

三例小麦细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的扩增片段长度多态性分析

朱启迪*, 张新铎*, Ejaz M, 张改生, 车会学, 王书平, 宋齐鲁, 杨书玲, 张龙雨

西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100

朱启迪, 张新铎, Ejaz M, 等. 三例小麦细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的扩增片段长度多态性分析. 生物工程学报, 2013, 29(5): 646-656.

Zhu QD, Zhang XB, Ejaz M, et al. Analysis of three wheat cytoplasmic male sterile line mitochondrial DNA by AFLP. Chin J Biotech, 2013, 29(5): 646-656.

摘 要: 细胞质雄性不育是小麦杂种优势利用的重要途径, 为了鉴定 3 例小麦雄性不育系的细胞质类型, 对其线粒体 DNA (mtDNA) 进行扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分析。文中利用差速离心法和连续蔗糖密度梯度超速离心法提取纯化小麦线粒体。结果表明: 通过该提取方法获得的 mtDNA, 其质量和纯度能够满足 PCR 反应和遗传学分析。在 64 对选扩引物中, 筛选到了 4 对特异性引物, 其中引物 E1/M7 在 ms (Kots)-90-110 不育系扩增出 3 条特异条带; 引物 E4/M2 在 ms (Ven)-90-110 不育系扩增出 2 条特异条带; 引物 E7/M6 在 ms (S)-90-110 不育系中扩增出 2 条特异条带; 引物 E6/M4 在 ms (Kots)-90-110 不育系中扩增出 2 条特异条带。这些特异引物可以用来作为鉴定具有粘果山羊草 *Aegilops kotschyi*、偏凸山羊草 *Ae. ventricosa*、斯卑尔脱小麦 *Triticum spelta* 3 类不育细胞质型小麦雄性不育系的细胞质分子标记, 为研究小麦细胞质雄性不育机理奠定了分子基础。

关键词: 小麦, 细胞质雄性不育, 线粒体 DNA, 扩增片段长度多态性, 分子标记

Received: September 16, 2012; **Accepted:** December 26, 2012

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A106), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31071477, 31171611), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20090204110024), Key Scientific and Technological Innovation Special Projects of Shaanxi "13115" (No. 2010ZDKG-68).

Corresponding author: Gaisheng Zhang. Tel: +86-29-87092085; E-mail: zhanggsh@public.xa.sn.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划重大专项 (863 计划) (No. 2011AA10A106), 国家自然科学基金 (Nos. 31071477, 31171611), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20090204110024), 陕西省 "13115" 科技创新工程重大科技专项 (No.2010ZDKG-68) 资助。

Analysis of three wheat cytoplasmic male sterile lines mitochondrial DNA by AFLP

Qidi Zhu*, Xinbo Zhang*, Ejaz M, Gaisheng Zhang, Huixue Che, Shuping Wang, Qilu Song, Shuling Yang, and Longyu Zhang

College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Cytoplasmic male sterility is an important way to utilize wheat heterosis. The purpose of this study was to identify cytoplasmic type of three wheat male sterile lines. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker technique was used to analyze the wheat mitochondrial DNA. We isolated mitochondria by differential centrifugation and density gradient ultracentrifugation. The results show that the extracted mitochondrial DNA was pure. It was suitable for PCR and genetic analysis. We got 4 pairs of specific primers from 64 primers combinations. Primer E1/M7 amplified 3 specific fragments in ms(Kots)-90-110. Primer E4/M2 generated 2 specific fragments in ms(Ven)-90-110. Primer E7/M6 amplified 2 specific fragments in ms(S)-90-110. Primer E6/M4 produced 2 specific fragments in ms(Kots)-90-110. Four specific primers could be used to identify three cytoplasmic types of *Aegilops kotschy*, *Ae. ventricosa* and *Triticum spelta*. It provided the molecular basis to further study the mechanism of wheat cytoplasmic male sterility.

Keywords: wheat, cytoplasmic male sterility, mitochondrial DNA, amplified fragment length polymorphism (AFLP), molecular marker

细胞质雄性不育 (Cytoplasmic male sterility, CMS) 普遍存在于高等植物中, 是生产上广泛利用农作物杂种优势的基础。小麦作为世界第一大粮食作物, 对其杂种优势利用的研究, 特别是雄性不育机理的研究, 一直是众多杂交小麦研究者设法攻克科学难关^[1-2]。大量的研究表明, 植物雄性不育不仅与叶绿体相关^[3-6], 而且与线粒体的关系更加密切相关^[7-9]。目前在小麦^[10]、水稻^[11]、豌豆^[12]等植物中已经鉴定出与细胞质雄性不育相关的 mtDNA 片段。人们普遍认为, 植物细胞质雄性不育与 mtDNA 的重排、插入、缺失所产生的突变有关, 这些突变能够产生可表达的开放阅读框架, 从而使 mtDNA 转录和翻译的产物发生变化, 导致植物雄性不育的产生^[13-16]。韩艳芬等^[17]对黏类小麦细胞质雄性不育线粒体 *atp6* 基因转录本编辑位点研究, 编辑不充

