

DOI:10.11937/bfyy.201708021

辣椒细胞质雄性不育相关基因的克隆与表达分析

刘科伟¹, 王述彬², 刁卫平², 戈伟²

(1. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:以辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其相应保持系 21B 为试材, 根据辣椒细胞质雄性不育相关基因 *orf456* 序列设计特异引物, 对 21A 及 21B 的基因组 DNA 进行特异性扩增, 获得了不育系特有的目的条带, 克隆测序表明其大小为 292 bp, 命名为 CMS292。采用 QRT-PCR 方法, 研究了 CMS292 分别在蕾期、盛花期对根、茎、叶和花蕾中的表达水平的影响, 以期探索雄性不育相关基因的表达机制。结果表明: 该基因只在不育系中表达, 并且在所检测的组织中都有表达; 蕾期根和花蕾中的表达量明显高于茎和叶, 盛花期根和叶中的表达量高于茎和花蕾; 从蕾期到盛花期根、茎和花蕾中的表达量呈下降趋势, 而叶中的表达量呈上升趋势, 推测 CMS292 控制辣椒花药中蛋白的表达, 引起小孢子败育, 进而导致雄性不育。

关键词:辣椒; 细胞质雄性不育; *orf456*; QRT-PCR; 表达分析

中图分类号:S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0090-06

高等植物的细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是普遍存在的, 目前为止已在 300 多种植物中发现细胞质雄性不育现象^[1]。植物雄性不育在作物杂种优势利用中有着重要的应用价值^[2-3], 长期以来, 人们一直对植物细胞质雄性不育的分子机理进行探索研究^[4-8]。

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 是常异花授粉植物, 具有明显的杂种优势。自 MARTIN、GRAWFORD 和 PERTERSON 最先报道了辣椒雄性不育现象以来, 国内外对辣椒雄性不育的研究逐步加深^[9-18]。KIM 等^[19]研究发现了一个与辣椒细胞质雄性不育相关的线粒体候选基因 *orf456*, 转录与表达水平及转基因的研究表明, 此基因与辣椒雄性不育性状密切相关。该研究的供试材料 CMS21A 是

以 LANES 为不育源转育而成, 与 KIM 等^[19]研究材料不同, 对不同来源的辣椒雄性不育材料之间是否具有相似的分子机制, 需要进一步深入研究。因此, 该研究根据此 *orf456* 基因序列设计特异引物, 在辣椒不育系中克隆到了一个不育性相关的基因 CMS292, 与 *orf456* 核苷酸序列同源性达 99%。

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, QRT-PCR) 是一种新型的 PCR 技术, 该技术利用在 PCR 反应体系中添加的特定荧光基团, 实时监测整个 PCR 进程中产物的变化, 即荧光信号的积累, 从而对 DNA、RNA 样品或者目标基因的表达进行定性或者定量分析。QRT-PCR 以其可靠、高灵敏度的技术优势而广泛用于基因表达水平的检测^[20]。因此, 现利用 QRT-PCR 技术, 对辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其保持系 21B 中 CMS292 基因的表达进行分析, 研究了 2 个不同生长时期、4 个不同组织中 CMS292 的表达量, 对揭示 CMS292 在辣椒细胞质雄性不育中的作用具有重要的理论意义, 以期对辣椒细胞质雄性不育的分子机理及分子遗传学机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为江苏省农业科学院蔬菜研究所辣椒

第一作者简介:刘科伟(1983-), 男, 河南新蔡人, 硕士, 助理研究员, 现主要从事园林植物育种及栽培等研究工作。E-mail: kwliu@sina.cn.

基金项目:国家“863”计划资助项目(2006AA100108, 2008AA10Z150); 国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A7-04-03, 2008BADB1B04); 江苏省科技支撑计划资助项目(BE2009309); 江苏省中国科学院植物研究所“绿手指”基金资助项目(01-06-11)。

收稿日期:2016-12-13

课题组提供的由法国不育源 LEANS 经过多代回交转育而成的稳定的羊角形辣椒 (*Capiscum annuum* L.) 细胞质雄性不育系 21A 及其相应的保持系 21B^[21], 是同核异质的近等基因系, 其不育性由不育细胞质基因和一对隐性核基因共同决定, 属孢子体不育类型。常规方法管理。

