

## 玉米雄性不育基因( $m_{S30}$ )的 RFLP 作图<sup>x</sup>

梁业红 周洪生 蒋琬茹

(中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京, 100081)

**提 要** 以姊妹交第 5 代群体( $SB_5$ )和回交一代群体( $BC_1$ )为作图群体, 对经细胞学初步定位于玉米第 4 染色体上的雄性不育基因( $m_{S30}$ )进行了 RFLP 作图。选用玉米第 4 染色体上的探针 18 个, 用集团分离分析(bulked segregatant analysis, BSA)进行标记筛选, 用 JoinMap 作图软件进行统计分析。 $SB_5$ 群体的 RFLP 分析表明,  $m_{S30}$ 基因与玉米第 4 染色体长臂上的两个探针位点 umc15a 和 umc66a 连锁, 交换率分别为 5.9% 和 14.8%。 $BC_1$ 群体的 RFLP 分析表明 umc19、umc15a、bn17.65 和 csu178a 与  $m_{S30}$  连锁, 遗传图距为: umc19-214cM  $m_{S30}$ -24.2cM umc15a-21.4cM bn17.65-23.4cM csu178a。对  $m_{S30}$  基因的定位研究, 不仅为辅助育种打下基础, 而且可以有效地保护我国特有的种质资源。

**关键词** 玉米; 核雄性不育;  $m_{S30}$ ; BSA; RFLP

## RFLP Mapping of a Male Sterile Gene ( $m_{S30}$ ) in Maize

LIANG YeHong ZHOU HongSheng JIANG WanRu

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081)

**Abstract** A sibling population  $SB_5$  and backcross population  $BC_1$  were applied to map a male sterile gene  $m_{S30}$  which was early located on chromosome 4 of maize by BSA system. 18 probes from maize chromosome 4 were used, and BSA was practised to screen on RFLPs. By using JoinMap software, linkage as well as genetic distance between  $m_{S30}$  and marker loci were obtained. The main result as follows: analysis on  $SB_5$  population showed that  $m_{S30}$  was linked with umc15a and umc66a on maize 4L, the recombination value was 5.9% and 14.8%, respectively. In the  $BC_1$  population, umc19, umc15a, bn17.65 and csu178a were found linked to  $m_{S30}$ , the genetic distance was umc19-214cM  $m_{S30}$ -24.2cM umc15a-21.4cM bn17.65-23.4cM csu178a.

**Key words** Maize; Nuclear male sterility;  $m_{S30}$ ; BSA; RFLP

利用雄性不育是商品化生产玉米杂交种子的最有效途径, 自从玉米 T 型细胞质不育系的应用受到限制后, 胞质基因の利用受到挑战, 人们更加重视核不育基因的研究。迄今玉米上已发现了 60 多份核雄性不育突变材料, 通过等位性测验等研究, 正式命名了 33 个玉米核不育基因, 并用经典的细胞学方法将其中的 21 个定位到了染色体上<sup>[1]</sup>。但有关雄性不育基因的分 子标记研究, 尚未有正式报道。

x 本研究为国家自然科学基金课题(批准号: 39480013)

收稿日期: 1998211207, 接收日期: 1999204229

李竞雄等在研究甜玉米材料时发现了一个雄性不育基因, 他用 B2A 易位系把该基因定位在玉米第 4 染色体上, 距离玉米甜质基因  $su$  为 11~19 个交换单位(未发表), 李竞雄等<sup>[2]</sup>将其定名为  $m_{S30}$ 。周洪生等对  $m_{S30}$  的花药发育过程进行了超显微观察, 发现基足层还未形成, 小孢子就退化了, 小孢子和绒毡层细胞内含物全部降解变空。

RFLP 标记是 80 年代兴起的以 DNA 多态性为基础的一类新型遗传标记, 近年来各主要农作物上均有许多重要农艺性状基因被标记或定位<sup>[3~10]</sup>。玉米上已有 195 个基因被定位到 RFLP 连锁图上<sup>[11]</sup>。

本文用 RFLP 方法对雄性不育基因  $m_{S30}$  进行分子标记作图, 进而为分子标记辅助育种打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

姊妹交第 5 代群体: ((2603SuSu  $m_{S30} m_{S30}$ Ö2611suSu  $M_{S30} M_{S30}$ )F<sub>2</sub>)SB<sub>5</sub>。

