

利用 cDNA-AFLP 技术鉴定甘蓝显性核不育基因相关表达序列

娄 平¹ 王晓武^{1*} Guusje. Bonnema² 方智远¹⁽¹⁾中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ⁽²⁾Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Wageningen 6700AJ, Netherlands)

摘 要: 利用 cDNA-AFLP 技术, 比较分析了一个甘蓝与两个青花菜自交系回交转育的显性核基因雄性不育材料与对应可育亲本植株花蕾发育过程中基因表达的差异。将花蕾混合提取 RNA 合成 cDNA 建立 6 个 cDNA 池, 分析 128 个引物组合获得了 26000 个片段, 共鉴定 24 个片段与雄性不育相关, 其中 13 条表现为质的差异, 11 条表现为量的差异; 将其中引物组合 A16T15 产生的 300 bp 左右的差异片段进行克隆测序, BLAST 结果表明, 该序列与花粉特异性相关的硫氧还蛋白氨基酸序列同源性达 89%。

关键词: 甘蓝; 显性核不育; cDNA-AFLP; 差异表达序列

中图分类号: S 635 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0668-05

选育可利用的雄性不育系用于生产一代杂种是长期以来国内外遗传育种工作者研究的热点。1979 年中国农业科学院蔬菜花卉所甘蓝育种组从甘蓝原始材料 79-399 的自然群体中获得雄性不育株, 通过研究明确其不育性受一对显性核基因控制, 并且通过选育已经育成可利用的显性雄性不育系^[1]。在此基础上进行了该不育基因的 RAPD 标记, 并已经转化为稳定的 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) 和 ERPAR (Extended Random Primer Amplified Region) 标记^[2,3]。对该甘蓝显性雄性不育材料花药发育细胞学研究表明, 其不育花花药的发育过程中, 四分体孢子不能从胼胝质里释放出来, 致使小孢子逐渐发生败育, 从而引起雄性不育^[4]。说明在四分体发育中, 雄性不育基因阻断或抑制了正常小孢子发育基因的表达, 从而导致小孢子不能正常发育。有关该显性核不育材料在小孢子发育过程中基因表达上的差异尚未见报道。利用分子生物学技术, 对不育基因的表达差异进行研究, 从差异表达的产物中找到与雄性不育基因相关的差异表达片段, 通过文库的筛选等手段最终达到克隆基因的目的是目前国内外雄性不育研究的重要内容。cDNA-AFLP 技术是研究基因表达的一种快速有效方法, 与常规差异显示相比具备许多优点, 目前已经广泛应用于分子生物学的各个领域^[5~8]。本研究利用该技术研究甘蓝在小孢子发育中一些与显性核不育相关基因在转录水平上的表达, 旨在对显性雄性不育的机理和小孢子发育研究提供分子生物学依据。

1 材料与方 法

1.1 甘蓝材料的准备

试验材料为甘蓝自交系 23202 显性不育回交 BC₇ 分离群体, 青花菜自交系 B8551 及 B8590 的显性雄性不育回交转育的 BC₆ 代分离群体, 均来自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。所用 3 个不育系的显性雄性不育基因均来源于相同甘蓝雄性不育突变株。

1.2 BSA 分析

采用 BSA (Bulk Segregation Analysis) 的策略, 选取分离后代不同发育阶段的花蕾构建不育 cDNA 池和可育 cDNA 池。当第一朵花开放时, 从花序最低端花蕾开始取样, 一直到花序顶端的最小可见花

收稿日期: 2002-12-06; 修回日期: 2003-03-05

基金项目: 农业部蔬菜遗传与生理重点实验室项目; 中-荷联合园艺作物基因组技术实验室资助项目

* 通讯作者, 项目主持人。

蕾,然后将这些花蕾混合,共建 6 个池(表 1)。混合花蕾取样法参见文献 14。

1.3 RNA 提取与双链 cDNA 的合成

花蕾总 RNA 提取采用 Trizol 试剂盒(GIBCO, Life Technologies),按 Trizol 试剂盒说明书上的方法进行。取 0.1 g 混合花蕾液氮研磨后加入 1.2 mL Trizol 缓冲液,最后 RNA 溶于 20 μ L DEPC 水中。总 RNA 用 DNase (AMERSHAM PHARMACIA)室温处理 30 min 后用于 cDNA 合成。

第 1 链的合成采用 Superscript II 逆转录酶(GIBCO, Life Technologies),方法依照使用说明;第 2 链的合成使用 TAKARA Ribonuclease H 和 *E. coli* DNA Ligase,方法参照 TAKARA 生产的 *E. coli* DNA Ligase 使用说明。合成后的双链 cDNA 经氯仿抽提纯化后溶于 20 μ L 超纯水中。

