

# 三例同核异质雄性不育小麦 mtDNA 差异片段的比较分析

兰红玉, 张改生, 刘红占, 高春宝, 张龙雨, 胡俊敏, 张明珠

(西北农林科技大学 陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室/小麦育种教育部工程研究中心, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 为了从分子水平鉴别三例同核异质小麦雄性不育材料, 利用 RAPD 技术, 对细胞核来自同一普通小麦 (*Triticum aestivum*), 细胞质分别来自粘果山羊草 (*Aegilops kotschy*)、二角山羊草 (*Ae. bicornis*) 和斯卑尔脱小麦变种 (*T. spelta*) 的三例同核异质小麦雄性不育系的线粒体 DNA (mtDNA) 进行差异片段的比较分析。结果表明: (1) 三种不育系在 mtDNA 上呈现明显差异; (2) 对三种不育系的 mtDNA 差异片段进行回收、克隆、测序和比对, 结果片段 OPY01-1517 和 OPP02-750 均与普通小麦 mtDNA 具有较高的同源性, 同源性分别为 99% 和 98%。这为进一步从分子水平鉴别含有斯卑尔脱小麦和二角山羊草细胞质的小麦材料奠定了基础, 也为区别不同细胞质雄性不育系提供了一定依据。

**关键词:** 小麦; mtDNA; RAPD; 克隆; 测序

**中图分类号:**

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-1041(2010)06-0997-04

## Comparative Analysis of Differential Fragments of mtDNA between Three Isonuclear Alloplasmic CMS of Wheat

LAN Hong-yu, ZHANG Gai-sheng, LIU Hong-zhan, GAO Chun-bao,  
ZHANG Long-yu, HU Jun-min, ZHANG Ming-zhu

(Key Laboratory of Crop Heterosis of Shaanxi Province, Northwest A&F University/Wheat Breeding Engineering  
Research Center, Ministry of Education, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Comparative analysis of the mitochondrial DNA (mtDNA) from three isonuclear alloplasmic CMS lines of wheat was conducted by RAPD technique. The results showed: 1. Three kinds of wheat CMS lines presented obvious difference in mtDNA. 2. Three special fragments obtained from three male sterile lines were successfully cloned and sequenced, the results showed that the sequences of OPY01-1517 and OPP02-750 had higher homology with the mitochondrial DNA of wheat (*triticum aestivum*), the homology were 99% and 98% respectively, which provided theoretical and technical support for further identifying the wheat male sterile lines with cytoplasm of *T. spelta* and *Ae. bicornis* at the molecular level.

**Key words:** Wheat (*triticum aestivum*); mtDNA; RAPD; Clone; Sequencing

近年来, 在小麦细胞质雄性不育的机理研究中, 人们倾向于认为线粒体基因组对小麦雄性不育的影响较大。刘忠松<sup>[1]</sup>对线粒体和叶绿体离体

翻译产物研究的结果表明, 小麦细胞质雄性不育与线粒体有直接关系, 而与叶绿体的关系不大。李文强等<sup>[2]</sup>利用分子标记技术对小麦质核互作型

\* 收稿日期: 2010-05-30 修回日期: 2010-08-15

**基金项目:** 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 重大专项 (No. 2009AA101102); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20090204110024); 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项 (No. 2007ZDKG-020); 国家杨凌农业生物技术育种中心专项基金项目 (No. 99-1A); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目。

**作者简介:** 兰红玉 (1981-), 男, 硕士, 研究方向为小麦杂种优势利用。E-mail: 627986583@qq.com

**通讯作者:** 张改生 (1951-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦雄性不育及杂种优势利用研究。E-mail: zhanggsh@public.xa.sn.cn

雄性不育系线粒体 DNA 变异性进行了 RAPD 分析,找到了与雄性不育有关的特异片段;姚鸿等<sup>[3]</sup>报道 D<sup>2</sup> 不育系线粒体 DNA 与 K 型、Ven 型、T 型之间存在明显差异。在水稻上也有这类报道。舒友菊等<sup>[4]</sup>利用 264 对 AFLP 引物研究了 K 型水稻和冈型水稻不育系线粒体 DNA 的分子差异,筛选出 9 条可能与 K 型水稻雄性不育相关的差异条带及 3 条可能与冈型水稻雄性不育相关的差异条带,由此证明了冈型和 K 型水稻不育系 mtDNA 具有各自的特异条带。但是这些研究都只是找到不同不育细胞质线粒体的相关特异片段,均停留在分子标记阶段,尚未进一步深入进行研究。

