

## 线粒体 ISSR 与 SCAR 标记鉴定大豆细胞质雄性不育系与保持系

张春宝<sup>1</sup>, 李玉秋<sup>1</sup>, 彭宝<sup>1</sup>, 王鹏年<sup>2</sup>, 董英山<sup>1</sup>, 赵丽梅<sup>1</sup>

(1. 吉林省农业科学院 大豆研究所, 吉林 长春 130033; 2. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130022)

**摘要:**通过提取细胞质雄性不育系和同型保持系的线粒体基因组 DNA, 用 100 条 ISSR 引物进行筛选, 发现引物 ISSR829 的扩增片段在不育系和保持系间存在差异。对差异片段进行测序发现, 该序列仅存在于保持系线粒体基因组中, 且位于基因 *Atp6* 上游 2 000 bp 处, 推断其可能与不育有关。利用测序获得片段设计引物, 用目前已育成的 5 个大豆杂交种的不育系母本和同型保持系的基因组 DNA 为模版, 进行 PCR 扩增, 发现不育系母本未出现特异片段, 而对应保持系出现目的片段, 表明该特异片段转化为 SCAR 标记, 可用于不育系的筛选和不育系种子纯度鉴定。

**关键词:**大豆; 不育系; 保持系; 杂交种; 分子标记

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)01-0019-04

## Identification of Soybean Cytoplasmic Male Sterile Line and Maintainer Line with Mitochondrial ISSR and SCAR Markers

ZHANG Chun-bao<sup>1</sup>, LI Yu-qiu<sup>1</sup>, PENG Bao<sup>1</sup>, WANG Peng-nian<sup>2</sup>, DONG Ying-shan<sup>1</sup>, ZHAO Li-mei<sup>1</sup>

(1. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130022, Jilin, China)

**Abstract:** By extracting the mitochondrial DNA of cytoplasmic male sterile line and its maintainer line, screening with 100 ISSR primers, and it was found that the amplification product of primer ISSR829 had differences in sterile line and its maintainer. Then sequenced the different fragments and found that the sequence was only exist in the maintainer mitochondrial genome, and upstream of mitochondrial gene *Atp6* by 2 000 bp. It was suggested that the sequence has a relationship with infertility. Designed primers according to the sequence and detected female parent and its maintainer line of five soybean hybrids, and found that sterile line did not appear specific fragment, but a target fragment corresponding maintainer lines. It was confirmed that the specific fragments was converted to a SCAR marker, which could be used for testing the seed purity of cytoplasmic male sterile line.

**Key words:** Soybean; Sterile line; Maintainer line; Hybrid; Molecular markers

大豆是世界上重要的油料作物之一, 但由于存在单产低、比较效益低等缺点, 导致近年来国内种植面积逐渐萎缩, 进口数量逐年增加。利用杂种优势选育杂交种进行种植, 可以大幅度提高作物单产, 该方法目前已在玉米、水稻、油菜、棉花等作物上成功应用。我国大豆杂种优势利用研究开始于 20 世纪 80 年代中期, 经过 20 多年的研究探索, 我国在此领域总体上处于国际前列。吉林省农业科学院于 1995 年在世界上率先育成了大豆细胞质雄性不育“三系”<sup>[1]</sup>。并于 2002 年审定了世界上第一个大豆杂交种“杂交豆 1 号”, 比对照品种增产 20.9%<sup>[2]</sup>。截至 2012 年初, 国内已审定了 8 个大豆杂交种用于生产示范。然而, 要实现杂交大豆产业化种植, 还存在很多问题亟待解决。

大豆细胞质雄性不育“三系”由不育系、保持系和恢复系构成。不育系作母本与恢复系父本杂交,

即可获得杂交种。其中保持系和恢复系由于自身可育, 种子可由自交繁殖获得; 而不育系自身不育, 种子只能通过其作为母本与同型保持系父本杂交获得, 而不育系与同型保持系除育性外, 其他农艺性状完全相同, 在繁殖的过程中常常由于田间种植、收获脱粒等环节造成不育系中混杂保持系。制种者利用不纯的不育系种子与恢复系杂交生产杂交种时, 必然导致混入的保持系给不育系授粉, 使不育系上结出的种子仍然为不育系而非杂交种。这样的种子在生产上种植, 必将导致生产田中出现不育株而减产, 降低农民的种植积极性, 种子销售公司也承担很大的违约风险。因此, 保证杂交种的纯度, 必须从源头抓起, 其中不育系种子纯度鉴定就显得尤为重要。