分的转录产物会影响线粒体功能的正常发挥, 进而影响到受体雄性不育的产生; 李文强等^[18]利用分子标记技术对小麦质核互作型雄性不育系 mtDNA 的变异性进行了 RAPD 分析, 表明小麦线粒体基因组的变异性很可能涉及到不育系育性本质的改变, 同时认为研究小麦细胞核相同而细胞质来源不同的不育系间 mtDNA 的差异, 对进一步探寻小麦细胞质雄性不育机理, 尤其是用于区分鉴定不同不育胞质类型具有十分重要的理论和实践意义。然而, 在细胞质雄性不育中由于存在核质互作现象, 很难确定细胞质基因组的差异是由细胞质基因组本身引起的, 还是由于细胞核通过对细胞质的互作影响而产生的, 因此如果不经过选择专门的研究材料, 仅单一地对某一供试材料进行研究很难确定其不育胞质来源与性质。为了解决这一问题, 本研究经过多年的实

践培育出一批异质同核小麦不育材料,这些材料均通过连续回交转育数十代,它们具有相同的核遗传背景。用这些材料为供试材料,在对雄性不育研究过程中可以完全排除供试材料间因细胞核差异带来的影响,得到的差异可以认为是来自于细胞质基因组的本质差异。本研究正是基于此,选取3例异质同核小麦雄性不育系及其对应保持系为材料,利用扩增片段长度多态性标记技术对其 mtDNA 进行差异性分析,旨在小麦杂种优势利用中在分子水平上分析鉴别不同不育细胞质类型以及各个不同不育细胞质育性的特异性,以提高核质互作型不育类型的实际利用效能。

1 材料与方 法

1.1 材料及材料处理

供试3例异质同核小麦雄性不育材料是经多年采用普通小麦 *Triticum aestivum* 同一亲本(A)90-110回交转育而成的小麦不育系,其回交世代均在15代以上,因此它们的核基因型相当一致。分别为:具有粘果山羊草 *Aegilops kotschy* 不育细胞质型的 ms (Kots)-90-110不育系、偏凸山羊草 *Ae. ventricosa* 细胞质型的 ms (Ven)-90-110不育系、普通小麦变种斯卑尔脱 *Triticum spelta* 细胞质型的 ms (S)-90-110不育系。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与保存。

小麦黄化苗的培育:分别取4份供试材料种子,用蒸馏水冲洗干净。去除瘪粒后,用无菌水冲洗3~4次。将种子浸泡于无菌水中24h,中间换水1次;再将种子铺于干净无菌的两层滤纸上,置于30℃暗室中催芽24h,然后调节温度降至28℃培养10d左右,每天换蒸馏水2次;等到

黄化苗约15cm高时停止培养,用20%次氯酸钠灭菌后,再用无菌水漂洗2次,剪成1cm左右的小段备用。

1.2 线粒体的提取和纯化

线粒体及 mtDNA 提取的具体操作步骤主要参照文献^[19-20]并加以改进,以下操作未经特别说明均在4℃或者冰浴中进行。

黄化苗材料10mL/g加入匀浆液(500mmol/L甘露醇,50mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 20mmol/L EDTA, 0.2% BSA, 0.2% β-巯基乙醇),匀浆后通过4层纱布过滤。滤液3000×g、4℃离心10min得上清液,然后上清液18000×g、4℃离心30min得沉淀;沉淀溶解于匀浆液。重复上述过程得到的沉淀即为粗线粒体。

将获得的线粒体沉淀再次悬于10mL悬浮液A(500mmol/L甘露醇,50mmol/L Tris-HCl),加过量DNase I以除去核DNA及破碎mtDNA,混匀后在冰上放置1h,加入EDTA到上述悬浮液中停止DNase I的消化反应。然后再加4倍体积的悬浮液B(500mmol/L甘露醇,50mmol/L Tris-HCl, 20mmol/L EDTA)稀释DNase I消化后的线粒体悬浮液,4℃、18000×g离心悬浮液30min,将上清倒掉,然后加入5mL悬浮液B用软毛笔悬浮线粒体沉淀。

配制蔗糖梯度溶液,它们的浓度分别为:0.6mol/L、1.2mol/L、1.6mol/L。将上述粗制线粒体悬浮液平均铺于不连续的蔗糖梯度溶液斜面上,50000×g、4℃离心90min。收集1.2~1.6mol/L界面部分,溶于5倍体积悬浮液B,然后30000×g、4℃离心30min,沉淀即为纯化的完整线粒体。

