

大豆雄性不育突变体 NJ89-1 核不育基因的 SSR 标记和定位^{*}

杨守萍 曾维英 段美萍 喻德跃 盖钧镒

(南京农业大学国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要 组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 的 F_1 、 $F_1 \times F_2$ 、 $F_2 \times F_3$ 的遗传数据表明在组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 中 NJ89-1 雄性不育性仍受一对隐性基因控制; 随机选取组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 的一个 $F_1 \times F_2$ 株行群体作为分子标记定位群体, 对 NJ89-1 不育基因进行 SSR 标记定位, 结果发现 Sat-402 与 NJ89-1 不育基因连锁, 参照 Song 等(2004)整合的大豆遗传连锁图谱, 初步将 NJ89-1 不育基因定位于大豆 C2 遗传连锁群上, NJ89-1 不育基因与 Sat-402 的遗传距离为 9.6cM。

关键词 大豆; 雄性不育基因; SSR 标记定位

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)04-0344-05

雄性不育在被子植物中是十分普遍的^[1,2]。核雄性不育(NMS)可用于作物群体改良, 也可用于作物杂种优势利用, 在利用 NMS 生产杂交种子时, 一般须在花期拔除群体中分离出来的 50%左右的雄性可育株, 不仅费工费时, 而且提供了昆虫传粉的机会, 难以保证制种纯度, 因而限制了 NMS 的应用范围, 但由于 NMS 类型多, 不育彻底、稳定, 选育较为容易, 加上一些作物一时没有 CMS 系可资利用, 因此人们试图通过获得 NMS 全不育群体将 NMS 类型用于杂交种子生产中, 随着许多作物分子标记图谱的构建, 利用 NMS 基因紧密连锁的分子标记来获得 NMS 全不育群体将可能成为现实^[2]。自 20 世纪初报道第一例大豆雄性不育^[3]至今已有许多发现, 其中大多数为核雄性不育, 少数为质核互作雄性不育。大豆雄性不育突变体 NJ89-1 为南农大豆所发现的一个天然核不育突变体^[4], 由于其雌性育性相对正常, 因此将 NJ89-1 划归为大豆核雄性不育中雄性不育-雌性可育类型, 此类不育迄今报道有 ms1~ms9 共 9 个不育基因位点^[7,18], 等位性测验研究发现 NJ89-1 不育基因与 ms1~ms6 均

不等位^[19], 细胞形态学研究表明在雄性败育的细胞形态学特征上, NJ89-1 与 ms1~ms9 突变体均表现不同, 存在明显差异^[6,20], 因此初步认为 NJ89-1 是一个新雄性不育突变体, 其雄性不育基因符号命名为 ms0^[19]。为进一步从分子水平上揭示 NJ89-1 不育基因的遗传特征以及与报道的 ms1~ms9 不育基因的差异, 本实验开展了 NJ89-1 不育基因的 SSR 标记定位等研究工作。

1 材料和方法

1.1 材料

大豆雄性不育突变体 NJ89-1, 恢复系南农 73-935, 杂交组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 的 F_1 、 $F_1 \times F_2$ 、 $F_2 \times F_3$ 。所有田间试验均在国家大豆改良中心、南京农业大学大豆研究所江浦试验站进行。

1.2 方法

1.2.1 NJ89-1 不育基因的遗传验证

* 收稿日期: 2006-01-25

基金项目: 国家 973 项目(编号: 2004CB7206), 国家自然科学基金重大项目(编号: 30490250), 长江学者和创新团队发展计划(PC SIRT), 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室开放基金课题(编号: ZW 2004009)。

作者简介: 杨守萍(1967-), 女, 副教授, 博士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: spyang@njau.edu.cn

联系人: 盖钧镒教授, 中国工程院院士, E-mail: sri@njau.edu.cn

2002 年夏在大豆开花时, 首先通过花粉检测从 NJ89-1 育性分离群体中鉴定出不育株, 然后配置杂交组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935, 同年秋收获得杂交 F₁ 种子; 2003 年夏种植 F₁, 两边种植亲本, 以鉴别真假杂种, 同年秋分单株收获; 2004 年夏种植 F₁:₂ 株行, 同年秋按株行分单株收获; 2005 年夏种植 F₂:₃。调查 F₁、F₁:₂ 和 F₂:₃ 的育性表现, 进行 NJ89-1 不育基因的遗传分析, 统计分析采用 χ^2 测验方法。

