

两种小麦细胞质雄性不育体系 mtDNA 的 RAPD 分析

牛芝霞 杨天章 柴守诚

(西北农业大学农学系, 陕西杨凌 712100)

摘 要 对 T 型和 V 型小麦细胞质雄性不育系 mtDNA 的 RAPD 扩增产物分析结果表明, 这两种不育系和其保持系间 mtDNA 的 RAPD 扩增产物存在着显著差异, 而两种保持系间的扩增产物则无明显不同, 说明小麦细胞质雄性不育可能与 mtDNA 的变异有关; 同时, 在两种不育体系的 RAPD 扩增产物之间, 既有共性, 又有差异, 暗示这两种不育体系产生不育的机理可能不尽完全相同, 而各具其特异性。

关键词 小麦, 细胞质雄性不育, mtDNA, RAPD

中图分类号 S512.10351

利用杂种优势提高作物产量是近代作物改良重大成就之一, 细胞质雄性不育 (CMS) 是作物杂种优势利用的重要手段, 因此, 对 CMS 机制的研究不仅具有理论意义, 而且也有重要应用价值。自 1951 年木原均发现小麦细胞质雄性不育以来, 人们除了对其在小麦杂种优势利用上进行了广泛的研究以外, 还从遗传学、细胞学、生理学、生物化学以及分子生物学诸方面对其产生的机理进行了许多研究。鉴于 CMS 的母性遗传特性, 不少学者从叶绿体基因组和线粒体基因组翻译产物^[1, 2]、叶绿体类囊膜多肽、叶绿体 DNA (ctDNA) 及线粒体 DNA (mtDNA) 的分子结构^[3-8]、mtDNA 的 RNA 编辑过程^[9, 10]等方面对小麦的一些不育系及其保持系进行了研究, 获得了一些有意义的结果。但到目前为止, 关于小麦雄性不育与 mtDNA 及 ctDNA 的关系, 仍是众说纷纭, 有关小麦 CMS 的机理问题, 尚无定论。本研究旨在通过对 mtDNA 的 RAPD 分析, 比较 V 型和 T 型小麦细胞质雄性不育体系及其保持系 mtDNA 的变异情况, 为研究小麦雄性不育与 mtDNA 之间的关系提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

为了对比, 本试验利用了两种小麦细胞质雄性不育体系, 一种是具有 *T. timopheevi* 细胞质的不育系 T-0004RdA (简称 TA) 及其保持系 0004RdB (简称 TB); 一种是具有 *Ae. variabilis* 细胞质的不育系 V-59A (简称 VA) 及其保持系 59B (简称 VB)。这两种不育系回交均在 10 代以上, 保持系均为普通小麦 (*T. aestivum*) 细胞质。

收稿日期 1997-09-01

课题来源 国家攀登计划项目

作者简介 牛芝霞, 女, 1968 年生, 硕士, 助理研究员; 现在天津市农作物研究所工作, 天津 300112

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的提取和纯化 用暗培养后的小麦黄化苗,经分级分离,得到粗提线粒体;接着通过蔗糖垫来纯化线粒体,继而用 SDS 和蛋白酶 K 破碎线粒体得到粗提 mtDNA;最后依次用 CTAB/NaCl 酚、氯仿除糖去脂抽提分离蛋白,纯化 mtDNA。经无水乙醇沉淀风干后,溶于 $80\mu\text{L TE}$ 中,置 4°C 下备用。

1.2.2 RAPD 分析 所用引物为美国 OPERON 公司产品,其长度均为 10 个核苷酸, RAPD 反应扩增总体积为 $25\mu\text{L}$,其中包括 $1.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$ 4 种核苷酸 (DNTP) 各 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,引物 $0.2\mu\text{m}$, mtDNA 5 ng , Taq 酶 1 unit , 10X buffer $2.5\mu\text{L}$ 扩增反应均在 94°C 下使 DNA 变性 1 min ,