BC<sub>1</sub> 群体 以  $m_{S30}$  基因的纯系 6960 作母本与自交系中黄 17 配制的回交一代群体 ( $m_{S30} m_{S30}$ ÖÖn  $M_{S30} M_{S30}$ Ö  $M_{S30} M_{S30}$ )。

SB<sub>5</sub> 群体 BC<sub>1</sub> 群体及其父母本分别于 1996 年和 1997 年春, 播种于中国农业科学院作物所试验地, 雄花开花后即对其育性进行调查。

### 1.2 RFLP 探针克隆

根据  $m_{S30}$  基因细胞学染色体定位的结果, 参考美国密苏里大学 1996 年玉米 RFLP 连锁图(UMC maize RFLP Map), 选择玉米第 4 连锁群上的探针 18 个。这些探针均由美国密苏里大学玉米探针库惠赠。

### 1.3 DNA 的提取

取玉米嫩雌穗或叶片 5~10g 用液氮磨碎, 加入提取液(含 100 mmol/L Tris 8.0, 20 mmol/L EDTA 8.0, 500 mmol/L NaCl, 1.25% SDS)于 65℃ 保温 40 min, 然后加入 5 mol/L KCl 冰浴 20 min 后, 加入 5 ml 氯仿/异戊醇混合液(体积比为 24:1)混匀离心, 用预冷的异丙醇沉淀 DNA。分别用 RNA 酶、酚/氯仿(酚、氯仿等体积混匀)及氯仿/异戊醇(体积比为 24:1)对 DNA 进行纯化。

### 1.4 RFLP 分析

本试验 DNA 的酶解、电泳 DNA 的 Southern 转移、探针的标记、分子杂交及放射自显影等 RFLP 分析均参照密苏里大学玉米 RFLP 程序手册(UMC MAIZE RFLP PROCEDURES MANUAL, 1993)。

### 1.5 连锁分析

采用 JoinMap 软件(Version 1.4, P. Stam 1993)<sup>[12]</sup>进行连锁分析和遗传作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 田间雄花育性调查及 $m_{S30}$ 基因的遗传

对田间姊妹交群体 SB<sub>5</sub> 的 135 个单株进行雄花育性调查。结果为: 不育株/可育株 = 71/64, 经位点分离比测验,  $V^2 = 0.36 < V_{0.05}^2$ 。

对田间回交一代(BC<sub>1</sub>)群体随机抽取 120 个植株进行雄穗育性调查, 不育株为 64, 可育株为 57, 位点分离比  $V^2 = 0.36$ , 也远小于  $V_{(0.1, 1)}^2(6.63)$ 。

两个群体中植株的雄性不育与雄性可育的分离比例均符合孟德尔 1 : 1 的分离比, 表明雄性不育性状是由  $m_{s30}$  单隐性基因控制的。

### 2.2 RFLP 遗传作图结果

2.2.1 S<sub>B5</sub> 群体作图 随机挑取可育株(F)与不育株(S)DNA 样品各 17 个, 分别构成可育株集团(bulked fertility, BF)和不育株集团(bulked sterility, BS)。以玉米第 4 染色体长臂上的 3 个探针(umc66a, umc15a 和 umc111a)及第 4 染色体短臂上的 3 个探针(umc14a, csu100 及 umc31a), 与 *Hind*<sub>III</sub>、*Bam*H<sub>I</sub> 和 *Dra*I 三种限制性内切酶组成 18 个(6 × 3)探针酶组合, 对 BF、BS 进行 RFLP 标记筛选, 结果 umc15a 与上述 3 种酶的组合在 BF、BS 间检测到多态性(图 1), umc66a 和 *Dra*I 检测到在 BF 中出现而 BS 缺少的一条高分子量特异带。

