

# 胡萝卜 *atp9* 基因的克隆表达及细胞质雄性不育的相关性研究

张 智<sup>1,2</sup>, 梁 毅<sup>1</sup>, 丁海凤<sup>1</sup>, 张洪伟<sup>1</sup>

(1. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京京研益农科技发展中心, 北京 100097; 2. 山西农业大学, 山西 太谷 030800)

**摘 要:**以胡萝卜及其它植物 *atp9* 基因序列信息设计引物, 分离并克隆了胡萝卜细胞质雄性不育相关的线粒体基因片段, 并利用半定量 RT-PCR 和 Real-time PCR 技术研究了该基因在不育系和相应保持系中的表达情况。结果表明:与保持系相比, *atp9* 基因在不育系中发生了若干碱基的置换及缺失; 基因表达分析表明, 不育系 *atp9* 基因在花蕾的前 3 个发育时期表达量明显较低, 并在大花蕾期超过了保持系, 但是在盛花期其表达量又低于保持系。推测 *atp9* 基因的结构变异和异常表达与胡萝卜细胞质雄性不育有着密切关系。

**关键词:**胡萝卜; *atp9* 基因细胞质雄性不育; RT-PCR; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:**S 631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0140-05

细胞质雄性不育(Cytoplasmic Male Sterility, CMS)是受细胞核和细胞质共同控制的一种母性遗传性状<sup>[1-2]</sup>, 其遗传方式不符合孟德尔遗传规律。其中, 胡萝卜雄性不育可分为 2 种类型, 即“瓣化型”雄性不育和“褐药型”雄性不育。“瓣化型”雄性不育植株表现为花药异变为花瓣或类似花瓣的结构而不能产生功能性的花粉, 其雄蕊畸变的程度有所不同; 而“褐药型”雄性不育最初用于杂交育种。目前大多数的细胞质雄性不育杂交种都属于瓣化型。

细胞质雄性不育是由线粒体基因重组而形成的异常开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)表达引起的<sup>[3]</sup>。Levings 等<sup>[4]</sup>通过对玉米 mtDNA 与 CMS 关系的研究发现其不育系和保持系 mtDNA 酶切图谱区别明显, 即二系线粒体基因组存在着大量的差异; 他们首次从分子水平上证明了细胞质雄性不育基因存在于 mtDNA 上。Chetrit 等<sup>[5]</sup>在对美花烟草(*Nicotiana glauca*)原生质体的培养过程中, 获得了 2 个 CMS 基因的突变体

CMS I 和 CMS II, 并发现 2 个突变体 mtDNA 均发生了长达 50 kb 大片段的缺失, 推测 CMS 可能是由 mtDNA 部分片段的缺失所造成。Wise 等<sup>[6]</sup>在 CMS 玉米 mtDNA 中发现了长 5 bp 片段的插入, 该片段的存在导致了线粒体基因序列发生移位, 并产生了 1 个新的终止密码子。Szklarczyk 等<sup>[7-8]</sup>从胡萝卜瓣化型雄性不育株 K826A 和相应的保持系 K831B 中克隆到了 *atp9* 全长基因, 命名为 *atp-sp1* 和 *atp-N1*, 分析表明, 除 ORF 229 bp 的位置出现了核苷酸的置换外, 二者的编码区是完全一致的, 即可育系植株该位置为终止密码子 TAA, 而瓣化型不育系植株为 CAA。

该研究利用与 CMS 相关的胡萝卜和其它植物线粒体 *atp9* 基因序列设计引物, 以胡萝卜“褐药型”雄性不育系 170A 和相应保持系 170B 为试验材料, 克隆胡萝卜两系植物线粒体 *atp9* 基因完整 ORF, 并对 2 个基因片段及其编码的多肽序列进行分析; 另外, 利用半定量 RT-PCR 技术和 Real-time PCR 技术对不同花蕾发育时期该基因的表达特征进行研究, 以期为进一步的论证胡萝卜雄性不育及其相关因素的关系提供了科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料与处理:高代纯合的“褐药型”胡萝卜细胞质雄性不育系 170A 及其相应保持系 170B, 由该课题组保存。取两系胡萝卜新鲜的幼嫩叶片为材料, 用以提取 mtDNA 并克隆目的基因; 目的基因的表达特征分析以两系胡萝卜

