茎瘤芥胞质雄性不育性与线粒体 T 基因选择性剪接有关

裴雁曦 陈竹君 曹家树 陈学军 刘晓辉

(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006; 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029; 云南烟草科学研究所生物技术重点实验室, 昆明 650106. E-mail: peiyanyi@sxu.edu.cn)

摘要 从茎瘤芥胞质雄性不育(cytoplasmic male sterile, CMS)系统粒体 cDNA 中扩增获得了 CMS 相关 T 基因的 2 个不同转录本, 分别命名为 T1170 和 T1243. 序列分析表明, T1243 是一个保留了内含子的转录本, 该内含子具备 型内含子基本特征. 这 2 个转录本是 T 基因选择性剪接的产物. RT-PCR 分析表明, 在苗期, T 基因转录水平的表达以 T1170 转录本为主; 随着发育时期变化, 该转录本表达逐渐减少, 而另一个转录本 T1243 表达丰度增加; 到盛花期, 该基因的表达以后者为主. Northern 杂交验证了这一结果. 推断茎瘤芥胞质雄性不育性和 T 基因转录后选择性剪接有关.

关键词 茎瘤芥(*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) 胞质雄性不育 选择性剪接 转录 表达

植物胞质雄性不育(cytoplasmic male sterile, CMS)是自然界较普遍的现象, 是遗传学理论研究的一个重要课题. CMS 的母性遗传现象, 使人们很自然地将其与线粒体和叶绿体 2 种细胞器联系起来, 故一般认为线粒体的变异是进行相关研究的前提^[1,2].

茎瘤芥(*B. juncea* var. *tumida* Tsen et Lee)又称榨菜, 其胞质雄性不育系是利用芥菜胞质雄性不育系 × 大白菜(*B. juncea* Coss × *B. campestris* L ssp *penkinesis*(Lour) Olsson)的种间杂种 F₀ 不育源^[3]为母本, 茎瘤芥(*B. juncea* var. *tumida* Tsen et Lee)为轮回亲本, 通过 18 代回交选育获得. 其他性状与保持系相同. 因而作为轮回父本的保持(MF)系和 CMS 系有相同的遗传背景.

在前期研究中^[4], 参考已发表十字花科 CMS 相关基因核酸序列设计引物, 用 PCR 从茎瘤芥 CMS 系统粒体 DNA(mtDNA)中克隆到特异 T 基因. Southern 杂交证明在 MF 系中不存该基因. 序列分析表明, T 基因与甘蓝型油菜波里马 CMS 系 mtDNA 相关特异片段 *orf224* 的核苷酸序列同源性为 70.6%, 推测该基因是一个 CMS 相关基因.

本文从茎瘤芥 CMS 线粒体 RNA(mtRNA)入手, 通过 RT-PCR 和 Northern blot 等方法对 T 基因在不同时期的表达情况进行分析, 进一步了解 T 基因的作用特征和规律.

1 材料与方法

() 植物材料. 茎瘤芥 CMS 系和保持系于苗期、抽薹期和盛花期采集幼嫩叶片供试.

() 试剂. 总 RNA 抽提液 Trizol[®], 琼脂糖凝胶

回收试剂盒 Concert[™] Rapid Gel Extraction System, 反转录试剂盒 Superscript[™] 购于 Gibco/BRL 公司; 限制性内切酶、Taq-DNA 聚合酶、琼脂糖、dNTP 及 6N 随机引物购自上海生工公司. T4-DNA 连接酶和 pGEM-T Easy 载体均购于 Promega 公司; α -³²P-dATP 购自北京亚辉生物医学工程公司; 尼龙膜购于 MILLIPORE 公司; 引物由上海生工公司合成.

() 茎瘤芥不同发育时期线粒体总 RNA 的分离.

按照文献[5]的方法, 分离茎瘤芥苗期、抽薹期、盛花期幼嫩叶片 CMS 系和 MF 系线粒体, 并提取线粒体 DNA. 线粒体 RNA(mtRNA)抽提按照 Trizol[®]试剂盒说明书要求操作, 略有改进. 甲醛变性凝胶电泳检测.

() 线粒体 RNA 的反转录. 取各样本总 RNA 反转录, 流程为 100 ng/ μ L 的 Oligo(dT) 2 μ L, 100 ng/ μ L 6N 随机引物 3 μ L, RNA 5 μ L(约 200 ng), 75 水浴 5 min 后冰浴 5 min; 加入 5× RT 缓冲液 6 μ L, 0.1 mol/L DTT 3 μ L, 20 nmol/L dNTPs 3 μ L, 2 μ L MMLV (200 U/ μ L), RNasin 1 μ L, 6 μ L DEPC-H₂O 混合后总体积 30 μ L. 42 温浴 2 h, 65 灭活.

