

mRNA 差异显示分离西瓜核雄性不育基因 的相关 cDNA 片段

于 远,张 显,张 勇,马建祥,杨建强,于 蓉,杨玉梅

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**揭示西瓜核雄性不育发生的分子机理。**【方法】**应用 mRNA 差异显示技术,研究西瓜核雄性不育材料 Se18 不育株和可育株雄花花蕾中基因表达的差异。**【结果】**获得了西瓜细胞核雄性不育两用系不育相关特异 cDNA 片段 T₁₂C/B0315S-359 和育性相关特异 cDNA 片段 T₁₂C/B0315F-175、T₁₂G/B0318F-260。经过序列比较,T₁₂C/B0315S-359 与美洲杨树一段未知的 cDNA 序列同源性较高(82%);T₁₂C/B0315F-175 与葫芦科植物中编码细胞色素 C 装配蛋白的 *ycf 5* 基因高度同源(98%);T₁₂G/B0318F-260 与植物中硫氧还蛋白过氧化物酶(Thioredoxin peroxidase,TPx)基因高度同源(84%)。**【结论】**经序列分析初步认为,这 3 个片段与西瓜细胞核雄性不育的发生有重要相关性。

【关键词】 西瓜;雄性不育;基因分析;差异显示
【中图分类号】 S651.03 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)11-0162-05

Isolation of the cDNA fragment of watermelon genic male sterility related genes using DDRT-PCR

YU Yuan,ZHANG Xian,ZHANG Yong,MA Jian-xiang,YANG Jian-qiang,
YU Rong,YANG Yu-mei

(College of Horticulture,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: **【Objective】** The research was done in order to study the molecular mechanism of genic male sterility in watermelon. **【Method】** mRNA differential display was used to analyze the differential expression of genes between male sterile flower buds and male fertile flower buds in male sterile watermelon Se18. **【Result】** Through identification of repeated tests,the differential fragments T₁₂C/B0315S-359 were obtained in male fertile flower buds;two differential fragments were obtained in male sterile flower buds; T₁₂C/B0315F-175 and T₁₂G/B0318F-260. The T₁₂C/B0315S-359 fragment was 82% homologous with a code sequence of an unknown protein which involved in vascular development of quaking aspen. The result of GenBank BLAST showed that the T₁₂C/B0315F-175 fragment had 98% nucleotide similarity to the *ycf5* gene encoding cytochrome C assembly protein in cucurbitaceous plants. The homology research indicated that T₁₂G/B0318F-260 fragment was of 84% of homology with code sequence of mRNA of thioredoxin peroxidase in plants. **【Conclusion】** After sequence research,the three differential fragments were related to genic male sterility in watermelon Se18.

* [收稿日期] 2007-11-13
[基金项目] 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2001AA241174)
[作者简介] 于 远(1982—),男,陕西临潼人,硕士,主要从事蔬菜育种及生物技术研究,现在广东省农业科学院蔬菜研究所工作。
E-mail:ymmzyz@126.com
[通讯作者] 张 显(1961—),男,陕西扶风人,教授,博士,博士生导师,主要从事蔬菜作物育种及生物技术研究。
E-mail:zhangxian098@126.com

Key words: watermelon; male sterility; genetic analysis; DDRT

在高等植物中广泛存在着核雄性不育现象,用其育成的核不育两用系,既可作不育系又是保持系,具有重要的理论研究和育种应用价值。自 1962 年 Watts 用人工方法获得西瓜 (*Citrullus Lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) 雄性不育株后,西瓜雄性不育系的选育与利用引起了人们的广泛关注。1988 年,我国学者夏锡桐等^[1]报道,在“龙蜜 100 号”西瓜自交后代中发现了雄性不育株,进而选育成 G17AB 雄性不育两用系后,有关西瓜雄性不育材料的发现及研究报道较多,但这些研究主要集中在细胞形态和生理生化方面^[2-6],在分子机理方面的研究尚不多见,因此限制了西瓜雄性不育在生产上的进一步利用。mRNA 差异显示 (Differential Display PCR, DDRT-PCR) 技术^[7],可以从 1 对细胞群或 1 对基因型各自产生的 mRNA 中,有效地鉴别并克隆差异表达基因,现已成功应用于植物抗逆与抗病性、形态发生、果实发育、信号转导等相关基因的分离、鉴定与克隆。本研究以西瓜核雄性不育材料“Se18”的雄花花蕾为试材,建立了较完善的西瓜 mRNA 差异显示技术体系,并对与核雄性不育基因相关的 cDNA 差异片段进行了分离,以期西瓜核雄性不育发生的分子机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验材料为西瓜核雄性不育系“Se18”,由西北农林科技大学园艺学院提供,经 7 代系内自交稳定,育性由 1 对隐性基因控制。提取总 RNA 的 BIOZOL 试剂为 BioFlux 产品, M-MLV Reverse Transcriptase 为 Promega 产品, *Taq* DNA 聚合酶为 MBI 产品,其他试剂均为国产分析纯。mRNA 差异显示的 3 种锚定引物分别为 5'-T₁₂A-3'、5'-T₁₂G-3' 和 5'-T₁₂C-3',引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,差异分析随机引物 B0301-B0320 也购自该公司。

