

辣椒细胞质雄性不育系及其保持系的 AFLP 分析

罗向东^{1,2}, 戴亮芳^{1,2}, 陈劲枫^{2*}, 王述彬³ (1. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 2. 江西师范大学生命科学院, 江西南昌 330022; 3. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014)

摘要 [目的] 对辣椒细胞质雄性不育系及其保持系进行 AFLP 分析, 为进一步深入研究辣椒细胞质雄性不育的分子机制奠定基础。[方法] 采用 AFLP 技术对辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其保持系 21B 进行分析, 获得不育系 21A 特异扩增片段。将特异扩增片段回收测序并用 BLASTn 和 BLASTX 程序在 NCB I 数据库中进行同源性检索和相似性比对。[结果] 获得了不育系 21A 特异性扩增片段 AA/CAG₁₆₉, 该片段中部分序列是 *Penaeus monodon* 性别及生长性状相关的 AFLP 标记序列中的串联重复序列; BLASTX 和 TBLASTX 分析结果表明, 该特异性片段的翻译产物与马铃薯的假拟 gag-pol 蛋白、假拟逆转座子蛋白、假拟逆转座子 gag 蛋白具有较高的相似性。[结论] 特异性片段 AA/CAG₁₆₉ 的功能可能与逆转座子有关, 表明其可能与育性密切相关。

关键词 辣椒; 细胞质雄性不育; AFLP 分析

中图分类号 S641.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2010)10 - 04999 - 03

AFLP Analysis of Cytoplasmic Male-sterile Line and Its Maintainer Line of Pepper

LUO Xiang-dong et al (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract [Objective] The research aimed to analyze the cytoplasmic male sterile line 21A and its maintainer line 21B of pepper by AFLP and lay the foundation for illuminating the molecular mechanism of the cytoplasmic male sterility in pepper further. [Method] Cytoplasmic male sterility (CMS) line 21A and maintainer line 21B were analyzed by using AFLP. The special fragment was reclaimed and sequenced. DNA sequence of the special fragment was analyzed with BLASTn, BLASTX and TBLASTX in GenBank of NCB I. [Result] A special fragment AA/CAG₁₆₉ was obtained from cytoplasmic male sterility (CMS) line 21A and maintainer line 21B. Partial DNA sequence of AA/CAG₁₆₉ was the series repeated sequence in AFLP marker sequence related with the sex and growth traits of *Penaeus monodon*. The results of BLASTX and TBLASTX online showed that AA/CAG₁₆₉ had higher identities with partial protein sequence of *Solanum demissum* putative gag-pol protein, *Solanum demissum* putative retrotransposon protein, and *Solanum demissum* putative retrotransposon gag protein, respectively. [Conclusion] The function of the fragment AA/CAG₁₆₉ was closely related to retrotransposon, which indicated that the special fragment could be related to the sterility traits.

Key words Pepper; Cytoplasmic male-sterility (CMS); AFLP analysis

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 是世界性的蔬菜和加工调味品, 为我国栽培面积最大的蔬菜作物之一。据统计, 我国辣椒年种植面积达 140 万 hm^2 以上, 为我国蔬菜周年均衡供应做出了重要贡献^[1]。由于辣椒杂种在早熟性、高生产力和高果实重量上的明显优势, 杂交辣椒品种深受广大菜农的欢迎。采用人工去雄和授粉培育杂交种子时间长、成本高。利用辣椒细胞质雄性不育系生产杂交一代种子省力并可确保种子纯度, 保护了育种者的权益, 是目前降低制种成本的最有效途径^[2], 也是当今辣椒育种的主攻方向。因此, 除了加强辣椒雄性不育系的鉴定和选育外, 从生物学不同层面进行研究将为其有效和更广泛地利用提供理论依据。

关于辣椒细胞质雄性不育机理的研究, 在形态学、细胞学、POD 同工酶以及不育性状的遗传规律等方面已作过较详细的探讨^[3-4]; 而辣椒不育的分子机理尤其是与辣椒细胞质雄性不育性状相关的序列片段鲜有报道。因此, 笔者运用 AFLP 技术对辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其同核异质的保持系 21B 基因组 DNA 进行比较分析, 试图获得与 CMS 相关的特异扩增片段, 为进一步深入研究辣椒细胞质雄性不育的分子机制奠定基础, 为更好地利用辣椒细胞质雄性不育系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 以江苏省农业科学院蔬菜研究所辣椒组选育的

基金项目 “十一五” 国家“863” 计划项目 (2006AA100108-3-2); 国家自然科学基金项目 (30860120; 30900781); 江西省教育厅科技计划项目 (GJ08159); 校青年成长基金项目 (2398)。