() 基因的扩增和克隆. 分别取 CMS 系和 MF 系苗期、抽薹期和盛花期混合 cDNA 5 μ L 作模板进行 PCR 扩增. 扩增程序为: 94 , 5 min; 94 , 30 s, 58 , 45 s, 72 , 90 s, 38 个循环; 72 , 10 min. 引物为 P1 × P2. 引物序列见图 1. 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收, pGEM-T easy 载体克隆, 方法参照文献 6. 委托上海生工公司通用引物测序.

() Southern 分析. 以 832 bp 的 probe A 和 73 bp 的 probe B(图 1)对茎瘤芥 CMS 系统粒体 DNA 进

图 1 茎瘤芥 CMS T1170 和 T1243 转录本结构示意图

P1~5 为不同引物(P1, 5'-AAATCGATGCCTCAACTGGATAAATTC-3'; P2, 5'-CCCAAGCTTCAGCGAAAGAGATCAAGGAT-3'; P3, 5'-GTGCGTTGGTGGTATGCTAT-3'; P4, 5'-ATAGCCCTTCACGACATCTT-3'; P5, 5'-CCTCTTTGAAGCCAAAGAAGC-3'); 阴影部分为型内含子所在位置; Probe A 和 B 为 Southern 和 Northern 杂交所用的 2 个探针

行 Southern 杂交分析. 以 PCR 法获得并标记探针: 在 50 μ L 体系中, 依次加入无菌去离子水 35 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, $MgCl_2$ 2.5 mmol/L, 引物 P1 $\times$ P2 或 P1 $\times$ P4(分别获得 probe A 和 probe B)各 0.2 μ mol/L, 10% BSA 0.5 μ L, 标记混合物(labeling mixture, LM) 1 μ L, 质粒 DNA 0.5 μ L, Taq 酶 3 U, α - 32 P-dATP 1 μ L. 以 *Bam*H, *Eco*R 和 *Eco*R 3 种限制性内切酶分别对 CMS 系线粒体 DNA 消化, 电泳检测, 转膜, Southern 杂交. 方法参照文献[6]方法. 用 Typhone 8600 (molecular dynamics) 扫描信号.

() 转录本的 RT-PCR 表达谱分析. 以 CMS 系苗期、抽薹期、盛花期线粒体 cDNA 为模板, P1 $\times$ P4 和 P1 $\times$ P2 引物组合进行 PCR 扩增分析, 引物序列见图 1. 扩增条件同上.

() 2 个片段的 Northern 分析验证. 以 probe A 和 probe B 对茎瘤芥 CMS 系不同发育时期的线粒体 RNA 进行了 Northern 杂交分析. 探针标记同上. Northern 杂交方法参照文献[6]方法. 用 Typhone 8600 扫描仪扫描杂交信号.

2 结果分析

2.1 茎瘤芥线粒体 RNA 的提取

茎瘤芥 CMS 系和 MF 系苗期、抽薹期和盛花期线粒体 RNA 提取后 1%甲醛变性凝胶电泳结果如图 2, RNA 无降解, 符合以下操作要求.

2.2 cDNA 模板的扩增

茎瘤芥 CMS 系和 MF 系线粒体总 RNA(不同发育时期混合), 以 Oligo(dT)引物和适量 6N 随机引物反转录, 以 P1 $\times$ P2 引物扩增, 在 MF 系中没有特异扩增(结果未显示). 在 CMS 系中扩增出分子量非常

相近的 2 条特异带. 合并胶回收 T 载体克隆后, 测序筛选出 2 个不同克隆命名为 T1170 和 T1243(图 3).

图 2 茎瘤芥 CMS 系和 MF 系不同时期线粒体 RNA
1 示 CMS 苗期; 2 示 MF 苗期; 3 示 CMS 抽薹期; 4 示 MF 抽薹期; 5 示 CMS 盛花期; 6 示 MF 盛花期

2 段序列比对结果表明, T1170 和 T1243 序列同源性很高, 首尾完全相同, 但 T1243 在第 834 个碱基处增加了一段, 共 73 个碱基. 该 73 bp 片段首尾有 GTGCG 和 AT 序列, 这是线粒体型内含子剪接位点的典型特征, 且尾部 AT 前为 CT, 基本符合 Y_n 特征. 但是片段中间部分没有富含 AT 序列, 而是包含有 1 个由 ATG 起始, TGA AGG 结束的有 54 个碱基组成的可读框(ORF). 在线粒体基因中, TGA 常不作为终止子而是编码 Trp, 而 AGG 是常见的线粒体终止密码. 由于这一段 DNA 有 73 个碱基, 因而 T1170 和 T1243 的后半段不具有相同的 ORF.

