

大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因 SSR 标记初步定位

汤复跃^{1,2}, 周立人¹, 程 潇¹, 张 磊², 陈 培², 江莹芬²

(¹安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036; 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: 鉴于细胞质雄性不育 (Cytoplasmic Male Sterility, CMS) 在作物杂种优势利用中的良好应用前景及分子标记对恢复系选育的应用价值, 试验采用 SSR 分子标记对大豆 CMS 恢复系 WR016 恢复基因进行初步定位。利用 197 对大豆 SSR 引物对不育系 W931A 和恢复系 WR016 单株进行多态性筛选, 52 对引物在双亲间表现多态性, 多态性频率 26.39%, 进一步利用这 52 对引物对 10 株不育系 W931A 和恢复系 WR016 单株、不育基因池、可育基因池和半不育基因池进行分析, 表明位于 A 连锁群上的 Satt276 表现出良好的多态性。再利用合成的 Satt276 附近的引物进行分析, 表明 Satt684 和 Satt572 也有良好的多态性。据此, 可将大豆 M-CMS 恢复系 WR016 的恢复基因初步定位在 A 连锁群上。

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(2008)03-0383-04

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

TANG Fu-yue^{1,2}, ZHOU Li-ren¹, CHENG Xiao¹, ZHANG Lei², CHEN Pei², JIANG Ying-fen²

(¹College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui; ²Crop Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Quality Improvement of Anhui Province, Hefei 230031 Anhui, China)

Abstract: Based on the advantage of cytoplasmic male sterility (CMS) in the application of crop heterosis and the practical value of molecular markers in crop breeding, this experiment applies SSR molecular markers to basically locate the restorer gene of the M-CMS WR016. 197 pair of SSR primers were used to amplify between sterile line W931A and restorer WR016. Results showed 52 pair of primers have polymorphism and the frequency was 26.39%. The 52 pair of polymorphic primers were used to analyze individual plants of W931A and WR016, sterile, fertile and semi-sterile bulk. The Satt276 on the linkage group A was demonstrated better polymorphism properties. In addition, the synthesized primers near Satt276 were applied, and both Satt684 and Satt572 was demonstrated better polymorphism properties. Hence, the restorer gene of the M-CMS WR016 should be located on the linkage group A of soybean.

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

雄性不育在被子植物中是十分普遍的^[1]。而细胞质雄性不育是作物杂种优势利用的基础。在我国, 目前所选育出的大豆细胞质雄性不育系主要有: 孙寰等选育的细胞质雄性不育系 OA、YA^[2]; 赵丽梅等选育的细胞质雄性不育系 ZA^[3]; 盖钧镒等选育的细胞质雄性不育系 NJCMS1A、NJCMS2A^[4]; 许占友等选育的细胞质雄性不育系阜 CMS1A、阜 CMS2A、阜 CMS3A^[5]; 张磊等选育的细胞质雄性不育系 W931A、W933A、W945A、W948A^[6-8]。而基于细胞

质雄性不育的杂交大豆已取得巨大突破。赵丽梅等利用细胞质雄性不育系 JLCMS9A 为母本, 吉恢 1 号为父本育成了世界上首例大豆杂交种“杂交豆 1 号”^[9], 随后又培育出了杂交豆 2 号 (H99-212)。张磊等育成了世界上首例杂交夏大豆“杂优豆 1 号”^[10]。杂交大豆比其常规大豆增产 20% 左右。恢复系的选育是利用细胞质雄性不育系 (CMS) 配制杂交种的前提之一, 而选育恢复系比常规育种具有更多的困难, 主要表现在恢复基因的有无只能在测交

