

利用 SSR 标记定位油菜细胞质雄性不育系 1193A 的恢复基因

官春云¹, 尹明智²

(¹ 湖南农业大学国家油料改良中心湖南分中心, 长沙 410128; ² 遵义师范学院生命科学学院, 贵州遵义 563002)

摘要:以油菜细胞质雄性不育系 1193A 和恢复系 1193R2 为亲本构建 F₂ 分离群体, 并运用 BSA 法构建了可育和不育基因池。利用 1521 对 SSR 引物进行了多态性分析, 结果表明有 36 对引物在亲本和基因池间都表现多态性, 用 F₂ 单株验证表明有 11 对引物与恢复基因连锁, 离恢复基因较近的 2 个标记 CB10316 和 BnGMS171 分布在恢复基因 *Rf* 的两侧, 遗传距离分别为 3.9 cM 和 5.7 cM, 可作为恢复系标记辅助育种的候选标记。

关键词:油菜; 雄性不育系 1193A; 恢复基因; SSR 标记

Mapping of Restoring Gene for Cytoplasmic Male Sterile Line 1193A in *Brassica napus* L. Using SSR Markers

GUAN Chun-yun¹, YIN Ming-zhi²

(¹ National Oil Crops Improvement Center of Hunan Agricultural University, Changsha 410128;

² College of Life Sciences, Zunyi Normal University, Zunyi Guizhou 563002)

Abstract: F₂ population was built by cytoplasmic male sterile line 1193A as female parent and restorer line 1193R2 as male parent. Using bulked segregant analysis method (BSA), 1521 SSR markers were analyzed. The result showed that 36 markers had polymorphism between parents and gene bulks. Then, F₂ population detection indicated 8 markers linked to the restoring gene, two of which located on both sides of the restoring gene and closely linked to the restoring gene with a genetic distance of 3.9 cM for CB10316 and 5.7 cM for BnGMS171, respectively, which could be used as candidate markers for marker-assisted breeding of restorer line.

Key words: *Brassica napus* L. cytoplasm; male sterile line 1193A; restoring gene; SSR markers

利用杂种优势有利于提高油菜产量, 目前油菜主要的授粉控制系统是细胞质雄性不育系统。不育系的应用价值体现在选育出强优势的杂交种, 而选育强优势恢复系对于配制强优势杂交组合是至关重要的^[1]。恢复基因的分子标记与克隆研究不仅有利于加速恢复系的选育, 提高选育效率, 而且有利于完整表述恢复基因与细胞质雄性不育相关基因间的作用机理。因此, 育种家们都十分重视恢复系的选育以及恢复基因的遗传和标记筛选等研究工作, 并取得了很好的成效。

刘平武等^[2]构建 F₂ 分离群体, 利用 BSA 法获得了与 *pol CMS* 的 *Rf* 恢复基因连锁的 2 个分子标记, 其中, AFLP 标记 E7P16230 与 *Rf* 遗传图距为 4.3 cM, 另一个 RAPD 标记 S1-500 的遗传图距为 10.8 cM。赵振卿^[3]筛选了 3072 对 AFLP 引物, 找到了与 *Rf* 连锁的 AFLP 标记 24 个, 用其中 9 个连锁较紧密的标记绘制了区域遗传连锁图, 最近的标记距目标位点为 0.4 cM, 并成功转化了 2 个 SCAR 标记 SCAP0612ST 和 SCAP0612EM2, 其中标记 SCAP0612ST 与目标位点连锁最紧密, 且适用性更

