

文章编号: 1005-0906(2005)03-0003-03

玉米同核异质不育系小孢子发育的 mRNA 多态性分析

曹墨菊^{1,2}, 荣廷昭², 朱英国¹

(1. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 四川农业大学玉米研究所, 四川 雅安 625014)

摘要: 应用 cDNA-RAPD 技术分析了玉米同核异质不育材料在小孢子发育过程中花粉发育相关基因表达的差异。结果表明, 在小孢子发育的相同时期, 引物 S330 在 48-2 背景下的不同胞质之间存在差异, 不同时期差异表现不一; 引物 S330 在黄早四背景下的不同胞质之间未检测到差异, 并且小孢子发育的 3 个时期表现一致。对同核异质不育系和同质异核不育系的比较发现, 核背景对 mRNA 转录的影响大于细胞质, 不育胞质 T、C、S 在 48-2 背景和黄早四背景下的差异表现不一。根据 S330 在 48-2 背景下的扩增结果, 发现基于 mRNA 多态性的相似性比较结果与不育细胞质的败育特点及败育时期具有较好的一致性, 即配子体不育类型与保持系的相似性高于孢子体不育类型, 孢子体不育类型之间的相似性高于孢子体不育与配子体不育的相似性。

关键词: 玉米; 细胞质雄性不育; cDNA-RAPD 分析; 同核异质系

中图分类号: S513.035.1

文献标识码: A

Polymorphism Detection and Analysis of mRNA from Isonucleur and Allocytoplasm Maize Male Sterility by cDNA-RAPD

CAO Mo-ju^{1,2}, RONG Ting-zhao², ZHU Ying-guo¹

(1. The Key Lab of Education Department for Plant Developmental Biology and Institute of Genetic, College of Life Science, Wuhan University 430072, China;

2. The Institute of Maize Research, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: cDNA-RAPD was employed to compare to the gene expression in developing anther among 2 sets of isonucleur and allocytoplasm maize male sterility. The results indicated that at the same development stage of microspore, primer S330 produces different bands under 48-2 nuclear background, but no difference was detected among different cytoplasm at 3 development stages of microspore under the Huangzaosi nuclear background. The effect of nuclear background on the mRNA polymorphism was bigger than the effect of cytoplasm. Based on the similarity analysis of mRNA polymorphisms, S₄₈₋₂ has higher similarity with N₄₈₋₂ than T₄₈₋₂ and C₄₈₋₂, among 3 different male sterile cytoplasm, T₄₈₋₂ and C₄₈₋₂ has higher similarity than another. These results were identical to the abortion style and characteristic of gametophyte male sterility and sporophyte male sterility.

Key words: Maize; Cytoplasmic male sterility; cDNA-RAPD; Isonucleur and allocytoplasm

植物细胞质雄性不育在杂交种子生产中具有重要的利用价值。分离和克隆这些不育基因是人们研究的最终目的。植物基因的分离及其表达调控可以从蛋白质、RNA 和 DNA 不同水平上进行。在不育基因表达的直接产物尚不清楚的情况下, 从蛋白质水平上分离基因有相当困难。虽然大量的研究结果表

明, 细胞质雄性不育与线粒体 DNA 有关, 但由于植物线粒体 DNA 的自身结构特点、线粒体基因的非孟德尔遗传特性以及实验技术的限制等原因, 使得从 DNA 水平上对细胞质雄性不育机理分子水平的解析与细胞质雄性不育基因的寻找进展一直比较缓慢。植物细胞质雄性不育的发生与育性恢复是核质互作的结果, 而核质互作对雄性不育特性的“保持”和“恢复”的影响机制相当复杂。首先导致雄性不育的核质不协调对线粒体的影响表现在细胞水平、DNA 水平、RNA 水平和蛋白质水平多个层次上; 其

