

辣椒细胞质雄性不育系和保持系线粒体 DNA 差异的 SRAP 分析

袁 稳^{1 2}, 吴国平^{1 2}, 王述彬², 刁卫平², 刘金兵², 潘宝贵², 戈 伟²

(1. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 以辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其保持系 21B 的线粒体 DNA 为材料进行 SRAP 分析, 结果表明, 从 128 对引物扩增获得了 1 440 条 100~1 000 bp 的条带, 多态性位点仅有 9 个, 占 0.63%, 其中 7 条多态性条带位于 21A 中; 对多态性条带回收、克隆和测序分析后发现 9 个克隆在 GenBank 中找到了相似的功能, 绝大部分与能量代谢有关; 利用 21A 中的多态性序列特点设计 SCAR 引物, 对 21A 和 21B 的基因组 DNA 进行扩增验证, 3 对引物在 21A 中扩增出目的条带, 表明已成功地将 SRAP 标记转化为 SCAR 标记, 是新发现的与辣椒细胞质雄性不育基因相关的片段。

关键词: 辣椒; 细胞质雄性不育; 线粒体 DNA; SRAP

中图分类号: S641.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)06-0062-05

Mitochondrial DNA Difference Analysis between CMS and Its Maintainer Line of Pepper through SRAP

YUAN Wen^{1 2}, WU Guo-ping^{1 2}, WANG Shu-bin², DIAO Wei-ping²,
LIU Jin-bing², PAN Bao-gui², GE Wei²

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) was analyzed between mitochondrial DNA of cytoplasm male sterility line 21A and its maintainer line 21B of pepper. The analysis showed that a total of 1 440 amplified fragments and nine polymorphic fragments between 100–1 000 bp were detected by applying 128 SRAP primer combinations; the polymorphic fragment percentage was 0.63%; seven of the polymorphic fragments was detected in male sterility line 21A. The polymorphic fragments were isolated, cloned and sequenced, blast of the 9 clones in GenBank showed that it all have homologous with energy metabolism genes. According to the sequences, three specific primers were designed to transform the SRAP marker to more stable SCAR markers, and they only detected in the 21A line, this suggested that the newly detected fragments related to cytoplasm male sterility.

Key words: Pepper; CMS; Mitochondrial DNA; SRAP

辣椒(*Capsicum* spp.)是我国第二大蔬菜作物, 作为常异花授粉作物, 具有很强的杂种优势, 优良的杂交组合比传统常规品种可增产 30%~50%^[1]。目前, 生产上主要靠人工去雄杂交制种, 生产成本低, 种子纯度也不能保障, 利用辣椒细胞质雄性不育系育种是解决这一难题的有效途径之一^[2-3], 韩国等国家已普遍利用辣椒细胞质雄性不育系进行杂交种生产。围绕辣椒胞质雄性不育国内外已进行了大

量研究, 并获得了与胞质雄性不育性相关的分子标记和基因^[4-7]。然而, 由于雄性不育性状涉及到多个生殖器官发育的时空调控过程, 生物学过程较为复杂, 不育性状和不育基因的多样性, 使得有关辣椒胞质雄性不育性状的产生及不育机理仍不明确。

SRAP 是一种基于 PCR 的新型分子标记技术, 与传统分子标记相比, 具有简便、稳定、多态性高、易于测序和引物通用等优点, 目前已被广泛应用于遗

收稿日期: 2012-08-12

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系淮安综合试验站项目(CARS-25-G-14); 江苏省自然科学基金项目(BK2010464); 国家科技支撑计划(2012BAD02B02); 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(11)1004)

作者简介: 袁 稳(1988-), 女, 山东菏泽人, 在读硕士, 主要从事辣椒遗传育种研究。

通讯作者: 王述彬(1963-), 男, 江苏姜堰人, 研究员, 博士, 主要从事辣椒育种研究。

传多样性分析、遗传图谱构建、基因定位与克隆等研究。目前,利用 SRAP 标记已在白菜^[5]、青花菜^[8]等作物上找到了与细胞质雄性不育性状相关的分子标记和基因。但 SRAP 在辣椒上的应用,国内多集中在种子纯度鉴定^[9-10]及种质资源的亲缘关系分析上^[11-13],尚未见利用 SRAP 标记对辣椒细胞质雄性不育基因相关片段分离研究的报道。

