

大豆细胞质雄性不育恢复基因的 SSR 标记

赵丽梅, 王玉民, 孙 寰, 赵洪锬, 程延喜, 彭 宝, 王曙明, 张伟龙, 董英山

(吉林省农业科学院大豆研究中心, 长春 130033)

摘要 大豆细胞质雄性不育系的获得, 为大豆杂种优势利用奠定了基础。在确认 RN 型大豆细胞质雄性不育系属单基因配子体不育, 恢复性是由显性单基因控制的遗传模式的基础上, 开展恢复基因的分子标记研究, 旨在找到与恢复基因紧密连锁的分子标记, 为进一步克隆恢复基因及恢复系的分子标记辅助育种奠定基础。研究选用 412 对 SSR 引物, 利用 RN 型不育系 YA 与恢复系 167 杂交的 F₂ 分离群体, 获得了与恢复基因连锁的两个标记 Satt414 和 Satt596, 遗传距离分别为 16.4 和 14.6 cM。为了找到更近的分子标记, 分析了 Satt414 和 Satt596 附近的所有 SSR 引物, 并利用两个遗传差异较大的亲本重新构建了分离群体, 从而获得了与恢复基因连锁比较紧密的标记 Satt547, 遗传距离为 7.56 cM。根据 Cregan 等构建的大豆分子遗传连锁图, 将恢复基因定位于 J 连锁群上。

关键词 大豆; 细胞质雄性不育; 恢复基因; 分子标记

中图分类号 S565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)06-0835-05

IDENTIFICATION OF SSR MARKERS LINKED TO THE FERTILITY RESTORER GENE FOR THE CMS IN SOYBEAN

ZHAO Li-mei, WANG Yu-min, SUN Huan, ZHAO Hong-kun, CHENG Yan-xi, PENG Bao, WANG Shu-ming, ZHANG Wei-long, DONG Ying-shan

(Soybean Research Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033)

Abstract The development of cytoplasmic male sterile (CMS) line has facilitated the utilization of soybean heterosis. It was confirmed that the fertility restoration of the RN type soybean CMS line was controlled by a single dominant nuclear gene. Two SSR makers, Satt414 and Satt596, which were genetically linked to the nuclear restorer gene, were selected by screening of SSR markers with F₂ segregation population from the cross between sterile line YA and restorer line 167. The genetic distance between the markers and the restorer gene were 16.4 and 14.6 cM, respectively. A segregating population developed from a cross between more diversified parents was used for screening the closer SSR markers. SSR marker Satt547 with genetic distance of 7.56 cM to the restorer gene was identified. The nuclear restorer gene was located in J linkage group according to Cregan's soybean genetic map.

Key words Soybean; Cytoplasmic male sterile (CMS); Restorer gene; Molecular marker

收稿日期: 2007-07-26

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(G1998010200); 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2006AA10Z120); 国家支撑计划(2006BAD01A04); 国家自然科学基金项目(30370890)

作者简介: 赵丽梅(1964-), 女, 研究员, 博士, 主要从事大豆杂种优势利用研究。E-mail: lmzhao@cjaas.com

通讯作者: 董英山, 研究员, 博士。Tel: 0431-87063008; E-mail: ysdong@cjaas.com

对作物细胞质雄性不育系统来说,选育恢复系相对于不育系要困难得多,主要表现在恢复基因的有无只能在测交后代中鉴定,在一年种植一季的地区,转育一个由显性单基因控制的恢复系需 8~10 年的时间。加上分离后代不可能逐株测交,使一些农艺性状优良的品系不含恢复基因。利用与恢复基因紧密连锁的分子标记,进行分子标记辅助选择,不仅可以排除环境条件的影响,大大加快选育时间,同时也为克隆恢复基因打下了基础。