由于大豆不育系和保持系形态上完全一致, 无法通过形态学鉴定法在田间将二者区别。近年来

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(31201224); 国家高技术研究发展计划“863 计划”重点项目(2011AA10A105); 中国博士后基金(2012M510902); 吉林省青年科研基金(201201091); 吉林省优秀创新团队项目(20111817)。

第一作者简介: 张春宝(1980-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为大豆杂种优势利用。E-mail: czhang@126.com。

通讯作者: 赵丽梅(1964-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为大豆杂种优势利用。E-mail: lmzhao@126.com。

随着分子标记的广泛应用, AFLP、RAPD、RFLP、SSR 等标记都被应用于杂交种纯度鉴定研究中<sup>[3-6]</sup>, 但都存在一定的缺点。AFLP 的试验步骤繁琐、对实验技术和设备的要求较高, 费用较大; RFLP 需要用到放射性同位素来检测; RAPD 结果不稳定、重复性较差; SSR 需要通过 SDS-PAGE 检测, 过程繁琐等。因此常将这些标记转化为 SCAR<sup>[7]</sup>、STS<sup>[8]</sup> 等标记。ISSR 是 Zietkeiwicz 等<sup>[9]</sup>发明的一种分子标记, ISSR 引物可以在不同的物种间通用, 不像 SSR 标记一样具有较强的物种特异性; 与 RAPD 和 RFLP 相比, ISSR 揭示的多态性较高, 信息量大, 精确度高, 检测简便和易操作。目前, ISSR 标记已经广泛应用于植物的遗传多样性分析<sup>[10-12]</sup>、功能基因定位等方面<sup>[13-15]</sup>。

SCAR 标记即特异序列扩增区域, 是在 RAPD、RFLP 等分子标记的基础上发展起来的, 首先要对这些分子标记的产物进行测序, 根据测序结果设计一对长约 20 bp 的引物, 然后通过普通的 PCR 手段来扩增多态性片段, 这样可以克服 RAPD 等标记的稳定性差等缺陷, 提高了分子标记的稳定性和重复性。王晓武等<sup>[16]</sup>利用 BSA 法筛选到了一个与甘蓝显性雄性不育基因 *M<sub>s</sub>* 连锁的 RAPD 标记 OT11<sub>900</sub>, 将该标记转化为稳定可靠的 SCAR 标记 ST11<sub>900</sub>, 结果显示, 该标记在甘蓝显性雄性不育基因的转育中, 可用于显性雄性不育基因的辅助选择。陈沁滨等<sup>[17]</sup>对洋葱雄性不育系 101A 和保持系 101B 的基因组 DNA 进行 RAPD 标记分析, 得到了一个和细胞质雄性不育基因连锁的一个特异片段记 AK15<sub>1400</sub>, 将该标记成功转化为 SCAR 标记 SCAK15<sub>1400</sub>, 为不育基因分子标记辅助选择育种体系的建立奠定了基础。

本研究利用 ISSR 标记对 5 个大豆杂交种的不育系母本及相应保持系, 在线粒体 DNA 水平进行多态性检测, 并将其转化为 SCAR 特异鉴定标记, 用于不育系种子纯度鉴定, 从源头控制杂交种纯度, 为杂交大豆种子商业化提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆杂交种杂交豆 1 号、杂交豆 2 号、杂交豆 3 号、杂交豆 4 号和杂交豆 5 号的母本不育系 JLCMS9A、JLCMS47A、JLCMS8A、JLCMS47A 和 JLCMS84A 及其相应的保持系 JLCMS9B、JLCMS47B、JLCMS8B、JLCMS47B 和 JLCMS84B, 由本实验室提供。

1.1.2 引物 根据加拿大 British Columbia 大学公布的 ISSR 标记序列, 由北京华大基因合成 100 条 ISSR 引物。不育系种子纯度鉴定的 SCAR 标记引物同样由北京华大基因合成。

