻“三系”*atp6* 基因的测序结果, 绘制“三系”同源树, 可以看出, 苧麻 *atp6* 基因不育系与保持系的遗传关系更近, 而与恢复系的遗传关系更远, 这个结果与 ISSR 分子标记的结果一致。

Distance matrix of 3 sequences			
<i>atp6-A</i>	0		
<i>atp6-B</i>	0.007	0	
<i>atp6-R</i>	0.049	0.042	0

Homology matrix of 3 sequences			
<i>atp6-A</i>	100%		
<i>atp6-B</i>	99.3%	100%	
<i>atp6-R</i>	95.1%	95.8%	100%

图 28 苧麻“三系”的同源性和距离矩阵

Fig. 28 Homology matrix and distance matrix of CMS line, maintainer line and restorer line in *Boehmeria nivea*.

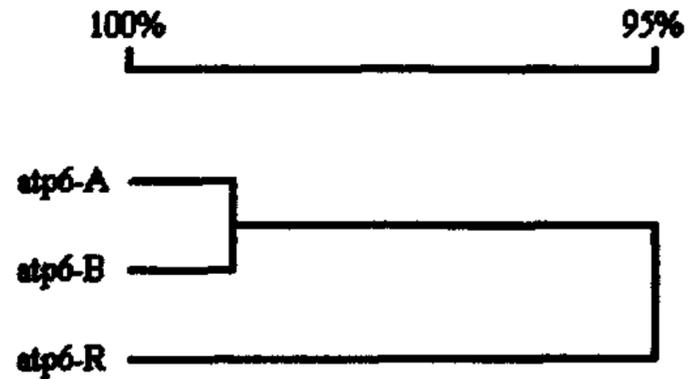


图 29 苧麻“三系”的遗传关系

Fig. 29 Genetic relationship of CMS line, maintainer line and restorer line in *Boehmeria nivea*

3 讨论

CMS 属功能性不育, 线粒体的作用举足轻重。苧麻中有关线粒体基因的克隆国内外尚未见报道, 本实验首次成功地从苧麻“三系”中克隆到线粒体 *atp6* 基因, 通过与 Genbank 中的同源性核苷酸、氨基酸序列进行比较, 发现它们与一些双子叶植物的同类基因有较高的同源性, 这也说明线粒体基因组在结构上的高度保守性。正因为植物线粒体基因具有高度的同源性, 本研究通过设计的简并引物先扩增出 *atp6* 基因的部分片段, 然后根据 DNA walking 扩增出全长 *atp6* 基因, 结果证明是可行的。陈军方等 (2005) 对太谷不育小麦进行研究时开始也是设计一对简并引物进行扩增, 然后通过电子延伸的方法获得了一个长为 1604 bp 的片段, 他们通过实验验证了这个片段的的存在, 也证明了通过设计简并引物开始进行后续实验的可行性。

植物的雄性不育性与其线粒体遗传系统关系密切, 普遍认为与呼吸链和 ATP 合成基因的嵌合基因以及 RNA 的编辑等有关(Gray 等 1992)。*atp6* 基因是 ATP 合成酶第 6 亚基, 由线粒体 DNA 编码, 在线粒体基因组中与呼吸作用有关, 是影响能量代谢的基因。由线粒体编码的若干个 ATP 合成酶的亚基的研究受到普遍重视。在不同物种中进行的研究表明, *atp6* 基因与 CMS 有着密切的关系 (Kadowaki 等 1989; Iwahashi 等 1993; Akagi 等 1994)。苧麻“三系”*atp6* 基因在核苷酸水平上、氨基酸水平上的差异, 暗示了它们与苧麻的雄性不育性的发生可能相关。通过与 Genbank 上公布的一些双子叶植物如油菜、向日葵、萝卜等的 *atp6* 基因的比较表明, 我们所克隆的苧麻 *atp6-A* 无论在核苷酸

水平上还是在氨基酸水平上都与这些基因有很高的同源性，而在这些植物上，*atp6* 基因被证明是与雄性不育性相关的基因。基于以上事实推测，我们所克隆的 *atp6-A* 基因与雄性不育性可能有较大相关。但要全面地了解苧麻“三系”*atp6* 基因以及它们与雄性不育性的真实关联性等问题，简单的序列比较还是不够的。

下一步的工作方向应该是把克隆到的基因连接到合适的转化载体上，通过转基因到可育植株比如烟草上，对转化植株进行鉴定、检测转基因植株的育性及相关生理生化指标以确认所转化的基因是否一定就是雄性不育基因。

第六章 雄性不育相关基因 *atp9* 的全序列克隆与序列分析

植物的雄性不育与其线粒体遗传系统有密切的关系,而其中由线粒体编码的若干 ATP 合成酶亚基的研究受到普遍重视。植物的 ATP 合成酶在能量产物的形成过程中起着重要作用。现已知道,ATP 合成酶由包括 *atpA* 在内的 9 个亚基组成,它们一起共同配合,完成 ATP 的生物合成。杨金水和 Walbot (1995) 采用酶切后分子杂交方法,在水稻野败型不育系中发现只有 1 个 *atp9* 拷贝,而保持系中却有 2 个 *atp9* 拷贝,认为 *atp9* 基因很可能与水稻野败型雄性不育有关。

本章选用苎麻雄性不育系、保持系和恢复系为材料,以 mtDNA 为中心,利用简并引物扩增所得的特异片段克隆测序后的结果设计特异引物,用 DNA-walking 策略扩增、克隆苎麻不育相关基因 *atp9* 全序列,并进行深入分析,为弄清苎麻雄性不育性的分子机理积累资料。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

同第三章 1.1。

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的提取与纯化

同第三章 1.4.1。

1.2.2 特异引物设计

根据简并引物 P1、P2 扩增 DNA 片段的测序结果设计 *atp9* 基因 3'和 5'方向的基因特异性引物 Tsp1, Tsp2, Tsp3, 委托上海生工公司合成,引物序列如下。

3' 方向特异引物:

Tsp1: 5'-GCTGCTGTGGGAATAGGA-3'

Tsp2: 5'-CAGTAGCTCGAAATCCGTCAT-3'

Tsp3: 5'-CGCCATCTTAGGATTTGCTCT-3'

5'方向特异引物:

Tsp1: 5'-AAATCCTAAGATGGCGTAAC-3'

Tsp2: 5'-ATGACGGATTTTCGAGCTACTG-3'

Tsp3: 5'-AAACATTTCTATTCCCACAGC-3'

1.2.3 DNA walking 扩增原理

DNA walking 扩增的原理参见 DNA Walking *SpeedUp*TM Premix kit 说明书 (目录号: K1501), 其技术路线同第五章 1.2.3 中的图 1。分为 3' 端和 5' 端扩增。

1.2.4 扩增 3' 端

(1) 不育系 3' 端扩增

包括三次不同的扩增, 主要实验步骤同第五章 1.2.4 中的不育系 3' 端扩增。以下各步 PCR 反应在进行前均要把 PCR 仪预热到 94 °C。

A. 第一次 PCR 反应

第一次 PCR 反应分别在 4 支独立的管中进行, 引物为 Tsp1 分别与 DW-ACP 1, 2, 3, 4 组成的引物对。

PCR 扩增体系和程序与第五章 1.2.4 相同。

使用 PCR 产物纯化试剂盒 (TIANGEN, 目录号: DP203/204) 对第一次 PCR 扩增产物进行纯化, 以去除其中的 DW-ACP 和 Tsp1。利用纯化后的产物当模板做第二次 PCR 扩增。

B. 第二次 PCR 反应

PCR 扩增体系与第五章 1.2.4 相同。

PCR 扩增条件: 为了增强 PCR 反应的特异性, 采用了降落 PCR (Touch-down) 程序。

94 °C	3 min	
94 °C	30 sec	
58 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	
94 °C	30 sec	
57 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	2 cycles
94 °C	30 sec	
56 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	3 cycles
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	6 cycles
94 °C	30 sec	

54 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	6 cycles
94 °C	30 sec	
53 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	12 cycles
94 °C	30 sec	
52 °C	30 sec	
72 °C	100 sec	5 cycles
72 °C	7 min	

对第二次 PCR 产物取 8 μ L 于 1.0% 的琼脂糖中进行检测, 如有目的条带就进行第三次 PCR 反应。

C. 第三次 PCR 反应

PCR 扩增体系与第五章 1.2.4 相同。

PCR 扩增程序与本章 1.2.4 中的第二次扩增程序相同。

(2) 保持系 3' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤与本章 1.2.4 中不育系 3' 端扩增相同。

(3) 恢复系 3' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤与本章 1.2.4 中不育系 3' 端扩增相同。

1.2.5 扩增 5' 端

(1) 不育系 5' 端扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4。

(2) 保持系 5' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4。

(3) 恢复系 5' 端 DNA walking 扩增

主要实验步骤同本章 1.2.4。

1.2.6 扩增产物的检测

扩增产物的检测同第五章 1.2.3.2。图 1-6 中的 1, 2, 3, 4 分别对应 DNA walking 第一次扩增中的引物 DW-ACP1, 2, 3, 4; M 为 DL2000。

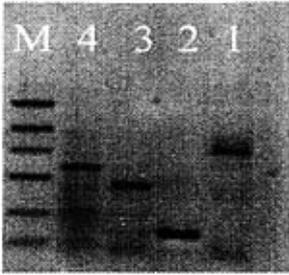


图 1 不育系 3'端 DNA walking 扩增图谱

Fig. 1 Patterns of 3' DNA walking

of CMS line

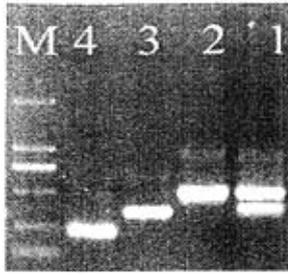


图 2 保持系 3'端 DNA walking 扩增图谱

Fig. 2 Patterns of 3' DNA walking

of maintainer line

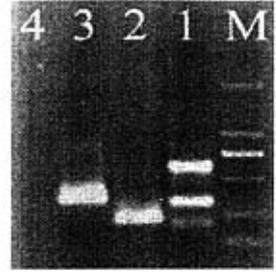


图 3 恢复系 3'端 DNA walking 扩增图

Fig. 3 Patterns of 3' DNA walking

of restorer line

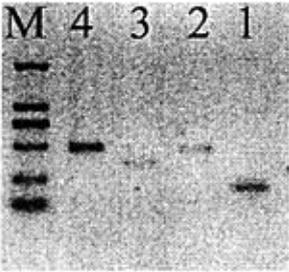


图 4 不育系 5'端 DNA walking 扩增图谱

Fig. 4 Patterns of 5' DNA walking

of CMS line

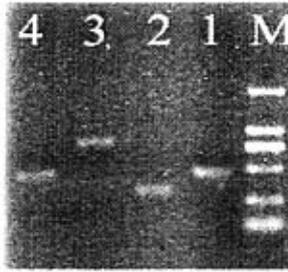


图 5 保持系 5'端 DNA walking 扩增图谱

Fig. 5 Patterns of 5' DNA walking

of maintainer line

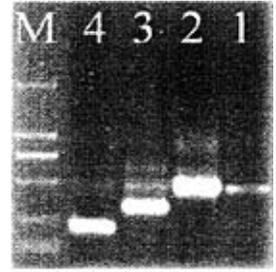


图 6 恢复系 5'端 DNA walking 扩增图谱

Fig. 6 Patterns of 5' DNA walking

of restorer line

第三次 PCR 产物可以直接用来测序，或克隆到合适的载体上测序。

3' 端 DNA walking 扩增后，于琼脂糖凝胶中把目的条带切下，分别用 DNA 片段回收和纯化试剂盒进行回收（TIANGEN，目录号：DP208/209）。

1.2.7 PCR 产物的回收与纯化

同第四章 1.3.2.4。

1.2.8 感受态细胞的制备

同第四章 1.3.2.5。

1.2.9 PCR 产物的连接与转化

同第四章 1.3.2.6。

1.2.10 小量质粒的快速抽提

同第四章 1.3.2.7.