**第一作者简介:**张智(1980-), 男, 硕士, 助理研究员, 现主要从事胡萝卜和洋葱遗传研究等工作。E-mail: zhangzhi\_zz@126.com.

**责任作者:**梁毅(1969-), 男, 硕士, 副研究员, 现主要从事胡萝卜和洋葱遗传育种等研究工作。E-mail: liangyi222@yahoo.com.cn.

**基金项目:**国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD02B00, 2011BAD35B07); 北京市科委育种平台三期资助项目(D111100001311002); 北京市常规育种财政专项资助项目(2012-509)。

**收稿日期:**2012-09-03

不同发育时期的花蕾(以花萼的裂开程度为依据分为以下6个时期:花萼紧闭,现蕾前期;花萼裂开 $\leq 0.02$  mm,小花蕾; $0.02$  mm $\leq$ 花萼裂开 $\leq 0.05$  mm,中花蕾; $0.05$  mm $\leq$ 花萼裂开 $\leq 0.1$  mm,大花蕾; $0.1$  mm $\leq$ 花萼裂开 $\leq 0.15$  mm,现花期;花萼裂开 $\geq 0.15$  mm,盛花期)为材料。取样后分别用锡箔纸包好,液氮速冻后,于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

主要试剂:Trizol 试剂和 Superscript II Transcriptase 购于 Life Technologies (原 Invitrogen); RNase Free DNase I 和 poly-d T<sub>18</sub> primer 购于宝生物工程(大连)有限公司;Real Master Mix(SYBR Green)购自天根生化科技(北京)有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 胡萝卜 mtDNA 提取 以胡萝卜不育系和保持系的幼嫩叶片为材料,提取 mtDNA。具体方法参照张智等<sup>[9]</sup>胡萝卜叶片 mtDNA 提取方法。

1.2.2 胡萝卜总 RNA 的提取及反转录合成单链 cDNA

利用 Trizol 试剂提取不育系和保持系胡萝卜花蕾各发育阶段的总 RNA,并用 RNase Free DNase I 处理该 RNA,以去除残留的基因组 DNA。取  $1.0\ \mu\text{L}$  总 RNA,使用 Superscript II Transcriptase 和 poly-d T<sub>18</sub> primer 合成胡萝卜的 cDNA 第 1 链,具体操作步骤参照说明书。

1.2.3 胡萝卜线粒体 *atp9* 基因片段克隆及序列分析

利用 Primer Premier 5.0,根据与 CMS 相关的胡萝卜及其它植物线粒体 *atp9* 基因序列,设计特异性引物 *atp9*-S:  $5'$ -GCCAACATTGACTGACTTTC- $3'$  和 *atp9*-A:  $5'$ -TTACTTTACCCGTTCTCTAA- $3'$ 。以胡萝卜 mtDNA 为模板,扩增其线粒体 *atp9* 基因,反应体系为:胡萝卜 mtDNA  $2\ \mu\text{L}$ ;  $10\times$  PCR Buffer  $2\ \mu\text{L}$ ; *atp9*-S( $5\ \mu\text{mol/L}$ )  $1\ \mu\text{L}$ ; *atp9*-A( $5\ \mu\text{mol/L}$ )  $1\ \mu\text{L}$ ; dNTPs( $2.5\ \text{mmol/L}$ )  $1.6\ \mu\text{L}$ ; Taq 酶( $2.5\ \text{U}/\mu\text{L}$ )  $0.2\ \mu\text{L}$ ; 灭菌水补足  $20\ \mu\text{L}$ 。反应程序为: $94^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\ \text{min}$ ;  $94^{\circ}\text{C}$  变性  $1\ \text{min}$ ,  $56^{\circ}\text{C}$  复性  $1\ \text{min}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\ \text{min}$ , 共 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $7\ \text{min}$ 。取上述 PCR 反应产物  $5\ \mu\text{L}$ ,以 1% 胶浓度进行琼脂糖凝胶电泳,并切胶回收目的基因条带;回收的 PCR 产物克隆到 PGEM-T 载体上,并将筛选的阳性克隆委托上海生工测序。利用 DNASTAR 和 DNAMAN 软件分析目的基因的序列特征、开放阅读框及其编码蛋白质的氨基酸组成;利用在线工具 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/data-software/>) 和 ExPASy Proteomics Server (<http://cn.expasy.org/tools/blast/>) 等进行蛋白质结构功能域、同源氨基酸序列比对以及其它生物信息学分析。

