

大白菜核雄性不育相关基因 *BrLTP1* 的克隆及特征分析

刘志勇, 叶雪凌, 李承戡, 冯 辉*

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866)

摘 要: 利用 cDNA-AFLP 技术分析大白菜核雄性不育两用系 ‘AB02’ 可育株(*msms*)和不育株(*Msms*)花蕾的基因表达谱, 在可育株混合花蕾 cDNA 中扩增出 1 条特异条带 TDF-25, 通过 RACE 和 RT-PCR 技术克隆了该基因的全长 cDNA 序列。序列分析表明, 该基因编码脂质转移蛋白, 命名为 *BrLTP1*。*BrLTP1* 全长 cDNA 序列为 750 bp, 推测编码 1 个包含 183 个氨基酸残基的前体蛋白。*BrLTP1* 蛋白含有典型的脂质转移蛋白 N 端信号肽, 保守的 AAI 结构域和半胱氨酸位点。预测 *BrLTP1* 蛋白含有多种修饰性位点, 包括 1 个 PKC 磷酸化位点, 2 个 N-糖基化位点和 10 个 N-端豆蔻酰基化位点。基因表达模式表明, *BrLTP1* 在两用系不育株花蕾中受到强烈抑制, 在可育株的大花蕾、成熟花药以及花瓣中高水平表达。

关键词: 大白菜; 核基因雄性不育; 脂质转移蛋白

中图分类号: S 634.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 02-0343-10

Cloning and Characterization of a Genic Male Sterility-related Gene *BrLTP1* in Chinese Cabbage

LIU Zhi-yong, YE Xue-ling, LI Cheng-yu, and FENG Hui*

(Department of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The gene differential expression analysis was performed by cDNA-AFLP in the genic male sterile line ‘AB02’ of Chinese cabbage, and a differentially expressed cDNA fragment, TDF-25, was only found in fertile plants. The full-length cDNA of *BrLTP1*, coding lipid transfer protein in Chinese cabbage, was amplified by RACE and RT-PCR. The *BrLTP1* gene was 750 bp long in cDNA and hypothetical protein BrLTP1 included 183 amino acids with a signal peptide of 22 amino acids. Sequence analysis revealed that the BrLTP1 protein has ten N-myristoylation sites, two N-myristoylation sites, and one PKC phosphorylation site. Gene expression characteristics indicated that *BrLTP1* was highly expressed in big flower buds and mature anthers of fertile plants, with a extremely low expression level in sterile buds.

Key words: *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson; genetic male sterility; lipid transfer protein

收稿日期: 2010-08-06; 修回日期: 2011-01-11

基金项目: 国家 ‘863’ 计划项目 (2006AA10Z170); 教育部博士点基金项目 (20092103110001); 国家博士后科学基金项目 (200902551, 20080441101)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fenghuiaaa@263.net)

雄性不育是农作物杂种优势利用的重要途径,也是研究植物雄性器官发育分子机制的理想系统。在前期研究中,本课题组发现了大白菜复等位核雄性不育现象,其育性由一个位点的3个复等位基因控制:“*Ms*”为显性不育基因;“*ms*”为“*Ms*”的等位隐性可育基因;“*Ms^f*”为“*Ms*”的等位显性恢复基因,三者之间的显隐关系为 $Ms^f > Ms > ms$ (Feng et al., 1998)。目前已成功实现了核不育复等位基因在不同生态型大白菜品种间及亚种间的转育交流,创制出多个不育株率和不育度均为100%的芸薹属 A 基因组蔬菜作物雄性不育系(冯辉等, 2007; Li et al., 2009; 辛彬等, 2009)。由于该不育源败育彻底,无不良性状伴生,且能够配制出100%雄性不育系,其育性控制分子机制研究更显重要(Feng et al., 2009, 王丽丽等, 2010)。

植物雄性器官发育受复杂基因网络的精细调控,其中一些关键基因的突变可能引起下游众多育性相关基因的表达发生改变,干扰花粉或花药的发育进程,从而导致雄性不育。通过比较突变株和野生型花蕾的基因表达谱,克隆雄性不育相关基因并研究其特征特性,对于深入了解植物雄性器官发育的分子机制具有重要意义(Kang et al., 2008; Huang et al., 2009)。

本研究中分析了不育株和可育株的基因表达差异,进而分离、克隆了1个在可育株特异性表达而在不育株上不表达的大白菜脂质转移蛋白(Lipid-transfer protein, LTP)基因,为进一步研究脂质代谢在大白菜花粉或花药发育过程中的作用提供素材。

1 材料与方法

1.1 试材

大白菜雄性不育两用系‘AB02’由沈阳农业大学蔬菜遗传育种课题组提供,其育性控制符合复等位遗传模式,群体不育株基因型为 *Msms*,可育株基因型为 *msms*,不育株雄蕊深度退化,花丝短缩,花药瘦小,可育株和不育株的其它性状高度一致。