1.2.11 重组质粒的筛选与鉴定

同第四章 1.3.2.8.

2 结果与分析

2.1 苎麻“三系” *atp9* 基因测序结果

2.1.1 不育系测序结果

2.1.1.1 不育系 3' 端 DNA walking 的测序结果 (下划线标示引物位置, 下同)

CGCCATCTTAGGATTTGCTTTAACGGAGGCTATTGCCCTGTTTCGCCTTAATGATGGC

Tsp3

ATTTCTAATTTTGTGGTTTAAATCTAATAGATTTTGGATATCATTCTCTTATTTCT
CGGACACAGCTCGTTTTTCCATGACCCCCCCCCCTCGCTGGCATACTTCTGTGA

Uni-primer

2.1.1.2 不育系 5' 端 DNA walking 的测序结果

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTTGGTGGTAGGGCAGTAGGAG

Uni-primer

TAAAGGCAATAGGATCAGTATTAGGGCTTAAAGAGAATGTTCTGTCAGAGAAGAA
CTAATAGATGAATCGGCTGCAAGTCTTTTAGCCACAGACGCTCTTGCTGGAATAAC
CGGCAATGGTCAACTATCCATTGTCAAAGCAAAGTCTCCGCCCTTTGGTGCTATCA
TCGTATATAAAATATAATAGATCACGCCTCTAACTATAACTTTAAATTTAATAAGAGA
AGAATTGGCAAGTCAAGTAGTACGCCTGGTTCACCAGGTTCCACCACTGCAGGGC
TCAATCATGCTAGTTAGGCTATATGCTTAACACATGCAAGTCGGAAACCTCGGGAA
CAAAGAAAAATAATAAAAAAATGTTAGAAGGAGCGAAATTAATAGGTGCCGGAGC
AGCAACTATTGCATTAGCTGGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTT

Tsp3

2.1.1.3 不育系 *atp9* 基因的拼接结果

采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序进行拼接, 方框示起始密码子和终止密码子。

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTTGGTGGTAGGGCAGTAGGAGT
AAAGGCAATAGGATCAGTATTAGGGCTTAAAGAGAATGTTCTGTCAGAGAAGAAC
TAATAGATGAATCGGCTGCAAGTCTTTTAGCCACAGACGCTCTTGCTGGAATAACC
GGCAATGGTCAACTATCCATTGTCAAAGCAAAGTCTCCGCCCTTTGGTGCTATCAT
CGTATATAAAATATAATAGATCACGCCTCTAACTATAACTTTAAATTTAATAAGAGAA

1.2.10 小量质粒的快速抽提

同第四章 1.3.2.7.

1.2.11 重组质粒的筛选与鉴定

同第四章 1.3.2.8.

2 结果与分析

2.1 苎麻“三系”*atp9* 基因测序结果

2.1.1 不育系测序结果

2.1.1.1 不育系 3' 端 DNA walking 的测序结果 (下划线标示引物位置, 下同)

CGCCATCTTAGGATTTGCTTTAACGGAGGCTATTGCCCTGTCGCCCTTAATGATGGC

Tsp3

ATTTCTAATTTTGTGTTGTTTTTAATCTAATAGATTTTTGATATCATTCTCTTATTTCT
CGGACACAGCTCGTTTTTCCATGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

Uni-primer

2.1.1.2 不育系 5' 端 DNA walking 的测序结果

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTTGGTGGTAGGGCAGTAGGAG

Uni-primer

TAAAGGCAATAGGATCAGTATTAGGGCTTAAAGAGAATGTTCTGTCAGAGAAGAA
CTAATAGATGAATCGGCTGCAAGTCTTTTAGCCACAGACGCTCTTGCTGGAATAAC
CGGCAATGGTCAACTATCCATTGTCAAAGCAAAGTCTCCGCCCTTTTGGTGCTATCA
TCGTATATAAAAATAAATAGATCACGCCTCTAACTATAACTTTAAATTTAATAAGAGA
AGAATTGGCAAGTCAAGTAGTACGCCTGGTTCACCAGGTTCCACCACTGCAGGGC
TCAATCATGCTAGTTAGGCTATATGCTTAAACACATGCAAGTCGGAAACCTCGGGAA
CAAAGAAAAATAATAAAAAATGTTAGAAGGAGCGAAATTAATAGGTGCCGGAGC
AGCAACTATTGCATTAGCTGGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTT

Tsp3

2.1.1.3 不育系 *atp9* 基因的拼接结果

采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序进行拼接, 方框示起始密码子和终止密码子。

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTTGGTGGTAGGGCAGTAGGAGT
AAAGGCAATAGGATCAGTATTAGGGCTTAAAGAGAATGTTCTGTCAGAGAAGAAC
TAATAGATGAATCGGCTGCAAGTCTTTTAGCCACAGACGCTCTTGCTGGAATAACC
GGCAATGGTCAACTATCCATTGTCAAAGCAAAGTCTCCGCCCTTTTGGTGCTATCAT
CGTATATAAAAATAAATAGATCACGCCTCTAACTATAACTTTAAATTTAATAAGAGAA

GAATTGGCAAGTCAAGTAGTACGCCTGGTTCACCAGGTTCCACCACTGCAGGGCT
CAATCATGCTAGTTAGGCTATATGCTTAAACACATGCAAGTCGGAAACCTCGGGAAC
AAAGAAAAATAATAAAAAATGTTAGAAGGAGCGAAATTAATAGGTGCCGGAGCA
GCAACTATTGCATTAGCTGGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTTTTAGTTCATTA
ATTCAATCAGTAGCTCGAAATCCGTCATTAGCAAAACAGTTGTTTGGTTACGCCAT
CTTAGGATTTGCTTTAACGGAGGCTATTGCCCTGTTGCGCTTAATGATGGCATTTC
TAATTTGTTTGTGTTTTTAACTCTAATAGATTTTTGATATCATTCTCTTATTTCTCGG
ACACAGCTCGTTTTTCCATGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

2.1.2 保持系测序结果

2.1.2.1 保持系 3' 端 DNA walking 的测序结果

CGCCATCTTAGGATTTGCTTTAACGGAGGCTATTGCCTTGTTCGCCTTAATGATGG

Tsp3

CATTTCTAATTTTGTGTTTTTAATCTAATAGATTTTTGATATCATTCTCTTATTT
CTCGGACACAGCTCGTTTTTCCATGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

Uni-primer

2.1.2.2 保持系 5' 端 DNA walking 的测序结果

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTTGGTGGTAGGGCAGTAGGAG

Uni-primer

TAAAGGCAATAGGATCAGTATTAGGGCTTAAAGAGAATGTTCTGTCAGAGAAGA
ACTAATAGATGAATCGGCTGCAAGTCTTTTAGCCACAGACGCTCTTGCTGGAATA
ACCGGCAATGGTCAACTATCCATTGTCAAAGCAAAGTCTCCGCCCTTTTGGTGCT
ATCATCGTATATAAAATATAATAGATCACGCCTCTAACTATAACTTTAAATTTAAT
AAGAGAAGAATTGGCAAGTCAAGTAGTACGCCTGGTTCACCAGGTTCCACCACTG
CAGGGCTCAATCATGCTAGTTAGGCTATATGCTTAAACACATGCAAGTCGGAAACC
TCGGGAACAAAGAAAAATAATAAAAAAATGTTAGAAGGAGCGAAATTAATAGGT
GCCGGAGCAGCAACTATTGCATTAGCTGGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTT

Tsp3

2.1.2.3 保持系 *atp9* 基因的拼接结果

采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序进行拼接,方框示起始密码子和终止密码子。

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGGTCTTGGTGGTAGGGCAGTAGGAG
TAAAGGCAATAGGATCAGTATTAGGGCTTAAAGAGAATGTTCTGTCAGAGAAGA

ACTAATAGATGAATCGGCTGCAAGTCTTTTAGCCACAGACGCTCTTGCTGGAATA
ACCGGCAATGGTCAACTATCCATTGTCAAAGCAAAGTCTCCGCCCTTTTGGTGCT
ATCATCGTATATAAAATATAATAGATCACGCCTCTAACTATAACTTTAAATTTAAT
AAGAGAAGAATTGGCAAGTCAAGTAGTACGCCTGGTTCACCAGGTTCCACCACTG
CAGGGCTCAATCATGCTAGTTAGGCTAT[ATG]CTTAACACATGCAAGTCGGAAACC
TCGGGAACAAAGAAAATAATAAAAAAATGTTAGAAGGAGCGAAATTAATAGGT
GCCGGAGCAGCAACTATTGCATTAGCTGGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTT
TTAGTTCATTAATTCAATCAGTAGCTCGAAATCCGTCATTAGCAAACAGTTGTTTG
GTTACGCCATCTTAGGATTTGCTTTAACGGAGGCTATTGCCTTGTTTCGCCTTAATG
ATGGCATTCTAATTTTGTGTTT[TAAT]CTAATAGATTTTGTATATCATTCTCT
TATTTCTCGGACACAGCTCGTTTTTCCATGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTT
CTGTGA

2.1.3 恢复系测序结果

2.1.3.1 恢复系 3' 端 DNA walking 的测序结果

CGCCATCTTAGGATTTGCTCTAACGGAGGCTATTGCCTTGTTTCGCCTTAATGATGG

Tsp3

CATTTCTTATTTTGTGTTTGTAAAAATCTAATAGATTTTGTATATCATTCAATTCTTG
CTCGGACACAGCTCGTTTTTCCATGACCGCCACATTGAATTCCTATTTTTTTTAAA
AGGGAAGCTCCTGGATOGAGGGCCTTTATGGTACTACGGGAGATGAAATCGACTC
GAACTCAACCCCCCGTCATCCCGCCACAGGCGGAAAATACGGACCCGGAAGA
AGGGGCGGGCTCCTCAAATCCCTTGTCTTCTATAAGCCTTCTCAAGCTTCTCTGG
AAGCTTTAGAAAGATCTATGCGAGGACGTAGAGAGAGGGGAATTTACCCAGCTC
CCTCCAGTGAGCCCTTCGGCAAGGCAGTCTCAATTCAATATTTAACGGAGTCAA
TTCGATTGTTTCAAATGAATATGAGGTTATTGTTGGTAAAAAGGTGGTTTCTAGG
GCCACGCTACAAGAAGAAATAGATTTTTTGAATACGAAAACACGCCTTTGGACT
CTTTTCTATAAGAATTTTAGGAGACCCCCCCCCCTCGCTTGGCATACTTCTGTGA

Uni-primer

2.1.3.2 恢复系 5' 端 DNA walking 的测序结果

TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGACGCCCATTTTATAATATAAACCATGA