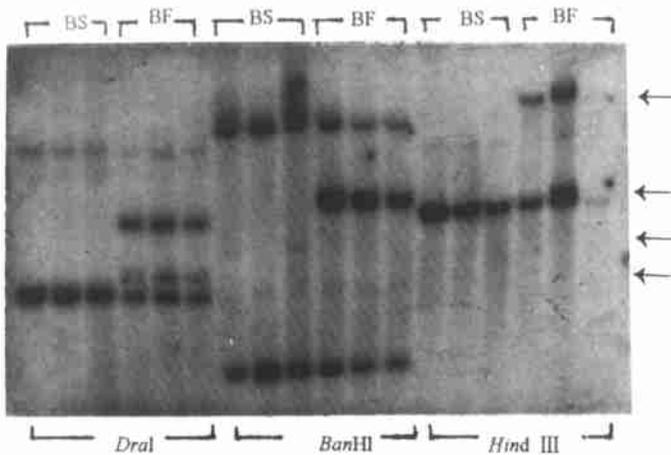


图 1 S<sub>B5</sub> 群体中, umc15a 与经 *Dra*I、*Bam*H<sub>I</sub> 和 *Hind*<sub>III</sub> 酶切的 BF、BS DNA 进行 Southern 杂交结果  
BF: 可育集团, BS: 不育集团。箭头示特异带

Fig 1 Southern hybridization patterns of BF and BS from S<sub>B5</sub> digested with *Dra*I, *Bam*H<sub>I</sub> and *Hind*<sub>III</sub>, probed with umc15a

BF: bulked fertility, BS: bulked sterility. The arrows indicate polymorphism bands

分别用 umc15a 和 *Hind*<sub>III</sub>、*Bam*H<sub>I</sub> 和 *Dra*I 酶组合对群体的 68 个单株(可育株与不育株分别为 34 株)进行多态性检测, umc15a 和 *Hind*<sub>III</sub> 在 33 个可育单株检测到与 BF 相同的特异带, 31 株不育株无此特异带, 交换型个体为 4 个; 而 umc66a 和 *Dra*I 则在 68 个单株中检测到 10 个交换型, 其他单株为可育株有 BF 的特异带, 不育株无此特异带。经连锁测验,  $V_{(umc66a, m_{s30})}^2 = 49.5$ ,  $V_{(umc15a, m_{s30})}^2 = 60.2$ , 均远大于  $V_{(1, 0.01)}^2(6.63)$ , 表明  $m_{s30}$  基因与第 4 染色

体长臂上的 umc66a 及 umc15a 连锁, 交换率分别为 14.8% 和 5.9%。

2.2.2 BC<sub>1</sub> 群体的 RFLP 作图 随机挑选可育株和不育株 DNA 样品各 15 个等量混合, 分别构成可育集团(BF)和不育集团(BS)。

选用上述 S<sub>B5</sub> 群体中检测到 RFLPs 的探针 umc15a、umc66a 以及 umc15a 与 umc66a 区域内或附近的探针共 14 个(umc15a, umc66a, umc19, bn17.65, csu91a, agrp168, csu178a, bn115.07, umc158, asg9a, asg33a, umc127c, asg85, asg27), 与 *Hind*<sub>III</sub>、*Eco*R<sub>I</sub>、*Bam*H<sub>I</sub>、*Eco*R<sub>II</sub> 4 种限制性内切酶组成 56 个(4 × 14)探针酶组合, 对回交群体的 BF、BS 及父本(P<sub>2</sub>)和母本(P<sub>1</sub>)进行 RFLP 分析, 结果 umc66a 与 *Eco*R<sub>II</sub>, umc19 与 *Hind*<sub>III</sub>, bn17.65 与 *Hind*<sub>III</sub>、*Eco*R<sub>I</sub> 及 *Eco*R<sub>II</sub>, umc15a 与 *Hind*<sub>III</sub>、*Eco*R<sub>I</sub> 和 *Bam*H<sub>I</sub>, csu91a 与 *Bam*H<sub>I</sub>, csu178a 与 *Eco*R<sub>II</sub> 等探针酶组合检测到在父本及 BF 中出现而母本及 BS 中缺少的特异带。

