

红莲型和野败型水稻细胞质雄性不育系线粒体DNA(mtDNA)的比较研究*

梅启明 朱英国**

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

提 要 以水稻红莲型和野败型细胞质雄性不育系为材料,用不连续蔗糖梯度离心法提纯线粒体,以饱和酚-氯仿-异戊醇法抽提mtDNA。用琼脂糖电泳和电泳观察比较不育系mtDNA差异,发现不育系中有小分子mtDNA(即 m_2 和 m_3),不同细胞质间的小分子mtDNA存在差异。在不育系与保持系间名为 m_1 的大分子mtDNA无差异;本文还研究了mtDNA m_1 的理化性质。

关键词 细胞质雄性不育系;线粒体DNA;限制性内切酶

关于线粒体在细胞质雄性不育形成中的作用问题,杜尔宾等人认为,这种细胞器是在双重的遗传系统——即细胞核DNA与mtDNA的控制下发育并起作用的^[1]。Levings和Pring等人曾先后用E.COR I和Hind III对玉米细胞质雄性不育系和同型保持系mtDNA进行酶解,酶解片段的电泳图谱在细胞质雄性不育系和保持系间存在明显差异^[9,15]。Yamaguchi等人首先从水稻BT型细胞质雄性不育系mtDNA中发现存在类似玉米细胞质雄性不育系中小环mtDNA B—1和B—2^[21]。我们以水稻红莲型青四矮和野败型珍汕97细胞质雄性不育系(A)与同型保持系(B)为材料,对不同来源的细胞质雄性不育系的mtDNA进行初步的比较研究。为深入探讨水稻细胞质雄性不育性的遗传学机理奠定基础。

材 料 与 方 法

材料来源 红莲型青四矮(A)、(B)由广东省佛山市农科所提供;野败型珍汕97(A)、(B)由湖北省种子公司提供。

培育黄化苗 准确称取除去瘪粒的干种子,用15%的次氯酸钠溶液浸泡表面消毒10分钟,然后用无菌水冲洗干净。25℃浸种两昼夜。在干净的有盖白瓷盘中铺三层滤纸,并注入无菌水使滤纸充分浸透,插上种子并加盖。在25℃恒温培养箱中暗处发芽长苗8天约6cm长,收获根和黄化苗部分,去掉残存颖壳,用无菌水冲洗干净,放入-80℃冰箱一昼夜或保存备用。

本文于1988年2月9日收到。

*国家自然科学基金资助项目。

**电泳观察鉴定得到武汉大学病毒系电泳室胡远扬老师指教,谨此致谢。

线粒体及mtDNA的提取与纯化 线粒体及 mtDNA的提取与纯化方法基本上依照 McNay 等人和黄大年等人程序, 在我们的实验中, 对其程序作了适当的补充和修改^[4, 12]。

1. 线粒体的分离与纯化 从 -80°C 冰箱取出供试材料在低温室用剪刀截至1 cm左右, 置于内径20 cm的玻璃研钵中, 充入适量液氮迅速研磨1—2分钟使其呈粉状, 加入冷冻的匀浆介质(0.5 M 蔗糖, 0.005 M Na_2EDTA , 0.1% BSA, 0.005 M β -巯基乙醇, 0.005 M Tris-HCl, pH7.5) 100 ml, 充分混匀用两层纱布过滤, 再用10层纱布过滤, 滤渣再重复研磨1分钟后加入冷冻匀浆介质100 ml 混匀并过滤。两次所得滤液迅速经 $1000\times g$, 4°C , 离心13分钟得上清液, 再经 $16000\times g$, 4°C , 离心10分钟收集沉淀, 沉淀悬浮于35 ml 悬浮介质(0.3 M 蔗糖, 0.1% BSA, 0.04 M MgCl_2 , 0.05 M Tris-HCl, pH7.5, 临用时加入DNA酶 I 1.5 mg/35 ml) 4°C 酶解1小时, 之后加入等体积洗涤介质(0.6 M 蔗糖, 0.1% BSA, 0.02 M Na_2EDTA , 0.01 M Tris-HCl, pH7.5) 混匀置片刻, 经 $12000\times g$, 4°C , 离心20分钟, 沉淀再经 $12000\times g$ 洗一次, 以彻底除去DNA酶。最后经 $16000\times g$, 4°C , 离心10分钟得沉淀并悬浮于15 ml 洗涤介质, 得到线粒体粗制样品。