Uni-primer

AAGTCCTTAACCACAGGCAACTAACTGGTCTATCCAGCCGTTTGAGTCGGCATTGGA
GAAATAGGTGTGTTTCGATTGCTTTGGTTGGAGCTGCTGTGGGAATAGGAAATGTTT

Tsp3

2.1.3.3 恢复系 *atp9* 基因的拼接结果

采用 DNAMAN 5.2.2 的 Sequence Assembly 程序进行拼接,方框示起始密码子和终止密码子。

```
TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGACGCCATTTTATAATATAAACCATG
AAAGTCCTTAACCACAGGCAACTAACTGGTCTATCCAGCCGTTTGAGTCGGCATT
GAGAAATAGGTGTGTTTCGTAATGCTTTGGTIGGAGCTGCTGTGGGAAIAGGAAATG
TTTTTAGTTCATTAATCAATCAGTAGCTCGAAATCCGTCATTAGCAAACAGTTGT
TTGGTTACGCCATCTTAGGATTTGCTCTAACGGAGGCTATTGCCTTGTTCCGCTTA
ATGATGGCATTTCCTATTTTGTGTTGTTTTTAACTCTAATAGATTTTTGATATCATT
AATTCTTGCTCGGACACAGCTCGTTTTCCATGACCGCCACATTGAATTCCTATTT
TTTTTAAAAGGGAAGCTCCTGGATCGAGGGCCTTTATGGTACTACGGGAGATGAA
ATCGACTCGAACTCAACCCCCCGTCATCCCGCCACAGGCGGAAAATACGGACC
CGGAAGAAGGGGCGGGCTCCTCAAATCCCTTGTCTTCTATAAGCCTTCTCAAGC
TTCTCTGGAAGCTTTAGAAAGATCTATGCGAGGACGTAGAGAGAGGGAATTTACC
CCAGCTCCCTCCAGTGAGCCOCTTCGGCAAGGCAGTCTCAATTCAATATTTAACG
GAGTCAATTCGATTGTTTCAAATGAATATGAGGTTATTGTTGGTAAAAAGGTGGT
TTCTAGGGCCACGCTACAAGAAGAAATAGATTTTTTTGAATACCGAAAACACGCCT
TTGGACTCTTTTTCTATAAGAATTTTAGGAGACCCCCCCCCCTCGCTGGCATACT
TCTGTGA
```

2.2 苎麻不育系 *atp9-A* 基因与其他植物 *atp9* 基因比较分析

根据 Genbank 上已报道的其它一些双子叶植物与雄性不育相关基因,我们对所克隆的苎麻“三系”*atp9* 的开放阅读框以及推导的氨基酸等相关方面进行了比较分析。

2.2.1 苎麻不育系 *atp9-A* 基因及其编码的氨基酸序列

```
1 ATCCTTAAACACATCCAAAGTCGGAACCTCGGGAACAAGAAAAATAATAAAAAAATGTTA
1 M L N I C K S E I S G T K K N H K K M L
61 GAAGGAGCGAAATTAATAGGTGCGGAGCAGCAACTATTGCATTAGCTGGAGCTGCTGTG
21 E G A K L I G A G A A T I A L A G A A V
121 GCAATAGCAAAATGTTTTAGTTCATTAATTCAAATCAGTAGCTCGAAATCCGTCATTAGCA
41 G I G N V F S S L I Q S V A R N P S L A
181 AAACAGTIGTTTGGTTACGCCATCTTAGGATTTGCTTTAACGGAGGCTATTGCCCTGTTC
61 K Q L F G Y A I L G F A L T E A I A L F
241 CCCTTAATGATGCCATTTCCTAATTTGTTTGTGTTTTTAA
81 A L N N A F L I L F V F *
```

图7 苎麻 *atp9-A* 基因与其推导的氨基酸序列

Fig.7 *atp9-A* gene of *Boehmeria nivea* and its deduced amino acids

由上图可以看出，苎麻 *atp9-A* 基因能编码通读的氨基酸序列，说明我们已经克隆到了苎麻的完整 *atp9* 基因。

2.2.2 苎麻不育系 *atp9-A* 基因在 Genbank 中的同源性检索

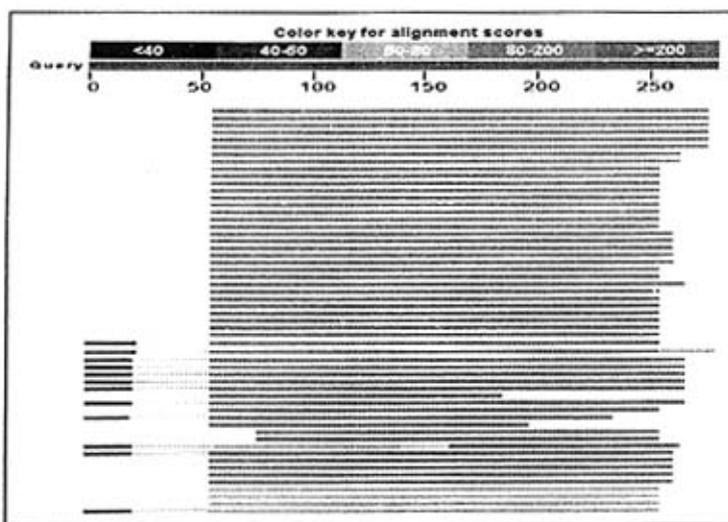


图 8 不育系 *atp9* 基因在 Genbank 中的同源性检索结果

Fig. 8 Alignment of cloned *atp9-A* in Genbank database

用 Genbank 中的 Blast 工具对 *atp9-A* 的开放阅读框进行了同源性检索 (图 8)，结果显示，在 Genbank 中有 155 条与该序列具有较高同源性的核苷酸序列。*atp9-A* 与玉米有 83% 的同源性序列；与甘蔗、烟草、拟南芥同源性是 82%；与高粱、大豆分别是 81%；与油菜是 79%。

2.2.3 苎麻不育系 *atp9* 基因开放阅读框 (ORF) 与其他植物比较

把苎麻 *atp9-A* 基因与一些双子叶植物的雄性不育相关基因 *atp9* 的开放阅读框 (ORF) 进行比较。从图 9 可以看出，苎麻 *atp9-A* 基因与大豆 (登录号: L17319.1)、烟草 (登录号: X64423.1)、高粱 (登录号: U61165.1) 雄性不育相关基因 *atp9* 的同源性较高，分别为 83.6%，81.3%，80.9%。

苧麻 *atp9-A* 基因同双子叶植物大豆、烟草雄性不育相关基因 *atp9* 翻译的氨基酸比较 (图 11), 发现他们氨基酸相似性非常高, 但苧麻 *atp9-A* 基因的多肽链长度比大豆、烟草等相对要长。它们之间的差异主要表现在肽链长度上的不同。

<i>Boehmeria nivea</i>	MLNTCKSETSGTKKNNKQ	MLEGAKLI	GAGAA	TTALAGA	AV
<i>Glycine max</i>	MLEGAKLI	GAGAA	TTALAGA	AV
<i>Nicotiana tabacum</i>	MLEGAKLI	GAGAA	TTALAGA	AI
Consensus		mlegakli	gagaati	alagaa	

<i>Boehmeria nivea</i>	GIGNVFS	SLIQ	SVARNP	SLAKQLF	GYAIL	GFALTEA	IALF
<i>Glycine max</i>	GIGNVFS	SLIQ	SVARNP	SLAKQLF	GYAIL	GFALTEA	IALF
<i>Nicotiana tabacum</i>	GIGNVFS	SLIQ	SVARNP	SLAKQLF	GYAIL	GFALTEA	IALF
Consensus	gignv	fsli	svarnp	slakql	fyail	gfalte	iaalf

<i>Boehmeria nivea</i>	ALMMAFLILFV
<i>Glycine max</i>	ALMMAFLILFV
<i>Nicotiana tabacum</i>	ALMMAFLILFV
Consensus	almmaf

图 11 *atp9-A* 基因同大豆、烟草与雄性不育相关的 *atp9* 基因翻译的氨基酸比较
 Fig.11 the comparison of translated amino acids of *atp9* gene in *Glycine max*, *Nicotiana tabacum* and *Boehmeria nivea*

2.2.5 苧麻不育系 *atp9-A* 基因编码蛋白质的二级结构与烟草同类蛋白质二级结构的比较

用 DNAMAN 5.2.2 分别对苧麻 *atp9-A* 基因与烟草不育相关基因 *atp9* 编码蛋白质的二级结构进行分析 (图 12, 13), 结果表明, 苧麻 *atp9-A* 编码的蛋白质二级结构中 12.0%为卷曲结构 (Coils), 88.0%为螺旋结构 (Helices), 无线状结构 (Strands) 出现。卷曲结构和螺旋结构是苧麻 *atp9-A* 基因蛋白质二级结构的骨架。烟草 *atp9* 基因编码的蛋白质二级结构中, 100%为螺旋结构 (Helices), 无卷曲结构 (Coils) 和线状结构 (Strands)

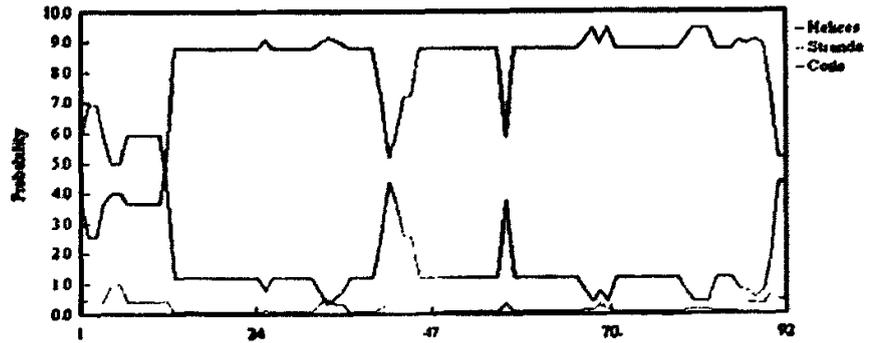


图12 苧麻*atp9-A*编码的蛋白质二级结构
 Fig.12 Secondary structure of *Boehmeria nivea atp9-A* product

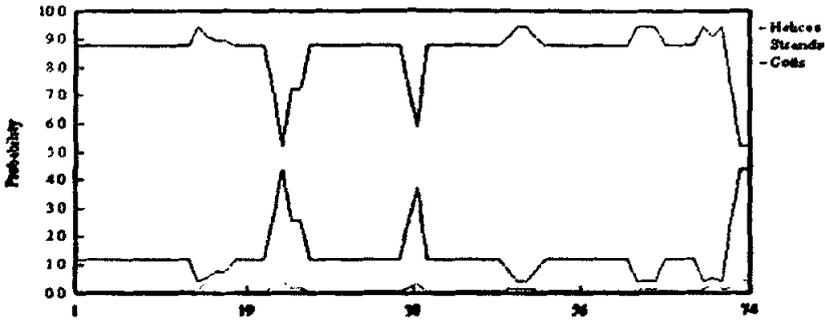


图 13 烟草雄性不育基因 *atp9* 编码的蛋白质二级结构

Fig.13 Secondary structure of *Nicotiana tabacum atp9-A* product

出现。螺旋结构是烟草不育相关 *atp9* 基因蛋白质二级结构的骨架。从中可以看出，苧麻不育系 *atp9* 基因与烟草不育相关基因 *atp9* 编码蛋白质的二级结构大体框架一致，但它们之间还是有差异存在。

