

• 研究报告 •

小麦 T 型细胞质雄性不育系与相应保持系 线粒体 DNA 的 RAPD 分析^①

黄占景 沈银柱 刘植义 何聪芬 柏峰 马闻师

(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

姚鸿 王京兆 王斌

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 利用 RAPD 技术对小麦 T 型细胞质雄性不育系 75-3369A 和相应保持系 75-3369B 的线粒体 DNA(mtDNA)进行了 81 个单引物和 14 组双引物的多态性研究。结果有 73 个单引物和全部的双引物有扩增结果,表现出多态性的有 10 个单引物和一组双引物。

关键词 T 型不育系, 保持系, RAPD, 多态性

RAPD Analysis of Mitochondria DNAs of T-type CMS Line and Its Maintainer in Wheat

Huang Zhanjing Shen Yinzhu Liu Zhiyi He Congfen Bai Feng Ma Wenshi

(Department of Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)

Yao Hong Wang Jingzhao Wang Bin

(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract Using 81 single-primers and 14 double-primers, T-type CMS (cytoplasmic male sterile) line 75-3369 A and its maintainer 75-3369B were studied by means of RAPD. 73 single-primers and all double-primers gave amplified products in the experiment, among them 10 single-primers and one double-primer presented polymorphism.

Key words T-type CMS line, Maintainer line, RAPD, Polymorphism

小麦 T 型细胞质雄性不育系被发现以来,人们对其不育机理进行了大量的研究,如对小孢子发育过程中各阶段细胞形态学的研究;同工酶、可溶性蛋白的研究;细胞化学的研究^[1-3],这些研究都发现不育系和保持系之间存在着差异;司智海等通过对线粒体多肽研究证明,小麦的雄性不育与线粒体有关^[4];Quetier, Umbeck 等通过对小麦不育系和保持系 mtDNA 酶切分析,证明小麦雄性不育与 mtDNA 有关^[7,8]。RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)是 1990 年由 Williams 和 Welsh 同时建立的一种新的分子生物学技术,它和 RFLP 一样能检测 DNA 的多态性,但远比 RFLP 简单、快速,而被人们重视。目前已广泛应用于生物学的研究及生物分类等很多领域^[5,6]。本研究利用 RAPD 技术对小麦 T 型细胞质雄性不育系和保持系 mtDNA 进行分析,其目的是

^①河北省基金委资助项目。本工作在中国科学院遗传研究所进行。

探讨 T 型细胞质雄性不育系和保持系 mtDNA 的扩增差异, 为解开 T 型细胞质雄性不育机理之谜积累资料, 并为开展雄性不育基因工程、分离育性基因打下基础。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

不育系 75-3369A 是河北师范大学生物系遗传教研室自 1975 年开始转育的一种稳定的 T 型细胞质雄性不育系, 75-3369B 为相应的保持系。种子浸种后在 26℃ 的条件下催芽并暗培养一周, 取黄化苗用以提取 mtDNA。

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的提取 取 100g 黄化苗, 剪碎加 2~3 倍鲜重体积的提取液 A(0.3mol/L 蔗糖, 50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 5mmol/L EDTA, 0.2% 巯基乙醇), 用组织匀浆器破碎, 4 层纱布过滤, 弃渣后 3 000g 离心 10 分钟, 上清再以 12 000g 离心 20 分钟, 弃上清, 加入 30ml G 液(0.3mol/L 蔗糖, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.2% 巯基乙醇), 1/100 体积的 1mol/L MgCl₂, 100μl 3mg/ml 的 DNaseI, 4℃ 保温 1~2 小时后, 加 40ml S 液(0.6mol/L 蔗糖, 10mmol/L Tris-HCl, pH7.2, 20mmol/L EDTA, 0.2% 巯基乙醇), 离心(12 000g)20 分钟。向沉淀加 L 液(50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 20mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 1.2% SDS)10ml, 加蛋白酶 K(20mg/ml)100μl, 37℃ 保温 2 小时, 转移至冰浴 10 分钟, 加冷饱和酚, 轻轻摇动 30 分钟, 离心分层取上清, 以等体积的 Tris/EDTA 溶液抽提下层酚一次, 合并上清, 酚氯仿抽提两次, 氯仿抽提一次, 加 1/10 体积 3mol/L NaAl, pH5.2, 2.5 倍乙醇, -20℃ 保存 2 小时以上。离心收集 mtDNA, 溶于 TE 后加 RNaseA, 37℃ 保温 30 分钟, 酚-氯仿、氯仿各抽提 1 次, 乙醇沉淀, 溶于适量体积的 TE 中备用。

