

大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因标记定位

汤复跃¹, 张磊², 陈培², 陈渊¹, 梁江¹

(¹广西玉米研究所, 广西 南宁 532227; ²安徽省农业科学院作物研究所, 安徽省农作物品质改良重点实验室, 安徽 合肥 230031)

摘要: 鉴于与恢复基因紧密连锁的分子标记在分子辅助选择育种中的应用前景, 采用 SSR 标记法定位大豆 CMS 恢复系 WR016 的恢复基因。根据 (W931A × WR016)F₁、F₂ 的植株育性, 分析表明大豆 M 型不育系统为单基因配子体不育。由于大豆 M-CMS 恢复系 WR016 的恢复基因定位在 A1 连锁群上, 利用 A1 连锁群上的大豆 SSR 引物对不育系 W931A 和恢复系 WR016 构建的 F₂ 分离群体进行分析, 获得了与恢复基因连锁的三个标记 Satt684、Satt276 和 Satt545, 遗传距离分别为 29.5 cM、10.7 cM 和 14.1 cM。虽然 10.7 cM 还是一个较远的距离, 但为进一步精确定位恢复基因, 并最终克隆恢复基因打下了基础。

关键词: 大豆; 细胞质雄性不育; 微卫星标记

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2009)04-0578-05

Marker Location for Fertility Restorer Gene of M-Cytoplasmic Male Sterility in Soybean

TANG Fu-yue¹, ZHANG Lei², CHEN Pei², CHEN Yuan¹, LIANG Jiang¹

(¹Guangxi Maize Research Institute, Nanning 532227, Guangxi; ²Crop Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Quality Improvement of Anhui Province, Hefei 230031, Anhui, China)

Abstract: In view of the application prospects of the molecular marker - assisted selection in breeding by the molecular markers closely linked with restorer gene, this experiment aims to locate restorer gene of the M - CMS WR016 with SSR markers. Fertilities of F₁, F₂ generations of W931A (sterile line) × WR016 (restorer line) showed that M - CMS belonged to single - gene gametophyte sterility. This experiment applies SSR molecular markers to locate the restorer gene of the restorer line WR016. Three SSR markers in A1 linkage group, Satt684, Satt276 and Satt545, genetically linked to the restorer gene, were selected by screening of SSR markers with F₂ segregation population. The genetic distance between the markers and the restorer gene were 29.5, 10.7 and 14.1 cM, respectively. Although 10.7 cM is still a large distance, it laid the foundation for further location of restorer gene.

Key words: Soybean; Cytoplasmic male sterility (CMS); SSR

由于土地面积和淡水资源的限制, 提高大豆产量的根本途径只可能依靠提高大豆的生产潜力。而杂种优势的利用最为有效, 细胞质雄性不育是作物杂种优势利用的基础。有关大豆细胞质雄性不育最早的报道是 Davis 在一项美国专利中所描述的^[1], 但迄今无人能重复这一试验结果, 我国目前选育的大豆细胞质雄性不育系有 10 多个^[2-5]。安徽省农科院与吉林省农科院已经实行大豆三系配套并应用^[6-8], 杂交大豆成功应用的关键之一是要求 F₁ 具有高的结实率, 这一特性是由恢复系的恢复基因所决定的, 鉴于恢复基因在杂种优势利用中的重要性

及分子生物技术的发展, 已有相关学者对其进行了相关研究, M 型大豆细胞质雄性不育恢复基因初步定位于 A1 连锁群^[9]。采用以 PCR 为基础的 SSR 分子标记来研究与 CMS 恢复系 WR016 恢复基因紧密连锁的分子标记, 为大豆细胞质雄性不育机理研究和克隆恢复基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 M 型大豆细胞质雄性不育的遗传分析

大豆雄性不育系 W931A、恢复系 WR016 和杂

收稿日期: 2008-09-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2006AA100104); 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD01A04)。

作者简介: 汤复跃 (1984-) 男, 硕士研究生, 研究方向为植物分子遗传育种。E-mail: tfy0130@163.com。

通讯作者: 张磊, 研究员。E-mail: leizh66@163.com。

交组合 W931A × WR016 的 F₁、F₂ 于 2005 ~ 2007 年分别种植于安徽省农业科学院试验田。两边分别种植保护行,在大豆盛花期采摘植株中上部即将开放的花蕾,每株 3 朵,用 70% 酒精固定,取出花药,用解剖针压开花药后,弃去杂质用 1% I₂ - KI 染色,在高倍(40 ×) 光学显微镜进行镜检观察花粉育性,随机选取 3 个视野,分别统计不育和可育花粉粒的数,计算花粉败育率,调查 F₁、F₂ 的育性表现,进行育性的遗传分析,统计分析采用测验方法。