1.4 cDNA-AFLP 差异显示

cDNA-AFLP 体系及程序参照 Christian 等^[9]的方法,使用 Licor 公司生产的 IR² DNA Analyzer 5200 型测序仪电泳分析。利用荧光标记的 AseI 引物和非荧光标记的 TaqI 引物,其中选用荧光标记引物 8 个和非荧光标记引物 16 个,共 128 个引物组合进行差异片段筛选。

1.5 差异片段回收及克隆测序

由于采用荧光标记引物和 Licor DNA 自动测序仪,所以差异片段无法回收。将产生差异片段引物组合的 PCR 产物在 6% 的丙稀酰胺胶上分离,通过银染显色,银染方法参照文献 [9]。用刀片切取差异条带,浸泡在高盐缓冲液中(20% 乙醇, 1 mol·L⁻¹ LiCl, 10 mmol·L⁻¹ Tris) 24 h, 65℃ 水浴 2 h, 然后氯仿抽提,乙醇沉淀后吹干, DNA 溶于 40 μ L 水中。取 5 μ L 用作模板在相同的 PCR 条件下重新扩增,程序为 95℃ 5 min 变性, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环后 72℃ 10 min^[10,11]。

扩增产物在 1% 的琼脂糖上分离,检验差异片段的大小是否正确,利用 TAKARA 公司 PMD18-T 载体克隆差异片段后,由季康生物技术公司代为测序。

1.6 序列比较分析

获得序列利用 BLAST 联网服务(NCBI, National Center for Biotechnology Services)进行比较,将获得的差异序列利用 BLAST N 和 BLAST X 程序与数据库中所有序列进行比较,如没有显著同源性,再用 BLAST N 程序与芸薹属 EST 库中的序列进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝、青花菜雄性不育系与可育系花蕾发育过程中差异表达基因分析

分析甘蓝显性核不育材料不育与对应可育亲本在花蕾发育过程中差异表达片段,提取植株花蕾的 RNA 合成 cDNA,利用 AseI 2 个选择性碱基荧光标记引物和 TaqI 2 个选择性碱基共 128 个引物组合,从 6 个池中扩增出大约 26000 条(大于 100 bp)清晰可见的条带,其中有下列条带类型:Ⅰ在所有池中均出现的条带,占 53.8%,来源于甘蓝与青花菜共有的一些保守基因;Ⅱ在甘蓝池中出现,而在青花菜中不存在的差异,占 41.6%,是一些甘蓝与青花菜两种作物间存在的背景差异造成的;Ⅲ只在青花菜中可育池与不育池存在的差异片段或只在甘蓝不育池与可育池中存在的差异,约占 4%,可能两种基因参与作用,一是只与青花菜或甘蓝的花蕾发育有关的一类基因;二是甘蓝或青花菜所特有的与雄性不育表达有关的基因;Ⅳ在青花菜与甘蓝可育与不育池中同时存在的差异表达条带,共 24 条,占总条带数的 0.28%,即与显性核不育表达相关的片段,因为在本试验中无论青花菜还是甘蓝

表 1 6 个池中材料的来源背景及育性情况

Table 1 Background of the materials in six pools

池编号	来源背景	自交系	单株数	育性
Pool codes	Background	Lines	Individuals	Fertile or sterile
BS1	青花菜 Broccoli	8551	6	不育 Male sterile
BF1	青花菜 Broccoli	8551	6	可育 Fertile
BS2	青花菜 Broccoli	8590	5	不育 Male sterile
BF2	青花菜 Broccoli	8590	5	可育 Fertile
CS	甘 蓝 Cabbage	23202	6	不育 Male sterile
CF	甘 蓝 Cabbage	23202	6	可育 Fertile

的雄性不育均来源于同一个甘蓝雄性不育突变体的回交转育,为同一个基因所控制。结果见图 1 (图中仅显示 6 条Ⅳ类差异条带,其他 18 条见表 2)。

在所有可育池与不育池中扩增出的具有共同差异的条带有两类,第一类是扩增质的差异(有或无),模式如图 1, B 所示;第二类是扩增量的差异(条带的深或浅)见图 1, C。由于 cDNA-AFLP 技术显示的是植物在表达水平上的差异,所以无论扩增质的差异还是扩增量的差异,均能正确反映出基因在整个发育阶段的表达变化。试验中一些差异条带只是在扩增量上存在差异,表明在不育植株和可育植株在花蕾的发育过程中,一些基因在不同发育阶段只是在表达量上存在不同。本试验优先回收具有扩增质差异的片段。已经确认与雄性不育有关的差异片段见表 2。