2.2.6 苧麻不育系 *atp9-A* 基因编码的蛋白质疏水性与烟草同类蛋白质疏水性的比较

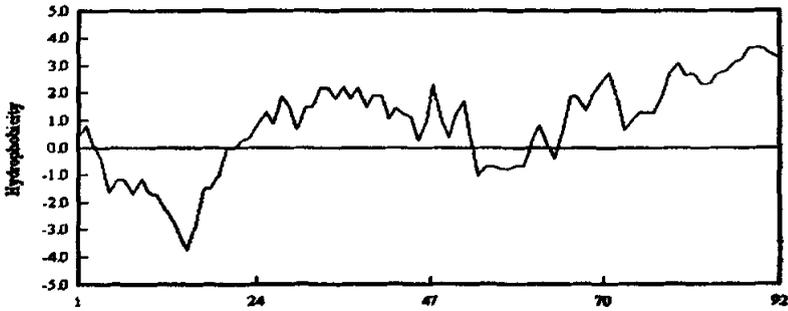


图 14 苧麻 *atp9-A* 基因蛋白质疏水性

Fig.14 Hydrophobicity of protein of *atp9-A* in *Boehmeria nivea*

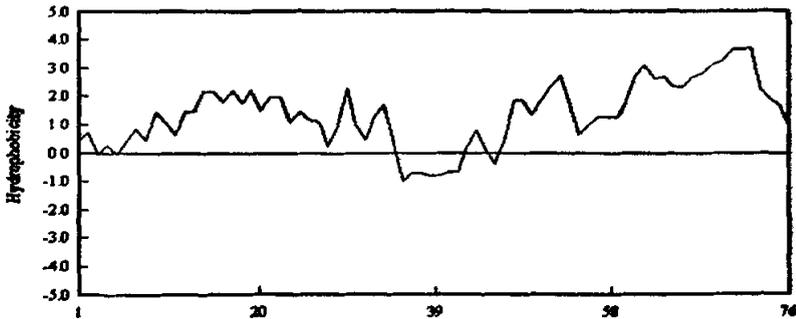


图 15 烟草 *atp9* 基因蛋白质疏水性

Fig.15 Hydrophobicity of protein of *atp9* in *Nicotiana tabacum*

从图中可以看出, 苎麻 *atp9-A* 基因编码蛋白质的疏水性与烟草雄性不育相关的 *atp9* 基因编码蛋白质的疏水性后半部分有很大的相似性, 但前面小部分很不一致, (见图 14, 15)。蛋白质平均疏水性值(Mean hydrophobicity)两者也有较大的差异, 苎麻为 0.603, 烟草为 0.522。

2.3 苎麻“三系” *atp9* 基因的比较

2.3.1 “三系” *atp9* 基因开放阅读框的比较

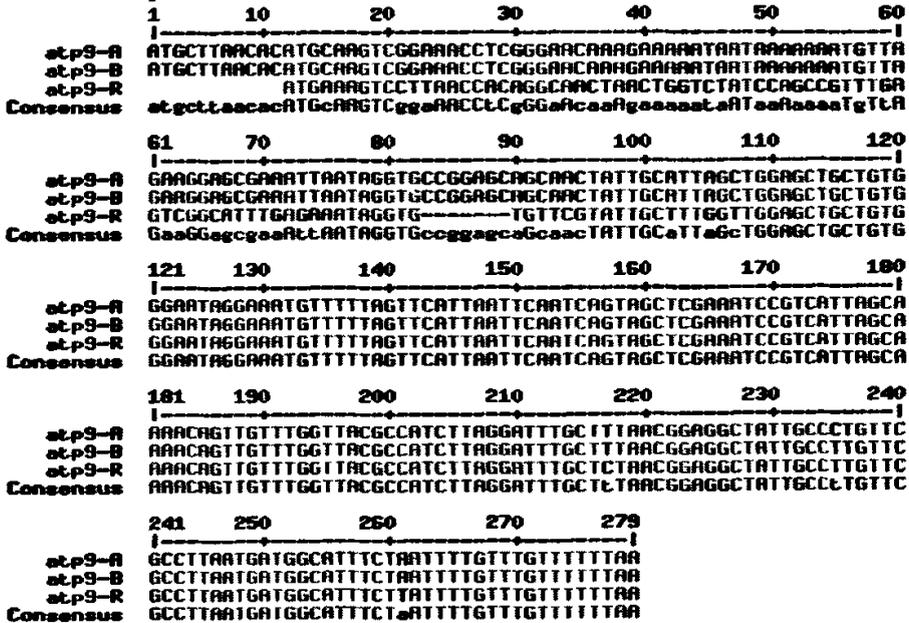


图 16 苎麻“三系” *atp9* 基因开放阅读框 (ORF) 的比较

Fig.16 ORF comparison of *atp9* gene in *Boehmeria nivea*

所克隆到的苎麻 *atp9* 基因在“三系”中有较大的差异。不育系与保持系间的差异相对较小, 与恢复系的差异相对较大。它们在核苷酸水平上的差异主要表现在碱基的缺失和某些位点上的突变等。保持系与不育系是同核异质关系, 因此它们 mtDNA 的差异主要是由细胞质的差异引起的。不育系 *atp9* 基因和保持系 *atp9* 基因仅在 235 位核苷酸上有差异, 在此位点上不育系是 C, 保持系变为 T。在有些位点上, 不育系与保持系相同而与恢复系不同, 如 102、217 和 261 位核苷酸, 等等; 仅在个别位点上 (如 235 位核苷酸), 保持系与恢复系相同, 而与不育系不相同 (图 16)。

2.3.2 苎麻“三系”*atp9* 基因推导的氨基酸序列比较

atp9-A (aa)	V L N T C K S E T S C T K K N N K K M E G A K L I G A G A A T T A L A G A A V	40
atp9-B (aa)	V L N T C K S E T S C T K K N N K K M E G A K L I G A G A A T T A L A G A A V	40
atp9-R (aa)	V K V L N H R Q L T C L S S R L S R H R N R C V R T A L V G A A V	34
Consensus	m g l ial gaav	
atp9-A (aa)	G I G N V F S S L I Q S V A R N P S L A K Q L F G Y A I L G F A L T E A I A L F	80
atp9-B (aa)	G I G N V F S S L I Q S V A R N P S L A K Q L F G Y A I L G F A L T E A I A L F	80
atp9-R (aa)	G I G N V F S S L I Q S V A R N P S L A K Q L F G Y A I L G F A L T E A I A L F	74
Consensus	g i g n v f s s l i q s v a r n p s l a k q l f g y a i l g f a l t e a i a l f	
atp9-A (aa)	A L M M A F L I L F V	91
atp9-B (aa)	A L M M A F L I L F V	91
atp9-R (aa)	A L M M A F L I L F V	85
Consensus	a l m m a f l i l f v	

图 17 苎麻“三系”推导的氨基酸的比较

Fig.17 Comparison of deduced amino acids of *atp9* gene in *Boehmeria nivea*

从图 16 和图 17 可以看出, 不育系和保持系虽在 235 位核苷酸上有差异, 但它们与 TG 组成的密码子却编码相同的氨基酸, 因此, 不育系和保持系 *atp9* 基因在氨基酸水平上没有差异。而恢复系与不育系、保持系 *atp9* 基因除了在肽链长度上存在差异外, 在氨基酸组成上也有明显差异。

2.3.3 “三系”*atp9* 基因编码蛋白质的二级结构比较

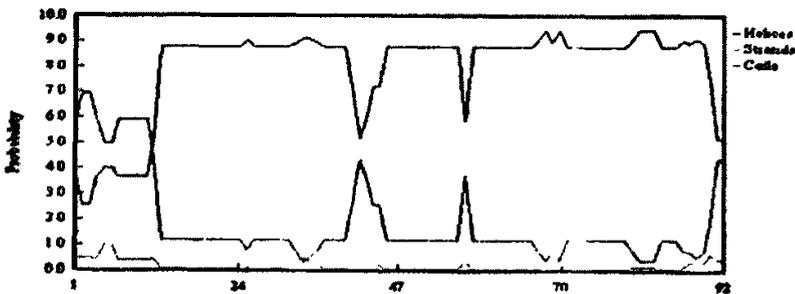


图 18 苎麻 *atp9-A* 基因编码蛋白质二级结构

Fig.18 Protein secondary structure of *Boehmeria nivea atp9-A*

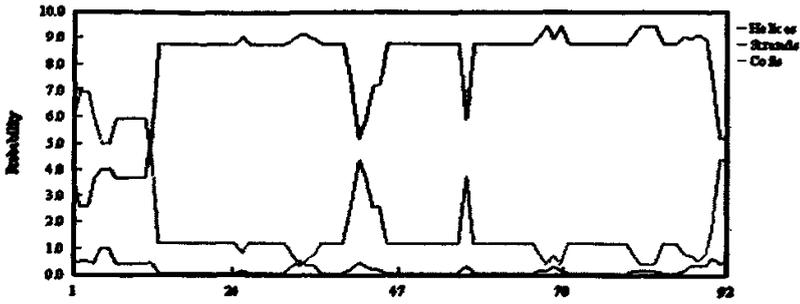


图 19 苎麻 *atp9-B* 基因编码蛋白质二级结构

Fig. 19 Protein secondary structure of *Boehmeria nivea atp9-B*

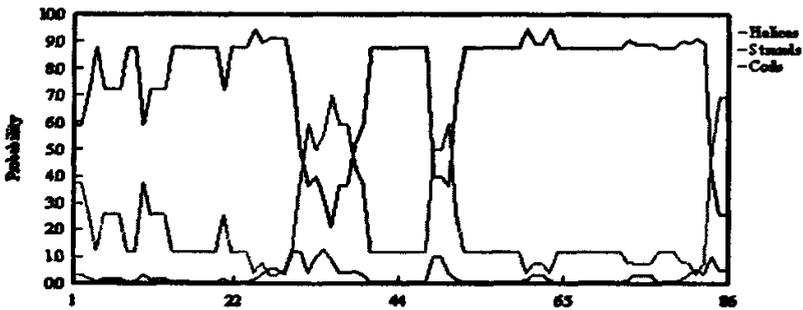


图 20 苎麻 *atp9-R* 基因编码蛋白质二级结构

Fig. 20 Protein secondary structure of *Boehmeria nivea atp6-R*

用 DNAMAN 5.2.2 分别对苎麻“三系”*atp9* 基因编码蛋白质的二级结构进行分析(图 18~20), 结果表明, 苎麻 *atp9-A*、*atp9-B* 基因编码蛋白质的二级结构相同(核苷酸序列亦只在 235 位有 1 个核苷酸差异)。它们的蛋白质二级结构中 12.0% 为卷曲结构(Coils), 88.0% 为螺旋结构(Helices), 无线状结构(Strands) 出现。*atp9-R* 基因编码的蛋白质二级结构中 14.0% 为卷曲结构(Coils), 86.0% 为螺旋结构(Helices), 无线状结构(Strands) 出现。以上苎麻“三系”的 *atp9* 基因都无线状结构, 卷曲结构和螺旋结构是它们的蛋白质二级结构的骨架。*atp9* 基因的蛋白质二级结构在苎麻“三系”中, 不育系和保持系的相同, 但都与恢复系有明显差异。