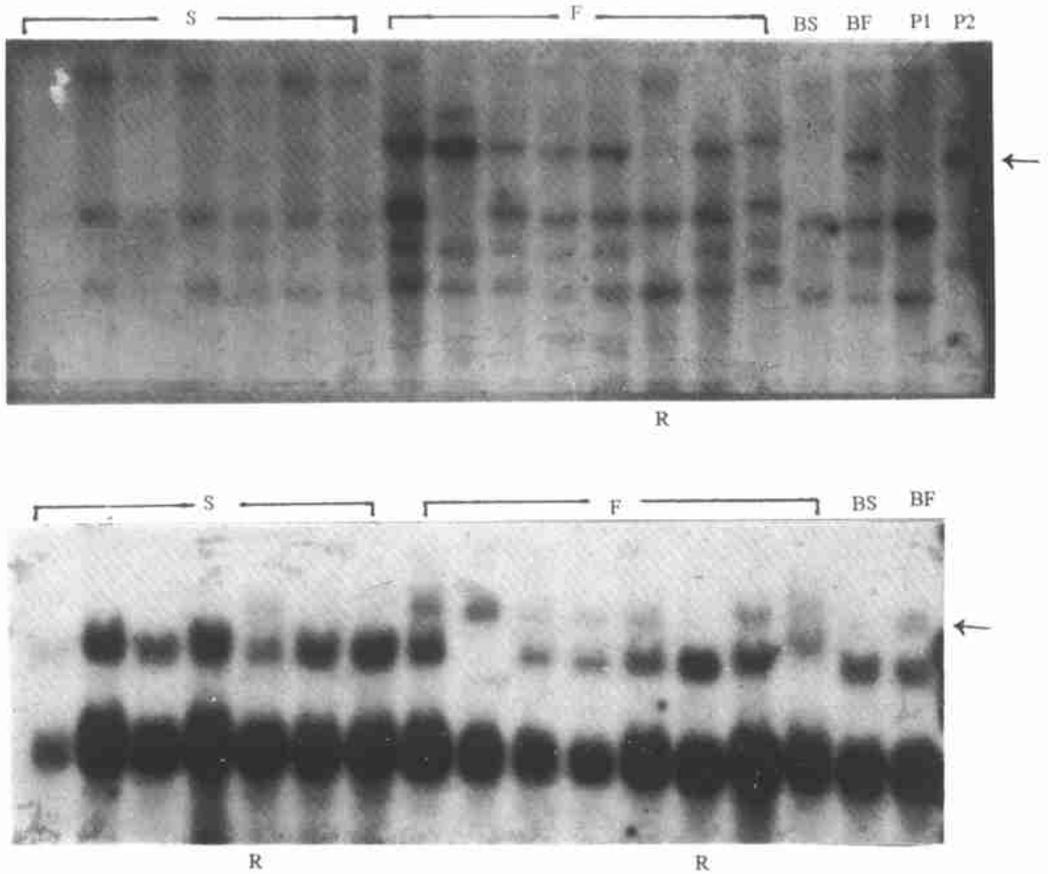


图 2 BC<sub>1</sub> 群体 Southern 杂交结果

2a: *umc15a* *Hind* 分子杂交结果; 2b: *bn17.65* *EcoR* 分子杂交结果

P1: 母本(*m<sub>s30</sub>m<sub>s30</sub>*), P2: 父本(*M<sub>s30</sub>M<sub>s30</sub>*), F: 可育单株, S: 不育单株, R: 交换型, 箭头示特异带

Fig 2 Southern analysis of BC<sub>1</sub>

2a: DNA digested with *Hind*, probed with *umc15a*; 2b: DNA digested with *EcoR* probed with *bn17.65*

P1: Female parent(*m<sub>s30</sub>m<sub>s30</sub>*), P2: Male parent(*M<sub>s30</sub>M<sub>s30</sub>*), F: Fertility, S: Sterility,

R: Recombination, arrows show polymorphism bands

选用其中的 *umc19*、*umc15a*、*bn17.65* 和 *csu178a* 对 BC<sub>1</sub> 群体 90 个单株进行 RFLP 分析, 进一步证实了它们与 *m<sub>s30</sub>* 的共分离关系: 在 90 个单株中, *umc19* *Hind*、*umc15a* *Hind*、*bn17.65* *EcoR*、*csu178a* *EcoR* 分别检测到 16 个、5 个、6 个和 7 个交换型个体。*umc15a* *Hind*、*bn17.65* *EcoR* 分子杂交的部分结果见图 2。