表 2 与显性核不育相关片段的引物组合、分子量及表现模式

Table 2 The primer combinations, sizes and pattern of the differential bands related to dominant male sterility

引物组合 Primer combin- ations	分子量 Sizes (bp)	表现模式 (质或量) Quali- or quantitative	引物组合 Primer combin- ations	分子量 Sizes (bp)	表现模式 (质或量) Quali- or quantitative
A16T15	300	质 Qualitative	A14T21	250	质 Qualitative
A16T15	180	质 Qualitative	A15T11	295	质 Qualitative
A19T16	115	量 Quantitative	A15T12	218	量 Quantitative
A11T26	228	质 Qualitative	A15T12	300	质 Qualitative
A11T26	245	质 Qualitative	A15T12	330	质 Qualitative
A12T15	240	质 Qualitative	A15T24	297	量 Quantitative
A12T21	135	量 Quantitative	A16T17	260	量 Quantitative
A12T24	110	质 Qualitative	A16T19	128	质 Qualitative
A13T14	245	质 Qualitative	A16T20	258	量 Quantitative
A13T23	100	量 Quantitative	A17T13	170	量 Quantitative
A14T12	300	量 Quantitative	A17T19	330	量 Quantitative
A18T18	300	量 Quantitative	A18T11	120	质 Qualitative

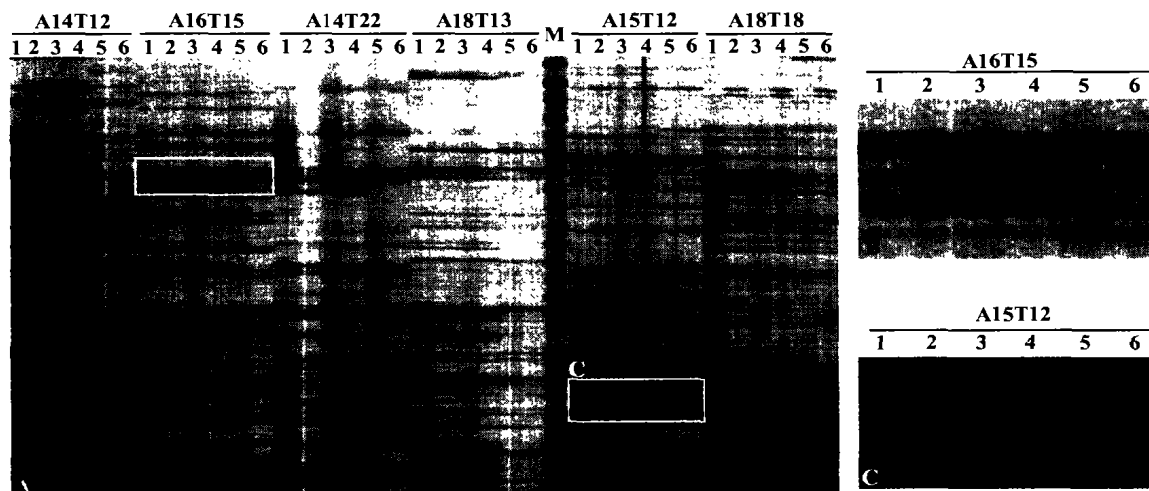


图 1 甘蓝及青花菜雄性不育及可育池花蕾发育中 cDNA-AFLP 差异显示图谱 (A) 及引物组合 A16T15 (B)

和 A15T12 (C) 差异显示部分放大图片

1. BS1 (青花菜不育池); 2. BF1 (青花菜可育池); 3. BS2 (青花菜不育池); 4. BF2 (青花菜可育池); 5. CS (甘蓝不育池); 6. CF (甘蓝可育池)。A14T12, A16T15, A14T22, A18T13, A15T12, A18T18 代表不同引物组合。

Fig. 1 cDNA-AFLP differential display profile between cabbage and broccoli fertile and male sterile line pools during the flower bud development (A) and enlarged section of profile created by primer combination A16T15 (B) and A15T12 (C)

1. BS1 (Broccoli sterile pools); 2. BF1 (Broccoli fertile pools); 3. BS2 (Broccoli sterile pools); 4. BF2 (Broccoli fertile pools); 5. CS (Cabbage sterile pools); 6. CF (Cabbage fertile pools). A14T12, A16T15, A14T22, A18T13, A15T12, A18T18 present primer combination respectively.