2.3.4 “三系” *atp9* 基因编码蛋白质的疏水性比较

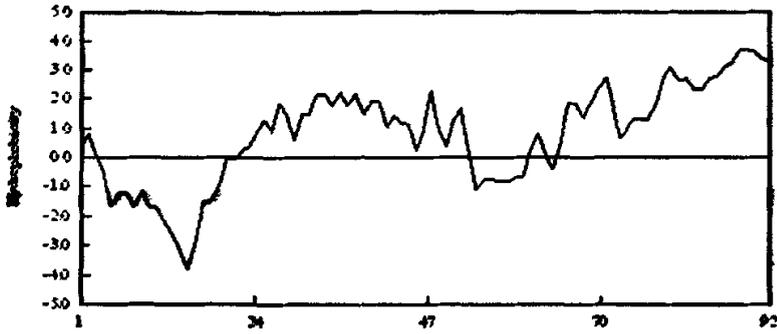


图 21 苎麻不育系 *atp9* 基因翻译的蛋白质的疏水性

Fig. 21 Mean hydrophobicity of the protein of *atp9*-A in *Boehmeria nivea*

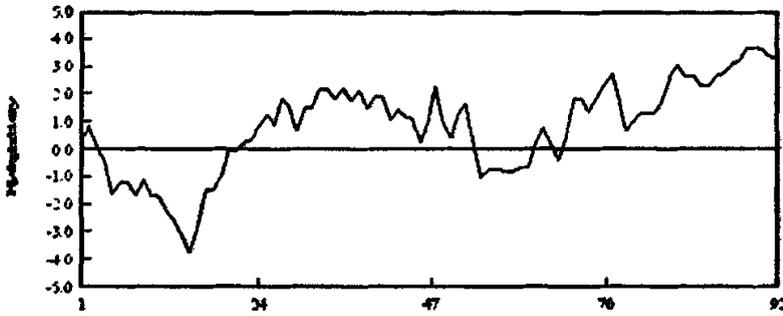


图 22 苎麻保持系 *atp9* 基因翻译的蛋白质的疏水性

Fig. 22 Mean hydrophobicity of the protein of *atp9*-B in *Boehmeria nivea*

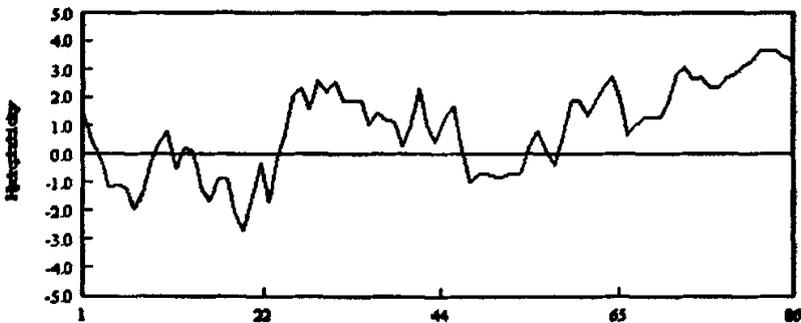


图 23 苎麻恢复系 *atp9* 基因翻译的蛋白质的疏水性

Fig. 23 Mean hydrophobicity of the protein of *atp9*-R in *Boehmeria nivea*

苎麻“三系” *atp9* 基因蛋白质疏水特性表现出一定差异 (图 21-23)。蛋白质平均

疏水性值(Mean hydrophobicity)不育系和保持系相同(0.603), 但恢复系略有降低(0.592)。

2.3.5 “三系”的遗传关系

根据苧麻“三系”*atp9*基因的测序结果, 我们绘制了“三系”同源树, 可以看出, 苧麻*atp9*基因保持系与不育系的遗传关系很近, 与恢复系的遗传关系稍远, 这个结果与 ISSR 分子标记分析的结果一致。

Distance matrix of 3 sequences

<i>atp9</i> -A	0		
<i>atp9</i> -B	0.004	0	
<i>atp9</i> -R	0.180	0.176	0

Homology matrix of 3 sequences

<i>atp9</i> -A	100%		
<i>atp9</i> -B	99.6%	100%	
<i>atp9</i> -R	82.0%	82.4%	100%

图 24 苧麻“三系”的同源性和距离矩阵
Fig. 24 Homology matrix and distance matrix of CMS line, maintainer line and restorer line of *Boehmeria nivea*



图 25 苧麻“三系”的聚类图
Fig. 25 Dendrogram of CMS line, maintainer line and restorer line of *Boehmeria nivea*

3 讨论

植物的雄性不育性与其线粒体遗传系统关系密切, 普遍认为与呼吸链和 ATP 合成基因的嵌合基因以及 RNA 的编辑等有关(Gray 等 1992)。线粒体的 *atp9* 基因编码 ATP 合成酶第 9 亚基, 与呼吸作用有关, 是影响能量代谢的基因。由线粒体编码的若干个 ATP 合成酶的亚基的研究受到普遍重视。在不同物种中对 *atp9* 基因的研究表明, 它与 CMS 有着密切的关系 (Kadowaki 等 1989; Iwahashi 等 1993; Akagi 等 1994)。

Dieterich 等 (2003) 分析了 25 个线粒体基因的转录本在雄性不育和雄性可育植株之间的差异。结果发现, 雄性不育和雄性可育植株之间在 *atp9* 基因周围有差异。在雄性不育植株的 *atp9* 基因上游, 由于重组产生了一个编码 193 个氨基酸的开放阅读框, 它与 *atp9* 共转录, 形成一个 1.58kb 的对 CMS 有专一影响的双顺反子 mRNA。杨金水和 Walbot (1995) 采用酶切后分子杂交方法, 对野败型水稻不育系和保持系的研究, 发现不育系和保持系的拷贝数不同, 不育系中只发现 1 个 *atp9* 拷贝, 而保持系中却有 2 个 *atp9* 拷贝, 这表明 *atp9* 基因很可能与水稻野败型不育性有关。但张赛群等 (2003) 对玉米 S 型 CMS 线粒体 DNA 的研究表明, *atp6*, *atp9*, *coxII* 基因与玉米 S-CMS 的形成没有关系。

有关苧麻线粒体 *atp9* 基因的研究,目前国内外还未见报道。本实验首次成功地从苧麻“三系”中克隆到线粒体 *atp9* 基因,通过与 Genbank 中的同源性核苷酸、氨基酸序列进行比较,发现它与一些双子叶植物的同类基因在核苷酸水平上的同源性非常高,这说明线粒体基因组在结构上是高度保守的。但我们所得到的苧麻 *atp9* 基因不育系和保持系在核苷酸水平上、氨基酸水平上的相似性,推测苧麻中 *atp9* 基因与雄性不育性的发生可能无关。通过与 Genbank 上公布的一些双子叶植物如大豆、烟草、高粱等的 *atp9* 基因的比较表明,我们所克隆到的苧麻 *atp9*-A 无论在核苷酸水平上还是在氨基酸水平上都有些类似。但苧麻 *atp9* 基因的不育系和保持系在氨基酸水平上没有发现差异;不育系与恢复系之间存在明显差异性,它们的差异除了肽链长度上的差异外,在氨基酸组成上也有明显差异。这可能与恢复基因的影响有关,这方面的工作有待进一步的深入研究。

第七章 苎麻雄性不育相关基因的表达分析

基因的表达与否通常可以通过 Southern 杂交或 RT-PCR 来验证。本实验采用 RT-PCR 的方式来验证从苎麻“三系”线粒体中所克隆到的 *atp6*、*atp9* 基因在不同时期的表达情况。

逆转录-聚合酶链式反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 的原理是:提取组织或细胞中的总 RNA, 以其中的 mRNA 为模板, 采用 Oligo(dT) 或随机引物利用逆转录酶反转录产生 cDNA; 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 从而获得目的基因或检测基因表达。把逆转录和 PCR 结合起来的 RT-PCR 能使 RNA 检测的灵敏度提高了几个数量级, 使一些极为微量 RNA 样品分析成为可能。该技术主要用于: 分析基因的转录产物、获取目的基因、合成 cDNA 探针、构建 RNA 高效转录系统等。

本章提取苎麻“三系”生殖生长不同阶段的叶片 RNA, 采用 RT-PCR 策略分析 *apt6*、*apt9* 基因的表达模式。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

由于所用苎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), 因此本实验只能以叶片为样品提取 RNA, 进行 RT-PCR 试验。实验材料为苎麻不育系 GS14-1 (A), 保持系 13-X₂ (B) 和恢复系湘 5 (R) 生殖生长期不同阶段的叶片, 即在现蕾前期、现蕾期、盛花期、开花末期取样。

1.2 实验试剂及主要仪器

(1) 主要试剂

提取 RNA 的 Trizol 试剂购自上海生物工程公司, 为 Promega 产品; Oligo(dT)15 引物、逆转录酶 ReverTra Ace (MMLV Reverse Transcriptase RNase H)、RNase Inhibitor 购自大连宝生生物公司, 为 Takara 产品。

(2) 主要仪器

Eppendorf 高速冷冻离心机, 北京六一仪器厂电泳槽, Bio-Rad 电泳仪, Eppendorf PCR 仪, WD-9403F 型紫外分析仪, UV-1600 型紫外分光光度计等。

1.3 逆转录引物

逆转录反应的特异引物依据本论文第五章 *apt6*、*apt9* 基因测序结果设计而来。
atp6 基因逆转录引物序列如下:

P1: 5'-GATACCTTATAGCTTCACAG-3'

P2: 5'-TAATGGAGATTTATAGCATC-3'

atp 9 基因逆转录引物序列如下:

P1: 5'-GCTTAACACATGCAAGTCG-3'

P2: 5'-AGAAATGCCATCATTAAAGGCG-3'

1.4 实验方法

1.4.1 苎麻叶片总 RNA 的提取

采用 Trizol 法提取苎麻总 RNA。具体方法如下:

(1) 取约 0.1 g 苎麻叶片, 加入液氮在研钵中充分研磨成粉末, 同时用液氮冷却 1.5 ml 的小离心管;

(2) 把研碎的粉末转入 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml 的 Trizol 试剂, 室温静置一段时间;

(3) 4 °C 14,000g 离心 10min;

(4) 转移上清到一新的 1.5 ml 的小离心管中;

(5) 加 200 μ l 氯仿, 剧烈振荡 15s, 室温静置 5min;

(6) 4 °C 10,000g 离心 15min, 上清加入 1/3 体积的 8 M LiCl, 混匀后置于 4 °C 放置 16h 或冰上放置 8~12h 沉淀 RNA;

(7) 小心抽出上层的液相到一新的 1.5 ml 的小离心管中, 加 1/2 V 的异丙醇和 1/2 V 的 3 M 的乙酸钠, 轻轻混匀, 室温静置 10min;

(8) 4 °C 10,000g 离心 10min, 取沉淀。

(9) 用 75% 的乙醇漂洗 2 次, 凉干, 加适量 DEPC 处理的水溶解 RNA。总 RNA 经电泳检测后立即进行逆转录反应合成 cDNA 第一链后置 -20 °C 冰箱备用, 或将总 RNA 直接于 -20 °C 或 -70 °C 保存备用, 但保存时间很短。

1.4.2 两步法 RT-PCR

1.4.2.1 逆转录反应合成 cDNA

以总 RNA 为模板, 通过逆转录得到 cDNA, 再进行后续的 PCR 扩增。逆转录反应体系为 20 μ l: 在 6 μ l 总 RNA 中加入 1 μ l Oligo-dT, 混匀, 70 °C 水浴 5min, 立即置冰上, 随后加入以下试剂:

5 X RT buffer	4.0 μ l
dNTPs (10 mM)	1.0 μ l
ReverTra Ace (100U/ μ l)	1.0 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	0.5 μ l

DEPC-H ₂ O	6.5 μ l
总体积	20.0 μ l

42℃温浴 60min 后，立即放入 95℃条件下加热 10min 以终止第一链的合成。

(注：如果用水浴锅或是 PCR 仪温育，先加入一滴矿物油在反应液表面，防止温浴过程中液体蒸发而减少。)

逆转录产物用 1.0%的琼脂糖检测。

1.4.2.2 PCR 反应扩增合成 cDNA 第二链

PCR 反应体积为 25 μ l，在 0.2 ml 离心管中进行。根据扩增片段长度的不同而使用不同的 PCR 反应循环参数。

25 μ l 的 PCR 扩增体系如下：

10 \times PCR 反应缓冲液	2.5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 μ l
dNTPs (10 mM)	0.5 μ l
Taq. DNA 聚合酶	0.5 μ l
P1 (10 μ M)	0.5 μ l
P2 (10 μ M)	0.5 μ l
cDNA	3.0 μ l
灭菌水	15.5 μ l
总体积	25.0 μ l

atp6 基因 PCR 扩增程序：

94℃ 4 min

94℃ 40 sec

47℃ 50 sec

72℃ 80 sec

} 40 Cycles

72℃ 10 min

atp9 基因 PCR 扩增程序：

94℃ 4 min

94℃ 40 sec

49℃ 50 sec

72℃ 80 sec

} 40 Cycles

72℃ 10 min

2 结果与分析

2.1 提取的总 RNA 检测

RNA 的提取是本实验成功的关键步骤之一。图 1 显示的是现蕾前期的苎麻“三系”RNA，其中的 1, 2, 3 分别代表不育系、保持系和恢复系，M 为 DL2000。图中 1、2 和 3 的 28S 的亮度几乎是 18S 的 2 倍，表明提取的 RNA 质量很好，可以当作后续实验的模板。

