

# 小麦 T 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf6* 的 ISSR 标记分析

关荣霞<sup>1</sup>, 郭小丽<sup>2</sup>, 刘冬成<sup>3</sup>, 曹双河<sup>3</sup>, 张爱民<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学植物遗传育种系, 北京 100094; <sup>2</sup> 中国农业大学生物学院, 北京 100094;  
<sup>3</sup> 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 以小麦 T 型恢复系 2114 和不育系 ND44A 配制杂交组合, 并以 147 株个体组成的 F<sub>2</sub> 分离群体作为恢复基因的标记群体。用 43 个 ISSR 引物对两个亲本进行了扩增, 发现 18 个引物能在两者间产生明显的多态性, 其中引物 UBC-808、UBC-848 在 2 个亲本间以及可育池和不育池间都能产生一致、稳定的多态性。用这 2 个引物在 F<sub>2</sub> 群体中进行扩增。经连锁分析, 证明这 2 个标记与小麦 T 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf6* 连锁, 遗传距离分别为 7.9 cM 和 4.9 cM。用 181 对 SSR 引物对两个亲本进行扫描, 其中有 34.3% SSR 引物能在亲本间扩增出多态性, 但没找到与 *Rf6* 连锁的 SSR 标记。对 ISSR、SSR 等方法在小麦中的多态性比例进行了比较, 发现 ISSR 具有更高的多态性, 特别是在外源基因的检测中能提供更丰富的遗传信息。

关键词: 小麦; 恢复基因; ISSR 标记

## Analysis of the Fertility Restoring Gene *Rf6* in *T. timopheevii* Cytoplasmic Male Sterility of Wheat with ISSR Markers

GUAN Rong-xia<sup>1</sup>, GUO Xiao-li<sup>2</sup>, LIU Dong-cheng<sup>3</sup>, CAO Shuang-he<sup>3</sup>, ZHANG Ai-min<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Plant Genetics and Breeding, China Agricultural University, Beijing 100094;

<sup>2</sup> College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094;

<sup>3</sup> Institute of Genetics and Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: Inter-simple sequence repeat (ISSR) was evaluated in a F<sub>2</sub> population of 147 plants derived from male fertility restorer line 2114 and male sterile line ND44A. Of 43 examined primers, 18 produced distinguishable as well as polymorphic bands between the two parents. Linkage analysis in the mapping population showed that two markers, UBC-808 and UBC-848, were closely linked with the restoring gene *Rf6* of the *T. timopheevii* CMS system. The distance between the two markers and the restoring gene was 7.9 cM and 4.9 cM, respectively. Two parental plants were screened with 181 pairs of SSR primers, of which, 34.3% showed polymorphism. No locus was found linked with the restoring gene. Compared with SSR technique that used in the experiment, ISSR produced more information and proved to be a valuable method for identification of alien fragment.

Key words: Wheat; Restorer gene; ISSR marker

ISSR(inter-simple sequence repeats)是近年发展起来的一种新型分子标记技术<sup>[1]</sup>,它是根据基因组内广泛存在的微卫星基序设计单一引物,对基因组

DNA进行扩增。ISSR引物通常为16~18个碱基,由1~4个碱基组成的串联重复序列和几个非重复的锚定碱基组成,从而保证引物能对SSR之间的

收稿日期:2002-01-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39893350)

作者简介:关荣霞(1974-),女,山西运城人,博士,现在中国农业科学院品种资源研究所作博士后, Tel:010-62186624。张爱民为通讯作者, Tel:010-64889347; E-mail: amzhang@genetics.ac.cn

DNA 序列进行 PCR 扩增。由于微卫星在基因组中广泛分布,而且等位变异特别丰富<sup>[2,3]</sup>,因而 ISSR 可以检测到基因组多个位点的差异。另外,ISSR 不像 SSR 具有物种特异性,它可以和 RAPD 一样用于各类植物的研究。Nagaoka 等用 ISSR 引物对小麦的研究表明,此类引物的分析结果与 RFLP 分析结果一样可靠,并发现(AC)<sub>n</sub> 引物能扩增出更多的多态性<sup>[4]</sup>。由于 ISSR 和 RFLP 相比更容易操作,且多态性更高,所以被看作是克服了 RFLP 和 RAPD 许多局限性的新标记。本研究旨在用 ISSR 技术寻找与单基因恢复系 2114 所携带的恢复基因 *Rf6* 紧密连锁的分子标记,并将该方法与 RAPD、SSR 技术作一比较。