本研究以三例同核异质雄性不育小麦系为试材,首先提取三者的 mtDNA 进行 RAPD 分析,然后对筛选出的特异片段进行测序分析,旨在为从分子水平区分不同细胞质来源的雄性不育系提供理论和技术支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

供试亲本为三例经过多年采用同一亲本 90-110 回交转育而成的小麦雄性不育系,其回交世代均在 20 代以上,所以其细胞核基因型相当一致。它们分别是:ms(*Ae. kotschy*)-90-110、ms(*Ae. bicornis*)-90-110 和 ms(*T. spelta*)-90-110。

以上材料均由西北农林科技大学陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室提供。

### 1.2 细胞核 DNA 与线粒体 DNA 的提取

以黄化苗为材料,研磨匀浆,经差速离心和蔗糖密度梯度离心,分离纯化无叶绿体的线粒体。线粒体及线粒体 DNA 提取的具体操作参照已有方法<sup>[5-7]</sup>。细胞核 DNA 提取采用 CTAB 法。

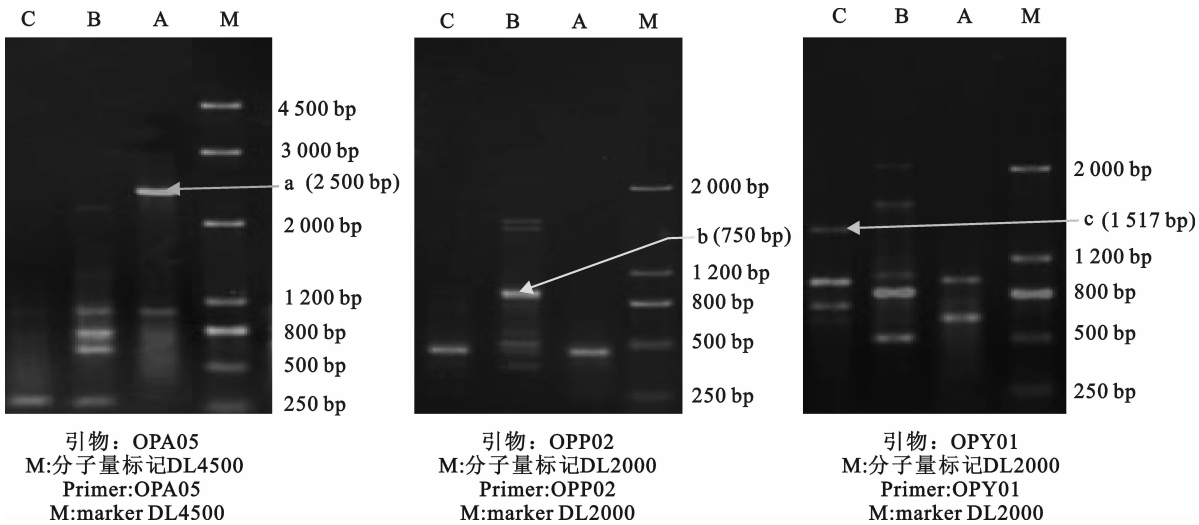
### 1.3 RAPD 扩增

50 条由 10 个碱基组成的随机引物购于上海生工生物技术有限公司,其中引物 OPY01 序列为:5'-GGTGGCATCT-3',OPP02 序列为:5'-TCGGCACGCA-3',OPA05 序列为:5'-AGGGGTCTTG-3'。采用 TIANGEN 公司的 2×Taq PCR MaseerMix 进行 PCR 扩增,PCR 反应在 MyCycler Thermal Cycler(Bio-Rad)扩增仪上进行。