有关大豆细胞质雄性不育最早的报导是 Davis 在一项美国专利中所描述的^[1],但迄今没有人能重复这一试验结果。孙寰等^[2]利用栽培大豆和野生大豆远缘杂交育成了野生型细胞质雄性不育系和同型保持系,并于 1995 年实现栽培大豆三系配套。定名该细胞质雄性不育系为 RN 型不育系,并又发现了 ZD 和 XX 两种不同细胞质来源的细胞质雄性不育系^[3-4]。李磊等^[5]、盖均镒等^[6]、张磊等^[7]也相继发现了细胞质雄性不育现象,并于 1999 年育成了大豆细胞质雄性不育系^[8-9]。目前,大豆细胞质雄性不育系已经进入应用阶段,但有关细胞质雄性恢复基因的分子标记研究,国内外少有报道。

孙寰等^[10]对 RN 型大豆细胞质雄性不育系进行了遗传模式的研究,确认该不育系统属单基因配子体不育,恢复基因为单显性基因 Rfrf。在此基础上,本研究选用 SSR 分子标记技术开展恢复基因标记研究,旨在找到与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 群体构建

群体 1:以 RN 型细胞质雄性不育系 YA 为母本,恢复系 167 为父本进行杂交,获得(YA × 167)F₂ 育性分离群体,可育和半不育植株的比例为 1:1。在大豆开花期进行育性镜检,在 131 个 F₂ 单株中,可育单株 65 株,半不育单株 66 株。以不育系 YA、保持系 YB 和恢复系 167 构成三交群体 YA × (YB × 167),半不育和不育植株的比例为 1:1,从中获得不育群体。

群体 2:以不育系 JLCMS82A 为母本,恢复系 JLR1 为父本,配制杂交组合,获得(JLCMS82A × JLR1)F₂ 群体,可育和半不育植株的比例为 1:1。

在大豆开花期进行育性镜检,共 105 株,其中可育 56 株,半不育 49 株。

1.2 近等基因池的构建及引物筛选

分别随机取 10 个可育单株、10 个半不育单株、10 个不育系单株 DNA 等量混合,分别构建可育基因池、半不育基因池、不育基因池。用可育基因池、半不育基因池、不育基因池筛选引物,对有多态性的引物进行群体的单株验证,用亲本作对照。

1.3 SSR 引物的来源及数量

按照 Soybase 网站上(<http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php>)所提供的大豆微卫星序列选用 412 对 SSR 引物,由北京鼎国生物技术公司合成。

1.4 大豆基因组 DNA 的提取

新鲜叶片总 DNA 采用 Rogers 和 Bendish 报道的 CTAB 方法^[11],并参考忻骅等^[12]稍作改进的方法提取。

1.5 PCR 反应

反应体系总体积 25 μL,其中包括 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl (PH = 8.3), 1.8 mmol L⁻¹ MgCl₂, 5 mmol L⁻¹ KCl, 4 种 dNTP 各 200 μmol L⁻¹, 引物 240 nmol L⁻¹, 1U Taq DNA 聚合酶, 30 ng DNA。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 4 min, 然后 94℃ 30 s, 46℃ 30 s, 68℃ 30 s, 30 个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物采用 6% 测序胶电泳, 银染显示谱带, 数码相机记录结果。

1.6 遗传距离的计算

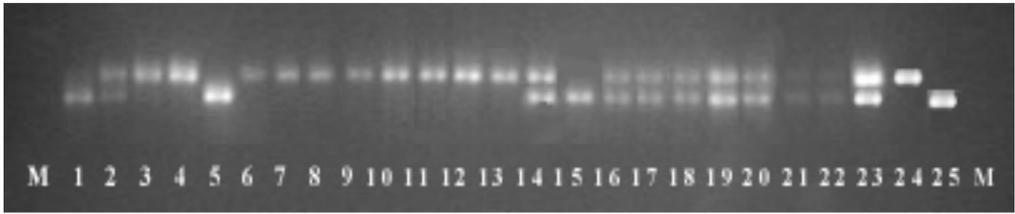
采用 JoinMap 软件系统^[13]。

2 结果与分析

2.1 细胞质雄性不育恢复基因的初步标记

通过遗传研究已经确认 RN 型细胞质雄性不育系属单基因配子体不育,恢复基因为一对显性基因 Rfrf。利用由群体 1 构建的可育基因池、半不育基因池和不育基因池对 400 对 SSR 引物进行筛选,发现引物 Satt414 在可育基因池、半不育基因池和不育池之间有多态性差异,在可育池和不育池各扩增出一条特异带,在半不育池扩增出分别含有不育池和可育池特异带的两条特异带。进一步以亲本和群体 2 进行单株验证,可育亲本和不育亲本各扩增出一条特异带,可育池扩增出的一条特异带与恢复系的特异带一致,不育池扩增出的一条特异带与不育系的

