

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2015.01.02

甜菜属厚皮菜 SWTY-1 细胞质 VNTRs 多态性分析

刘巧红¹, 罗成飞¹, 代翠红¹, 袁肖寒², 梁乃国¹, 刘天骄¹, 史淑芝¹, 于歆¹, 吕星道²

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 哈尔滨 150090;

2. 东北农业大学生命科学与生物技术研究中心, 哈尔滨 150030)

摘要: 利用数目可变串联重复序列 (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs) 微卫星标记方法, 对重庆厚皮菜甜菜材料 SWTY-1 群体中 100 个单株的细胞质线粒体 DNA 片段中 TR2 位点 VNTRs 片段多态性进行分析。结果显示 97 个单株线粒体 TR2 位点微卫星串联重复序列均为 3 拷贝, 与普通糖甜菜一致; 3 个单株线粒体 TR2 位点微卫星串联重复序列为 6 拷贝, 发现甜菜属厚皮菜细胞质 TR2 位点 VNTRs 存在多态性, 在该群体中发现了不同于甜菜栽培种新的细胞质单株。对该群体材料 100 个单株的抽薹及结籽进行观测, 结果显示微卫星串联重复序列为 6 拷贝的变异植株中 2 个单株花期未抽苔开花, 1 株抽苔晚未形成正常种子; 细胞质 TR2 位点 VNTRs 片段拷贝数为 3 的植株中 2 个单株未能正常抽薹, 其他植株均正常抽薹结籽。

关键词: 甜菜属; 细胞质; 雄不育; 线粒体; 分子标记

中图分类号: TS242.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2015)-01-009-04

Analysis for variable number of tandem repeats in cytoplasm genome of *Beta vulgaris cicla* SWTY-1

LIU Qiaohong¹, LUO Chengfei¹, DAI Cuihong¹, YUAN Xiaohan², LIANG Naiguo¹,
LIU Tianjiao¹, SHI Shuzhi¹, YU Xin¹, LÜ Xingdao²

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. Life Science and Biotechnology Research Center, Northeast Agricultural University, Harbin 150090, China)

Abstract: Molecular identification for cytoplasm polymorphism of *Beta vulgaris cicla* L materials SWTY-1 was conducted in this paper. Polymorphisms in mtDNA TR2 locus of *Beta vulgaris cicla* SWTY-1 were analyzed using variable number of tandem repeats (VNTRs) molecular markers method. The result showed that the numbers of tandem repeats in mtDNA TR2 locus were three-copy array of tandem repeats in 97 single plants among the 100 plants of Swiss chard, which was consistent with sugar beet. Six-copy VNTRs in mtDNA TR2 locus were found in 3 single plants among the population. Two plants could not bolt among the three plants whose VNTRs copy numbers were six. One plant bolting late could not form normal seeds among the three plants whose VNTRs copy number were six. Only two plant among the 97 plants with three-copy in TR2 locus failed to bolt normally and others bolt normally and form seeds.

Keywords: Beta; Cytoplasm; Male sterility; mt DNA; Molecular markers

甜菜 (*Beta vulgaris*) 是重要的糖料作物之一, 属于典型的异交作物^[1]。由于甜菜开花器官的特殊结构, 大规模人工去雄很难操作, 因此不育系亲本材料选育是甜菜杂种生产的主要支柱。在甜菜杂交育种中选育不育系是一项费时费力而又花费较大的工

作^[2-3]。目前所有杂交栽培甜菜种子的生产都依赖于 Owen 发现的雄不育甜菜材料 (CMS) 细胞质, 种质单一, 各国研究者一直试图寻找利用新的不育系血缘^[4]。近几年, 国外研究者主要发现了起源于巴基斯坦野生甜菜的 S2 型细胞质不育系 1-12CMS(3)

收稿日期: 2014-12-18; 修回日期: 2015-01-06.

基金项目: 国家自然科学基金 (No.31371685)。

作者简介: 刘巧红, 女, 副研究员, 研究方向: 甜菜遗传育种与植物分子标记; E-mail: Qiaohong941@hit.edu.cn.