作者简介 罗向东 (1976 -), 男, 江西吉水人, 博士, 副教授, 从事植物遗传与生物技术研究。*通讯作者, E-mail: jfchen@njau.edu.cn

收稿日期 2010-01-11

辣椒细胞质雄性不育系 21A (不育性状完全稳定) 和其同核异质保持系 21B 为试验材料。1 月上旬将 21A 和 21B 进行冷床育苗, 3 月下旬将这 2 种材料各 100 株种植于江苏农业科学院蔬菜研究所塑料大棚内, 常规田间管理。

1.2 方法

1.2.1 AFLP 研究。 AFLP 研究参考 Vos 等^[5] 和娄群峰等^[6] 方法, 采用 *EcoR* 和 *Mse*I 双酶切, T_4 连接酶将酶切片段与双链 DNA 接头连接 (限制性内切酶和 T_4 连接酶购自上海生物工程技术有限公司)。取 5 μl 酶切连接产物为模板进行预扩增, 预扩增引物为 E + 1, M + 1, 取预扩增产物 5 μl 用 1% 琼脂糖凝胶检测, 估计预扩增的效率。并根据预扩产物的检测结果, 将预扩增产物稀释 10 ~ 30 倍, 作为模板进行选择扩扩增。选择性扩扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 采用银染法染色。

1.2.2 特异条带的回收克隆与测序分析。 将不育系和保持系的差异条带回收。以灭菌的解剖刀准确切下差异条带, 转入装有 200 μl 重蒸水的离心管中。置于沸水浴中 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取 5 μl 上清液作为模板再次以相应引物组合, 扩增条件相同。扩增产物经电泳验证分子量后, 与 pGEMTeasy 载体连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109, 蓝白斑筛选, 单菌落质粒提取并经酶切鉴定后, 送往上海英俊生物技术有限公司进行 DNA 测序。克隆测序后, 去除接头的全序列, 提交 NCB 数据库进行 BLAST 检索分析。

2 结果与分析

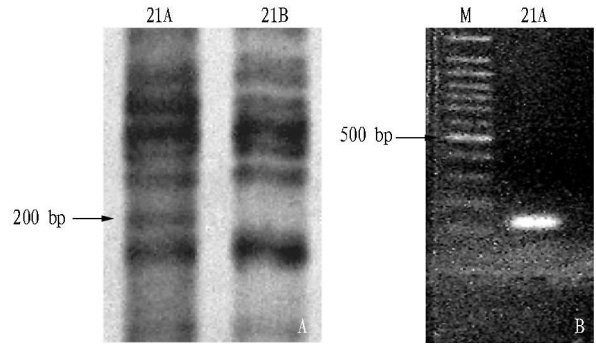
2.1 不育系 21A 和保持系 21B 基因组 AFLP 特异性片段筛选 采用 32 对 AFLP 引物组合对不育系 21A 与其保持系 21B 基因组 DNA 进行扩增, 结果表明 AFLP 图谱条带非常丰

富,平均每个泳道约出现 60 个条带。不育系与保持系之间在所用的 32对 AFLP引物中,只有 1对引物的扩增产物有差异,表明不育系 21A和保持系 21B基因组 DNA差异较小。

利用上述多态性引物对筛选出的引物组合 EcoR-A A/MseI-CAG对不育系 21A与保持系 21B基因组 DNA进行重扩增,不育系 21A中发现 1条约 200 bp的特异性条带(图 1),而在保持系 21B中仍未出现。经过重复试验,证明其片段稳定、可靠,且为与不育性状相关的一段特异性片段。

2.2 AFLP差异片段回收克隆及测序 由图 1-B可知,重组质粒 PCR产物与目的片段大小完全相同,表明目的片段已成功进行了 T-A克隆。测序序列去除载体序列和 AFLP引物组合 AA/CAG序列后,全长共 169 bp(图 2)。因此,为便于分析,将不育系 21A中这条特异性片段记为 AA/CAG₆₉。

2.3 特异性片段 AA/CAG₆₉序列的 BLASTn分析 根据 BLAST查询结果,AA/CAG₆₉的部分序列(位于 122~158 bp, AGAATTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTAAAC,共 37 bp)与 *Penaeus monodon*性别及生长性状相关的 AFLP标记序列(AFE549M27.1)中的几段序列有较高的相似性。进一步比对分析发现,该 37 bp序列是 *Penaeus monodon*性别与