2008年9月,经春化后播种于沈阳农业大学蔬菜育种基地日光温室。当第1朵花开放时,鉴定出不育株和可育株,采用混合花蕾取样策略,收集一级分枝的所有花蕾,分别构建不育花蕾池和可育花蕾池,用于cDNA-AFLP分析;分别取可育株的根、花茎、花茎叶、角果、小蕾(< 1 mm)、中蕾(1.5 ~ 2.5 mm)和大蕾(> 3.0 mm),以及可育花的花丝、花药、雌蕊、花瓣、萼片,经液氮速冻后保存于-80℃,用于基因表达模式分析。

1.2 试剂

引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成;5' RACE和3' RACE均为Invitrogen公司产品;dNTP、*Taq*酶、DNA分子量标准、凝胶回收试剂盒均购自天根公司;第1链cDNA合成采用Invitrogen公司SuperScript III反转录系统;*T4* DNA Ligase、RNaseH、*T4* DNA Polymerase、*E.coli* DNA Polymerase I、限制性内切酶*EcoR* I 和*Mse* I 均购自NEB公司;T载体、RQ1 RNase-Free DNase为Promega公司产品;大肠杆菌TOP10为辽宁省十字花科蔬菜遗传育种重点实验室保存。

1.3 cDNA-AFLP 分析与差异条带的回收

按照产品说明书,提取总RNA并去除所含的痕量DNA,继而合成单链cDNA。采用刘志勇等(2008)所述方法合成双链cDNA。cDNA-AFLP体系及程序参照Bachem等(1996)所述方法,酶切组合为*EcoR* I 和 *Mse* I。选择性扩增产物经5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染法显示条带(Sanguinetti et al., 1994)。从总RNA提取到银染同时设置两次重复。

1.4 差异条带的回收与表达模式验证

回收测序差异表达基因片段，利用 NCBI 在线 Blast 程序预测差异表达基因的功能（刘志勇 等，2008）。

设计 6 个差异表达基因的特异性引物，以 *Elongation Factor-1α* 作为内标基因（表 1），利用 QRT-PCR 技术分析其在可育池和不育池上的表达模式（刘志勇 等，2008）。反应在 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行，方法参照天根公司荧光定量试剂盒 Real Master Mix（SYBR Green I）说明书。PCR 反应条件：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 20 s，68 ℃延伸 20 s，共 40 个循环，每个样本重复 3 次。采用校正表达模式分析目的基因在不同样品中的相对表达量。

表 1 用于 QRT-PCR 分析的基因特异性引物
Table 1 Gene specific primer for QRT-PCR analysis

转录驱使片段	引物名称和引物序列（5'-3'）	
TDF	Primer number and Primer sequences	
TDF-3	TDF3-L: ACTCCTACCTGGGGTTTCTTT;	TDF3-R: GATTGACTTCTTGCTTCGTGC
TDF-6	TDF6-L: CCTGAAGATACAGAAGGAAAGC;	TDF6-R: TGACAATACTCCATCAAAAGCC
TDF-8	TDF8-L: CTTTGTGGGTTTAGCATTAC;	TDF8-R: TCACGCTCGTATTATAGTCA
TDF-9	TDF9-L: TGTTATTGGCTCTTGACAGAA;	TDF9-R: TCGCATCTCTTTGGTAACG
TDF-17	TDF17-L: GCTGCGTATTCCGATGCTA;	TDF17-R: GTGTAAACGAACCCGATGTT
TDF-21	TDF21-L: GATAGCATTCACACCGCTTCAC	TDF21-R: ACCATTCTCCACAGCCCTCT

1.5 大白菜脂质转移蛋白基因 *BrLTP1* 全长 cDNA 序列的克隆

根据 TDF-25 序列，设计用于 5' RACE 的基因特异性嵌套引物（5RLTP-1: 5'-TGAGATGTCAGGGTTGGCG; 5RLTP-2: 5'-AGGGAGATCAAGAGCGTTGTC-3'）和 3'RACE 嵌套引物（3RLTP-1: 5'-GACAACGCTCTTGATCTCCCT-3'; 3RLTP-2: 5'-CGCCAACCCTGACATCTCA-3'）。以可育株花蕾的混合 cDNA 为扩增模板，按照试剂盒说明书分别进行 5'RACE 和 3'RACE。

将经测序验证后的 5'RACE 和 3'RACE 片段以及 TDF-25 片段进行拼接，得到全长 cDNA 序列，命名为 *BrLTP1*。根据拼接序列，设计全长扩增引物（Q-L: 5'-ACAAAACATTCAAACACAAGA-3'和 Q-R: 5'-GTTGAAAATTAGAAATATTATTAGA-3'），验证拼接结果。PCR 反应条件：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环；72 ℃终反应 5 min。