大量研究结果表明,线粒体基因组与 CMS 直接相关,植物细胞质雄性不育是由线粒体基因突变、嵌合、不完全编辑、重组等原因产生新的功能区造成的^[14-17]。为了更好地利用辣椒胞质雄性不育进行杂种优势育种,进一步阐述辣椒细胞质雄性不育的相关机理,本研究以辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其相应的保持系 21B 为材料,采用 SRAP 分子标记技术分析不育系和保持系线粒体 DNA 差异,试图获得与 CMS 相关的基因差异片段,为进一步克隆与辣椒细胞质雄性不育相关的基因奠定基础。

表 1 SRAP 引物序列

Tab. 1 The primer sequences used in SRAP reaction

编号 Coding No.	正向引物 The forward primer	编号 Coding No.	反向引物 The reverse primer
me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
me6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
me7	5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	em7	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'
me8	5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	em8	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'
		em9	5'-GACTGCGTACGAATTCCA-3'
		em10	5'-GACTGCGTACGAATTCCG-3'
		em11	5'-GACTGCGTACGAATTCCA-3'
		em12	5'-GACTGCGTACGAATTATT-3'
		em13	5'-GACTGCGTACGAATTACG-3'
		em14	5'-GACTGCGTACGAATTATG-3'
		em15	5'-GACTGCGTACGAATTCCG-3'
		em16	5'-GACTGCGTACGAATTGAT-3'

20 μ L PCR 反应体系: dNTPs 0.15 mmol/L; $MgCl_2$ 1.5 mmol/L; 10 \times PCR Buffer 2 μ L; 正、反向引物 0.5 μ mol/L; DNA (30 ng/ μ L) 1 μ L; *Taq* 酶 1 U; ddH_2O 补足至 20 μ L。

SRAP 程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 35 $^{\circ}C$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 50 $^{\circ}C$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}C$ 保存。

检测: 扩增产物在 6% 变性 PAGE 凝胶上分离, 银染法显带。

1.4 扩增产物回收、克隆、测序

用手术刀将聚丙烯酰胺凝胶板多态性条带切

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究所用材料为由法国不育源 LEANS 经过多代回交转育而成的稳定的羊角形辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其相应的保持系 21B, 由江苏省农业科学院蔬菜研究所辣椒课题组提供。

1.2 线粒体 DNA 提取与基因池的建立

辣椒线粒体 DNA 的提取及纯化主要参考 Kemble^[18]的方法, 并加以改进。对不育系 21A 和保持系 21B 的黄花苗取样, 分别构建不育池和可育池进行 SRAP 分析, 筛选两池间的多态性, 以获得有多态性的引物组合。

1.3 SRAP 分析

参照 Li^[19]的方法进行 SRAP 引物设计和标记分析, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 引物及序列见表 1。

下转到 0.5 mL 离心管中, 加入 100 μ L ddH_2O , 沸水浴 10 min 提取凝胶中的 mtDNA, 稍加离心取上清作模板进行二次 PCR 扩增, PCR 引物组合和反应条件与原 PCR 完全相同。

产物经纯化后连接于 pGEM-Teasy 载体 (Promega) 上, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}C$ 培养 16~20 h 后, 蓝白斑筛选, 挑取白色单克隆, 在含有 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养过夜, PCR 鉴定阳性克隆。

将鉴定的阳性克隆菌液送往上海英骏生物技术有限公司测序, 利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件对测序结果进行分析, 比较其同源性。