注:A:引物 EAA/MCAG的扩增产物,箭头所示为差异片段;B:差异片段单克隆鉴定结果。

Note: A: Amplification products of primer EAA/MCAG, The arrow show the differential bands; B: Single clone identification results of the differential bands

图 1 不育系 21A和保持系 21B基因组 DNA的 AFLP特异性片段扩增结果

Fig 1 The amplification results of differential fragments of AFLP of genomic DNA from sterile line 21A and its maintainer line 21B

TGATGAGTCCTGAGTAAACAGGCTGGAGAGTTGGAGTCTCAGACTTAGTGTCCTTGACTCTAACCAAATGGTAA
ATACACCCCTTGGAAATAAGCCTTCTATCTTTGAGGTAAGAGATAAAATGACTCTTGGGTGACACAGAATTGGTA
CGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTAAACAGGCGTGTGTTGAATTGGTACGCAGTCA

注:下划线部分为 AFLP引物组合 AA/CAG序列;双下划线部分为 AFLP接头。

Note: The underlined parts are AA/CAG sequence of AFLP primer combination; The double-underlined parts are AFLP joints

图 2 不育系 21A中特异性片段序列

Fig 2 The specific fragment sequence in sterile line 21 A

AAATTGACACTGAGATTGACAATGGAAAATGTGTTAGAA 83
.....AGAA 4
..... agaa
TTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTAAACGGCCTTC 123
TTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTAAAC..... 37
ttggtacgcagtc t gatgagtcctgagtaac
CCAAGCACAGTCTGCAACGAAAATGTCGAAAGTTGAAAAAG 163
.....
GTCTTAGAATTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTA 202
.....AGAATTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTA 72
agaattgggtacgcagtc atgatgagtcctgagta
ACTATTAGAAATTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGT 241
AC.....AGAATTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGT 108
ac.....agaattgggtacgcagtc atgatgagtcctgagtc
AACGGCTGCAAAAATACCTAGCATGGTTTCAAATAACTAT 281
AACRGA.....AT 116
aac g at
TACCACGTAATTTTCTGTGGTCTGAGGACATTCCTATTAG 321
TGGTACGCAGT.....CTCTATGATGAGTCTGAGTAAACAG 150
t acg a gt tg g c t ta ag
AATTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTAAACGGTTT 360
AATTGGTACGCAGTCTATGATGAGTCCTGAGTAAACGAA 190
aattgggtacgcagtc atgatgagtcctgagtaac g t

图 3 AA/CAG₆₉部分序列与 *Penaeus monodon*性别及生长性状相关的 AFLP标记序列的比对结果

Fig 3 The alignment results of partial sequences of AA/CAG₆₉ and the related AFLP markesequences with the sex and growth traits in *Penaeus monodon*

生长性状相关的 AFLP标记序列中的 4个串联重复序列(图 3)。表明特异片段 AA/CAG₆₉与育性密切相关。

2.4 特异性片段 AA/CAG₆₉序列的 BLASTX分析 将该 AA/CAG₆₉片段序列递交到 GenBank,应用 NCB 的 BLASTX程序与蛋白质数据库进行同源性搜索发现,由该片段推测的氨基酸序列分别与马铃薯的假拟 gag-pol蛋白(*Solanum demissum* putative gag-pol protein)、假拟逆转座子蛋白(*Solanum*

demissum putative retrotransposon protein)等部分序列具有较高的相似性(图 4)。TBLASTX程序分析发现其与马铃薯假拟 gag-pol蛋白、假拟逆转座子蛋白、假拟逆转座子 gag蛋白(*Solanum demissum* putative retrotransposon gag protein)部分序列具有较高的相似性。而 gag蛋白是由植物逆转座子结构中心 gag(group-specific antigen)基因编码的 1个多蛋白质前体,后处理成为几种核糖蛋白质; gag-pol蛋白是由 pol-gag共同编码的,酶切以后产生逆转录酶、整合酶以及蛋白酶。因此,推测特异性片段 AA/CAG₆₉的功能可能与逆转座子有关。

Solanum demissum putative gag-pol protein (Identities = 63.41%)
Band 127 NSVSPKSHFISYLKRRRLISKGCYIHLVRVKDTKSEHTTLQ 5
Sbjct 530 SEAVPKGRFISYLKRRRLISKGCYIHLVRVHLSSVEIHFQ 570
Solanum demissum putative gag-pol polyprotein (Identities = 60.98%)
Band 127 NSVSPKSHFISYLKRRRLISKGCYIHLVRVKDTKSEHTTLQ 5
Sbjct 585 SEAVPKGRFISYLKRRRLISKGCYIHLVRVHLSSVEIHFQ 625
Solanum demissum putative retrotransposon protein (Identities = 60.98%)
Band 127 NSVSPKSHFISYLKRRRLISKGCYIHLVRVKDTKSEHTTLQ 5
Sbjct 691 SEAVPKGRFISYLKRRRLISKGCYIHLVRVHLSSVEIHFQ 631