1.2.2 RAPD 反应总体积 25μl, 其中包括: 超纯水 16μl, MgCl₂(25mmol/L)8μl, 10×PCR 缓冲液 2.5μl, dNTP(2.5mmol/L)1.5μl, Taq 酶(1U/μl)1μl, 引物(16~20ng/μl)1μl, 模板(15ng/μl mtDNA)1μl, 石蜡油 40μl。

把以上各成份加入 0.5ml Eppendorf 管中在 PE 公司热循环仪(DNA Thermalcycler 480 PERKIN ELMER CETUS)上扩增 40 个循环, 其中每个循环包括: 94℃ 变性 1 分钟, 37℃ 退火 1 分钟, 72℃ 延伸 2 分钟。40 个循环后在 72℃ 保温 5 分钟。反应结束后用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

2 结 果 与 讨 论

2.1 所用引物及扩增结果

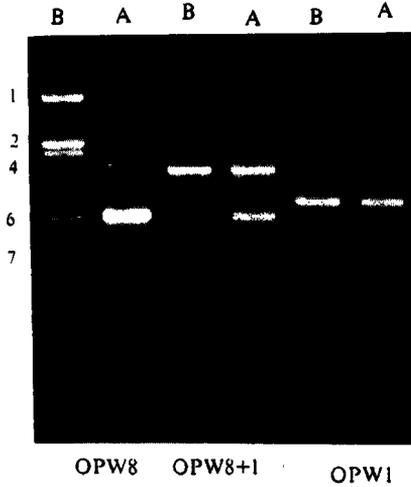
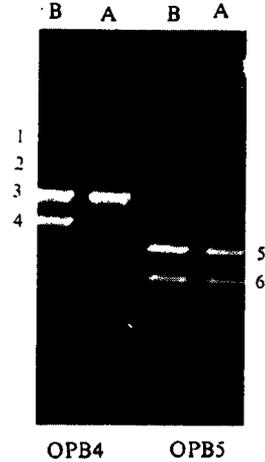
本研究共用单引物(10 个核苷酸组成的寡聚核苷酸, Operon 公司)81 个, 其中包括: OPB1-20、OPF1-20、OPY10-11、OPW1-20、OPZ1-10、12-20。除此之外还用了 14 组双引物, 包括 OPF-02+OPF-03、OPF-04+OPF-05、OPF-06+OPF-07、OPW-01+OPW-08、OPY-02+OPY-03、OPY-04+OPY-05、OPY-06+OPY-07、OPY-08+OPY-09、OPY-10+OPY-11、OPY-12+OPY-13、OPY-14+OPY-15、OPY-16+OPY-17、OPY-18+OPY-19 和 OPY-20+OPF-01。

在上述引物中有 8 个单引物未扩增出产物, 出现扩增差异的有: 单引物 OPB-01、OPB-04、OPB-06、OPB-14、OPB-17、OPB-19、OPF-03、OPF-05、OPW-08、OPY-11, 双引物 OPW-08+OPW-01, 各引物的序列如表 1。其它引物(包括单引物和双引物)都有扩增产物, 但无多态性(差异)。

现选 2 个单引物和 1 组双引物的扩增结果为例加以分析。图 1 为引物 OPW-08、OPW-08+OPW-01 和 OPW-01 的扩增结果, 图 2 为引物 OPB-04 和 OPB-05 的扩增结果。图中各带按由负极到正极的方向依次编号。从图 1、2 可以看出, 引物 OPW-01 和 OPB-05 在 A 和 B 之间虽有扩增产物但无差异, 而 OPW-08、OPW-08+OPW-01 和 OPB-04 表现出明显的扩增差异。

表 1 表现多态性引物的序列

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPB-17	AGGGAACGAG	OPW-01	CTCAGTGTCC
OPB-04	GGACTGGAGT	OPB-19	ACCCCGAAG	OPW-08	GACTGCCTCT
OPB-06	TGCTCTGCC	OPF-03	CCTGATCACC	OPY-11	AGACGATGGG
OPB-14	TCCGCTCTGG	OPF-05	CCGAATTCCC		

图 1 用引物 OPW-08、OPW8+1、OPW-01 进行的扩增
A. 75-3369A; B. 75-3369B.图 2 用引物 OPB-04、OPB-05 进行的扩增
A. 75-3369A; B. 75-3369B.