和起源于法国野生沿海甜菜的 S3 型细胞质不育系 CMS 2 种新材料,研究者正在对新发现材料的线粒体 DNA 序列多态性及育性机理进行研究,试图补充 Owen 学说,并作为新的候选 CMS 种质材料应用到甜菜生产中,研究者正在积极发掘新的甜菜属细胞质类型补充甜菜种质资源的研究^[5]。

数目可变串联重复序列 (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs) 又称小卫星 DNA (Minisatellite DNA), 为 10 到几百核苷酸, 拷贝数 10~1 000 不等, 在动物细胞线粒体中广泛存在, 被子植物物种中目前只在甜菜中检测到 VNTRs 的存在^[6]。2000 年日本研究人员 Nishizawa S 等首次报道在甜菜细胞质线粒体 DNA 中不相关连的 4 个 TR 位点存在数目可变的串联重复序列, 分别为 TR1、TR2、TR3、TR4 位点; 糖用栽培甜菜和沿海甜菜群体中线粒体 TR1 位点 32 bp 的串联重复序列分别为 3~13 拷贝不等, 其中糖甜菜 Owen 型不育系、保持系、普通受粉系 TR1 位点的 VNTRs 分别为 4 拷贝、13 拷贝和 6 拷贝; 沿海甜菜 (*B. maritima*) 中出现 2 拷贝、5 拷贝、7 拷贝、8 拷贝; 在 TR3 和 TR4 位点串联重复序列也出现不同拷贝数的多态性, 但这些材料在 TR2 位点均为 3 拷贝, 未发现多态性^[7]。本研究利用 VNTRs 标记, 针对中国甜菜属厚皮菜 (*Beta vulgaris* Linn. var. *cicla* L) 材料 SWTY-1 群体中 100 个单株的线粒体 DNA 中 TR2 位点 VNTRs 片段进行分析, 试图寻找新的细胞质类型并在田间对其抽苔结籽现象进行观察。叶用甜菜厚皮菜又名牛皮菜, 甜菜属 (*Beta*), 藜科 (*Chenopodiaceae*) 的一种, 二年生草本植物, 原产欧洲地中海沿岸, 以幼苗或叶片作蔬菜用, 尤其在西方烹调中被广泛应用^[8]。期望通过对该材料的研究, 为甜菜属新型细胞质种质资源的利用提供理论基础, 为甜菜属不育植株不育机制的解释提供新的研究材料与数据, 同时丰富甜菜属细胞质资源的分子数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

甜菜属厚皮菜材料群体 SWTY-1 为叶用甜菜种子材料, 由哈尔滨工业大学食品科学与工程学院甜菜育种研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 单株叶片总 DNA 的提取

每个试验单株取 0.05 g 叶片, 参照文献^[9-10]方法, 应用提取缓冲液 (0.5 mol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ EDTA, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol·L⁻¹ 巯基乙

醇) 和氯仿: 异戊醇 (24:1) 进行 DNA 提取实验, 分别获得群体中每个单株材料的总 DNA。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 质量, 模板 DNA 终浓度调至 20~25 ng·μL⁻¹。

1.2.2 单株 TR2 位点 VNTRs 片段多态性 PCR 检测

参照 Nishizawa S 等的文献报道, 根据甜菜细胞质中线粒体 TR2 位点微卫星串联重复序列两端的保守序列设计合成上游引物和下游引物序列^[5]。进行聚合酶链式反应 (PCR) 反应。每个单株的 PCR 反应体系为 20 μL。反应组成为: 模板 DNA 20~30 ng; 上游和下游引物分别为 0.30 μmol·L⁻¹; dNTPs 0.2 mmol·L⁻¹, MgCl₂ 2.5 mmol·L⁻¹, Taq 酶 0.8 U。引物序列片段由上海生物工程公司合成。dNTP、Taq 酶、DL2000 购自 TaKaRa 公司。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 50 s, 25 个循环, 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 90 V, 电泳适当距离后取出, 在紫外灯下拍照记录。

1.2.3 VNTRs 片段的回收与测序

特殊的 VNTRs PCR 片段使用 BioSpin Gel Extraction Kit 回收试剂盒进行回收, 具体操作步骤参照试剂盒说明书进行, 回收片段的测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成。根据测序结果确定不同于对照特殊单株 TR2 位点的拷贝数。

1.2.4 试验材料的抽苔结实特性田间观察

经冬季低温春化处理后的植株于次年春季栽于田间, 待抽苔开花时, 根据是否正常抽苔结籽观测单株的育性特点。

2 结果与分析

2.1 甜菜属厚皮菜 TR2 位点 VNTRs 片段多态性检测结果及细胞质类型分析

从甜菜属厚皮菜群体中随机取样 100 个单株进行细胞质 DNA TR2 位点 VNTRs 片段多态性标记检测。琼脂糖凝胶电泳时, 在 DNA Marker 旁边的泳道分别点入测序鉴定后的 3 拷贝对照 PCR 产物及测试样品 PCR 产物。图 1 为对照及待测单株 TR2 位点 VNTRs 片段多态性检测 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图片。参照文献^[7], TR2 位点 3 拷贝 PCR 产物序列为 362 bp, 6 拷贝为 461 pb。3 个单株 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳明显不同于 3 拷贝单株 PCR 产物, 回收测序结果显示微卫星序列串联重复 6 次, 为 6 拷贝, PCR 产物序列为 461 bp。100 个单株的线粒体 TR2 位点 VNTR 片段 PCR 产物测序结果统