1.2 “Se18”雄花花蕾总 RNA 的提取与 cDNA 第 1 链的合成

采西瓜核雄性不育系“Se18”现蕾期前后可育株和不育株雄花花蕾,按 BioFlux 公司的 BIOZOL 试剂说明书提供的操作方法,分别混合提取 RNA。取 2 μ g 总 RNA,参照 Promega 公司 M-MLV Reverse Transcriptase 操作指南进行反转录,合成 cDNA 第

1 链。

1.3 cDNA 第 1 链的 PCR 扩增

反应体系为 25 μ L,内含 cDNA 第 1 链反应产物 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 0.75 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 锚定引物 T₁₂M 100 ng, 随机引物 50 ng, *Taq* 酶 1.25 U, 10 $\times$ *Taq* Buffer 2.5 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 25 s, 42 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 PCR 扩增产物的分离与回收

PCR 扩增产物 4 μ L 在 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 上高压电泳,用 1 $\times$ TBE 电泳缓冲液于 80 V 电泳 10 h 左右,对凝胶进行银染。银染反应中的固定液为 10 mL/L HNO₃,固定 5 min;染色液为 2 g/L AgNO₃,用前加入 7.5 mL/L 甲醛,染色 4 min;显影液为 30 g/L NaCO₃,用前加入 0.2 mL/L 甲醛;最后加入 10 mL/L HNO₃ 溶液终止反应。cDNA 差异条带用针尖挑起,煮沸法回收后直接用于 2 次 PCR 扩增,取含有差异片段的回收液 2 μ L,扩增条件同 RT-PCR。用鼎国 DNA 快速纯化/回收试剂盒回收 cDNA 差异片段的扩增产物。

1.5 cDNA 差异片段的克隆与测序

将阳性 cDNA 差异片段重扩增产物与 pMD18-T vector (购自大连 TaKaRa 公司) 进行连接,测序工作由上海英骏生物技术服务公司完成。

2 结果与分析

2.1 “Se18”雄花花蕾 mRNA 差异显示和 cDNA 差异片段的获得

选用 3 个锚定引物和 20 个差异显示引物,对西瓜核雄性不育系“Se18”不育株和可育株雄花花蕾共 120 个组合进行 mRNA 差异显示,经 2 次 PCR 检测,共回收到 3 个正义的 cDNA 差异片段 (图 1)。其中 1 条差异带为不育株所特有,其余 2 条为可育株所特有,可见不育株与可育株都有自己特异的 cDNA 差异条带。这 3 条 cDNA 差异片段长度大多在 150~400 bp,其中不育株所特有的 cDNA 差异片段 T₁₂C/B0315S-359 为 359 bp,可育株所特有的 2 条 cDNA 差异片段 T₁₂C/B0315F-175 和 T₁₂G/B0318F-260 分别为 175 和 260 bp。

2.2 “Se18”雄花花蕾 cDNA 差异片段的序列分析

用 pMD18-T vector 分别克隆差异片段 T₁₂C/B0315S-359、T₁₂C/B0315F-175 和 T₁₂G/B0318F-

260, 并进行序列测定。T₁₂C/B0315S-359 序列全长 359 bp, GenBank BLAST 查询表明, T₁₂C/B0315S-359 序列与与美洲杨树(*Populus tremuloides*)一段