1.2.2 NJ89-1 不育基因的 SSR 标记

随机选取组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 的一个 F₁:₂ 株行群体作为 NJ89-1 不育基因的 SSR 标记定位群体, 该群体共有 252 株, 其中可育株 188 株、不育株 64 株, 育性分离比例经 χ^2 测验符合 3:1 ($\chi^2_c=0.0053, P=0.942$)。

2004 年夏, 在大豆苗期(二出复叶展开时), 从田间种植的 NJ89-1 突变体、南农 73-935 以及组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 的 F₁、F₁:₂ 植株上分单株采集嫩叶, 放在 -70℃超低温冰箱里保存待用。植株的育性判别主要根据成熟时的植株表现, 正常成熟、结荚的为可育株, 贪青、结少数或不结荚的为不育株。

采用 CTAB 法^[21, 22] (略加改进) 提取 DNA。从随机选取的标记定位用 F₁:₂ 群体中随机选取 10 株不育单株的等量 DNA 混合构成不育基因池, 随机选取 10 株可育单株的等量 DNA 混合构成可育基因池。

SSR 引物随机选自大豆公共遗传连锁图谱 (Cregan 等 1999)^[23], 引物序列来自 Soybase (<http://129.186.26.94/ssr.html>), 由上海申友和上海申能博采公司合成。

PCR 反应体系 (25 μ l): 8 μ l DNA (10ng/ μ l), 4 μ l Primer (2pmol/ μ l), 2.5 μ l 10× Buffer (freeMgCl₂),

0.4 μ l dNTP (2.5mM), 1.5 μ l MgCl₂ (25mM), 0.12 μ l Taq(5u/ μ l), 8.48 μ l ddH₂O。

PCR 反应程序: 95℃预变性 5min; 95℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 共进行 35 次循环; 72℃延伸 7min。PCR 反应在 PTC-225 型热循环仪中进行, 扩增产物置 4℃冰箱中备用。

用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 银染。用凝胶成像仪 (Pharmacia Biotech Image Master) 进行图像扫描, 记录实验结果。

根据 PCR 扩增产物电泳后显示的指纹条带, 采用 Mapmaker3.0 软件对 SSR 标记与 NJ89-1 不育基因的遗传连锁关系进行分析。

2 结果与分析

2.1 NJ89-1 不育基因的遗传验证

组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 的 F₁, 共有 20 株, 全部为可育株。F₁:₂ 共有 16 个株行, 均表现育性分离, 可育株与不育株的分离比例经 χ^2 测验均符合 3:1, 齐性测验显示它们是同质的, 一致符合 3:1, 将 16 个株行合并共有 1692 株, 其中可育株 1262 株、不育株 430 株, 其分离比例经 χ^2 测验仍符合 3:1 (表 1)。F₂:₃ 共有 66 个家系, 其中有 45 个家系表现育性分离, 有 21 个家系共 5745 株无育性分离, 全部为可育株, 分离家系数与不分离家系数之比经 χ^2 测验符合 2:1 ($\chi^2_c=0.0170; P=0.8961$)。表现育性分离的 45 个家系, 其分离比例经 χ^2 测验均符合 3:1, 齐性测验表明它们是同质的, 合并后共有 2674 株, 其中可育株 2011 株、不育株 663 株, 其分离比例经 χ^2 测验仍符合 3:1 (表 2)。以上结果表明, 在组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 中 NJ89-1 雄性不育性仍受一对隐性基因控制, 与以前的报道^[6, 19] 相一致。

表 1 组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 F₁:₂ 株行的育性分离分析

Table 1 Analysis of the fertility segregation of F₁:₂ lines of cross NJ89-1 sterile plant × Nannong73-935

F ₁ : ₂ 株行	可育株数	不育株数	$\chi^2(3:1)$	$\chi^2_c(3:1)$	df	P
F ₁ : ₂ lines	No.fertile plants	No. sterile plants				
总计	1262	430	2.5010		16	
Total						
合并			0.1545	0.1332	1	0.7152
Pooled						
齐性测验			2.3465		15	0.9999
Homogeneity						

表 2 组合 NJ89-1 不育株 × 南农 73-935 F_{2:3} 家系的 3:1 育性分离的适合性测验

Table 2 Test of fitness for 3 fertile : 1 sterile of F _{2:3} lines of cross NJ89 – 1 sterile plant × Nannong 73 – 935							
F _{2:3} 家系	可育株数	不育株数					
F _{2:3} lines	No.fertile plants	No. sterile plants	$\chi^2 2(3:1)$	$\chi_c^2(3:1)$	df	P	
总计	2011	663	8.6454		45		
Total							
合并			0.0603	0.0499	1	0.8233	
Pooled							
齐性测验			8.5851		44	1.0000	
Homogeneity							