1.2.4 胡萝卜线粒体 *atp9* 基因的表达特征分析 根据克隆到的 *atp9* 基因序列设计了 1 对特异引物 *atp9*-F:  $5'$ -TCCGGCACCTATTGATTTTG- $3'$  (上游引物) 和 *atp9*-R:  $5'$ -GACGAGAGGAGGGGAAGAGT- $3'$  (下游引

物)。以三磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)为内标(上游引物为 GAPDH-S:  $5'$ -TTGGGAAAAAGGAGGAGGAT- $3'$ ,下游引物为 GAPDH-A:  $5'$ -CGAGAAGAACAGAAAGGGGA- $3'$ ),上述提取的 cDNA 第 1 链为模板,分别对保持系和不育系胡萝卜的花蕾各个发育时期 *atp9* 基因进行了半定量 RT-PCR 分析和实时荧光定量 PCR 分析。半定量 RT-PCR 的反应程序为: $94^{\circ}\text{C}$  预变性  $3\ \text{min}$ ;  $94^{\circ}\text{C}$  变性  $30\ \text{s}$ ,  $56^{\circ}\text{C}$  复性  $45\ \text{s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $45\ \text{s}$ , 共 28 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\ \text{min}$ 。实时荧光定量 PCR 分析采用试剂盒 Real Master Mix(SYBR Green)来进行,其反应体系为: $2.5\times$  Real Master Mix/ $20\times$  SYBR solution  $4.5\ \mu\text{L}$ ; 上游引物  $0.25\ \mu\text{L}$ ; 下游引物  $0.25\ \mu\text{L}$ ; cDNA 模板  $1\ \mu\text{L}$ ; 加灭菌水至  $10\ \mu\text{L}$ 。实时荧光定量 PCR 反应采用 Light Cycler system(Roche Light Cycler 480 实时荧光定量 PCR 仪)进行,基因的相对表达量计算采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 胡萝卜 *atp9* 基因片段的克隆与分析

利用胡萝卜和其它植物线粒体 *atp9* 基因的序列设计引物,以胡萝卜不育系和相应保持系 mtDNA 为模板进行 PCR 反应。经电泳检测发现两系 mtDNA 经 PCR 反应后出现大小不同的特异性条带,其中不育系特异条带约为  $600\ \text{bp}$ ,而保持系约为  $650\ \text{bp}$ (图 1)。将 2 个 DNA 片段分别与载体连接并转化大肠杆菌后,以通用测序引物 T7 和 SP6 对重组质粒进行了 PCR 检测,并选取其中的阳性克隆进行测序检测,发现在不育系 170A 中克隆的序列长度为  $598\ \text{bp}$ ,而在保持系 170B 中长度为  $640\ \text{bp}$ 。