1.2 试验方法

1.2.1 辣椒叶片 DNA 的提取 采摘幼嫩的辣椒叶片, 采用 CTAB 法^[22] 提取基因组 DNA, 略加修改^[23]。

1.2.2 辣椒细胞质雄性不育相关基因片段的克隆及序列分析 根据 NCBI 数据库中辣椒细胞质雄性不育相关线粒体 *orf456* 基因序列设计 1 对特异引物(序列见表 1), 由上海英骏生物技术有限公司合成。以辣椒基因组 DNA 为模板扩增基因片段。反应体系为: 基因组 DNA 1.0 μL ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 上

下游引物各 1.0 μL ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 1.0 μL Mg^{2+} ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2.0 μL dNTPs ($2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.2 μL Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$), 2.0 μL 10 \times PCR reaction buffer, 补充 11.8 μL ddH₂O 使扩增体系总体积为 20 μL 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 60 s (35 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用凝胶回收试剂盒回收特异片段, 用 pEASY-T1 克隆载体连接, 转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中。经菌落 PCR 鉴定后, 送上海英骏生物技术有限公司进行 DNA 测序, 每个样品测定 2 次。测序所得的核苷酸序列用 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)、DNAMAN 5.0 与 BioXM 2.6 软件对其核苷酸序列及其编码的氨基酸序列进行同源性检索分析及序列比对分析。

表 1 辣椒 *orf456* 基因引物和参照基因引物

Table 1 Primer sequences of *orf456* gene and reference genes

引物 Primer	序列 Sequence	用途 Usage
CMS-F	5'-GAGCAAGAAGCGGAACCTAC-3'	Primer of <i>orf456</i> gene in pepper
CMS-R	5'-TTCGTTCCTCAGTCTCTC-3'	Primer of <i>orf456</i> gene in pepper
Actin-F	5'-GTCTCTTCCAAACATCAT-3'	Primer of <i>Actin</i> gene in QRT-PCR
Actin-R	5'-TACTTTCTCTCTGGTGGTGC-3'	Primer of <i>Actin</i> gene in QRT-PCR
UEP-F	5'-CGACTACAACATCCAGAAG-3'	Primer of <i>UEP</i> gene in QRT-PCR
UEP-R	5'-CACACTCAGCATTAGGACAC-3'	Primer of <i>UEP</i> gene in QRT-PCR
EFl α -F	5'-TGAAGAATGGTGATGCTGGC-3'	Primer of <i>EFlα</i> gene in QRT-PCR
EFl α -R	5'-GACAACACCAACAGCAACAG-3'	Primer of <i>EFlα</i> gene in QRT-PCR

1.2.3 辣椒总 RNA 提取和反转录 采用 RNAsim-ple 总 RNA 提取试剂盒提取辣椒生殖生长期 2 个不同生长阶段(蕾期和盛花期)的 4 个不同组织(根、茎、叶和花蕾)的总 RNA, 具体操作参照试剂盒说明书。反转录采用如下体系: 2.5 μg 辣椒总 RNA, 2 μL 随机六聚体引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 μL dNTPs ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 补充 ddH₂O 使扩增体系总体积为 13.5 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后迅速在冰上冷却 2 min。在上述混合液中加入 4 μL 5 \times First Strand Buffer, 1 μL DTT ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL RNasin ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 和 1 μL TIANScript M-MLV ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 42 $^{\circ}\text{C}$, 50 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。将 cDNA 第一链 1:10 稀释, 作为 QRT-PCR 的模板。

1.2.4 QRT-PCR 参照基因引物设计及相对标准曲线的建立 根据 GenBank 中已登录的辣椒 Actin、UEP 和 EFl α 序列, 利用 BioXM 2.6 软件设计 3 对内参引物(表 1)。CMS292 基因表达量以参照基因 Actin、UEP 和 EFl α ^[24] 作为标准进行相对定量, 相对