特异带一致,半育池扩增出的特异带涵盖了恢复系 和不育系的两条特异带(图1)。



M; Marker; 1: 不育池; 2: 半育池; 3: 可育池; 4: 恢复系; 5: 不育系; 6-15: 分离群体中的可育株; 16-25: 分离群体中的半不育株
M; Marker; 1: Sterile pool; 2: Semi-sterile pool; 3: Fertile pool; 4: Restorer line; 5: Sterile line; 6-15: Fertile plants of the segregation population; 16-25: Semi-sterile plants of the segregation population

图1 Satt414 引物扩增结果

Fig. 1 SSR profile amplified with Satt414 primer

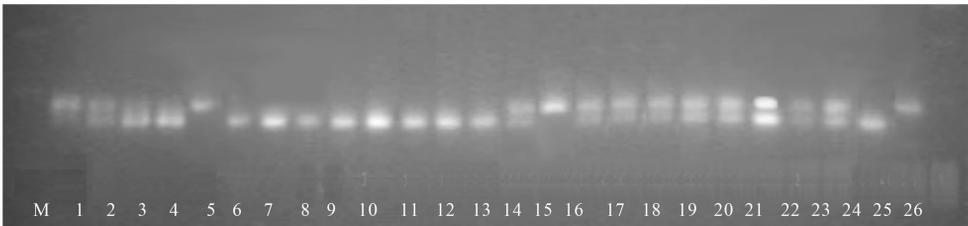
除14号单株扩增出与半育池一致的特异带、15号单株扩增出与不育亲本一致特异带外,其余可育单株扩增结果均与可育亲本和可育池一致;24号单株扩增出与可育亲本一致的特异带,25号单株扩增出与不育亲本一致特异带,其它半不育单株的扩增结果与半不育池一致。说明14、15和24、25单株发生了交换。在引物Satt414扩增的131个群体1 F₂单株中,65个可育单株有18株发生交换,66个半不育单株中有16个发生交换;将Satt414引物扩增的131个单株的结果用Joinmap以Kosmai函数进行遗传作图,结果表明Satt414与恢复基因连锁,距恢复基因的遗传距离为16.4 cM。

2.2 细胞质雄性不育恢复基因的进一步标记

根据Cregan等^[14]构建的遗传连锁图谱,确定Satt414位于J连锁群上。为了找到更紧密的分子标记,进一步定位恢复基因,用J连锁群的所有SSR

引物对群体进行扩增标记。

用合成的J连锁群的18个SSR引物对三个基因池及亲本进行扩增,筛选到引物Satt596有较好的多态性。进一步用该引物对亲本和群体2进行单株验证,可育亲本和不育亲本各扩增出一条特异带,分别与可育池和不育池扩增出的特异带一致,半育池扩增出含有可育亲本、不育亲本特异带的两条带(图2)。6-15和16-25分别为群体1的10个可育单株和10个半不育单株的扩增结果,除14、15和24、25外,扩增结果分别与可育亲本和半不育亲本一致,说明14、15和24、25号单株发生了交换。在引物Satt596扩增的131个单株中,65个可育单株有18株发生交换,66个半不育单株中有14个发生交换。将131个单株的扩增结果用Joinmap以Kosmai函数进行遗传作图,结果表明Satt596与恢复基因连锁,距恢复基因14.6 cM。



M; Marker; 1: 不育池; 2: 半育池; 3: 可育池; 4: 恢复系; 5: 不育系; 6-15: 分离群体中的可育株; 16-25: 分离群体中的半不育株

M; Marker; 1: Sterile pool; 2: Semi-sterile pool; 3: Fertile pool; 4: Restorer line; 5: Sterile line; 6-15: Fertile plants of the segregation population; 16-25: Semi-sterile plants of the segregation population