## 1 材料与方 法

### 1.1 恢复基因标记群体的构建

选用小麦 T 型细胞质雄性不育系 ND44A 与单基因恢复系 2114 配制杂交组合(材料由江苏农业科学院赵寅槐提供),单株 F<sub>1</sub> 套袋自交所结种子种于大田,构成 F<sub>2</sub> 标记群体。F<sub>2</sub> 单株编号并取叶片用于 DNA 提取,开花前套袋自交,收获后考查自交结实率。

### 1.2 基因组 DNA 的提取及 DNA 池的构建

小麦 DNA 的提取采用 SDS 方法<sup>[5]</sup>。在 F<sub>2</sub> 分离群体中随机抽取高度可育的植株和完全不育的植株各 10 株,取等量 DNA 混合,分别构成可育池和不育池。

### 1.3 PCR 反应及电泳检测

用 43 个 ISSR 引物、181 对 SSR 引物对两个亲本及可育和不育池进行扩增。PCR 反应体系为:1 × 扩增缓冲液[10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 9.0), 50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 0.1% Triton-100], 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol·L<sup>-1</sup> dNTPs, 引物 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>, 50 ng DNA, 1uTaq 酶,加 dd H<sub>2</sub>O 至 25 μl。反应在 PE-2400PCR 热循环仪上进行。

ISSR 的 PCR 反应循环参数为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 1 min,52℃ 1 min,72℃ 2 min,38 个循环;72℃ 延伸 8 min,最后 4℃ 保存。SSR 的 PCR 扩增仅退火温度与 ISSR 不同(50~60℃)。ISSR 扩增产物在 7% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,SSR 扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 在亲本间的多态性

在选用的 181 对小麦微卫星引物中,有 62 对能在亲本 2114 和 ND44A 间扩增产生稳定的多态性,占 34.3%。其中 9 对引物能在不育池与可育池间扩增产生多态性,但经在 F<sub>2</sub> 分离群体中检测,这些多态性片段与恢复基因不连锁。用这 9 对引物在构成两个池的 20 株个体中进行扩增,发现每 10 株中至少有 2 株有交换发生。而建池时 DNA 等量混合,使得交换单株的 DNA 在扩增体系中占有的份量很小,以致没有扩增产物或产物太少难以检测。因此,对 SSR 标记而言,以 10 株个体的 DNA 构建可育池和不育池可能过少。

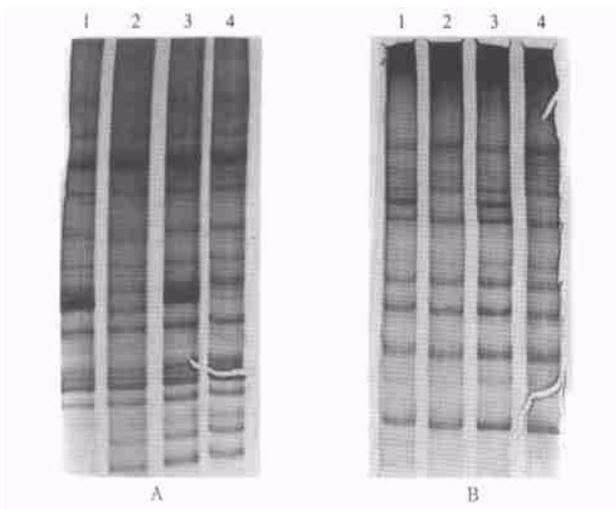
### 2.2 ISSR 在亲本间的多态性

共选用 43 个 ISSR 引物在亲本和 2 个池中同时扩增,有 6 个引物没有清晰的扩增产物;18 个引物能在两个亲本间扩增产生稳定的多态性,其中 2 个引物 UBC<sub>808</sub>、UBC<sub>848</sub> 在亲本和池间都扩增出稳定的多态性(图 1 A,B),引物 UBC<sub>808</sub> 扩增的多态性片段长度约为 702bp,引物 UBC<sub>848</sub> 扩增的多态性片段长度约 1 500bp。用这 2 个引物在一个由 147 株个体组成的 F<sub>2</sub> 分离群体中进行 PCR 扩增(图 2,图 3),2 个标记在该群体中发生交换的单株分别为 11 株和 7 株,用 Mapmaker 3.0 进行连锁分析,发现这 2 个标记与恢复基因的遗传距离分别为 7.9 cM 和 4.9 cM。