计后得出的微卫星串联重复序列拷贝数结果见表 1。

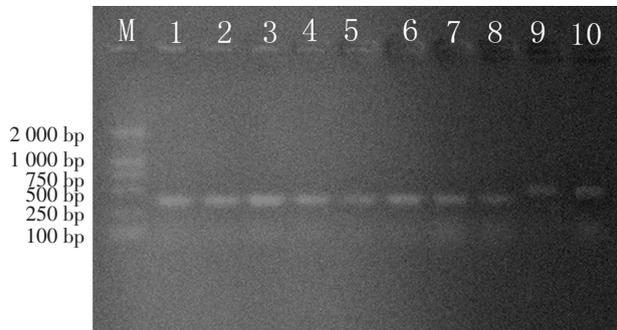


图 1 线粒体 TR2 位点 VNTRs 多态性 PCR 产物电泳图谱

Fig.1 PCR product electrophoretogram for

VNTRs polymorphism on mitochondrion TR2 locus

注: M; DL2000 分子量标准; 1: 3 拷贝对照; 2~8: 3 拷贝 VNTRs 单株; 9~10: 6 拷贝 VNTRs 单株。

Notes: M; DL2000 DNA marker. No.1: 3 copies CK. No.2~8: 3 copies VNTRs sing plant. No.9 ~10: 6 copies VNTRs sing plant.

表 1 TR2 位点 VNTRs 片段拷贝数及育性特点

Table 1 Copy number of VNTRs on TR2 locus and fertility trait

单株序号	VNTRs 拷贝数	育性特点	单株个数
1~15	3	正常抽薹结籽	15
16	3	未抽苔	1
17~36	3	正常抽薹结籽	20
37	3	未抽苔	1
38~67	3	正常抽薹结籽	30
68	6	未抽苔	1
69~72	3	正常抽薹结籽	4
73	6	抽薹晚	1
74~87	3	正常抽薹结籽	14
88	3	未抽薹	1
89~100	3	正常抽薹结籽	12

表 1 中看出,甜菜属厚皮菜群体所检测的 100 个单株 TR2 位点 VNTRs 片段分别为 3 拷贝和 6 拷贝,出现多态性,其中 97 个植株中线粒体 TR2 位点 VNTR 片段为 3 拷贝,与 Nishizawa S 等报道的糖用栽培甜菜 TR2 位点的细胞质类型一致,3 个植株中线粒体 TR2 位点 VNTR 片段为 6 拷贝,线粒体 TR2 位点出现 6 拷贝现象的单株数在该试验群体中占 3%。根据 Satsuki Nishizawa 等的报导^[6],在研究的甜菜属不同糖甜菜栽培种和沿海甜菜群体中线粒体 DNA TR2 位点中未发现多态性,均为 3 拷贝。本实验在叶用甜菜厚皮菜群体的单株中检测到线粒体 DNA TR2 位点串联重复序列(VNTRs)出现 6 拷贝

单株,存在多态性,发现了甜菜属新的细胞质单株。实验结果表明叶用甜菜-厚皮菜群体中细胞质多样性比糖用栽培甜菜更为广泛,TR2 位点出现多态性。

2.2 100 个单株的田间育性观测结果分析与讨论

从幼苗至繁茂期,对群体植株的农艺性状进行观察,该群体中 100 个植株的田间生长形态及株型并无明显差异。100 个单株的抽薹结籽特性并不完全相同。田间花期抽薹及植株育性调查结果见表 1。该群体 100 个单株中 TR2 位点 VNTRs 片段分子标记检测结果拷贝数为 3 的群体中 95 个植株能够正常抽薹结籽属于正常可育材料,2 个单株未能抽薹结籽;TR2 位点 VNTRs 片段拷贝数为 6 的植株中 2 个单株不能正常抽苔开花,1 个植株抽薹晚,获得的种子粒小,种仁干瘪,不能萌发形成幼苗。新发现的 TR2 位点 VNTRs 片段拷贝数为 6 的 3 个植株个体均不能正常结籽,此现象出现的原因有待进一步解释与研究,该试验鉴定结果并不能完全证明线粒体 DNA 中 TR2 位点微卫星串联数目的改变直接与甜菜属植株的育性变化相关,因为植株数量少有待更多群体的验证,而且细胞质 TR2 位点 VNTRs 片段拷贝数为 3 的 2 个单株也不能正常抽薹,对于引起单株抽薹异常不能正常形成可育种子的原因和机理有待深入探讨,将成为本课题组下一步研究的目标之一。