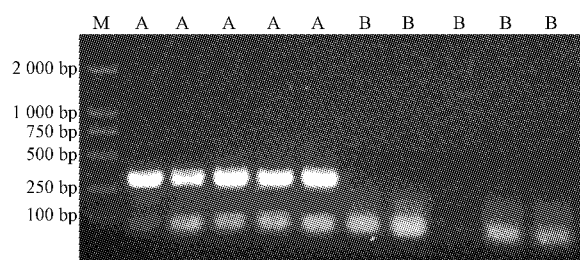
定量方法采用新的 $10^{\Delta\Delta\text{Ct}/A}$ 法(A 为斜率)^[25]。用蕾期叶片 10 倍稀释后的 cDNA 做标准品, 6 个 5 倍系列稀释的标准品的起始拷贝数分别为: 100、500、2 500、12 500、62 500、312 500, 将各个稀释度的起始拷贝数都成比例缩小 100 倍, 使其成为 1.5、25、125、625、3 125, 则标准曲线的斜率和相关系数不变。将各个标准品的起始拷贝数取常用对数作为横坐标, 其所对应的 Ct 值作为纵坐标, 绘制相对定量标准曲线。

1.2.5 QRT-PCR 表达分析 以稀释后的 cDNA 第一链为模板, 采用 QRT-PCR 技术分析辣椒 CMS292 基因在不同生长阶段不同组织中的表达情况。反应体系为 12.5 μL 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM (Takara), 上下游引物各 1 μL ($10 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 μL 稀释后的 cDNA, 补充 8.5 μL ddH₂O 使扩增体系总体积为 25 μL 。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s (40 个循环)。每个样品重复 3 次, 在荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 反应结束后, 获得相应的 Ct 值和熔解曲线, 根据荧光曲线的 Ct 值及标准曲线计算定量结果。

2 结果与分析

2.1 辣椒细胞质雄性不育相关基因片段的克隆及序列分析

利用特异引物(CMS-F、CMS-R)对不育系 21A 及其保持系 21B 进行基因组 DNA 扩增。由图 1 可以看出,在不育系 21A 基因组 DNA 中扩增出一条 330 bp 左右的特异条带,而在其保持系中则无该条带。



注:A.不育系 21A;B.保持系 21B;M. DNA 标准分子量 DL 2 000。
Note: A. CMS line 21A; B. Maintainer line 21B; M. DL 2 000 Marker.

图 1 辣椒细胞质雄性不育基因相关片段 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of PCR products related to cytoplasmic male sterility in pepper

将扩增获得的 330 bp 左右特异片段切胶回收后,连接到 pEASY-T1 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。重组质粒经菌落 PCR 鉴定(图 2),获

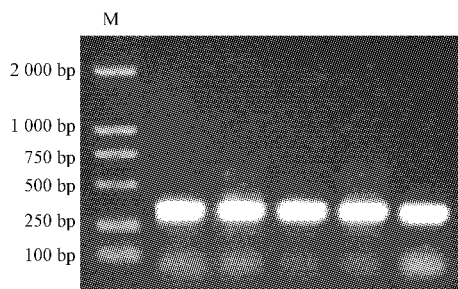


图 2 重组质粒的菌落 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Results of bacterial colony PCR of recombinant plasmid

得了与目的片段大小一致的条带,证明回收片段已经连接到载体上。

重组质粒经上海英骏公司序列测定,表明此特异片段序列全长为 292 bp,命名为 CMS292。序列经 BLAST 同源性比较,与已报道的辣椒细胞质雄性不育相关基因 *orf456* 序列同源性达 99%,核苷酸序列只有 1 个碱基差异,即 *orf456* 第 159 个碱基 T 与 CMS292 第 70 个碱基 C 的差异(图 3)。CMS292 可编码 97 个氨基酸,与 *orf456* 所推导的蛋白序列一致性达 100%(图 4),显示了高度的保守性,此外,该 CMS292 与 *orf456* 一样,还可以编码一个 29 aa 的跨膜蛋白区域。

