

# K型小麦细胞质雄性不育系育性恢复基因的 SSR分子标记分析

刘保申<sup>1,2</sup>,孙其信<sup>2</sup>,高庆荣<sup>1</sup>,孙兰珍<sup>1</sup>,解超杰<sup>2</sup>,  
李传友<sup>1</sup>,倪中福<sup>2</sup>,窦秉德<sup>2</sup>,魏艳玲<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 山东农业大学农学院,泰安 271018;<sup>2</sup> 中国农业大学植物遗传育种系,北京 100094)

摘要:以(K冀5418A//911289/LK783)三交F<sub>1</sub>分离群体的极端不育株和极端可育株分别建立保持池和恢复池,利用79对SSR引物对两池间的多态性进行了研究。分析表明,6对SSR引物在两池间扩增出了稳定的多态性差异,在分离群体上验证结果表明,LK783的育性恢复基因与4个SSR引物的扩增位点Xgwm11、Xgwm18、Xgwm264a和Xgwm273有连锁关系,该育性恢复基因与Xgwm11、Xgwm18和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,这4个引物可应用于K型小麦细胞质雄性不育系育性恢复基因的标记辅助选择。利用中国春缺体四体系和双端体系进一步将Xgwm11、Xgwm18、Xgwm264a和Xgwm273定位于1BS,说明LK783的育性恢复基因位于1BS,但它在1BS上的相对位置与Rfv1有所不同,它们的等位性关系有待于进一步研究。

关键词:小麦;雄性不育;恢复基因;分子标记;微卫星

## Mapping of Fertility Restoring Gene for *Aegilops kotschy* Cytoplasmic Male Sterility in Wheat Using SSR Markers

LIU Bao-shen<sup>1,2</sup>, SUN Qi-xin<sup>2</sup>, GAO Qing-rong<sup>1</sup>, SUN Lan-zhen<sup>1</sup>, XIE Chao-jie<sup>2</sup>,  
LI Chuan-you<sup>1</sup>, NI Zhong-fu<sup>2</sup>, DOU Bing-de<sup>2</sup>, WEI Yan-ling<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Agronomy Department, Shandong Agricultural University, Taian 271018;

<sup>2</sup> Department of Plant Genetics and Breeding, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: LK783 was found to be a good fertility restorer for K-type male sterility of wheat. Microsatellite markers were employed to map the major restoring gene in LK783. Maintainer and restorer DNA pools were established using the extreme sterile and fertile plants among (KJ5418A//911289/LK783) F<sub>1</sub> population, respectively. Seventy-nine sets of SSR primers were screened for polymorphism between the two pools, 6 of which were found polymorphic. Linkage analysis showed that Xgwm11, Xgwm18, Xgwm264a and Xgwm273 were linked to the restoring gene in LK783, while Xgwm11, Xgwm18 and Xgwm273 were cosegregated. The distance between the Rf gene in LK783 and the three cosegregated markers was 6.54±4.37 cM, the distance between Rf gene and Xgwm264a was 5.71±4.10 cM. The four SSR markers were located on chromosome 1BS by amplifying the DNA of nulli-tetrasomics and ditelosomics of CS with the 4 sets of primers, indicating that the restoring gene in LK783 was located on 1BS, but the relative location of the gene was different from Rfv1, the allelism of the two genes should be further investigated. The breeding for new fertility restorer lines of K-type cytoplasmic male sterility in wheat would be facilitated by using the four polymorphic markers.

Key words: Wheat (*Triticum aestivum*); Cytoplasmic male sterility; Restoring gene; Molecular marker; Microsatellite

收稿日期:2001-04-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900088)

作者简介:刘保申(1966-),男,山东武城人,副研究员,博士,主要从事作物遗传育种研究,现在山东农业大学博士后流动站工作。Tel:0538-8241477; Fax:0538-8242226; E-mail:liubaoshen@263.net