收稿日期: 2004-10-14

基金项目: 四川省教育厅自然科学重点项目

作者简介: 曹墨菊(1965-), 女, 河北邯郸人, 副教授, 博士, 主要从事玉米遗传育种及分子生物学研究。Tel: 0835-2882455

E-mail: caomj@sicau.edu.cn

次导致雄性不育的核质不协调还可能表现为不育系的细胞质对外来的细胞核有选择的进行“定向”修饰功能^[1]。随着分子生物学理论和技术的发展,人们不仅发现不育与可育胞质之间线粒体基因转录、转录后的加工等方面存在差异,而且也发现翻译后的加工可能与细胞质雄性不育有关。因此,研究不同核遗传背景、不同组织器官、不同发育时期 RNA 的转录和蛋白表达的调控以及转录和翻译后 RNA 和蛋白质的加工规律与细胞质雄性不育的关系,对雄性不育分子机理的探讨具有重要意义。植物雄性不育的主要特征是不能形成有功能的花粉,而其它器官发育正常,所以对小孢子不同发育时期的花药进行研究,可以更直接的获得与雄性不育有关的一些信息。mRNA 差异显示技术自从 80 年代发展起来,经过十几年的发展与完善,在揭示生物体整个生命过程中的发育、分化、衰老与死亡等方面显示出广阔的应用前景^[2~8]。本研究从 RNA 水平上对玉米同核异质不育系花药败育过程中基因的表达特征进行初步观察与分析,为深入揭示雄性不育现象的发生和发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为两套同核异质玉米细胞质雄性不育系,它们分别为不育系 C_{48-2A}、T_{48-2A}、S_{48-2A} 及其保持系 N₄₈₋₂;不育系 C_{黄早四 A}、T_{黄早四 A}、S_{黄早四 A} 及其保持系 N_{黄早四},以上材料均经回交转育 8 代以上,T、C、S 分别为玉米的三大不育胞质类型,N 表示具有正常细胞质的保持系。48-2 和黄早四是两个常用玉米自交系。

1.2 实验方法

1.2.1 花药总 RNA 的提取

取上述 8 个材料的雄穗,在 4℃ 的低温冷库中,剥取小孢子发育至四分体、单核期和双核期的花药,液氮中研磨,加 2~3 倍体积的 Trizol。提取方法参照试剂盒的说明。

1.2.2 RNA 的 DNA 酶处理

为防止总 RNA 中可能混杂的 DNA 分子对后续操作产生的影响,利用无 RNase 的 DNA 酶进行消化处理。反应体系为:RNA 20 μL,10×DNaseI Buffer 5 μL,DNaseI 10U,RNasin 20U,用 DEPC 处理的无菌水定容至 50 μL。步骤:37℃ 温水浴 30 min,加 50 μL DEPC H₂O,再加 100 μL 氯仿,4℃ 10 000 g 离心 20 min,取上清液于另一无菌的离心管,加 10 μL 3M NaAC(pH=5.2),加 250 μL 预冷的无水乙醇,-20℃ 放置 30~60 min,4℃ 12 000 g 离心 10 min,弃上清,回收沉淀,预冷的 70% 的乙醇洗涤 5~10 min,真空干燥 8 min,加 15 μL DEPC H₂O 溶解。

1.2.3 cDNA 第一链的合成

RNA 5 μL,65℃ 变性 5 min;冰浴冷却 5~10 min;迅速加入下列成分:5×M-MLV 缓冲溶液 5 μL;dNTPs 10mmol/L 2 μL;随机六聚体引物 10 μM/L 1 μL;RNasin inhibitor 40U;M-MLV 酶 400U;DEPC H₂O 9 μL;22℃ 复性 10 min,37℃ 温浴 60 min;-70℃ 变性反转录酶 15 min,-20℃ 保存备用。

1.2.4 PCR 扩增及扩增产物的检测

反应体系:10×Buffer 2.5 μL,dNTPs 10 mmol/L 0.5 μL,cDNA 50 ng,MgCl₂ 1.5 μL,Taq 酶 2U,十聚体随机引物 2 μL,用无菌 H₂O 定容至 25 μL。反应程序:94℃ 2 min;94℃ 2 min,38℃ 2 min,72℃ 1.5 min,36 cycles;72℃ 10 min。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,凝胶成像系统观察。

2 结果与分析

运用 RAPD 方法对 8 个供试材料小孢子发育至不同时期的花药 RNA 进行差异展示分析。共用 RAPD 引物 64 个,其中引物 S330 能够揭示出差异并具有很好的重复性,其扩增结果见图 1。为便于分析,将电泳结果根据分离片段的大小分为大片段区域(b)和小片段区域(s),表现多态性的片段分别用 b1、b2、b3、b4 表示。