1.1.3 试剂  $2 \times \text{EsTaq}$  酶、质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物公司; DNA 回收试剂盒、pEASY-T1 载体购自北京全试金生物公司; 其余为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 线粒体和基因组 DNA 提取 取 30℃ 下暗培养 7 d 的大豆不育系和保持系黄化苗 15 g, 利用改良的差速离心与蔗糖密度梯度法<sup>[18]</sup>提取大豆线粒体基因组 DNA。将 5 个杂交种的母本不育系和同型保持系种子磨成干粉, 用改良的 SDS 法<sup>[19]</sup>提取基因组 DNA。DNA 质量和浓度采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检测。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增 利用 100 条 ISSR 引物, 对大豆不育系和相应保持系线粒体基因组混合池进行扩增和引物筛选。25  $\mu\text{L}$  体系含  $2 \times \text{EsTaq}$ , 0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物, 30 ng 模板线粒体 DNA。PCR 程序为 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 47℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 6 min, 4℃ 保存。反应结束后 PCR 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶 100 V 电压下电泳 1 h 左右, 凝胶成像仪照相保存图片。

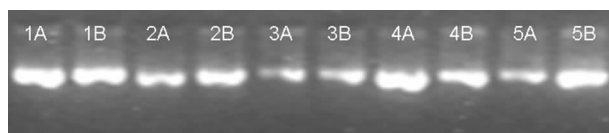
1.2.3 特异片段克隆及测序 用凝胶回收试剂盒回收特异片段。取回收产物与 pEASY-T1 载体连接 15 min, 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆。将阳性重组子培养后用质粒提取试剂盒提取质粒并鉴定。然后将样品送北京华大基因测序。

1.2.4 SCAR 标记的引物设计及扩增 根据测序结果, 从序列两端设计 PCR 特异引物, 将此差异片段转化为 SCAR 标记。用此标记以 5 对不育系和相应保持系线粒体基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系和程序同 1.2.2, 反应结束后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆线粒体 DNA 的提取

利用暗培养获得“杂交豆 1~5 号”不育系母本和保持系黄化苗提取线粒体 DNA 构建混池, 可有效避免提取过程中发生的叶绿体 DNA 污染。而且线粒体 DNA 提取采用本实验室优化的差速离心与蔗糖密度梯度法, 提取的线粒体 DNA 质量好(图 1), 可以直接用于 ISSR 分析。



1A、1B~5A、5B 分别为提取的杂交豆 1~5 号的母本不育系和相应保持系的线粒体 DNA。

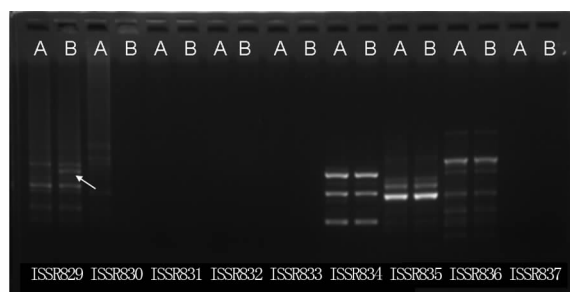
1A、1B-5A、5B were mitochondrial DNA of sterile line and its maintainer of HybSoy No. 1 to No. 5.

图 1 大豆线粒体 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis on agarose gel of mtDNA isolated from soybean

## 2.2 不育系和保持系的 ISSR 分析

以本实验室优化的 ISSR 反应体系为基础,采

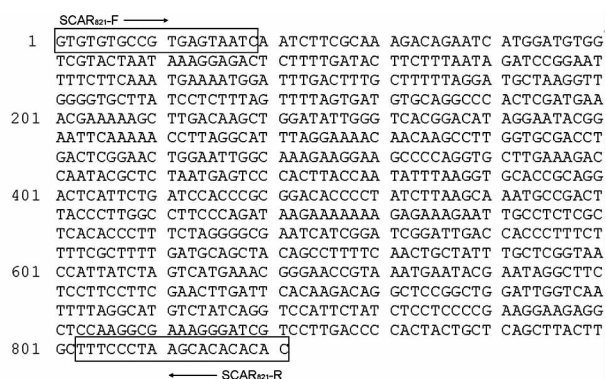


A 为不育系;B 为保持系

A: Sterile line; B: Maintainer line

图 2 不育系和保持系线粒体 DNA 部分 ISSR 引物筛选电泳图

Fig. 2 Mitochondrial DNA of sterile line and maintainer line screened by ISSR primers



