DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.02285

四种细胞质来源的烟草不育系线粒体 SSR 位点差异

李凤霞 杨爱国 崔萌萌 龚达平 王卫锋 孙玉合*

中国农业科学院烟草研究所 / 中国农业科学院烟草遗传改良与生物技术重点开放实验室, 山东青岛 266101

摘要: 采用线粒体 SSR(mtSSR)方法对普通烟草 4 种不育类型的不育系、不育胞质来源的烟草野生种和保持系进行线粒体位点差异分析, 探讨 mtSSR 位点差异与胞质不育的关系。在烟草线粒体基因组上检索到 24 个能重复稳定扩增出片段的 mtSSR, 对烟草属植物的这些 mtSSR 分析结果显示, 普通烟草种内 mtSSR 较为保守, 多态性比率仅 10.5%; 4 种不育类型的各自不育系与保持系、不育胞质上存在多个差异位点, 在 Nta(sua.)S 类型中差异位点在线粒体编码基因 orf138a、orf138c 以及 orf102~orf210 的基因间区; 在 Nat(gla.)S 类型中, 差异位点在线粒体 orf138a、orf138c 两个编码基因以及 nad2~sdh3、rps12~orf125b、orf116~orf101b、orf102~orf210 的 4 个基因间区; 在 Nta(rep.)S 类型中, 差异位点在线粒体编码基因 orf190 以及 orf104c~orf202 的基因间区; 在 Nta(rus.)S 类型中, 差异位点在线粒体编码基因 orf137 以及 rps12~orf125b 的基因间区。这些位点差异可能与各自的雄性不育有关。另外, mtSSR 引物 TMS20 在 Nat(sua.)S、Nat(gla.)S、Nat(rep.)S 和 Nat(rus.)S 类型的雄性不育系中分别扩增出了 184、172、212 和 225 bp 的片段, 表明可用该引物区分 4 种烟草 CMS 类型。

关键词: 烟草; 不育胞质类型; 线粒体 DNA; SSR

Mitochondrial Microsatellite Variability of Tobacco CMS Lines with Four Different Cytoplasms

LI Feng-Xia, YANG Ai-Guo, CUI Meng-Meng, GONG Da-Ping, WANG Wei-Feng, and SUN Yu-He*

Key Laboratory of Tobacco Genetic Improvement and Biotechnology, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China

Abstract: Sequence variation of the mitochondrial DNA has a direct relation with cytoplasmic male sterility (CMS). In this study, we analyzed mtSSR variability of four sterile cytoplasm types, including four CMS lines, their maintainer lines and sterility cytoplasm sources, and explored the relationship between mtSSR variability and CMS. Based on the entire mitochondrial DNA sequence of *Nicotiana tabacum*, we identified 39 mtSSR loci having more than ten mononucleotide repeats and 24 mtSSR markers that can be used to analyze mitochondrial DNA variability of four sterile cytoplasm types. The results showed that the mtSSR polymorphism was very low in *N. tabacum*, which was 10.5%, and there were some different loci between the CMS lines and their maintainer lines, the wild tobacco provided the sterile cytoplasm. Such as, in the Nat(sua.)S, the different loci were located in coding regions of orf138a, orf138c and intergenic region orf102~orf210; in the Nat(gla.)S, the different loci were located in two coding regions of orf138a, orf138c and four intergenic regions nad2~sdh3, rps12~orf125b, orf116~orf101b, orf102~orf210; in the Nat(rep.)S, the different loci were located in coding region orf190 and intergenic region orf104c~orf202; in the Nat(rus.)S, the different loci were located in coding regions of orf137 and rps12~orf125b. These different loci likely related to their CMS. The results also showed that the fragments of 184, 172, 212 and 225 bp were amplified by mtSSR primer TMS20 in four types of CMS of ms G-28, 86-6, 98-43, 116, respectively, and using this primer we could distinguish the four types of CMS of Nat(sua.)S, Nat(gla.)S, Nat(rep.)S, Nat(rus.)S between each other.

Keywords: Tobacco; Sterile cytoplasm type; Mitochondrial DNA; SSR

烟草胞质雄性不育系(cytoplasmic male sterility line, CMS line)的推广应用是当前烟叶生产的主要发展方向之

一, 至 2009 年, 我国烤烟不育系种植面积达 53.3 万公顷, 占当年烤烟总面积的一半以上, 所使用的不育胞质来源

本研究由国家烟草专卖局重点科技项目(110200601001)和中国农业科学院作物科学研究所基本科研业务费资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 孙玉合, E-mail: yhsun@163.com

第一作者联系方式: E-mail: lfx-2@163.com

Received(收稿日期): 2011-05-23; Accepted(接受日期): 2011-09-18; Published online(网络出版日期): 2011-09-29.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110929.1551.005.html>