CMS292AACATTTACATGCAATTCACCATGAATTTTATTGATTATGGCACATTGTTTACTTTTCTTTTATCTCG	71
<i>orf456</i>	CGGAAGTACAAACATTTACATGCAATTCACCATGAATTTTATTGATTATGGCACATTGTTTACTTTTCTTTTATCTCG	160
CMS292	GTATTTCAATCGGCATTTTTCGCGGCCGGTTTTTGTAGCGAAGTGAAGTTTACAGGAATTGGAGAACTCCAGCTAGAA	151
<i>orf456</i>	GTATTTCAATCGGCATTTTTCGCGGCCGGTTTTTGTAGCGAAGTGAAGTTTACAGGAATTGGAGAACTCCAGCTAGAA	240
CMS292	AAAAATAAACTGAAAACGGAAGCAGAAGTCAATTTCTTTGTAGAGAGCACTTGAGAATGAATGAAGAATTACAATTACC	231
<i>orf456</i>	AAAAATAAACTGAAAACGGAAGCAGAAGTCAATTTCTTTGTAGAGAGCACTTGAGAATGAATGAAGAATTACAATTACC	320
CMS292	TGTTCCAGATGGAACGAGTATGCACATCTCCGACTTTTATAGGAAAAGCCTTTTGGTCGAC.....	292
<i>orf456</i>	TGTTCCAGATGGAACGAGTATGCACATCTCCGACTTTTATAGGAAAAGCCTTTTGGTCGACGAGACTGTGAGGGAACGAA	400

图 3 辣椒 CMS292 与雄性不育相关基因 *orf456* 的核苷酸序列比对

Fig. 3 Nucleotide sequence alignment analysis of CMS292 with *orf456* related to male sterility

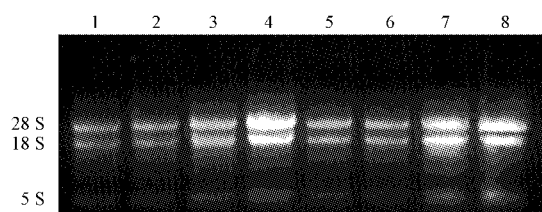
CMS292TFTCNFTMNFIDYGLFTFSFYLGISIGIFAGRFFERSEVLQELNFQLE	50
<i>orf456</i>	MPKSPMYFWLKPATSDKSFPIGRARSGTTFTCNFTMNFIDYGLFTFSFYLGISIGIFAGRFFERSEVLQELNFQLE	80
CMS292	KIKLKTEAELQFLCREHLMNEELQLPVPDGTSMHISDFLGKAFIVD.....	97
<i>orf456</i>	KIKLKTEAELQFLCREHLMNEELQLPVPDGTSMHISDFLGKAFIVDTVRRERILGLTQIYMDLKNNGA	150

图 4 辣椒 CMS292 与雄性不育相关基因 *orf456* 的氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid sequence alignment analysis of CMS292 with *orf456* related to male sterility

2.2 辣椒总 RNA 提取和反转录

图 5 为提取的 RNA, 条带清晰, 无 DNA 污染, 经分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 为 1.9~2.2, OD_{260}/OD_{230} 为 2.1~2.2, 表明所提取的 RNA 纯度较好, 能满足试验需要。



注: 1, 2, 3, 4 依次为 21A 的根、茎、叶、花蕾的 RNA; 5, 6, 7, 8 依次为 21B 的根、茎、叶、花蕾的 RNA。

Note: 1, 2, 3, 4. RNA of root, stem, leaf and flower bud with 21A; 5, 6, 7, 8. RNA of root, stem, leaf and flower bud with 21B.

图 5 蕾期辣椒总 RNA 电泳检测结果

Fig. 5 Results of total RNA isolated from cytoplasmic male sterile line and maintainer line in pepper of bud stage

2.3 相对定量标准曲线的构建

由图 6 可知, 6 个 5 倍系列稀释的标准品进行 QRT-PCR 扩增, 反应结束后构建的标准曲线 $y = -2.3998x + 31.8350$, 相关系数 R 为 0.9959, 起始模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系。

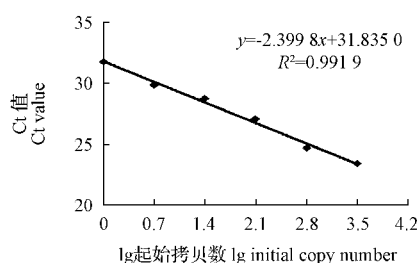


图 6 实时荧光定量标准曲线

Fig. 6 A relative quantitative standard curve

2.4 CMS292 的 QRT-PCR 表达分析

以不育系 21A 及其相应的保持系 21B 的 cDNA 为模板, 采用 QRT-PCR 技术对 CMS292 基因在 2 个不同生长阶段(蕾期和盛花期)的 4 个组织(根、茎、叶和花蕾)中的转录表达水平进行分析, 结果表明, 该基因在所检测的不育系材料所有组织中都有表达, 而在相应的保持系中不表达, 不育系 21A 各组织表达的熔解曲线结果显示为单峰, 且峰值单一, 说明产物特异性好。图 7 为根据 Ct 值计算出辣椒细胞质雄性不育系不同生长阶段、不同组织 CMS292 基因相对于蕾期根中表达指数为 1 的相对表达量结