1.6 *BrLTP1* 基因特征分析

利用 DNASTar 软件分析 *BrLTP1* 基因最大开放阅读框，推导氨基酸序列；利用 NCBI 的在线 BLAST 程序进行同源搜索和预测保守结构域；利用 ClustalX 2.0 软件进行多序列对齐和排序，使用 GenDOC 和 MEGA4 软件输出同源比对和进化树构建结果（Tamura et al., 2007）；使用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测可能存在的信号肽；利用 SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)预测蛋白质的疏水性和跨膜结构域；使用 Prosite 程序推测可能存在的修饰性位点(<http://www.expasy.ch/prosite/>)；蛋白质二级结构分析在 <http://www.predictprotein.org/>网站上进行。

1.7 *BrLTP1* 基因表达模式分析

设计基因特异引物（TDF25-L: 5'-TATCATCATCTAACGCCGCAAT-3' 和 TDF25-R: 5'-GAATCACCAGTGGAGAAACG-3'），利用 QRT-PCR 分析 *BrLTP1* 在可育池、不育池，以及在可育株根、花茎、花茎叶、小蕾、中蕾、大蕾、花丝、花药、雌蕊、花瓣和萼片上的表达模式，反应体系同 1.4 节。

2 结果与分析

2.1 ‘AB02’可育株和不育株花蕾基因表达具有明显差异

利用cDNA-AFLP技术对雄性不育两用系‘AB02’可育株和不育株花蕾的基因差异表达进行了分析。结果显示，cDNA-AFLP所产生的条带表达模式重复性好，128对引物组合共产生了约6 000条长度在50 ~ 600 bp之间的TDF，可育株和不育株花蕾转录组具有明显差异，共检测到了25条差异TDF，均表现为在可育株上特异性或优势表达，而在不育株上不表达或表达量相对较低（图1）。

序列分析表明，25个TDF为非冗余序列。除TDF-7外，其余24个TDF序列在NCBI的公共数据库中存在同源序列（表2）。其中，TDF-25与甘蓝型油菜的1个EST（GR451396）同源性为100%，后者来自编码LTP的Unigene（Bna.1030），说明TDF-25所在基因很可能编码LTP。

值得注意的是，TDF-5也编码LTP，暗示可能有多个LTP家族成员参与了大白菜雄配子发育过程。利用QRT-PCR对其中6个基因的表达模式进行了验证。结果显示，6个基因在可育池和不育池之间表达均存在显著性差异，与cDNA-AFLP结果高度一致（图1，图2）。