于烟草属野生烟草种 *Nicotiana suaveolens*, 为我国烟草育种和生产上使用的唯一不育胞质^[1]。这种单一细胞质的长期大范围使用在生产上存在潜在危害, 只有增加烟草 CMS 的胞质来源, 才可促进烟草生产的可持续发展。此后, 国内外烟草育种家致力于烟草新胞质不育系的选育, 通过体细胞融合、远缘杂交等方法先后培育的不育胞质分别来源于 *N. bigelovii*、*N. undulata*、*N. debneyi*、*N. megalosiphon*、*N. plumbaginifolia*、*N. glauca* 和 *N. repanda* 等不育系以及自然突变获得的晒烟雄性不育系。不同胞质来源不育系的败育阶段、败育特点以及表现型各不相同^[2-9], 有必要从分子水平探讨其异同。大量研究证明, 线粒体基因组是细胞质育性因子的载体, 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的变异与细胞质雄性不育有直接联系^[10-11]。Levings 和 Pring^[12]利用多种限制性内切酶消化玉米正常胞质和 T 型不育系的 mtDNA, 首次发现两者酶切图谱存在明显差异, 证明了 CMS 与线粒体基因组的突变存在相关性。而后相继出现了大量用 RFLP、AFLP、AP-PCR 和 RAPD 等分子标记手段进行 mtDNA 多态性与胞质雄性不育关系的研究, 在玉米、矮牵牛、水稻、小麦、棉花等农作物不育系 mtDNA 上找到了可能与 CMS 有关的基因座位^[12-18]。

近年来, 烟草胞质不育的分子机理研究有很大进展。Bergman 等^[19]发现 Nta(rep.)S 类型不育系线粒体基因 *atp1* 同 *orf274* 共转录本升高导致其 ATP/ADP 比率显著降低是该不育类型不育的一个特点; Fitter 等^[20]发现 Nta(sua.)S 的不育系线粒体存在融合和重排; 赵婷等^[21]和朱腾义等^[22]分别获得了 Nta(tab.)S 的不育类型存在显著相关性的 *atp6*、*coxII* 基因 SNP 位点; 刘齐元等^[23]发现 Nta(tab.)S 和 Nta(sua.)S 的不育系和保持系线粒体基因组有明显的差异。但是对其他胞质不育类型的烟草雄性不育分子机理尚未展开研究, 对我国烟草生产上唯一使用的 Nta(sua.)S 不育类型, 与不育相关的线粒体基因座位也没有提到, 而且不同雄性不育类型的线粒体差异也不清楚。线粒体微卫星(mtSSR)是近年来发展起来的一种新型高效的分子标记技术, 该技术不但具有微卫星标记共显性、高多态性、分布广泛等有点, 又兼顾到线粒体基因组结构简单, 相对保守, 单亲遗传等特点, 在植物细胞质遗传及系统发育、胞质雄性不育鉴定等方面得到了很好的应用^[24-27]。由于传统的 SSR 操作通过银染及人工读带进行基因型分型研究, 方法虽然成熟但耗时、耗力, 多批次的数据收集和分析时存在一定的难度, 而基于荧光标记、毛细管电泳和激光检测的荧光标记 SSR 技术是将经荧光标记的 PCR 扩增片段和标准分子量(内标)在同一泳道中进行毛细管电泳, 通过 CEQ 片段分析软件分析结果, 精确计算出微卫星等位变异扩增片段的大小, 具有分辨率高、自动化, 适合通量检测的优点^[28], 在大麦^[29]、黑麦草^[30]、莠草^[31]、竹子^[32]等多种植物 SSR 分子标记研究中显示出极为广阔的应用前景。

本研究根据普通烟草的线粒体全基因组测序结果^[33], 对腺嘌呤和胸腺嘧啶单核苷酸超过 10 个拷贝的区域进行搜索并设计引物, 利用 mtSSR 分子标记技术, 对不同胞质来源的雄性不育系、保持系和相应的不育胞质进行 mtSSR 扩增, 并采用荧光标记毛细管电泳检测技术, 分析不同类型的雄性不育系之间以及各种雄性不育类型的雄性不育系和其对应的保持系、不育胞质的 mtSSR 差异, 来探寻与各种雄性不育类型相关的线粒体基因座位。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用的 4 份不育系材料是由中国农业科学院烟草研究所分别通过回交转育或体细胞融合再转育 10 代以上而成, 代表了烟草 4 种不同胞质雄性不育类型^[2,6-7,34], 其对应的各自保持系及不育胞质来源的烟草种由中国烟草遗传育种研究(北方)中心提供(表 1)。

表 1 烟草 4 种不育胞质类型的不育系和保持系
Table 1 Male sterile lines and maintainers with four types of sterile cytoplasm

不育胞质来源/类型 Origins/types of sterile cytoplasm	不育系 Male sterile line	保持系 Maintainer
<i>N. suaveolens</i> /Nat(sua.)S	ms G-28	G-28
<i>N. glauca</i> /Nat(gla.)S	86-6	G-28
<i>N. repanda</i> /Nat(rep.)S	98-43	K326
<i>N. rustica</i> /Nat(rus.)S	116	NC82

1.2 烟草高纯度线粒体提取

参照 Sugiyama 等^[33]和李文强等^[35]方法, 略有改动。将生长至 10~12 周的烟草材料在 30℃ 条件下黑暗培养 3~5 d, 取 40 g 叶片, 去除主叶脉, 4℃ 下过夜, 加入 3 倍体积预冷的匀浆缓冲液(0.5 mol L⁻¹ 蔗糖, 10 mmol L⁻¹ EDTA, 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 1% BSA, 10 mmol L⁻¹ β-巯基乙醇), 用组织匀浆器破碎组织, 10 min 后加入 2 倍体积匀浆缓冲液, 静置 20 min, 以 4 层无菌纱布过滤, 滤渣加 3 倍体积预冷的匀浆缓冲液继续破碎, 2 次滤液合并后于 900×g 离心 10 min, 取上清 2 000×g 离心 15 min, 并重复此步操作。将得到的上清液 18 000×g 离心 15 min, 弃上清液, 得到粗线粒体沉淀。向每管沉淀中加入 5 mL 预冷的洗涤缓冲液(0.4 mol L⁻¹ 蔗糖, 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% BSA)将沉淀重悬浮, 然后加入 5 U 的 DNase I, 室温下反应 30 min, 18 000×g 离心 15 min, 充分弃上清液, 得到较纯的线粒体沉淀。向沉淀中加入终浓度为 50 mmol L⁻¹ 的 EDTA, 混匀后静置 10 min 以终止反应。然后加入 2 mL 洗涤缓冲液, 18 000×g 离心 15 min, 充分弃上清液。