2.2 与显性核不育基因表达相关序列分析

由试验材料的遗传背景可以看出,由于采用多代回交的甘蓝为材料,不育与可育材料之间的遗传背景已经相当一致,它们之间的差异可以初步认定由雄性不育基因引起。另外同时分析了青花菜显性核不育回交的两个株系,来验证差异的可靠性。由于 3 个不育材料的显性核不育基因均来自同一雄性不育突变体 79-399,所以试验 6 份材料中不育与可育共同的差异是由显性核不育基因表达引起的。选

取通过引物组合 A16/T15 产生的大约为 300 bp 左右差异片段, 暂时命名为 MSr01, 回收后用 T 载体克隆后测序, 其序列用 BLAST 软件与 NCBI 数据库中已知序列进行同源性分析。序列比对结果表明 MSr01 的序列与拟南芥第 2 条染色体 CHR2v07142002 序列 (Thioredoxin) 同源性为 88%, E 值为 $8e-64$ 。进一步进行蛋白水平上的同源性比较, 该序列所编码的蛋白与硫氧还蛋白的氨基酸序列同源性为 89%, E 值为 $1e-34$ 。序列对比结果如图 2。

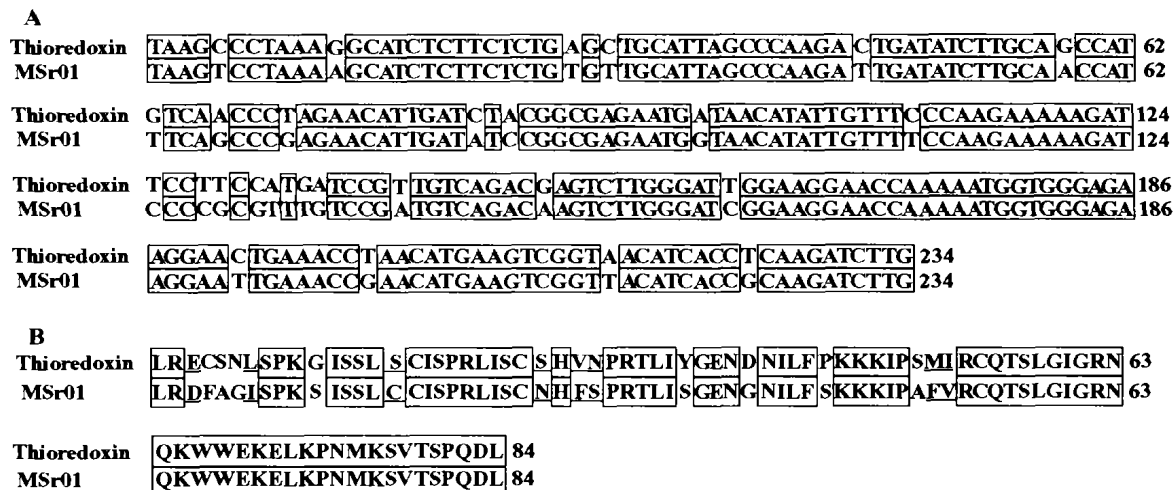


图 2 MSr01 与硫氧还蛋白部分碱基序列比较 (A) 及氨基酸序列比较 (B)

□ 表示相同的碱基或氨基酸; — 表示相似氨基酸。

Fig. 2 Sequence comparing of MSr01 and thioredoxin at nucleotide and protein level

Amino acids in black boxes (□) and underlines (—) are identical and similar respectively.

3 讨论

植物雄性不育涉及大量基因的协同表达, 多数为具有时空顺序的花药特异表达基因, 其中大部分的雄性不育基因在花粉发育早期发生作用。在小孢子发育过程中所必须的某种物质或间接影响小孢子发育的某种物质发生改变, 也会引起植物的雄性不育, 同时发生突变基因的转录产物也可能正向或负向调控着其他一些基因的表达。目前所鉴定的差异片段均出现在可育池中, 即所得到的差异序列均与育性有关。此结果表明甘蓝显性核不育的产生是一些下游的基因表达受到抑制或减弱的结果, 可能的原因是在植物花蕾发育过程中, 雄性不育基因抑制和阻断了这些基因的表达, 从而导致一系列参与小孢子发育的基因表达发生变化, 最终导致雄性不育。

cDNA-AFLP 技术是研究基因表达的一种新方法, 有许多优点。由于使用严格的 PCR 条件和加接头的方法, 具有较高的重复性; 不仅可以快速简单地观察某一时期的基因表达, 而且可以同时观察不同时期的基因表达, 有利于系统研究基因表达和基因间的相互作用。在本试验中通过对 cDNA-AFLP 所获得的 TDF (Transcript Derived Fragments) 进行分析, 揭示了花蕾发育过程中一些基因转录水平上的表达和变化模式, 利用 BSA 的策略, 更使我们可以从中发现与雄性不育相关的序列, 为雄性不育的机理研究和雄性不育基因的克隆提供了一条快速有效的途径。同样, 利用 cDNA-AFLP 技术与 BSA 相结合的策略, 也是快速鉴定并克隆表型差异性状基因表达乃至发育基因的有效途径^[11-13,15]。