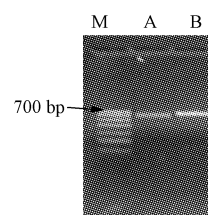


图 1 胡萝卜线粒体 *atp9* 基因片段的 PCR 扩增

注: M: Trans DNA Marker; A: 模板 170A 扩增条带; B: 模板 170B 扩增条带。

*atp9*-170A 包含 1 个长  $270\ \text{bp}$  的完整开放阅读框(ORF),编码长 89 个氨基酸的多肽;而 *atp9*-170B 同样包含 1 个长  $270\ \text{bp}$  的完整开放阅读框(ORF),编码含 89 个氨基酸的多肽链。蛋白质的结构域分析结果表明,不育系和可育系包含有相同的结构域(图 2)。

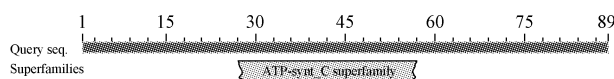


图 2 *atp9* 基因结构域分析

## 2.2 胡萝卜 *atp9* 基因序列比对

将所获得的 2 个 DNA 片段进行 blastn 分析,发现测序所得片段确实是胡萝卜线粒体 *atp9* 基因片段。而 DNASTar、DNAMAN 等软件的分析,表明与保持系相比,不育系 *atp9* 基因的第 52、432、458 和 579 bp 4 个位置核苷酸发生了突变,且在 509~550 bp 处发生了缺失,

而保持系此处多了一段大小为 42 bp 的重复序列;此外,在胡萝卜不育系中,该基因 432 bp 位点的终止密码子 TAA 突变为 CAA,导致其比保持系多编码了 13 个氨基酸。这种结构的变化暗示其可能与胡萝卜细胞质雄性不育有关(图 3)。

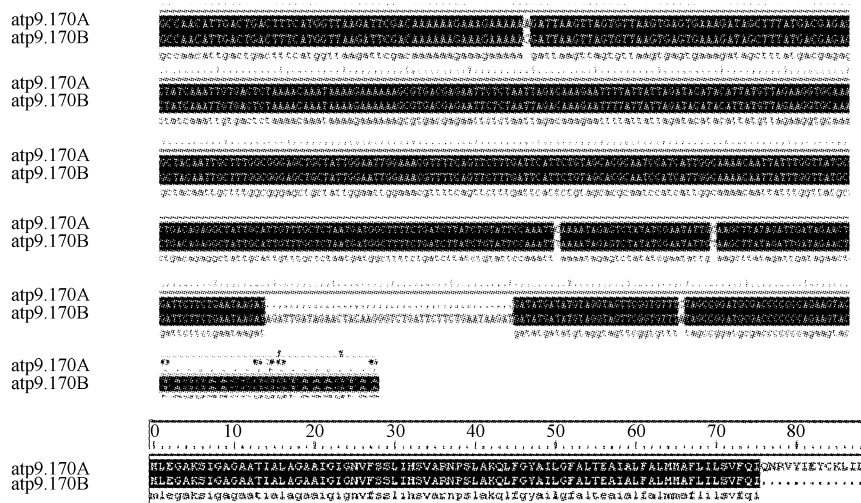


图 3 胡萝卜不育系和可育系 *atp9* 基因核苷酸和蛋白序列比对

## 2.3 胡萝卜 *atp9* 基因不育系蛋白序列同源性比对

通过对 *atp9*-170B 蛋白的 blastp 分析,发现其与蚕豆 Adenylate kinase (Accession No: P69442) 氨基酸序列一致性为 68%。与芥菜 ATPase subunit 9 (Accession No: Q5I7E6)、胡萝卜 ATPase 9 (Accession No: Q94S27) 和苹果 ATP synthase subunit 9 (Accession No: Q37550) 的相似性分别为 68%、57% 和 54%。这些基因都属于

ATP 合成酶第 9 亚组。为进一步分析这些蛋白质之间的系统进化关系,对这些蛋白质进行了系统进化分析和保守结构域比较分析,结果表明, *atp9*-170B 蛋白与胡萝卜 ATPase 9、胡萝卜 F0-F1 ATPase subunit 9 (Accession No: O79335) 遗传距离较近,而与蚕豆 Adenylate kinase 距离较远,与苹果 ATP synthase subunit 9 遗传距离也较远(图 4)。