K型小麦细胞质雄性不育系(K-CMS)是有应用潜力的理想不育类型。恢复系的选育是利用CMS系统配制杂交种的前提之一,而选育恢复系比常规育种具有更多的困难,主要表现在恢复基因的有无只能在测交后代中鉴定,加上分离世代不可能逐株测交,造成农艺性状优良的品系常常不含有恢复基因,且恢复力稳定较慢。利用DNA分子标记能在幼苗期对分离世代的植株进行鉴定,通过筛选与育性恢复基因连锁的DNA分子标记,可对恢复基因进行精确定位,并为最终克隆育性恢复基因打下基础。CMS恢复基因分子标记的筛选工作在水稻、玉米、油菜、黑麦、甜菜、向日葵等作物上都取得了较大的进展,而对小麦CMS育性恢复基因的分子标记研究局限于T-CMS<sup>[1~4]</sup>,对K-CMS恢复基因的分子标记工作尚未见报道。鉴于K-CMS的良好应用潜力和分子标记对恢复系选育的重要应用价值,有必要开展K-CMS恢复基因的分子标记研究工作。SSR是近来发展起来的一类理想的DNA分子标记。本试验采用以PCR技术为基础的SSR分子标记来寻找K-CMS恢复系LK783的恢复基因,并对此恢复基因进行染色体定位。

## 1 材料与方 法

### 1.1 育性分离群体的构建和连锁分析

K冀5418A为我们转育的秣谷山羊草细胞质的小麦雄性不育系,已回交10代以上,911289是通过轮回选择选育出的一个品系,对K型不育系有保持能力,LK783是从山东省认定品种龙口783中筛选出的一个白粒材料,对K型不育系具有较高的恢复力,其恢复度稳定在80%左右。

1997年配制(911289/LK783)F<sub>1</sub>;1998年以K冀5418A为母本,(911289/LK783)F<sub>1</sub>为父本进行测交;1999年对测交单株进行编号,提取单株苗期叶片DNA,成熟时按国内法考查各株的套袋自交结实率。结实率高于70%的极端类型含有主效育性恢复基因为可育株,结实率为0的完全不育株不含有主效育性恢复基因。选取自交结实率为0的15个单株,每株取等量DNA混合构建保持池;选取自交结实率高于85%的15个单株,每株取等量DNA混合构建恢复池。

用SSR标记在两个池中筛选多态性差异,筛选到稳定差异的标记对测交单株进行扩增,用最大似然法计算标记与恢复基因的连锁值,按Kosambi(1944)方法转换为遗传距离。

### 1.2 恢复基因的染色体和染色体臂定位

用1套中国春缺体-四体系对与恢复基因连锁的分子标记进行检测,确定标记所在的染色体,之后用该染色体的1对双端体系确定标记所在染色体臂。

### 1.3 PCR扩增及扩增产物的检测

部分微卫星引物由Dr. M. D. Gale (John Inners Centre, UK)惠赠,其它根据Röder(1998)<sup>[5]</sup>等报道的序列合成。

PCR扩增反应在Perkin Elmer 480 Thermocycler上进行,反应体系为20 $\mu$ l,模板DNA50~100ng,10mmol/L Tris-HCl(pH8.3),50mmol/L KCl,1.5~2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>,200~250 $\mu$ mol/L dNTP,50ng Primers,1.25U Taq DNA聚合酶。PCR扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性1min,50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C或65 $^{\circ}$ C退火1min(退火温度依引物不同而变化),72 $^{\circ}$ C延伸2min,共进行45个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

SSR扩增产物采用5%变性聚丙烯酰胺凝胶恒功率(85W)电泳约40min,银染检测。聚丙烯酰胺凝胶银染程序:10%醋酸2000ml固定30min,去离子水漂洗3次,每次3~5min,0.1%硝酸银2000ml(加入1.5ml的甲醛)染色30min,去离子水漂洗8~10s,3%碳酸钠溶液2000ml(预冷至10 $^{\circ}$ C以下,临用前加入1.5ml甲醛,400 $\mu$ l 10mg/ml 硫代硫酸钠)显影至DNA带型清晰,加入10%醋酸终止反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 LK783恢复基因的遗传特点

考查了252个(K冀5418A//911289/LK783)测交F<sub>1</sub>单株的自交结实率,其结实率呈连续分布(图1),LK783对K型不育系的育性恢复受主效基因和众多微效基因控制,代表不育株的峰较明显,而其它单株的结实率几乎平均分布于10%~90%之间。由于育性受环境条件影响较大,而环境误差又不易剔除,故试验只用分离的两极端类型(结实率为0的不育株和结实率高于70%的可育株)进行连锁分析。