线粒体的纯化采用铺梯度法。不连续蔗糖梯度由1.0 M 蔗糖溶液(1.0 M 蔗糖, 10 mM Tris-HCl, 0.1% BSA, pH7.4) 和1.6 M 蔗糖溶液(1.6 M 蔗糖, 10 mM Tris-HCl, 0.1% BSA, pH7.4) 组成。用时取100 ml 离心管, 先加入35 ml 1.6 M 蔗糖溶液, 再顺管壁慢慢加入35 ml 1.0 M 蔗糖溶液, 然后将15 ml 线粒体粗制样品加在不连续蔗糖梯度上面, $40000\times g$, 4°C , 离心1小时, 线粒体带聚集1.0 M 和1.6 M 蔗糖溶液的交界处。小心收获线粒体带并加入4倍体积洗涤介质, 混匀。经 $17000\times g$, 4°C , 离心15分钟得线粒体沉淀, 并重复一次蔗糖梯度离心。最后所得的沉淀即为纯化的线粒体, 用10 ml 裂解液(0.002 M Na_2EDTA , 0.01 M Tris-HCl, pH8.0) 悬浮, 并取样进行电泳鉴定。悬浮液可较长时间放入 -80°C 冰箱内保存备用。

2. mtDNA 的提取与分离纯化 将纯化了的线粒体样品液于三角瓶中加入蛋白酶K (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37°C 保温30分钟, 再加 SDS 至终浓度为0.5%, 继续 37°C 保温1小时, 置冰浴中加入等体积饱和酚(0.1 M Tris 溶液饱和) 于三角瓶中轻荡20分钟, 经 $7000\times g$, 0°C , 8分钟离心分层, 小心吸取上层水相, 并重复用氯仿抽提2—3次至无蛋白层, 上层水相中加入1/10倍体积8 M 醋酸铵混匀, 再加入2.5倍体积冷无水乙醇混匀可置 -20°C 冰箱过夜, 经 $12000\times g$, 0°C , 离心40分钟得粗 mtDNA 沉淀, 沉淀溶于0.5 ml TE (10 mM Tris, 0.5 mM Na_2EDTA , pH8.0) 缓冲液中, 并取样进行电泳观察鉴定, 其余用于 mtDNA 的分离纯化去 RNA。

mtDNA 的分离纯化采用琼脂糖电泳法。在长12 cm, 宽10 cm 的自制水平平板电泳槽中制备0.6 cm 厚的琼脂糖凝胶(含有溴化乙锭0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 在胶板负极端模制一条长8 cm, 宽0.5 cm 的点样沟, 于室温凝胶1小时即可上样。电泳缓冲液为0.03 M Tris-HCl, 0.036 M NaH_2PO_4 , 0.001 M Na_2EDTA , pH7.8。电泳先加100 V 电压, 约20分钟样品出点样沟后, 在平板槽中加入电泳缓冲液使液面高出胶面2 mm 左右, 再调到50 V 电压电泳10小时左右结束电泳。在紫外灯下照相并迅速切下大分子 mtDNA_{m1} 带。移入预先处理好的透析袋中加入5 ml TE 缓冲液, 扎好袋口, 在注满电泳缓冲液的电泳槽中

80V 电压电泳 3 小时, 以使 mtDNA 从切下的胶中析出, 再换插正负电极电泳 3 分钟以脱离粘附袋壁的 mtDNA。结束电泳, 弃去凝胶, 所得 mtDNA 样品对 0.1SSC (0.015 M NaCl, 0.00015 M 柠檬酸三钠, pH7.0) 透析 24 小时, 中途换透析液 5 次。取出透析袋中 1/5 体积 mtDNA 样品液直接用于 mtDNA 紫外吸收特征和 T_m 值的测定。4/5 体积用 2.5 倍体积冷冻乙醇混匀, 置 -20°C 冰箱沉淀过夜, 经 $12000 \times g$, 0°C , 离心 40 分钟得 mtDNA 沉淀, 并溶于 $100\mu\text{l}$ TE 缓冲液中, 在 4°C 下保存用于 mtDNA 样品的电泳鉴定及限制性内切酶酶解电泳。

