

# 大白菜胞质雄性不育线粒体基因特异分子 RAPD 标记及克隆

冯冬林<sup>1</sup>, 陈文辉<sup>2</sup>, 林义章<sup>3</sup>, 高山<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 福建农业职业技术学院, 福建福州 350007; <sup>2</sup> 福州市蔬菜科学研究所, 福建福州 350003;

<sup>3</sup> 福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002)

**摘要:** 用随机引物对大白菜细胞质雄性不育系及其保持系线粒体 DNA 的 RAPD 分析, 在不育系与保持系的线粒体基因组间存在明显的差异, 用引物 S259 在不育系中扩增并克隆得到特异片断(mt) S259~600bp, 序列分析表明该片断与油菜线粒体基因 NADH 脱氢酶第四亚基序列有部分相似性, 片段与雄性不育的关系还需进一步研究。

**关键词:** 大白菜; 细胞质雄性不育; 线粒体 DNA; RAPD

中图分类号: S634.1 文献标识码: A

## RAPD Analysis of Mitochondrial DNA of Cytoplasmic Male Sterile Line and Its Maintainer in Chinese Cabbage

Feng Donglin<sup>1</sup>, Chen wenhui<sup>2</sup>, Lin yizhang<sup>2</sup>, Gao shan<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou 350007; <sup>2</sup>Fuzhou Institute of Vegetable Research, Fuzhou 350003;

<sup>3</sup>College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** The mitochondrial DNA of Chinese cabbage CMS line and its maintainer line were analysed by the method of random amplified polymorphic DNA using random primers. And obtained clear amplification profile. Meanwhile, some obvious differences in mitochondrial genome were detected between CMS and maintainer line. And obtained specific amplified fragment (mt)S259~600bp of CMS in mitochondria DNA, the results revealed that and there are 23bp homology between (mt)S259~600bp and rape mitochondrion gene for NADH dehydrogenase subunit 4. The relationship of this different bands in CMS to male sterility needs further study.

**Key words:** chinese cabbage, cytoplasmic male sterility(CMS), mitochondrial DNA(mtDNA), RAPD

大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 是国内栽培最广泛的大众化蔬菜之一, 推广品种几乎都是杂种一代。自交不亲和系和雄性不育系是大白菜一代杂种生产的主要途径, 二者相比, 后者具有更大的优越性。利用雄性不育系可降低亲本繁殖成本, 提高亲本繁殖产量, 同时其杂种一代杂交率可达到 100%。大白菜细胞质雄性不育是生产白菜一代杂种最经济、有效的理想系统, 已成为国内外竞争的热点<sup>[1]</sup>。细胞质雄性不育广泛存在于高等植物中, 近 20 年来, 国内外在十字花科作物上已发现了多种来源不同的细胞质雄性

不育类型, 而研究最多、利用最广泛的是 Ogu CMS(萝卜胞质不育)和 Pol CMS(波里马胞质不育)。细胞质雄性不育中其母性遗传的特点表明, 它可能同线粒体或叶绿体有关<sup>[2]</sup>。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的变异与 CMS 的发生直接相关<sup>[3-6]</sup>, 胞质雄性不育的产生是由于线粒体 DNA (mtDNA) 重组而改变表达模式以及不充分的或偏离的 RNA 编辑造成的<sup>[7,8]</sup>。

笔者以胞质雄性不育系 CMS-2 及其保持系 B-2 为材料, 对 mtDNA 进行了 RAPD 分析。试图比较大白菜细胞质雄性不育系及其保持系 mtDNA 的变异情

**基金项目:** 福建省科技厅计划项目“十字花科主要蔬菜品种选育和出口蔬菜生产加工标准化安全体系建设”(2003N022)。

**第一作者简介:** 冯冬林, 男, 1978 年出生, 助理讲师, 硕士研究生, 从事蔬菜教学及科研工作, 通信地址: 350007 福建省福州市仓山区上三路 190 号福建农业职业技术学院。E-mail: fdl\_sx@sina.com。

