

粘类小麦育性恢复基因的遗传分析及 SSR 分子标记

李红霞,张改生,张龙雨,牛 娜

(西北农林科技大学 陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室,小麦育种教育部工程研究中心,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】进一步探讨粘类小麦育性恢复基因的遗传机理。【方法】选取具有高恢复力的恢复系亲本材料 rk5451 为父本与 ms(Kots)-90-110 杂交, F_1 代再与保持系 90-110 回交,以 ms(Kots)-90-110/rk5451//90-110 的 BC_1F_1 代分离群体为研究对象,分别用定位于 1B 短臂染色体上的 18 对 SSR 引物和 6B 染色体上的 47 对 SSR 引物对粘类小麦细胞质雄性不育育性恢复基因进行分子标记。【结果】初步筛选出 *Wms273* 和 *Wmc406* 2 对揭示育性恢复基因多态性的引物,用 132 株 BC_1F_1 回交群体对这 2 对引物进行进一步检测,得出 *Wmc406* 与粘类小麦细胞质雄性不育系 1BS 上的恢复基因连锁,遗传距离约为 7.6 cM。【结论】粘类小麦细胞质雄性不育系的育性是由 1 对主效恢复基因和多对微效基因共同控制的,标记 *Wmc406* 可直接用于分子标记辅助选择。

【关键词】 粘类小麦雄性不育系;恢复基因;SSR 分子标记;遗传学分析

【中图分类号】 S512.103

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)04-0065-04

Genetic analysis and SSR markers on fertility restorer gene of male sterility of wheat with *Aegilops kotschyi* cytoplasm

LI Hong-xia, ZHANG Gai-sheng, ZHANG Long-yu, NIU Na

(Key Laboratory of Crop Heterosis, Wheat Breeding Engineering Research Center, Ministry of Education, Shaanxi Province, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 In order to probe into the fertility characteristics of male sterile lines of Nian type, genetic index of fertility restorer gene for male sterile line of Nian type was analyzed. 【Method】 The sterile line ms(Kots)-90-110 was used as female to cross with rk5451. SSR markers which were located on the chromosome 1BS and 6B were employed to tag the major restorer gene in BC_1F_1 of ms(Kots)-90-110/rk5451//90-110. 【Result】 Two primer pairs (*Wms273* and *Wmc406*) displayed polymorphism of the restorer gene. By analyzing the polymorphic markers in these segregating populations, the microsatellite locus *Wmc406* located on chromosome 1BS was found to be linked to the restorer gene with the estimated genetic distance of 7.6 cM. 【Conclusion】 Genetic analysis probe that fertility restorer gene of wheat male sterility of Nian type was influenced by major fertility restorer gene and some minor enhance gene. *Wmc406* can be used in MAS directly.

Key words: wheat male sterility of Nian type; restorer gene; SSR marker; genetic analysis

恢复基因分子标记的建立可以帮助育种学家进行恢复系的快速分子标记辅助选择,更好地将不同来源、不同位点的恢复基因进行累加,选育出恢复力强且稳定的恢复系,从而达到缩短育种年限、提高育

种效率的目的。自 1951 年首次报道小麦细胞质雄性不育现象以来,不少学者对小麦雄性不育机理及恢复基因的定位进行了广泛研究^[1-3]。目前,已经创制了 40 余种不同细胞质雄性不育类型,其中粘类小

* [收稿日期] 2007-09-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(301705760);国家“863”重大专项(2002AA207004);陕西省 13115 重大专项(2007ZDKG-02);国家杨凌农业生物技术育种中心专项(99-1A)

[作者简介] 李红霞(1980—),女,新疆伊犁人,在读博士,主要从事小麦雄性不育机理研究。

[通讯作者] 张改生(1951—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事小麦杂种优势利用研究。