果。由图 7 可以看出, CMS292 基因在不育系不同生长阶段、不同组织中的表达量存在显著差异。蕾期根和花蕾中的表达量明显高于茎和叶中的, 其中根中的表达量最高; 盛花期根和叶中的表达量高于茎和花蕾中的, 其中根中的表达量最高; 从蕾期到盛花期根、茎和花蕾中的表达量呈下降趋势, 而叶中的表达量呈上升趋势。

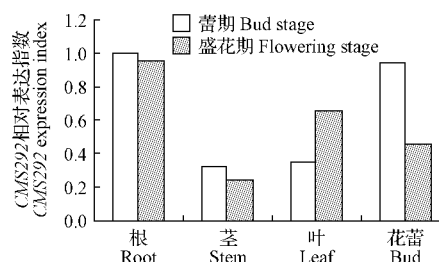


图 7 CMS292 基因在不育系 21A 不同生长阶段、不同组织中的相对表达水平

Fig. 7 Relative expression levels of CMS292 in 21A at different tissues with different stages

3 讨论

近年来, 国内外对雄性不育基因的作用机制开展了广泛的研究, 通常认为细胞质雄性不育的发生是由于线粒体基因组分子内或分子间发生频繁重组, 从而产生新的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 导致线粒体功能发生紊乱, 致使小孢子发育过程中能量供应不足, 进而导致雄性不育^[26-28]。在不育系中, 与不育基因相关的 *orf* 已被确定, 如玉米 *urf13*^[29]、小麦 *orf256*^[30] 和向日葵 *orfH522*^[31] 等。许多研究者通过对多种材料的研究发现, 在 mtDNA、转录和翻译调控水平, 以及线粒体翻译产物—蛋白质水平都可能产生雄性不育^[32-36]。近年来, 众多研究者对多种作物的不育系和保持系的研究表明, 与 CMS 有关的基因或片段均位于线粒体基因组中, 并克隆得到部分与雄性不育相关的线粒体候选基因^[37-41]。

KIM 等^[19]研究表明, *orf456* 的表达调控发生在转录后的翻译水平上, Western 分子杂交法分析得出 *orf456* 的转录被翻译成一种跨膜蛋白, 这种蛋白在细胞质雄性不育系中有一个约 17 kDa 的表达产物, 并高度表达, 而其在恢复系中明显减少。该研究在辣椒细胞质雄性不育系 21A 中克隆到了一个不育相关基因序列 CMS292, 与辣椒细胞质雄性不育相关基因 *orf456* 核苷酸序列同源性高达 99%, 蛋白质序列完全相同。KIM 等^[19]通过转基因试验及电镜观察

到不育植株处于小孢子阶段的花粉囊中含有空泡的花粉粒,导致雄性不育。而王述彬等^[13]研究表明辣椒 CMS21A 在雄配子发育过程中,绒毡层细胞中的线粒体空泡化,结构异常,导致雄性不育。因此,推论该研究所用不育材料的不育性可能与 CMS292 相关,并可能与 *orf456* 具有相同或相似的败育机理。

通过 QRT-PCR 研究表明,CMS292 是在不育系的线粒体中特异表达的基因,不育系的蕾期、盛花期的根、茎、叶和花蕾中都有表达,为组成型表达,并不具有组织特异性,这似乎与不育系材料只表现为雄蕊退化而其余性状与其相应的保持系没有差异的表型性状不够吻合,CMS292 可能只对 CMS21A 花粉的育性产生影响,而与其它性状无关。