**收稿日期:** 2008-05-14, 修回日期: 2008-07-02。

况,为研究大白菜细胞质雄性不育性与 mtDNA 之间的关系积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为 1 对大白菜胞质雄性不育系及其保持系,即带有 Ougra 胞质的胞质雄性不育系 CMS-2 及其保持系 B-2,均由福州市蔬菜科学研究所提供。取苗期材料幼嫩叶片,用于提取线粒体 DNA。PCR 反应的随机引物和试剂等购自上海生物工程公司,其它试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 大白菜线粒体 DNA 的提取与检测 参考 Kemble R J 和李俊英<sup>[9,10]</sup>等方法,简化提取过程,用差速离心法提取 mtDNA,获得了理想的效果,提取的 DNA 在纯度、完整性上都可以满足 RAPD 的要求。提取 mtDNA 时采用新鲜材料,获得的 mtDNA 纯度高无降解。在线粒体裂解之前,加入 DNase I,可消除污染,但会降解 DNA,解决办法是用缓冲液多次洗涤去除其污染;在裂解液中加入  $\beta$ -巯基乙醇等成分,对 DNA 样品有保护作用。同时提高裂解温度,延长裂解时间,使线粒体充分裂解,释放 DNA。

通过 1%的琼脂糖凝胶电泳和 S53/54 紫外可见分光光度计检测所提取的 DNA 的质量。

1.2.2 线粒体 DNA 的 RAPD 反应 RAPD 分析采用下列反应体系:总反应体系为 25 $\mu$  L,20ng 的模板 DNA;25mmol/L 的  $Mg^{2+}$ 2.5 $\mu$ L;2.5mmol/L dNTPs1 $\mu$ L;10 $\mu$ mol/L 随机引物 1 $\mu$ L;2.5U TaqDNA 聚合酶;10 $\times$  buffer 2.5 $\mu$ L;H<sub>2</sub>O 12.5 $\mu$ L。反应循环条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3min,然后执行 94 $^{\circ}$ C 1min,37 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5min。RAPD 反应在 GeneAmp PCR System 2700 仪器上自动循环。扩增产物用 1.2%

琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 扩增产物的克隆与 DNA 序列测定 凝胶回收试剂盒购于 Sigma 公司,pMD18-T Vector 载体购于宝生物工程公司,感受态细胞购于天为时代公司。经蓝白斑筛选,双酶切、电泳检测,将阳性克隆交由上海生物工程有限公司测序。

采用 80 个 10bp 随机引物对大白菜雄性不育 CMS 及其保持系线粒体 DNA (mtDNA)进行了 RAPD 分析,筛选出稳定的不育系和保持系线粒体基因组的特异条带。采用低熔点琼脂糖法回收 RAPD 扩增产物中的特异片段,回收产物用 pMD 18-T Vector 载体连接,转化 E.coli DH5 $\alpha$  菌,用 X-gal 和 IPTG 筛选重组子,并进行酶切鉴定。

将培养的菌落(经筛选确认含有所需的片段)穿刺培养于 1.5ml 的离心管中,将鉴定的连接有目的片段的菌液送至上海博亚公司进行测序。

1.2.4 特异片段序列分析 将测序的核苷酸序列在 NCBI 网上应用 BLAST 程序进行同源性检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞质雄性不育线粒体 DNA(mtDNA)提取质量检测

试验提取的 CMS-2 和 B-2 的 mtDNA 经紫外检测,测定其在 230nm、260nm 和 280nm 处的紫外吸收值,OD260/OD280 值在 1.7~1.9 之间,OD260/OD230>2.0,符合 RAPD 分析的要求。

### 2.2 RAPD 扩增结果

用 80 个随机引物(表 1),其中 12 个引物未获得扩增片断,其余 68 个引物有扩增,共扩增出 368 条带,平均每条引物可以扩增出 5 条谱带,条带介于 200~3000bp 之间(图 1)。

表 1 随机引物序列

引物代号	序列	引物代号	序列	引物代号	序列
S31	GAATCGCCGT	S149	CTTACCCGA	S392	GGCGGTACT
S32	TCGGCGATAG	S153	CCCGATTGG	S393	ACCGCTGCT
S35	TTCCGAACCC	S155	ACGCACAACC	S397	AGCCTGAGCC
S39	CAAACGTCGG	S156	GGTACTGTG	S410	TCTGGCGCAC
S40	GTTGCGATCC	S184	CACCCCTTG	S412	GGGACGTTGG
S46	ACCTGAACGG	S185	TTGGGGCCT	S414	AGGGTCGTTC
S50	GGTCTACACC	S191	AGTCGGGTGG	S415	GACCTACCAC
S51	AGCGCCATTG	S193	GTCGTTCTG	S418	CACCATCCGT
S52	CACCGTATCC	S196	AGGGGGTTCC	S420	AGGTCTTGGG
S60	ACCCGGTCAC	S232	ACCCCCACT	S423	GGTACTCCCC
S62	GTGAGGCGTC	S233	ACCCCTGAA	S425	ACTGAACGCC
S67	GTCCCGACGA	S240	CAGCATGGTC	S462	TCGGCACGCA