为广泛,可用于分子标记辅助育种。Z. Liu 等^[4]在赵振卿^[3]的研究基础上,利用公共数据库开发了 86 个 SSR 标记和 115 个 SCAR 标记作进一步的分析,结果有 13 个标记与恢复基因 *Rfp* 紧密连锁,将 *Rfp* 定位在 N9 连锁群上,并通过生物信息学预测 *Rfp* 基因可能是 PPR (pentatricopeptide repeat) 蛋白基因。R. Delourme 等^[5-6]从 138 个 RAPD 引物中筛选出 4 个与 *ogu* CMS 恢复基因 *Rfo* 完全连锁的标记,并成功转化成了 SCAR 标记,并将转移到甘蓝型油菜中带有恢复基因的萝卜染色体片段定位在第 15 号连锁群上。S. Maruyama 等^[7]用 BSA 法发现了 7 个 RAPD 标记与恢复基因 *Rfo* 连锁,标记分布于 *Rfo* 基因的两侧,其中 OPH1₄₁₀ 与 *Rfo* 最近,遗传图距是 1.2 cM。之后,同样用 BAS 法,从 F₂ 群体中分析了 32 个 AFLP 标记,筛选出 1 个 AFLP 标记 AFLP190 与恢复基因连锁,并进一步转化成为 STS 标记 STS190,该标记与恢复基因紧密连锁,遗传距离仅为 1.2 cM^[8]。汪志伟等^[9]利用 F₂ 群体筛选出标记 OPC61900 与 *ogu* CMS 的恢复基因连锁,遗传距离为 11.6 cM,这个标记可应用于对育性恢复基因的标记辅助选择。程计华^[10]鉴定出一个与 NSa CMS 恢复基因连锁的 AFLP 标记 EM107,其与恢复基因的交换率在 6.7% 左右,但是通过多种方法进行 SCAR 标记转化均没有成功。孙盼盼^[11]从 180 对 AFLP 引物中找到差异性引物 17 对,94 条 RAPD 引物中找到差异性引物 10 个,96 对 SSR 引物中找到差异性引物 2 对,170 对 SRAP 引物中找到差异性引物 30 对。F₂ 群体验证后发现 4 个 SRAP 标记与恢复基因连锁,即 *mle8*、*m6el0*、*m9el0* 和 *m3e9*,与恢复基因的遗传距离分别是 28 cM、23 cM、3.1 cM、13.5 cM,并将 *m9el0* 标记成功转化为 SCAR 标记 SCAR₂₈₁。

新疆野生油菜 (*Sinapis cwrvensis* L. 简称野油) 是笔者^[12-13]于 1987 年在新疆发现的一种 *n* = 9 的野生油菜,通称野芥,抗逆性强,具有不育细胞质,是一个新的育种资源。郑卓等^[14-15]以野油为母本、甘蓝型油菜湘油 15 号为父本,属间杂交获得的野油胞质不育株。通过将该不育株系回交选育和测交筛选,目前已经选育出不育性稳定的野油胞质不育系 1193A 及其恢复系,实现了三系配套。目前关于该类胞质不育系恢复基因的分子标记研究还比较少见。SSR 标记具有多态性丰富、分布较广、检测快速、稳定可靠等优点,已在作物分子生物学研究上得到了广泛应用。因此,本研究利用 SSR 标记技术分

析不育系 1193A 的恢复基因,可以为建立恢复系的分子标记辅助选择技术以及恢复基因的精细定位与克隆打下基础,为加快不育系 1193A 优良恢复系和强优势杂交种的选育提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

不育系 1193A 和恢复系 1193R2 由湖南农业大学国家油料改良中心湖南分中心提供,秋季播种于湖南农业大学油菜试验基地,夏繁时播种于云南省昆明市云南农业大学小麦油菜国家夏繁基地。2012 夏繁时用不育系 1193A 作母本与恢复系 1193R2 杂交得 F₁,2013 年春选取 F₁ 单株套袋自交,2013 年夏繁时调查 F₁ 自交获得的 F₂ 群体育性分离情况。对调查结果进行 χ^2 检验分析, χ^2 检验 *P* 值由 EXCEL 的 CHITEST 函数计算而来。

1.2 总 DNA 提取和检测

采用 CTAB 法提取 F₂ 群体和亲本叶片总 DNA^[16],用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳在紫外光成像系统下检测 DNA 质量,-20 °C 冰箱中保存备用。