反应程序如下:95℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,37℃复性 1 min,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。

### 1.4 差异片段的克隆测序

紫外灯下切取 3 个材料中的 OPY01-1517、OPA05-2500 和 OPP02-750 差异片段,用 TIAN-gel Midi Purification Kit 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 DNA 片段。将所获得的差异片段 OPY01-1517、OPA05-2500 和 OPP02-750 与 pMD19-TVector 连接,具体克隆方法参照已有



A:ms(*Ae. kotschy*)-90-110, B:ms(*Ae. spelta*)-90-110, C:ms(*Ae. bicornis*)-90-110

图 1 三个不育系材料 mtDNA 的 PAPD 扩增图谱

Fig. 1 mtDNA cloned in 3 CMS with 3 primer

产品说明进行。采用 NCBI 网站中的 Blastn 程序对序列进行同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 三种材料细胞核 DNA RAPD 扩增结果

50 条随机引物未从核基因组中扩增出差异常条带,表明核基因组在 50 条随机引物扩增的条件下没有任何差异,其核基因型基本一致。

### 2.2 线粒体基因组的 RAPD 分析

50 条随机引物对三种不育类型的线粒体基

因组进行扩增,其中 3 条随机引物扩增结果表现差异,引物 OPA05 对材料 ms(*Ae. kotschy*)-90-110 扩增出一条 2 500 bp 的特异性条带(图 1 左图中的 a);引物 OPP02 对材料 ms(*Ae. spelta*)-90-110 扩增出 750 bp 的特异带(图 1 中间图的 b);引物 OPY01 对材料 ms(*Ae. bicornis*)-90-110 扩增出 1 517 bp 的特异带(图 1 右间图的 c)。结果表明,三个小麦雄性不育系 mtDNA 上存在很大差异。

```

1   TACGAATCAC GAGGAGCCCC ACAGAGGATC TCAGGGAACC GGTATCCTAA GCCTGGGGTT
61  TGCATGAACT TGAGGGCTGA GATTGGATCT CGTTCAGGGG CGGACCCTAT AGGAAAACGC
121 CAGCCAGCGC CCTTTTACGT TTCTGCCTTG CTGGCTTTGG TCACCATTTC TTTCTGCGT
181 TATCCCTGAT TCTTGGGATA ACCGTATTAC CGCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
241 AGCCGACGAC CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA GCGAGAAGC AAGAGCCGCC AATACGCCAA
301 CGCCCTCTCC CGCGCGGTTG GCCGATTTCAT TAATGCAGCT GAGCAGCAG GTTTCCCGAC
361 TGGAAAGCGG GCAGTGAGCG CAACGCAATT AATGTGAGTT AGCTCACTCA TTAGGCACCC
421 CAGGCTTTAC ACTTTATGCT TCCGGCTCGT ATGTTGTGTG GAATTGTGAG CGGATAACAA
481 TTTACACAG GAAACAGCTA TTGACCATGA TTACGCCAAG CTTGCATGCC TGCAGGTCGA
541 CGATTGGTGG CATCTGGCTC TATGCGATGA AAGCAATGGG AAATGAGATT CTGGGTTTGA
601 TTA CTGGTAC AAACAAGTTC AAAGCTAGCG AGAGCATAAA GAACGGTAGA TTCCATTCAA
661 CTGGTAGGTC AAGCCCTTAC CCATAACACT TATTCAAAAT GGGCTATCCG AAAGAGGAGA
721 TCAATAATTC CACTATCAAT ATGGGTAGGC TGCTATATCT AGAAAGAGAA GATGAAAGGT
781 TTTGGATTAT TAGCAAAGGT ACTTATCTTA TTA CTCACTAGT AGGCACCTAC AAACCTATTT
841 ATTTACAAGT TCCACATGGG TCTGGTCAGG AAGACTCGGA ATCATTCTCA CGGCCACCCC
901 ACACGGGAGC GGCTTCTCCG CCAATCGATC ATCACTTGCA TACAAAAAAA AGCCCTTTT
961 CCAATGGAAA CCTGGGGAAA TACAGTTGCT CAATTCATTC GATTTGAAA TAGCGTATAA
1021 AGTGATTCTT GCAATTTTAC TGCAGGCAGC GTAGCAATTC TCGCGGGAAAT CTCGGTCTGT
1081 TTTGGGCCGA TTCCTTAACG AGAGCCTAGT CGAAAGCGCC CATAAAAAAGA GTAATTCGTT
1141 TTCGGTATGG GTACGCTGGC CCCTACGAGG GCGCGTAAGC AAGGTAGAGA CCAGGGAGCA
1201 GGACCGCGAA GGGTCTTCCC ATCTCTTCTT GTTATTGTCT TGTCTGAGA TGCCACCAAT
1261 CTCTAGAGGA TCCCGGGTA CCGAGCTCGA ATCACTGGC GCGTCTGTTT ACAACGTCGT
1321 GACTGGGAAA ACCTGGCGT TACCAACTT AATCGCCTT GACACATCC CCCTTTCGCC
1381 AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT CCAACAGTTT CCGCAGCCTG
1441 AATGGCGAAT GGCCTGAT GCGGTATTTT TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACCC
1501 GCATATGGTG CACTCTC