电镜观察鉴定 电镜观察和拍照在 JEM-100CX 电子显微镜下进行。

1. 线粒体的电镜鉴定 将纯线粒体样品经稀释后直接捞到碳-火棉胶铜网上, 待干燥后上机观察, 在 80KV, 10000X 下观察和照相。

2. mtDNA 的电镜鉴定 综合应用胡远扬、Klemschmidt、Ferguson 等人的水合展开法^[3, 6, 8]。用复 Formvar 膜的铜网捞膜, 于醋酸双氧铀中染色 30—60 秒, 再浸入无水乙醇中脱染、脱水, 放在滤纸上凉干, 置真空喷镀仪中用铂 (Pt) - 钯 (Pd) 合金小角度旋转投影以增加反差, 电镜观察时由于 Formvar 膜不耐电子束, 故加速电压不宜过高, 我们在 60KV, 10000X 下观察 7200X 下照相。底片放大 11 倍后用图形数字转换器描述, 并换算成绝对长度并按 Long^[10] 的公式, $1\mu\text{m}$ 长相当于 2.07×10^6 道尔顿计算分子量。

mtDNA 的纯度和 mtDNA 熔点温度的测定 mtDNA 的纯度鉴定采用 752 型分光光度计分别检测 O.D260、O.D230、O.D280, 按照 Mandel 等人的方法^[12] 测定熔点温度, 在日本岛津 QK-50 型紫外分析仪上, 从 25°C 逐渐升温, 记录各温度的 260nm 吸收值, 直至吸收值不再增加。对升温时溶液的蒸发和膨胀产生的影响都进行校正, 以尽量避免误差。

mtDNA 的鉴定及限制性内切酶酶解 mtDNA 的鉴定, 在上述自制水平平板电泳槽中制备 0.4cm 厚的 0.8% 琼脂糖凝胶 (含有溴化乙锭 $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$), 50V 电压电泳 10 小时, 在紫外灯下观察和照相。限制性内切酶酶解反应采用中国科学院生物物理所生化厂生产的限制性内切酶。Pst I 的酶解反应体系为: $2\mu\text{g}$ mtDNA 样品液, $2\mu\text{l}$ Pst I 原液, 加反应液 (20mM Tris, 10mM MgCl_2 , 50mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 至最后体积为 $25\mu\text{l}$, 于 30°C 水浴保温消化 2 小时。反应结束后加 1/5 倍体积终止反应液 (70% 蔗糖, 100mM Na_2EDTA , 0.5% SDS, 0.1% 溴酚兰, pH7.5), 然后于 65°C 水浴中保温 10 分钟, 迅速冷至 0°C , 供电泳使用。E·CORI 和 BamHI 双酶酶解反应参照 Haggerty 等人的方法进行^[7]。电泳在长 30cm 宽 10cm 的自制水平平板槽中进行。琼脂糖凝胶厚度为 0.4cm, 以 45V 电压电泳 20 小时左右, 染色在溴化乙锭溶液 ($1.5\mu\text{g}/\text{ml}$) 中浸泡 30 分钟, 再用蒸馏水浸泡 20 分钟, 然后在紫外灯下观察和照相。

结果与分析

1. 线粒体的纯化与 mtDNA 的鉴定

采用不连续蔗糖梯度纯化收集的线粒体, 经电镜观察, 排除了叶绿体的污染, 获得了高纯度的线粒体 (图版 I)。

用纯的线粒体提取的 mtDNA 经紫外检测, 表明所测 mtDNA 具有一般天然 DNA 的

紫外吸收光谱, 最大吸收峰在 260nm 处, 最低吸收峰在 230nm 处。O.D260/O.D230 的比值在 1.969—2.010 之间, O.D260/O.D280 的比值在 1.827—1.853 之间 (见表 1), 所测样品 mtDNA 均未检出 RNA 和蛋白质。

表 1 mtDNA 的紫外吸收值测定结果

Table 1 Evaluation of mtDNA ultraviolet absorption

材料 Material	O.D260	O.D230	O.D280	O.D260/O.D230	O.D260/O.D280
青四矮(A) Qingsiai(A)	0.382	0.194	0.208	1.969	1.836
青四矮(B) Qingsiai(B)	0.358	0.181	0.196	1.978	1.827
珍汕97(A) Zhenshan97(A)	0.404	0.201	0.218	2.010	1.853
珍汕97(B) Zhenshan97(B)	0.374	0.188	0.202	1.989	1.851

提取的 mtDNA 以 λ DNA 为对照, 经琼脂糖凝胶电泳纯化所得的 mtDNA 完全排除了 RNA 的污染 (图版 I : 2, 3)。从图版 I : 2 中看出, 所测样品 mtDNA 除大分子 m_1 外, 还存在分子量略小于 m_1 的 m_2 分子和分子量小的 m_3 。