### 2.2 保持池和恢复池间SSR标记多态性及多态性位点与LK783恢复基因的连锁分析

以保持池和恢复池的DNA为模板,用79对小麦SSR引物进行PCR扩增。有11对引物没有扩增产物,占总数的14%,有扩增产物的引物中只有6对有稳定的多态性差异。但进一步在分离群体上

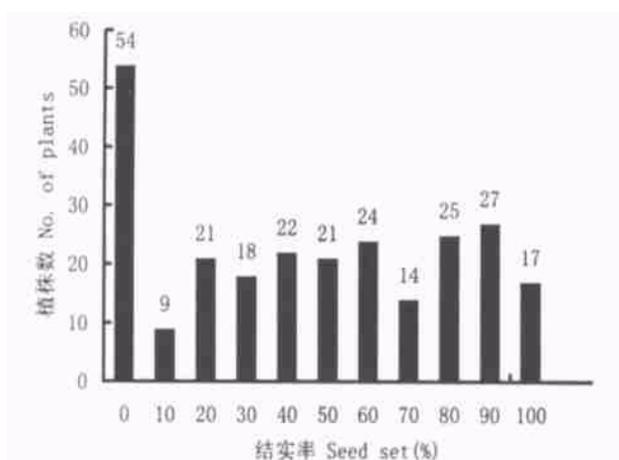


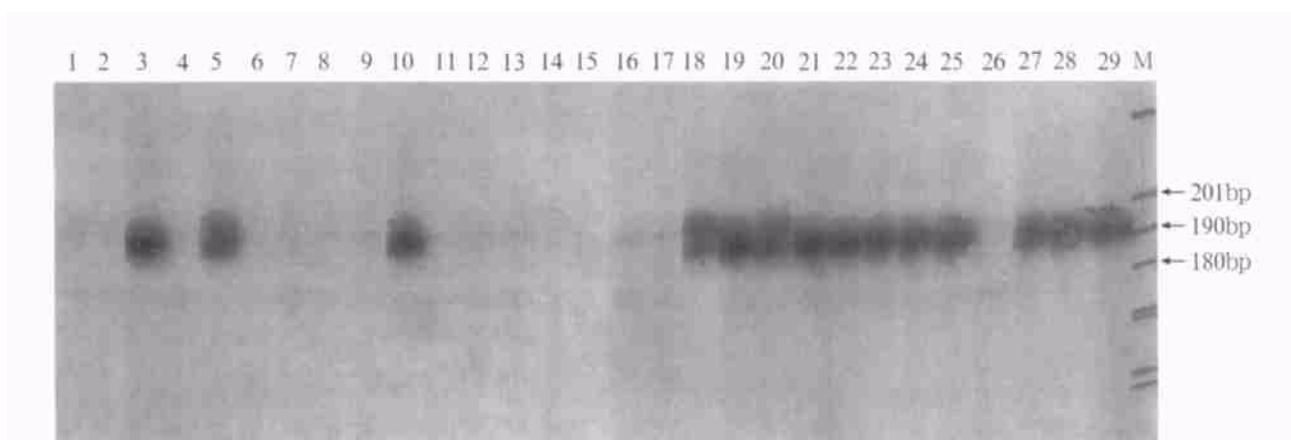
图 1 (K 冀 5418A // 911289/ LK783) 三交  $F_1$  结实率分布

Fig. 1 Frequency distribution of seed set for (K J5418 A // 911289/ LK783)  $F_1$  population. The value in the x-axis is the higher limit

验证的结果表明,多态性引物 GWM11、GWM18、GWM264 和 GWM273 的扩增位点 *Xgwm11*、*Xgwm18*、*Xgwm264* 和 *Xgwm273* 与恢复基因有连锁

关系,其它差异与恢复基因不存在连锁关系。GWM11、GWM18、GWM264 和 GWM273 在 LK783 上的扩增片段大小分别为 200bp、190bp、220bp、170bp 左右。4 个引物在 911289 和冀 5418 上均无扩增目标带。