```

图 2 差异片段 c 的碱基组成

Fig. 2 Base composition of differential fragment c

```

1   TAGGCGGTAC GCGCAGTGAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCCTCTAGAG ATTGGTGGCA
61  TCTGGATACC TCATAAATAA ATCAAGCAGG CCGGCTAGTA AGCGATCCCG AGGGGCTATC
121 TTCTCTCCCA TGCTGGTGCC TTGCTTAACT CAAGTATAAA GTGGAATTC AAGCCAAAAT
181 CCGGGGTGAT AAAATTCCAT TTGAATCTTG AGATCCAAGA AGAAGGATAG CTTCATGAGT
241 TCGTTCTGAC TCCTAGCTTA GCTGGAAAGC TTTTGCTTGT ATCTGGCAGT GGGTATAACA
301 TCCATCATA TCAAACAGAA GAAGGTTTGC TTATCTAGCT CCAAGGCAGT TATAATCATT
361 TACAGAACCA GGGTTTGAC CTA CTAGGGA GGAGAAAGGG CCGACGACCC AACTAGAAC
421 TCCAAGATAA GATCTTTCAG TCGATCAGAC GGCCGAGGCC TTTAATAAGG TCCGGTTGTG
481 CCAACGAGTT CTTCTAGTTA TGAATCCCG TAGGGAGGTA GCATTACATT TGTATTAGCA
541 AAATAGAGCT CCTCATAGAA AAGAATGGCG AATAAAGTGT TAGAGTACTT TCTTCTGTT
601 CAGTCTGGA ACTTATTCTT TTCCGATCGA CCTATCAACA GTAGCGATCA TACTACGTCG
661 ACGAGTTTGG ATCTGCTTAG TACAATCTGC TCTGATGCCG CATAGTTAGC CAGCCCCGAC
721 ACCCGCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGA

```

图 3 差异片段 b 的碱基组成

Fig. 3 Base composition of differential in fragment b

### 2.3 差异片段序列分析

差异片段 c 和 b 克隆后的测序结果见图 2 和

图 3。利用 BLAST 序列分析程序,对差异片段 c 和 b 的序列进行同源性比对。结果表明,差异片

段 c 和 b 与小麦线粒体基因组上的序列具有同源性,同源性分别为 99% 和 98%,小麦线粒体基因组登录号:EU534409.1。c 含有一段 *atp1* 基因序列,序列位于 3' 端,长度为 106 bp,剩余序列为非编码区序列。b 是小麦线粒体基因组 *nad1*<sup>[8]</sup> 和 *nad5*<sup>[9]</sup> 非编码区序列。