1.3 线粒体裂解及 DNA 纯化

线粒体裂解及 DNA 纯化方法主要参照李文强^[18]的方法并加以改进。线粒体沉淀中加入 1 mL 裂解缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS), 然后加入蛋白酶 K (Meck) 至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 重新悬浮沉淀。首先 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 之后再 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 水浴期间每隔一段时间轻轻摇动 1 次。裂解结束后加入 2 mol/L 醋酸铵溶液 100 μL , 混匀, 加入 800 μL TE 饱和酚/氯仿 (1 : 1), 再次混匀并静置 10 min, 18 000 \times g 离心 5 min, 吸取上清, 重复抽提 1 次。将上清液分装于 1.5 mL 离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇并混匀, -70 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, 18 000 \times g 离心 15 min, 所得白色沉淀干燥后加入 30 μL TE 溶液 (含有 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ RNase), -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 小麦 mtDNA 的质量和纯度检测

1.4.1 mtDNA 质量检测

用紫外分光光度计分别测定 mtDNA 在 260 nm、280 nm、230 nm 的 OD 值, 并计算出 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 值, 进行纯度分析。

1.4.2 mtDNA 纯度鉴定

以 mtDNA 为模版, 分别利用细胞核基因组上肌动蛋白 β 亚基 (β -actin) 基因和线粒体基因组上细胞色素 C 氧化酶第三亚基 (COXIII) 基因内参标记进行 PCR 扩增, 在 1.0% 的琼脂糖凝胶 100 V 的电压电泳 40 min 后观察效果, 检测所提取的 mtDNA 质量。

1.5 mtDNA 的 AFLP 分析

1.5.1 模板 DNA 制备

双酶切目的 DNA: 选用 *EcoR* I / *Mse* I 两种酶。反应混合液按表 1 配制。先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 3 h,

再在 65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 2.5 h, 有条件时可以在酶切过程中用另一台 PCR 仪进行接头的复性。复性的热循环条件为: 65 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

DNA 片段的连接: 用 T4 DNA 连接酶, 将混合液加入等体积酶切混合物, 16 $^{\circ}\text{C}$ 或 22 $^{\circ}\text{C}$ 室温下放置过夜。

1.5.2 AFLP 引物的选择

采用的 AFLP 引物由北京六合华大科技有限公司合成, 其引物组成见表 2, 选扩引物共 64 对组合, 如表 3 所示。

1.5.3 预扩增反应

按照表 4 建立 PCR 预扩体系 (20 μL), 混匀后离心 10 s, PCR 预扩程序 26 个循环为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增后, 反应混合物稀释 50 倍, 稀释好的产物和剩下的产物一起置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存, 稀释好的产物作为下一步扩增反应的模板。

1.5.4 选择性扩增

选择性扩增 PCR 程序为: 第 1 个循环是: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 第 2~13 个循环, DNA 退火温度每次递减 0.7 $^{\circ}\text{C}$, 第 14~36

表 1 AFLP 限制性酶切体系

Table 1 AFLP restriction enzyme digestion system

Component	Volume (μL)
DNA template (50 ng/ μL)	5.0
<i>EcoR</i> I (10 U/ μL)	0.5
<i>Mse</i> I (10 U/ μL)	0.5
10 \times buffer tango	2.0
H ₂ O	12.0
Total volume	20.0

表 2 *EcoR* I 引物和 *Mse* I 引物的组成Table 2 Component of primers *EcoR* I and *Mse* I

Primer	Primer core sequence (5'-3')	Restriction endonuclease sequence (5'-3')	Selecting sequence (5'-3')
<i>EcoR</i> I primer	GACTGCGTACC	AATTC	NNN
<i>Mse</i> I primer	GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN

Note: N represents random nucleotide.

表 3 *EcoR* I-*Mse* I 及其相关引物组合Table 3 Primers combinations of *EcoR* I and *Mse* I

<i>EcoR</i> I \ <i>Mse</i> I	M1 (CAA)	M2 (CAA)	M3 (CAA)	M4 (CAA)	M5 (CAA)	M6 (CAA)	M7 (CAA)	M8 (CAA)
E1(AAC)	E1/M1	E1/M2	E1/M3	E1/M4	E1/M5	E1/M6	E1/M7	E1/M8
E2(AAG)	E2/M1	E2/M2	E2/M3	E2/M4	E2/M5	E2/M6	E2/M7	E2/M8
E3(ACA)	E3/M1	E3/M2	E3/M3	E3/M4	E3/M5	E3/M6	E3/M7	E3/M8
E4(ACT)	E4/M1	E4/M2	E4/M3	E4/M4	E4/M5	E4/M6	E4/M7	E4/M8
E5(ACC)	E5/M1	E5/M2	E5/M3	E5/M4	E5/M5	E5/M6	E5/M7	E5/M8
E6(ACG)	E6/M1	E6/M2	E6/M3	E6/M4	E6/M5	E6/M6	E6/M7	E6/M8
E7(AGC)	E7/M1	E7/M2	E7/M3	E7/M4	E7/M5	E7/M6	E7/M7	E7/M8
E8(AGG)	E8/M1	E8/M2	E8/M3	E8/M4	E8/M5	E8/M6	E8/M7	E8/M8

表 4 AFLP 预扩增 PCR 反应体系

Table 4 PCR reaction system of AFLP pre-amplification

Component	Volume (μ L)
DNA template	5.0
MP primer (50 ng/ μ L)	1.0
EP primer (50 ng/ μ L)	1.0
MgCl ₂ (25 mmol/L)	1.2
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ L)	0.1
dNTPs (2.5 mmol/L)	1.6
10 \times buffer	2.0
H ₂ O	8.1
Total volume	20.0