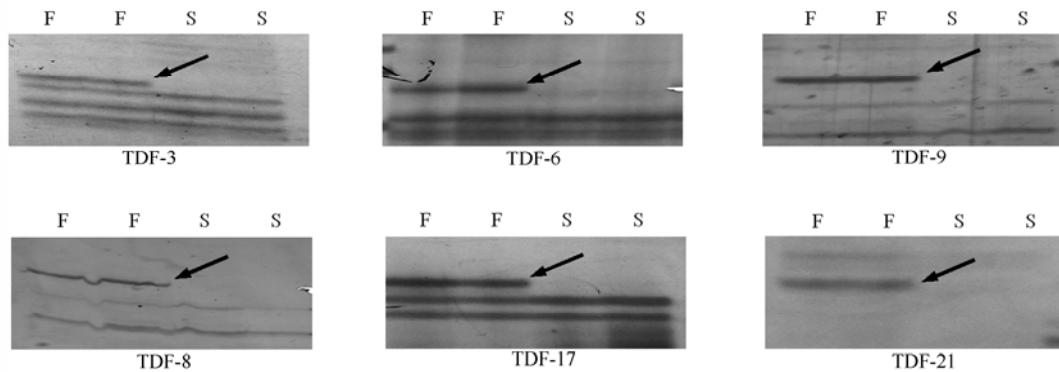


图 1 利用 cDNA-AFLP 获得的部分差异表达基因

F. 可育株混合花蕾；S. 不育株混合花蕾。

Fig. 1 Differentially expressed genes obtained by cDNA-AFLP

F. Fertile bud pool; S. Sterile bud pool.

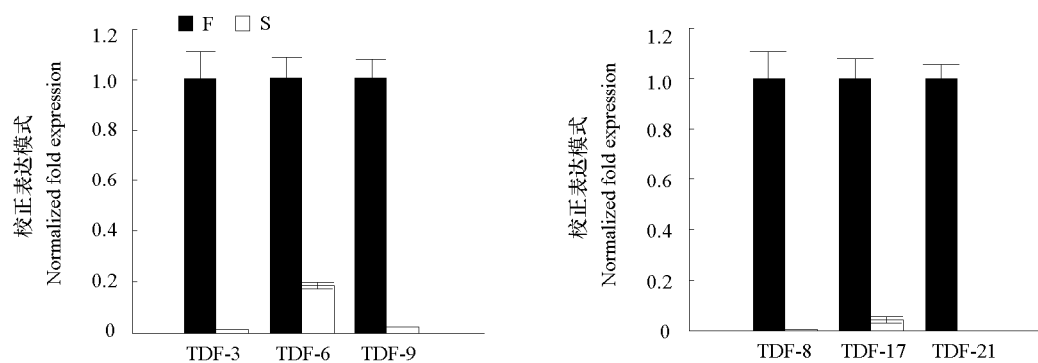


图 2 差异表达基因的 QRT-PCR 验证

F. 可育株混合花蕾；S. 不育株混合花蕾。

Fig. 2 Expression validation of differentially expressed genes by real-time RT-PCR

F. Fertile bud pool; S. Sterile bud pool.

表 2 TDF 序列同源性比较结果
Table 2 Analyses of TDF sequences similarity using Blast

转录驱动片段 TDF	长度/bp Length	功能预测 Function characterization	E-值 E-value	一致性/% Identity
TDF-1	244	拟南芥未知功能蛋白 Unknown protein[<i>Arabidopsis thaliana</i>] ^X	1.00e-22	86
TDF-2	102	拟南芥液泡膜内在蛋白 Delta tonoplast integral protein[<i>A. thaliana</i>] ^U		98.8
TDF-3	84	大白菜花粉 cDNA 文库 EST EST from pollen cDNA library[<i>Brassica. rapa</i>] ^N	6e-29	100
TDF-4	246	推测的拟南芥胶质乙酰酯原酶 Putative pectinacetylsterase precursor[<i>A. thaliana</i>] ^X	2.00e-23	75
TDF-5	173	推测的拟南芥脂质转移蛋白 Putative lipid transfer protein[<i>A. thaliana</i>] ^X	9.00e-15	65
TDF-6	330	拟南芥 F-box 蛋白 F-box family protein[<i>A. thaliana</i>] ^X	3.00e-16	50
TDF-7	61	功能未知 Function unknown		
TDF-8	302	拟南芥裂解酶 Lyase[<i>A. thaliana</i>] ^X	1.00e-35	82
TDF-9	75	拟南芥氨基酸转运蛋白 Amino acid transporter family protein[<i>A. thaliana</i>] ^X		93.8
TDF-10	182	拟南芥羧肽酶 Y 类似蛋白 Carboxypeptidase Y-like protein[<i>A. thaliana</i>] ^X	6.00e-22	85
TDF-11	280	甘蓝过氧化物酶 Peroxidase[<i>Brassica oleracea</i>] ^X	2.00e-36	98
TDF-12	149	推测的拟南芥丝氨酸蛋白酶 Putative cysteine proteinase[<i>A. thaliana</i>] ^X	7.00e-09	81
TDF-13	286	拟南芥内在膜蛋白 Integral membrane family protein[<i>A. thaliana</i>] ^X	5.00e-16	89
TDF-14	83	大白菜花蕾 cDNA 文库 EST EST from floral bud cDNA library[<i>B. rapa</i>] ^N	5e-35	100
TDF-15	116	拟南芥含有 PH 结构的蛋白 Pleckstrin homology domain-containing protein[<i>A. thaliana</i>] ^X	2.00e-06	86
TDF-16	85	大白菜花粉钙结合蛋白 Pollen calcium-binding protein[<i>B. rapa</i>] ^X	8.00e-08	100
TDF-17	78	拟南芥果胶甲酯酶 Pectin Methylesterase[<i>A. thaliana</i>] ^P	0	76
TDF-18	105	拟南芥丝氨酸蛋白酶 Cysteine proteinase[<i>A. thaliana</i>]	5.00e-13	88
TDF-19	95	拟南芥液泡膜 H ⁺ -ATPase Vacuolar proton-ATPase subunit[<i>A. thaliana</i>] ^X	8.00e-08	93
TDF-20	104	拟南芥未知功能蛋白 (AT3G48660) mRNA Unknown protein (AT3G48660) mRNA[<i>A. thaliana</i>] ^N	1.00e-28	90
TDF-21	331	受体丝氨酸/苏氨酸激酶 Receptor serine/threonine kinase[<i>A. thaliana</i>] ^X	3.00e-52	90
TDF-22	94	甘蓝型油菜 mRNA 序列 mRNA sequence[<i>Brassica napus</i>] ^N	5.00e-41	100
TDF-23	154	拟南芥钙结合蛋白 Calcium-binding protein[<i>A. thaliana</i>] ^X	5e-19	90
TDF-24	123	拟南芥果胶甲酯酶 Pectin methylesterase[<i>A. thaliana</i>] ^X	1e-11	82
TDF-25	95	甘蓝型油菜 EST (GR451396) EST (GR451396) [<i>B. napus</i>] ^N	2e-41	100

注：X、N和P分别代表BlastX、BlastN和BlastP分析。U代表基于Unigene的分析结果。

Note: X, N and P represented similarity analyses of TDF sequences using BlastX, BlastN and BlastP, respectively. U represented the analyses abased on relevant unigenes.