图2 引物 Satt596 扩增图谱

Fig. 2 PCR amplification with Satt596 primer

2.3 细胞质雄性不育恢复基因的定位

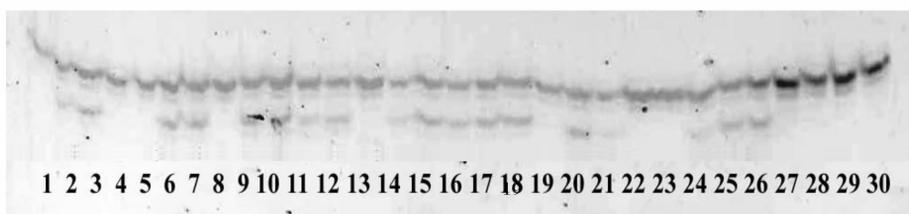
虽然找到了Satt596、Satt414两个连锁标记,遗传距离分别为14.6 cM和16.4 cM,但遗传距离都比

较远。为了找到更为紧密的标记,选用J连锁群上的18个SSR标记,对6个不育系JLCMS9A、JLCMS47A、JLCMS82A、JLCMS8A、JLCMS29A、JLC-

MS61A 和 9 个恢复系 JLR1、JLR2、JLR3、JLR4、JLR5、JLR6、JLR7、JLR8、JLR9 的多态性进行分析,发现不育系 JLCMS82A 与恢复系 JLR1 之间的多态性最高。

以不育系 JLCMS82A 和恢复系 JLR1 配制杂交组合,构建了(JLCMS82A × JLR1)F₂分离群体(群体 2)。在开花期进行镜检,确认该分离群体中的可育

株与半不育株的比例为 1: 1。以 Satt596 及其附近的 3 个 SSR 引物 Satt212、Satt547 和 Sct001 对 105 个 F₂单株进行扩增。图 3 是 SSR 引物 Satt547 对 105 个单株中的 30 个单株扩增的结果,其中 2 号和 13 号单株发生了交换。用 Joinmap Kosmai 函数进行遗传作图,计算结果见表 1。



1、2、4、5、8、19、22、23、27~30 为可育单株,3、6、7、9~21、24~26 为半不育单株
Lanes 1、2、4、5、8、19、22、23、27~30: Fertile plants, 3、6、7、9~21、24~26: Semi-sterile plants

图 3 Satt547 与 105 个分离单株中的 30 个单株扩增结果

Fig. 3 PCR amplification of 30 plants from 105 segregation single plants with Satt547 primer

表 1 各标记之间及各标记与恢复基因之间的遗传距离和重组率

Table 1 Genetic distance between markers, between markers and restorer gene, and recombination frequencies					
标记 1	标记 2	遗传距离/cM		重组率	LOD 值
Marker 1	Marker 2	Dist	Rec	/%	LOD
		(Direct dist)			
Satt596	Sct0001	4.515	(4.399)	4.388	31.774
Satt596	Satt215	14.087	(16.372)	15.811	12.290
Satt596	RRRRRRR	32.957	(34.104)	29.644	3.809
Satt596	Satt547	40.518	(33.253)	29.086	3.958
Sct0001	Satt215	9.572	(12.035)	11.808	16.713
Sct0001	RRRRRRR	28.442	(27.563)	25.073	5.808
Sct0001	Satt547	36.003	(28.561)	25.813	5.341
Satt215	RRRRRRR	18.870	(29.266)	26.326	4.591
Satt215	Satt547	26.431	(32.889)	28.844	3.332
RRRRRRR	Satt547	7.561	(9.598)	9.482	23.070

通过计算得出, Satt596、Sct0001、Satt215 和 Satt547 与恢复基因的遗传距离分别为 32.957、28.442、18.870 和 7.561cM。Satt547 与恢复基因连锁最为紧密,重组率为 9.482%。恢复基因(*Rf*) 在分子连锁群上的位置见图 4。