1.2 大豆基因组 DNA 提取

采用改良的 1.25% SDS 提取法提取大豆基因组 DNA。

1.3 基因池的构建

随机选取 10 株不育系单株的等量 DNA 混合构成不育基因池,随机选取 10 株恢复系单株的等量 DNA 混合构成可育基因池,随机选取 10 株 F₁ 单株的等量 DNA 混合构成半不育基因池。

1.4 SSR 引物

合成大豆 A1 连锁群上的所有引物,SSR 引物选自大豆公共遗传连锁图谱^[10],引物序列来自于 Soybase (<http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php>)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.5 PCR 反应

PCR 反应体系(20 μL): 3 μL DNA (15 ng · L⁻¹), 0.3 μL Primer (10 μmol · L⁻¹), 2.0 μL 10 × Buffer (free MgCl₂), 0.4 μL dNTPs (2.5 mmol · L⁻¹), 2.0 μL MgCl₂ (15 mmol · L⁻¹), 1U Taq, 11.8 μL ddH₂O。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ (退火温度随引物不同而不同) 退火 30 s, 68℃ 延伸 45 s, 共进行 35 次循环; 68℃ 延伸 10 min。扩增产物置 4℃ 冰箱中备用。SSR 扩增产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 60 W 恒功率 1.5 h, 银染检测。X 线胶片观察灯观察并用数码相机拍摄照片, 记录试验结果。

1.6 数据分析

将不育基因的扩增带型记为 a, 恢复基因的扩增带型记为 b, 杂合体基因的扩增带型记为 h。利用 JionMap4.0 遗传作图软件进行分析^[11]。

2 结果与分析

2.1 M 型大豆细胞质雄性不育的遗传分析

以赵丽梅提出的大豆细胞质雄性不育系育性分

类标准(不育、半不育、可育花粉败育率分别为 95.1% 以上, 10.1% ~ 95% 和 0 ~ 10%)^[12] 并结合田间植株表现(育株表现为正常结荚成熟, 没有症青株出现; 不育株表现为不结荚或结荚数较少, 植株表现为症青; 半不育株表现为正常结荚贪青), 来判定植株的育性。

亲本不育系 W931A 的花粉不育率达 97.71%, 植株不育率达 100%, 表明不育系的不育性稳定; 恢复系 WR016 的花粉可育率达 96.08%, 植株可育率达 100%。F₁ 植株(105 株) 花粉败育率达 54.23%, 植株可育率达 99.05%。由于 F₁ 表现为半不育, 花粉败育率在 40% ~ 60% 之间, 平均数接近于 50%, 但平均败育率与 25% 相差较远, 因此, 可以初步排除两对或两对以上的核不育基因控制的配子体不育的假设, 初步判断大豆 M 型不育系统为单基因配子体不育或孢子体不育的不完全显性。如果不育系属于单基因配子体不育, F₂ 应出现可育: 半不育 = 1:1; 如果不育系属于孢子体不育的不完全显性, 则 F₂ 应出现可育: 半不育: 不育 = 1:2:1。经分析组合(W931A × WR016) F₂ 育性分离情况见表 1。从表 1 中的育性分离结果可知, 组合(W931A × WR016) F₂ 基本分离为可育与半不育两部分, 可育与半不育株的数量分别为 178 和 219, 符合 1:1 分离比例(显著水平 α = 0.05)。可育: 半不育: 不育 = 178:219:10 与可育: 半不育: 不育 = 1:2:1 的育性分离相差较远, 不可能是孢子体不育的不完全显性。因此, 大豆 M 型不育系统为单基因配子体不育。

表 1 分离群体花粉可育率分布

Table 1 Separation of groups of pollen fertility distribution

花粉可育率 Pollen fertility/%	植株数目 Plants
0-10	10
10.1-95	219
95.1-100	178

2.2 大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因初步定位

利用 197 对大豆 SSR 引物对亲本和 F₂ 群体进行 SSR 分析, 表明位于 A1 连锁群上的引物 Satt276 和 Satt684 表现出良好的多态性。据此, 初步将大豆 M 型恢复系 WR016 的恢复基因定位在 A1 连锁群上^[9]。

2.3 大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因图谱定位

对 M 型大豆细胞质雄性不育的遗传分析表明大豆 M 型不育系统为单基因配子体不育。根据育性判断标准, 挑选出 F₂ 群体中 144 个单株对大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因进行图谱定位研究, 其

复基因的遗传距离分别为 29.5 cM、10.7 cM 和 14.1 cM。其中 Satt276 与恢复基因连锁最为紧密,重组率为 13.72%。恢复基因(Rf)在分子连锁群上的位置见图 3。