1.3 基因池的构建

参照 R. W. Michelmore 等^[17]提出的 BSA (bulked segregant analysis) 方法,构建可育池和不育池:在 F₂ 群体中随机选取 10 株可育植株的 DNA 等量混合,10 株不育植株的 DNA 等量混合,分别形成 DNA 可育池 (FB),DNA 不育池 (SB),用于筛选与恢复基因相连锁的分子标记。

1.4 SSR 标记来源

试验中用到的所有 SSR 标记均来自湖南农业大学国家油料改良中心湖南分中心保存的 SSR 标记^[16,18-19]。

1.5 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

PCR 扩增程序和反应体系以及聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳参照谭勇俊^[16]的流程进行。

1.6 遗传连锁分析

根据 MAPMAKER 软件的要求^[20],共显性标记:母本带型记为“B”,父本带型记为“A”,杂合带型记为“H”;显性标记,在本研究中父本等位基因为显性,则母本带型记为“B”,杂种带型记为“C”;带型不清或数据缺失均用“-”表示。将对应的带型按顺序录入 EXCEL 表格,读完带后,统计特异条带在 F₂ 群体中的分离情况,运用 χ^2 检验分离比。运用

Kosambi 作图函数将重组率转化为遗传图距(cM),使用 MAPMARKER/EXP Version 3.0 软件进行 (LOD = 3.0, $r = 37.2$) 进行遗传连锁分析,并采用 MapDraw_V2-2 绘制遗传连锁图^[21]。

2 结果与分析

2.1 不育系 1193A 恢复基因的遗传分析

不育系 1193A 作母本与恢复系 1193R2 杂交获得的 F_1 育性表现为可育,自交获得的含 182 个单株的 F_2 作图群体中可育株 136 株,不育株 46 株,经 χ^2 测验 $P = 0.9318 > 0.05$,符合 3:1 的分离比例,说明不育系 1193A 的育性由一对显性核基因控制。

2.2 SSR 标记多态性分析

DNA 模板的纯度和浓度对 PCR 有不良影响。为了检测所提取 DNA 的质量,先采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳在紫外光成像系统下检测 DNA 质量。结果表明所提的 DNA 电泳显示大多是一条亮带,很少有拖尾现象和蛋白质污染,可作为 PCR 模板用于标记多态性分析。

先以亲本 1193A 和 1193R2 为模板进行 PCR 扩增,共筛选了 1521 对 SSR 引物,其中 142 对引物没有扩增出条带,引物有效性为 90.66%,亲本间具有多态性的引物 546 对,占 35.90%。

再将在亲本中表现出多态性的 546 对引物,对基因池进行分析,结果有 36 对引物在 2 个亲本和 2 个抗感池间均能扩增出相同的特异性片段,这 36 对引物即是可能与恢复基因连锁的标记。

2.3 F_2 群体验证

基因池筛选的关键在于单株验证,用 182 株的 F_2 群体对这 36 对引物进行了验证(图 1)。结果表明,36 对引物中有 25 对引物具有较重的偏分离,占 69.44%。对其他的 11 对引物进行了读带数据化和分离比的 χ^2 检验,发现其中 3 对引物 SN2016、BRMS050 和 BrgMS12,不符合孟德尔分离规律,剩下的 8 个 SSR 标记经 χ^2 检验,其可育株与不育株分离比都符合 3:1 的孟德尔分离规律(表 1)。

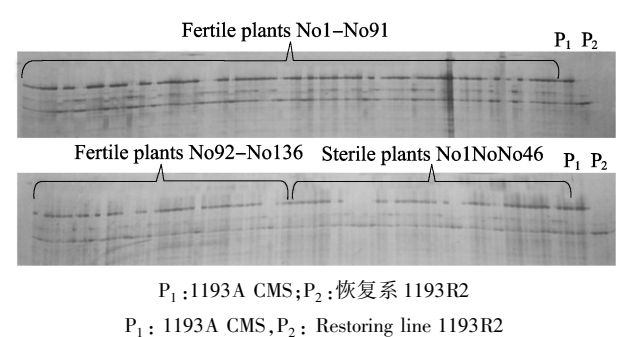


图 1 SSR 标记 CB10316 在 F_2 群体和亲本中的表现
Fig. 1 Segregation of SSR marker CB10316 in the F_2 population and parents