图 4 *atp9* 及其同源蛋白的系统进化及结构域比较

注:同源蛋白以其 NCBI 登录号命名,进化树分枝长度表示氨基酸变化率,Bootstrap 重复 1 000 次。

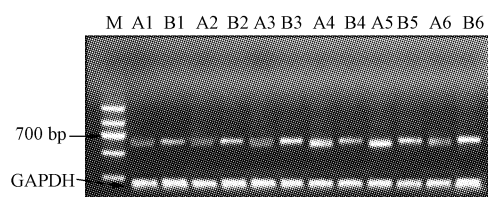
## 2.4 *atp9* 基因的表达特征分析

以胡萝卜不育系和相应的保持系花蕾为研究材料,通过半定量 RT-PCR 技术,分析了 *atp9* 基因在花蕾 6 个不同发育时期的表达含量变化。结果表明,不育系 *atp9* 基因在花蕾发育的前 3 个时期表达量明显低于相应的保持系基因,而从大花蕾期开始,不育系 *atp9* 基因大量表达,甚至超过了相应保持系基因,但是到了盛花期再次降低,并低于保持系该基因的表达量(图 5)。

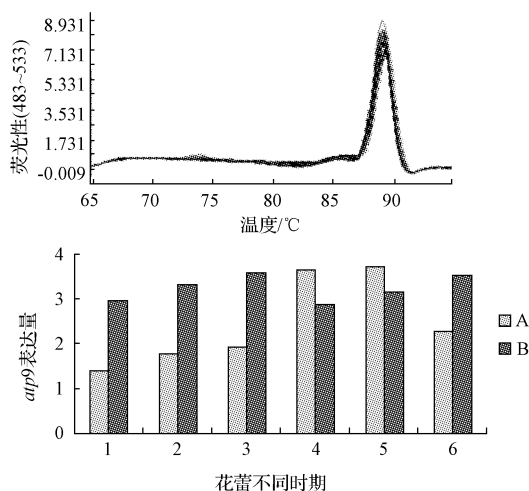
为进一步研究 *atp9* 基因与雄性不育的关系,采用

实时荧光定量 PCR 技术对半定量 RT-PCR 结果进行了验证。该试验结果表明,实时荧光定量 PCR 产物的溶解曲线均为单峰,说明 PCR 特异性高,引物设计合理;对于花蕾的前 2 个发育时期,保持系 *atp9* 基因的表达量均约为不育系 2 倍,而在大花蕾期,不育系 *atp9* 基因表达量达到最大,并超过了其相应保持系,但是在盛花期时其表达量又显著低于保持系。另外,实时荧光定量 PCR 结果还表明了保持系 *atp9* 基因表达量基本稳定(图 6)。实时荧光定量 PCR 结果与半定量 PCR 结果基本保持一



图5 *atp9* 基因的 RT-PCR 表达结果

注:M;Trans DNA Marker;A1~A6;6个时期不育系花蕾 cDNA 扩增条带;B1~B6;6个时期保持系花蕾 cDNA 扩增条带;GAPDH;内参基因扩增条带。

图6 *atp9* 基因的表达特征分析

注:A:不同 PCR 产物片段的溶解曲线分析;B:*atp9* 基因的实时定量 PCR 分析。

致,可推测不育系 *atp9* 基因的异常表达很可能与细胞质雄性不育有着密切关系。

### 3 讨论

该研究以胡萝卜幼嫩叶片为材料,采集叶片后进行低温暗处理,以使叶绿体和糖类充分降解,不仅省去了黄化苗的培育步骤,而且还大大缩短了 mtDNA 的提取时间。该研究利用了蔗糖沉淀差速离心法,在线粒体 DNA 提取过程中,使用了 DNaseI 处理,从而消除了核基因 DNA 的污染。所得 mtDNA 结构完整、质量和产量高,为后续研究奠定了基础。