表 5 AFLP 选择性扩增 PCR 反应体系

Table 5 PCR reaction system of AFLP selective amplification

Component	Volume (μ L)
DNA diluents of preamplification	5.0
<i>EcoR</i> I primer (10 ng/ μ L)	0.4
<i>Mse</i> I primer (10 ng/ μ L)	1.2
MgCl ₂ (25 mmol/L)	1.2
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ L)	0.2
dNTPs (2.5 mmol/L)	1.6
10 \times buffer	2.0
H ₂ O	8.4
Total volume	20.0

循环,退火温度是 56 °C,其余步骤同第一个循环,选扩体系见表 5。反应结束后,扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,硝酸银染色。

2 结果与分析

2.1 不连续蔗糖梯度结果

粗制线粒体悬浮液经不连续蔗糖梯度离心后会形成 3 个不同的界面,吸取 1.2~1.6 mol/L 界面部分即为所要的线粒体,如图 1 所示。

2.2 mtDNA 的质量检测

将获得的 mtDNA 用 TE 溶液溶解后进行分光光度测定,其 A_{260}/A_{280} 值介于 1.8~2.0,表明样品中无蛋白质或者酚类污染, A_{260}/A_{230} 值在 2.0~2.1 之间,表面样品中没有糖类或者有机试剂污染。在提取 mtDNA 过程中,若不用 DNase I 处理,得到的 mtDNA 经琼脂糖凝胶电泳检测后可以看出条带有明显的拖尾。使用 DNase I 处理后,拖尾现象消失,可见一条清晰的 mtDNA 条带,带型整齐(图 2),表明利用该方法提取的 mtDNA 质量良好。

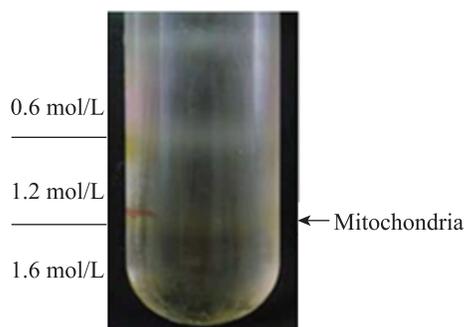


图 1 不连续蔗糖梯度结果

Fig. 1 Result of discontinuous sucrose gradient.

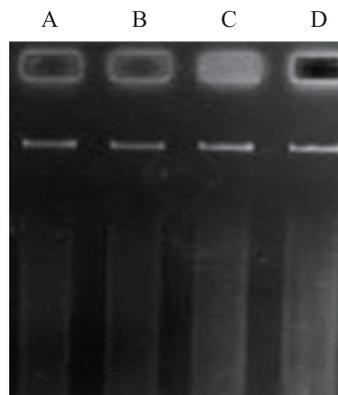


图 2 加入 DNase I 的 mtDNA 检测结果

Fig.2 Results of mtDNA with DNase I. (A) (A)-90-110. (B) ms(Kots)-90-110. (C) ms(Ven)-90-110. (D) ms(S)-90-110.

2.3 内参基因对 mtDNA 的鉴定

提取高纯度的 mtDNA 是利用分子手段研究线粒体的前提。利用差速离心去掉细胞核、质体及碎片, DNase I 可以酶切掉破裂的细胞核 DNA、mtDNA 以及质体 DNA。不连续蔗糖梯度离心对线粒体进一步纯化,能排除其他基因组 DNA 的污染。分别利用细胞核基因组上肌动蛋白 β 亚基 (β -actin) 基因和线粒体基因组上细胞色素 C 氧化酶第 3 亚基 (COXIII) 基因的特异性引物,以 mtDNA 为模板进行 PCR 扩增,所得产物进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 3)。结果发现线粒体基因 COXIII 的特异性引物在 mtDNA 中能扩增出一条预期大小(约 400 bp)的 DNA 条带,而细胞核基因 β -actin 的特异性引物却没有扩增出其特异性条带,从而表明利用本方法提取的 mtDNA 纯度很好,没有受到细胞核 DNA 的污染。

2.4 mtDNA 的 AFLP 分析

采用 64 对引物组合检测了供试材料 3 例异质同核小麦雄性不育系及其保持系 mtDNA 之间

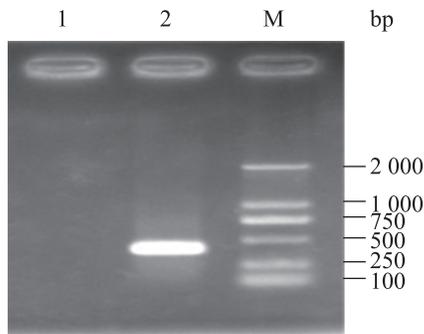


图3 内参基因对 mtDNA 的 PCR 检测结果

Fig. 3 Results of internal reference gene amplified in mtDNA. M: marker(DL2000). 1: β -Actin gene. 2: COXIII gene.