1.3 线粒体 DNA 的提取

向沉淀中加入 1 mL 裂解缓冲液(25 mmol L⁻¹ EDTA, 25 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% SDS), 将沉淀重悬浮, 再加入终浓度为 100 μg mL⁻¹ 蛋白酶 K, 37℃ 裂解 2 h, 裂

解期间每隔一段时间轻轻摇动一次。裂解结束后依次用苯酚/氯仿/异戊醇(24 24 1)、氯仿/异戊醇(24 1)抽提; 上清液加 1/10 体积 3 mol L⁻¹ 醋酸铵和 2.0~2.5 倍体积乙醇, -20℃ 沉淀半小时以上, 12 000 ×g 离心 10 min, 用 70% 乙醇洗涤 2 次, 将沉淀于室温凉干, 加入 20~30 μL TE (pH 8.0) 溶解, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后置 -20℃ 保存待用。

1.4 以 PCR 检测烟草 mtDNA 的纯度

以烟草 *Actin* 基因(NTU60495)为核基因组内参, 设计特异性引物 ActinF: 5'-CAAGGAAATCACCGCTTTGG-3'; ActinR: 5'-AAGGGATGCGAGGATGGA-3'。PCR 体系(20 μL)含 DNA 1 μL, 10×PCR buffer 2 μL, 1 U *Taq* 聚合酶、25 mmol L⁻¹ dNTP 1 μL, 0.15 μmol L⁻¹ 上、下游引物各 0.5 μL。PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

1.5 mtSSR 引物筛选与合成

从 NCBI 公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BA000042>)下载烟草线粒体全基因组序列, 利用 SSR Finder 软件, 对多聚 A(poly A)或者 T(poly T)超过 10 的重复进行搜索, 用 Primer 5.0 设计引物。为配合 PCR 产物的毛细管电泳检测, 对设计的每对 SSR 引物的上游 5' 端进行 M13 通用序列(5'-CACGACGTTGTAAACGAC-3')加尾。同时合成经 cy5 荧光标记的 M13 通用序列。

1.6 mtSSR 扩增反应体系

PCR 体系(20 μL)含线粒体 DNA 约 30~50 ng, 10×PCR buffer 2 μL, 1 U *Taq* 聚合酶、25 mmol L⁻¹ dNTP 1 μL, 0.15 μmol L⁻¹ mtSSR 上游引物、0.01 μmol L⁻¹ 下游引物、0.15 μmol L⁻¹ cy5 荧光标记 M13 通用引物各 0.5 μL。PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

1.7 cy5 荧光标记 mtSSR 产物毛细管电泳检测

毛细管电泳检测的上样缓冲液包括去离子甲酰胺(Sigma) 30 μL、DSS 400 分子量内标 0.3 μL、经 50 倍稀释的 PCR 产物 0.5 μL。于 CEQ8000 遗传分析系统(Beckman Coulter, USA)上进行毛细管电泳, 分析系统电压 2.0 kV, 进样时间 30 s; 电泳电压 4.8 kV, 65 min。

2 结果与分析

2.1 烟草 mtDNA 的纯度检测

经琼脂糖凝胶电泳检测, 所提取的烟草 mtDNA 无明显降解现象(图 1)。利用烟草核基因组的 *Actin* 基因特异性引物, 分别以烟草总 DNA 和 mtDNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果发现, 该引物只能在总 DNA 中扩增出约 105 bp 的特异性条带, 以 mtDNA 为模板没有扩增出任何产物(图 2)。表明该方法提取的烟草 mtDNA 完整性良好, 而且无核基因组 DNA 的污染, 可满足后续实验的要求。

图 1 烟草 mtDNA 的凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoretic of mtDNAs for *N. tabacum*
M: D2000 marker; 1: G-28; 2: ms G-28; 3: *N. suaveolens*; 4: 86-6; 5: *N. glauca*; 6: K326; 7: 98-43; 8: *N. repanda*; 9: NC82; 10: 116; 11: *N. rustica*.

图 2 烟草 *Actin* 基因的 PCR 检测

Fig. 2 PCR amplification of *Actin* from *N. tabacum*
M: D₆₀₀ marker; 1: nuclear DNA of K326; 2: mtDNA of G-28; 3: ms G-28; 4: *N. suaveolens*; 5: 86-6; 6: *N. glauca*; 7: K326; 8: 98-43; 9: *N. repanda*; 10: NC82; 11: 116; 12: *N. rustica*.