2.2 大豆雄性不育突变体 NJ89-1 不育基因的 SSR 标记

利用 660 对大豆 SSR 引物对亲本 NJ89-1 不育株和南农 73-935 进行多态性筛选, 结果 412 对 SSR 引物具有扩增产物, 其中 101 对 SSR 引物表现出多态性, 多态性频率为 15.3%。用在亲本间表现多态的 101 对 SSR 引物对不育基因池和可育基因池进行分析, 结果有 18 对 SSR 引物在基因池间表现多态性。然后用这 18 对 SSR 引物对 10 株 NJ89-1 不育株、5 株南农 73-935、10 株 NJ89-1 可育株、不育基因池和可育基因池进行扩增, 结果只有

Sat-402 和 Satt153 两对引物表现较为理想的多态性。进一步用这两对引物对 NJ89-1 不育株、南农 73-935、F₁、F_{1:2} 单株进行扩增, 根据 Sat-402 和 Satt153 在 252 株 F_{1:2} 植株上扩增产物的带型表现和植株的育性表现, 采用 Mapmaker3.0 软件分析 Sat-402 和 Satt153 与 NJ89-1 不育基因的连锁关系, 结果发现 Satt153 与 NJ89-1 不育基因不连锁, Sat-402 与 NJ89-1 不育基因连锁, 参照 Song 等 (2004)^[24] 整合的大豆遗传连锁图谱, 发现 Sat-402 位于 C2 连锁群上, 从而将 NJ89-1 不育基因初步定位于大豆 C2 遗传连锁群上, NJ89-1 不育基因

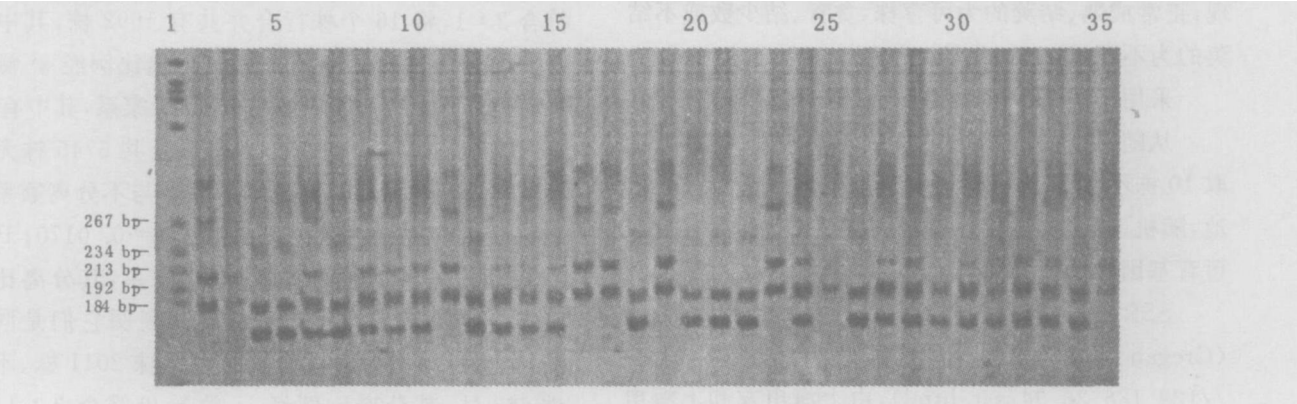


图 1 Sat-402 在 NJ89-1 不育株、南农 73-935、F₁、F_{1:2} 部分植株上的扩增产生

Fig.1 Amplification products of Sat 402 among NJ89-1 sterile plant, Nannong 73-935, F₁ and F_{1:2} plants

1: Marker 23: NJ89-1 不育株 45: 南农 73-935 6: F₁ 735: F_{1:2}

1: Marker 23: NJ89-1 STERILE PLANT 45: Nannong 73-935 6: F₁ 735: f_{1:2}

与 Sat-402 的遗传距离为 9.6cM。

3 讨论

植物雄性不育相关基因的定位是作物杂种优势利用的基础。过去, 育性基因的定位主要采用细胞遗传学方法, 需要三体、单体、端体等特殊的细胞遗传学材料, 在研究时须注意排除非整倍体本身对育性的影响。近年来, 分子标记技术得到了迅速的发