的差异, 将所提取的 mtDNA 经 *EcoR* I、*Mse* I 双酶切, 预扩增和选择性扩增, 聚丙烯酰胺凝胶电泳可以得到几十条清晰的亮带。从 64 对引物组合中共筛选出 4 对引物 E1/M7、E4/M2、E6/M4、E7/M6 扩增结果表现差异。

从图 4 中可以看出, 在引物 E1/M7 扩增条件下, ms (Kots)-90-110 不育系扩增出 200 bp 左右、400 bp 左右、750 bp 左右 3 条特异条带, 而 ms (S)-90-110 不育系扩增出一条 500 bp 左右特异条带, 从而可以鉴定具有粘果山羊草 *Aegilops kotschy* 不育质型和斯卑尔脱 *Triticum spelta* 不育质型的 mtDNA。引物 E4/M2 在粘果山羊草 *Aegilops kotschy* 不育质型的 ms (Kots)-90-110 不育系扩增出一条 200 bp 左右特异条带, 而在偏凸山羊草 *Ae. ventricosa* 不育质型的 ms (Ven)-90-110 不育系扩增出 600 bp 左右、1 000 bp 左右两条特异条带, 从而可以鉴定这两种不育系的 mtDNA。从图 5 中可以看出, 在引物 E7/M6 扩增条件下, 只有斯卑尔脱 *Triticum spelta* 不育质型的 ms (S)-90-110 不育系在 300 bp 左右、400 bp 左右的位置扩增了两条特异条带, 从而可

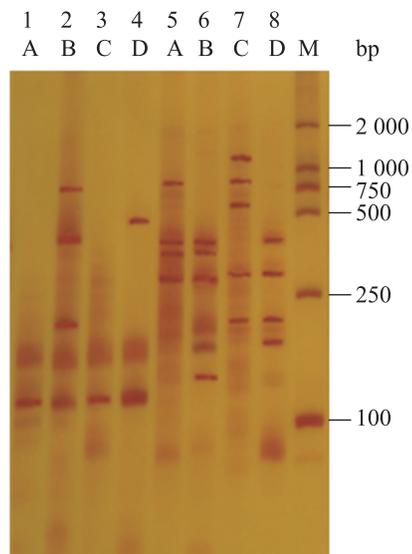


图4 三个不育系及保持性 AFLP 扩增图谱

Fig. 4 AFLP amplification profiles of three CMS lines and the maintainer line. (A) (A)-90-110. (B) ms (Kots)-90-110. (C) ms (Ven)-90-110. (D) ms (S)-90-110. 1-4: primer E1/M7; 5-8: primer E4/M2.

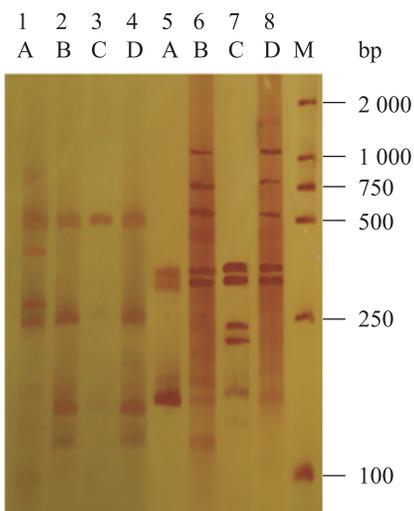


图5 三个不育系及保持性 AFLP 扩增图谱

Fig. 5 AFLP amplification profiles of three CMS lines and the maintainer line. (A) ms (S)-90-110. (B) ms (Ven)-90-110. (C) ms (Kots)-90-110. (D) (A)-90-110. 1-4: primer E7/M6; 5-8: primer E6/M4.

以鉴定具斯卑尔脱 *Triticum spelta* 不育质型的 ms (S)-90-110 的 mtDNA。引物 E6/M4 只在具粘果山羊草 *Aegilops kotschy* 不育质型的 ms (Kots)-90-110 不育系扩增出 200 bp 左右、250 bp 左右两条特异条带,可以用来鉴定该类型不育系的 mtDNA。因此,实践中上述 4 对特异引物可以作为鉴定粘果山羊草 *Aegilops kotschy*、偏凸山羊草 *Ae. ventricosa*、斯卑尔脱 *Triticum spelta* 这 3 类不育细胞质类型的细胞质分子标记。

3 讨论

本研究以小麦黄化苗为实验材料,由于黄化苗生长周期较短 (7~10 d),种子自身营养就能够满足其生长需要,因此培养基质用无菌水即可。黄化苗培养过程中要严格进行避光处理,否则极易出现返绿现象,提取的 mtDNA 受到叶绿体 DNA 的污染,因此换水时间一般在黑暗环境中进行。黄化苗最好在 30 °C 左右的温度下培养,这样不仅幼嫩的植物组织更容易破碎,有利于 mtDNA 的提取,而且在较高温度下细胞代谢旺盛,形成的线粒体更多,大大提高了线粒体 mtDNA 的产率。