2.2 mtSSR 引物筛选及扩增体系建立

通过电子查询, 在烟草线粒体基因组序列中共发现 41 个含有多聚 A 或 T 超过 10 的 SSR, 其中 3 个(T)13 是同一个序列在线粒体 DNA 的 3 次重复。以普通烟草线粒体基因组为模板对 39 对烟草 mtSSR 特异引物进行筛选, 有 24 对引物能重复稳定扩增出片段。在这 24 个线粒体微卫星中, 有 8 个位于编码区, 1 个位于基因的内含子, 其他位于基因间区(表 2)。

2.3 mtDNA 的 SSR 分析

2.3.1 烟草属植物 mtSSR 多态性 用筛选的 24 对 mtSSR 引物在 11 份供试材料: 4 个不育系 ms G-28、86-6、98-43、116 以及 3 份普通烟草 G-28、K326 和 NC82 和提供不育细胞质的 4 个烟草种 *N. suaveolens*、*N. glauca*、*N. repanda* 和 *N. rustica* 间进行 SSR 扩增和毛细管电泳检测, 共检测到 40 个等位变异位点, 其中多态性位点 27 个, 占 67.5%。在 3 份普通烟草、4 个不育胞质来源的烟草野生种以及 4 个不育系间的多态性分别为 10.5%、51.4% 和 64.8% (表 3), 反映了在普通烟草种内线粒体差异不大, 基因组较为保守, 而来源于烟草属不同亚属、不同分组的 4 份烟草种的线粒体多态性远高于普通烟草种内。值得一提的是 4 种不同类型的不育系多态性位点比率达到 64.8%, 这与其线粒体组成成分有很大关系, 由于它们都是通过普通烟草与烟草属其他种融合、杂交形成, 不育系的线粒体包含普通烟草的线粒体组分和相应的野生烟线粒体组分, 而且这些组分之间还不断进行融合、重组与重排。

表 2 烟草线粒体微卫星信息
Table 2 Tobacco mitochondrial microsatellite information

位点 Locus	重复序列 Repeat	引物序列 Primer sequence(5'-3')	在 mtDNA 中的位置 Position in mtDNA	微卫星基因位点 Location of mtSSR	片段大小 Size (bp)
TM _s 1	T12	CACGACGTTGTAAAACGACCGTGGGATCAACT GCTCGTTTGATTTATGAAAGCCCGGTGA	2775–2942	Coding region (orf138a)	168
TM _s 2	A12	CACGACGTTGTAAAACGACGACGACGGTCCA CTACTTATGCCACTGGATCAACTC	55560–55785	Intergenic region (orf161–orf132)	225
TM _s 3	T13	CACGACGTTGTAAAACGACCGGTGCAATTCCA AACCTTTTCCCTCGTAGAGTGGCGTCTTT	76869–77052 278369–278552 427619–427802	Intergenic region (nad2–sdh3)	184
TM _s 4	T12	CACGACGTTGTAAAACGACCAAGGCTGTGTAA GGGTGTGTCTGAGAACGAGTGGAATACCTGA	89418–89569	Intergenic region (rps12–orf125b)	152
TM _s 5	A14	CACGACGTTGTAAAACGACCTGGGGGTCTTCA TTCACCTTGAAGGGCTTATCGCTTCTCC	90062–90214	Intergenic Region (rps12–orf125b)	153
TM _s 6	T10	CACGACGTTGTAAAACGACGTCAGCGAAGGA AGGATAGAGACCGAAGGTAAGGAG	133285–133512	Intergenic region (cox1–orf105a)	227
TM _s 7	T12	CACGACGTTGTAAAACGACCTGGATTGAATCT TCCGCTTTCCCATCAATCATCCAACACA	140566–140760	Intergenic region (orf158–orf129)	195
TM _s 8	A11	CACGACGTTGTAAAACGACCGATTATGCTCCT GCGGAAGTTGCTTCAATGGCTCGATATG	155566–155800	Coding region (rps3)	235
TM _s 9	A11	CACGACGTTGTAAAACGACCAAGCAAGGGAT GTCGTGAACAGGTCCCACCACCAACTCTA	157298–157470	Intron (cox2)	173
TM _s 10	T11	CACGACGTTGTAAAACGACCTCTGCTTTTTCC TGGATGCTATTTCCGACCTCTTGCAATTG	179805–179954	Intergenic region (trnD–orf171)	150
TM _s 11	T12	CACGACGTTGTAAAACGACCAAGCAGATCGTC TGAAGTCATCCACAACCTAAGTGCACGA	195434–195636	Intergenic region (orf116–orf101b)	203
TM _s 12	A17	CACGACGTTGTAAAACGACCGTCACCGTCAGC ATTTGGTAAAAGGCGAACAATCTCCATTG	228833–229035	Coding region (orf138c)	203
TM _s 13	A10	CACGACGTTGTAAAACGACTCCTCCACTAGCA GGTTTGGGATCTTCTATAATTTCTG	256071–256266	Coding region (orf190)	195
TM _s 14	A11	CACGACGTTGTAAAACGACCAAGAAATGA CCCGAAATCGCTTCTCAAGGCCCTCT	259914–260100	Coding region (orf125e)	186
TM _s 15	T11	CACGACGTTGTAAAACGACTCTATGAAGTAGG ACGAGATATGATAAAGGAAGAGC	262967–263162	Intergenic region (atp1–orf120b)	195
TM _s 16	T13	CACGACGTTGTAAAACGACCTCGTCAAGAAA GATCGAGCAGAGCTTCGCCCTTTGTATTG	268587–268737	Intergenic region (orf120b–orf131b)	151
TM _s 17	T10	CACGACGTTGTAAAACGACCAAGAAAGGTCC CCTCCTTCACTTTCGACGTTGCACAAAAG	288376–288561	Coding region (nad1)	186
TM _s 18	A11	CACGACGTTGTAAAACGACCTTCTTGCTGCT AAGGGATTGCTCAAAATTAGCCTCACGAA	302953–303250	Intergenic region (orf104c–orf202)	198
TM _s 19	A11	CACGACGTTGTAAAACGACCTTCTCCCCAC CTTTAGCGAGCCAAGGAAAGGGAAG	313675–313851	Intergenic region (nad6–rps4)	177
TM _s 20	T16	CACGACGTTGTAAAACGACCGAAGGGGAAGG AAGAGATGGAAGGGGGCGAAAAGAGTCTA	315512–315703	Coding region (orf137)	192
TM _s 21	A12	CACGACGTTGTAAAACGACCGGTAGAACGTG GGTCTCCAATACAGGCGTGGTGATCAGTT	337800–338023	trnW(tRNA)	224
TM _s 22	T10	CACGACGTTGTAAAACGACTATGAAAGCAAG AGGTGGAATAATGTCTGTGGCGAAGGT	350042–350266	Intergenic region (orf110b–mmt2)	224
TM _s 23	A10	CACGACGTTGTAAAACGACCTTCCCTTTCTAT AACATACCCTCATACGGAGTCGCACA	378858–379036	Intergenic region (orf105–orf125f)	178
TM _s 24	T10	CACGACGTTGTAAAACGACTAACGAGATGGCT ATCAAACAGCCCTAAGTCTAAGTTGA	393947–394142	Intergenic region (orf102–orf210)	195