(续表 1)

引物代号	序列	引物代号	序列	引物代号	序列
S68	TGGACCGGTG	S250	ACCTCGGCAC	S464	GTGTCTCAGG
S71	AAAGCTGCGG	S257	ACCTGGGGAG	S466	GTGGGCTGAC
S76	CACACTCCAG	S259	GTCAGTGCGG	S468	ACATCGCCCA
S81	CTACGGAGGA	S271	CTGATGCGTG	S469	GTGGTCCGCA
S82	GGCACTGAGG	S272	TGGGCAGAAG	S472	AAGGGCGAGT
S83	GAGCCCTCCA	S273	CACAGCGACA	S473	GGAGTGCCTC
S84	AGCGTGTCTG	S274	CTGCTGAGCA	S475	GGAAGCCAAC
S85	CTGAGACGGA	S279	CAAAGCGCTC	S476	CCAAGCTGCC
S86	GTGCTAACC	S280	TGTGGCAGCA	S477	TGACCCGCCT
S87	GAACCTGCGG	S291	AGACGATGGG	S479	GGGAAGGACA
S89	CTGACGTCAC	S294	GGTCGATCTG	S480	GACCCTAGTC
S91	TGCCCGTCGT	S362	GTCTCCGCAA	S481	GGGACGATGG
S95	ACTGGGACTC	S381	GGCATGACCT	S490	TGTGCCCGAA
S112	ACGCGCATGT	S388	AGCAGGTGGA	S89-G	GGTGCAGAAA
S144	GTGACATGCC	S391	ACGATGAGCC		

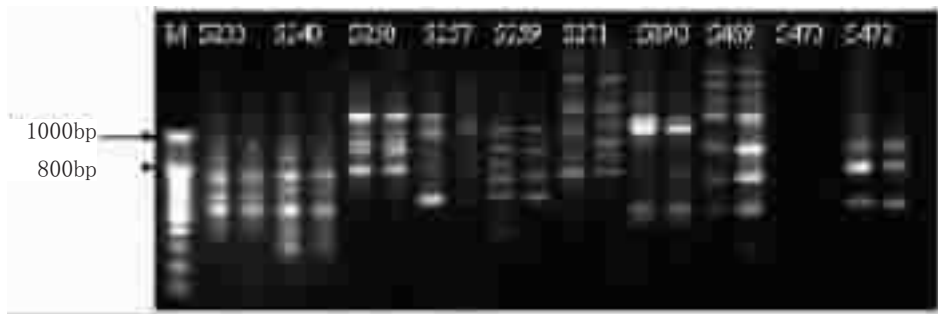


图 1 大白菜线粒体 DNA(mt)DNA 的 RAPD 分析

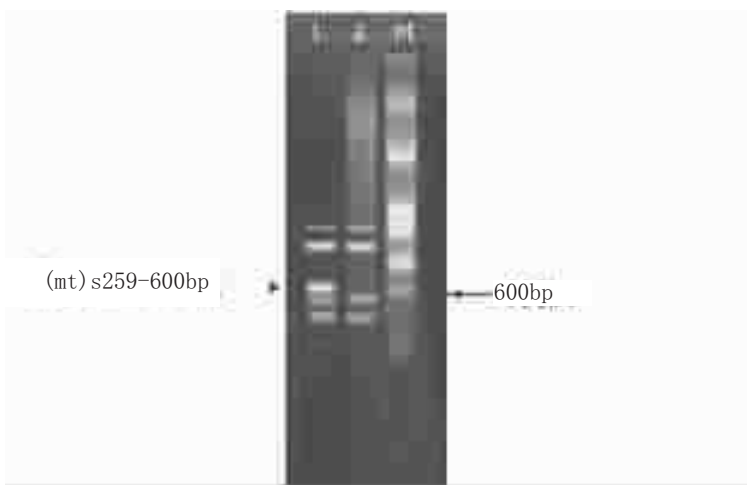


图 2 引物 S259 扩增的 RAPD 图

1: 不育系, 2: 保持系, M: Marker



图 3 RAPD 扩增特异片段及重组质粒图

A: (mt)S259-600bp 片段, B: EcoRI + HindIII 双酶切重组质粒, C: 重组质粒

2.3 不育系和保持系线粒体基因组的特异条带

用引物 S259 扩增时 CMS-2 比 B-2 多一条分子量约为 600bp 的扩增片断(图 2), 这一片断为不育系特有, 记为(mt)S259~600bp。

