

小麦耐盐突变体线粒体 DNA 的 RAPD 分析

王宏英, 黄占景, 仇艳光, 沈银柱

(河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016)

摘要: 利用 RAPD 技术分析了小麦耐盐突变体 RH8706-49、其母本濮农 3665 以及与 49 同为“一粒传”后代的敏盐材料 H8706-34 的线粒体 DNA, 发现三个材料的线粒体 DNA 存在有明显的差异, 初步认为这些差异可能与突变体 49 耐盐性的增强相关, 回收克隆了突变体 49 线粒体 DNA 的特异扩增产物, 为进一步的研究打下了基础。

关键词: 小麦; 耐盐突变体; 线粒体 DNA; RAPD

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0001-04

RAPD Analysis of Wheat Salt-tolerant Mutant mtDNA

WANG Hong-ying, HUANG Zhan-jing, QIU Yan-guang, SHEN Yin-zhu

(College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: The mtDNA of wheat salt-tolerant mutant RH8706-49, its female parent-Punong 3665 and salt-sensitive material H8706-34 were studied by RAPD. There are differences among the three materials. It suggested that the difference might be related to the increase the salt-tolerance of the mutant 49. The special amplified products of mutant 49 mtDNA were cloned.

Key words: wheat; Salt-tolerant mutant; mtDNA; RAPD

河北师范大学遗传实验室通过 EMS 诱变和耐盐性的反复筛选, 获得了由“一粒传”后代得到的一系列的耐盐性存在有明显差异的材料^[1]。将其中的耐盐性较好的 RH8706-49 与另一个耐盐性差的材料 86-5094 进行连续两年正反交试验, 结果表明, F₁ 各生育期耐盐指数均高于不耐盐亲本, 以耐盐亲本为母本的组合 F₁ 的耐盐指数高于反交组合, 表明该材料的耐盐性遗传不仅受核基因的控制, 而且与细胞质因子也有一定的关系。

RAPD 方法是 Williams 等^[2]提出的, 现在已被广泛应用于遗传图谱的构建、基因定位、基因诊断、分子进化与分类、植物抗病性以及植物质量性状或数量性状的标记等研究领域中^[3~7]。

1 材料和方法

1.1 材料

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 耐盐突变体 RH8706-

49、敏盐材料 H8706-34 是反复筛选得到的同一单粒的后代^[1], 并稳定遗传 12 代。RH8706-49 耐盐指数 ≥ 1.3 (耐盐级别为 1 级), H8706-34 耐盐指数 ≤ 0.5 (耐盐级别为 4 级)。

1.2 方法

1.2.1 小麦线粒体 DNA 的提取 参考内宫博文等^[3]的方法。

1.2.2 RAPD 扩增及产物的检测 所用的随机引物为 Opron 公司的试剂盒。在 20 μ L 反应体系中, 10 \times Buffer 2 μ L; 1.5 mmol/L MgCl₂; dNTP 各 0.1 mmol/L; 0.8 μ mol/ μ L 引物 1 μ L; 1 U Taq DNA 聚合酶; 60 ng 模板 DNA。PCR 反应在 PTC-100™ (Programmable Thermal Controller) 扩增仪上进行。扩增程序为: 94℃ 预变性 1.5 min, 94℃ 变性 45 s, 36℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 40 个循环, 然后 72℃ 补平 10 min, PCR 产物保存于 4℃。

扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳后, 于 EB

收稿日期: 2002-07-04

基金项目: 国家自然科学基金(30070471); 河北省自然科学基金(301103)

作者简介: 王宏英(1977-), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学方面的研究工作, 沈银柱为通讯作者。

溶液(浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中染色 30 min, 蒸馏水脱色 10 min, 观察并拍照。