导致植物细胞质雄性不育的因素有很多,而各种植物中确定的与细胞质雄性不育密切相关的基因也各不相同。由于细胞质雄性不育现象广泛存在<sup>[11]</sup>,而迄今为止确定的与细胞质雄性不育密切相关的基因却不多,涉及的植物也只有十几种<sup>[12]</sup>,所有有关细胞质雄性不育基因的数据有限,以至于利用同源序列克隆雄性不育相关基因方法的利用也受到了极大地限制。高等植物线粒体基因组的大小和结构在不同物种乃至同一物种不同植株之间都存在极大的差异,但线粒体基因组编码的基因产物却基本一致<sup>[13-14]</sup>。随着测序技术的发展,目前大多数植物的线粒体基因组已测序完毕,如经测序发现,油菜线粒体基因组最小,为 221 kb,而最大的则为葫芦

线粒体基因组,为 2 700 kb<sup>[15-16]</sup>。目前,克隆到的细胞质雄性不育基因均为线粒体嵌合基因,且一般都与线粒体编码的功能基因紧密连锁并且共同转录<sup>[12]</sup>。

2000 年,Szklarczyk 等<sup>[7]</sup>在瓣化型胡萝卜雄性不育研究中发现,*atp9* 基因在保持系中比不育系多了 42 bp 的重复序列,而导致了不育系该基因编码的蛋白质序列比相应的保持系多了 13 个氨基酸;通过 RT-PCR 分析,发现该基因的表达量的降低可能是导致雄性不育的原因。而该研究采用瓣化型雄性不育品种及不同的试验材料,同样得出了相同的结论,因此推断 *atp9* 基因在胡萝卜雄性不育中起着关键性作用。

### 参考文献

- [1] Chase C D. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions[J]. Trends Genet, 2007, 23(2): 81-90.
- [2] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development[J]. Plant Cell, 2004, 16(1): 154-169.
- [3] 路铁刚, 丁毅. 分子遗传学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 83-84.
- [4] Levings C S, Pring D R. Restriction endonuclease analysis of mitochondria DNA from normal and texas cytoplasmic male sterile maize[J]. Science, 1976, 193: 158-160.
- [5] Chetrit P, Rios R, Paepe R, et al. Cytoplasmic male sterility is associated with large deletions in the mitochondrial DNA of two *Nicotiana sylvestris* protoclones[J]. Curr Genet, 1992, 21(2): 131-137.
- [6] Wise R P, Pring D R, Gengenbach B G. Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T)-cytoplasm maize is associated with a frame-shift in a mitochondrial open reading frame[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(9): 2858-2862.
- [7] Szklarczyk M, Oczkowski M, Augustyniak H, et al. Organisation and expression of mitochondrial *atp9* genes from CMS and fertile carrots[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100(2): 263-270.
- [8] Bach I C, Olesen A, Simon P W. PCR-based markers to differentiate the mitochondrial genomes of petaloid and male fertile carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Euphytica, 2002, 127(3): 353-365.
- [9] 张智, 王永勤, 关绚丽, 等. 胡萝卜叶片线粒体 DNA 提取方法研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(13): 58-62.
- [10] 唐永凯, 贾永义. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨[J]. 生物技术, 2008, 18(3): 89-91.
- [11] Akagi H, Sakamoto M, Shinryo C, et al. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* gene may cause male sterility [J]. Curr Genet, 1994, 25(1): 52-58.
- [12] 马继鹏. 辣椒细胞质雄性不育相关基因的克隆及表达研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007: 31-32.
- [13] 司家钢, 朱德蔚, 杜永臣, 等. 原生质体非对称融合获得胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 种内胞质杂种[J]. 园艺学报, 2002(2): 128-132.
- [14] 管长志, 尹立荣, 顾自豪, 等. 胡萝卜新品种天红一号的选育[J]. 中国蔬菜, 2003(2): 21-22.
- [15] Handa H. The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.); comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana* [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(20): 5907-5916.
- [16] Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, et al. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA<sup>Cys</sup> (GCA) [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 2571-2576.