对提取的 mtDNA 进行电镜观察其分子特征, 所测样品 mtDNA 大多为线形和开环分子 (图版 II : 1, 2)。

2. 两种雄性不育细胞质 mtDNA 的比较分析

提取的 mtDNA 经琼脂糖凝胶电泳和电镜观察结果表现两种细胞质雄性不育系和同型保持系 mtDNA 存在差异。

琼脂糖凝胶电泳 mtDNA 的琼脂糖凝胶电泳出现三条明显的 DNA 带, 取名为 m_1 、 m_2 、 m_3 。 m_1 分子量较大迁移率与 λ DNA 相近, m_2 、 m_3 分子量较小。不育系与保持系比较, 红莲型青四矮 (A)、(B) 与野败型珍汕 97 (A)、(B) 的 m_1 均相同, 它们的差异在 m_2 和 m_3 , 青四矮 (B) 和珍汕 97 (B) 中均缺少 m_2 和 m_3 ; 不同细胞质的不育系比较, 红莲型青四矮 (A) 仅出现 m_3 , 而野败型珍汕 97 (A) 则出现了 m_2 和 m_3 , 即细胞质间存在差异 (图版 I : 2)。

电镜观察进一步对红莲型青四矮 (A)、(B), 野败型珍汕 97 (A)、(B) 的 mtDNA 进行电镜观察。观察到几种类似质粒状小环分子 mtDNA, 青四矮 (A) 中有两种类型 (图版 II : 4, 6), 测得分子长度分别为 $2.50\mu\text{m}$ 和 $1.28\mu\text{m}$, 根据公式 $1\mu\text{m} = 2.07 \times 10^6$ 道尔顿得到分子量分别为 5.18×10^6 道尔顿 (7.97kb) 和 2.64×10^6 道尔顿 (4.10kb); 珍汕 97 (A) 中有三种类型 (图版 II : 3, 5, 7), 测得分子长度分别为 $3.22\mu\text{m}$ 、 $1.64\mu\text{m}$ 和 $0.51\mu\text{m}$, 其分子量分别为 6.66×10^6 道尔顿 (10.25kb)、 3.40×10^6 道尔顿 (5.23kb) 和 1.05×10^6 道尔顿 (1.62kb)。而这种小环状分子 mtDNA 在同型保持系中尚未发现。这与 mtDNA 的电泳结果相吻合, 这些小分子 mtDNA 可能与雄

性不育性有关, 与在玉米^[10]、水稻^[21]的文献报道相符。

3. mtDNAm₁的理化特性鉴定

mtDNAm₁在分离纯化电泳和鉴定电泳中均表明两种细胞质雄性不育系和保持系间不存在差异(图版I: 2, 3), mtDNAm₁与细胞质雄性不育性是否相关, 我们对所测样品mtDNAm₁进行了深入研究。

(1) 融点温度及G.C含量的测定 通过电泳分离得到所测样品mtDNAm₁, 并经

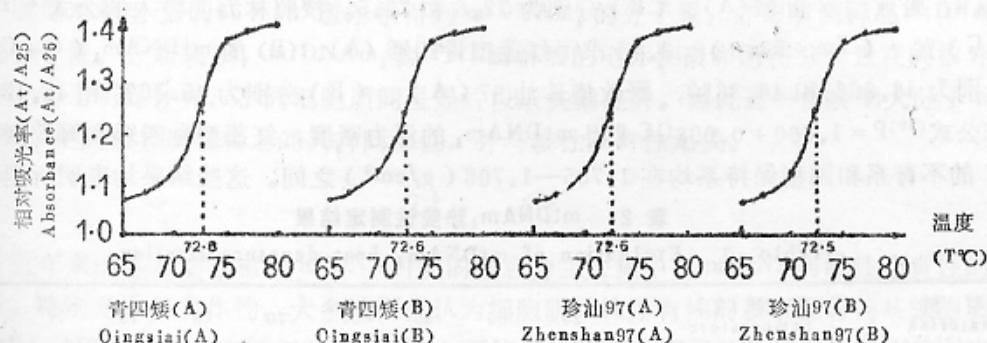


图1 mtDNAm₁的热变性曲线
Fig. 1 Curve of mtDNAm₁ heat-denaturation

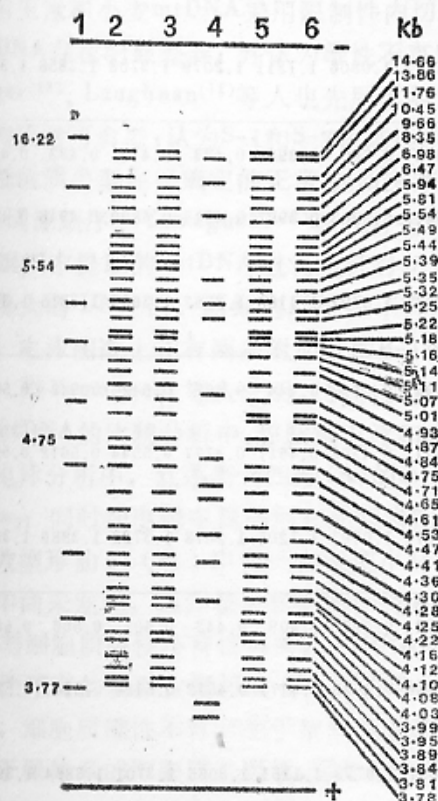


图2 mtDNAm₁的PstI限制片段图谱

1. λ DNA + E. CORI + BamHI;
- 2, 3. 青四矮(A), (B);
4. λ DNA + PstI;
- 5, 6. 珍汕97(A), (B)