2.3 Southern 分析

分别以 probe A 和 probe B (图 1)为探针, 与 CMS 系 mtDNA 的不同酶切产物(*Eco*R, *Bam*H, *Eco*R)进行杂交. 如果 2 个转录本是同一个基因转录而来, 那么 probe A 和 probe B 杂交结果应该显示相同的图式, 如果二者来源于不同基因, 那么杂交图式应该不同. Southern 杂交显示相同的杂交信号分布模式, 且都是单条信号带(图 4), 表明 T1170 和 T1243 是同一

```

T1170 1 AAATCGATGCCTCAACTGGATAAAATCGAGCTCAGGGAGATATACAAAAAGACTTCGCC
T1243 1 AAATCGATGCCTCAACTGGATAAAATCGAGCTCAGGGAGATATACAAAAAGACTTCGCC
*****

T1170 61 GAAGAGAAAAGCGCCTCGGCGACCACTTCTGAAGAGCAGCTCCAAATCGCACGAGAA
T1243 61 GAAGAGAAAAGCGCCTCGGCGACCACTTCTGAAGAGCAGCTCCAAATCGCACGAGAA
*****

T1170 121 TCCAGCGCTAGTGACTTCGTTGCTTGTATCTGGAGTTACATTCTGACCCATACGTAACG
T1243 121 TCCAGCGCTAGTGACTTCGTTGCTTGTATCTGGAGTTACATTCTGACCCATACGTAACG
*****

T1170 181 TCAGCGAATTTACGGTGAGGGGCAATCACCAGGCTTCATCTTGATGGATGAGCCAGGA
T1243 181 TCAGCGAATTTACGGTGAGGGGCAATCACCAGGCTTCATCTTGATGGATGAGCCAGGA
*****

T1170 241 CAGCACTCCATGGCGACGAAAAGCCAAGTGGCACTGCTTCAGCAATTGTCTGCTCAGAAG
T1243 241 CAGCACTCCATGGCGACGAAAAGCCAAGTGGCACTGCTTCAGCAATTGTCTGCTCAGAAG
*****

T1170 301 GGCCTTCAGAGCATCGTTGCCGCGTCGTTGACGATAGTGAGGCGGCATACCTTGAAGCC
T1243 301 GGCCTTCAGAGCATCGTTGCCGCGTCGTTGACGATAGTGAGGCGGCATACCTTGAAGCC
*****

T1170 361 ACCCATAACGTTGAATTCAACCTGATTGCTGTGGCGGATAAGGCTATTGTGCCGAATGGG
T1243 361 ACCCATAACGTTGAATTCAACCTGATTGCTGTGGCGGATAAGGCTATTGTGCCGAATGGG
*****

T1170 421 GATACGGTGCTTCTGGGGGCTAGAGTAGTTGCGGGTGCTGGCGAGTCTTCATCTTGCGA
T1243 421 GATACGGTGCTTCTGGGGGCTAGAGTAGTTGCGGGTGCTGGCGAGTCTTCATCTTGCGA
*****

T1170 481 GTCCTCATCATGGCAGGTTCTGGCGTCGGCGGGTCATGCCGTTGGTTACTCCTGAAGCAT
T1243 481 GTCCTCATCATGGCAGGTTCTGGCGTCGGCGGGTCATGCCGTTGGTTACTCCTGAAGCAT
*****

T1170 541 GCGGCTGTTGATGGCGGCGAAACATCACATTACCGCCAGACATCAGGCTCAGCGTTATCC
T1243 541 GCGGCTGTTGATGGCGGCGAAACATCACATTACCGCCAGACATCAGGCTCAGCGTTATCC
*****

T1170 601 TATAGACCAACGGCGTTACTTACCTTCATTGGTTTAACTCACACTATGATACCTACCTG
T1243 601 TATAGACCAACGGCGTTACTTACCTTCATTGGTTTAACTCACACTATGATACCTACCTG
*****

T1170 661 AATTTCTCCGAGCCAGTTTACGGCCTCCTGCTCTGCCAGCAGCGTTGGAGATCTCCCC
T1243 661 AATTTCTCCGAGCCAGTTTACGGCCTCCTGCTCTGCCAGCAGCGTTGGAGATCTCCCC
*****

T1170 721 TTCATGGATGATCTCCTGAGTTGGCCTCTCGCACATTACCAACCTACAGAACAACTTGAA
T1243 721 TTCATGGATGATCTCCTGAGTTGGCCTCTCGCACATTACCAACCTACAGAACAACTTGAA
*****

T1170 781 GCGAGGCGGGAAGCCTTAGCTGCCGTTTTGGGCTTCTTTGGCTTCAAAGAGG-----
T1243 781 GCGAGGCGGGAAGCCTTAGCTGCCGTTTTGGGCTTCTTTGGCTTCAAAGAGGGGCTT
*****

T1170 834 -----
T1243 841 GTGGTATGCTATCTTGAAGCTGGTACTGCACCTACAAACGCAGATAAAGATGTCGTGAA

T1170 833 -----AATGTGAAAGACCACCTCGACCGGGACGTCCTGGCGCCCCCGCAGGCGGTGGC
T1243 901 GGCTATAATGTGAAAGACCACCTCGACCGGGACGTCCTGGCGCCCCCGCAGGCGGTGGC
*****

T1170 887 GTCGAGGAGTCGCCAAAGAGGGCTTGGAGCATATCTTCTCTGTCAGATCTGTATCTATT
T1243 961 GTCGAGGAGTCGCCAAAGAGGGCTTGGAGCATATCTTCTCTGTCAGATCTGTATCTATT
*****

T1170 947 GTGTAGTGGTCAACTGATCCCGGACAAGACGTTAAGTTTTTCTCGGACTGTGCTGGGGC
T1243 1021 GTGTAGTGGTCAACTGATCCCGGACAAGACGTTAAGTTTTTCTCGGACTGTGCTGGGGC
*****

T1170 1007 CAGCTCACCGTTGAACATCATGTGGTCGATCACCAGCGCAAGCGGGAGATCGACACATTGG
T1243 1081 CAGCTCACCGTTGAACATCATGTGGTCGATCACCAGCGCAAGCGGGAGATCGACACATTGG
*****

T1170 1067 TACCGTCCTCTCAGACGTCGGAAGCCTCTCGGCGTTTCCATACCTGCTTTGTACCAATT
T1243 1141 TACCGTCCTCTCAGACGTCGGAAGCCTCTCGGCGTTTCCATACCTGCTTTGTACCAATT
*****

T1170 1127 TGAAGAGGTGCCAGCCCTATCCTTGATCTCTTTCGCTGAAGCTTG
T1243 1201 TGAAGAGGTGCCAGCCCTATCCTTGATCTCTTTCGCTGAAGCTTG
*****