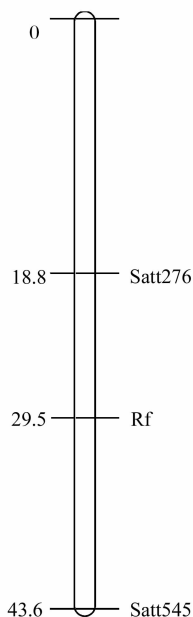


图 3 大豆细胞质雄性不育恢复基因(Rf)在分子连锁群上的位置

Fig. 3 Position of fertility restorer gene for CMS on genetic linkage map of soybean

3 讨论

BSA 法首次被 Michlmore 等利用并成功的在生菜中筛选出与目的基因相连锁的标记^[13];BSA 法在分组时,仅对目标性状进行选择,两个 DNA 混合池之间理论上就应主要在目标基因区段存在差异。这就排除了环境及个体因素的影响,并且,使研究者把焦点集中在植物基因组的特定区域。运用 BSA 法进行基因定位时,还应注意近等基因池的株数要适中。而在实际建池时基因池的大小主要取决于目的区域内已经定位标记位点的密度。密度小,植株可减少;密度大,植株要增加。建池株数过多多态性检出率低;株数过少取样的随机误差增大,多态性位点就会不真实。根据 SSR 标记在大豆连锁图的分布程度和 F₂ 的群体大小,选取 10 株建池,既达到了淡化遗传背景的目的,又保证了检出的多态性较为真实^[14]。

CMS 恢复基因的定位是作物杂种优势利用的基础。由于分子标记技术的迅速发展及各主要作物

的分子标记连锁图谱的构建,使得分子标记定位方法成为目前各作物育性基因定位的主要手段。鉴于 SSR 标记呈孟德尔式遗传,多样性指数比 RFLP 及 RAPD 更高,既具有 RAPD 技术快速、直接简便的特点,又具有 AFLP 技术的结果稳定可靠、重复性好的优点,是一种共显性的遗传标记,能鉴别真伪杂种并区别后代个体的基因型。随着微卫星标记图谱密度的增加和技术的发展,微卫星标记技术将在基因定位中发挥更大的作用。目前已设计出的大豆基因组 SSR 引物 1 000 多对,因此采用 SSR 标记和 BSA 法来定位大豆 CMS 恢复系 WR016 的恢复基因。

应用构建的可育池、半不育池和不育池和不育池进行另外 SSR 引物筛选,用 F₂ 单株验证,确认 Satt276、Satt545 和 Satt684 与恢复基因连锁,遗传距离分别为 10.7 cM、14.1 cM 和 29.5 cM,将恢复基因定位于 A1 连锁群上。有关大豆的遗传图谱参考的是 USDA 在网上公布的大豆遗传图谱。目前, Song 等整合的新的大豆遗传连锁图谱上共有 20 个连锁群,其中 SSR 标记 1015 个, RFLP 标记 709 个, RAPD 标记 73 个,经典性状标记 24 个,6 个 AFLP 标记,10 个同工酶标记和 12 个其它标记^[10]。与 1999 年 Cregan 等报道的图谱相比标记密度增加,由原来超过 20cM 的间距减少到标记间平均距离 2.5 cM(平均每个连锁群上的 SSR 标记达到 51 个,从 35 到 64 不等)。但是目前这个遗传图谱饱和度还很低,仍然给进一步增加更近的分子标记带来了很大的困难。

通过筛选大豆细胞质雄性不育恢复基因紧密连锁的 SSR 分子标记,不仅可以通过分子标记辅助选择加快恢复系选育过程、提高选育效率,而且为进一步精确定位恢复基因,并最终克隆恢复基因打下了基础。虽然根据分子标记的遗传交换规律,10.7 cM 还是一个较远的标记。但这一标记的发现为进一步寻找与恢复基因更紧密连锁的分子标记创造了条件。

参考文献

- [1] Davis W. H. Route to hybrid soybean production[P]. USA Patent: US4545146A, 1985-10-08.
- [2] 李磊,杨庆芳,胡亚敏,等. 栽培大豆双亲互作型不育材料的发现及其遗传推断[J]. 安徽农业科学, 1995, 23(4): 304-306. (Li L, Yang Q F, Hu Y M, et al. Cultivation of soybean each other for the parents of infertility and nucleo-cytoplasmic male sterile line material found[J] Journal of Anhui Agricultural Sciences,

1995,23(4):304-306.)