2.2 大白菜脂质转移蛋白基因 *BrLTP1* 全长基因的克隆

利用 5' RACE 锚定引物和引物 5RLTP-2 扩增出 1 条约 400 bp 的条带（图 3，A），测序表明扩增片段中已经包括连续的 10 个胞嘧啶，且与 TDF-25 有 9 个碱基的重合（不包括引物部分），说明已经扩增得到完整的 cDNA 5' 端。3' RACE 锚定引物和引物 3RLTP-2 扩增出 1 条约 400 bp 的条带

(图 3, B), 测序表明扩增片段与 TDF-25 有 35 个碱基的重合 (不包括引物部分), 且含有 16 个腺嘌呤, 说明已经获得了完整的 cDNA 3' 末端序列。以上序列和 TDF-25 拼接, 从而获得全长 cDNA 拼接序列。以此全长 cDNA 序列为基础设计基因特异引物, 扩增得到目标基因的全长 cDNA 序列。测序结果表明, 该全长 cDNA 序列与前述 5' 和 3' RACE 片段拼接结果完全一致, 全长均为 750 bp (图 3, C), 命名为 *BrLTP1* (*Brassica rapa* Lipid-Transfer Protein 1)。

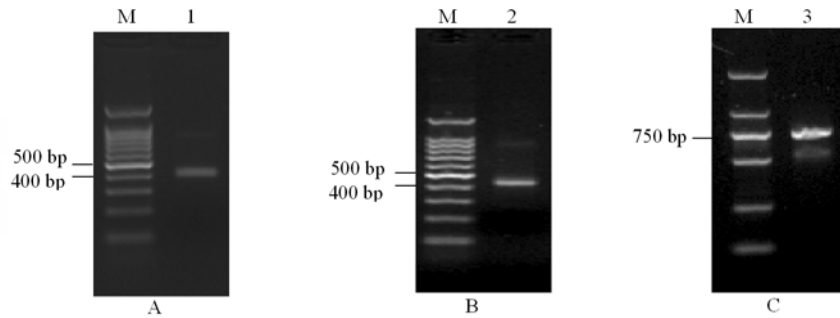


图 3 *BrLTP1* 基因的 5' RACE (A)、3' RACE (B) 以及全长 cDNA (C) 扩增结果

M: DNA 标准分子量。1, 2, 3 分别为 5' RACE、3' RACE 以及全长 cDNA 扩增产物。

Fig. 3 PCR products of 5' RACE (A), 3' RACE (B) and the full-length cDNA (C) of *BrLTP1*

M: DNA marker. 1, 2 and 3 indicate the products of 5' RACE, 3' RACE and full length cDNA of *BrLTP1*, respectively.

2.3 *BrLTP1* 基因特征分析

2.3.1 核酸序列分析

利用 DNASTar 软件对 *BrLTP1* 基因序列进行分析, 发现其最大开放阅读框为 552 bp, 起始密码子 ATG 始于第 80 位, 终止密码子 TGA 终于第 631 位, 预测编码一个含有 183 个氨基酸的蛋白质。起始密码子 ATG 上游-3 位核苷酸为 A, +4 位为 G, 是一个典型的 Kozak 结构, 这一结构对于蛋白质合成的 40S 起始复合物正确识别起始密码子具有很重要的作用。3'-UTR 的碱基组成极不平衡, A/T 含量达到 79.8%, 可能与基因调控有关 (图 4)。