表 3 不同类型烟草的 mtSSR 多态性
Table 3 mtSSR polymorphism in different types of tobacco

类型 Type	材料份数 Accession number	等位点位数 No. of alleles	多态性点位数 No. of polymorphic alleles	多态性比率 Ratio of polymorphic alleles (%)
普通烟草 <i>N. tabacum</i>	3	29	3	10.5
不育胞质 Sterile cytoplasm	4	35	18	51.4
不育系 Male sterile line	4	37	24	64.8

2.3.2 4 种雄性不育类型的不育系、保持系及不育胞质来源的野生烟草间的 mtSSR 分析 在 Nat(sua.)S 类型中,不育系 ms G-28 和保持系 G-28 以及提供不育胞质的 *N. suaveolens* 之间,24 对 mtSSR 引物共检测到 30 个 SSR 等位基因,其中 18 对引物在 ms G-28、G-28 和 *N. suaveolens* 材料中扩增片段没有多态性,3 对引物在 ms G-28 中的扩

增片段与 G-28 和 *N. suaveolens* 中的一个相同,另一个不同。而引物 TM_s1 在 G-28 和 *N. suaveolens* 中获得了 1 条 188 bp 的片段,该引物在不育系 ms G-28 中没有扩增产物(图 3-a),引物 TM_s12、TM_s24 在 ms G-28 和 G-28 和 *N. suaveolens* 中扩增出大小不同的片段,表明该不育系的形成可能在线粒体的这 3 个位点发生过融合与重排,这 3 个

微卫星基因位点分别是编码基因 orf138a、orf138c 及 orf102~orf210 的基因间区。

在 Nat(gla.)S 类型中, 24 对 mtSSR 引物在不育系 86-6 与其保持系 G-28、不育保持来源的 *N. glauca* 中的扩增结果显示, 在 3 份材料中共获得 32 个 mtSSR 等位基因, 其中 8 对引物在 ms G-28、G-28 和 *N. glauca* 中扩增的片段没有多态性, 10 对引物在 86-6 中的扩增片段与 G-28 和 *N. glauca* 中的一个相同, 另一个不同。引物 TMs1、TMs3、TMs4、TMs11、TMs12 和 TMs24 在 86-6 与 G-28 和 *N. glauca* 中分别获得大小不同的片段(图 3-b), 多态性位点占标记数的一半, 因此, 该不育系的形成可能发生过更为广泛的线粒体融

合与重排, 该不育类型中发生变化的微卫星基因位点有编码基因 orf138a、orf138c 以及 nad2~sdh3、rps12~orf125b、orf116~orf101b 和 orf102~orf210 的基因间区。

在 Nat(rep.)S 类型中, 24 对 mtSSR 引物在不育系 98-43、保持系 K326 及不育保持来源的 *N. repanda* 中获得 33 个 mtSSR 等位基因, 其中 20 对引物在 98-43、K326 和 *N. repanda* 中扩增片段没有多态性, 2 对引物在 98-43 中的扩增片段和 K326 和 *N. repanda* 中的一个相同, 另一个不同。引物 TMs13、TMs18 在 3 份材料间得到不同片段大小的扩增(图 3-c), 这 2 个位点位于编码基因 orf190 及 orf104c~orf202 的基因间区。

图 3 四种雄性不育类型的不育系、保持系及不育胞质来源的野生烟草间的 mtSSR 扩增结果

Fig. 3 PCR patterns of mtSSR in four types of the CMS lines, their maintainers, and wild tobacco with sterile cytoplasm

a: 引物 TMS1 在 Nat(sua.)S 不育类型的扩增结果; b: 引物 TMS12 在 Nat(gla.)S 不育类型的扩增结果; c: 引物 TMS18 在 Nat(rep.)S 不育类型的扩增结果; d: 引物 TMS4 在 Nat(rus.)S 不育类型的扩增结果。

a: PCR patterns of Nat(sua.)S type by mtSSR marker TMS1; b: PCR patterns of Nat(gla.)S type by mtSSR marker TMS12; c: PCR patterns of Nat(rep.)S type by mtSSR marker TMS18; d: PCR patterns of Nat(rus.)S type by mtSSR marker TMS4.