收稿日期: 2007-11-14

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 (2006AD01A04)。

作者简介: 汤复跃 (1984-) 男, 硕士研究生, 现主要从事植物遗传育种研究。E-mail: tfy0130@163.com。

通讯作者: 张磊, 研究员。Tel: 0551-5160957; E-mail: leizh66@163.com。

后代中鉴定,加上分离世代不可能逐株检测,造成农艺上性状优良的品系常常不含有恢复基因,且恢复力稳定较慢。CMS 恢复基因分子标记的筛选工作在水稻、玉米、油菜等作物上都取得了较大的进展。鉴于 CMS 的良好应用潜力和分子标记对恢复系选育的重要应用价值,有必要开展大豆 CMS 恢复基因的分子标记研究工作。由于微卫星 (simple sequence repeats, SSR) 标记具有变异丰富、分布较广、检测快速、稳定可靠等优点。试验采用以 PCR 为基础的 SSR 分子标记来寻找 CMS 恢复系 WR016 恢复基因,并对此恢复基因进行初步定位。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆雄性不育系 W931A 为张磊等选育,不育性稳定,WR016 是通过大量筛选选育出的一个品系,对不育系 W931A 具有良好的恢复能力^[6]。大豆雄性不育系 W931A、恢复系 WR016 和杂交组合 W931A × WR016 的 F₁、F₂。所有田间试验均在安徽省农业科学院试验田进行。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取 3~5 片新鲜叶片加液氮研磨成粉状,将粉末转入 1.5 mL 离心管中,加 600 μ L DNA 提取液 (1.25% SDS, 0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl, 0.05 mol · L⁻¹ EDTA (PH 8.0), 0.5 mol · L⁻¹ NaCl, 1% β -巯基乙醇) 放入 65°C 水浴锅中保温 20 min, 加 600 μ L 酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1, 4°C 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取上清转入另一新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇 = 24:1, 4°C 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取上清转入另一新的 1.5 mL 离心管中,加入 2 倍体积的 95% 乙醇,离心 3 min。弃上清,用 70% 乙醇洗管壁 2 次,后溶于 500 μ L ddH₂O + 3 μ L RNase (10 mg · L⁻¹) 中,于 37°C 水浴锅中 1 h。再用等体积的酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1 和氯仿:异戊醇 = 24:1 抽提 2 次,再用 95% 乙醇沉淀和 70% 乙醇洗管壁 2 次,加 100 μ L TE 中溶解,置 -20°C 保存备用。

1.2.2 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。

1.2.3 SSR 引物 根据 Song 等^[11] 整合的大豆遗

传连锁图谱的 20 个连锁群上 SSR 引物的饱和度和遗传距离挑选出 197 对大豆 SSR 引物,引物序列来自于 Soybase (<http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php>), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.4 PCR 反应 PCR 反应体系 (20 μ L): 3 μ L DNA (15 ng · L⁻¹), 0.3 μ L Primer (10 μ mol · L⁻¹), 2.0 μ L 10 × Buffer (free MgCl₂), 0.4 μ L dNTPs (2.5 mmol · L⁻¹), 2.0 μ L MgCl₂ (15 mmol · L⁻¹), 1 U Taq, 11.8 μ L ddH₂O。PCR 反应程序: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C (退火温度随引物不同而不同) 退火 30 s, 68°C 延伸 45 s, 共进行 35 次循环; 68°C 延伸 10 min。扩增产物置 4°C 冰箱中备用。SSR 扩增产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 30 min, 恒功率 60 W 电泳 1 h, 银染检测。聚丙烯酰胺凝胶银染程序: 10% 醋酸 1 000 mL 固定 30 min, 去离子水漂洗 2 次 (每次 10 min), 0.15% 硝酸银 1 000 mL (加入 150 μ L 甲醛) 染色 30 min, 去离子水漂洗 8~10 s, 3% 碳酸钠溶液 1 000 mL (4°C 预冷 30 min, 临用前加入 150 μ L 甲醛, 400 μ L 10 mg · L⁻¹ 硫代硫酸钠) 显影至 DNA 带清晰, 放入 10% 醋酸终止反应。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。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

利用挑选出的 197 对大豆 SSR 引物对亲本不育系 W931A 单株和恢复系 WR016 单株进行多态性筛选, 结果 163 对 SSR 引物具有扩增产物, 其中有 52 对 SSR 引物在亲间表现多态性, 多态性频率为 26.39% (图 1)。利用在亲本间表现多态的 52 对 SSR 引物在不育基因池和可育基因池间进行分析, 结果在大豆 20 个连锁群中的 6 个连锁群上有 34 对 SSR 引物在基因池间表现出多态性, 多态性频率为 17.26%。

2.2 大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因的初步定位

利用在基因池间表现出多态性的 34 对 SSR 引物对 10 株不育系 W931A 单株、10 株恢复系 WR016 单株、不育基因池、可育基因池和半不育基因池中进行分析, 结果 10 株不育系 W931A 单株扩增带位置与不育基因池中的位置一样, 10 株恢复系 WR016 单株扩增带位置与可育基因池中的位置一样, 半不