2 结果与分析

2.1 SRAP 分析

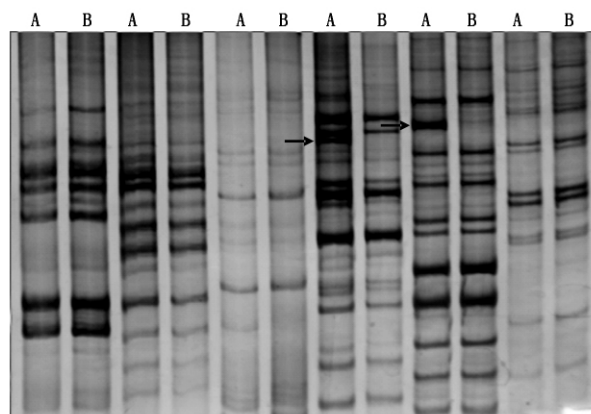
128 对 SRAP 引物组合对辣椒细胞质雄性不育系 21A 及保持系 21B 的线粒体 DNA 进行扩增,共扩增获得了 1 440 条 100 ~ 1 000 bp 的条带,平均每对引物组合可扩增出 15 条清晰的条带(图 1)。引物组合不同,扩增出的条带数变化较大,最多的条带达 30 条,而最少的仅为 11 条。大部分引物组合在两系间的扩增图谱相同,反映了两系间具有基本相同的线粒体 DNA 序列。

在总扩增条带中,多态性位点仅有 9 个,占总条带的 0.63%。128 对引物组合中仅有 5 对引物检测出多态性,以 21B 条带缺失为主,共有 7 个,而在 21A 中缺失的条带仅有 2 个(图 1)。经 3 次重复,多态性条带稳定存在。

2.2 特异片段测序和序列分析

对上述获得的多态性条带进行纯化、克隆和测序,Blastx 同源性比较分析表明,这些序列大多数与能量代谢有关(表 2)。其中,片段 $M_2E_{15}-5-5$ 、 M_3E_8-5-6 和 $M_5E_{13}-6-9$ 与 ATP 酶复合体相关,而片

段 $M_7E_{11}-7-2$ 和 $M_7E_{12}-9-2$ 则与 NADH 脱氢酶复合酶相关。分析结果表明,辣椒细胞质雄性不育系 21A 不育性的产生可能是由于线粒体基因组发生高度重排继而产生新的开放阅读框,导致线粒体功能发生紊乱,致使小孢子发育过程中能量供应不足。



A. 不育系 21A; B. 保持系 21B; 箭头所示为多态性条带。
A. CMS line 21A; B. Maintainer line 21B;
Arrows showed polymorphism lines.

图 1 辣椒细胞质雄性不育系及保持系线粒体 DNA 的 SRAP 扩增条带

Fig.1 Bands of the CMS line and their maintainer amplified by SRAP in pepper

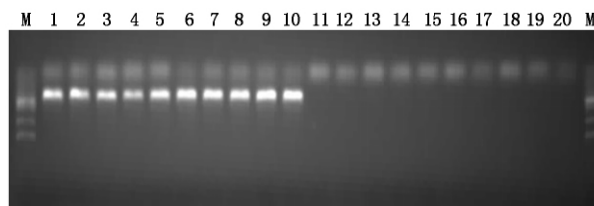
表 2 SRAP 分离到的辣椒细胞质雄性不育系及保持系线粒体 DNA 差异片段的序列分析

Tab.2 Sequence analyses of different fragments in mtDNA of CMS and their maintainer line in pepper by SRAP

差异片段 Clone (Accession No.)	长度/bp Length	同源基因 Homolog gene	物种来源 Organism	相似值(%) /相对概率 Identify /E-value
$M_2E_{15}-5-5$	441	Atpase gene (b and e subunits) K00507.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	95% /5e-179
M_3E_8-5-6	578	ATP synthase beta subunit (atpB) gene DQ131742.1	<i>Hymenodictyon floribundum</i>	92% /0.0
$M_3E_{11}-6-1$	375	male-sterile G mitochondrion FP885871.1	<i>Beta vulgaris</i>	93% /6e-146
$M_5E_{13}-6-9$	483	ATPase gene ABD16780.1	<i>Eucalyptus cinerea</i>	95% /4e-91
$M_7E_{11}-7-2$	394	NADH dehydrogenase (nad1) gene M30176.1	<i>Vicia faba</i>	91% /2e-139
$M_7E_{12}-9-2$	285	NADH dehydrogenase subunit 4YP514903.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	97% /2e-47
$M_7E_{16}-11-8$	881	Cell wall-associated hydrolaseXP003637074.1	<i>Medicago truncatula</i>	70% /3e-80
M_8E_8-7-7	391	Orf448 (mitochondrion) YP004927571.1	<i>Brassica carinata</i>	39% /1e-06
$M_8E_{11}-1-4$	202	<i>Capsicum annuum</i> clone JF330776.1	<i>Capsicum</i>	75% /1e-04