在 Nat(rus.)S 类型中, 24 对 mtSSR 引物在不育系 116、保持系 NC82 及不育保持来源 *N. rustica* 中获得 30 个 mtSSR 等位基因, 其中 16 对引物在 116、NC82 和 *N. rustica* 中没有扩增多态性片段, 6 对引物在 116 中的扩增片段与 NC82 和 *N. rustica* 中的一个相同, 另一个不同。引物 TMs4 和 TMs20 在不育系 116 中扩增出了与 NC82 和 *N. rustica* 不相一致的片段(图 3-d), 这 2 个位点分别处于 rps12~orf125b 的基因间区和编码基因 orf137 中。不育系和保持系、不育胞质来源的烟草种线粒体 SSR 的位点差异可能与各自类型雄性不育的产生有关。

2.3.3 四种雄性不育类型的不育系的 mtSSR 分析 在分别代表 Nat(sua.)S、Nat(gla.)S、Nat(rep.)S 和 Nat(rus.)S 不育类型的 4 个雄性不育系 ms G-28、86-6、98-43 和 116 中, 引物 TMS20 分别扩增出了 184、172、212 和 225 bp 的不同片段(图 4), 表明用该引物可区分这 4 种雄性不育类型。

图 4 引物 TMS20 在 4 种烟草雄性不育类型的 mtSSR 扩增结果
Fig. 4 Amplification patterns of the four types of tobacco CMS by the mtSSR marker TMS20

3 讨论

3.1 植物线粒体提取方法

线粒体 DNA 的提取是研究线粒体基因组的关键, 对于植物 mtDNA 提取, 主要是高纯度完整线粒体的获得。传统烟草线粒体提取采取差速离心和蔗糖衬垫方法, 所需样品量 250~300 g, 整个操作过程复杂费时, 线粒体产率低^[35-37], 对叶片较小的 *N. glauca* 和 *N. repanda* 等烟草野生种, 取材较为困难。而且, 在梯度密度离心时吸取中

间层较为困难, 在涉及到多个材料的线粒体研究中, 一般采用多次差速离心的方法^[35,37]。本研究用经黑暗处理的 10~12 周苗龄烟草幼嫩叶片提取线粒体 DNA, 线粒体纯化方法是多次差速离心、过量 Dnase I 处理、线粒体裂解、酚/氯仿抽提和 RNase A 消化等主要步骤, 所提取的烟草 mtDNA 结构完整、无核基因组 DNA 的污染。此外, 在细胞破碎过程中, 采用组织匀浆器以比较温和的匀浆强度研磨, 既可有效破碎细胞, 又较小程度破坏细胞器, 大大提高了烟草线粒体的产率, 用本方法提取烟草属几个野生种的线粒体 DNA, 都获得了较好的效果。

3.2 烟草 mtSSR 多态性与雄性不育的关系

线粒体是一种遗传上半自主性的细胞器, 能编码与自身功能相关的部分基因。研究发现, 植物线粒体基因组分子构型多样, 线粒体基因组大小在物种间甚至物种内差异较大, 在线粒体基因组上除了具有少量的编码基因以外, 含有大量的大片重复序列、非编码序列以及其他来源序列。虽然植物线粒体基因组大小和结构很不相同, 在进化过程中有活跃的重组发生, 但其编码基因数量基本相同, 而且编码区域的序列总长在已测物种中也非常接近^[38], 基因组大小的差异主要是由于植物线粒体基因组内含有大量长片段的重复序列或大的复制子区域。

另一方面, 植物线粒体基因组在核苷酸序列上的变化非常缓慢^[23,39], 碱基替代率分析也表明植物线粒体的进化速率比细胞核进化速率低 10~20 倍, 甚至比同一物种的叶绿体基因组的进化速率也低几倍^[25,40-41], 基因组复杂性相对保守^[42]。Hosaka 等^[26]用 14 对 mtSSR 引物对 7 个马铃薯栽培种以及 32 个野生种共 476 个材料进行了 mtSSR 分析, 结果显示 14 对 mtSSR 引物中, 有 6 对能在 476 个材料间扩增出多态性条带, 但这 6 对 mtSSR 引物除了 A14-1 外, 其他 5 对的多态性指数非常低, 在 0.064~0.180 之间; Ishii 等^[25]对普通小麦及祖先种共 43 个材料进行 mtSSR 位点分析, 21 对 mtSSR 引物中 11 对有多态性, 但其中 5 对多态性指数较低, 为 0.09; 燕妮等^[27]利用 29 对 mtSSR 引物对几种不同胞质来源的 15 份油菜胞质不育系进行多态性分析, 其中只有 4 对有多态性。这些研究表明线粒体的 SSR 进化较为缓慢。在本研究中, 24 对 mtSSR 引物在 3 份普通烟草中共检测到 29 个线粒体 SSR 位点, 多态性位点 3 个, 种内多态性位点比率为 10.5%, 说明普通烟草 mtDNA 在进化上较为保守, 这一结果与 Bland 等^[36]比较普通烟草与其两个祖先亲本 *N. tomentosiformis* 和 *N. sylvestris* 的线粒体序列后的结果一致。本研究中的 4 份不育材料的不育胞质分属于烟草属碧冬烟亚属的残波烟草组、香甜烟草组以及黄花烟亚属的圆锥烟草组和黄花烟草组, 亲缘关系较远^[43], 24 对烟草 mtSSR 引物在烟草属 4 个烟草种中扩增出 35 个条带, 其中 18 个为多态性条带, 多态性位点比率为 51.4%, 暗示烟草属种间的线粒体 DNA 变化的复杂性。