37°C 引物与模板结合 1 min , 72°C 链延长 2 min ,共 40 个循环。扩增反应在 Bio-Rad DNA 扩增仪上进行。扩增产物用 $14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳 45 min 至 1 h ,电压 $80\sim 100\text{ V}$,电泳结束后,用 EB 染色 $10\sim 30\text{ min}$,清水漂洗约 10 min ,紫外照相,记录结果。

从 73 个引物中,经过试验筛选出了在不育系和保持系扩增产物之间有差异的 5 个引物,用这 5 个引物进行扩增试验,重复 3 次,重复之间表现稳定。

2 结果与分析

通过试验,从 73 个引物中筛选出了 5 个对这两种小麦雄性不育系及其保持系的 mtDNA 具有特殊扩增效果的引物。其扩增产物如图 1 所示。

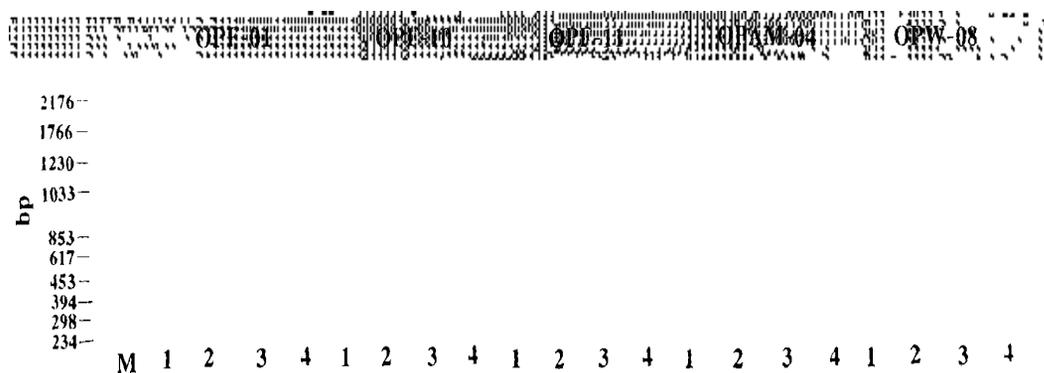


图 1 两种小麦细胞质雄性不育系及其保持系 mtDNA 的 RAPD 标记图谱

M 为 DNA 分子量标准 VI ($p\text{BR}328\text{DN A}\cdot\text{Bgl}^{\text{I}}$ + $p\text{BR}328\text{DN A}\cdot\text{Hinf}^{\text{I}}$)

1. V-59A; 2. 59B; 3. T-0004RdA; 4. 0004RdB

现将其中有区分性的扩增产物片段列于表 2。从图 1 和表 2 的资料可以清楚地看到,这两种不育系及其保持系 mtDNA 的 RAPD 扩增产物间的明显差异,同时,也可看到这两种不育系之间的异同以及这两种保持系之间的异同。

表 2 mtDNA 的 RAPD 扩增产物多态性片段大小

bp

OPF-01				OPF-10				OPF-11				OPAM-04				OPW-08			
VA	VB	TA	TB	VA	VB	TA	TB	VA	VB	TA	TB	VA	VB	TA	TB	VA	VB	TA	TB
				1766				826								1766			
2818				905												1659			1659
	2333	-	-					708		-	-	1148		1148					
	1584	-	-		828	-	-									1380			
	1258	-	-															905	
	1047	-	-																
	487	-	-														394	-	-

注: VA: V59A, VB: 59B; TA: T0004RdA, TB: 0004RdB. “-”: 不育系和保持系同时扩增出的相同片段

2.1 不育系与保持系 mtDNA 间 RAPD 的差异性

从图 1 和表 2 可以看出,除 OPF-01, OPF-10 和 OPF-11 对 TA 和 TB 无扩增效果外,所用的 5 个引物经 RAPD 扩增后,均可将不育系和保持系区分开。VA 与 VB 5 种引物共可扩增出 16 个差异片段,而 TA 和 TB 只有两个引物可以扩增出 3 个差异片段。从这些结果中可以看出:

① 扩增产物在 VA 与 VB 之间存在差异,而在 TA 与 TB 之间不存在差异。如引物 OPF-01, OPF-10 和 OPF-11 对 VA 与 VB 可以扩增出大量差异片段,但对 TA 与 TB 就没有扩增效果。