对检测到的 RFLPs 用 *JoinMap* 作图软件进行处理, 结果见表 1。据此构建出 *m<sub>s30</sub>* 的分子标记图谱(图 3)。

表 1 RFLP 标记遗传作图数据

Table 1		Map data from RFLP analysis			
标记 1	标记 2	图距 cM	交换值	LOD 值	
Marker1	Marker2	Dist cM	Rec %	LOD	
<i>csu178a</i>	<i>bn17.65</i>	3.4	7.8	16.4	
<i>csu178a</i>	<i>umc15a</i>	4.9	4.4	20.0	
<i>csu178a</i>	<i>M<sub>s30</sub>Ön<sub>s30</sub></i>	9.1	7.8	16.4	
<i>csu178a</i>	<i>umc19</i>	23.0	21.1	6.9	
<i>bn17.65</i>	<i>umc15a</i>	1.4	3.3	21.4	
<i>bn17.65</i>	<i>M<sub>s30</sub>Ön<sub>s30</sub></i>	5.6	6.7	17.5	
<i>bn17.65</i>	<i>umc19</i>	19.6	15.6	10.2	
<i>umc15a</i>	<i>M<sub>s30</sub>Ön<sub>s30</sub></i>	4.2	5.6	18.7	
<i>umc15a</i>	<i>umc19</i>	18.2	16.7	9.5	
<i>M<sub>s30</sub>Ön<sub>s30</sub></i>	<i>umc19</i>	14.0	17.8	8.8	

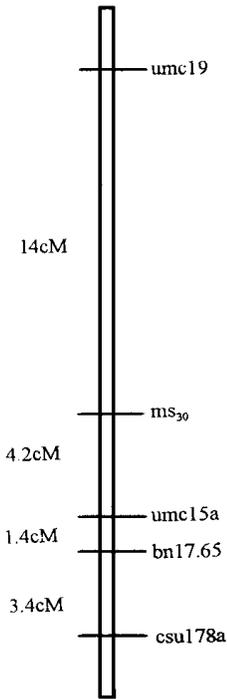


图3  $M_{s30}m_{s30}$ 的RFLP图谱

Fig. 3 RFLP map of  $M_{s30}m_{s30}$

### 3 讨论

用姊妹交群体SB<sub>5</sub>和回交群体BC<sub>1</sub>对 $m_{s30}$ 进行RFLP遗传作图的结果一致表明, $m_{s30}$ 基因位于玉米第4染色体长臂上,这一结果与李竞雄先生用B2A易位系初步定位的结果是一致的,但本研究的定位更精细,距离最近的标记只有4.2cM。

本研究得到 $m_{s30}$ 图谱为umc19214cM  $M_{s30}m_{s30}$ 24.2cM 2umc15a21.4cM 2bn17.6523.4cM 2csu178a,与最新发表的umcmaize RFLP map比较,umc19、bn17.65和csu178a的排列顺序一致,而umc15a与bn17.65的顺序颠倒,但距离只有1.5cM;各位点之间的图距也不完全符合,可能的原因是亲本材料、作图群体不同,作图群体大小也不相同所致。

$m_{s30}$ 与umc19的图距为14cM,为达到更精确作图的目的,曾选用不同位置探针进行多态性检测,但均未找到新的RFLP标记。表明所用群体的亲本在该区间内现有探针位点上没有多态性。拟用AFLP或SSR标记筛选更紧密连锁的标记。

umc15a、bn17.65距离 $m_{s30}$ 分别只有4.2cM和5.7cM,利用单个标记或双标记进行辅助选择,每个世代直接选择 $m_{s30}m_{s30}$ 个体与自交系杂交,最后自交一次,选育出不育系( $m_{s30}m_{s30}$ ),从而可大大加速育种进程。

### 参 考 文 献

- 1 Albertsen M. C. *M aize Genetic Newsletter*, 1996, 70: 30~ 31
- 2 李竞雄,周洪生,孙荣锦主编 玉米雄性不育生物学,北京:中国农业出版社,1998: 74
- 3 贾继增,中国科学(B)辑 1993, 23(6): 589~ 594
- 4 石永刚,郑用琏,李建生等 作物雄性不育及杂种优势研究进展,北京:中国农业出版社,1996, 163~ 169
- 5 David Zaitlin, Sandra Demars, Yu Ma *Genome*, 1993, 36: 555~ 563
- 6 Huang N, E R Angeles, J Domingo et al *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 313~ 320
- 7 Kamps T L, C D Chase *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 525~ 531
- 8 Chmer J M, K J Chalmers, S Manning *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 1060~ 1064
- 9 Mohan M, S Nair, J S Bentur et al *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 782~ 788
- 10 Zhang G, T S Bharaj, S S V imani *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 27~ 33
- 11 Mary Polacco *M aize Genetic Newsletter*, 1997, 71: 120
- 12 Stam P. *The Plant Journal*, 1993, 3(5): 739~ 744