吴鹤鸣等^[42]研究发现,辣椒细胞质雄性不育系 21A 花药中蛋白质和 DNA 含量明显比其保持系 21B 低,而且随着花药的继续发育,花药中的蛋白质和 DNA 含量逐渐下降直至消失。当花粉母细胞减数分裂以及四分孢子时也正是蛋白质和 DNA 合成旺盛时,需要大量的营养物质,而不育株花药的生物合成受到破坏,新陈代谢紊乱,导致核酸等物质合成的减弱或停止,产生雄性不育。*orf456* 是在翻译水平上调细胞质雄性不育的,其翻译的蛋白质与 CMS292 相同,并有一个相同的 29 aa 的跨膜蛋白区域,该研究中盛花期花蕾中的表达量比蕾期的低,可能是由 CMS292 翻译的蛋白产物控制的,此蛋白在蕾期高度表达,而在盛花期此蛋白合成受阻,营养和能量供应不足,引起小孢子败育进而导致雄性不育,表达量下降。至于 CMS292 是直接或者间接方式导致雄性不育,以及 CMS292 的表达与 CMS 发生的直接分子证据仍需进行深入的研究。

参考文献

[1] KAUL M L H. Male sterility in higher plants[M]. Berlin: Springer Verlag Press, 1988; 1-290, 845-883.
[2] WANG C G, CHEN X Q, LAN T Y, et al. Cloning and transcript analyses of the chimeric gene associated with cytoplasmic male sterility in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) [J]. Euphytica, 2006, 151: 111-119.
[3] HANSON M R. Plant mitochondrial mutation and male sterility [J]. Annu Rev Genet, 1991, 25: 461-486.
[4] BONHOMME S. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica cybrids* [J]. Mol Gen Genet, 1992, 235: 340-348.
[5] GRELON M, BUDAR F, BONHOMME S, et al. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated *orf138* is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in malesterile *Brassica cybrids* [J]. Mol Gen Genet, 1994, 243: 540-547.

[6] MAKAROFF C A, APEL I J, PALMER J D. Characterization of radish mitochondrial *atpA*-associated sequences and relationship with male sterility [J]. Plant Mol Biol, 1990, 15: 735-746.
[7] MONEGER R, SMART C J, LEAVER C J. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene [J]. EMBO J, 1994, 13: 8-17.
[8] TANG H V, PRING D R, SHAW L C, et al. Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum [J]. Plant J, 1996, 10: 123-133.
[9] 尚宏芹, 刘建萍, 高尚勇. 辣椒雄性不育的研究进展 [J]. 长江蔬菜, 2005(1): 35-38.
[10] 唐冬英, 邹学校, 刘志敏, 等. 辣椒胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004(4): 307-309.
[11] 刘科伟, 王述彬, 刘金兵, 等. 辣椒细胞质雄性不育基因的 AFLP 分析 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 736-742.
[12] 张宝玺, 王立浩, 黄三文, 等. 辣椒分子遗传图谱的构建和胞质雄性不育恢复性的 QTL 分析 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(7): 818-822.
[13] 王述彬, 罗向东, 戴亮芳, 等. 辣(甜)椒细胞质雄性不育系减数分裂和雄配子发生过程 [J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 807-810.
[14] 戴亮芳, 罗向东, 王述彬, 等. 辣椒细胞质雄性不育系和保持系过氧化物酶同工酶的比较分析 [J]. 西北植物学报, 2005(25): 1960-1964.
[15] KIM D H, KIM B D. Development of SCAR markers for early identification of cytoplasmic male sterility genotype in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Mol Cells, 2005, 20: 416-422.
[16] KIM D S, KIM D H, YOOI J H, et al. Cleaved amplified polymorphic sequence and amplified fragment length polymorphism markers linked to the fertility restorer gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Mol Cells, 2006, 21: 135-140.
[17] KUMAR R, KUMAR S, DWIVEDI N, et al. Validation of SCAR markers, diversity analysis of male sterile (S-) cytoplasm and isolation of an alloplasmic S-cytoplasm in *Capsicum* [J]. Sci Hort, 2008, 120: 167-172.
[18] 马继鹏, 巩振辉, 黄炜. 辣椒细胞质雄性不育相关线粒体基因片段的克隆及序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(2): 124-128.
[19] KIM D H, KANG J G, KIM B D. Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated *orf456* gene of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Mol Biol, 2007, 63: 519-532.
[20] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. Methods, 2001, 25: 386-401.
[21] 王述彬, 赵华仑, 刘金兵, 等. 辣(甜)椒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.
[22] MURRAY H G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4326.
[23] 刘科伟, 杨学玲, 王述彬, 等. 辣椒 AFLP 技术体系的建立与优化 [J]. 江西农业学报, 2009, 21(7): 1-3.
[24] WANG S B, LIU K W, DIAO W P, et al. Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR [J]. Mol Breeding, 2012, 30: 1393-1400.