2.2 质的差异和量的差异

图 1 的 OPW-08 和 OPW-08+OPW-01, 图 2 的 OPB-04 在 A 和 B 之间都有明显的扩增差异, 但这些差异之间也存在一些差异, 大致可分为两类, 一类称为质的差异, 一类称为量的差异。所谓质的差异是指有或无的差异, 这种差异又有两种情况, 一是保持系有某种扩增片段, 而不育系没有相应的扩增片段, 如图 2 的第 4 号带, 另一种情况是不育系有某种扩增片段, 而保持系则没有相应的扩增片段, 如图 1 中 OPW8+1 的第 7 号带。量的差异是指保持系和不育系在相应的位置都有扩增产物, 但量有很大的差异。量的差异同样也有以上两种情况, 如图 1 中 OPW8 的第 1 号带保持系的扩增量高于不育系, 而第 6 号带不育系的扩增量高于保持系。无论质的差异还是量的差异都反映了不育系和保持系在 mtDNA 水平上的差异。

2.3 75-3369A 和 75-3369B mtDNA 的同源性

75-3369A 和 75-3369B 的细胞核相同, 都来自于普通小麦, 但细胞质不同。75-3369A 的细胞质来自于提莫菲维, 75-3369B 的细胞质来自于普通小麦。提莫菲维和普通小麦属于同一属中不同的种。从扩增结果来看, 在 81 个单引物中有 63 个引物, 14 组双引物中有 13 组在二者(75-3369A 和 75-3369B)之间具有完全相同的扩增产物, 这说明二者的 mtDNA 有很高的保守性。也说明这些引物的结合部位与小麦的生长发育可能有着密切的关系。

2.4 75-3369A 和 75-3369B mtDNA 的多态性与育性的关系

在 81 个单引物中有 10 个引物的扩增产物在 A 和 B 之间存在着差异, 其中包括质的差异和量的差异。质的差异很可能是由于 DNA 的缺失而失去了引物的结合部位而造成的, 这种缺失可能和小麦的生长发育所必须的区段无关或是发生在“无功能区”。保持系有而不育系没有的质的差异很可能与小麦的育性有关(雄性)。量的差异可能是由于碱基的改变使引物的结合能力发生变化而造成的。这种碱基改变可能有 3 种情况, 一是发生在“功能区”的错义突变或无义突变; 二是发生在“功能区”的同义突变; 三是发生在“无功能区”。第一种情况可能与小麦的育性

(雄性)有关,第二、三种情况可能与育性无关。当然究竟哪种质的差异或量的差异与育性有关还要借助其它手段进行研究。

2.5 单引物和双引物的关系

本研究除使用了单引物外还用了 14 组双引物,在双引物扩增时只有 OPW-08+OPW-01 有扩增差异,其它均无差异。由此可见,在双引物中一方或双方在单引物时如有扩增差异,那么该组双引物也有扩增差异,如双引物的双方在单引物时都无扩增差异,那么这两个单引物组成的双引物也无扩增差异。

参 考 文 献

- 1 沈银柱等. 小麦不同细胞质雄性不育系及保持系萌动胚及幼芽可溶性蛋白等电聚焦分析. 植物学报, 1994, 36(4): 283~288
- 2 张召铎等. 普通小麦雄性不育系及保持系花粉形态的扫描电镜观察. 华北农学报, 1992, 7: 22~37
- 3 刘植义等. T型杂交小麦过氧化物酶同工酶的初步研究. 河北师范大学学报, 1983, (2): 30~37
- 4 司智海等. 普通小麦T型细胞质雄性不育系及其保持系线粒体多肽的电泳比较研究. 遗传学报, 1991, 18(1): 44~50
- 5 Klein-Lankhost R. M., *et al.* Isolation of molecular markers for tomato using random amplified polymorphic DNA(RAPD). Theor. Appl. Genet., 1991, 83: 108~114
- 6 Martin G. B., *et al.* Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proc Nacl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 2336~2340
- 7 Umbeck P. F., Gengenbach B. G. Reversion of male-sterile T-cytoplasm maize to male fertility in tissue culture. Crop Science, 1983, 23: 584~588
- 8 Quetier F., *et al.* Heterogenous population of mtDNA molecules in higher plan. Nature, 1977, 268: 365~368

1996-07-01 收稿, 1996-12-10 修回.

· 读 者 来 信 ·

关于日本水稻品种的英汉名称

编辑先生:

最近在本所召开了东亚地区水稻生物技术年会,有些日本品种的英汉名称用这些品种汉名的汉语拼音来表示,这是不对的。如一个日本品种的汉名为秋光,它的英译名为“秋光”的日语发音,即为‘Akihikari’,而不是汉语拼音‘Qiuguang’。顺便举两个例子,“日本晴”为‘Nipponbare’或‘Nihonbare’,“金南风”为‘Kinmaze’。关于日本水稻品种的日英汉名称检索,在《国外农学——水稻》1986年第1~3期,1987年第2和3期上有连载,读者可以参考。

国际交流不断增加,1998年要在我国召开第18届国际遗传学大会,学术用语还是要规范。

对于韩国品种的汉英名称,同样应注意。

祝

编安

中国水稻研究所 郑康乐

1996. 11. 20.