图 4 CMS_{21A} 169的全序列 BLASTX分析结果

Fig 4 Results of BLASTX analysis of the whole sequence of CMS_{21A} 169

3 结论与讨论

关于雄性不育基因的作用机制国内外已开展了广泛研究,通常认为植物 CMS的发生与线粒体基因组的结构、线粒体基因表达密切相关,线粒体基因组分子内或分子间频繁重组是 CMS产生的分子基础。从大量已鉴定的 CMS有关线粒

体 DNA 片段分析来看,它们一般都是几个已知基因的部分序列多次重组后与未鉴定的阅读框 (orf) 形成的嵌合基因,如芥蓝型油菜^[7]、玉米^[8]、水稻^[9]等。

该研究中采用 CTAB 法提取基因组总 DNA 是由核 DNA、mDNA 和 cpDNA 组成,因此不育系 21A 的特异性片段 AA/CAG₁₆₉可能来自核 DNA,也有可能来自 mDNA 或 cpDNA。将特异性片段 AA/CAG₁₆₉序列利用 NCBI 在线工具 ORF Finder 寻找其开放阅读框,结合 BLASTX 和 TBLASTX 搜索分析结果,初步确定特异性片段 AA/CAG₁₆₉序列的阅读框为 - 编码框,编码 53 个氨基酸。但该阅读框的真实身份尚不清楚,与不育嵌合基因是否存在一定的关系仍需进一步深入研究。

该研究的 BLASTn 结果表明,特异片段 AA/CAG₁₆₉与育性可能密切相关。而 BLASTX 和 TBLASTX 分析结果都表明,AA/CAG₁₆₉序列可能与逆转座子有关。暗示了辣椒细胞质雄性不育可能与逆转座子密切相关,类似结果在胡萝卜细胞质雄性不育上也有报道^[10]。这为进一步深入研究并揭示辣椒细胞质雄性不育的分子机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 方荣,陈学军,缪年生,等. 辣椒 (*Capsicum* spp.) 遗传资源与分子育种进展 [J]. 江西农业学报, 2004, 16(3): 55 - 61.
- [2] 王述彬,赵华仑,刘金兵,等. 辣(甜)椒细胞质雄性不育系杂种优势利用及其制种技术 [J]. 江苏农业学报, 2002, 18(3): 143 - 146.
- [3] 戴亮芳,罗向东,王述彬,等. 辣椒细胞质雄性不育系的 3 种同工酶分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1772 - 1776.
- [4] LUO X D, DA I L F, WANG S B, et al Male gamete development and early tapetal degeneration in cytoplasmic male sterile pepper (*Capsicum annuum* L.) investigated by meiotic, anatomical and ultrastructural analyses [J]. Plant Breeding, 2006, 125: 395 - 399.
- [5] VOS P, HOGER R, BLEEKER M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407 - 4414.
- [6] 姜群峰,陈劲枫, MOLLY JAHN, 等. 黄瓜全雌性基因的全 AFLP 和 SCAR

分子标记 [J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 256 - 261.