麦雄性不育系,即粘、易、偏型等几类易保持、易恢复不育类型,被认为是最有利用前景的不育类型。不少学者已对粘类小麦雄性不育系的细胞质效应、产生单倍体的机理、育性恢复性及雌雄配子传递的方式等应用基础理论问题进行了广泛研究。研究均表明,粘类小麦雄性不育系育性基因单一(仅受制于 1B 染色体上的 1 对主效隐性基因 *rfv1* 控制),不育性彻底,易恢复性高,为小麦雄性不育研究和杂种优势利用提供了良好的材料^[4-5]。随着分子生物学技术的发展,建立了多种基于 DNA 多态性的分子标记定位方法,并被广泛应用于遗传学研究的各个领域,已成为恢复基因定位的主要研究方法。在分子标记中,SSR 标记以其高度变异性、共显性遗传以及易操作、易分析等特点,被应用于各种作物遗传图谱的绘制、基因定位、遗传多样性及品种鉴定等方面^[6-12]。小麦育性恢复基因的分子标记研究,亦取得了一定进展,但它们多分布在 T 型恢复系上,对粘类小麦育性恢复基因的定位却很少。本研究通过对粘类小麦细胞质雄性不育恢复基因的遗传分析和标记筛选,确定其恢复基因的作用方式,并试图得到与恢复基因紧密连锁的 SSR 标记,以期杂交小麦分子标记辅助选择育种奠定坚实的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 所用粘类小麦细胞质雄性不育系 ms(Kots)-90-110(A),恢复系 rk5451(R),以及保持系 90-110(B)等亲本,均由西北农林科技大学陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室提供。经杂交、自交获得以下世代材料: F_1 (A/R),即 ms(Kots)-90-110 与恢复系 rk5451 杂交; BC_1F_1 (A/R//B),即 ms(Kots)-90-110 与恢复系 rk5451 杂交得 F_1 , F_1 再与保持系 90-110 回交; BC_4F_1 (A// BC_3F_1),即 ms(Kots)-90-110 与恢复系 rk5451 杂交得 F_1 ,ms(Kots)-90-110 再与 F_1 连续回交 4 代。

1.1.2 引物 由于粘类小麦细胞质雄性不育系育性基因单一(仅受制于 1B 染色体上的 1 对主效隐性基因 *rfv1* 控制),根据 Roder 等^[13]的文献报道及相关网站的 SSR 引物序列信息,选用小麦 1B 短臂染色体上的 18 对 SSR 引物及 6B 染色体上的 47 对 SSR 引物,均由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 主要生化试剂 CTAB、RNaseA、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000,均购自大连宝生物公司;琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉等,购自沃尔森公司。

1.2 方法

1.2.1 试验材料的创建 首先用不育系与恢复系杂交,然后 F_1 再与保持系 90-110 回交,获得 BC_1F_1 代种于试验田,分单株编号并取相应的单株叶片用于 SSR 分析。所选单株开花前套袋自交,考查自交结实率。结实率采用国内法计算。

自交结实率/% = 有效小穗基部两侧小花结实数/有效小穗数 $\times 2 \times 100\%$ 。

以 ms(Kots)-90-110/rk5451//90-110 的 BC_1F_1 代分离群体为研究对象,随机选取结实率大于 80% 的植株和结实率为 0 的植株各 10 株,取等量 DNA 混合,分别构建不育池和可育池;亲本为 ms(Kots)-90-110(A)及其近等基因系 BC_4F_1 。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取小麦基因组 DNA,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 DV6600 紫外分光光度计检测, OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.0,说明 DNA 基本无降解,适合于 SSR 引物的 PCR 扩增。

1.2.3 PCR 扩增及电泳 SSR 标记筛选反应总体系 20 μ L: 1 $\times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+}), 200 μ mol/L dNTPs,引物 0.2 μ mol/L, 50 ng 模板 DNA, 1 U *Taq* DNA 聚合酶。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48~62 $^{\circ}$ C (退火温度依引物而定) 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物以 3.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,或在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,银染显色。