Fig. 2 Restriction site map of mtDNAm₁

- PstI by electrophoresis
1. λ DNA + E. CORI + BamHI;
 - 2, 3. Qinghai(A), (B);
 4. λ DNA + PstI;
 - 5, 6. Zhenshan 97(A), (B)

0.1SSC 透析后, 在紫外分析仪上从 25℃ 逐渐升温并记录各温度的 260nm 吸收值, 得到表 2。由表 2 得到所测样品的 mtDNAm₁ 热变性曲线(图 1)显示, mtDNAm₁ 的 260nm 处光吸收在 25—70℃ 范围内经过一段低色效应过程, 红莲型青四矮(A)、(B) 分别仅增值 12.1% 和 11.6%, 野败型珍汕 97(A)、(B) 分别仅增值 12% 和 11.5%。在 70—75℃ 范围内红莲型青四矮(A)、(B) 增值值剧增至 37.1% 和 36.8%, 野败型珍汕 97(A)、(B) 剧增至 37.2% 和 37%, mtDNAm₁ 分别发生变性, 这表明了 DNA 的双链特性。根据图 1 曲线得到红莲型青四矮(A)、(B) mtDNAm₁ 的 T_m 值分别为 72.8 和 72.6, 野败型珍汕 97(A)、(B) 分别为 72.6 和 72.5。按照林万明等人的公式^[2]: $(G + C) \% = (T_m - 53.6) \div 2.44$ 求得红莲型青四矮(A)、(B) 的 mtDNAm₁ (G + C) % 分别为 46.86% 和 46.36%, 野败型珍汕 97(A)、(B) 分别为 46.36% 和 46.12%。按公式^[20] $P = 1.660 + 0.098GC$ 求得 mtDNAm₁ 的浮力密度, 红莲型青四矮和野败型珍汕 97 的不育系和同型保持系均在 1.705—1.706 (g/cm³) 之间。这些结果均表明所测样品

表 2 mtDNAm₁ 热变性测定结果Table 2 Evaluation of mtDNAm₁ heat-denaturation

材料 Material	温度(℃) Temperature	25	60	65	67	70	72	75	77	80
青四矮(A) Qingsiai (A)	吸光率(260nm) Absorbance(260nm)	0.382	0.393	0.401	0.406	0.420	0.452	0.512	0.517	0.520
	校正膨胀体积后的吸光率 Absorbance after adjusting inflatable volume	0.3820	0.3985	0.4077	0.4128	0.4283	0.4614	0.5236	0.5294	0.5335
	相对吸光率At/A25 Relative absorbance (At/A25)	1.0000	1.0431	1.0672	1.0806	1.1211	1.2079	1.3708	1.3858	1.3966
青四矮(B) Qingsiai (B)	吸光率(260nm) Absorbance(260nm)	0.358	0.368	0.375	0.380	0.392	0.423	0.479	0.483	0.486
	校正膨胀体积后的吸光率 Absorbance after adjusting inflatable volume	0.3580	0.3731	0.3813	0.3863	0.3997	0.4318	0.4899	0.4946	0.4986
	相对吸光率At/A25 Relative absorbance (At/A25)	1.0000	1.0424	1.0651	1.0792	1.1165	1.2062	1.3685	1.3815	1.3928
珍汕97(A) ZhenShan 97(A)	吸光率(260nm) Absorbance(260nm)	0.404	0.415	0.424	0.429	0.444	0.468	0.542	0.548	0.551
	校正膨胀体积后的吸光率 Absorbance after adjusting inflatable volume	0.4040	0.4219	0.4311	0.4362	0.4527	0.4777	0.5544	0.5612	0.5653
	相对吸光率At/A25 Relative absorbance (At/A25)	1.0000	1.0418	1.0671	1.0797	1.1205	1.2078	1.3722	1.3889	1.3993
珍汕97(B) Zhenshan 97(B)	吸光率(260nm) Absorbance(260nm)	0.374	0.383	0.392	0.397	0.409	0.442	0.501	0.506	0.509
	校正膨胀体积后的吸光率 Absorbance after adjusting inflatable volume	0.3740	0.3894	0.3986	0.4036	0.4171	0.4512	0.5124	0.5181	0.5222
	相对吸光率At/A25 Relative absorbance (At/A25)	1.0000	1.0412	1.0657	1.0793	1.1151	1.2065	1.3701	1.3854	1.3963