```

图3 茎瘤芥 CMS 系 T1170 和 T1243 转录本的序列比较
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/CSB2004-49-22-2312>
 阴影部分为扩增引物位置

图 4 T1170 和 T1243 转录本中 2 个探针的 Southern 分析
(a) probe A 杂交结果; (b) probe B 杂交结果; 1~3 示 mt DNA 分别用 *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRI* 消化

个基因转录产物, 且这个基因在线粒体基因组中以单拷贝形式存在. 结合序列分析, 揭示 73 bp 片段是 T 基因的内含子, 而 T1243 转录本是一个在转录后加工过程中内含子发生了选择性剪接的转录本.

用 probe A 和 probe B 分别与 MF 系 mtDNA 杂交, 未检测到杂交信号(结果未显示).

2.4 T1170 和 T1243 转录本的 RT-PCR 表达分析

P1×P4 扩增产物应是 T1243 转录本的前 907 bp. 图 5(a)结果显示, T1243 转录本在茎瘤芥 CMS 系发育过程中, 其转录水平表达呈明显上升趋势; 以 P1×P2 扩增, 产物应该是 T1170 和 T1243 转录本的混合物. 图 5(b)结果显示, T 基因在茎瘤芥 CMS 系发育过程中 2 个转录本总量在苗期和抽薹期转录水平表达量大致相同, 而在盛花期明显降低, 且在这一时期, 该基因转录表达以 T1243 占明显优势(2 条扩增带中分子量稍大者). RT-PCR 结果综合分析显示, 在茎瘤芥 CMS 系发育过程中, T1243 转录本上调表达, 而 T1170 下调表达.