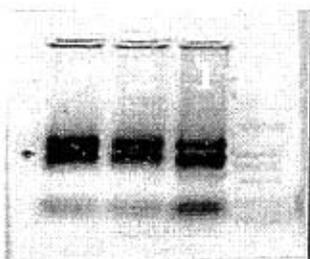


图 1 提取的苎麻总 RNA

Fig. 1 Patterns of total RNA of *Boehmeria nivea*

2.2 逆转录结果检测

图 2 显示的是逆转录结果。其中的 1, 2, 3 分别代表不育系、保持系和恢复系，M 为 DL2000。从图中可以看出，逆转录后的 cDNA 呈弥散带，带的范围在 1500~3000 bp 之间，表明逆转录是成功的。

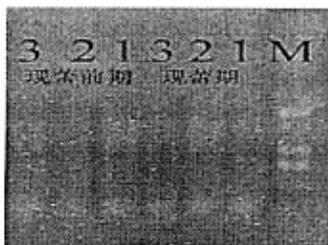


图 2 逆转录后 cDNA 的检测

Fig.2 The detection of cDNA

2.3 *atp6* 和 *apt9* 基因的表达

(1) *atp6* 基因的表达

以第一链 cDNA 为模板，基于已经获得的 *atp6* 基因序列设计特异引物 P1、P2 进行第二链 cDNA 的扩增。*atp6* 基因 2 个特异引物之间的序列长度为 461bp，RT-PCR 检测结果所示位置与我们预期的一致。我们对较为明亮的“三系”现蕾期的 3 条带（图 3）进行克隆、测序，通过与第五章中所获得的线粒体 *atp6* 基因的 DNA 序列进行比对，证

明了两者序列的一致性。

苎麻“三系”4个时期的 RT-PCR 扩增结果如图 3 所示，图中的 1, 2, 3 分别代表不育系、保持系和恢复系，M 为 DL2000。从图中可见 *atp6* 基因在苎麻“三系”叶片中 4 个不同时期都有表达，但表达量存在明显差异：以现蕾期表达最高，开花末期次之，现蕾前期最低。



图 3 苎麻“三系”叶片不同时期 *atp6* 基因的 RT-PCR 分析

Fig.3 RT-PCR analysis of *atp6* gene in the leaves of *Boehmeria nivea* in various stages

(2) *atp9* 基因的表达

同样以第一链 cDNA 为模板，基于已经获得的 *atp9* 基因序列设计特异引物 P1、P2 进行第二链 cDNA 的扩增。*atp9* 基因 2 个特异引物之间的序列长度为 258bp，RT-PCR 检测结果所示位置与我们预期的一致。

苎麻“三系”4个时期的 RT-PCR 扩增结果如图 4 所示，图中的 1, 2, 3 分别代表不育系、保持系和恢复系，M 为 DL2000。从图中可以看出 *atp9* 基因在苎麻“三系”叶片中的 4 个不同时期都有表达。4 个时期的表达中，以开花末期的表达量最高，其它 3 个时期的表达比较接近。

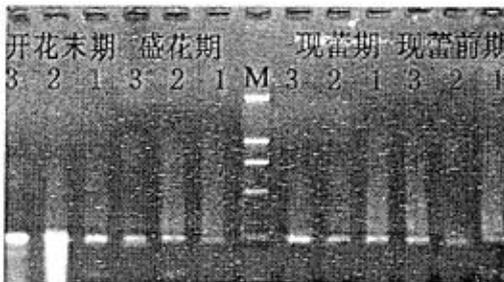


图 4 苎麻“三系”叶片不同时期 *atp9* 基因的 RT-PCR 分析

Fig.4 RT-PCR analysis of *atp9* gene in the leaves of *Boehmeria nivea* in various stages

2.4 RT-PCR 检测条带的比较

用 Glyko Bandscan 软件 (version 5.0) 对苎麻“三系”4个不同时期检测到的条带进行量化分析,大致可以看出不同时期各带的表达水平。根据 Marker 所标示的浓度,我们把 DL2000 中的 500bp 的条带的亮度作为基准浓度 (50ng),其它指示带的亮度就有相应的变化。

(1) *atp6* 基因 RT-PCR 检测条带的比较

表 1 中的 Lane13~11、Lane10~8、Lane7~5、Lane4~2 分别表示现蕾前期、现蕾期、盛花期、开花末期 4 个不同时期, M 为 DL2000。结合图 3 和表 1 可以看出, *atp6* 基因在苎麻“三系”4 个不同时期的叶片中都有表达,只是存在表达量的差异,提示 *atp6* 基因在苎麻中是组成型表达的。

表 1 不同时期 *atp6* 基因 RT-PCR 的表达量比较

Tab. 1 Concentration of reverse transcription products of *atp6* gene in various stages of *Boehmeria nivea*

	DL2000	Lane2	Lane3	Lane4	Lane5	Lane6	Lane7	Lane8	Lane9	Lane10	Lane11	Lane12	Lane13
Row1	80.13												
Row2	93.44												
Row3	79.63												
Row4													
Row5	50.00												
Row6		277.66	237.94	277.47	112.11	181.78	103.54	378.69	479.18	456.31	92.09	139.30	110.01
Row7	55.22												
Row8													
Row9	69.25												

(2) *atp9* 基因 RT-PCR 检测条带的比较

表 2 中的 Lane12~10、Lane9~7、Lane6~4、Lane3~1 分别表示现蕾前期、现蕾期、盛花期、开花末期 4 个不同时期, M 为 DL2000。结合图 4 和表 2 可以看出, *atp9* 基因在苎麻“三系”4 个不同时期的叶片中都有表达,表明 *atp9* 基因在苎麻中也是组成型表达的。

表 2 不同时期 *atp6* 基因 RT-PCR 的表达量比较Tab. 2 Concentration of reverse transcription products of *atp6* gene in various stages of *Boehmeria nivea*

	Lane1	Lane2	Lane3	Lane4	Lane5	Lane6	DL2000	Lane7	Lane8	Lane9	Lane10	Lane11	Lane12
Row1							99.12						
Row2							93.76						
Row3							79.89						
Row4													
Row5							50.00						
Row6													
Row7	129.25	131.76	94.80	82.77	92.71	64.77	46.22	97.85	84.46	88.41	91.50	67.60	40.31
Row8													
Row9							22.38						

3 讨论

人们对植物不育相关基因的表达有过一些研究,但结论不太一致。一般认为,有些基因,尤其像 *atp6*、*atp9* 这样与 ATP 合成酶相关的基因,在花器官中表达而且是差异表达,即同一材料不同时期的表达不一样或不同材料同一时期的表达不一样,而在营养器官中的表达结论不太一致。

曹家树等(2001)对白菜雄性不育两用系花蕾的 mRNA 差别显示及其 cDNA 差异片段进行分析,在用 B0302-4 作探针与花蕾总 RNA 杂交时,不育株显示的杂交信号明显弱于可育株,说明不育株中该基因的表达明显受到了抑制;以 B0302-4 为探针,与叶片总 RNA、茎总 RNA 杂交时,无杂交信号。说明该基因只在花蕾中特异表达,在叶片中不表达。裴雁曦等(2004)用蛋白 SDS-PAGE 电泳研究了榨菜胞质不育系与保持系苗期、抽薹期、盛花期线粒体的差异,发现在 3 个不同发育时期中,不育系比保持系多 1 条特异性表达的多肽,其分子量约为 37 KD;同时还检测到 1 条仅出现于不育系的线粒体特异性多肽,分子量约为 35 KD,该蛋白在保持系的 3 个时期均无表达,在不育系的苗期和抽薹期也未表达。他们认为,可能不同物种间不育机理存在差异,同一属的油菜和榨菜具有相似的不育机制(Wang 等 1995)。陈军方等(2005)在研究中国春小麦时,事先利用电子延伸技术得到一个长达 1604 bp 的序列,通过 RT-PCR 验证时,发现该序列确实在小麦可育花药中表达,在小麦败育花药、叶片和根中不表达。

但胡志勇等(2006)对温州蜜柑不同发育时期及不同组织、器官的 RT-PCR 分析表明,*atp6*、*cob*、*coxII* 基因在叶片、花瓣以及不同时期的花蕾中都有表达,但在幼果中表达量很少或没有表达。其中,在叶片中的表达一般高于花瓣,而在不同时期的花蕾中表达存在差异。张义平等(2003)运用 DDRT-PCR 技术,对红莲优 6 号杂交水稻“三系”不同

发育时期幼苗叶片基因的表达进行了差异分析, 结果发现, 同一材料, 一叶期、三叶期的叶片 cDNA 扩增带型相似, 没有发现基因表达质的差异, 只发现有个别 DNA 条带量上强弱的差异, 说明一叶期与三叶期幼苗叶片基因表达差异很小。关和新等 (1998) 通过对水稻红莲型粤泰不育系和保持系黄化苗及不同发育时期花药的 mRNA 分析发现, 黄化苗与花药、花药不同发育时期扩增带相似; 不育系与保持系黄化苗及相同发育时期花药 mRNA 差异也很少, 绝大多数都有对应的扩增带, 在 mRNA 水平不育系与保持系的差异不如实验前想象的那么大, 更不是有 (保持系) 和无 (不育系) 的关系, 说明绝大多数基因都是组成型表达的。高凤华等 (2006) 对水稻滇一型不育系及保持系花药 mRNA 进行了差异分析, 结果显示不育系和保持系花药 mRNA 间差异很少, 不育系和保持系间不同发育时期花药的 cDNA 带型相似, 同时期不育系和保持系间花药的 cDNA 带型也很相似, 同样证明了多数基因都是组成型表达。

植物的雄性不育是一个复杂的发育过程, 涉及多个组织的分化和大量基因的协同表达, 且多数花药的特异表达基因具有严格的时空顺序, 花药发育所需的基因一旦发生突变, 就会使花粉不能正常发育而导致雄性不育, 所以研究育性基因的表达多以花药作为材料。本实验由于很难采集到花药, 所以只有选择不同时期的叶片进行基因表达分析。从叶片样品分析结果看, 苎麻的 *atp6*、*atp9* 基因在“三系”的 4 个不同时期的叶片中都有表达, 表明 *atp6*、*atp9* 基因在苎麻中是组成型表达。但 *atp6* 基因在 4 个不同时期的叶片中出现表达量的差异, 应该与线粒体 F (0)、F (1) -ATP 合成酶有某些相关性。可能 *atp6* 基因在 4 个不同时期与某些基因相互作用, 共同参与了育性的调控和表达, 影响了 ATP 的合成, 从而影响了花粉的形成, 最终产生不育和可育性状 (Bergman 等 2000)。*atp6* 基因在“三系”4 个时期中的表达量以现蕾期最高, 开花末期次之, 蕾前期和盛花期表达量最低; 除开花末期之外, 其余 3 个时期都是不育系和恢复系的表达量弱于保持系, 这与袁美等 (2003) 对油菜的研究结果相吻合。*atp9* 基因在不同时期的表达量表现为, 在现蕾期, 不育系与保持相当, 而恢复系最高, 现蕾前期和盛花期则恢复系表达量最高, 保持系次之, 不育系最小。这暗示了 *atp9* 基因的转录可能受到恢复基因 Rf 的调控, Rf 共同参与了苎麻的育性调控。这方面的工作也有待进一步的深入研究。