未知的 cDNA 序列有 82% 的同源性(图 2), 该序列与美洲杨树维管组织的发育相关, 优先在韧皮部中表达。

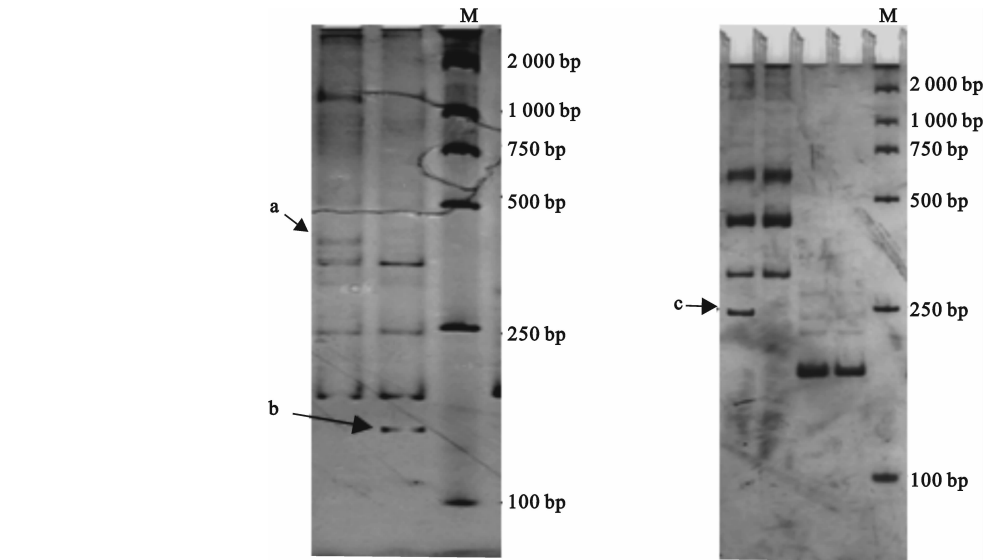


图 1 “Se18”不育株和可育株雄花花蕾 DDRT-PCR 产物测序胶电泳银染结果(差异部分)

a. T₁₂C/B0315S-359; b. T₁₂C/B0315F-175; c. T₁₂G/B0318F-260; M. DL2000 Marker

Fig. 1 Partial results of DDRT-PCR between male sterile flower buds and male fertile flower buds in male sterile watermelon Se18

a. T₁₂C/B0315S-359; b. T₁₂C/B0315F-175; c. T₁₂G/B0318F-260; M. DL2000 Marker

Query	1	GATCCAGTACGCATAGTGAGCAAGTTGAGGAAGTTTGGCACCCAGAGATATTATCAGTT	60
Sbjct	301	GATCCAGTACACATAGTGAGCAAACCTGAGAAAGCTGTAACACAGAAATAATTACAGTA	360
Query	61	GGACCAGCAAAAAGAGCCAG— — —AGAAGAAGGAGGAACCCAAGAAAGAAGAG	109
Sbjct	361	GGGCCAGC— AAAAGAGCCAGAGAAGAAGAAGGAAGAACCCAAGAAAGAAGAG	411

图 2 T₁₂C/B0315S-359 片段与美洲杨树未知 cDNA 序列核苷酸同源性的比较

Query . T₁₂C/B0315S-359; Sbjct . 美洲杨树未知 cDNA

Fig. 2 Comparison of the nucleotide sequence of the T₁₂C/B0315S-359 with unknown cDNA from *Populus tremuloides*

Query . T₁₂C/B0315S-359; Sbjct. Unknown cDNA from *Populus tremuloides*

T₁₂C/B0315F-175 序列全长 175 bp, GenBank BLAST 查询表明, T₁₂C/B0315F-175 与西瓜、苦西瓜(*Citrullus colocynthis*)、葫芦、毒瓜等葫芦科植物

中的 *ycf 5* 基因高度同源, 同源性达 98% (图 3), 该基因编码细胞色素 C 装配蛋白(Cytochrome C assembly protein, Cytochrom_C_asm)。