## 3 讨论

### 3.1 小麦 T 型不育系恢复基因的分子标记研究

细胞质雄性不育(CMS)是小麦杂种优势利用研究的一个主要方面,在众多的小麦细胞质雄性不育系统中,小麦 T 型雄性不育是研究时间最长,研究最深入的一种。但小麦 T 型不育系恢复源少,恢复力高的恢复系较少。由于 CMS 的恢复是一个复杂的生理现象,目前 CMS 的作用机理尚不完全清楚,用转基因技术创造恢复系还不现实,利用回交转育仍是选育优良恢复系的主要方法。DNA 分子标记技术的应用将简化恢复基因的检测程序,提高恢复系育种的选择效率。目前在玉米、水稻等作物上 CMS 的分子标记已初步建立起来。在小麦的 T 型细胞质雄性不育恢复基因的研究中,已用 RFLP 定位了小麦的 *Rf3*、*Rf4* 基因<sup>[6,7]</sup>,Xu 等找到 4 个与小麦 T 型恢复系 R9034 所携带的恢复基因连锁的 RAPD 标记,并将其中一个转化为 SCAR 标记<sup>[8]</sup>。与此同时,育种家也在寻找新的恢复源。小麦 T 型恢复系 2114 是单基因恢复系,其携带的恢复基因来



1. 2114, 2. ND44A, 3. 可育池, 4. 不育池

1. 2114, 2. ND44A, 3. Fertile bulk, 4. Sterile bulk

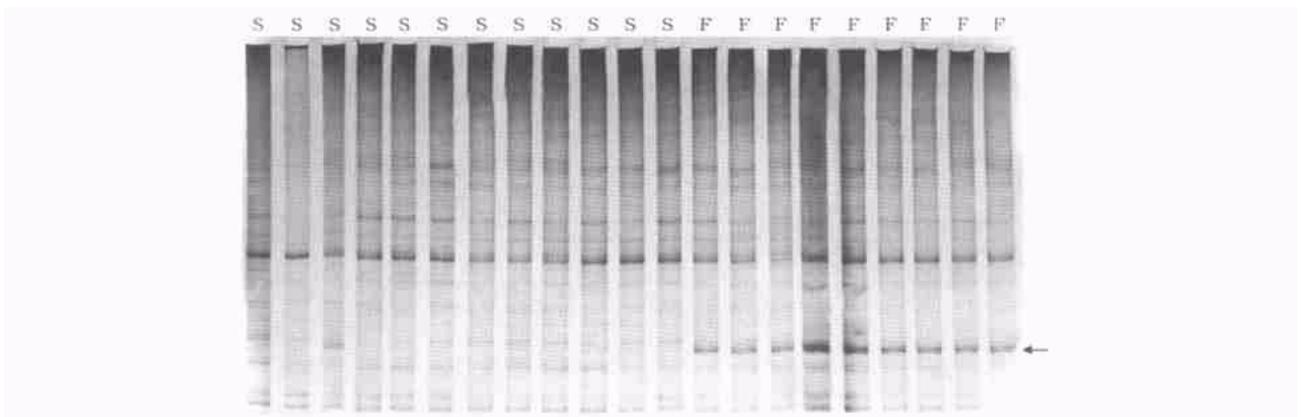
图 1 ISSR 引物 UBC<sub>808</sub>、UBC<sub>848</sub>在亲本和池间的扩增

Fig. 1 Amplification profile obtained with ISSR primers UBC808 and UBC848 in parental plants and bulks

源于小伞山羊草 (*Aegilops umkellulata*) 的 6U 染色体易位片段,该基因被国际上命名为 *Rf6*,据报道,2114 对难恢复和易恢复不育系的恢复力分别达到 82.5%和 93.0%,具有潜在的利用价值<sup>[9]</sup>。Ma 等用 RFLP 技术将该恢复基因定位于 2114 的 6A 短臂上<sup>[10]</sup>。但 RFLP 不仅成本较高,操作复杂,难以用于大批量的材料筛选,而且根据 RFLP 探针合成的 STS 标记在亲本间检测不到多态性(数据未列)。因此,需要采用新的易于操作的分子标记技术对该恢复基因进行研究。

### 3.2 分子标记在恢复基因定位中的应用效率

本研究曾以集群分离分析法 (bulked segregant analysis, BSA) 与 RAPD 技术相结合寻找与恢复基因 *Rf6* 连锁的分子标记,但在采用的 460 个 10 碱基的随机引物中,对初选有多态性的引物经 3 次以上重复,只有 10 个引物(2.17%)能在亲本间产生稳定的多态性。其中只有 2 个引物(OPI18 和 OPI19)