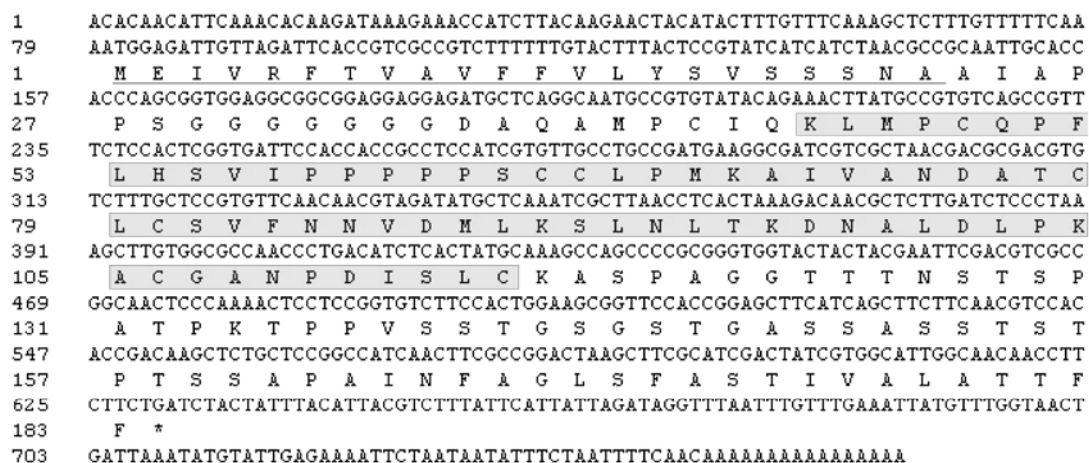


图 4 *BrLTP1* 基因的 cDNA 及推导的氨基酸序列

下划线部分为信号肽; 阴影加框线部分为 AAI 结构域。

Fig. 4 Nucleotide sequence of tomato *BrLTP1* cDNA and deduced amino acid sequence

The signal peptide is underlined; Shaded frame indicates the conserved AAI domain.

2.3.2 蛋白序列分析

BrLTP1 分子量为 18.23 kD, 等电点 (PI) 为 7.534, pH 7.0 时的电荷为 0.829。BrLTP1 蛋白质含有 8 个强碱性氨基酸 (K, R), 7 个强酸性氨基酸 (D, E), 64 个疏水氨基酸 (A, I, L, F, W, V), 64 个极性氨基酸 (N, C, Q, S, T, Y)。signalP3.0 预测表明, BrLTP1 存在信号肽的可能性为 0.993, Ser²²~Arg²³ 为前体蛋白剪切位点的可能性为 0.899。经 SOSUI 分析, 发现 BrLTP1 为膜蛋白, 含有 1 个跨膜结构域 (1~21)。

通过 Prosite 数据库查询, 发现 BrLTP1 含有 10 个 N-豆蔻酰化位点 (29~34、30~35、31~36、33~38、121~126、122~127、142~147、144~149、147~152 和 168~173), 2 个 N-糖基化位点 (93~96、126~129) 以及 1 个 PKC 磷酸化位点 (132~134)。SMART 分析表明, 在 42~115 位存在 AAI 结构域。通过 PredictProtein 预测 BrLTP1 蛋白质的二级结构, 表明该蛋白含有 37.6% 的 α 螺旋、3.28% 的 β 折叠和 59.56% 的环状结构。以上分析结果表明, BrLTP1 为具有前导信号肽的膜蛋白, 其功能可能与脂质转移相关, 推测出的多个修饰性位点可能对蛋白的加工或者对生物功能调节具有重要作用。

经氨基酸序列同源搜索和多序列比对, 发现 BrLTP1 与拟南芥 protease inhibitor/seed storage/LTP family 成员 NP_173264 同源性达到 60%, 与其他 LTP 家族成员的同源性很低 (< 30%), 但 BrLTP1 半胱氨酸位置符合植物 LTP 的保守性 (图 5)。

利用 MEGA 4.0 软件采用比邻法对大白菜拟南芥、白菜、蓖麻等植物 LTPs 的亲缘关系进行了分析, 结果表明 BrLTP1 与 Boutrot 等 (2008) 所报道的拟南芥 LTP, Tian 等 (2009) 公布的白菜 LTP 蛋白 (ABQ63061) 的亲缘关系均较远, 与拟南芥 LTP 蛋白 NP_173264 和蓖麻 XP_002530788 的亲缘关系较近, 处于同一分枝 (图 6)。