3 结 论

100 个甜菜属厚皮菜单株的线粒体基因组 TR2 位点的微卫星串联序列重复次数(VNTRs)的分子检测结果表明,甜菜属厚皮菜群体中 97% 个体的细胞质 TR2 位点的微卫星串联序列重复次数与 Nishizawa S 等报导的糖甜菜栽培种和其他沿海甜菜细胞质一样,TR2 位点 VNTRs 拷贝数均为 3 拷贝;厚皮菜群体中 3% 个体的细胞质中线粒体 DNA 上 TR2 位点的 DNA 序列发生改变,微卫星串联序列重复次数由 3 拷贝变异为 6 拷贝,出现多态性,首次发现了 TR2 位点 VNTRs 为 6 拷贝的新的细胞质单株。微卫星串联重复序列为 6 拷贝的植株中 2 个单株花期未抽苔开花,1 株抽苔晚未形成正常种子,线粒体 DNA 中一些位点微卫星串联数目的改变与甜菜属植株的育性变化是否具有相关性有待更深入的研究及大量单株材料线粒体 DNA 序列的分子鉴定与田间育性调查的结合。本实验在叶用甜菜厚皮菜 SWTY-1 群体的单株中首次检测到了线粒体 DNA TR2 位点串联重复序列(VNTRs)出现 6 拷贝多态性。说明叶用甜菜群体中细胞质多样性较糖用甜菜

更为广泛。该特殊的多态性细胞质材料的发现为甜菜属植物育性机理的进一步深入探索提供了新的植物种质资源研究材料。

参考文献(References)

- [1] 刘巧红,罗成飞,程大友. 糖用甜菜的综合利用[J]. 中国甜菜糖业,2009,(4):37-39.
LIU Qiaohong, LUO Chengfei, CHENG Dayou. Comprehensive utilization for sugar beet [J]. China Beet & Sugar, 2009, (4): 37-39.
- [2] CHADIA O, ANDRE B. Isolation and antigenic characterization of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) mitochondrial F₁-ATPase: Studies of some Beta species and of the cytoplasmic male sterile Owen form [J]. Plant Science, 1991, 74(1): 53-64.
- [3] HAGIHARA E, ITCHONA N, HABU Y, et al. Molecular mapping of a fertility restorer gene for Owen cytoplasmic male sterility in sugar beet [J]. TAG. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(2): 250-255.
- [4] KAWANISHI Y, SHINADA H, MATSUNAGA M, et al. A new source of cytoplasmic male sterility found in wild beet and its relationship to other CMS types [J]. Genome, 2010, 53 (4): 251-256.
- [5] MIKAMI T, YAMAMOTO M, MATSUHIRA H, et al. Molecular basis of cytoplasmic male sterility in beets: an overview [J]. Plant Genetic Resources-characterization and Utilization, 2011, 9(2): 284-287.
- [6] HONMA Y, YOSHIDA Y, TERACHI T, et al. Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of oryza and brassica [J]. Current Genetics, 2011, 57(4): 261-270.
- [7] NISHIZAWA S, KUBO T, MIKAMI T. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets [J]. Current Genetics, 2000, 37 (1): 34-38.
- [8] PAOLINO N, DONOTO A. Nutritional and functional potential of Beta vulgaris cicla and rubra [J]. Fitoterapia, 2013, 89: 188-199.
- [9] 刘巧红,程大友,罗成飞,等,甜菜 TR1 位点多态性分析及细胞质育性鉴定[J],中国甜菜糖业,2013,(1):18-20.
LIU Qiaohong, CHENG Dayou, LUO Chengfei, et al. TR1 loci polymorphism analysis and cytoplasmic fertility identification for 8 sugar beet material population [J]. China Beet & Sugar, 2013, (1): 18-20.
- [10] LIU Qiaohong, CHENG Dayou, YANG lin, et al. Construction of digital fingerprinting and cluster analysis using ISSR markers for sugar beet cultivars (lines) [J]. Non-nye Gongcheng Xuebao, 2012, 28 (Sup.2): 280-284.