在提取小麦 mtDNA 过程中对仪器设备的要求比较高,需要转速 50 000×g 以上的高速冷冻离心机。为了降低试验成本,用蔗糖梯度离心法代替 Percoll 密度梯度离心法^[21],一方面蔗糖是目前发现的成本最低的密度梯度离心介质,另一方面蔗糖在密度大于 1.1 g/mL (质量分数为 25%) 和低温条件下,它的黏度较高和扩散较慢,虽然不利于连续梯度的形成,但是有利于制备不连续梯度,还可以防止由于颗粒扩散而造成的区带变宽。制备好稳定的梯度后,在加样和离心过程中

需要特别小心,防止梯度遭到破坏,如果梯度遭到破坏,离心后线粒体就会沉淀到离心管底部,不能获取高质量的 mtDNA。

mtDNA 是植物细胞质雄性不育相关基因的载体。不育系线粒体基因组中某些位点经分子内或分子间重排产生了不同于保持系 mtDNA 的特异位点,这些位点是产生细胞质雄性不育的分子基础^[22]。而利用分子标记技术比较不育系与保持系 mtDNA 结构的差异,可以进一步鉴定出与细胞质雄性不育相关特异性的线粒体基因。对小麦异质同核雄性不育材料进行分子标记以前多采用 RAPD 标记,高春保等^[23]利用 RAPD 分子标记技术对几类异质同核小麦雄性不育系进行遗传多样性分析,筛选出 3 条特异引物,但是此标记方法容易受外界环境影响,重复性比较差。而 AFLP 分子标记重复性、稳定性均很好,因此对异质同核小麦材料进行 AFLP 标记,结果更加可靠稳定。本文正是基于此,采用 3 例异质同核小麦雄性不育系及其共同保持系为材料,筛选出了 4 对特异引物在 3 例异质同核小麦雄性不育系及其共同保持系中均表现出了稳定的差异,且这些差异能够作为一个稳定分子标记在实践中用以区分鉴别 K、Ven、S 型小麦不育胞质类型。一般情况下,“雄性不育 (CMS)-育性恢复”都是核质互作的产物,常作为一个整体考虑^[24],不注意特别选材,所获差异较难明晰归属于细胞质还是细胞核。而本文供试的 3 例异质同核小麦雄性不育材料是经多年采用同一亲本 (A) 90-110 回交转育而成的小麦不育系,其回交世代均在 15 代以上,它们的核基因型相当一致;采用这些材料为供试材料,在雄性不育研究过程中完全可排除供试材料间因细胞核差异带来的影响,得到的差

异完全可认为是来自细胞质基因组的本质差异。本研究后续实验还将扩大到同质异核材料间的研究,这样就可以从纵横关系来探讨细胞质分子标记的方法与途径。特别是将上述特异分子标记所显示的特异条带进行克隆、测序与表达,这将为进一步发现和挖掘新的小麦细胞质雄性不育相关基因及特异分子标记提供技术支撑,同时也为更深入地研究细胞质雄性不育机理奠定坚实的基础。

4 结论

利用差速离心法和不连续蔗糖密度梯度超速离心法提取纯化的小麦线粒体,其质量和纯度能够满足 PCR 反应和遗传性分析。对 3 例异质同核的小麦雄性不育系即具粘果山羊草 *Aegilops kotschy* 不育细胞质型的 ms (Kots)-90-110 不育系、偏凸山羊草 *Ae. ventricosa* 不育细胞质型的 ms (Ven)-90-110 不育系、普通小麦变种斯卑尔脱 *Triticum spelta* 不育细胞质型的 ms(S)-90-110 不育系以及共同保持系 (A) 90-110 的 mtDNA 进行 AFLP 分析,表现出稳定的差异,筛选出的 4 对特异引物,可以用来作为鉴定这几类小麦细胞质雄性不育系的细胞质分子标记,为区分不同小麦细胞质不育系提供了一定的理论和技术支撑,也为进一步研究其不育特异性及其细胞质种性奠定了分子基础。