1.2.4 遗传距离的计算 标记的遗传距离用 Mapmarker 3.0 软件计算。

2 结果与分析

2.1 粘类小麦育性恢复基因的遗传分析

将粘类小麦细胞质雄性不育系 ms(Kots)-90-110,恢复系 rk5451 以及保持系 90-110 杂交、自交后代 F_1 、 F_2 以及 BC_1F_1 种于大田,开花前套袋自交,5 月中旬统计自交结实率,结果见表 1。由表 1 可见,杂种 F_1 自交结实率为 70%~100.0%,平均自交结实率为 84.73%,表明供试恢复系的恢复力符合杂交小麦组配要求,属具有高恢复力的亲本材料。杂种 F_2 自交结实率表现为连续分布,表明育性性状具有数量性状的特点,但它与多基因控制的数量性状分布又不完全一致,为偏态分布,表明此恢复系材料是由主效基因和微效基因共同控制。

表 1 ms(Kots)-90-110 和 rk5451 与 90-110 杂交及其后代的育性分布

Table 1 Distribution of fertility from hybrid combinations of ms(Kots)-90-110, rk5451 and 90-110

杂交组合 Hybrid combination	株数 No. of plants											合计 Seed-set	平均结实率/% Means of sum
	自交结实率/% Seed-set												
	0~5	5~10	10~20	20~30	30~40	40~50	50~60	60~70	70~80	80~90	90~100		
F ₁									5	1	4	10	84.73
F ₂			1		3	2	7	13	22	35	8	91	76.24
BC ₁ F ₁ (2006 年 2006 year)	40		7	3	5	8	6	11	13	22	17	132	54.67
BC ₁ F ₁ (2007 年 2007 year)	28	7	7	8	12	8	13	13	10	4	1	111	36.26

关于 F₂ 代无不育株出现及组合 BC₁F₁ 的后代分离严重偏离 1 : 1 的比例,说明粘类小麦细胞质雄性不育系 ms(Kots-90-110)败育是在配子体水平进行的,F₁ 代减数分裂产生两种配子,即核基因为 *Rfv1* 的配子与核基因为 *rfv1* 的配子,其中携带有 *rfv1* 基因的配子败育,不能在柱头萌发或完成受精,因而不会传递到后代;*Rfv1* 配子是可育的,能正常传递到后代,因此客观上提高了可育配子的百分率,从而导致 BC₁F₁ 群体中的可育株数上升。

在配子体不育的基础上,恢复系材料有 1 对主效等位基因时,F₁ 和 F₂ 的基因型都是 *Rfv1rfv1*,无不育株出现;而 BC₁F₁ 的基因型为 1/2 *Rfv1rfv1*+1/2 *rfv1rfv1*。图 1 显示,BC₁F₁ 的自交结实率分布有两个明显的峰,且不育峰和可育峰的频数分布相近似,进一步表明粘类小麦细胞质雄性不育系 ms(Kots)-90-110 的育性,是由 1 对主效恢复基因和多对微效基因共同控制的。

2.2 粘类小麦育性恢复基因的标记及定位

分别用定位于小麦 1B 短臂染色体上的 18 对 SSR 引物和 6B 染色体上的 47 对 SSR 引物,对不育

亲本、可育亲本、可育池和不育池进行扩增筛选,其中 62 对引物能扩增出稳定的多态性,占全部引物的 95%,6B 染色体上的 47 对 SSR 引物全部能扩增出稳定的多态性,但没有差异条带。位于 1B 短臂染色体上的 18 对引物中,有 2 对引物 *Wms273* 和 *Wmc406* 在不育亲本和可育亲本之间扩增出差异常带,在不育池和可育池之间检测扩增产物也存在同样的差异条带,且扩增结果一致(图 2)。初步表明,这 2 个 SSR 标记与粘类小麦育性恢复基因连锁。