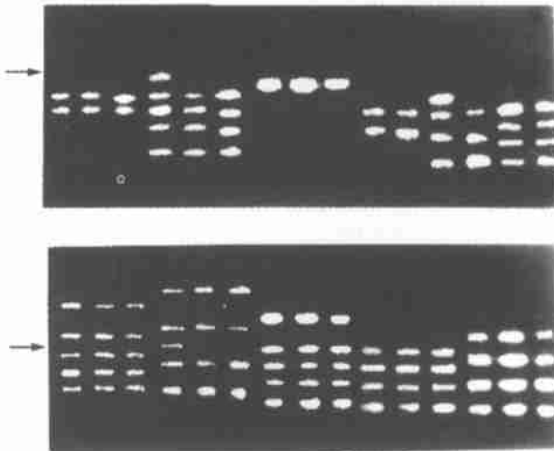
1.2.3 特异扩增产物的回收、克隆及鉴定 采用低熔点琼脂糖挖块回收法回收 RH8706-49 中的特异扩增产物, 使用 pGEM^{hL} -Tvector 连接回收产物, 利用蓝白斑筛选的方法鉴定重组子, 提取质粒进行酶切鉴定。

1.2.4 测序 酶切鉴定为正确连接的重组质粒, 由北京六合通生物工程公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

试验中共选用了 53 个随机引物, 其中有 7 个引物在三个材料间有多态性。这三个材料之间的差异既有质的差异(电泳条带有无的差异), 又有量的差异(即电泳条带亮度的差异)。两个引物在 RH8706-49 中有特异扩增产物, 这两个引物为 Opron N06 和 Opron Q05。图 1 为部分引物对三个材料的扩增结果。



1 两个胶板的样品自左至右每三个为 1 组, 依次为 RH8706-49、H8706-34 及其母本濮农 3665 2 上图中第 2 组所用引物为 Opron N06, 下图中第 2 组所用引物为 Opron Q05 3 箭头所指分别为随机引物 Opron N06 和 Opron Q05 在 RH8706-49 中的特异扩增条带

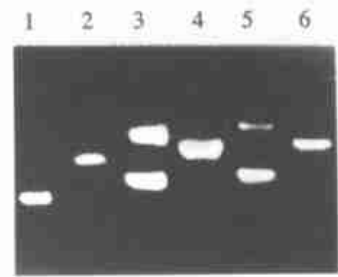
图 1 部分随机引物对 RH8706-49、H8706-34 及濮农 3665 的扩增结果

2.2 差异片段的回收、克隆及鉴定

将 RH8706-49 特有的扩增产物回收、连接转化。随机挑取白斑, 提取质粒, 以空载的 pGEM^{hL} -T 载体作为对照, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

pGEM^{hL} -T 载体上有一个限制性内切酶 Pst I 的酶切位点, 利用 Pst I 对经电泳检测的重组质粒进行

酶切, 再次鉴定。图 2 为重组质粒 N06-49 和 Q05-49 被 Pst I 酶切后的电泳结果, 以未酶切的和单酶切的 pGEM^{hL} -T 载体作为对照。



1 T 载体; 2 酶切的 T 载体; 3 重组子 Q05-49; 4 酶切后的 Q05-49; 5 重组子 N06-49; 6 酶切后的 N06-49

图 2 重组子的酶切鉴定

2.3 测序结果

对重组子 N06-49 和 Q05-49 进行序列测定, 其中重组子 N06-49 中插入片段的长度为 971 bp, 重组子 Q05-49 中插入片段的长度为 696 bp。

将这两个片段与 GeneBank 中的序列进行对比。其中, N06₉₇₁ 片段中有一段能够编码 49 个氨基酸的开放阅读框, 这一段序列与草木犀根瘤菌中的一种未知功能的蛋白质同源性较高^[9](相应部分的同源性为 75%); Q05₆₉₆ 片段中有一段能够编码 142 个氨基酸的开放阅读框, 该序列与假单胞杆菌中的末端双加氧酶大亚单位的相似性较高^[10](相应部分的同源性为 78%)。