序列中方框部分为正向引物和反向引物序列

The box were the primer and its anti-complementary sequences

图 3 特异片段序列信息

Fig. 3 The sequences of differential DNA Bands

## 2.3 ISSR 特异条带测序和序列分析

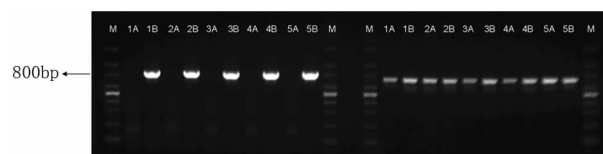
通过对差异片段进行切胶回收与亚克隆载体 pEASY T1 连接,并将连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,通过蓝白斑筛选挑去阳性克隆提取质粒,经 M13F/R 引物鉴定正确后,进行测序。经测序确定特异条带大小为 821 bp。将此序列用 NCBI 数据库的 Blastn 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析发现,该序列存在于大豆线粒体基因组中,在线粒体基因 *Atp6* 上游 2 000 bp 处。与豆科植物百脉根、水黄皮的线粒体序列同源性较高,但并不编码任何功能蛋白。

用 100 对 ISSR 引物对不育系及保持系线粒体 DNA 混池进行标记筛选。结果表明,在引物 ISSR829 的扩增图谱中,保持系较不育系多出一条特异条带(图 2)。经多次重复验证,该差异条带稳定出现,条带大小大约为 800 bp。同时用引物 ISSR829 对另外 4 对不育系和保持系线粒体 DNA 进行 PCR 扩增,结果都只在保持系中出现此特异片段,而不育系中没有(图 3),因此可初步判断此位点在不育系中特异缺失。表明这个缺失可能与不育系中的细胞质雄性不育基因有关。



## 2.4 ISSR 标记的 SCAR 转化

根据测序获得的序列,设计 1 对引物 SCAR<sub>821</sub>-F 5'-GTGTGTGCCGCTGAGTAATC-3' 和 SCAR<sub>821</sub>-R 5'-GTGTGTGTGCTTAGGGAAA-3' (图 3)。该特异引物在所有 5 个保持系中稳定扩增出 1 条特异条带,大小与目的片段一致,而不育系中均没有扩增出相应的特异条带(图 4)。同时,以大豆 *Atp6* 基因扩增片段作为对照,发现无论在不育系和保持系中均能扩增出相应片段。表明已成功将 ISSR 标记转化为更为稳定的 SCAR 标记。



左侧为 SCAR<sub>821</sub> 扩增电泳结果,右侧为大豆 *Atp6* 基因扩增结果。

Left side: SCAR<sub>821</sub> amplification electrophoresis results; Right side: *Atp6* gene amplification results.

图 4 SCAR<sub>821</sub> 对 5 对不育系和配套保持系进行 PCR 检测电泳图

Fig. 4 Five pairs of male sterile lines and maintainer line detected by SCAR<sub>821</sub>

## 3 讨论

SCAR 标记特异性和重复性较好,操作简单、快

捷,在分子标记辅助育种中具有重要的应用价值。李红双等<sup>[20]</sup>将获得的与番茄抗根结线虫病基因紧密连锁的 RAPD 标记 OPD20-1454 转化成 SCAR 标记 SCD20-1000,用于番茄抗病材料筛选。王欣等<sup>[21]</sup>利用与抗甘薯茎线虫病基因连锁的 RAPD 标记 OPD01-700 引物对高抗亲本徐 781 和高感亲本徐薯 18 的  $F_1$  分离群体的 161 个品系进行 PCR 扩增,得到长度为 689 bp 的 DNA 序列。并成功地将其转化为 SCAR 标记,并在 7 个高抗品系和 13 个高感品系进行验证,初步建立了甘薯抗茎线虫病育种分子标记辅助选择技术。丁俊杰等<sup>[22]</sup>利用 2 个与大豆灰斑病抗性相关的 SCAR 标记,将大豆灰斑病抗性定位在 2 个磷脂酶 D 基因内含子上。王成等<sup>[23]</sup>研究获得的与桃花花粉可育基因连锁的 RAPD 标记 OPW03-900,并将其转化为 SCAR 标记 SCW03-906。目前,SCAR 标记在分子标记辅助育种和基因定位中广泛应用,但在种子纯度分析,尤其是不育系种子纯度鉴定上的报道却很少,在杂交大豆中尚未见相关研究。

CMS 是指由细胞质基因和核基因互作控制的不育类型。大量研究表明,线粒体基因组与细胞质雄性不育密切相关,而与叶绿体基因组关系不大。从前人研究结果来看,CMS 与线粒体基因组的结构变化和新的嵌合基因的产生有关,而其中已经鉴定的与 CMS 相关的嵌合基因大多与 ATP 合成酶或细胞色素 C 氧化酶(Cox)有关,如水稻 *Atp6* 基因以及其他植物 *AtpA*、*Atp9*、*Cox* 基因等<sup>[24-27]</sup>。本研究利用 ISSR 标记对 5 个大豆杂交种的 5 对不育系及相应保持系在线粒体水平进行多态性分析,发现 IS-SR829 引物在大豆不育系与其对应的保持系间存在特异片段,该片段通过测序比对发现序列存在于大豆线粒体基因 *Atp6* 上游 2 000 bp 处,推断可能由于 *Atp6* 基因嵌合导致该序列在大豆细胞质雄性不育系中缺失,而与其对应的保持系线粒体基因组中该片段正常,但是否此片段缺失造成不育系花粉败育仍需进一步研究。