- [7] YANG J H, ZHANG M F, YU J Q. Mitochondrial nad2 gene is co-transcribed with CMS-associated orf gene in cytoplasmic male-sterile stem mustard (*B. nissica juncea*) [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36: 345 - 351.
- [8] GALLAGHER L J, BETZ S K, CHASE C D. Mitochondrial RNA editing truncates a chimeric open reading frame associated with S male-sterility in maize [J]. Curr Genet, 2002, 42: 179 - 184.
- [9] ZHANG H, LI SH Q, YIP, et al A Honglian CMS line of rice displays aberrant F0 of F0F1-ATPase [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26: 1065 - 1071.
- [10] NAKAJIMA Y, YAMAMOTO T, MURANAKA T, et al Genetic variation of petaloid male-sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence-tagged sites (STSs) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 837 - 843.
- [11] 王勇, 罗世武, 程炳文, 等. 辣椒节水栽培技术 [J]. 内蒙古农业科技, 2006(4): 85 - 86.
- [12] 聂宗顺, 张军, 李江, 等. 夏秋反季节辣椒高产栽培试验 [J]. 内蒙古农业科技, 2007(2): 55 - 57.
- [13] 陈桂英, 孟令强. 辣椒杂交种赤研 4 号的选育 [J]. 内蒙古农业科技, 2007(5): 34 - 35.
- [14] DENG M H, WEN J F, ZOU X X. *In vitro* plant regeneration of pepper cytoplasmic male sterility (CMS) lines via cotyledon culture [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(1): 39 - 42.
- [15] LU L K, LU Q Q, LU C G, et al Construction and identification of HSP70 antisense RNA expression vector for genetic engineering male sterility in plant [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 81 - 84, 128.
- [16] WANG F Q, WEI H, HE Y M, et al Preliminary studies on the effect of photoperiod and temperature on male fertility of a cytoplasmic male sterile line in wheat [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2): 85 - 89.
- [17] 李晓东, 白晨, 张惠忠, 等. 甜菜丛根病单粒型雄性不育系 N9849A、B 的选育 [J]. 内蒙古农业科技, 2006(2): 11 - 13.
- [18] MENG S C, ZHANG H Y, ZHENG X Y, et al Studies on genomic DNA extraction and establishment of AFLP reaction system in Chinese cabbage [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(3): 29 - 35.
- [19] JIN L W, LU W C, PAN Z Y, et al Study on AFLP technical protocol for antagonistic strains of streptomycetes [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(3): 58 - 62.
- [20] WANG Y, JIN Z Q, CHEN Y Y, et al Construction of AFLP molecular marking system in *Mangifera indica* L. [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(5): 72 - 75.

(上接第 4971 页)

的非饱和和渗透系数 (图 5)。由图 5 可以看出,当基质势大于 10 cmH₂O 时,脱湿的非饱和和渗透系数远远大于吸湿过程,最大为当吸力为 70 cm H₂O 时,渗透系数可以相差近 4 个数量级。

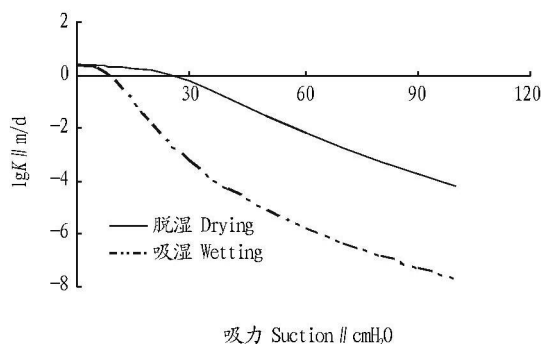


图 5 脱湿和吸湿的非饱和和渗透系数

Fig 5 Unsaturated infiltration coefficient in wetting process and drying process

3 结论

由于风积砂在脱湿和吸湿过程中的吸力不超过 10 kPa,因此利用负水柱方法可以方便地测定风积砂的脱湿和吸湿过程的水分特征曲线,用表达水分特征曲线的 Van Genucht-

en 公式求出拟合参数值后,可以得到非饱和渗透系数、比水容量等表征风积砂非饱和性质的参数。研究结果表明,风积砂吸湿水分特征曲线比脱湿过程存在较大的滞后性;比水深度最大值相差不大,但出现最大值时脱湿过程为 30 cmH₂O,而吸湿过程为 10 cmH₂O;脱湿的非饱和和渗透系数远远大于吸湿过程,最大为当吸力为 70 cmH₂O 时,渗透系数可以相差近 4 个数量级。

参考文献

- [1] BRUCE R R, LUXMORE R J. Water retention: Field method [M] // KLUTE A. Methods of soil analysis Part I. Physical and mineralogical methods Georgia, USA: American Society of Agronomy, Inc, 1986: 679.
- [2] VISSER W C. Progress in the knowledge about the effect of soil moisture content on plant production [C]. The Netherlands Institute for Land and Water Management Research, Wageningen, 1966.
- [3] BROOKS R H, COREY A T. Hydraulic properties of porous media [C]. Colorado State Uni, Fort Collins, 1964.
- [4] van GENUCHTEN M TH. Predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soil [J]. Soil Sci Soc Am J, 1980 44(5): 892 - 898.
- [5] 李园媛, 邱丹. “循化红 线辣椒 SRAP-PCR 反应体系的优化与建立 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 88 - 89, 94.
- [6] 易晓华, 刘建萍. 不同浓度聚乙二醇处理对辣椒幼苗形态的影响 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 102 - 103, 127.
- [7] 王存纲, 张素娟. 大蒜浸提液对辣椒种子发芽和幼苗生长的影响 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 132 - 133.
- [8] 韦美玉, 陈世军. 紫茎泽兰叶片对 2 种辣椒幼苗 POD、SOD 及抗坏血酸代谢的化感效应 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 107 - 108, 183.