**2.2.1 引物 GWM11、GWM18 和 GWM273 扩增多态性片段与恢复基因的连锁分析** 在 Röder<sup>[5]</sup>建立的微卫星遗传图谱上,由于群体较小而将 *Xgwm11*、*Xgwm18* 和 *Xgwm273* 定位于同一区间,它们在着丝点附近。本试验所用群体(252 个单株)虽然有所增加,3 个标记仍表现为共分离而定位于同一区间。在 54 株完全不育株中,5 株有 GWM11、GWM18 和 GWM273 的扩增目标带,属于交换类型,在 69 株可育株中,3 株没有 GWM11、GWM18 和 GWM273 的扩增目标带,属于交换类型,即在 123 株极端类型中共有 8 个交换单株,重组率为  $6.50 \pm 4.36\%$ ,遗传距离为  $6.54 \pm 4.37\text{cM}$ 。图 2 展示了 GWM18 在不育系、保持系、恢复系、保持池、恢复池及部分测交后代的扩增结果。



M: 分子量标准 pBR322DNA/ MspI Marker pBR322DNA/ MspI; 1:不育系 Sterile line; 2: 保持系 Maintainer line; 3: 恢复系 Restorer line; 4: 保持池 Pool of maintainers; 5: 恢复池 Pool of restorers; 6~17: 分离群体中的不育株 Sterile plants of the segregational population; 18~29: 分离群体中的可育株 Fertile plants of the segregational population

图 2 GWM18 在不育系、保持系、恢复系、保持池、恢复池及其部分测交后代单株的扩增结果

Fig. 2 Amplification results of GWM18 in sterile line, maintainer line, restorer line, pool of maintainers and restorers and individuals of (KJ5418 A // 911289/ LK783)  $F_1$  population

**2.2.2 引物 GWM264 扩增多态性片段与恢复基因的连锁分析** 在 54 株不育株中,4 株有 GWM264 的目标带,属于交换类型,在 69 株可育株中,3 株没有 GWM264 的目标带,属于交换类型,即在 123 株极端类型中共有 7 个交换单株,重组率为  $5.69 \pm 4.09\%$ ,遗传距离为  $5.71 \pm 4.10\text{cM}$ 。在 252 个测交单株中有 3 个单株发生了 *Xgwm264* 与 *Xgwm11*、

*Xgwm18* 和 *Xgwm273* 之间的交换,重组率为  $1.19 \pm 1.34\%$ ,遗传距离为  $1.19 \pm 1.34\text{cM}$ ,4 个连锁标记与恢复基因的相对位置示于图 3。

### 2.3 恢复基因的染色体和染色体臂定位

首先用引物 GWM11、GWM18、GWM264 和 GWM273 扩增 39 个中国春的缺体四体系(缺少 N4BT4A、N4BT4D、N4DT4B)以确定扩增目标带所

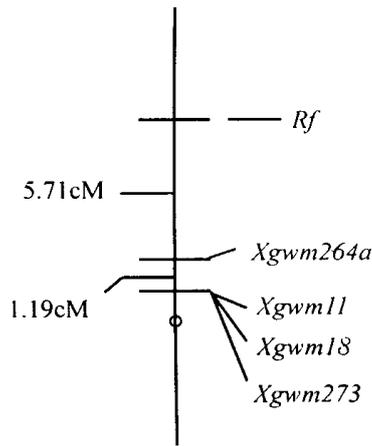


图 3 4 个 SSR 标记与 LK783 恢复基因的相对位置  
Fig. 3 Relative position of four SSR markers and *Rf* gene in LK783