S:不育株, F:可育株, 箭头:多态性带

S: sterile, F: fertile, Arrow: polymorphic band

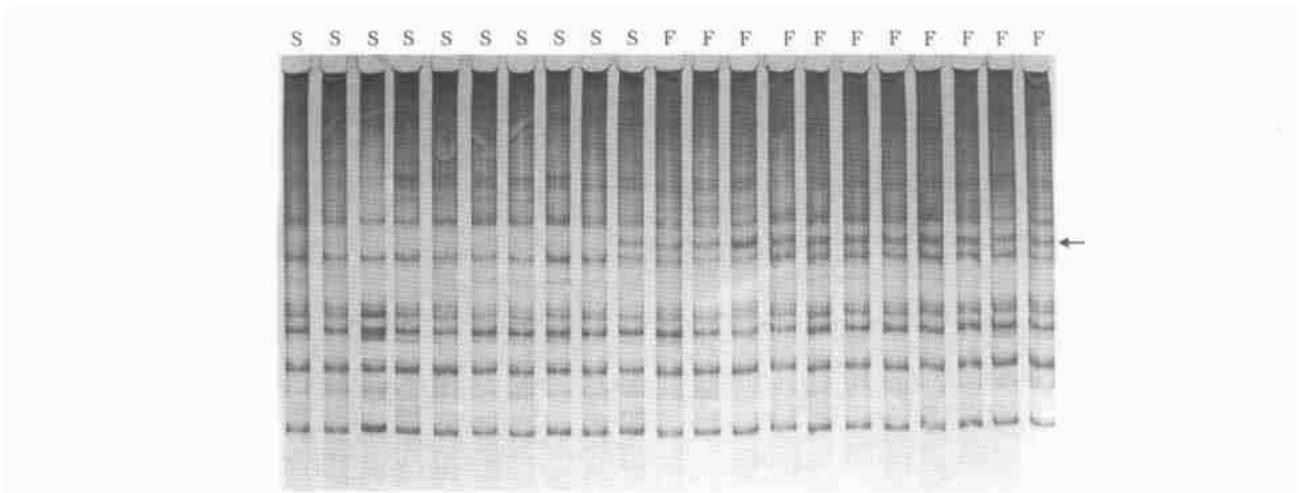
图 2 ISSR 引物 UBC<sub>808</sub>在 F<sub>2</sub> 分离群体中的检测

Fig. 2 Segregation of the *Rf6* alleles amplified by primer UBC808 on 7% polyacrylamide gel

能在 2 个池间产生多态性<sup>[11]</sup>。而且 RAPD 是以引物结合位点的突变为基础,常具有遗传背景特异性,因而会限制其在选择育种中的应用范围。

小麦许多微卫星标记位点均已定位于图谱上<sup>[12]</sup>,若找到与 *Rf6* 连锁的 SSR 标记,就能把目的基因直接定位于分子图谱上,一方面是用不同的方法验证前人的研究结果,另外还可以再利用最新的小麦连锁图谱对基因进行精确定位。虽然在所用的 181 对 SSR 引物中有 34.3%能在亲本间扩增出多态性,但没找到与 *Rf6* 连锁的 SSR 标记。图谱密度太稀可能是 SSR 定位失败的原因。

在所用的 43 个 ISSR 引物中,18 个(41.8%)能在亲本间产生稳定的多态性,其中 2 个是与 *Rf6* 紧密连锁的标记,表明 ISSR 的多态性远远高于 RAPD,同时 ISSR 具有更高的稳定性,而且采取聚丙烯酰胺电泳和银染结合的检测技术,增加了 ISSR 的灵敏度。与 SSR 相比 ISSR 1 次扩增可以提供多个位点的序列信息,更适用于外源染色体片段的检测。由于 ISSR 比 RAPD 有更高的多态性,又比 RFLP 简单易行,已被广泛用于小麦、水稻、玉米等作物的遗传差异研究和基因的分子标记筛选<sup>[13-17]</sup>、作物品种的鉴别<sup>[18]</sup>以及遗传图谱的构



S:不育株, F:可育株, 箭头:多态性带

S: Sterile, F: Fertile, Arrow: Polymorphic band

图3 ISSR引物UBC<sub>848</sub>在F<sub>2</sub>分离群体中的检测

Fig. 3 Segregation of the *Rf6* alleles amplified by primer UBC848 on 7% polyacrylamide gel