表 1 连锁标记的重组率和遗传距离

Table 1 Recombination rate and genetic distance of the markers

标记名称 Markers name	未跑出 1193R2 带型数 Without 1193R2 bands	未跑出 1193A 带型数 Without 1193A bands	未跑出 带株数 Without bands	交换株数 Exchange numbers	重组率(%) Exchange rate	期望 值(E) Expected value	χ^2 检验 χ^2 test	遗传 距离 Genetic distance
CB10316	0	7	0	7	3.85	3:1	0.41	3.90
BRMS309	16	8	1	24	13.26	3:1	0.82	13.60
BRAS072	23	9	18	32	19.51	3:1	0.84	20.60
NIA-M051A	48	12	5	60	33.90	3:1	0.99	41.30
BrgMS741	0	12	0	12	6.59	3:1	0.13	6.60
At4g02580	10	14	0	24	13.19	3:1	0.17	13.50
BnGMS171	1	9	5	10	5.65	3:1	0.40	5.67
BoGMS1025	13	8	18	21	12.80	3:1	0.81	13.10

2.4 恢复基因连锁标记及连锁图谱的构建

按最大似然法及 Kosambi 公式计算出标记与恢复基因间的遗传距离(表 1),运用 MAPMAKER/EXP Version 3.0 软件进行连锁分析结果表明 8 个标记位

于同一个连锁群上,再利用 MapDraw_V2-2 绘制遗传连锁图(图 2)。其中离恢复基因 Rf 最近的 2 个标记是 CB10316 和 BnGMS171,分布在恢复基因 Rf 的两侧,遗传距离分别为 3.9 cM 和 5.7 cM。

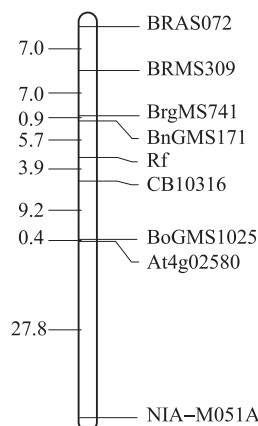


图2 不育系 1193A 恢复基因的分子标记连锁图谱

Fig.2 Linkage groups of molecular markers surrounding restorer gene in 1193A CMS

3 讨论

选育优良的恢复系,配制强优势的杂交种,是提高油菜产量的重要途径。有些不育系统存在恢复源较少的问题,为了扩宽恢复系的遗传来源,提高恢复系的配合力,传统的方法是依靠大量的测交筛选来实现,这种方式需要的周期长,效率低。近几年,分子标记由于能对基因型进行直接的选择,具有快速、准确的优点在植物遗传育种中发挥了重要作用。将分子标记技术与常规育种相结合,即分子标记辅助选择,能缩短育种周期,提高选择效率,越来越受到育种家的青睐^[22]。对恢复系进行分子标记研究,找到与恢复基因紧密连锁的标记,既能为恢复系的选育和杂种纯度的鉴定提供技术支撑,提高选择效率和准确性,避免大量的测交,节约了人力和物力,又可对恢复基因进行定位,明确恢复基因在基因组及染色体上的位置,有利于恢复基因的克隆。关于通过属间杂交获得野油菜质雄性不育系的恢复基因研究尚未见报道。本研究以野油菜质不育系 1193A 和恢复系为试验材料,通过分析 1521 对 SSR 引物,从中筛选到 8 对引物与恢复基因连锁,经 χ^2 检验其基因型分离比符合孟德尔分离规律。其中离恢复基因最近的 2 个标记是 CB10316 和 BnGMS171,分布在恢复基因 *Rf* 的两侧,遗传距离分别为 3.9 cM 和 5.7 cM,2 个标记相距 9.7 cM。由于在 15~20 cM 的距离内较难发生双交换,一般认为如果目标基因在 2 个距离在 15~20 cM 以下的分子标记之间,这 2 个标记即可用于标记辅助育种。因而,标记 CB10316 和 BnGMS171 可以作为恢复系标记辅助育种的候选标记,以做进一步的反复验证。一方面可将连锁的标记转化为更为稳定、检测手段更简便的 SCAR 标记进行更大群体的验证;另一方面可以在 CB10316 和 BnGMS171 标记区间