小结

本研究利用本项目组在前期工作中培育的不育系和保持系, 以及通过测交选择的恢复系为研究对象。其中的不育系与保持系苧麻来源于同一品种的孤雌生殖诱导后代。由于苧麻组织中, 酚类、粘状物及黄酮类等次生代谢物质的含量较多, 纤维含量也较高, DNA 的提取与纯化相当困难。对苧麻总 DNA 和线粒体 DNA 的提取方法进行了适当的改进。利用 ISSR 方法分析了苧麻“三系”总 DNA 和线粒体 DNA, 检测到了在总 DNA 水平和线粒体 DNA 水平上“三系”之间存在明显的 ISSR 多态性。无论是以苧麻总 DNA 还是线粒体 DNA 为对象, 发现苧麻中保持系与不育系的差异程度都比不育系与恢复系的差异程度要小, 其中不育系和保持系之间的多态性差异可能与育性相关。

先是设计简并引物扩增苧麻“三系”*atp6*、*atp9* 基因的部分片段, 然后根据 DNA walking 策略进行两端延伸, 都是根据线粒体基因组具有保守性的特点, 通过与 Genbank 中公布的其它植物与雄性不育相关的序列进行比对并进行相关分析, 表明我们已经克隆到了完整的 *atp6*、*atp9* 基因。

通过同源性比较分析发现, 苧麻 *atp6* 基因与某些植物同类基因的相似性很高, 而苧麻 *atp9* 基因则与其他植物同类基因的相似性略低。推测所克隆的苧麻 *atp6* 基因可能与雄性不育性相关, *atp9* 基因可能与育性没多大关系。RT-PCR 策略分析 *atp6*、*atp9* 基因的表达模式, 在不同时期的叶片中苧麻“三系”都是组成型表达。

本实验首次克隆到了苧麻“三系”的 *atp6*、*atp9* 基因, 这方面的研究国内外还没有见到报道; 利用分子生物学方法对苧麻雄性不育的研究也无报道, 所以本研究结果具有一定的创新性。

参 考 文 献

- 陈军方, 任正隆, 孔秀英, 等. 小麦中雄性不育同源序列的分离、鉴定及表达分析. 遗传学报, 2005, 32 (6) : 566~570
- 陈学军, 陈竹君, 张耀洲. 榨菜线粒体 DNA 雄性不育相关片段克隆及序列分析. 应用与环境生物技术学报, 2003, 9 (5) : 513~516
- 陈章良主编. 精编分子克隆指南. 北京: 中国农业出版社, 1999
- 邓启云, 盛孝邦, 段美娟, 等. 籼型光温敏核不育水稻雄性不育性遗传研究. 杂交水稻, 2001, 16 (3) : 47~51
- 盖树鹏, 孟祥栋. 简易、快速提取大葱叶绿体、线粒体 DNA 的方法. 农业生物技术学报, 2000, 8 (3) : 262~266
- 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作. 北京: 北京大学出版社, 1995
- 关和新, 景润春. 水稻不育系和保持系不同发育时期花药 mRNA 差异展示. 中国水稻科学, 1998, 12 (4) : 215~218
- 郭传友, 黄坚钦, 王正加. 山核桃基因组 DNA 提取方法的比较研究福建林业科技, 2004, 31(2): 12~15
- 胡志勇, 全铸, 徐强, 等. 温州蜜柑线粒体基因的克隆与表达分析. 园艺学报, 2006, 33(3): 484~490
- 黄小英, 刘瑛, 赖小萍, 等. 用 CTAB 法提取苎麻总 DNA 试验. 江西农业学报, 2001, 13 (4) : 40~42
- 黄占景, 银柱, 刘植义, 等. 小麦 T 型细胞质雄性不育系与其相应保持系线粒体 DNA 的 RAPD 分析. 遗传, 1997, 19 (4) : 8~11
- 季 静, 王 罡, Serieys H, 等. 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
- 揭雨成等. 苎麻不同基因型亲缘关系的 RAPD 分析. 中国麻作, 1999, 21 (1) : 1~6
- 李传友, 伏健民. 高等植物线粒体基因组研究进展. 应用与环境生物技术学报, 1998, 4 (2) : 200~207
- 李传友, 王斌. 小麦 K 型及 V 型细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的比较分析. 植物生理学报, 1998, 24 (2) : 153~158
- 李传友, 谢伟武, 孙兰珍, 等. 普通小麦三种细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的比较研究. 遗传学报, 1995, 22 (4) : 272~279
- 李大东, 王斌. 水稻线粒体 *atpA* 基因的克隆及其与细胞质雄性不育的关系. 遗传, 1990, 12 (4) : 1~4

- 李继耕. 叶绿体遗传与细胞质雄性不育性. 中国农业科学, 1983, 1: 49~52
- 李继耕. 细胞质雄性不育的分子机理. 遗传, 1992, 14 (2) : 37~40
- 李明芳. 荔枝 SSR 标记的研究及其部分荔枝种质的遗传多样性分析[学位论文]. 广州: 华南热带农业大学, 2003
- 李小明, 郑用琰, 张方东, 等. 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析. 遗传, 2000, 22 (4) : 201~204
- 李宗菊, 熊丽, 桂敏, 等. 非洲菊基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增模板浓度优化. 云南植物研究, 2004, 26 (4) : 439~444
- 凌杏元, 周培疆, 关和新, 等. 运用 AFLP 技术筛选野败型水稻 mtDNA 中与雄性不育性状相关的片段. 遗传, 1999, 21 (2) : 33~36
- 凌杏元, 周培疆, 黄青阳, 等. 红莲型水稻细胞质雄性不育相关 mtDNA 片段的分离及序列测定. 实验生物学报, 2000, 33(2): 151~154
- 凌杏元, 周培疆, 朱英国. 植物细胞质雄性不育分子机理研究进展. 植物学通报, 2000, 17(4): 319~332
- 刘飞虎等. 苧麻雄性不育系育性鉴定和遗传分析. 中国麻作, 2000a, 22 (1) : 6~9
- 刘飞虎等. 苧麻雄性不育系温光反应特性研究. 江西农业大学学报, 2000b, 22 (1) : 20~23
- 刘飞虎等. 苧麻雄性不育系生理生化特点初步研究. 中国麻作, 2000c, 22 (3) : 16~20
- 刘飞虎, 郭清泉, 郑思乡, 等. 苧麻种质资源研究导论. 中国农业出版社, 2002
- 刘杰, 崔成日, 崔崇士, 等. 洋葱细胞质雄性不育系与相应保持系线粒体 DNA 的 RAPD 分析. 东北农业大学学报, 2004, 35 (3) : 322~324
- 刘军, 朱英国, 扬金水. 马协型细胞质不育水稻的线粒体 DNA 研究. 作物学报, 1998, 24(3): 315~319
- 刘炎生, 汪训明. 利用线粒体 DNA 酶切电泳带型对水稻雄性不育细胞质源的分类. 上海农业学报, 1989, 15 (2) : 7~14
- 刘炎生, 汪训明, 王蕴珠, 等. 水稻线粒体 *CoxI*、*CoxII* 基因组织结构差异的分析. 遗传学报, 1988, 15 (5) : 348~354
- 刘忠松, 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
- 刘祚昌, 赵世明. 水稻细胞基因组翻译产物与细胞雄性不育. 遗传学报, 1989, 6 (1) : 14~19
- 梅启明, 朱英国. 红莲型和野败型水稻细胞质不育系线粒体 DNA (mtDNA) 的比较研究. 武汉植物学研究, 1990, 8 (1) : 25~33

- 裴雁曦, 陈竹君, 曹家树. 榨菜胞质雄性不育系与保持系间线粒体和叶绿体多肽比较. 西北植物学报, 2004, 24(8): 1511~1513
- 秦泰辰. 作物雄性不育性育种原理与方法. 上海: 上海科学技术出版社, 1978
- 乔玉山, 章镇, 沈志军. 中国李基因组 DNA 提取方法的优化. 上海交通大学学报. 农业科学版, 2004, 22(2): 138~142
- 仇艳光, 沈银柱, 黄占景, 等. 普通小麦 T 型细胞质雄性不育系及其保持系线粒体 DNA 的比较研究. 遗传学报, 2001, 28 (2) : 166~170
- 邱英雄, 傅承新, 孔航辉. 杨梅不同品种的 ISSR 分析, 2002, 10 (4): 343~346
- 孙兰珍, 姚方印, 李传友, 等. 小麦 T、K、V 型胞质不育系和杂种 mtDNA 的 RAPD 分析及育性相关片段的克隆. 作物学报, 2001, 27: 144~148
- 田志宏, 郑用珪, 孟金陵. 几个甘蓝型油菜细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的 RFLP 分析. 遗传, 1998, 20 (增刊) : 22~26
- 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 (第二版). 北京: 科学出版社, 2002
- 王文明, 周开达. 水稻线粒体基因组的研究进展. 西南农业学报, 1998, 11, 62~66
- 王学德(2000). 细胞质雄性不育棉花线粒体蛋白质和 DNA 分析. 作物学报, 26 (1) : 35~39
- 王学德, 朱英国. 水稻雄性不育与可育花药的 miRNA 差别显示和 cDNA 差别片段的分析. 中国科学 (C 辑), 1998, 28 (3) : 257~263
- 王永飞, 马三梅, 张鲁刚, 等. 大白菜细胞质雄性不育系 RAPD 特异扩增片段的克隆及其序列分析. 西北植物学报, 2003, 23 (1) : 49~53
- 王岳光, 杨典洱, 王琳清, 等. 小麦辐射雄性不育系 89AR 及其保持系和恢复系线粒体 DNA 的 RAPD 分析. 麦类作物学报, 22 (2) : 1~4
- 谢建坤, 舒庆尧, 陈大洲, 等. 水稻细胞质雄性不育育性恢复遗传研究. 浙江大学学报, 2002, 28 (4) : 373~378
- 许仁林, 谢东, 师熹云, 等. 水稻线粒体 DNA 雄性不育有关特异片段的克隆及序列分析. 植物学报, 1995, 37 (7) ; 501~506
- 杨剑波, 汪秀峰, 赵成松, 等. 水稻线粒体 DNA 中与雄性不育系有关特异片段的克隆及序列分析. 遗传学报, 2002, 29 (9) : 808~813
- 杨金水, 葛扣麟, Virginia Walbot. 水稻 BT 型不育系与保持系线粒体 DNA 的酶切电泳带型. 上海农业