Query	15	CCCCTGAAAGAATACCTATGCTTAAAAAGATAAACCTAGACTAATAGTACGATAA	74
Sbjct	232	CCCCTGAAAGAATACCTATGCTTAAAAAGATAAACCTAGACTAATAATACGATAA	173
Query	75	AATGATCTAATTGTTGAATCAGTTGAGACTTATAATAATTCTTCTAATAAAAAAAGGAAG	134
Sbjct	172	AATGATCTAATTGTTGAATCAGTTGAGACTTATAATAATTCTTCGAAGAAAAAAGGAAG	113
Query	135	TGTTTCTTAGAAAATTGTTCCCTTCGTTTCATGTACTGGATC	175
Sbjct	112	TGTTTCTTAGAAAATTGTTCCCTTCGTTTCATGTATTGGATC	72

图 3 T₁₂C/B0315F-175 片段与西瓜 *ycf 5* 基因核苷酸同源性的比较

Query. T₁₂C/B0315F-175; Sbjct. 西瓜 *ycf 5* 基因

Fig. 3 Comparison of the nucleotide sequence of the T₁₂C/B0315F-175 with *ycf 5* from *Citrullus lanatus*

Query . T₁₂C/B0315F-175; Sbjct . *ycf 5* from *Citrullus lanatus*

T₁₂G/B0318F-260 序列全长 260 bp,GenBank BLAST 查询表明,T₁₂G/B0318F-260 与烟草、豌豆、拟南芥、玉米、白菜等植物中硫氧还蛋白过氧化物酶 (Thioredoxin peroxidase, TPx) 基因高度同源,同源性达 84 % (图 4)。

Query	29	AAAGTACTCTTTGCTACCCTTGGGGTCTAGCTTCATCGACTTCTCCCCGGGTTTCCATCC	88
Sbjct	822	AAAGTATTCTTTGCTACCCTTGGGGTCAGGCTTCATGGATTCTCCCCAGGCTTCCATCC	763
Query	89	AGCAGGGCAGACTTCGTCGGGGTTCTCTGCACGTATTGTAAGGCTTGAGAGTTCTCTT	148
Sbjct	762	AGCTGGGCACACTTCATCCGGGTTATCCTGAACGTATTGCAATGCCTGAAGAGTTCTCAA	703
Query	149	CGTCTCGTCAACACTCCGGCCAATAGCAAGATTGTTTATTGTTGAGTGTTGGATAACTCC	208
Sbjct	702	TGTTTCATCAACACTACCACCAATTCCAAGATTGTTAATGGTTGAATGCTGAATAACTCC	643
Query	209	TTCTTTGTCAATAATGAAAAGGCCTCTCAATGCAATTCCTGGTCTGAGATC	260
Sbjct	642	TTCCTTGTC AATGATGAAAAGTCCTCTCAATGCAATTCCTGATCGGGGATC	643

图 4 T₁₂G/B0318F-260 片段与烟草 TPx 基因核苷酸同源性比较
Query. T₁₂G/B0318F-260;Sbjct. 烟草 TPx 基因

Fig. 4 Comparison of the nucleotide sequence of the T₁₂G/B0318F-260 with TPx from Nicotiana tabacum
Query. T₁₂G/B0318F-260;Sbjct. TPx from Nicotiana tabacum

3 讨 论

利用 mRNA 差异显示技术寻找可育与不育基因之间表达的差异,要求 2 个材料必须具备相同的遗传背景,这样才能保证所得到的结果具有分析价值。本研究采用的西瓜细胞核雄性不育材料来自一个材料的天然突变,且经过多代系内自交,因此不育株和可育株具有相对一致的遗传背景。尽管如此,可育株与不育株个体之间还是有一定的差异,雄花蕾在发育进程上表现并不一致,本试验采用混合取样法,可基本上消除这些差异引起的误差,差异显示电泳图谱也证明这种方法是有效的。

本研究获得了与西瓜育性相关的有意义差异 cDNA 片段 T₁₂C/B0315F-175 和 T₁₂G/B0318F-260。T₁₂C/B0315F-175 与葫芦科植物 *ycf 5* 基因高度同源(98%),*ycf 5* 基因编码细胞色素 C 装配蛋白家族,该家族成员大多为与细胞色素 C 合成、转运相关的膜蛋白。已有研究发现,雄性不育花药中呼吸作用的某些步骤出现缺陷,能量代谢平衡出现破坏,从而导致小孢子的败育和雄性不育的发生^[8-10]。可以推测,由于差异 cDNA 片段 T₁₂C/B0315F-175 在不育株花蕾中的表达受到抑制,细胞色素 C 装配蛋白家族部分蛋白成员缺失,导致细胞色素 C 在合成和转运过程中出现异常,能量代谢中的呼吸链运转过程不能正常进行,雄花花药呼吸速率和能量形成减弱,能量供应短缺,呼吸系统能量亏损,最终导致小孢子败育和雄性不育的发生。