对 MSr01 序列的测序结果分析表明该序列与小孢子的发育有关。在小孢子发育过程中, 雄性不育基因阻断或抑制了硫氧还蛋白的正常表达, 而该蛋白是小孢子发育中普遍存在的蛋白, 若该蛋白不能正确合成或合成减弱就会阻断小孢子的正常发育, 从而引起甘蓝显性核不育, 进一步的功能正在验证中。对该序列的特异性表达则需要进一步通过不同发育时期及不同器官加以验证。因通过 cDNA-AFLP

技术获得的只是片段而不是完整的 cDNA, 所以要克隆完整的基因需要通过 RACE 等其他的方法首先获得全长的 cDNA。利用基因沉默等技术可以从可育株中沉默该基因, 检验是否能引起雄性不育, 从而对所获得的差异片段进行功能验证, 目前该试验正在进行中。

参考文献:

- 1 Fang Zhiyuan, Sun Peitian, Liu Yumei, et al. A male sterile line with dominant gene (*Ms*) in cabbage and its utilization for hybrid seed production. *Euphytica*, 1997, 97: 265 ~ 268
- 2 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RAPD 标记. *园艺学报*, 1998, 25 (2): 197 ~ 198
- 3 Wang Xiaowu, Fang Zhiyuan, Huang Sanwen, et al. An extended random primer amplified region (ERPAR) marker linked to a dominant male sterility gene in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Euphytica*, 2000, 112: 267 ~ 273
- 4 李树德主编. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 1995. 670 ~ 672
- 5 Anna Campalans, Montserrat, Ramon Messeguer. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiology*, 2001, 21: 633 ~ 643
- 6 Bachem C W, Horvath B, Trindade L, et al. A potato tube-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development. *Plant J.*, 2001, 25 (6): 595 ~ 604
- 7 Bachem C W, Oomen R J F, Kuyt S. Antisense suppression of a potato alpha-SNAP homologue leads to alterations in cellular development and assimilate distribution. *Plant mol. Biol.*, 2000, 43 (4): 473 ~ 482
- 8 Cooper B. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *Plant J.*, 2001, 26 (3): 339 ~ 496
- 9 Bachem C W, Oomen R J F, Visser R G F, et al. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16: 157 ~ 173
- 10 Sanguinetti C J, Neto E D, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Bio. Techniques*, 1994, 17: 915 ~ 919
- 11 Dellagi A, Birch P R, Heilbronn J, et al. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology*, 2000, 146 (1): 165 ~ 171
- 12 Diachenko L B, Ledesma J, Chenchik A A, et al. Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1996, 219: 824 ~ 828
- 13 Fukuda T, Kido A. Cloning of differential expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1999, 261 (1): 35 ~ 40
- 14 Gianni Barcaccia. Analysis of gene expression during flowering in apomeiotic mutants of *Medicago* spp. cloning of ESTs and candidate genes for 2n eggs. *Sex Plant Report*, 2001, 14: 233 ~ 238
- 15 Qin L, Overmars H, Helder J, et al. An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Plant Microbe Interact*, 2000, 13 (8): 830 ~ 836

Gene Expression Associated with Dominant Male Sterility in Cabbage is Revealed by cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis

Lou Ping¹, Wang Xiaowu¹, Guusje. Bonnema², and Fang Zhiyuan¹

(¹ *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*; ² *Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Wageningen 6700AJ, Netherlands*)

Abstract: cDNA-AFLP was used to detect differentially expressed genes during flower bud development of male sterile and fertile lines of cabbage and broccoli. Expression profiles were generated around 26,000 cDNA fragments (128 primer combinations). Transcriptional changes were observed for 24 cDNA fragments, from which, 13 were only expressed in fertile buds, while the other 11 were upregulated in fertile buds. Sequencing of a 300 bp differential fragment amplified by primer combination A16T15 revealed 89% similarity to the gene thioredoxin, which is related to pollen development in the *Brassica* family.

Key words: Cabbage; Dominant male sterility; cDNA-AFLP; Differentially expressed genes