之间大分子 mtDNA_{m1} 无明显差异, 因此推测, mtDNA_{m1} 在不同品系的水稻 mtDNA 中具有同源性。

(2) 限制性内切酶分析及分子量测定 以 λ DNA 经 BamHI 和 E·CORI 双酶酶解得到的 11 个片段为标准⁽⁷⁾。与 PstI 对所测样品 mtDNA_{m1} 的酶解片段同时电泳, 在紫外灯下观察和照相得到图版 I : 4。由图版 I : 4 和图 2 可看出, 红莲型青四矮 (A)、(B) 均被割成 45 个片段, 野败型珍汕 97 (A)、(B) 均被切割成 47 个片段。并按照文献⁽¹⁹⁾的计算方法, 以对照 λ DNA 酶解片段为标准确定各片段大小和积加各片段分子量总和, 以 1 千碱基对相当于 0.65×10^6 道尔顿得到 mtDNA_{m1} 的分子量, 亦即所测样品 mtDNA 的最低分子量。分析表明, mtDNA_{m1} 经 PstI 酶解后的电泳图谱和所得分子量在同核异质材料之间无明显差异, 不同细胞质间呈显片段缺失的差异。因此进一步表明大分子 mtDNA_{m1} 在同核异质材料之间具有同源性, 并与雄性不育性无关。

讨 论

近年来国外对高等植物 mtDNA 研究的注意力主要集中在 mtDNA 与雄性不育性的关系上。特别是禾谷类作物, 大多数研究认为细胞质雄性不育性的表型发育与其细胞质中 mtDNA 基因组的差异直接相关, mtDNA 可能是雄性不育因子的载体。Pring^(16,17) 等人先后在玉米和高粱雄性不育细胞质中发现小分子 mtDNA, 并认为某些低分子量的线形或环状 DNA 与雄性不育细胞质的 mtDNA 有关。Levings⁽⁹⁾、Pring⁽¹⁵⁾、Quetier⁽¹⁴⁾ 等人分别对玉米和小麦 mtDNA 采用限制性内切酶分析证实雄性不育细胞质与正常可育型细胞质 mtDNA 存在明显差异; 并认为雄性不育细胞质的产生与细胞质基因组有关。McNag⁽¹²⁾、Roger⁽¹⁸⁾、Laughnan⁽¹¹⁾ 等人也先后用限制性内切酶对玉米 mtDNA 进行分析能区分出不育型与正常可育型; 认为 S-1 和 S-2 在雄性不育细胞质中可能具有同源性; 并发现所有雄性不育细胞质类型在已确定的正常胞质玉米品系原来的 S-1 位置上, 主要 mtDNA 都失去了 S-1 同源顺序。Yamaguchi⁽²¹⁾ 等人首先将水稻 BT 型包罗 II-台中 65 和普通水稻台中 65 愈伤组织中提取的 mtDNA 进行电泳分析比较, 发现台中 65 mtDNA 电泳图谱只有一条分子量大的 DNA 带, 而细胞质雄性不育水稻包罗 II-台中 65 除 DNA 分子量大的带外, 电泳图谱上还有两条附加带即 B-1 和 B-2。

继 Yamaguchi 等人之后, 我们在水稻红莲型与野败型细胞质雄性不育系及同型保持系 mtDNA 的比较分析中, 琼脂糖电泳和电镜观察结果均表明不育系中存在小分子 mtDNA。在电泳分析中, 红莲型青四矮 (A) 的 mtDNA 存在小分子 m₃, 野败型珍汕 97 (A) 存在 m₂ 和 m₃; 同时在电镜中观察到红莲型青四矮 (A) mtDNA 中有两种类型小环 mtDNA 分子, 野败型珍汕 97 (A) 中有三种类型小环 mtDNA 分子; 而这些小分子 mtDNA 在同型保持系中尚未发现。因此较之相应的保持系, 不育系中存在的这几种小分子 mtDNA 可能直接与细胞质雄性不育性有关, mtDNA_{m3} 在不同雄性不育细胞质类型中可能具有同源性; 雄性不育的表型发育可能与不育系中 mtDNA 基因组调控核基因的表达有关。同时还表明, 细胞质雄性不育产生于核质关系的改变, 核质关系改变后的雄性不育细胞质具有不同于保持系的细胞质基因组, 因此细胞质基因组与细胞质雄性不育的产生有关, 不同细胞质间的差异也与其细胞质基因组的差异有关。因此推测, mtDNA 基因组很可能存在调控