2.5 2 个转录本的 Northern 表达谱分析验证

在植物线粒体基因 RT-PCR 表达研究中稳定的内参照基因尚没有报道. 为了对上述结论进行验证, 用 probe A 和 probe B 对茎瘤芥 CMS 系不同发育时期线粒体 RNA 进行了 Northern blot 分析(图 6). probe A 检测到的是 2 个转录本的总和, 而 probe B 检测到的是

图 5 茎瘤芥 CMS 系 T1170 和 T1243 转录本表达情况的 RT-PCR 分析
(a) P1×P4 引物的 RT-PCR 结果; (b) P1×P2 引物的 RT-PCR 结果. 1 示苗期; 2 示抽薹期; 3 示盛花期; 4 示 DNA Maker

T1243 转录本. 从杂交结果可见, Northern blot 分析所得表达规律与 RT-PCR 所得表达趋势基本一致.

3 讨论

单个基因的前体 mRNA(pre mRNA)可以通过选择性剪接(alternative splicing)产生多种转录本, 编码多样性的功能蛋白. 估计最少有 35% 的人类基因可通过这种剪接产生多样性的蛋白^[7]. 一个较为极端的例子是果蝇一个与神经发育有关的基因 DSCAM 竟然可能通过选择性剪接产生 38016 种蛋白^[8]. 在植物中, 关于 RNA 选择性剪接的研究远没有动物或人那样深入, 有关这方面的报道相对较少, 且多数情况下并不知晓其在植物中的生物学意义. 比较成功的例子仅有拟南芥光合同化相关的 Rubisco Activase (RCA) 基因^[9]、核糖体蛋白 RPS14(ribosomal protein S14)基因^[10]、番茄抗 TMV 病毒 N 基因^[11]及拟南芥

图6 茎瘤芥 CMS T1170 和 T1243 转录本表达的 Northern 分析

(a) probe A 杂交结果; (b) probe B 杂交结果. 1 示苗期; 2 示抽薹期; 3 示盛花期

控制开花时间的基因FCA^[12]等少数报道. 目前还没有植物线粒体基因选择性剪接现象与植物雄性不育性有关的报道. 仅有在小麦CMS中RNA编辑与细胞质雄性不育有密切关系的报道^[13].

在前期预备实验中, 并不知晓T基因有选择性剪接现象. 采用茎瘤芥不同发育时期(苗期、抽薹期和盛花期)cDNA为模板, 用P1×P2引物进行T基因扩增时, 发现不同时期该基因扩增量(表达量)差异不大, 但是扩增产物特异性不强, 尤其是盛花期更为明显, 在扩增循环减少时, 常可见到分子量十分接近的2条特扩增带. 最初认为可能是扩增的特异性不好, 以后发现这种扩增很稳定, 但是在不同时期有不同表现, 说明可能是同一基因的不同转录本或是基因家族中2个结构大小相似的基因的转录产物(后来, Southern杂交否定了后者). 由于当时没有搞清2种扩增产物出现规律, 而且二者分子量十分接近, 常规切胶回收十分困难, 因而采用各个时期混合cDNA做模板, 扩增产物混合回收. 克隆T载体后, 随机挑选多个克隆测序, 从其中分离筛选到2个不同的转录产物. 序列比

较后, 发现其中一个转录本保留了一个型内含子. Southern杂交证实这是同一基因发生选择性剪接的2个转录本.

抽薹期到盛花期是雄蕊发育阶段, 这一阶段的后期是雄蕊发育成熟时期. 盛花期T1243转录本丰度的明显升高和T1170的下调表达, 暗示了在雄蕊败育过程和T基因2个转录本表达丰度的此消彼长直接相关. 其转录后调控机理有待深入研究.

线粒体基因组是植物细胞遗传物质中重要的组成部分, 和核基因组相比有许多自己的特点. 线粒体mRNA大部分类似原核基因, 不具有poly(A)尾, 但是也有植物线粒体mRNA具有poly(A)尾的报道^[14,15]. 本研究在mtRNA反转录过程中, 采用Oligo(dT)引物和6N随机引物混合使用的方法, 既保证了具有多腺化尾巴的转录本的反转录完整性, 也兼顾到未多腺化转录本, 尽量全面地保留线粒体基因组转录后的RNA信息.

在采用RT-PCR技术进行植物核基因表达分析时, 常常以actin等持家基因作为内参照. 但是在进行线粒体基因表达研究中还没有报道有稳定的内参照, 因而本研究在RT-PCR后, 进行了Northern验证. 尽管没有内参照, 但是RT-PCR相对Northern有许多优点, 除去方便安全之外, 它可以通过调节扩增条件展示象T1170和T1243这种分子量接近的转录本的表达, 如图4(b)中3泳道. 尽管不十分理想, 但是这种情况Northern很难分辨.