展, 各主要作物的分子标记连锁图谱均已构建, 分子标记定位方法成为当前育性基因定位的主要方法。目前用于基因定位的分子标记主要有限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩展多态性 DNA(RAPD)、扩展片段长度多态性(AFLP)和微卫星 DNA(SSR)等标记。在 DNA 分子标记中 RAPD 标记稳定性较差, 受反应条件影响较大, 检测的重复性较差; RFLP 检测的步骤较多, 周期长, 成本较高; AFLP 比较繁琐; 而 SSR 标记不仅稳定性好, 重复性高, 费

用较低,操作比较简单,而且 SSR 标记作为共显性标记,能鉴别真伪杂种并区别后代个体的基因型。因此本实验采用 SSR 标记来定位大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的不育基因。结果发现位于 C2 连锁群上的 Sat-402 与 NJ89-1 不育基因连锁,遗传距离为 9.6cM。Jin 等(1998)报道将 ms7 定位于 D1b 连锁群上的 Satt157 和 Satt412 之间^[25]。本实验结果初步表明 NJ89-1 不育基因与已报道的 ms7 不在同一个连锁群上,至于 NJ89-1 不育基因与已报道的 ms1(ms9)的更精确的分子遗传学上的关系,还需要进一步研究确定。本实验中找到的分子标记与 NJ89-1 不育基因的遗传距离还不是很近,这可能是受到作图群体、标记数量和种类等方面的影响,今后将从这几个方面入手进行广泛筛选,以找到与 NJ89-1 不育基因紧密连锁的分子标记,为分子标记辅助育种和克隆 NJ89-1 不育基因奠定基础。

参 考 文 献

- 1 Kaul M L. Male sterility in higher plants[M]. Monograph on Theoretical Applied Genetics, 1988. Vol. 10. Springer verlag. Berlin.
- 2 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.
- 3 Owen F V. A sterile character in soybeans[J]. Plant Physiology, 1928, 3: 223-226.
- 4 马国荣, 刘佑斌, 盖钧镒. 大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的发现与表现[J]. 大豆科学, 1993, 12(2): 172-174.
- 5 Gai J Y, S P Yang, H Q Xu. The performance and allelism study of the new male sterile mutant NJ89-1 of the soybean[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1997, 24: 57-59.
- 6 杨守萍, 盖钧镒, 徐汉卿. 大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的遗传学与细胞学鉴定[J]. 大豆科学, 1998, 17(1): 32-38.
- 7 Brim C A, M F Young. Inheritance of a male sterile character in soybeans[J]. Crop Science, 1971, 11: 564-566.
- 8 Albertsen M C, R G Palmer. A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male sterile(ms1) and male fertile soybeans(*Glycine max*(L.) Merr.) [J]. Amer. J. Bot., 1979, 66(3): 253-265.
- 9 Bernard R L, C R Cremeens. Inheritance of the Eldorado male sterile trait[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1975, 2: 37-39.
- 10 Graybosch R A. Genetic and cytological studies of a male sterile, female fertile soybean mutant[J]. The Journal of Heredity, 1984, 75: 383-388.
- 11 Palmer R G. Inheritance of male sterile female fertile mutant ms3[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1979, 6: 63-64.
- 12 Palmer R G, C W Johns, P S Muir. Genetics and cytology of the ms3 male sterile soybean[J]. The Journal of Heredity, 1980, 71: 343-348.
- 13 Palmer R G. Inheritance of male sterile female fertile mutant ms4[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1979, 6: 64-66.
- 14 Delannay X, R G Palmer. Genetics and cytology of the ms4 male sterile soybean[J]. The Journal of Heredity, 1982, 73: 219-223.
- 15 Buss G R. Inheritance of a male sterile mutant from irradiated Essex soybeans[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1983, 10: 104-108.
- 16 Skonupska H, R G Palmer. Genetics and cytology of the ms6 male sterile soybean[J]. The Journal of Heredity, 1989, 80: 304-310.
- 17 Palmer R G. Genetics of four male sterile female fertile soybean mutants[J]. Crop Science, 2000, 40: 78-83.
- 18 Palmer R G, J Y Gai, H Sun, et al. Production and evaluation of hybrid soybean[J]. In: J Janick(ed.). Plant Breeding Reviews John Wiley (Sons, Inc. New York). 2001, 21: 263-307.
- 19 杨守萍, 盖钧镒, 邱家驹. 大豆雄性不育突变体 NJ89-1 核雄性不育基因的等位性测验[J]. 作物学报, 2003, 29(3): 372-378.
- 20 杨守萍, 盖钧镒, 徐汉卿. 大豆雄性不育突变体 NJ89-1 的细胞学研究[J]. 作物学报, 1999, 25(6): 663-666.
- 21 Murray M G, W F Thompson. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res., 1980, 8: 4321-4325.
- 22 Saghai Maroof M A, K M Soliman, R A Jorgensen, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 8014-8018.
- 23 Cregan P B. An integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Crop Sci., 1999, 39: 1464-1490.
- 24 Song Q J, L F Marek, R C Shoemaker, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Theor. Appl. Genet., 2004, 109: 122-128.
- 25 Jin W, R G Palmer, H T Homer, et al. Molecular mapping of a male sterile gene in soybean[J]. Crop Science, 1998, 38: 1681-1685.