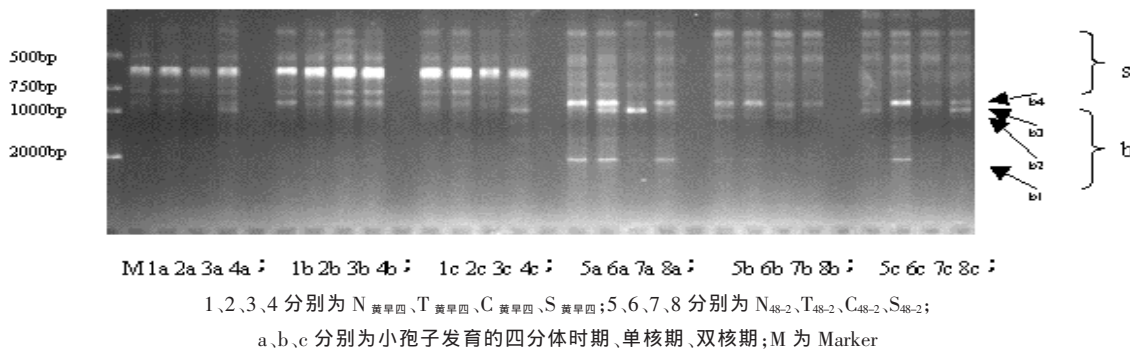


图 1 引物 S330 在同核异质系中的扩增结果

2.1 同核异质系的比较

黄早四背景下的不同胞质之间,在小孢子发育的四分体、单核期和双核期均未检测出主带区的稳定差异。48-2 背景下的不同胞质之间,在小孢子发育的三个时期均表现出一定的差异,且各个发育时期的差异表现不一。四分体时期: N_{48-2} 与 S_{48-2} 之间未检测出差异; T_{48-2} 与 N_{48-2} 相比多 1 条扩增带 b3; C_{48-2} 与 N_{48-2} 相比缺少扩增带 b1 和 b4,但增加 1 条扩增带 b3。单核期: N_{48-2} 、 T_{48-2} 、 C_{48-2} 扩增结果相同,均具有 b2 和 b4 扩增带,而 S_{48-2} 却只扩增出 b4 带。双核期: S_{48-2} 比 N_{48-2} 多 1 条 b2 带; T_{48-2} 比 N_{48-2} 多 1 条 b1 带,少 1 条 b3 带; C_{48-2} 比 N_{48-2} 少 1 条 b3 带。

2.2 同质异核系的比较

具有正常细胞质的黄早四与 48-2 扩增结果明显不同,黄早四的扩增带主要分布在 S 区,而 48-2 的扩增带则分布在 b 和 S 两个区,并且 48-2 背景下的不同细胞质之间的差异片段主要集中在 b 区。同质异核系如 T_{48-2} 与 $T_{\text{黄早四}}$ 、 C_{48-2} 与 $C_{\text{黄早四}}$ 、 S_{48-2} 与 $S_{\text{黄早四}}$ 以及 N_{48-2} 与 $N_{\text{黄早四}}$ 之间的差异远远大于同核异质系之间的差异,说明细胞核在控制 RNA 的转录调控方面占主导地位。

2.3 不同胞质的相似性比较

根据 S330 在 N_{48-2} 、 T_{48-2} 、 C_{48-2} 和 S_{48-2} 三个时期的扩增结果,算得不同细胞质之间的相似性系数见表 1。

表1 S330在同核异质系中的扩增结果及其相似性比较 %				
项 目	N_{48-2}	T_{48-2}	C_{48-2}	S_{48-2}
四分体	b4,b1	b4,b1,b3	b3	b4,b1
单核期	b4,b2	b4,b2	b4,b2	b4
双核期	b4,b3	b4,b1	b4	b4,b3,b2
N_{48-2}	100	76.9	70.0	83.3
T_{48-2}		100	72.2	61.5
C_{48-2}			100	

由表 1 的结果可以看出,在 T、C、S 三种类型的不育细胞质中,与 N_{48-2} 相似性最高的为 S_{48-2} (83.3%),其次为 T_{48-2} (76.9%),最小的为 C_{48-2} (70%)。对三种不育胞质 T、C、S 之间的相似性分析表明, T_{48-2} 和 C_{48-2} 的相似性最高为 72.2%, S_{48-2} 与 T_{48-2} 的相似性次之为 61.5%,而 S_{48-2} 与 C_{48-2} 的相似性最低仅为 40%。

通常配子体不育类型败育发生较晚,而孢子体不育类型败育发生较早,因此属于配子体不育的 S_{48-2} 与保持系的相似性高于属于孢子体不育的 T_{48-2} 和 C_{48-2} ;而在 T_{48-2} 、 C_{48-2} 、 S_{48-2} 三种不育胞质之间,因 T_{48-2} 、 C_{48-2} 均为孢子体不育类型,故二者的相似性高于孢子体不育 T_{48-2} 、 C_{48-2} 分别与配子体不育 S_{48-2} 的

相似。mRNA 转录水平的分析与细胞学上观察到的小孢子败育时期具有较好的吻合性。本研究从 RNA 水平上进一步印证了孢子体不育和配子体不育的败育特点。

以上结果说明,不同细胞质之间在小孢子发育的相同时期存在转录上的差异,这种差异既表现为转录本的数目上,也表现在转录本的丰度上。引物 S330 在两套同核异质系之间的扩增大于同一核背景下不同细胞质之间的扩增差异。不同细胞质之间在一种核背景下可能存在转录上的差异,而在另一种细胞核背景下可能表现一致。相同细胞质在小孢子发育的不同时期也存在着转录差异,如 T_{48-2} 在四分体时期扩增出 b1、b3、b4 三条带,在单核期扩增出 b2、b4 两条带,双核期扩增出 b1、b4 两条带。