② 扩增产物既在 VA 与 VB 之间存在差异,也在 TA 与 TB 之间存在差异,而且这些差异在两种不育系间具有特异性。例如,当以 OPW-08 为引物时 VA 和 VB 间的扩增产物存在 4 个差异片段,其大小分别为 1766, 1659, 1380 和 394 bp。而 TA 与 TB 间的扩增产物存在 2 个差异片段,其大小分别为 1659 和 905 bp。

③ 扩增产物在两种不育系与其保持系间均存在差异,而且差异片段相同。例如,当以 OPAM-04 为引物时,这两种不育系与其保持系间的扩增产物均存在一个大小为 1148 bp 的差异片段。此外,OPW-08 也有类似的扩增效果,即存在共同的 1659 bp 差异片段。

2.2 两种保持系 mtDNA 间 RAPD 的差异性

从图 1 看,所用两种保持系的基因型虽然不同,但其 mtDNA 的 5 种随机引物(除 OPF-11 有一个差异片段外)的 RAPD 扩增产物完全相同。因为这两种保持系的细胞质均来自普通小麦,从而说明普通小麦的 mtDNA 是相当稳定的。

2.3 两种不育系 mtDNA 间 RAPD 的差异性

从表 2 看,当以 OPW-08 为引物时,VA 与 VB 相比,VA mtDNA 的 RAPD 扩增产物中存在有 1766 和 1380 bp 这两个大小不同于 VB 的片段,缺少 1659 bp 大小的片段。TA 与 TB 相比,在 TA 的扩增产物中出现了一条 905 bp 大小的片段,也缺少 1659 bp 大小的片段。可以看出,在与各自的保持系相比中,这两种不育系 mtDNA 的 RAPD 扩增产物的共同点是均缺少一条 1659 bp 大小的片段,所不同的则只是它们所扩增出的片段数目和大小互不相同。另外,当以 OPAM-04 为引物时,这两种不育系 mtDNA 的 RAPD 扩增产物完全相同,与各自的保持系相比,其扩增产物均缺少一条 1148 bp 大小的片段。

3 讨论

最近的研究认为小麦细胞质雄性不育可能与其线粒体基因 orf256 和 atp6 以及 orf25

的基因重排有关^[13,14]。作者通过对小麦 V 型和 T 型不育系及其保持系 mtDNA 的 RFLP 比较分析发现,这两种雄性不育可能与 atpA 基因的重排或变异有关,而且在 Cob 和 atpA 位点上,V 型不育系还有其特异性^[8]。为了进一步证明小麦细胞质雄性不育与其 mtDNA 的关系,作者利用同一材料进行了 RAPD 分析,得到了上述结果,从这些结果中可以看出:

1)这两种不育系与其保持系之间的 mtDNA 存在显著差异。5 种随机引物均可在这两种不育系及其保持系的 mtDNA 间扩增出有差异的片段,且 V-59A 和 59B 间 mtDNA 的扩增产物差异要比 T-0004RdA 与 0004RdB 间的扩增产物差异为多,说明 T 型细胞质与普通小麦细胞质的亲缘较近,差异较小,而 V 型细胞质的亲缘较远,差异较大。参考 Tsunewaki 关于小麦细胞质起源进化的研究^[6,7],这两种不育系与其保持系 mtDNA 的 RAPD 扩增产物差异,主要是由于细胞质来源不同所致,其中有些差异可能与细胞质雄性不育有关。

2)虽然这两种不育系与其各自保持系间 mtDNA 的 RAPD 扩增产物显著不同,但核基因型不同而细胞质来源相同的两种保持系 mtDNA 的 RAPD 扩增产物之间几乎没有差异,进一步说明这两种小麦不育系的 mtDNA 确实发生了重大变异,细胞质雄性不育可能与 mtDNA 的变异有关。