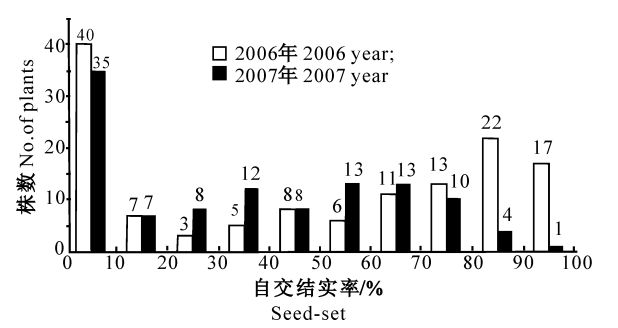


图 1 ms(Kots)-90-110/rk5451//90-110 的 BC₁F₁ 育性分布

Fig. 1 Two-year seed-set of BC₁F₁ individuals of ms(Kots)-90-110/rk5451//90-110

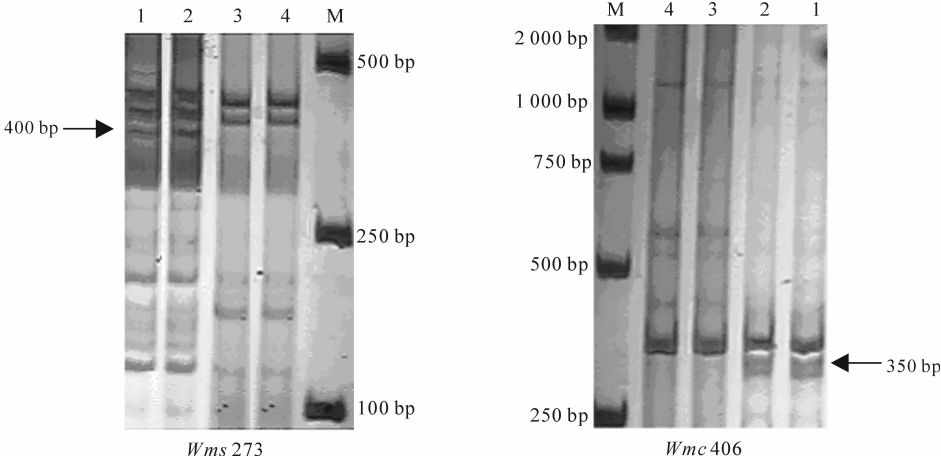


图 2 *Wms273*,*Wmc406* 在亲本、样品池间的扩增结果

1. 可育亲本 BC₄F₁; 2. 可育池; 3. 不育池; 4. 不育亲本 ms(Kots)-90-110; M. Marker

Fig. 2 Amplification patterns of *Wms273*,*Wmc406* on parents and bulks

1. Fertile parent BC₄F₁; 2. Fertile pool; 3. Sterile pool; 4. Sterile parent ms(Kots)-90-110; M. Marker

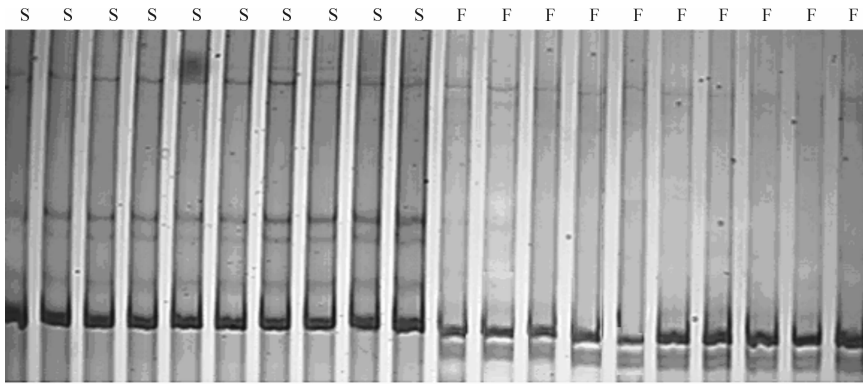


图 3 引物 *Wmc406* 对 *ms(Kots)-90-110/rk5451//90-110 BC₁F₁* 代部分单株的扩增结果
S. *BC₁F₁* 代的部分不育株; F. *BC₁F₁* 代的部分可育株