2.3 SRAP 标记转化为 SCAR 标记

根据目的片段($M_2E_{15}-5-5$ 、 M_3E_8-5-6 、 $M_7E_{12}-9-2$)测序结果,分别设计特异引物,在不育系和保持系单株基因组 DNA 中进行扩增,结果设计的 3 对引物均在不育单株中稳定扩增出一条特异条带。图 2 所示为根据片段 $M_7E_{12}-9-2$ 设计 SCAR 引物的扩增结果,扩增片段大小约 400 bp,与设计结果一致,而保持系单株中均没有扩增出相应的条带,表明已成功将 SRAP 标记转化为 SCAR 标记。



M. DL1000 Marker; 1 ~ 10. 不育系; 11 ~ 20. 保持系。
M. DL1000 Marker; 1 ~ 10. CMS line; 11 ~ 20. Maintainer line.

图 2 SCAR 引物在不育系和保持系中的扩增

Fig.2 The amplified profile by SCAR primer in sterile line and maintainer line

3 讨论

关于细胞质雄性不育的作用机理,国内外开展了广泛研究。通常认为,植物 CMS 的发生与线粒体有密切关系。线粒体基因组分子内或分子间频繁地重组是 CMS 产生的分子基础^[20-22]。随着分子生物学理论和技术的不断发展,已在多种植物的细胞质基因组中克隆到与 CMS 相关的基因片段,使人们对 CMS 的分子机制有了更深入的认识。玉米、水稻、白菜等多种材料的 CMS 研究表明,线粒体 DNA 结构、转录及翻译水平的变异均可引起植物的雄性不育,高度的基因重组和外源基因整合使他们的线粒体 DNA 具有很高程度的多态性,分析特异片段的序列特征表明,与 CMS 有关的基因或片段均位于线粒体基因组中^[15,17,21,23]。

关于植物线粒体 DNA 导致 CMS 的机理,有观点认为,线粒体基因组中与能量代谢相关的基因表达异常,影响呼吸链和正常的电子传递,影响线粒体的正常生理功能,从而导致花粉的败育^[24-25]。本研究通过对不育系和保持系线粒体 DNA 的 SRAP 分析,获得了 CMS 相关的 9 个特异片段。检索发现,差异片段碱基序列与多种作物的 ATPase 亚基基因、NADH 脱氢酶基因具有较高的同源性,ATP 是生命活动能量的直接来源,线粒体 ATP 合成异常影响花粉的发育,导致雄性不育的产生。最新的研究发现,与呼吸相关的 NADH 脱氢酶的表达也与 CMS 相关^[26-27],表明辣椒 CMS 与线粒体 DNA 相关。虽然本研究发现的差异片段与辣椒 CMS 的产生存在一定关系,但测序片段在辣椒细胞质雄性不育系 21A 花粉败育中的作用,以及线粒体控制不育基因的表达机理还需要更进一步地探索研究。

与玉米和水稻等作物的雄性不育机理研究相比,不同学者虽然在辣椒 CMS 的分子生物学研究方面进行了大量、积极的探索,但辣椒细胞质雄性不育性状相关的序列片段报道仍较少,辣椒雄性不育的基础研究还十分薄弱,离全面认识辣椒雄性不育的机理相距甚远,有待于更广泛而深入地研究。

参考文献:

- [1] 王述彬,罗向东,戴亮芳,等. 辣椒细胞质雄性不育系与其保持系线粒体 DNA 的 RAPD 分析[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(1): 44-47.
- [2] Jo Y D, Jeong H J, Kang B C. Development of a CMS-specific marker based on chloroplast-derived mitochondrial sequence in pepper[J]. Plant Biotechnol Rep, 2009, 3: 309-315.
- [3] 刘科伟,王述彬,刘金兵,等. 辣椒细胞质雄性不育基因的 AFLP 分析[J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 736-742.
- [4] Kim D H, Kang J G, Kim B D. Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility associated *orf456* gene of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Plant Mol Biol, 2007, 63: 519-532.
- [5] 王永飞,马三梅,张鲁刚,等. 大白菜细胞质雄性不育系和其保持系的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 2003, 23(4): 554-560.
- [6] 邓晓辉,张蜀宁,侯喜林. 白菜 Pol 胞质雄性不育系和保持系蕾期基因表达差异的 SRAP 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 655-658.
- [7] 冒维维,高红胜,薄天岳,等. 菜薹雄性不育相关基因的 ISSR 分子标记筛选[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 40-44.
- [8] 姚雪琴,李媛,谢祝捷,等. 青花菜胞质不育相关基因的 SRAP 标记筛选[J]. 分子植物育种, 2009, 5: 941-947.
- [9] 李亚利,扈新民,赵丹,等. 运用 SRAP 分子标记鉴定辣椒杂交种纯度[J]. 中国农学通报, 2010, 26(24): 67-70.
- [10] 张素勤,耿广东,周贤婷,等. 贵州辣椒种质资源的表型和 SRAP 分析[J]. 山地农业生物学报, 2008, 27(3): 228-232.
- [11] 许先松,刘志钦,林晓丹,等. 基于形态及 SRAP 标记的辣椒资源遗传多态性及亲缘关系比较[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(1): 48-53.
- [12] 陈学军,方荣,周坤华,等. 辣椒中间杂种的表型鉴定及 SRAP 分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(2): 286-290.
- [13] 任羽,张银东,尹俊梅,等. 应用 SRAP 分子标记评价辣椒自交系的遗传关系[J]. 热带作物学报, 2008, 29(1): 28-52.
- [14] Kohler R H, Horn R, Lossel A, et al. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene [J]. Mol Gen Genet, 1991, 227(3): 369-376.
- [15] Akagi H, Sakamoto M, Shinjyo C, et al. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility [J]. Theor Appl Genet, 1994, 25: 52-58.
- [16] Singh M, Brown G G. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region [J]. The Plant Cell, 1991, 3(12): 1349-1362.
- [17] Singh M, Brown G G. Characterization of expression of a mitochondrial gene region associated with the brassica "polima" CMS developmental influences [J]. Curr Genet, 1993, 24(4): 316-322.

- [18] Kemble R J. A rapid ,single leaf ,nucleic acid assay for determining the cytoplasmic organelle complement of rapeseed and related *Brassica* species [J]. Theor Appl Genet ,1987 ,73: 364 – 370.
- [19] Li G ,Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. [J]. Theor Appl Genet ,2001 ,103: 455 – 461.
- [20] Folkerts O ,Hanson M R. Three copies of a single recombination repeat occur on the 443kb master circle of the petunia hybrida 3704 mitochondrial DNA genome [J]. Nucleic Acids Res ,1989 ,17: 7345 – 7357.
- [21] Dewey R E ,Levings C S ,Timothy D H. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm [J]. Cell ,1986 ,44: 439 – 449.
- [22] Young E G ,Hanson M R ,Dierks P M. Sequence and transcription analysis of the Petunia mitochondrial gene for the ATP synthesis proteolipid subunit [J]. Nucleic Acids Res ,1986 ,14: 7995 – 8006.
- [23] Bonhomme S ,Budar F ,Lancelin D ,et al. Sequence and transcript analysis of the *Nco2.5* Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* hybrids [J]. Mol Gel Genet ,1992 ,235: 340 – 348.
- [24] Mackenzie S ,McIntosh L. Higher plant mitochondria [J]. Plant Cell ,1999 ,11: 571 – 585.
- [25] L'Homme Y ,Brown G G. Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus [J]. Nucleic Acids Research ,1993 ,21(8) : 1903 – 1909.
- [26] Brown G G ,Domaj M ,Du Pauw M ,et al. Molecular analysis of *Brassica* CMS and its application to hybrid seed production [J]. Acta Horticulturae ,1998 ,459: 265 – 274.
- [27] Yang J H ,Zhang M F ,Yu J Q. Mitochondrial *nad2* gene is co-transcribed with CMS-associated *orfB* gene in cytoplasmic male-sterile stem mustard (*Brassica juncea*) [J]. Mol Bio Rep ,2009 ,36(2) : 345 – 351.