3 讨 论

目前普遍认为植物细胞质雄性不育与线粒体的功能异常有关,线粒体功能异常可能表现为 DNA 水平的结构上,也可能表现为 RNA 水平的转录表达上。迄今大多数学者对细胞质雄性不育的研究主要是从 DNA 水平寻找差异,而从 RNA 水平进行研究的报道很有限。线粒体 RNA 的 3' 端没有 poly(A) 结构,或具有 poly(A) 结构但不够长或不稳定,正是因为线粒体 RNA 的这一结构特点,使得运用传统的差异展示方法研究线粒体 RNA 的多态性受到限制。本研究用随机六聚体取代 oligo (dT) 进行反转录获得 mRNA,一方面可以将线粒体 mRNA 纳入可研究的范畴,并且对具有 poly(A) 结构的 mRNA 和其它无 poly(A) 结构的 mRNA 也可以进行比较研究;另一方面可以克服传统的差异展示方法仅能分析 mRNA 的 3' 端或 5' 端的遗传信息,而位于转录物中部的更多的编码信息却得不到揭示的缺点。

由于获取大量线粒体 RNA,特别是花粉线粒体 RNA 的难度较大,本研究选用经多年转育的两套同核异质不育系为材料,提取花药的总 RNA 进行 cDNA-RAPD 分析,由此所揭示的差异可以反映出线粒体或核质互作的变化对 RNA 转录的影响。

已有的研究表明,同一种不育细胞质在不同核背景下败育方式存在差别^[9-11]。本研究通过 cDNA-RAPD 分析检测到 48-2 和黄早四两种核背景下的同核异质系之间存在 mRNA 多态性。由同核异质和同质异核两类材料的扩增结果可以发现,核背景对线粒体基因转录的影响大于细胞质。根据 mRNA 的多态性片段对 T、C、S 和 N 进行相似性分析,所得结果与孢子体不育和配子体不育的败育特(下转第 9 页)

(上接第5页)点有较好的一致性,即S型与N型的相似性高于T、C型,T型和C型相似性高于二者分别与S型相似性。综上所述,mRNA的多态性既存在于同核异质系的不同细胞质之间,也存在于同质异核系的不同核背景之间,不同胞质之间的差异表现既受核背景的影响也受小孢子发育时期的影响。

参考文献:

- [1] 郭晓才.核基因组在细胞质雄性不育中的作用研究:背景与现状[J].应用与环境生物学报,2001,7(3):297-301.
- [2] John M S Bartlett. Approaches to the analysis of gene expression using mRNA. Molecular Biotechnology, 2002, 21: 149-160.
- [3] Shan Liang S, Paul Rossby, Peng Liang, et al. Detection of an mRNA polymorphism by differential display. Molecular Biotechnology, 2001, 19: 121-124.
- [4] 侯 磊,肖月华,李先碧,等.棉花不育系花药发育的 mRNA 差别显示[J].遗传学报,2002,29(4):359-363.
- [5] 吴敏生,高志环,戴景瑞.利用 cDNA-AFLP 技术研究玉米基因的差异表达[J].作物学报,2001,27(3):339-342.
- [6] 易 平,万翠香,汪 莉,朱英国.一种适用于线粒体基因表达分析的 cDNA-RAPD 方法[J].遗传,2002,24(3):339-341.
- [7] 江树业,陈启锋,方宣钧.利用 cDNA-RAPD 技术分析籼稻光敏核不育基因的差异表达[J].科学通报,1998,43(23):2521-2524.
- [8] 王学德,朱英国.水稻雄性不育与可育花药的 mRNA 差别显示和 cDNA 差别片段的分析[J].中国科学(C 辑),1998,28(3):257-263.
- [9] 罗红兵,黄 璜,朱卫平,戴林健.玉米 GDS 细胞质雄性不育系的细胞学观察[J].湖南农业大学学报,2003,29(2):109-111.
- [10] 杨俊品,高之仁,荣廷昭.同核异质玉米细胞质雄性不育系的细胞学比较研究[J].四川农业大学学报,1990,8(3):238-242.
- [11] 陈伟程,段韶芬.玉米 C 型细胞质雄性不育系花药发育的细胞学观察[J].作物学报,1988,14(3):177-178.
- [12] 孙庆泉,荣廷昭.玉米雄性不育材料的研究和利用进展[J].玉米科学,2003,11(2):22-27.
- [13] 马 冲,陈举林,李兴锋,等.S 型雄性不育自交系配合力分析研究[J].玉米科学,2003,11(4):22-27.