REFERENCES

- [1] Kempe K, Gils M. Pollination control technologies for hybrid breeding. *Mol Breeding*, 2011, 27(4): 417-437.
- [2] Zhou LL, Song GQ, He BR, et al. A ras GTPaseactivating protein-binding protein, TaG3BP, associated with the modulation of male fertility in a thermo-sensitive cytoplasmic male sterile wheat line. *Mol Genet Genomics*, 2011, 286(5-6): 417-431.
- [3] Ye JX, Zhang GS, Wang SP, et al. Differential proteomic studies on pollen grain proteins of wheat male sterile line induced by chemical hybridizing agent SQ-1. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2009, 25(10): 949-957 (in Chinese).
叶景秀, 张改生, 王书平, 等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花粉粒差异蛋白质组学研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(10): 949-957.
- [4] Wang SP, Zhang GS, Ye JX, et al. Differential proteomics analysis of floret intact chloroplasts proteins in wheat physiological male sterile line induced by CHA SQ-1 in wheat. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, 26(9): 854-861 (in Chinese).
王书平, 张改生, 叶景秀, 等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦生理型雄性不育小花完整叶绿体差异蛋白质的鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(9): 854-861.
- [5] Ye JX, Chen RH, Zhang GS, et al. Analysis on anther proteins of wheat male sterile line induced by chemical hybridizing agent SQ-1. *J Agric Biotech*, 2009, 17(5): 858-864 (in Chinese).
叶景秀, 陈蕊红, 张改生, 等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花药蛋白质组分分析. *农业生物技术学报*, 2009, 17(5): 858-864.
- [6] Li L, Wang SP, Zhang GS, et al. Comparison of floret intact chloroplast proteome in male sterile line induced by CHA SQ-1, cytoplasmic-nuclear sterile and its normal fertile lines in wheat. *Acta Agron Sin*, 2011, 37(7): 1134-1143 (in Chinese).
李莉, 王书平, 张改生, 等. 小麦生理型和遗传型雄性不育系及其保持系小花完整叶绿体蛋白质组分比较研究. *作物学报*, 2011, 37(7): 1134-1143.
- [7] Kuzmin EV, Duvick DN, Newton KJ. A mitochondrial mutator system in maize. *Plant Physiol*, 2005, 137(2): 779-789.
- [8] Li YY, Ru ZG, Su Q, et al. Identification and

- analysis of differentially expressed proteins of BNS male sterile line and its conversion line of wheat. *Acta Agron Sin*, 2011, 37(9): 1540–1550 (in Chinese).
- 李友勇, 茹振钢, 苏晴, 等. 小麦 BNS 雄性不育系及其转换系花药差异蛋白鉴定与分析. *作物学报*, 2011, 37(9): 1540–1550.
- [9] Zhang LP, Xu CG, Zhao CP, et al. Gene differential expression of photo-thermo sensitive genic male sterile line by using rice microarray. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2011, 27(8): 761–767 (in Chinese).
- 张立平, 许晨光, 赵昌平, 等. 应用水稻基因芯片分析小麦光温敏核雄性不育系的基因差异表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(8): 761–767.
- [10] Lan HY, Zhang GS, Liu HZ, et al. Comparative analysis of differential fragments of mtDNA between three isonuclear alloplasmic CMS of wheat. *J Triticeae Crops*, 2010, 30(6): 997–1000 (in Chinese).
- 兰红玉, 张改生, 刘红占, 等. 三例同核异质雄性不育小麦 mtDNA 差异片段的比较分析. *麦类作物学报*, 2010, 30(6): 997–1000.
- [11] Das S, Sen S, Chakraborty A, et al. An unedited 1.1 kb mitochondrial orfB gene transcript in the wild abortive cytoplasmic male sterility (WA-CMS) system of *Oryza sativa* L. subsp. Indica. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 39–56.
- [12] Bogdanova VS. Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(2): 333–339.
- [13] Mcdermott P, Connolly V, Kavanagh TA. The mitochondrial genome of a cytoplasmic male sterile line of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) contains an integrated linear plasmid-like element. *Theor Appl Genet*, 2008, 117(3): 459–470.
- [14] Chen RH, Ye JX, Zhang GS, et al. Differential proteomic analysis of anther proteins between cytoplasmic-nuclear male sterility line and its maintainer in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36(4): 431–440 (in Chinese).
- 陈蕊红, 叶景秀, 张改生, 等. 小麦质核互作型雄性不育系及其保持系花药差异蛋白质组学分析. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(4): 431–440.
- [15] Budar F, Touzet P, Paepe RD. The nucleo mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica*, 2003, 117(1): 3–16.
- [16] Lorenz M, Weihe A, Borner T. Cloning and sequencing of RAPD fragments amplified from mitochondrial DNA of male-sterile and male-fertile cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 1997, 94(2): 273–278.
- [17] Han YF, Zhang LY, Hu JM, et al. Editing sites in transcript of mitochondrial atp6 gene of male sterile line with *aegilops kotschyi* cytoplasm in wheat. *Acta Agron Sin*, 2010, 36(12): 2179–2184 (in Chinese).
- 韩艳芬, 张龙雨, 胡俊敏, 等. 黏类小麦细胞质雄性不育线粒体 atp6 基因转录本编辑位点. *作物学报*, 2010, 36(12): 2179–2184.
- [18] Li WQ, Zhang GS, Wang K, et al. An efficient method for isolation of mitochondrial DNA in wheat. *Hereditas*, 2007, 29(6): 771–775 (in Chinese).
- 李文强, 张改生, 汪奎, 等. 小麦线粒体 DNA 的高效提取方法. *遗传*, 2007, 29(6): 771–775.
- [19] Kuzniak E, Skłodowska M. Comparison of two methods for preparing mitochondria from tomato leaves to study the ascorbate-glutathione cycle activity. *Biologia Plantarum*, 2004, 48(4): 537–542.
- [20] Tang Q, Yao YQ, Zhang GS, et al. Establishment of the simple extraction method of wheat mitochondrial DNA. *J Triticeae Crops*, 2005, 25(6): 144–147 (in Chinese).
- 唐群, 姚雅琴, 张改生, 等. 小麦线粒体 DNA 快速提取体系的建立. *麦类作物学报*, 2005, 25(6): 144–147.
- [21] Keech O, Dizengremel P, Gardstrom P. Preparation of leaf mitochondria from *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, 2005, 124(4): 403–409.
- [22] Dewey RE, Levings CS, Timothy DH. Novel recombinations in maize mitochondrial genome produces a unique transcriptional unit in the