- [25] 张驰宇,徐顺高,黄新祥.一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立[J].生物化学与生物物理进展,2005,32(9):883-888.
- [26] SCHNABLE P S, WISE R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration[J]. Trends Plant Sci, 1998, 3: 175-180.
- [27] BUDAR F, PELLETIER G. Male sterility in plant: occurrence, determinism, significance and use[J]. Life Sciences, 2001, 324: 543-550.
- [28] 张明方,杨景华,陈竹君.十字花科作物细胞质雄性不育的分子机理[J].农业生物技术学报,2003,11(5):538-544.
- [29] LEVINGS S C. The texas cytoplasm of maize: Cytoplasmic male sterility and disease susceptibility[J]. Science, 1990, 250: 942-947.
- [30] SONG J, HEDGCOCK C. A chimeric gene (*orf 256*) is expressed as protein only in cytoplasmic male-sterile lines of wheat[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 535-539.
- [31] KOHLER R K, HORN R, LOSSL A, et al. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene[J]. Mol Gen Genet, 1991, 227: 369-376.
- [32] DEWEY R E, TIMOTHY D H, LEVINGS C S. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize[J]. Current Genetics, 1991, 20: 475-482.
- [33] HORN R, KOHLER R H, ZETSCHKE K. A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(1): 29-36.
- [34] MART C J, MONEGER F, LEAVER C J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower[J]. The Plant Cell, 1994, 6(6): 811-825.
- [35] EDQBIST J, BERGMAN P. Nuclear identity specifies transcriptional initiation in plant mitochondria[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49(1): 59-68.
- [36] 张鸿,陈祖玉,李阳生,等.马协型水稻细胞质雄性不育系线粒体基因组的变异与功能的研究[J].武汉植物学研究,2007,25(3): 313-315.
- [37] SINGH M, BROWN G G. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region[J]. The Plant Cell, 1991, 3(12): 1349-1362.
- [38] HANDA H, NAKAJIMA K. Different organization and altered transcription of the mitochondrial *atp6* gene in the male sterile cytoplasm of rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. Curr Genet, 1992, 21: 153-159.
- [39] AKAGI H, SAKAMOTO M, SHINJO C, et al. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility[J]. Theor Appl Genet, 1994, 25: 52-58.
- [40] 王永飞,马三梅,张鲁刚,等.植物细胞质雄性不育的分子机理研究进展[J].自然科学进展,2002(10): 1009-1014.
- [41] 危文亮,王汉中,刘贵华.植物细胞质雄性不育性与育性恢复的分子生物学研究进展[J].遗传,2005(4): 651-658.
- [42] 吴鹤鸣,余建明,周邗扬,等.羊角椒雄性不育系及保持系的细胞学观察[J].江苏农业学报,1988,4(2): 35-38.

Cloning and Expression Analysis of Gene Related With Cytoplasmic Male Sterility in Hot Pepper

LIU Kewei¹, WANG Shubin², DIAO Weiping², GE Wei²

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract: The cytoplasmic male sterile line 21A and its maintainer line 21B of hot pepper were used as test materials, the specific fragment were amplified by using specific primers designed according to the pepper cytoplasmic male sterility associated with gene *orf456* between the genomic DNAs of 21A and 21B. And the specific fragment were found only in cytoplasmic male sterile line. Cloning and sequencing analysis indicated that the length of the sequence were 292 bp, named *CMS292*. The effect of expression level of *CMS292* in roots, stems, leaves and flower buds at bud and flowering stages were studied by QRT-PCR method, in order to explore the expression mechanism of male sterility related genes. The results indicated that *CMS292* expressed with all tissues tested in cytoplasmic male sterile line. The expression in roots and flower buds were higher than in stems and leaves at bud stage, and the expression in stems and flower buds were lower than in roots and leaves at flowering stage. From bud stage to flowering stage, since the expression were downtrend in roots, stems and flower buds, the leaves expression were rised. It was speculated that *CMS292* regulated the expression of protein in anther, causing microspore abortion, which led to cytoplasmic male sterility.

Keywords: pepper; cytoplasmic male sterility(CMS); *orf456*; QRT-PCR; expression analysis