植物细胞质雄性不育与线粒体密切相关, 线粒体基

因组内多个正向或反向重复序列引起基因重组或重排, 进而线粒体基因组序列的变化, 产生一些 mtDNA 的特异位点, 导致 CMS。本研究通过 mtSSR 分析找到了存在于不育系和保持系、不育胞质之间的线粒体 SSR 位点差异, 由于线粒体 SSR 进化缓慢, 这些位点的差异可能是不育系形成时线粒体变异的证据。但植物细胞质雄性不育是个十分复杂的性状, 线粒体结构和数量的变化、线粒体 DNA 片段差异、线粒体基因的转录、修饰、RNA 编辑、线粒体蛋白的差异等都可能引起不育。本研究中变异的线粒体 DNA 序列可能与各自的 CMS 有关, 但变异的线粒体 DNA 是怎样影响育性还需要进一步的研究。

References

- [1] Xie J-P(谢剑平). Report on Advances in Tobacco Science and Technology 2009–2010 (烟草科学与技术学科发展报告 2009—2010). Beijing: China Science and Technology Press, 2010 (in Chinese)
- [2] Bu G-Z(卜锅章), Gong M-L(龚明良), Ding C-M(丁昌敏), Yao S-M(姚绍满), Zhang L-L(张历历). A new strain of tobacco selected by somatic hybridizaion between *N. tabacum* and *N. rustica*. *Chin Tab* (中国烟草), 1992, (2): 1–5 (in Chinese)
- [3] Kofer W, Glimelius K, Bonnett H T. Restoration of normal stamen development and pollen formation by fusion of different cytoplasmic male-sterile cultivars of *Nicotiana tabacum*. *Theor Appl Genet*, 1991, 81: 390–396
- [4] Spangenberg G, Vicente R P, Oliveira M M, Osusky M, Nagel J, Pais M S, Potrykus I. CMS system in *Nicotiana*: flower development, patterns of mitochondrial DNA and mitochondrial gene expression. *Sex Plant Reprod*, 1992, 5: 13–26
- [5] Tong D-R(佟道儒). Tobacco Breeding (烟草育种学). Beijing: China Agricultural Press, 1997. pp 284–288 (in Chinese)
- [6] Sun Y-H(孙玉合), Ding C-M(丁昌敏), Zhang L-L(张历历), Bu G-Z(卜锅章), Gong M-L(龚明良). Breeding and use of a new tobacco CMS line 86-6. *Acta Tab Sin* (中国烟草学报), 1999, 5(1): 20–24 (in Chinese)
- [7] Sun Y, Xue Q, Ding C, Wang W, Zhang L, Chen G, Han L, Wang Z. Somatic cybridizaion between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* based on a single inactivation procedure of nuclear donor parental protoplasts. *Plant Sci*, 2005, 168: 303–318
- [8] Liu Q-Y(刘齐元), Liu F-H(刘飞虎), Yang J-B(杨建兵), Hou Y-P(侯玉平), Liu M-Q(刘明求), Xiao F(肖伏). Study on stamen development of cytoplasmic male sterile line “Gexin 3” of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (Nat Sci Edn) (江西农业大学学报·自然科学版), 2006, 28(2): 170–174 (in Chinese with English abstract)
- [9] Liu Q-Y(刘齐元), Liu F-H(刘飞虎), Yang J-B(杨建兵), Hou Y-P(侯玉平), He H(何瀚). Cytological study on stamen development of cytoplasmic male sterile line “Yunyan 85” of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Guihaia* (广西植物), 2007, 27(2): 156–160 (in Chinese with English abstract)
- [10] Chase C D. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends Genet*, 2007, 23: 81–90
- [11] Rajender S, Rahul P, Mahdi A A. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*, 2010, 10: 419–428
- [12] Levings C S, Pring D R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize. *Science*, 1976, 193: 158–160
- [13] Boeshore M L, Hanson M R, Izhar S. A variant mitochondrial DNA arrangement specific to *Petunia* stable sterile somatic hybrids. *Plant Mol Biol*, 1985, 4: 125–132
- [14] Wang F, Feng C D, O'Connell M A, Stewart J M, Zhang J F. RFLP analysis of mitochondrial DNA in two cytoplasmic male sterility systems (CMS-D2 and CMS-D8) of cotton. *Euphytica*, 2010, 172: 93–99
- [15] Hang W, Wang L, Yi P, Tan X L, Zhang Z J, Zhu Y G, Li Y S, Zhu Y G. RFLP analysis for mitochondrial genome of CMS-rice. *Acta Genet Sin*, 2006, 33: 330–338
- [16] Sun L-Z(孙兰珍), Yao F-Y(姚方印), Li C-Y(李传友). RAPD analysing of CMS-T, K, V mtDNAs and cloning of mtDNA fragments associated with CMS-K in wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2001, 27(2): 144–148 (in Chinese with English abstract)
- [17] Yi P, Wang L, Sun Q P, Zhu Y G. Discovery of mitochondria chimeric gene associated with male sterility of Honglian-rice. *Chin Sci Bull*, 2002, 47: 744–747
- [18] Wei W-L(危文亮), Wang H-Z(王汉中), Liu G-H(刘贵华). Candidate sterility-related mitochondrial genes of NCa CMS in *Brassica napus* L. and its transcription regulated by restorer gene. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(1): 102–106 (in Chinese with English abstract)
- [19] Bergman P, Edqvist J, Farbos I, Glimelius K. Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial *atp1* transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 531–544
- [20] Fittera J T, Thomas M R, Niu C, Rose R J. Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* cybrids with carpelloid stamens. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 225–235
- [21] Zhao T(赵婷), Zhu T-Y(朱滕义), Liu Q-Y(刘齐元), Zhang M-L(张美良), Jiang H-Y(蒋海燕). SNP in tobacco mitochondrial gene *atp6* and its correlation with CMS. *Acta Agron Sin* (作物学报)