- [3] Gai J Y, Cui Z L, Ji D F. A Report on the nuclear cytoplasmic male sterility from a cross between two soybean cultivars [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1995, 22: 55-58.
- [4] 孙寰, 赵丽梅, 黄梅. 大豆质-核互作不育系研究[J]. 科学通报, 1993, 38(16): 1535-1536. (Sun H, Zhao L M, Huang M. Studies on cytoplasmic male sterile soybean line in soybean [J]. Science Bulletin, 1993, 38(16): 1535-1536.)
- [5] 孙寰, 赵丽梅, 黄梅. 大豆细胞质雄性不育系ZA的选育和初步研究[J]. 大豆科学, 1998, 17(3): 268-270. (Sun H, Zhao L M, Huang M. The development and preliminary studies on cytoplasmic male sterile soybean line ZA [J]. Soybean Science, 1998, 17(3): 268-270.)
- [6] 张磊, 戴欧和, 黄志平, 等. 杂交大豆杂优豆1号选育[J]. 大豆通报, 2007(2): 14-16. (Zhang L, Dai O H, Huang Z P, et al. Breeding of hybrid soybean Zayoudou No. 1 [J]. Soybean Bulletin, 2007, 2: 14-16.)
- [7] 张磊, 戴欧和. 大豆质核互作不育系W931A的选育研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30(6): 90-91. (Zhang L, Dai O H. Selection and breeding of nucleo-cytoplasmic male sterile line W931A in soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 30(6): 90-91.)
- [8] 赵丽梅, 孙寰, 王曙明, 等. 大豆杂交种“杂交豆1号”选育报告[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(3): 15-17. (Zhao L M, Sun H, Wang S M, et al. Breeding of hybrid soybean Hysoy 1 [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(3): 15-17.)
- [9] 汤复跃, 周立人, 张磊, 等. 大豆M型细胞质雄性不育恢复基因SSR标记初步定位[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 383-386. (Tang F Y, Zhou L R, Zhang L, et al. SSR marker location for fertility restorer gene of M2 cytoplasmic male sterility in soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 383-386.)
- [10] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 122-128.
- [11] Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap [J]. The Plant Journal, 1993, (5): 739-744.
- [12] 孙寰, 赵丽梅, 王曙明, 等. 大豆花粉育性分类标准的研究[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 339-343. (Sun H, Zhao L M, Wang S M, et al. Criterion on classification of pollen fertility in soybean [J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 339-343.)
- [13] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a raperegating populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88: 9828-9832.
- [14] 张萃, 王宏英, 沈银柱, 等. 用卫星标记定位小麦T型CMS的恢复基因[J]. 遗传学报, 2003, 30(5): 459-464. (Zhang C, Wang H Y, Shen Y Z, et al. Location of the fertility restorer gene for T-type CMS wheat by microsatellite marker [J]. Acta Genetica Sinica, 2003, 30(5): 459-464.)

(上接第577页)

- [10] 翁秀英, 王彬如, 吴和礼, 等. 大豆辐射育种的研究[J]. 遗传学报, 1974, 1(2): 152-160. (Weng X Y, Wang B R, Wu H L, et al. Research on soybean mutation breeding [J]. Acta Genetica Sinica, 1974, 1(2): 152-160.)
- [11] 李雪华. 大豆突变体库的初步构建及突变类型的鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2003. (Li X H. Construction of soybean mutant pools and characterization of different mutant-types [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003.)
- [12] 韩锁义, 杨玛丽, 陈远东, 等. 大豆“南农94-16”突变体库的构建及部分性状分析[J]. 核农学报, 2008, 22(2): 131-135. (Han S Y, Yang M L, Chen Y D, et al. Construction of mutant library for soybean “Nannong 94-16” and analysis of some characters [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2008, 22(2): 131-135.)
- [13] 韩锁义, 张恒友, 杨玛丽, 等. 大豆“南农86-4”突变体筛选及突变体库的构建[J]. 作物学报, 2007, 33(12): 2059-2062. (Han S Y, Zhang H Y, Yang M L, et al. Screening of mutants and construction of mutant population in soybean “Nannong 86-4” [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(12): 2059-2062.)
- [14] 盖钧镒, 翟虎渠, 胡蕴珠, 等. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000, 81-84. (Gai J Y, Zhai H Q, Hu W Z, et al. Experimental statistics method [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000, 81-84.)
- [15] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C. A new integrated genetic linkage map of the soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 122-128.
- [16] 冯峰, 杨新泉. “大豆优异基因资源发掘及其基因组研究”立项背景和意义[J]. 中国科学基金, 2003, 6: 335-338. (Feng F, Yang X Q. Exploration of excellent gene resources in soybean and their genomic studies [J]. Bulletin of National Science Foundation of China, 2003, 6: 335-338.)
- [17] 朱兴全, 林瑞庆, 宋慧群. 功能基因组学研究概述[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(7): 29-34. (Zhu X Q, Lin R Q, Song H Q. Progress on the functional genomics [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2003, 33(7): 29-34.)
- [18] 江树业. 水稻突变群体的构建及功能基因组学[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 137-150. (Jiang S Y. Rice mutant population and its applications on functional genomics [J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(2): 137-150.)