2.4 特异片断的克隆

特异片段(mt)S259~600bp 经过电泳, 在紫外灯下

回收后重组进 pMD 18-T Vector, 经 LB 液体培养提取重组质粒。EcoRI+HindIII 双酶切验证, 其中一条带与 RAPD 扩增所获得的特异片断电泳距离相近, 表明特异片段克隆成功(图 3)。

2.5 特异片断的序列分析

特异片断(mt)S259~600bp 序列如下:

1 GTCAGTGCGG TTATCATCAA TATTCTTCTG GGTTCTCTAT CGCTGACTGT TTCTTCGCC  
 61 TCTCGAAGAG CTGTGTTAAC CGTCCAGCGT CATAGTCATC GTTGCTCGTG TTCGGAGATG  
 121 ATGGGCAGGG ATCGTATTCA TGTGGTCCGG GAGAGATTTC CGCTCCCTTA GACTCTCGAG  
 181 AACCAAAACA TTTCGCTCTC CGACTGTGGA TACCTCAGAG CCTTCTGTTA CTGGACTTTG  
 241 TGATTGGAAG AAGAGAGGAG GGAATGGCTG TTATGTGGAG AGCTTATATA  
 GGAGATGGCC  
 301 ACGGCTTGTG CTGACCGACA ACATGATGCT TAGTAATAGT AATATTCTTT TACTGAACTG  
 361 AAGTATGTTT TTTGTGTGGA TTTTATTTTA AAATTGTTGC GTACTATCTT TGCGAATCCG  
 421 CGCTATATAT TTGTTCATGT CTAACGAAAA AAGTTGTTAG GTTAGCCTCA GTTTCGCGCC  
 481 TGTAAGACGC ATTGCAGTTA TTATTGTAAC TTTGACTTGA TTTCTGTAA TATAGTTAGT  
 541 CCGTTTAGCA GCGGCGAGCG GCCTCAGCAT CCTCCTTATC TACTACACAT CCTCGGGCTC  
 601 CCATGATACG ACTGGAGGCG CTGCGGTCGG GCCGCCGCAC TGAC

该片断总共有 644 个碱基,各个碱基数为:A:140 个;C:139 个;G:159 个;T:206 个;A:21.7%;C:21.6%;G:24.7%;T:32.0%;A+T=53.7%,G+C=46.3%。

采用 Blastn 进行核苷酸同源序列比较,结果显示,在 GeneBank 中有 57 条 DNA 序列和(mt)S259~600bp 序列有部分的同源性,但同源性位点片断大小在 20~23bp 之间,(mt)S259~600bp 与油菜线粒体基因 NADH 脱氢酶第四亚基序列有 23bp 完全同源。

### 2.6 标记的 SCAR 转换

将差异片段克隆测序后,根据目的片段的测序结果,在两端设计新的引物:

Primer1:5'-TTCTGGGTTCTCTATCGC-3'

Primer2:5'-CCCAGGATGTGTAGTAG-3'

所设计的 SCAR 引物的基本情况(表 2)。

表 2 SCAR 扩增引物

名称	所在位置	长度/mers	T <sub>m</sub> /°C	GC/%
Primer1	26-43	18	52.1	50
Primer2	597-615	18	52.0	55.6

根据目的片断(mt)S259~600bp 对不育系和保持系单株进行 SCAR 转化分析,分别从不育系部分单株中扩增出了特异条带,大小与目的片段基本一致,而保持系单株则均没有扩增出相应的特异条带(图 4)。