筛选与恢复基因更紧密连锁甚至共分离的分子标记,为提高优良恢复系选育效率以及恢复基因的精细定位和克隆提供参考,也为进一步研究该类不育胞质的育性控制机理奠定基础。

参考文献

- [1] 程计华,李云昌,梅德圣,等. 几种农作物细胞质雄性不育恢复基因的定位和分子标记研究进展[J]. 植物学通报,2006, 23(6):613-624
- [2] 刘平武,李赞,何庆彪,等. 甘蓝型油菜 pol CMS 育性恢复基因的分子标记[J]. 中国油料作物学报,2007,29(1):14-19
- [3] 赵振卿. 甘蓝型油菜波里马细胞质雄性不育育性恢复基因 *Rfp* 和的图谱定位[D]. 武汉:华中农业大学,2007
- [4] Liu Z, Liu P W, Long F R, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene *Rfp* for pol CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2012, 125: 773-779
- [5] Delourme R, Bouchereau A, Hubert N, et al. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(6): 741-748
- [6] Delourme R, Foisset N, Horvais R, et al. Characterization of the radish introgression carrying the *Rfo* restorer gene for the Ogu-IN-RA cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 129-134
- [7] Murayama S, Yamagishi H, Terachi T. Identification of RAPD and SCAR markers linked to a restorer gene for *ogura* cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) by bulked segregation analysis [J]. Breed Sci, 1999, 49: 115-121
- [8] Murayama S, Habuchi T, Yamagishi H, et al. Identification of a sequence-tagged site (STS) marker linked to a restorer gene for *Ogura* cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) by non-radioactive AFLP analysis [J]. Euphytica, 2003, 129(1): 61-68
- [9] 汪志伟, 向长萍, 梅时勇, 等. 萝卜细胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(2): 153-155
- [10] 程计华. 油菜 Nsa 雄性不育细胞质的分子鉴定及恢复系筛选 [D]. 武汉:华中农业大学, 2007
- [11] 孙盼盼. 油菜 NsaCMS 恢复基因的分子标记及恢复系菌核病的抗性鉴定[D]. 北京:中国农业科学院, 2008
- [12] 官春云. 野芥在中国的发现与意义[J]. 作物研究, 1995, 9(S1): 39-40
- [13] 官春云. 新疆野生油菜与野芥遗传性状的比较研究[J]. 作物学报, 1996, 22(2): 214-219
- [14] 郑卓. 新疆野生油菜的利用研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2005
- [15] 郑卓, 李健, 李梅, 等. 新疆野生油菜与甘蓝型油菜属间杂交亲和性及杂种分子鉴定[J]. 湖南农业大学学报, 2006, 32(5): 465-468
- [16] 谭勇俊. 甘蓝型油菜花期调控基因标记开发与开花时间 QTL 定位[D]. 长沙:湖南农业大学, 2013
- [17] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 9828-9832
- [18] 杨燕宇. 甘蓝型油菜 SSR 分子标记图谱构建和油酸含量 QTL 定位[D]. 长沙:湖南农业大学, 2011
- [19] 罗宝. 甘蓝型油菜分子标记连锁图谱的加密和脂肪酸含量 QTL 定位[D]. 长沙:湖南农业大学, 2012
- [20] 何祯祥, 林国忠, 施季森. 遗传作图软件应用及辅助软件的研制[J]. 南京林业大学学报, 1999, 23(3): 1-5
- [21] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J]. 遗传, 2003, 25(3): 317-321
- [22] 徐小万, 雷建军, 罗少波, 等. 作物基因聚合分子育种[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 364-368