截止目前, 在高等植物细胞器、原生动物、真菌及各种细菌中发现有100多个型内含子. 大约有1/4的内含子编码蛋白, 其中大部分编码成熟酶参与内含子的自我剪接^[16]. 通过对可自我剪接的酵母线粒体型内含子数据的分析, 确定了其功能区域的特征, 其二级结构常被分为由一个中心延伸出的6个螺旋区域. 但是这种具自我剪接能力的高等植物型内含子还没有报道, 加上获得稳定的细胞器转化体系相当困难, 高等植物线粒体型内含子剪接方面的报道很少^[17]. 型内含子大小根据ORF的有无变化很大, 大约0.6~2.5 kb. 研究表明, 拟南芥线粒体基因组包含57个基因, 它们含有23个型内含子, 但是仅有nad1基因的外显子d和e之间的内含子具有一个类似编码成熟酶的可读框^[18]. 本研究中所发现线粒体T基因内含子仅有73 bp, 明显小于已报道

的型内含子,二级结构不具有典型的6个螺旋区域,但是具有首尾剪接位点一级结构的典型特征,因而这一问题值得深入研究.

2个转录本在功能上有何差异,这是一个吸引人的问题.我们已经构建了转基因载体进行拟南芥转化,希望在表型水平得到答案.T基因的73 bp内含子究竟是否编码蛋白,编码蛋白有何功能,与基因剪接、植物育性有何关系等等也都是十分有趣的研究内容.

致谢 本研究为国家自然科学基金(青年)基金资助项目(编号:30300239).

参 考 文 献

- 1 Abad A R, Mehrtens B J, Mackenzie S A. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male sterile bean. *Plant cell*, 1995, 7: 271~285[DOI]
- 2 Bonhomme S, Budar F, Lancelin D, et al. Sequences and transcript analysis of the Neo Ogura-specific fragment are correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica hybrids*. *Mol Gen Genet*, 1992, 235: 340~348[DOI]
- 3 陈竹君, 张明方, 汪炳良, 等. 榨菜胞质雄性不育系及其农艺性状的研究. *园艺学报*, 1995, 21(1): 40~46
- 4 陈学军, 陈竹君, 张耀洲. 榨菜线粒体 DNA 雄性不育相关片段的克隆和序列分析. *应用与环境生物技术学报*, 2003, 9(5): 513~516
- 5 陈学军, 陈竹君, 张耀洲, 等. 榨菜线粒体 DNA 的提取. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2000, 26(3): 321~324
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Douglas L B. Protein diversity from alternative splicing: A challenge for bioinformatics and post genome biology. *Cell*, 2000, 103: 367~370[DOI]
- 8 Dietmar S, James C C, Huidy S, et al. *Drosophila dscam* is an

axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 2000, 101: 671~684[DOI]

- 9 Ning Z, Russell P K, Robert G E, et al. Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 3330~3334[DOI]
- 10 Kubo N. A single nuclear transcript encoding mitochondrial RPS14 and SDHB of rice is processed by alternative splicing: common use of the mitochondrial targeting signal for different protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9207~9211[DOI]
- 11 Dinesh K, Barbara J B. Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1908~1913[DOI]
- 12 Richard M, Lan B, Tania P, et al. FCA, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encoding RNA-binding domains. *Cell*, 1997, 89: 737~745[DOI]
- 13 Hernould M, Suharsono S. Male sterility introduction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 2370~2374
- 14 Giege P, Brennicke A. From gene to protein in higher plant mitochondria. *CR Acad Sci*, 2001, 324: 209~217
- 15 Gagliardi D, Leaver C. Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO J*, 1999, 18: 3757~3766[DOI]
- 16 Bonen L, Vogel J. The ins and outs of group I introns. *Trends Genet*, 2001, 17(6): 322~331[DOI]
- 17 Farre J C, Araya A. RNA splicing in higher plant mitochondria: determination of functional elements in group I intron from a chimeric *cox* gene in electroporated wheat mitochondria. *Plant J*, 2002, 29(1): 203~209[DOI]
- 18 Unseld M, Marienfeld J R, Brandt P, et al. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366 924 nucleotides. *Nat Genet*, 1997, 15: 57~61 [DOI]

(2004-10-04 收稿, 2004-11-09 收修改稿)