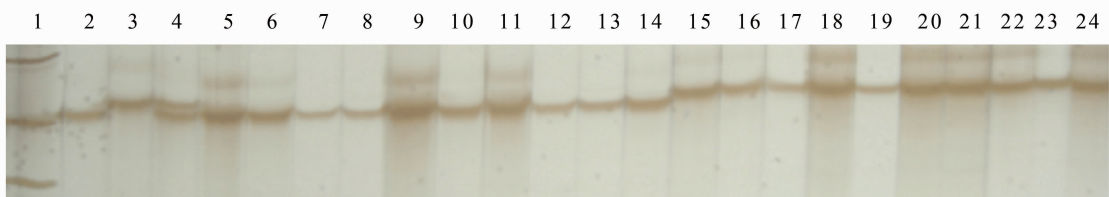
育基因池中的扩增带只含不育基因池和可育基因池中的扩增带,表明引物 Satt276 表现出良好的多态性(图 2)。再利用合成的 Satt276 附近的引物进行分析,表明 Satt684(图 3)和 Satt258(图 4)也表现出良

好的多态性。参照 Song 等^[11]整合的大豆遗传连锁图谱,发现 Satt276、Satt684、Satt258 位于 A 连锁群上,因此,将 M 型 CMS 恢复系 WR016 的恢复基因初步定位在大豆 A 连锁群上。



图 1 部分 SSR 引物在 W931A 单株和 WR016 单株上的扩增结果

Fig. 1 Amplification products of some primer among W931A sterile plant and WR016 plant

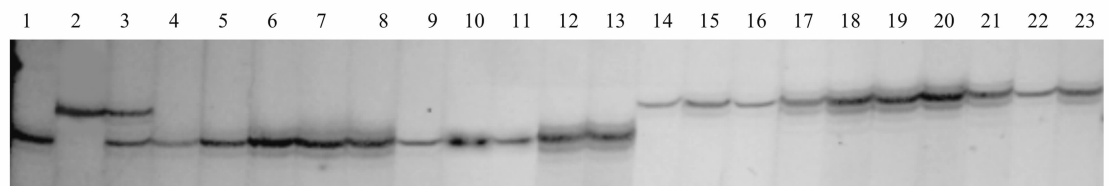


1: Marker; 2: 不育基因池; 3: 可育基因池; 4: 半不育基因池; 5—14: W931A; 15—24: WR016

1: Marker; 2: Sterile bulk DNA; 3: Fertile bulk DNA; 4: F₁ bulk DNA; 5—14: W931A; 15—24: WR016

图 2 Satt276 在 W931A、WR016、不育基因池、可育基因池、半不育基因池上的扩增结果

Fig. 2 Amplification products of Satt276 among W931A sterile plant, WR016, sterile bulk, fertile bulk and F₁ Bulk DNA

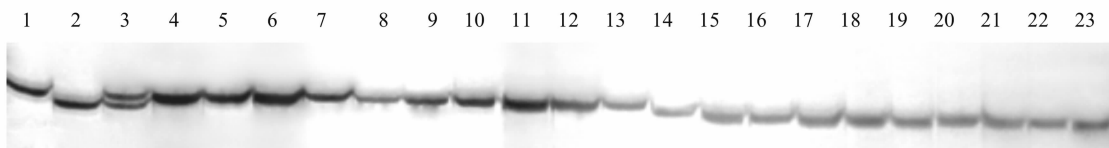


1: 不育基因池; 2: 可育基因池; 3: 半不育基因池; 4—13: W931A; 14—23: WR016

1: Sterile bulk DNA; 2: Fertile bulk DNA; 3: F₁ bulk DNA; 4—13: W931A; 14—23: WR016

图 3 Satt684 在 W931A、WR016、不育基因池、可育基因池、半不育基因池上的扩增结果

Fig. 3 Amplification products of Satt276 among W931A sterile plant, WR016, sterile bulk, fertile bulk and F₁ Bulk DNA



1: 不育基因池; 2: 可育基因池; 3: 半不育基因池; 4—13: W931A; 14—23: WR016

1: Sterile bulk DNA; 2: Fertile bulk DNA; 3: F₁ bulk DNA; 4—13: W931A; 14—23: WR016