在的染色体。结果表明,中国春和其它的 37 个系有 GWM11、GWM18、GWM264 和 GWM273 的扩增目标带,只有 NIBT1A 和 NIBT1D 没有扩增目标带,说明 GWM11、GWM18、GWM264 和 GWM273 位于 1B 染色体上。随后对 1B 的双端体系进行扩增,DD1BS 仍有 GWM11、GWM18、GWM264 和 GWM273 的扩增目标带,而 DD1BL 没有 GWM11、GWM18、GWM264 和 GWM273 的目标带,表明 *Xgwm11*、*Xgwm18*、*Xgwm264* 和 *Xgwm273* 位于 1B 短臂上,这与 Röder 的结果一致。但 Röder 所建的遗传图谱上,GWM264 扩增片段的大小为 160bp 左右,与本试验扩增多态性带的 220bp 差异较大,且 *Xgwm264* 在 1BS 上与 *Xgwm11*、*Xgwm18* 和 *Xgwm273* 的遗传距离较远,大约为 20cM,本试验结果表明它与 *Xgwm11*、*Xgwm18* 和 *Xgwm273* 的遗传距离为  $1.19 \pm 1.34$ cM。Peng<sup>[6]</sup>在筛选条锈抗病基因 *YrH52* 的分子标记时筛选出 GWM264 的另一个位点 *Xgwm264a* (Peng 论文中未标明此扩增片段的大小),它与 *Xgwm18* 的遗传距离为 0.6cM。推测本试验所找到的多态性位点与 Peng 试验中的 *Xgwm264a* 相一致,由此证明与这 4 个标记连锁的恢复基因位于 1BS 上。

### 3 讨论

恢复基因的遗传研究是恢复系选育的理论基础,目前已有文献报道了对 K-CMS 的恢复基因的遗传分析结果,它们主要集中于育性指标的划分、恢复基因的数目、恢复基因的效应等遗传研究。由于不同研究者采用了不同的育性指标,加上育性本身

受环境条件影响较大,导致研究结果差异甚大<sup>[7-9]</sup>。本试验发现 LK783 的育性恢复基因与位于着丝点附近的 *Xgwm11* 等分子标记有较紧密的连锁关系,由于没有对 LK783 的育性恢复基因和 *Rfv1* 的等位性进行测验,我们认为造成差异的原因可能有 3 种:(1) LK783 所携带的育性恢复基因与 *Rfv1* 不等位,它是位于 1BS 上的另一个 K 型不育系的恢复基因,这可通过等位性测验得以证实。(2) Kota<sup>[10]</sup>在 1991 年就发现了 1B 染色体上这种遗传图谱和物理图谱不一致的现象,并指出相对于 1B 中部来说(长臂的 60%和短臂的 80%)1B 的两个末端是重组热点区。由于 *Xgwm11* 等 4 个标记位于非重组热点区,而 *Rfv1* 位于重组热点区和非重组热点区的交界处,所以二者的物理距离虽然较远但表现为遗传距离较近。加上 911289 是 1B/1R 易位系,1BS 和 1RS 虽然同源性较高,但 1BS 和 1RS 的联会频率低于 1BS 本身的联会频率,从而造成交换减少,标记之间的遗传距离较近。由于在不育细胞质背景下 1B/1R 染色体的遗传传递率较 1B 的遗传传递率低<sup>[11,12]</sup>,从而造成偏分离现象。本试验表现为来源于 1B 染色体的 4 个 SSR 标记不符合 1:1 的比例,也会造成遗传距离的估计存在偏差。(3) Kojima<sup>[3]</sup>在对 *Rf3* 定位时发现 1BS 上的 RFLP 标记 *Xbcd98* 位于物理图谱的端部,但定位于遗传图谱的中部,推测缺失系发生了染色体重排。LK783 或中国春缺失系是否发生了染色体重排造成的一致有待进一步研究。

不同细胞质雄性不育类型的育性恢复基因很可能有类似的起源,明确不同育性恢复基因的关系更有利于理解细胞质雄性不育及其育性恢复基因的产生方式<sup>[3,13,14]</sup>。筛选出 K-CMS 育性恢复基因的分子标记也有利于对这种争论作出正确的结论。

### References:

- [1] Ma Z Q, et al. Genetic analysis of fertility restoration in wheat using restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.* 1995, 35: 1137 - 1143.
- [2] Ma Z Q, et al. Inheritance and chromosomal location of male fertility restoring gene transferred from *Aegilops umbellata* Zhuk into *Triticum aestivum* L. *Mol. Gen. Genet.* 1995: 351 - 357.
- [3] Kojima T, et al. High-resolution RFLP mapping of the fertility restoration (*Rf3*) against *Triticum timopheevi* cytoplasm located on chromosome 1BS of common wheat. *Genes and Genetic Systems*, 1997, 72(6): 353 - 359.
- [4] Xu Z Y, et al. Study on RAPD and SCAR markers linked to the male fertility restorer gene (*Rf*) in wheat. *Hybrid Wheat - A New Crop Going to Farmer. The Proceedings of 1st International*