差异 cDNA 片段 T₁₂G/B0318F-260 与植物中

硫氧还蛋白过氧化物酶 (Thioredoxin peroxidase, TPx) 基因高度同源,硫氧还蛋白过氧化物酶属于抗氧化蛋白家族的一员。硫氧还蛋白过氧化物酶和细胞色素 C 都具有清除机体内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的能力,正常情况下,细胞内活性氧的产生和清除处于一种动态平衡,但植物在遭受逆境胁迫时,这种平衡遭到破坏,活性氧的积累导致膜脂过氧化,造成膜系统的伤害,最终导致植物受到伤害。目前有关活性氧与植物雄性不育的研究发现,雄性不育花药中 O^{2·-} 的产生速率、有机自由态水平、H₂O₂ 及膜脂过氧化产物 MDA 含量较高,但其活性氧清除酶活性则较可育花药低,从而导致 O^{2·-}、H₂O₂、MDA 含量升高,膜脂过氧化加剧,引起活性氧代谢紊乱,最终导致雄性不育^[11-15]。

差异 cDNA 片段 T₁₂C/B0315F-175 同源基因与细胞色素 C 的合成和转运相关,差异 cDNA 片段 T₁₂G/B0318F-260 与植物中硫氧还蛋白过氧化物酶 (Thioredoxin peroxidase, TPx) 基因高度同源,而这 2 个片段在雄性不育花蕾中的表达受到抑制,使细胞色素 C 和硫氧还蛋白过氧化物酶不能行使清除活性氧的功能。但由于机体内还有如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽还原酶(GSH-R)、抗坏血酸过氧化物酶(ASA-POD)、维生素 E 等酶促和非酶促活性氧清除系统,故雄性不育的发生是否与这 2 种活性氧清除系统的失效有直接或间接关系,还需进一步验证。另外,细胞色素 C 和硫氧还蛋白过氧化物酶在细胞凋亡中的功能一直是研究热点,而植物核雄性不育

的发生与细胞程序化死亡相关,关于该方面的研究现已有所报道^[16-18]。

目前分离所得的与雄性不育相关的基因还不多^[19-20],材料也主要集中在拟南芥突变体上。西瓜细胞核雄性不育可能是某一基因位点发生突变所致。DDRT-PCR 结果显示,不育株与可育株都具有特异的 cDNA 条带,表明不育株和可育株可产生不同的 mRNA。由此可以推测,育性基因可能为调节基因类型,其表达与否可能影响着一系列基因的表达。由于差异显示技术存在假阳性高的缺陷,这些片段的可靠性还有待于作 Northern 验证,其结构和功能均有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 夏锡桐,刘寅安,武兴丽. 西瓜 G17AB 雄性不育两用系选育 [J]. 沈阳农业大学学报,1988,19(1):9-13.
Xia X T,Liu Y A,Wu X L. Selection of watermelon (*Citrullus vulgaris*) A B male-sterile line G17AB [J]. Acta Shenyang Agric Univ,1988,19(1):9-13. (in Chinese)

[2] 刘海河,侯喜林,张彦萍,等. 西瓜核雄性不育育性基因的 RAPD 标记 [J]. 果树学报,2004,21(5):491-493.
Liu H H,Hou X L,Zhang Y P,et al. Marker linked to a male fertile gene in watermelon G17AB line [J]. Journal of Fruit Science,2004,21(5):491-493. (in Chinese)

[3] 张 显,王 鸣,马建祥,等. 西瓜隐性核型雄性不育两用系的细胞学研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(1):71-74.
Zhang X,Wang M,Ma J X,et al. Cytological studies on recessive nuclease male sterile lines in watermelon [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition,2005,33(1):71-74. (in Chinese)

[4] 张 显,王 鸣,张进升,等. 西瓜隐性核雄性不育基因的 RAPD 标记 [J]. 园艺学报,2005,32(3):438-442.
Zhang X,Wang M,Zhang J S,et al. Identification RAPD markers linked to male sterility in watermelon [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2005,32(3):438-442. (in Chinese)