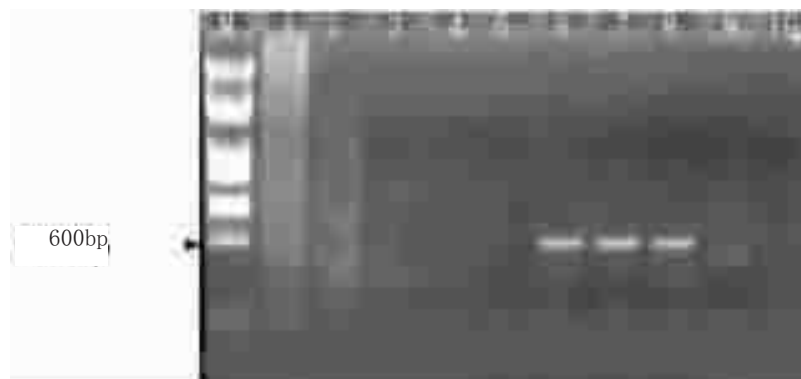


图 4 不育系和保持系单株扩增片断(mt)S259~600bp

1-5: 保持系单株,6-10: 不育系单株

### 3 讨论

植物胞质雄性不育性被认为是由线粒体 DNA 分子突变和重组产生新的功能区(嵌合基因)造成的<sup>[11,12]</sup>,因此,通过 RAPD 技术所揭示的不育系与保持系间的差异,就有可能与新的功能区(如育性相关基因)有关。

对大白菜材料 CMS-2、B-2 线粒体 DNA 的 RAPD 分析表明,不育系与保持系间有些引物未扩增出多态性片段,这反映了不育系和保持系线粒体的同源性。同

时,在不育系与保持系的线粒体基因组间也发现了明显的差异。

用 80 个随机引物对胞质雄性不育系和保持系的线粒体 DNA 进行扩增,从不育系中找到并克隆了 1 条特异片段,标记为 (mt)S259~600bp,进行了测序,Blastn 表明,(mt)S259~600bp 与油菜线粒体基因 NADH 脱氢酶第四亚基序列有 23bp 完全同源。

NADH 脱氢酶是电子呼吸链磷酸化产生 ATP 中

的一个重要的酶。线粒体的电子呼吸链若受损害,会使得 ATP 能量供应不足,进而导致不育<sup>[13]</sup>。而克隆到的片段 (mt)S259~600bp 与 NADH 脱氢酶的第四亚基有着极高的同源性这一点可以看出,它在细胞质雄性不育的产生中所起的作用。可能不育系多出了该片段导致线粒体功能受损,供应能量不足,以此影响到花粉发育,因为花粉发育过程中所需的能量是巨大的。

### 参考文献

- [1] 张德双,张风兰,王永健,等.大白菜 CMS96 细胞质雄性不育分子特性研究[J].分子植物育种,2006,4(4):545-552.
- [2] Ling XY. Advances in molecular mechanism of plant cytoplasmic male sterility[J]. Chin Bull Bot,2000,17(4):319-332.
- [3] Schnables PS, Wise RP. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration[J]. Trends Plant Sci,1999,3:175-180.
- [4] Zhang ZX, Zhang FD, Zheng YL. Advances of molecular biology in maize CMS[J]. Heredity (遗传),2002,24(5):601-606.
- [5] Yang JB, ang XF, hao CS, et al. Cloning and sequencing of fragment associated with cytoplasm male sterility of rice [J]. Acta Gene Sin, 2002,29(9):808-813.
- [6] Hanson MR, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J]. Plant Cell, 2004,16:154-169.
- [7] A bad A R, M ehmens B J, M achenzie S A. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility associated protein in CMS bean[J]. The plant cell,1995,7:271-285.
- [8] Levings C S. Molecular biology of plant mitochondria [J]. Cell,1989, 56:171-179.
- [9] Kemble R J, Gunn R E, Flarell R B. Classification of normal and male sterile cytoplasm in maize I electrophoretic analysis of DNA species in mitochondria[J]. Genetics,1980,95:451-458.
- [10] 李俊英,闻颖达,蒋嫦英,等.一种简便快捷的植物线粒体质粒 DNA 的提取方法[J].南开大学学报,2000(4):49-52.
- [11] Hanson M R, Folkerts O. Structure and function of higher plant mitochondrial genome. In: Mitochondrial Genomes [C]. Academic Press, Inc. 1992,141:129-172.
- [12] Iwahashi M, Kyoizuka J, Shimamoto K. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial atp6 RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice[J]. EMBO J,1993,12(4):1437-1446.
- [13] Arora J, Nath, P Sane PV. Translocation of adenine nucleotides in the mitochondria of male sterile and male fertile sorghum [J]. Z Naturforsch,1993,48(9-10):795-798.