值得注意的是, BrLTP1、XP_002530788 和 NP_173264 分子量明显大于其它已报道的 LTP 蛋白, 主要在于其拥有一个延长的 C-末端。

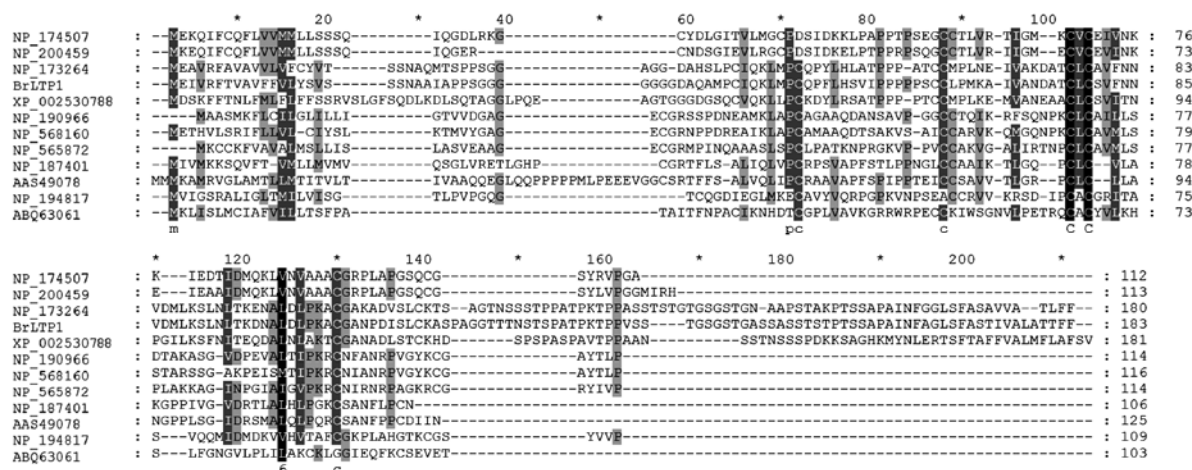


图 5 BrLTP1 和其他植物脂质转移蛋白的氨基酸序列多重比对

XP_002530788 来自蓖麻, ABQ63061 来自白菜, 其余蛋白序列来自拟南芥。

Fig. 5 Multiple sequence alignment of amino acid sequence of BrLTP1 and lipid transfer proteins in other plants

XP_002530788 (*Ricinus communis*); ABQ63061 (*Brassica rapa* subsp. *campestris*);

Other sequences are from *A. thaliana*.

3 讨论

脂类不仅是细胞的主要组成成分之一, 而且一些脂质分子作为第二信使参与了动植物细胞功能的调节, 在细胞信号转导中构成脂类信号通路 (Raffaele et al., 2009)。非特异性脂质转运蛋白 (nsLTPs) 在植物的生长发育、抗逆过程中具有广泛的生物学功能, 而其在生殖发育中的作用备受关注 (Blein et al., 2002; Imin et al., 2006)。nsLTP蛋白由多基因家族编码, 具有多种异构体 (Boutrot et al., 2008)。目前, 研究者已经得到多个在植物雄性器官特异性或优势表达的nsLTP。Ariizumi等 (2002) 发现拟南芥LTP12表达出现在花粉发育的单核和二核花粉阶段, 并进一步定位在绒毡层, 它的功能被认为在花粉发育过程中从绒毡层到花粉外壁传递脂质。在水稻、桃的生殖器官以及油菜绒毡层和小孢子中也存在特异表达的LTP基因, 可能参与了雄性生殖器官中花粉壁发育所需物质的累积积淀 (Foster et al., 1992; Botton et al., 2002; Boutrot et al., 2007)。对白菜核雄性不育*mmc*突变体与其野生植株花蕾差异表达分析中, 发现了1个推测的LTPs基因*BcMFL5*, 该基因在野生型植株花蕾和嫩果中特异表达, 而在*mmc*突变体没有任何表达, 这表明它与白菜花粉发育密切相关 (Tian et al., 2009)。Chen等 (2009) 利用拟南芥ATH1芯片分析了甘蓝型油菜雄性不育系S45AB可育株和不育株花蕾的基因表达谱, 其中1个LTP基因在不育株上受到强烈抑制。

作者通过比较分析大白菜复等位核雄性不育系统可育株 (*msms*) 和不育株 (*Msms*) 花蕾的基因表达谱, 共获得25个差异表达基因片段, 其中2个编码LTP, 暗示了‘AB02’雄性不育性的形成可能与脂质代谢的异常有关。进一步的序列分析和基因表达表明, *BrLTP1*为花器官优势表达基因, 推测的BrLTP1蛋白含有典型的N端信号肽、保守的AAI结构域和半胱氨酸骨架, 但与以前所报道的LTP有很大的不同。首先, *BrLTP1*分子量远远大于以往报道的植物LTP; 其次, LTPs往往含有保守的钙调素结合位点, 可能参与钙调素所介导的信号转导 (Tian et al., 2009), 但*BrLTP1*并不含有此位点。由于在复等位核不育系统中, 不育株和可育株在转录组上存在明显差异, *BrLTP1*只是其中之一, 它在雄性不育性形成中的角色尚未得知。与BrLTP1同源性最高的蛋白为拟南芥NP_173264。在Pfam数据库中, NP_173264被归为独立的基因家族 (protease inhibitor/seed storage/LTP family), 目前该家族成员的功能还是未知的。作者已从ABRC购买了NP_173264的T-DNA插入突变体, 欲通过分析野生型与突变体的育性差异, 进而推测*BrLTP1*的可能功能。同时, 构建了*BrLTP1*的RNAi载体, 拟在正常可育品系中沉默该基因, 研究其在植物雄配子发育过程中的具体功能。

References

- Ariizumi T, Amagai M, Shibata D, Hatakeyama K, Watanabe M, Toriyama K. 2002. Comparative study of promoter activity of the three anther-specific genes encoding lipid transfer protein, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and polygalacturonase in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 21: 90 - 96.
- Bachem C W, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, 9: 745 - 753.
- Blein J P, Coutos-Thévenot P, Marion D, Ponchet M. 2002. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci*, 7 (7): 293 - 296.
- Botton A, Begheldo M, Rasori A, Bonghi C, Tonutti P. 2002. Differential expression of two lipid transfer protein genes in reproductive organs of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Plant Science*, 163 (5): 993 - 1000.
- Boutrot F, Chantret N, Gautier M F. 2008. Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. *BMC Genomics*, 9: 86.