本研究将不育系和保持系间存在差异的片段克隆测序后,转化为 SCAR 特异鉴定标记,并对 5 个大豆杂交种的不育系母本和同型保持系进行分析,发现该标记重复性好,而且稳定,表明该标记可以作为杂交大豆不育系种子纯度分析的候选标记,实际应用于不育系种子纯度的鉴定。

## 参考文献

[1] Sun H,Zhao L M,Huang M. Studies on cytoplasmic-nuclear male sterile soybean[J]. Chinese Science Bulletin,1994,39(2):175-176.

- [2] 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 Oil Crop Science,2004,26(3):15-17.)
- [3] Grzebelus D,Senalik D,Jagosz B,et al. The use of AFLP markers for the identification of carrot breeding lines and  $F_1$  hybrids[J]. Plant Breeding,2001,120:526-528.
- [4] Livneh O,Vardi E,Stram Y,et al. The conversion of a RFLP assay into PCR for the determination of purity in a hybrid pepper cultivar[J]. Euphytica,1992,62:97-102.
- [5] Ilbi H. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum* [J]. Scientia Horticulturae,2003,97:211-218.
- [6] Daniel I O,Adetumbi J A,Oyelakin O O,et al. Application of SSR markers for genetic purity analysis of parental inbred lines and some commercial hybrid maize (*Zea mays* L.) [J]. American Journal of Experimental Agriculture,2012,2:597-606.
- [7] Jang I,Moon J H,Yoon J B,et al. Application of RAPD and SCAR markers for purity testing of  $F_1$  hybrid seed in chili pepper (*Capsicum annuum*) [J]. Molecules and Cells,2004,18:295-299.
- [8] Yashitol J,Thirumurugan T,Sundaram R M,et al. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers[J]. Crop Science,2002,42:1369-1373.
- [9] Zietkiewicz E,Ratajski A,Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20:176-183.
- [10] Wang H F,Zong X X,Guan J P,et al. Genetic diversity and relationship of global faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm revealed by ISSR markers[J]. Theoretical and Applied Genetics,2012,124:789-797.
- [11] Padmesh P,Mukunthakumar S,Vineesh P S,et al. Exploring wild genetic resources of *Musa acuminata* Colla distributed in the humid forests of southern Western Ghats of peninsular India using ISSR markers[J]. Plant Cell Report,2012,31:1591-1601.
- [12] 杨若林,孔俊,吴鑫,等. ISSR 标记在辣椒资源遗传多态性分析中的初步应用[J]. 上海大学学报:自然科学版,2001,11(4):423-426,435. (Yang R L,Kong J,Wu X,et al. Application of ISSR Markers in genetic polymorphism of *Capsicum frutescens* L [J]. Journal of Shanghai University (Natural Science Edition),2001,11(4):423-426,435.)
- [13] 张立荣,徐大庆,杨文香,等. 小麦抗叶锈基因 *Lr37* ISSR 分子标记[J]. 农业生物技术学报,2004,12(1):86-89. (Zhang L R,Xu D Q,Yang W X,et al. ISSR Molecular markers for the leaf rust resistance gene *Lr37* in wheat [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2004,12(1):86-89.)
- [14] 朱元娣,李光晨,李春雨,等. 苹果柱型基因的 ISSR 分子标记研究[J]. 园艺学报,2003,30(5):505-510. (Zhu Y D,Li G C,Li C Y,et al. Studies on the ISSR marker analyses of the columnar gene in apple [J]. Acta Horticulture Sinica,2003,30(5):505-510.)
- [15] 孟芳,袁庆华,苏德荣,等. 苜蓿抗褐斑病基因 ISSR 标记的筛选及验证[J]. 植物保护,2008,34(4):46-50. (Meng F,Yuan Q H,Su D R,et al. Selection and validation of ISSR markers of common leaf spot disease resistance-related gene in tetraploid alfalfa [J]. Plant Protection,2008,34(4):46-50.)

(下转第 27 页)