- al Workshop on Hybrid Wheat. Beijing:China Agricultural University Press,1998:111-119.
- [ 5 ] Röder M S, et al. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998,149:2007-2023.
- [ 6 ] Peng J H, et al. Microsatellite tagging of the stripe-rust resistance gene *YrH52* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, and suggestive negative crossover interference on chromosome 1B. *Theor. Appl. Genet.* 1999, 98:862-872.
- [ 7 ] Mukai Y, et al. Basic studies on hybrid wheat breeding. VIII. A new male sterility-fertility restoration system in common wheat utilizing the cytoplasm of *Aegilops kotschyi* and *Ae. variabilis*. *Theor. Appl. Genet.* 1979, 54:153-160.
- [ 8 ] Hamawaki H, et al. Telocentric mapping of the fertility-restoring gene *Rfv1* against *Aegilops variabilis* cytoplasm in wheat. *Jpn. J. Genet.* 1980, 55:453.
- [ 9 ] Mukai Y, et al. Physical mapping of a fertility-restoring gene against *Aegilops kotschyi* cytoplasm in wheat. *Jpn. J. Genet.* 1992, 66:199-207.
- [ 10 ] Kota R S, et al. A cytogenetically based physical map of chromosome 1B in common wheat. *Genome*, 1993, 36:548-554.
- [ 11 ] Tsunewaki K. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. Kyoto:Japan Society for the Promotion of Science, 1980:211-265.
- [ 12 ] Zhang G S, et al. Studies on fertility stability and restoration of some male sterile lines of alloplasmic 1B/1R wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 1996, 29(5):41-50. (in Chinese)  
张改生,等.几类异质小麦雄性不育系育性稳定性与育性恢复性的研究. *中国农业科学*, 1996, 29(5):41-50.
- [ 13 ] Boner A, et al. Genetics and molecular mapping of a male fertility restoration locus (*Rfg1*) in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1998, 97:99-102.
- [ 14 ] Tan X L, et al. Genetic relationship between *Rf* genes for rice CMS-WA and CMS-BT based on molecular mapping. *Hybrid Rice*, 1999, 14(3):37-39. (in Chinese)  
谭学林,等.水稻不同胞质恢复基因分子定位及其相互关系. *杂交水稻*, 1999, 14(3):37-39.

## 《中国畜牧兽医》征稿启事

(原名《国外畜牧科技》)

《中国畜牧兽医》是由农业部主管,中国农业科学院畜牧研究所主办的全国性、综合性的技术类期刊,国内外公开发行。读者对象为畜牧兽医行业管理者与生产者,大专院校及科研院所的科研工作者,专业技术人员和广大的养殖户。国内统一刊号:CN11-4843/S;邮发代号:2-215。办刊宗旨:宣传国家有关畜牧兽医行业的政策法规;报道全国畜牧兽医研究的最新进展与成果;传播养殖业最先进的实用技术;介绍世界畜牧兽医研究进展与生产的最新信息与动态;简介全国畜牧兽医企业最成功的经营理念及有关的新产品。栏目设置:政策法规、专家论坛、营养与饲养、添加剂与饲料、遗传繁育、生物技术、疾病防治、国际动物疫情、畜禽产品、养殖与环境、生理生化、特种动物、企业经营与管理、信息与动态及企业介绍等。其中营养与饲养、添加剂与饲料、遗传繁育、疾病防治、国际动物疫情为每期的固定栏目。投稿要求:中、英文摘要、关键词、题目和地址。第一作者个人简介。请作者注明电话,以便联系。若与基金项目有关,请注明项目编号。请勿一稿多投,若3个月后未收到刊用通知,可另投他刊。请作者自留底稿。

联系地址:100094 北京圆明园西路2号中国农业科学院畜牧研究所《中国畜牧兽医》编辑部

电话/传真:010-62816020

E-mail:gwxm@263.net