3)值得注意的是,虽然这两种不育系的细胞质背景完全不同,但与其保持系相比,其 mtDNA 的 RAPD 扩增产物中均缺少了两个共同性的扩增片段 (OPAM-04 的 1 148 bp 片段和 OPW-08 的 1 659 片段)这很可能与细胞质雄性不育有关。但各自的 RAPD 扩增产物差异片段之间又有许多差异,说明这两种不育系产生不育的分子基础可能具有一定共性,但也不尽完全相同。这一结果,与以前所做的 RFLP 分析结果趋势完全一致。

参 考 文 献

- 1 司智海,刘植义.普通小麦 T 型细胞质雄性不育系及保持系线粒体多肽的比较研究.河北师范大学学报,1989(3): 26- 39
- 2 刘祚昌,李继耕.二磷酸核酮糖羧化酶与细胞质雄性不育的研究.遗传学报,1983,10(1): 36- 42
- 3 刘一农,李继耕.叶绿体 DNA (ctDNA)与细胞质雄性不育性.遗传学报,1983,10(2): 114- 122
- 4 Oaetier F, V edel F. Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. Nature, 1977, 168 365- 388
- 5 Rathburn HB, Hedgcoth C. A chimeric open reading frame in the 5 flanking region of cox1 mitochondrial DNA from cytoplasmic male sterile wheat. Plant Mol Bio, 1991, 16 909- 912
- 6 Tsunewaki K. Cytoplasmic variation in *Triticum* and *Agilops*. Proc. 7th Int. Wheat Genet Symp, London, 1988, 53- 62
- 7 Tsunewaki K. Genome-plasmon interactions in wheat. Jap J Genet, 1993, 68 1- 34
- 8 牛芝霞,杨天章,谢纬武等.两种小麦细胞质雄性不育体系 mtDNA 的 RFLP 分析.植物雄性不育及杂种优势研究进展(1).北京:农业出版社,1996. 101- 106
- 9 Hernould M, Suhusono S. Male sterility induction in transgenetic tobacco plants with an unedited atp9 mitochondrial gene from wheat. Proc. Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 2370- 2374
- 10 Walbot V. RNA editing fixed problems in plant mitochondrial transcripts. TIG, 1991, 7(2): 37- 39
- 11 Tsunewaki K. Genetic diversity of the cytopesm in *Triticum* and *Agilops*. Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp, Tokyo-

1983, 1139- 1144

- 12 Wang B, Yuan K. China science and technology press. Rice biotechnology, 1993, 124- 126
- 13 Song J, Hedgcoth C. Plant Mol Biol, 1994, 26 535- 539
- 14 Mohr S. Mitochondrial DNA of cytoplasmic male-sterile *Triticum timopheevi* rearrangement of upstream sequences of the atp 6 and orf 25 genes. Theor. Appl. Genet. , 1993, 86 259- 268

RAPD Analysis of mtDNA from Two Types of Cytoplasmic Male Sterility in Wheat

Niu Zhixia Yang Tianzhang Chai Shoucheng

(Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The differences of mtDNAs between V-type and T-type CMS systems in wheat were studied with RAPD technique. The results indicated that there were significant differences between the two male sterile lines and their maintainers in amplified DNA fragments of mtDNA, and there were no differences between the two maintainers in those of mtDNAs. It can be concluded that the cytoplasmic male sterility might have something to do with variation of mtDNA. In addition, both similarities as well as differences were expressed on the polymorphism products between the two CMS systems. It implied that the mechanisms of the CMS in wheat might be incompletely identical. The results confirmed the conclusion from the RFLP analysis before.

Key words wheat (*Triticum aestivum*), cytoplasmic male sterility (CMS), mitochondrial, DNA (mtDNA)

“复合楝素杀虫剂及其制法”获中国发明专利

以西北农业大学张兴教授为发明人的科研成果“复合楝素杀虫剂及其制法”,近日已获得中国发明专利。其专利号为: ZL 93118181.X,授权时间 1998-04-23。

复合楝素杀虫剂对害虫具有毒杀、拒食和抑制生长发育的作用,杀虫效果好,对环境、人、畜、害虫天敌及其它有益生物安全,同时害虫不易对其产生抗药性。该杀虫剂制法简单、成本低廉,适宜于推广应用。

(罗永娟)