[5] 刘海河,侯喜林,张彦萍,等. 西瓜核雄性不育系雄花蕾发育过程中内源激素和多胺动态变化分析 [J]. 园艺学报,2006,33(1):143-145.
Liu H H,Hou X L,Zhang Y P,et al. Changes of endogenous hormones and polyamines in male flower buds of Nuclear male sterile G17AB line watermelon [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006,33(1):143-145. (in Chinese)

[6] 陈银华,张广平. 雄性不育基因 *barnase* 对西瓜的遗传转化 [J]. 湖南农业大学学报,2006,32(2):128-130.
Chen Y H,Zhang G P. Genetic transformation of watermelon with the male sterility gene-*barnase* [J]. Journal of Hunan Agricultural University,2006,32(2):128-130. (in Chinese)

[7] Liang P,Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Sci-

ence,1992,257:967-971.

[8] 王永勤,曹家树,虞慧芳,等. 白菜核雄性不育两用系生理生化特征的分析 [J]. 园艺学报,2003,30(2):212-214.
Wang Y Q,Cao J S,Yu H F,et al. Analysis on physiological and biochemical characteristics between male sterile and fertile plants of genic male sterile AB line in Chinese cabbage [J]. Acta Horticulturae Sinica,2003,30(2):212-214. (in Chinese)

[9] 夏 涛,刘纪麟. 生长素和玉米素与玉米雄性不育关系的研究 [J]. 作物学报,1994,20(1):26-30.
Xia T,Liu J L. Study on the relation between auxin,zeatin and cytoplasmic male sterility in maize (*Zea mays* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica,1994,20(1):26-30. (in Chinese)

[10] 张凤兰,冯忠梅,张德双,等. 大白菜新型细胞质雄性不育生理生化机制的研究 [J]. 华北农学报,2007,22(5):101-105.
Zhang F L,Feng Z M,Zhang D S,et al. Studies on physiological and biochemical mechanisms for cytoplasmic male sterility in Chinese cabbage [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007,22(5):101-105. (in Chinese)

[11] 陈贤丰,梁承邨. 水稻不育花药中 H₂O₂ 的积累与膜脂过氧化的加剧 [J]. 植物生理学报,1991,17(1):44-48.
Cheng X F,Liang C Y. Accumulation of hydrogen peroxide and lipid peroxidation in male-sterile anthers of *oryza sativa* [J]. Acta Photophysiological Sinica, 1991, 17 (1): 44-48. (in Chinese)

[12] 陈贤丰,梁承邨. HPGMR 不育花药能量代谢、H₂O₂ 积累与雄性不育的关系 [J]. 植物生理学通讯,1991(1):21-24.
Cheng X F,Liang C Y. Relation of energy metabolism in HPGMR abortive anthers and accumulation of H₂O₂ to male sterility [J]. Plant Physiology Communications,1991(1):21-24. (in Chinese)

[13] 赵会杰,刘华山,林学语,等. 小麦胞质不育系花粉败育与活性氧代谢关系的研究 [J]. 作物学报,1996,22(3):365-367.
Zhao H J,Liu H S,Lin X Y,et al. Study on relationship between anther abortion of cytoplasmic male-sterile wheat lines and metabolism of active oxygen [J]. Acta Agronomica Sinica,1996,22(3):365-367. (in Chinese)

[14] 刘丽华,李保国,齐国辉,等. 雄性不育板栗雄花序败育与几种酶活性及 MDA 含量的关系 [J]. 林业科学,2007,43(4):121-124.
Liu L H,Li B G,Qi G H,et al. Relationships between some protective enzymes activities,MDA content and male inflorescence of male sterile chestnut [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2007,43(4):121-124. (in Chinese)

[15] 蒋培东,朱云国,王晓玲. 棉花细胞质雄性不育花药的活性氧代谢 [J]. 中国农业科学,2007,40(2):244-249.
Jiang P D,Zhu Y G,Wang X L. Metabolism of reactive oxygen species in the cytoplasmic male-sterile cotton anther [J]. Scientia Agriculture Sinica, 2007, 40 (2): 244-249. (in Chinese)

[16] Wu H,Cheung A Y. Programmed cell death in plant reproduction [J]. Plant Mol Biol,2000,44:267-281.