N06₉₇₁: (划线处为所用随机引物的序列, 黑体为线粒体蛋白质合成的起始密码子)

```

1  GAGACGCACAGAGAAACAAGTCAATCGATTG
   TGCCGAGGGTGCCAAAGTTGATTGAAAAGA
61  AAATGCTGGAGATCAGAAAGAAATCACTGAG
   CTCAAAAGCATTTATCGGTATTTGACCG
121 AGGAGCGTGCAAATCTCGAGGCCAGTGCTGCC
   AAGCAACTTGAGCTTCAGCGACTCAACA
181 ACGCCITGAAGTGAGCTGTCTGGCATCCAGACA
   ACAGCGGCAGTCTGCTGCATGGCAGCCCC
241 CGGCATCACCCGAGTACATCCGCGCAGCCTGG
   ACAGAAAACGCATCTGCCGCGCCAAGGC
301 ATGGCGCAGCCATTCATCCACGGCTATGCTCA
   ATACCTTTGCCGTTGCGCAGCCGCGGCC
361 CGCCCTGCAACGGACCTTGACTGTTGAGGACC
   TCCCATGCACATCGAACCCGGCGTCGTC
421 AGCCCGGAAAAAATCGCCCTCAGTTATGTCAC
  
```

CGCCGCAGCGGCCTTCGGCCTGACCGCC
481 GGCCTGGCAAGGCAAAAGCCTGCACGACAACGG
CGGCTGGCTCGCGCTGCTGGCCGCGAGT
541 GTCATCACCAACCGCGCTGGTGTTCAGCTTCT
TCGAGGTGTTTCCGCAAGAGCCGGTCCGC
601 GTGTCCGAGGTCCATCTGATCCTGGGCTCGA
CCTTGCTGCTGACGTTCCGGCGCGGAGCT
661 GCGCCATCGGCCTGGCGTTCCGGCTGCTGG
TGCAGGGCCTGTTCTTTGCCCCCTTCGAC
721 CTGCCGAGTACGGCATGAACGTACCACT
TGCTGGTGCCGCTGTATGCGGTGAACCAA
781 CTGGCAAGCCGGCTGATTCCCGCCGGCAAGG
CCTATGTGGACATCAGCTGCAGGCAGGCC
841 CTGGCCCTGTCCACACCTACCAGGGCGGCA
TTGTCTGTGGGTGCGGTTCTGGGCCATC
901 TACGGCCACGGTGCCAGCCTGGCAACCTTGA
CCGAGGTGGCAAGCTTCGGTGCTGCCTAC
961 ATGTGCGTCTC

Q05₆₉₆: (划线处为所用随机引物的序列, 黑体为线粒体蛋白质合成的起始密码子)

1 CCGCGTCTTGGGCATCCAGGGGCACCCCGAGG
TGGACCGTCAGTTCCTGAAAGACAAGTT
61 CATGGCCTACCACCGCGGCTGTTCAAGACG
AGCAGTGGGGGCAAGTAGAACAGGAAGC
121 CAGCTAGCCTCTGTCTCCCGACCGCGTCATCG
CGCTGGGCGCGCGCTTACTGGACGAAGG
181 CGCCCTGGCTCCCGCGGCTGTGCTCAGCTTA
CCGAAACAACATGAACTGAAGCCGCGAT
241 TTTCAGATTCAACCGAATTGCGAGAAAACGAT
GAAAGTAATTCATATTGCGCCGTTCCG
301 GCGGGGAATCCGCGCGATGAATGGGACGA
CCTGGTGACGCCAGACCGTGTACACCGC
361 CGGCTCTATACGACCCCGCCATCTTTGCCCC
CGAAATGGACCATGTGTACGCCGCCAGC
421 TGGGTGTACTTGGCCCATGAAAGCGAGATCCC
CGAGCCCAACGATTTCCGGCAGGCGTGG
481 CTGGGCACCCGCGAGGTCATCGTGACTCGCGA
CGAAGAGGGGCAATTGCGGTGTTCTCC
541 AACCGTTGCTCGCACCAGCGCGCAACCGTCTG
CCGCGAGACCAAGGAAACGCCGCCAAC
601 TTCACCTGCCCTACCAAGGCTGGCGTTTCGA
CAACCGAGGTCAGTTGTTCCGCATTCCC