### 3 讨论

对三个小麦不育系 mtDNA 的 RAPD 扩增,所获得的差异带型较好,且十分稳定,说明这三种不育系在 mtDNA 上存在很大差异。对三个雄性不育小麦 mtDNA 差异片段进行序列分析,除所获得的 a 序列与小麦线粒体基因组不具有同源性,c 和 b 与小麦线粒体基因组具有较高的同源性,同源性分别为 99% 和 98%。其中 c 除了含有一段 *atp1* 基因序列(序列位于 3' 端,长度为 106 bp)以外,其他序列为非编码区序列。目前对于 *atp1* 的研究比较少,其具体功能尚在研究之中。b 位于小麦线粒体基因组 *nad1* 和 *nad5* 非编码区。最新的研究表明,植物线粒体基因组中 *nad1* 和 *nad5* 是相对比较稳定的<sup>[10-11]</sup>。大多数研究认为这些 *nad1* 基因上的非编码区在系统进化中起着非常重要的作用,主要用于鉴定植物的种类。如郭亚龙等<sup>[12]</sup> 研究线粒体 *nad1* 基因内含子在稻族系统学中的应用价值;谭功燮等<sup>[13]</sup> 根据线粒体 *nad1* 基因第 2 内含子的序列多态性对糯玉米进行系统分类。因此,本试验所获得两个特异性片段为鉴别含有斯卑尔脱小麦和二角山羊草细胞质的小麦雄性不育材料奠定了基础,也为区别不同细胞质雄性不育系提供了一定的依据。

#### 参考文献:

[1] 杨金水, Virginia Walbot. 水稻野败不育系与保持系线粒体 DNA 限制酶切图谱分析[J]. 作物学报, 1995, 21(2): 181-

186.

- [2] Li Wenqiang, Zhang Gaisheng, Niu Na. RAPD analysis on variation of mitochondrial DNA for cytoplasmic-nuclear male sterile lines in wheat[J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(3): 490-496.
- [3] 姚 鸿, 李传友, 谢伟武, 等. 小麦 D<sup>2</sup> 型与 K 型、V 型、T 型细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的 RAPD 比较分析[J]. 植物学报, 1998, 10: 43-48.
- [4] 舒友菊, 王贵学, 郑家奎, 等. K 型和冈型水稻线粒体 DNA 的 AFLP 分析[J]. 重庆大学学报(自然科学版), 2007, 30(12): 69-72.
- [5] Murai K, Takumi S, Koga H, et al. Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat[J]. The Plant Journal, 2002, 29(2): 169-181.
- [6] 李文强, 张改生, 汪 奎, 等. 小麦线粒体 DNA 的高效提取方法[J]. 遗传, 2007, 29(6): 771-775.
- [7] 唐 群, 姚亚琴, 张改生. 小麦线粒体 DNA 快速提取体系的建立[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(6): 144-147.
- [8] Jose H M, Tambor R F. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the dermatophyte fungus *Epidermophyton floccosum*[J]. Current Genetics, 2006, 49: 302-308.
- [9] Susanne B, Siegfried S, Hermann M, et al. A molecular phylogeny of bryophytes based on nucleotide sequences of the mitochondrial *nad5* gene[J]. Plant Systematics and Evolution, 1998, 218: 179-192.
- [10] Adams K L, Palmer J D. Evolution of mitochondrial gene content, gene loss and transfer to the nucleus[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29: 380-395.
- [11] Meng S W, Chen Z D, Li D Z, et al. Phylogeny of Saururaceae based on mitochondrial *matR* gene sequence data[J]. Journal of Plant Research, 2002, 115: 71-76.
- [12] 郭亚龙, 葛 颂, 线粒体 *nad1* 基因内含子在稻族系统学研究中的价值—兼论 *Porteresia* 的系统位置[J]. 植物分类学报, 2004, 42(4): 333-344.
- [13] 谭功燮, 田孟良, 黄玉碧, 等. 根据线粒体 *nad1* 基因第 2 内含子的序列多态性对糯玉米进行系统分类[J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(1): 39-43.