图 4 Satt258 在 W931A、WR016、不育基因池、可育基因池、半不育基因池上的扩增结果

Fig. 4 Amplification products of Satt258 among W931A sterile plant, WR016, sterile bulk, fertile bulk and F₁ Bulk DNA

3 讨论

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及目前已设计出的大豆基因组 SSR 引物达一千多对,因此采用 SSR 标记来定位大豆 CMS 恢复系 WR016 的恢复基因。许占友等^[12]利用 60 对 SSR 核心引物对 2 个不育系(阜 CM S1A、阜 CM S2A)和 5 个恢复系(蒙 206, YC04, 阜 842524, ZY9010, Z9001)的核基因池进行多态性筛选,筛选出 3 个特异带的 SSR 引物为 Satt143、Satt168、Satt441,分别位于衣阿华州立大学和犹他州立大学的 L 和 CH09, U14 连锁群、B2 和 U26 连锁群、犹他州立大学 U24 连锁群。赵丽梅等^[13]利用 210 对 SSR 引物对(YA × 167)F₂分离群体中的可育和半不育单株及(YA × (YB × 167))群体中的不育单株进行引物筛选,结果获得了 2 对与恢复基因有关的引物 Satt414, Satt596, 位于 J 连锁群上,遗传距离分别为 16.4cM 和 14.6cM。而用两个遗传差异较大的亲本(JLCMS-20A × 吉恢 1 号)构建了分离群体 F₂,获得了 1 对与恢复基因有关的引物 Satt547,遗传距离为 7.56。通过对大豆恢复基因的定位可以加速大豆恢复系选育过程、提高选育效率,缩短育种年限,促进质核互作雄性不育在杂交种生产中的广泛应用。

参考文献

- [1] 刘忠松,官春云,陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用[M]. 北京: 中国农业出版社,2001. (Liu Z S, Guan C Y, Chen S Y. Mechanism of male sterile plant and application[M]. Beijing: Agricultural Press,2001.)
- [2] 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.)
- [3] 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.)
- [4] 盖钧镒,丁德荣,崔章林,等. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 的选育及其特性研究[J]. 中国农业科学,1999,32(5): 23-27. (Gai J Y, Ding D R, Cui Z L, et al. Development and performance of the cytoplasmic- nuclear male sterile line NJCMS1A of soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999,32(5): 23-27.)
- [5] 许占友,李磊,常汝镇,等. 大豆质核互作雄性不育系核不育基因的遗传分析[J]. 中国农业科学,1999,32(增刊): 1-8. (Xu Z Y, Li L, Chang R Z, et al. Genetic analysis of nuclear male sterile genes of soybean cytoplasmic male sterile lines[J]. Scientia Agricultura Sinica,1999,32:1-8.)
- [6] 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, 30(6): 1997, 90-91.)
- [7] 张磊,戴欧和,张丽亚. 大豆质核互作雄性不育系 W945A、W948A 的选育[J]. 大豆科学,1999,18(4): 327-330. (Zhang L, Dai O H, Zhang L Y. Breeding of soybean male sterile line of nucleo- cytoplasmic interaction [J]. Soybean Science, 1999, 18(4): 327-330.)
- [8] 张磊,戴欧和,黄志平,等. 大豆质核互作 M 型雄性不育系的选育及其育性表现[J]. 中国农业科学,1999,32(4): 34-38. (Zhang L, Dai O H, Huang Z P, et al. Selection of soybean male sterile line of necleo- cytoplasmic interaction and its fertility[J]. Scientia Agricultura Sinica,1999,32(4)34-38.)
- [9] 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 Hybsoy 1 [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(3): 15-17.)
- [10] 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.)
- [11] Song Q J, L F Marek, R C Shoemaker. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics,2004,109: 122-128.
- [12] 许占友,李磊,邱丽娟,等. 大豆三系的选育及恢复基因的 SSR 初步定位研究[J]. 中国农业科学,1999,32(2): 32-38. (Xu Z Y, Li L, Qiu L J, et al. Selection of three linde and localization of the restorer genes in soybean using SSR markers[J]. Scientia Agricultura Sinica,1999,32(2): 32-38.)
- [13] 赵丽梅. 大豆细胞质雄性不育的遗传和分子基础研究[D]. 长春: 东北师范大学,2005: 51-52. (Zhao L M. Cytoplasmic male sterile soybean genetic and molecular basis of the study [D]. Changchun: Northeast Normal University,2005:51-52.)