661 GGCAAGAACGCCTATGGCCCGGCCTTCAAGAC
GCGG

3 讨论

本实验室将小麦耐盐突变体 RH8706-49 与耐盐性差的材料石 86 5094 进行连续两年正反交试验, 并在 1993 年同时种植了双亲、F₁、F₂ 及回交一代。全部材料种植在含盐 0.45% 的人工模拟盐池中, 以耐盐指数和单株产量进行耐盐性评价。结果表明, F₁ 耐盐性与双亲存在明显差异。F₁ 各生育期耐盐指数均高于不耐盐亲本, 而且以耐盐亲本为母本的 F₁ 组合耐盐指数高于反交组合, 这表明耐盐性遗传不仅受核基因的控制, 而且与细胞质因子可能有一定的关系^[11]。

共选用了 53 个随机引物对小麦耐盐突变体 49、敏盐突变体 34 及其母本濮农 3665 的线粒体 DNA 进行 PCR 扩增。有 7 个引物的扩增产物在三个样品之间存在多态性, 这些差异既有质的差异, 又有量的差异。质的差异可能是由于 DNA 缺失或碱基的改变而使引物失去结合部位或结合部位发生改变而造成的。量的差异可能是由于碱基的微小改变使引物的结合能力发生变化而造成的。其中, 2 个引物——OpronN06, OpronQ05 在耐盐突变体 49 中有特异扩增产物。用 53 个随机引物对三个材料的扩增结果表明, 利用 EMS 诱变, 不仅使得核基因发生了突变, 同时细胞质基因也发生了一定程度的改变, 而且在不同的材料之间细胞质基因的突变位点也有所不同。

将 RH8706-49 中的特异扩增条带回收克隆测序。其中, N06₉₇₁ 片段与草木犀根瘤菌中的一种未知功能的蛋白同源性较高(相应部分的同源性为 75%)。植物线粒体 DNA 中存在有大量未知功能的编码区以及非编码序列, 这个片段可能为某个基因的编码序列或者是一个调控区域, 该片段的差异有可能造成表达产物出现异常, 从而对小麦耐盐突变体 RH8706-49 的耐盐性变化起到一定程度的影响。

重组子 Q05-49 中的插入片段长度为 696 bp, 经序列比对发现该片段与假单胞杆菌中的末端双加氧酶的大亚单位有较高的同源性(相应部分的同源性为 78%)。加氧酶参与生物体内的氧化还原反应, 能催化一个或两个氧原子并入底物中, 在线粒体中有加氧酶系的存在。本试验中得到的 Q05₆₉₆ 片段并不是一个完整的基因, 因此只能说该片段可能是某

种加氧酶类基因的一部分。在盐胁迫情况下,植物体内会积累大量的超氧离子自由基,这个基因的产物有可能参与到超氧离子自由基的清除中。以上两个片段的具体功能还有待进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] 沈银柱,刘植义,何聪芬,等. 诱发小麦花药愈伤组织及其再生植株抗盐性变异的研究[J]. 遗传, 1997, 19(6): 7-11.
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Libak K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [3] Ohtsuka M, Makino S, Yoda K, *et al.* Construction of a linkage map of the *Da* mutant locus defective in dorsoventral patterning [J]. Genome Res, 1999, 9: 1277-1287.
- [4] Waycott W, Fort S B, Ryder E J, *et al.* Mapping morphological genes relative to molecular markers in lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Heredity, 1999, 82: 245-251.
- [5] Zhang B X, Huang S W, Yang G M, *et al.* Two RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in pepper [J]. Euphytica, 2000, 113: 155-161.
- [6] Parant I, Michelmore R W. Development of PCR-based markers linked to downy mildew resistance in lettuce [J]. Theor Appl Genet, 1993, 85(8): 985-993.
- [7] 许占友,张爱民,张树臻,等. 小麦恢复基因 RAPD 分子标记的研究[A]. 第一届国际杂交小麦研讨会论文集: 杂交小麦[C]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998. 216-222.
- [8] 内宫博文(日). 孙崇英,李育庆,等译. 植物基因工程技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [9] Finan T M, Weidner S, Wong K, *et al.* The complete sequence of the 1 683 kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98(17): 9889-9894.
- [10] Fukumori F. Direct Submission. Submitted (16-MAY-1993) Fumiyasu Fukumori [Z], Toyo University, Faculty of Life Sciences.
- [11] 李杏普. 小麦遗传资源研究[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 153-163.