Fig. 3 Amplification of *Wmc406* in *ms(Kots)-90-110/rk5451//90-110 BC₁F₁* generation
S. Sterile individuals from *BC₁F₁* generation; F. Fertile individuals from *BC₁F₁* generation

分别用微卫星引物 *Wms273* 和 *Wmc406* 对 *BC₁F₁* 代群体 132 个单株进行扩增及电泳分析, 结果 *Wmc406* 得到稳定的扩增结果(图 3)。对 *BC₁F₁* 代群体, 应用微卫星引物 *Wmc406*, 在 92 株可育单株中有 85 株扩增出特异条带, 7 株没有此特异条带; 在 40 株不育单株中 3 株有特异条带, 37 株没有此特异条带。用 Mapmaker 3.0 软件计算标记与恢复基因间的遗传距离, 结果表明标记 *Wmc406* 与粘类小麦细胞质雄性不育系 1BS 上的恢复基因连锁, 遗传距离约为 7.6 cM。

3 讨 论

随着对细胞质雄性不育恢复基因的定位研究, 多个 T 型细胞质雄性不育育性恢复基因已定位于小麦染色体上^[14-15]。利用分子标记, 在小麦 1A、1B、4A、4B、5A、5D、6A、6B、6D、7B、7D 染色体上找到了 Rf 基因座, 并且根据 Rf 基因的来源及其所在的染色体, 确定了 11 个不同的主效 Rf 基因座(Rf1~Rf11)^[16-17]。关于粘类小麦细胞质雄性不育恢复基因的研究甚少, Mukai 等^[18]通过端体分析方法, 将粘果和易变不育质源细胞质雄性不育系的不育基因定位于 *Spelta* 的 1BS 上, 距离着丝粒的遗传距离为 (34.4 ± 3.8) 个交换单位, 并认为中国春 1BS 的同位点有 1 个显性的恢复基因 *Rfv1*。2002 年刘保申等^[19]对 K 型恢复系的 SSR 分析发现, 恢复系 LK783 的育性恢复基因与 SSR 标记 *Xgwm11*、*Xgwm18*、*Xgwm273* 的遗传距离为 (6.54 ± 4.37) cM, 与 *Xgwm264a* 的遗传距离为 (5.71 ± 4.10) cM, 并利用染色体缺体—四体系和双端体系进一步将这 4 个 SSR 位点定位于 1BS, 但在 1BS 的相对位置与 *Rfv1* 不同。本研究的结果与 Mukai 等^[18]及刘保申

等^[19]的研究结果基本一致, 证实了粘类小麦育性恢复基因位于 1BS 染色体上。得到的标记 *Wmc406* 在亲本及 *BC₁F₁* 代群体中的可育单株和不育单株间扩增出多条特异带, 表明该引物在基因组中至少有 2 个结合位点, 它们可能位于同一染色体的不同位点, 这还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kihara H. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestation [J]. *Cytologia*, 1951, 16: 177-193.
- [2] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies [J]. *Genetics*, 1988, 139: 457-462.
- [3] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregating population [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [4] 周 阳, 何中虎, 张改生, 等. 1BL/1RS 易位系在我国小麦育种中的应用 [J]. *作物学报*, 2004, 30(6): 531-535.
Zhou Y, He Z H, Zhang G S, et al. Utilization of 1BL/1RS translocation in wheat breeding in China [J]. *Acta Agron Sin*, 2004, 30(6): 531-535. (in Chinese)
- [5] 魏育明, 郑有良, 周永红, 等. RFLP 标记揭示的 1RS/1BL 易位系对小麦农艺性状的影响 [J]. *西南农业学报*, 1999, 12: 105-110.
Wei Y M, Zheng Y L, Zhou Y H, et al. The effects of chromosome 1RS/1BL translocation on the agronomic characters of common wheat revealed by RFLP markers [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 1999, 12: 105-110. (in Chinese)
- [6] Pestsova E, Gand M V, Roder M S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat [J]. *Genome*, 2000, 43: 689-697.
- [7] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. *Ann Eugen*, 1944, 12: 172-181.

(下转第 74 页)