- Boutrot F, Meynard D, Guiderdoni E, Joudrier P, Gautier M F. 2007. The *Triticum aestivum* non-specific lipid transfer protein (TaLtp) gene family: comparative promoter activity of six TaLtp genes in transgenic rice. *Planta*, 225 (4): 843 – 862.
- Chen Y, Lei S, Zhou Z, Zeng F, Yi B, Wen J, Shen J, Ma C, Tu J, Fu T. 2009. Analysis of gene expression profile in pollen development of recessive genic male sterile *Brassica napus* L. line S45A. *Plant Cell Rep*, 28 (9): 1363 – 1372.
- Feng H, Wei P, Piao Z Y, Liu Z Y, Li C Y, Wang Y G, Ji R Q, Ji S J, Zou T, Choi S R, Lim Y P. 2009. SSR and SCAR mapping of a genic multiple-allele male sterile gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet*, 119 (2): 333 – 339.
- Feng Hui, Wei Yu-tang, Ji Shu-juan, Jin Gang, Jin Ju-sheng. 1998. Multiple allele model for genic male sterility in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae*, 467: 133 – 142.
- Feng Hui, Xu Wei, Wang Yu-gang. 2007. Directive transfer of the genetic male sterile line of milk Chinese cabbage AI023. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 659 – 664. (in Chinese)
- 冯 辉, 徐 巍, 王玉刚. 2007. ‘奶白菜 AI023’ 品系核基因雄性不育系的定向转育. *园艺学报*, 34 (3): 659 – 664.
- Foster G D, Robinson S W, Blundell R P, Roberts M R, Hodge R, Draper J, Scott R J. 1992. A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins, is expressed specifically in the tapetum and developing microspores. *Plant Science*, 84 (1): 187 – 192.
- Huang L, Cao J, Zhang A, Ye Y, Zhang Y, Liu T. 2009. The polygalacturonase gene *BcMF2* from *Brassica campestris* is associated with intine development. *J Exp Bot*, 60 (1): 301 – 313.
- Imin N, Kerim T, Weinman J J, Rolfe B G. 2006. Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers. *Mol Cell Proteomics*, 5 (2): 274 – 292.
- Kang J, Zhang G, Bonnema G, Fang Z, Wang X. 2008. Global analysis of gene expression in flower buds of Ms-cd1 *Brassica oleracea* conferring male sterility by using an Arabidopsis microarray. *Plant Mol Biol*, 66 (1 – 2): 177 – 192.
- Li Cheng-yu, Feng Hui, Wei Peng, Wang Li-li, Zhang Jun, Yang Hao-ning, Jiang Nan. 2009. Directional transfer of the genic multiple allele inherited male sterile line in Chinese cabbage. *African Journal of Agricultural Research*, 4 (5): 522 – 529.
- Liu Zhi-yong, Du Yong-chen, Wang Xiao-xuan, Guo Yan-mei, Gao Jian-chang. 2008. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP approach during heat stress in tomato leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 1011 – 1016. (in Chinese)
- 刘志勇, 杜永臣, 王孝宣, 国艳梅, 高建昌. 2008. 高温胁迫下番茄叶片差异表达基因的 cDNA-AFLP 鉴定. *园艺学报*, 35 (7): 1011 – 1016.
- Raffaele S, Leger A, Roby D. 2009. Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant Signal Behav*, 4 (2): 94 – 99.
- Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17 (5): 914 – 921.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24: 1596 – 1599.
- Tian A, Cao J, Huang L, Yu X, Ye W. 2009. Characterization of a male sterile related gene *BcMF15* from *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Mol Biol Rep*, 36 (2): 307 – 314.
- Wang Li-li, Wei Peng, Liu Zhi-yong, Li Cheng-yu, Wang Yu-gang, Ji Rui-qin, Feng Hui. 2010. SSR mapping of the *Ms^f*, a multiple-allele male-fertility restorer gene in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (6): 923 – 930. (in Chinese)
- 王丽丽, 魏 鹏, 刘志勇, 李承彧, 王玉刚, 冀瑞琴, 冯 辉. 2010. 大白菜显性核复等位基因雄性不育恢复基因 *Ms^f* 的 SSR 标记. *园艺学报*, 37 (6): 923 – 930.
- Xin Bin, Feng Hui, Yang Xiao-fei, Wang Yu-gang. 2009. Studies on breeding for genetic male sterile line in *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* L. *Chinese Vegetables*, (14): 38 – 42. (in Chinese)
- 辛 彬, 冯 辉, 杨晓飞, 王玉刚. 2009. 青梗菜核基因雄性不育系的转育. *中国蔬菜*, (14): 38 – 42.