- 物学报), 2009, 35(9): 1655–1661 (in Chinese with English abstract)
- [22] Zhu T-Y(朱腾义), Fan D-D(范东东), Zhao T(赵婷), Liu Q-Y(刘齐元), Wang J-G(王建革), Zhu X-W(朱肖文), Cheng Y-Q(程元强). SNP detection in tobacco (*Nicotiana tabacum*) mitochondrial gene *CoxII* and its association with CMS. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 2010, 24(4): 720–727 (in Chinese with English abstract)
- [23] Liu Q-Y(刘齐元), Liu F-H(刘飞虎), Huang H-Q(黄海泉), He K-X(何宽信), Xiao F(肖伏). RAPD analysis of mitochondrial DNAs of cytoplasmic male sterile line and its maintainer in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (Nat Sci Edn)(江西农业大学学报·自然科学版), 2005, 27(6): 826–830 (in Chinese with English abstract)
- [24] Shakyawar S K, Joshi B K, Kumar D. SSR repeat dynamics in mitochondrial genomes of five domestic animal species. *Bioinform*, 2009, 15: 158–163
- [25] Ishii T, Takahashi C, Ikeda N, Kamijima O, Mori N. Mitochondrial microsatellite variability in common wheat and its ancestral species. *Genes Genet Syst*, 2006, 81: 211–214
- [26] Hosaka K, Sanetomo R. Comparative differentiation in mitochondrial and chloroplast DNA among cultivated potatoes and closely related wild species. *Genes Genet Syst*, 2009, 84: 371–378
- [27] Yan N(燕妮). SSR Analysis of Mitochondrial DNA of Some Sterile Lines of Rapeseed. MS Dissertations of Gansu Agricultural University, 2007. pp 1–40 (in Chinese with English abstract)
- [28] Hao C-Y(郝晨阳), Wang L-F(王兰芬), Jia J-Z(贾继增), Dong Y-C(董玉琛), Zhang X-Y(张学勇). Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 131: 144–149 (in Chinese with English abstract)
- [29] Castillo A, Budak H, Varshney R K, Dorado G, Graner A, Hernandez P. Transferability and polymorphism of barley EST-SSR markers used for phylogenetic analysis in *Hordeum chilense*. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 97–105
- [30] Studer B, Asp T, Frei U, Hentrup S, Meally H, Guillard A, Barth S, Muylle H, Roldán-Ruiz I, Barre P, Koning-Boucoiran C, Uenk-Stunnenberg G, Dolstra O, Sköt L, Sköt K P, Turner L B, Humphreys M O, Kölliker R, Roulund N, Nielsen K K, Lübberstedt T. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Mol Breed*, 2008, 21: 533–548
- [31] Simko I. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Hered*, 2009, 100: 256–262
- [32] Sharma V, Bhardwaj P, Kumar R, Sharma R K, Sood A, Ahuja P S. Identification and cross-species amplification of EST derived SSR markers in different bamboo species. *Conserv Genet*, 2009, 10: 721–724
- [33] Sugiyama Y, Watase Y, Nagase M, Makita N, Yagura S, Hirai A, Sugiura M. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol Gen Genomics*, 2005, 272: 603–615
- [34] Tong D-R(佟道儒), Niu P-L(牛佩兰), Luo Q-Z(骆启章), Bu G-Z(卜锅章). Study on breeding and utilization of a tobacco male sterile line. *Chin Tab* (中国烟草), 1980, 2: 5–8 (in Chinese)
- [35] Li W-Q(李文强), Zhang G-S(张改生), Wang K(汪奎), Niu N(牛娜), Pang D(潘栋). An efficient method for isolation of mitochondrial DNA in wheat. *Herditas* (遗传), 2007, 29(6): 771–775 (in Chinese with English abstract)
- [36] Bland M M, Matzinger D F, Levings C S. Comparison of the mitochondrial genome of *Nicotiana tabacum* with its progenitor-species. *Theor Appl Genet*, 1985, 69: 535–541
- [37] Li S, Tan Y, Wang K, Wan C, Zhu Y. Gametophytically alloplasmic CMS line of rice (*Oryza sativa* L.) with variant orfH79 haplotype corresponds to specific fertility restorer. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 1389–1397
- [38] Li S-S(李双双), Xue L-F(薛龙飞), Su A-G(苏爱国), Lei B-B(雷彬彬), Wang Y-M(王玉美), Hua J-P(华金平). Progress on sequencing and alignment analysis of higher plant mitochondrial genomes. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2011, 16: 22–27 (in Chinese with English abstract)
- [39] Wolfe K H, Li W H, Sharp P M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 9054–9058
- [40] Kubo T, Newton K J. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion*, 2008, 8: 5–14
- [41] Cho Y, Mower J P, Qiu Y L, Palmer J D. Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 17741–17746
- [42] Mouse S V. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 25–43
- [43] Clarkson J J, Kelly L J, Leitch A R, Knapp S, Chase M W. Nuclear glutamine synthetase evolution in *Nicotiana*: phylogenetics and the origins of allotetraploid and homoploid (diploid) hybrids. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 55: 99–112