- Texas male sterile cytoplasm*. Cell, 1986, 44(3): 439-449.
- [23] Gao CB, Zhang GS, Lan HY, et al. Polymorphism detection and analysis of mtDNA from isonuclear and allocytoplasm wheat male sterility by RAPD. J Triticeae Crops, 2011, 31(1): 21-24 (in Chinese).
高春保, 张改生, 兰红玉, 等. 几类同核异质雄性不育小麦线粒体 DNA 的 RAPD 标记多态性. 麦类作物学报, 2011, 31(1): 21-24.
- [24] Li CY, Wang B. Mitochondrial DNAs of cytoplasmic male sterile lines of K- and V-type in wheat. Acta Phytophysiol Sin, 1998, 24(2): 153-158 (in Chinese).
李传友, 王斌. 小麦 K 型及 V 型细胞质雄性不育系线粒体的比较分析. 植物生理学报, 1998, 24(2): 153-158.

(本文责编 陈宏宇)



《生物工程学报》“工业生物技术”专刊征稿通知

目前的工业生产模式是不可持续的, 人类需要一种自然与社会环境协调的生产方式, 一种可循环、可持续发展的生产模式。应运而生的新一代工业生物技术, 将会极大地改变现有的工业格局, 有利于解决人类社会所面临的资源、能源和环境问题。发展工业生物技术将减少我国经济发展对石油资源的依赖程度, 加快我国工业产业结构的调整, 促进社会经济可持续发展, 使我国最终发展成为未来生物经济竞争中的强国。

自 2007 年起, 中国工业生物技术发展高峰论坛在天津、湖州、青岛、成都等地已成功举办六届。为传播会议成果, 促进我国工业生物技术领域的交流和发展, 《生物工程学报》曾多次与该论坛合作出版专刊, 集中反映了有关生物能源、发酵生物产品、生物基化学品、生物炼制等方面的最新研究成果, 得到了作者和同行专家的一致好评。今年将继续与“中国工业生物技术发展高峰论坛·2013”会议合作出版“工业生物技术”专刊。凡是参加高峰论坛、并至少做墙报展示的科研工作者, 有机会收到来自生物工程学报编委会的投稿邀请信, 经专家评审后, 优秀论文将在专刊上发表。

一、征文范围

本专刊收录如下研究方向的论文, 但不限于此:

合成生物学技术方法与工业合成生物学; 工业生物技术与化学工程; 工业生物技术与计算科学; 工业生物技术的新技术、新方法; 生物炼制与生物能源; 生物基化工产品与生物基材料; 大宗发酵产品; 甾体化合物与精细化学品; 工业酶制剂与工业蛋白质科学; 绿色生物工艺; 食品生物技术; 微生物资源与环境生物技术; 生物反应装备与生物过程工程技术。

二、投稿要求

1. 投稿方式: 全文投稿请通过《生物工程学报》投稿系统在线投稿, 详见主页(<http://journals.im.ac.cn/cjbcn/ch/index.aspx>)/投稿指南/投稿方式。

注意事项: 投稿时, 请在稿件标题栏注明“工业生物技术专刊”字样, 否则将以普通稿件进行处理。

2. 稿件格式: 参照《生物工程学报》论文格式, 详见主页/投稿须知/书写要求。

3. 投稿文章应未在正式出版物上发表过, 也不在其他刊物或会议的审稿过程中, 不存在一稿多投现象; 应保证投稿文章的合法性(无抄袭、剽窃、侵权等不良行为)。

三、本专刊几个关键的时间

1. 收稿截止日期: 2013 年 7 月 25 日

2. 出版日期: 2014 年 1 月 25 日

四、特别说明

1. 本专刊不是增刊, 将在 2014 年第 1 期《生物工程学报》正刊上刊出。

2. 专刊投稿文章免收审理费; 并按照《生物工程学报》相关规定收取版面费和支付作者稿酬, 同时赠送 2 本样刊。

五、联系方式

电话: 010-64807509 传真: 010-64807327 E-mail: cjb@im.ac.cn

邮寄地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号 中科院微生物研究所 B401《生物工程学报》编辑部(邮编: 100101)

专刊特邀编辑: 中国科学院天津工业生物技术研究所 朱敦明研究员和田朝光研究员

如果您还有什么问题, 欢迎随时与我们联系, 我们将在第一时间给您答复。

欢迎您的来稿!

《生物工程学报》编辑部
2013-4-18