绒毡层失调的作用,以致不育系花药中绒毡层畸形增生,造成花粉母细胞解体,最终导致雄性不育。所以关于小分子 mtDNA 确有深入研究的价值,如果存在几种类型小分子 mtDNA 引起细胞质雄性不育,则借以人为地改造普通水稻细胞质为雄性不育细胞质将成为可能。

参 考 文 献

- 1 杜尔宾等.《植物细胞质雄性不育的遗传学原理》.农业出版社,1975
- 2 林万明等.微生物学通报,1981; 8(5): 245—247
- 3 胡远扬等.电子显微学报,1986; 5(3): 107
- 4 黄大年等.遗传,1986; 8(4): 22—23
- 5 Abbott A G et al. *Plant Molecular Biology*, 1985; 4: 223—240
- 6 Ferguson J et al. In "Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy" II (Specific Ultrastructural Probes), Edited by Kocher J K. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979; 123
- 7 Haggerty D M et al. *J Virology*, 1976; 18: 659—663
- 8 Kleinschmidt A K. In "Methods in Enzymology" Edited by Colowick S P et al. New York-London Academic Press, Vol XII B, 1968; 361
- 9 Levings C S III. *Science*, 1976; 193: 158—160
- 10 Long D. *J Molecular Biology*, 1970; 54: 557
- 11 Laughnan J R et al. *Ann Rev Genet*, 1983; 17: 27—48
- 12 McNay J W et al. *Plant Molecular Biology*, 1983; 2: 177—187
- 13 Mandel M et al. *Methods in Enzymology*, 1968; 12: 195—206
- 14 Ouetier F et al. *Nature*, 1977; 268: 365—368
- 15 Pring D R et al. *Genetics*, 1978; 89(1): 121—136
- 16 Pring D R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 2904—2908
- 17 Pring D R et al. *Crop Science*, 1982; 22: 414—421
- 18 Roger J et al. *Nature*, 1980; 284: 565—566
- 19 Southern E M. *Analytical Biochem*, 1979; 100: 319—323
- 20 Schildkrant C L et al. *J Molecular Biology*, 1962; 4: 430—443
- 21 Yamaguchi et al. *Jpn J Genet*, 1983; 58: 607—611