3 讨论

对 RN 型大豆细胞质雄性不育遗传模式研究已

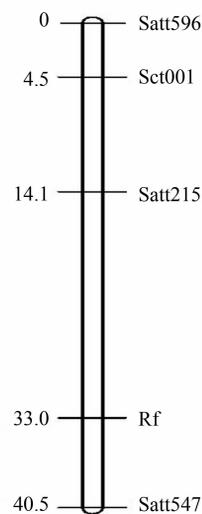


图 4 大豆细胞质雄性不育恢复基因(*Rf*) 在分子连锁群上的位置

Fig. 4 Position of fertility restorer gene for CMS on genetic linkage map of soybean

清楚,该细胞质雄性不育系恢复基因是由一对显性

基因控制的。为了找到与恢复基因紧密连锁的标记,利用不育系与恢复系构建了相应的遗传群体。由于RN型细胞质雄性不育系为单基因配子体不育,以不育系与恢复系杂交获得 F_2 育性分离群体时,由于 r_f 无法通过雄配子传递,在 F_2 群体中只出现可育和半不育的植株,不能分离出不育单株。因此,无法获得可育、半不育、不育这样的近等基因系。为此,本研究在以不育系与恢复系构建 F_2 育性分离群体的同时,设计了一个遗传背景与 F_2 群体基本相同的三交群体。在以不育系与恢复系杂交获得的($YA \times 167$) F_2 分离群体中,可获得可育和半不育的近等基因系。在三交群体 $YA \times (YB \times 167)$ 中,可获得半不育和不育的近等基因系。

应用构建的可育池、半不育池和不育池进行了SSR引物筛选,用 F_2 单株验证,确认Satt414和Satt596与恢复基因连锁,遗传距离分别为16.4cM和14.6cM后,将恢复基因定位在J连锁群上。有关大豆的遗传图谱能够参考的是美国农业部(Beltsville Agriculture Research Center, BARC)在网上公布的大豆遗传图谱。目前,已构建的大豆遗传图谱有20个遗传连锁群,已明确的标记1849个,其中,包括1015个SSR标记,709个RFLP标记和73个RAPD标记。目前这个遗传图谱饱和度还很低,也给进一步找到更近的分子标记带来了困难。据此,笔者调整了研究方案,用两个遗传差异较大的亲本重新构建了分离群体($JLCMS82A \times JLR1$) F_2 ,最终找到一个与恢复基因连锁比较紧密的标记Satt547,与恢复基因的遗传距离为7.56cM。虽然根据分子标记的遗传交换规律,7.56cM还是一个比较远的标记,还会发生分离。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。

由于大豆的遗传图谱标记的密度还很低,各标记之间的位置、遗传距离因不同的作者、利用不同的群体而异。在本研究中,用($YA \times 167$) F_2 群体得出的Satt596与恢复基因的遗传距离为14.6cM,而用($JLCMS820A \times JLR1$) F_2 群体得出的与恢复基因的

遗传距离为32.957cM。

本研究所获得的与大豆细胞质雄性不育恢复基因连锁的SSR分子标记,不仅可以用于分子标记辅助选择,提高恢复系选育速度和效率,而且为进一步精准定位恢复基因,并最终克隆恢复基因打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Davis W. H. Route to hybrid soybean production [P]. US Patent: US4545146A, 1985-10-08.
- [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.
- [3] 赵丽梅,孙寰,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.
- [4] 孙寰,赵丽梅,王曙明,等. 大豆杂种优势利用研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(1): 92-96.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [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.
- [8] 盖钧镒,丁德荣,崔章林,等. 大豆质核互作雄性不育系NJC-MS1A的选育及其特性[J]. 中国农业科学, 1999, 32(5): 23-27.
- [9] 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.
- [10] 孙寰,赵丽梅,黄梅. 质核互作雄性不育大豆及生产大豆杂种的方法[P]. 中国专利: ZL97 1 12173. 7, 2000-09-30.
- [11] Rogers O S. Extraction of DNA from plant tissues[J]. Plant Molecular Biology Manual, 1998, 6: 1-10.
- [12] 忻骅,袁卫明,顾其敏,等. 抽提大豆各组织总DNA方法的比较研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(6): 719-720.
- [13] Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap [J]. The Plant Journal, 1993, (5): 739-744.
- [14] Gregon P B. An integrated genetic linkage map of the soybean genome[J]. Crop Science, 1999, 39: 1464-1489.