- 学报, 1992, 8(1): 1~8
- 杨金水, Virginia Walbot. 水稻线粒体 DNA 酶切带型研究. 遗传学报, 1993, 20 (3) : 235~244
- 杨金水, Virginia Walbot. 水稻野败不育系与保持系的线粒 DNA 限制酶切图谱分析. 作物学报, 1995, 21 (2) : 181~187
- 姚方印, 孙兰珍, 李传友, 等. 3 种小麦细胞质雄性不育系及其杂种线粒体 DNA 的 RFLP 分析. 西北植物学报, 2000, 20 (5) : 707~714
- 姚庆荣, 赵长征, 王文泉. 荔枝基因组 DNA 提取与 SSR 反应条件优化. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(2): 131~135
- 姚鸿, 谢伟武, 李传友. D² 型小麦细胞质雄性不育系及其保持系和恢复系线粒体 DNA 的比较研究. 遗传学报, 1998, 25 (1) : 67~63
- 袁美, 杨光圣, 傅廷栋, 等. 甘蓝型油菜 *pol* CMS 育性恢复基因对 *orf224/atp6* 的转录调控. 遗传学报, 2003, 30 (5) : 469~473
- 袁自强, 杨金水. 线粒体和细胞核的互作. 遗传, 1999, 21 (6) : 54~58
- 曾强成, 郑世英, 沈亮, 等. 金丝小枣基因组 DNA 的优化提取方法, 2004, 15 (2): 152-153
- 张赛群, 张方东, 肖海林, 等. 玉米 S 型 CMS 线粒体 DNA R 区及其 *orf77* 的表达研究. 遗传学报, 2003, 30(3): 277~282
- 张义平, 陈学峰, 熊建华, 等. 红莲优 6 号杂交水稻与亲本三系不同发育时期幼苗叶片基因表达差异分析. 武汉植物学研究, 2003, 21 (1) : 27~30
- 赵世明, 刘祚昌. WA 型、BT 型和 D 型水稻雄性不育系细胞质基因组翻译产物分析和研究. 遗传学报, 1994, 21 (5) : 393~397
- 周长久. 萝卜雄性不育性的几种特性研究. 园艺学报, 1994, 21 (1) : 65~70
- 朱英国主编. 水稻雄性不育的生物学. 武汉大学学术丛书 (武汉大学出版社), 2000
- 卓德良, 叶正祥. 正常和细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 限制性内切酶图谱分析. 复旦大学学报(自然科学版). 1988, 27 (4) : 367~373
- Akagi H, Sakamoo M, Shinjyo C *et al.* A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Curr Genet*, 1994, 25(1): 52~58
- Akagi H, Nakamura A, Sawada R *et al.* Genetic diagnosis of cytoplasmic male sterile hybrid plants of rice. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 948~953
- Aviv D, Galun E. Restorer of fertility in cytoplasmic male sterility *Nicotiana sylvestris* by fusion with

- X-irradiated *N. tabacum* protoplasts. *Theor Appl Genet*, 1980, 58(3): 121~127
- Boeshore M L, Hanson M R, Izhar S. A variant mitochondrial DNA arrangement specific to *Petunia* stable sterile somatic hybrids. *Plant Mol Biol*, 1984, 4(2): 125~132
- Chen Z, Muthukrishnan S, Liang G H, et al. A chloroplast DNA deletion located in RNA polymerase gene *rpoC2* in CMS lines of Sorghum. *Mol Gen Genet*, 1993, 236: 251~259
- Clark E M, Izhar S, Hanson M R. Independent segregation of the plastid genome and cytoplasmic male sterility in somatic hybrids. *Mol Gen Genet*, 1995, 199: 440~445
- Dally A, Second G. Chloroplast DNA diversity in the wild and cultivated species of rice: Cladistic mutation and genetic-distance analysis. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 209~222
- Dewey R C, Levings C S III, Timothy D H. Novel recombination in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell*, 1986, 44: 439~449
- Dieterich J H, Braun H P, Schmitz U K. Alloplasmic male sterility in *Brassica napus* (CMS 'Tournafortii-Stiewe') is associated with a special gene arrangement around a novel *atp9* gene. *Mol Genet Genomics*, 2003, 269(6): 723~731
- Fauron C M R, Havlik M, Brettel R I S. The mitochondrial genome organization of a maize fertile CMS T revertant line is generated through recombination between two sets of repeats. *Genetics*, 1990, 124: 423~428
- Forde B G, Leaver C J. Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondria polypeptides in male-sterile maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 418~422
- Forde B G, Oliver R J C, Leaver C J. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 75: 3841~3845
- Gray M W, Hanic joyce P J, Coello P S. Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Plant Mol Biol*, 1992, 43: 145~147
- Hanson M R. Plant mitochondrial mutations and male sterility *Annu. Rev. Genet.*, 1991, 25: 461~486
- Hanson M R, Folkerts O. Structure and function of higher plant mitochondrial genome. In: *Mitochondrial genomes*, edited by Wolstenholme D R, Jeon K, Academic Press, Inc. 1992, 141: 129~172
- He S, Abad A R, Gelvin S B, Mackenzie S A. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11763~11768

- Horn R, Hustedt J E G, Horstmeyer A. The CNS-associated 16 KD protein encoded by *orf H522* in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasms of sunflower. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 523-538
- Horn R, Kohler R H, Zetsche K. A mitochondrial 16 KD protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 29-36
- Ishii T. Comparative study on the chloroplast, mitochondrial and nuclear genome differentiation in two cultivated rice series, *Oryza sativa* and *O. glaberrima*, by RFLP analysis. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 88-96
- Iwahashi M, Kyojuka J, Shimamoto K. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO*, 1993, 12(4): 1437-1446
- Joseph Sambrook, David W. Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, 2003
- Kadowaki K. Mitochondrial DNA polymorphism in male-sterile cytoplasm of rice. *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 234-236
- Kadowaki K, Harada K. Differential organization of mitochondrial genes in rice with normal and male sterile cytoplasm. *Jpn J Breed*, 1989, 39: 179-186
- Kadowaki K, T Suzuki and S Kazama. A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. *Mol Gen Genet*, 1990, 224: 106-116
- Kaleiku E K, et al. Structure and expression of the rice mitochondrial apocytochrome b gene(*Cob1*) and pseudogene (*Cob2*). *Mol Gen Genet*, 1992, 22: 463-470
- Kohler R H, Horn R, Lossl A. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol Gen Genet*, 1991, 227: 369-376
- Landgren M, Zetterstrand M, Sundberg E, Glimelius K. Alloplasmic male-sterile Brassica lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol Biol*, 1996, 32: 879-890
- Levings III C S, Brown G G. Molecular Biology of plant mitochondria. *Cell*, 1989, 56: 171-179
- Levings III C S, Pring D R. Restriction endonuclease analysis of mtDNA from normal and Texas male sterile maize. *Science*, 1976, 193: 158-160

- Levings C S, Pring D R. The Texas Cytoplasm of Maize. *Science*, 1990, 250: 942~947
- Lonsdale D M. A review of the structure and organization of the mitochondrial genome of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 1984, 12, 201~206
- Makaroff C A, Apel K J, Palmer J D. The *atp6* coding region has been disrupted and novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic male-sterile radish. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 11706~11713
- Mulhopadhyay A, Arumugam N, Pradhan A K, et al. Somatic hybrids with substitution type genomic configuration TCBB for the transfer of nuclear and organelle genes from *Brassica tournefortii* TT to allotetraploid oilseed crop *B. carinata* BBCC. *Theor Appl Genet*, 1994, 89 (1) : 19~25
- Primard C, Vedel F, Mathieu C, et al. Interspecific somatic hybridization between *Brassica napus* and *Brassica hirta*. *Theor Appl Genet*, 1988, 74(4): 546~552
- Pruitt K D, Hanson M R. Transcription of the *Petunia* mitochondrial CMS- associated Pcf locus in male sterile and fertility-restored lines. *Mol Gen Genet*, 1991, 227 (3) : 348~355
- Scotti N, Card T, Marechal-Drouard L. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue. *Plant Mol Bio Rep*, 2001, 19: 67a~67h
- Smart C J, Moneger F, Leaver C J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell*, 1994, 6(6): 811~825
- Soferman A O, Yesodi V, et al. Detection of an open reading frame related to the CMS-associated urf-s in fertile *Petunia* lines and species and in other fertile Solanaceae species. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 308~311
- Song J, Hedgcoth C. Influence of nuclear background on transcription of a chimeric gene(*orf256*) and *coxI* in fertile and cytoplasmic male sterile wheats. *Genome*, 1994, 37: 203~209
- Vedel F, Mathieu C. Physical and gene mapping of chloroplast DNA from normal and cytoplasmic male sterile (radish cytoplasm) lines of *Brassica napus*. *Curr Genet*, 1983, 7(1):13~20
- Walbot V. RNA editing fixes problems in plant mitochondrial transcripts. *Trends Genet*. 1991, 7: 37~39
- Waltes T W, Earle E D. Organellar segregation, rearrangement and recombination in protoplast fusion-derived *Brassica oleracea* calli. *Theor Appl Genet*, 1993, 85:
- Wise R P, Fliss A E, Pring D R, et al. Urf13-T of T cytoplasm maize mitochondria encodes a 13KD

- polypeptide. *Plant Molecular Biology*, 1987, 9: 121~126
- Xie W W, *et al.* Molecular characterization of a new type of cytoplasmic male sterile sugar beet. *Science in China(Series C)*, 1996, 39(1): 54~62
- Yamaguchi H. Kakiuchi H. Electrophoretic analysis of mitochondrial DNA from normal and male-sterile cytoplasms in rice. *Jpn J Genet*, 1983, 58: 607~611
- Yong E G, *et al.* A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male-sterility is developmentally regulated. *Cell*, 1993, 50: 41~49

附录：发表文章

1. FEI-HU LIU, SI-MING HOU, XUE-NI LIANG. Gas exchange characteristics of four domesticated *Primula* species. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2006, 34: 403~411
2. 侯思名, 段继强, 梁雪妮, 等. 苜蓿细胞质雄性不育系与保持系线粒体 DNA 的 ISSR 检测. *植物生理学通讯*, 2006, 42 (4) : 705~707
3. 侯思名, 段继强, 梁雪妮, 等. 苜蓿总 DNA 提取的 CTAB 法优化方案. *西北植物学报*, 2005, 25 (4) : 2193~2197
4. 刘明求, 侯思名, 等. 转基因 SOD、POD 高表达烟草幼苗抗热性研究. *云南农业大学学报*, 2005, 20 (5) : 620~623
5. 侯思名, 谭学林. 水稻滇一型不育系和保持系线粒体 DNA 差异的 AFLP 检测. *云南大学学报*, 2005, 18 (4) : 367~369

致 谢

本论文是在导师刘飞虎教授的悉心指导下完成的。从论文的选题、实验设计及整个研究过程的许多环节及论文的修改，无不倾注了刘老师的无数心血。刘老师博大的胸怀、谦虚的仁者之风、渊博的学识、严谨的治学态度以及全盘的大局观，对我影响深刻，并将让我终生受益。

衷心感谢程在全老师、鄢波老师、谭德勇老师、李宗菊老师在论文开题和写作方面给与的指导和帮助。

衷心感谢医学研究所的胡凝珠老师在分子克隆方面提供的帮助和一些试剂支持。

衷心感谢云南省农科院生物所丁玉梅老师以及其实验室老师和同学，对本论文后期的RNA工作提供的环境和热心帮助。

衷心感谢杨正安、范志祥、杜威、吴丽艳、杜光辉、李建勇、段继强、李飞、赖月群、刘旋、唐爱萍、王辉等本实验室的同学给予的学习和工作上的帮助。

衷心感谢杨雪、汤红敏、周玮等同学好友这几年来生活和学习上的关爱和帮助；感谢云南大学生命科学学院的和丽奇老师对我家庭生活上的鼎力相助。

衷心感谢育种基地的爷爷、奶奶这几年来对研究材料的精心照料，感谢它们在学习和生活中给予的关心和帮助；感谢师母梁雪妮这几年来对我的学习和生活以及我家人生活上的关系和帮助，感谢她对实验过程的指导和论文的指点。

感谢我远在家乡的母亲和兄弟姐妹的关怀和希冀、感谢我的妻子和儿子在生活中对我的关心和给予我的生活乐趣、感谢我的岳父母对我们全家的照顾。正是他们的无私的关怀和帮助，使我能全身心地投入到我的工作中，他们仍然会成为我日后工作的和学习的坚强后盾。

还有许多曾经帮助和关心过我的老师和同学，在此一并表示感谢！

感谢国家自然科学基金（30360058）“苎麻雄性不育相关基因的克隆和表达分析”项目的资助。

侯思名

2007年5月