SSR MARKER LOCATION OF MALE STERILE GENE OF NUCLEAR MALE STERILE MUTANT NJ89-1 IN SOYBEAN

Yang Shouping Zeng Weiyang Duan Meiping Yu Deyue Gai Junyi

(National Center for Soybean Improvement, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract The analysis of genetic data of F_1 , $F_{1:2}$ and $F_{2:3}$ of cross NJ89-1 sterile plant \times Nannong73(935 showed that the male sterility of NJ89-1 was still controlled by a single recessive nuclear gene. One population of a F_2 line of cross NJ89-1 sterile plant \times Nannong73(935 was selected randomly to map the male sterile gene of NJ89-1 through SSR markers. The results showed that Sat-402 was linked to the male sterile gene of NJ89-1. According to the integrated soybean genetic linkage groups of Song et al. (2004), it was found that Sat-402 was on the linkage group C2. Thus the male sterile gene of NJ89-1 was preliminarily located on the linkage group C2. The linkage distance between Sat-402 and the male sterile gene of NJ89-1 was 9.6cM.

Key words Soybean; Male sterile gene; SSR marker location

中国农技协大豆科技与产业化专业委员会成立暨学术 交流会在石家庄召开

“中国农技协大豆科技与产业化专业委员会成立暨学术交流会”于2006年9月2日-3日在石家庄市召开。来自国内16个省市的科研、种子推广部门以及有关企业的近100名代表参加了本次会议。会议由河北省农林科学院承办,中国农技协、农业部、河北省科协、河北省农业厅等有关部门领导到会祝贺。

会议由中国农村专业技术协会秘书长、中国科协农村专业技术服务中心副主任张晓军主持。原中国科协副主席、中国农村专业技术协会理事长王连铮宣布会议开幕并做了专业委员会筹备情况的工作报告。在原国家大豆工程技术研究中心主任刘忠堂研究员主持下选举产生了以著名大豆专家王连铮研究员为主任委员的专业委员会,张孟臣研究员宣读了专业委员会组织管理与服务办法。大豆科技与产业化专业委员会的宗旨是:适应大豆产业发展以及种植农户、加工企业的需求,以科技为纽带,以市场为导向,团结、组织大豆产业的农民、科普工作者、技术推广人员和企业家,普及推广先进技术,促进科技成果转化,开展产前、产中、产后配套服务,提高会员的科技素质,推进大豆产业化经营,引导会员走科技致富、共同富裕的道路,为推动我国大豆科技进步和产业化发展做出贡献。委员会的工作任务:1.宣传大豆科技的最新成果和企业的创新产品;2.大力促进科研与生产和企业的紧密结合;3.推广成熟的大豆高产栽培新技术以及大豆加工新产品;4.培训农民和基层农业技术人员,以增加人员收入;5.积极吸纳国内科研骨干、大豆加工企业和农村技术人员成为会员;6.纳入中国农技协网站上建立大豆科技与产业化委员会宣传网站”。

刘忠堂、张孟臣、邱家驹、董钻、王书平副主任委员和邵桂花委员就大豆科研、生产、市场与产业化发展;大豆产业开发与品种推广;以及大豆产量生理、大豆离子分布与耐盐性研究等作了专题报告。来自吉林、安徽、山西、广东、新疆、山东、河北等省市的大豆科研、种子企业交流了大豆科研、生产、加工与产业发展情况,代表们共同讨论了目前国内外大豆产业现状和今后的发展方向。最后,王连铮主任委员作了以“国内外大豆生产的现状和大豆品种创新问题”为题的总结性报告。

会议期间与会代表参观了河北农林科学院粮油作物研究所堤上试验站、国家大豆改良中心石家庄分中心试验设施建设;考察了河北省农林科学院粮油作物研究所大豆产业化示范基地,参观了高蛋白大豆冀豆12号、高油大豆冀黄13、冀nf58以及无豆腥味大豆五星1号大面积示范田。

杨春燕 邱锐

河北省农林科学院粮油作物研究所

国家大豆改良中心石家庄分中心