# 金线莲原球茎增殖研究

韩晓红, 罗明英, 欧阳志成, 段春红

(武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415)

**摘要:**以金线莲原球茎为试材,研究了基本培养基、添加物以及不同培养方式对原球茎增殖的影响。结果表明:以 B5 为基本培养基最适合金线莲原球茎的增殖;天然添加物对金线莲原球茎增殖有明显的促进作用,椰汁对增殖的促进作用最大,培养 45 d 后原球茎重量平均增加 6.146 倍;液体悬浮培养的增殖效果最佳,培养 30 d 增殖倍数达 2.150,原球茎生长健壮。

**关键词:**金线莲;增殖;原球茎;培养方式;基本培养基;添加物

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0144-03

金线莲(*Anoectochilus roburhii* (Wall.) Lindl)为兰科开唇兰属植物,是一种传统的名贵药材,兼具赏叶和观花之功用。金线莲含有生物碱、氨基酸、多糖、皂甙、甾体等活性成分,主要用于治疗高血压、糖尿病、心脏病、肺炎、急慢性肝炎、肾炎等症<sup>[1-2]</sup>。金线莲组织培养快速繁殖技术主要通过原球茎和丛生芽增殖 2 种途径,而原球茎增殖是兰科植物特有的增殖方式,该试验以金线莲的原球茎为试材,研究基本培养基、添加物以及培养方式对原球茎增殖的影响,旨在通过原球茎增殖途径快速繁殖金线莲,为解决其药源问题提供技术参考。

**第一作者简介:**韩晓红(1977-),女,博士,讲师,现主要从事植物组织培养及遗传转化的研究工作。E-mail:hongxiaohan@126.com。

**基金项目:**湖北省教育厅科学技术研究资助项目(B20114610);武汉市属高等科学研究资助项目(2010086)。

**收稿日期:**2012-08-22

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试金线莲原球茎由武汉生物工程学院植物细胞工程实验室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基选择试验 分别以 N6、B5、MS 以及 1/2MS 为基本培养基,每个培养基同时添加 TDZ 0.4 mg/L+ZT 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L,调 pH 至 5.8,研究不同基本培养基对原球茎增殖的影响。选取颜色较绿、形状比较规则、长势良好的原球茎作为接种材料,切割成大小约 1 cm×1 cm×1 cm 的块状,称重后接种到培养基上,每个处理 20 瓶,培养 45 d 后观察长势,称重。

1.2.2 添加物选择试验 以 B5+TDZ 0.4 mg/L+ZT 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L

## Study on Cloning and Expression of *atp9* Gene in Carrot and Its Relationship to Cytoplasmic Male Sterility

ZHANG Zhi<sup>1,2</sup>, LIANG Yi<sup>1</sup>, DING Hai-feng<sup>1</sup>, ZHANG Hong-wei<sup>1</sup>

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops in North China, Beijing Jingyan Yinong Sci-Tech Development Center, Beijing 100097; 2. Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 030800)

**Abstract:** Specific primers were designed according to the *atp9* gene in carrot and other plants, carrot mitochondrion gene fragments associated with cytoplasmic male sterility were cloned either. The results showed that carrot *atp9* gene contains a many base pair's substitution and deletion in sterile line compared with maintainer line. The expression analysis using semi-quantitative RT-PCR and Real-time PCR demonstrates that expression of *atp9* gene in carrot sterile line was significantly lower than in maintainer line besides the big bud stage. These researches indicated that *atp9* gene mutation and its abnormal expression had a closely relationship with carrot cytoplasmic male sterility.

**Key words:** carrot; *atp9* gene; cytoplasmic male sterility; RT-PCR; real-time PCR