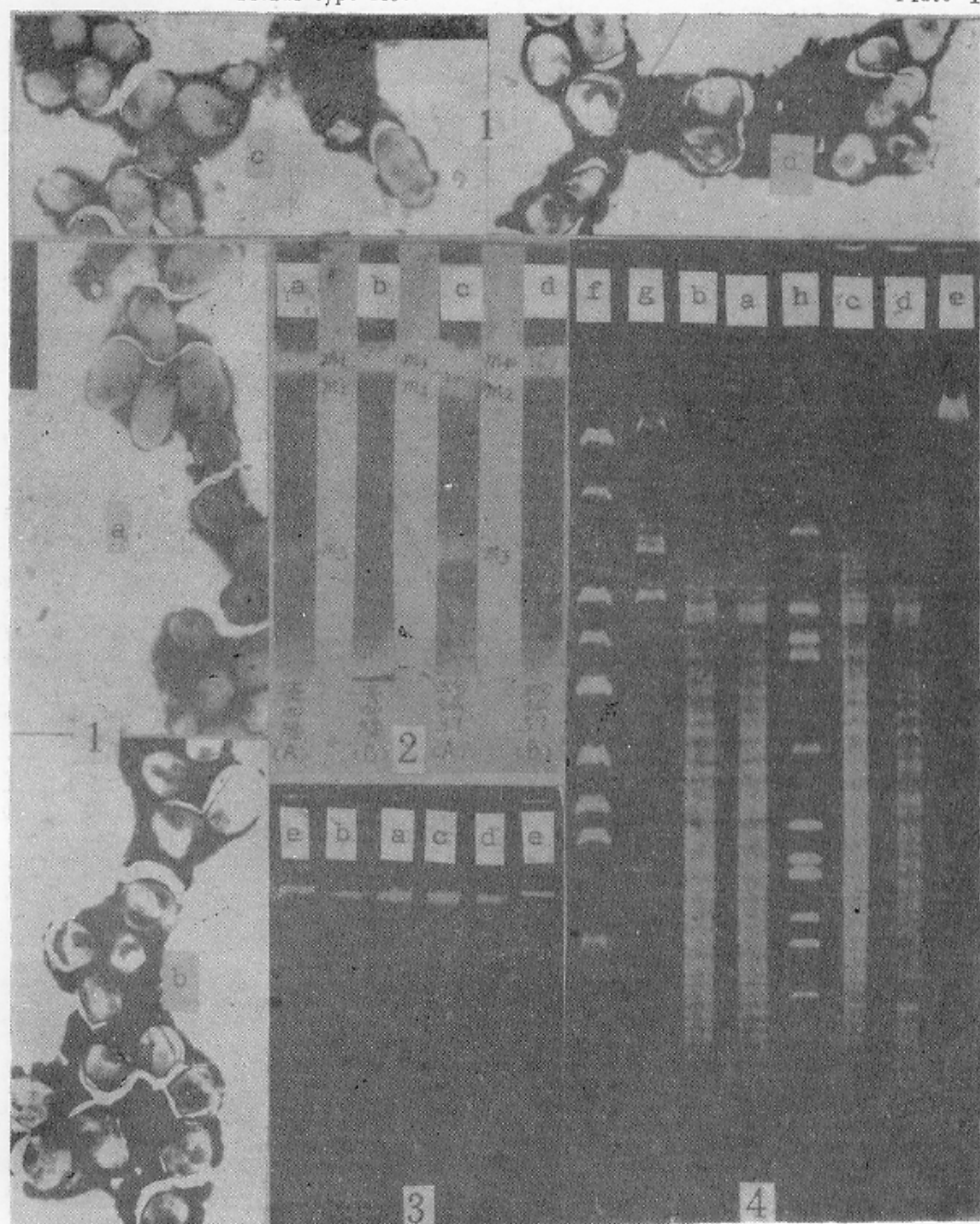
COMPARATIVE STUDY ON MITOCHONDRIAL DNA FROM CYTOPLASMIC MALE STERILE LINES OF HONGLIAN TYPE AND YIEBAI TYPE RICE

Mei Qiming, Zhu Yingguo

(Department of Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract In the experiments the cytoplasmic male sterility lines from Honglian type and Yiebai type rice were used. Chloroplasts were purified by discontinuous sugar density gradient centrifugation, and mtDNAs were isolated with saturated phenol-chloroform-iso-Amyl alcohol method. In comparative study on those mtDNAs, it is indicated that there were some small cycle mtDNAs named m_2 , m_3 and these small cycle mtDNAs were different between two cytoplasm types based on agarose gel electrophores and electron microscope observation. No difference was founded in the great-molecular mtDNAs named m_1 between sterile and maintainer lines. The experiments also dealt with biochemistic character of mtDNA m_1 .

Key words Cytoplasmic male sterility, lines, Mitochondrial DNA (mtDNA); Restriction endonucleases



线粒体的鉴定及mtDNA的电泳分析

1. 线粒体的纯化鉴定; 2. mtDNA的电泳分离纯化; 3. mtDNAm₁的电泳鉴定;
 4. Pst I 对mtDNAm₁的酶解电泳图谱
 - a. 红莲型青四矮(A); b. 红莲型青四矮(B); c. 野败型珍汕97(A); d. 野败型珍汕97(B);
 - e. λ DNA; f. λ DNA+E·CORI+BamHI; g. λ DNA+BamHI; h. λ DNA+PstI
- Purity identification of chloroplasts and analysis on mtDNA by electrophoresis
1. Purity identification of chloroplasts(10000X); 2. Isolation and purification
of mtDNA by electrophoresis; 3. Identification of mtDNAm₁ by electrophoresis;
4. Restriction site map of mtDNAm₁ (PstI) by electrophoresis.
- a. Honglian type Qingsiai(A); b. Honglian type Qingsiai(B);
 - c. Yiebai type Zhenshan 97(A); d. Yiebai type Zhenshan 97(B);
 - e. Lamenda DNA; f. Lamenda DNA+E·CORI+BamHI; g. Lamenda DNA+BamHI;
 - h. Lamenda DNA+PstI.



mtDNA的电镜鉴定 (20000×)

- 1,2. 大分子mtDNA; 4,6. 红莲型青四矮(A)的小环mtDNA;
 3,5,7. 野败型珍汕97(A)的小环mtDNA

Identification of mtDNA by electron microscope(20000×)

- 1,2. Great molecule mtDNA; 4,6. Small cycle mtDNA of Qingsiai(A);
 3,5,7. Small cycle mtDNA of Yiebai type Zhenshan 97(A)