建<sup>[19,20]</sup>。Qian 等用 RAPD 和 ISSR 进行野生稻的遗传差异研究,发现 20 个 RAPD 引物可产生 199 条可重复的带,其中 30.65%有多态性;12 个 ISSR 引物扩增出 113 条可重复的带,其中 46.02%是多态性带,他们认为 ISSR 不仅多态性高于 RAPD,而且可重复性也远高于 RAPD<sup>[21]</sup>。在大部分研究中,ISSR 引物扩增产生的标记都为显性标记,而 Akagi 等找到与水稻核恢复基因紧密连锁的共显性 ISSR 标记,测序发现这 2 个片段仅由于一个重复序列 (GATG)<sub>n</sub> 的重复次数不同,致使两者有 16bp 的差异。这一共显性标记不仅可以用于水稻的恢复系育种,而且还能用于杂种纯度的鉴定<sup>[22]</sup>。随着微卫星标记的开发利用,将会有更多的 ISSR 引物被开发出来,应用于重要基因的分子标记。这些标记对于恢复基因的精细定位和克隆,以及恢复基因的累加和恢复系的标记辅助选择将会起到重要作用。

## References

- [ 1 ] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176 - 183.
- [ 2 ] Kijas J M H, Fowler J C S, Thomas M R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*, 1996, 38: 349 - 355.
- [ 3 ] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12: 4127 - 4138.
- [ 4 ] Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 94: 597 - 602.
- [ 5 ] Gill K S, Lubbers E L, Gill B S, Raupp W J, Cox T S. A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat (AABBDD). *Genome*, 1991, 34: 362 - 374.
- [ 6 ] Ma Z Q, Sorrells M E. Genetic analysis of fertility restoration in wheat using restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.* 1995, 35: 1137 - 1143.
- [ 7 ] Kojima T, Tsujimoto H, Ogihara Y. High-resolution RFLP mapping of the fertility restoration (*Rf3*) gene against *Triticum timopheevi* cytoplasm located on chromosome 1BS of common wheat. *Genes Genetic Systems*, 1997, 72 (6): 353 - 359.
- [ 8 ] Xu Z Y, Liu D C, Zhang A M. Molecular mapping of fertility restoration gene in wheat using RAPD markers. *Hybrid Wheat - A New Crop Going to Farmer*. Beijing: China Agricultural University Press, 1998: 187 - 222.
- [ 9 ] Zhao Y H, Ma Z Q, Liu D J. Transfer of restoring gene in *Aegilops umbellulata* into wheat. *Acta Genetica Sinica*, 1991, 18(6): 529 - 536. (in Chinese)  
赵寅槐,马正强,刘大钧. 小伞山羊草 (*Aegilops umbellulata*) 恢复基因向小麦的转移. *遗传学报*, 1991, 18(6): 529 - 536.
- [ 10 ] Ma Z Q, Zhao Y H, Sorrells M E. Inheritance and chromosomal locations of fertility restoring gene transferred from *Aegilops umbellulata* Zhuk. to *Triticum aestivum* L. *Molec. Gen. Genet.* 1995, 94: 832 - 840.
- [ 11 ] Guan R X, Liu D C, Zhang A M. Genetic analysis and identification of RAPD markers of fertility restorer gene *Rf6* for the *T. timopheevii* cytoplasmic male sterility of wheat. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, 9(2): 159 - 162. (in Chinese)

- 关荣霞,刘冬成,张爱民. 小麦 T 型雄性不育恢复基因的遗传分析及 RAPD 标记. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 159 - 162.
- [12] Röder M S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M H, Leroy P, Ganal M W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2 007 - 2 023.
- [13] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1999, 98: 780 - 792.
- [14] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 95: 408 - 417.
- [15] Goodwin I D, Aitken E A B, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1 524 - 1 528.
- [16] Jain A, Apparanda C, Bhalla P L. Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea* (Bignoniaceae) by RAPD and inter-SSR PCR. *Genome*, 1999, 42: 714 - 719.
- [17] Jing R C, He Y Q, Huang Q Y, Zhu Y G. Analysis of the fertility restorer gene in the wild abortive (WA) type cytoplasmic male sterility (CMS) system with the ISSR and SSLP markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(2): 10 - 15. (in Chinese)
- 景润春,何予卿,黄青阳,朱英国. 水稻野败型细胞质雄性不育恢复基因的 ISSR 和 SSLP 标记分析. 中国农业科学, 2000, 33(2): 10 - 15.
- [18] Wolff K, Zietkiewicz E, Hofstra H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor. Appl. Genet.* 1995, 91: 439 - 447.
- [19] Ammiraju J S S, Dholakia B B, Santra D K, Singh H, Lagu M D, Tamhankar S A, Dhaliwal H S, Rao V S, Gupta V S, Ranjekar P K. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2001, 102: 726 - 732.
- [20] Sanker A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 2001, 102: 206 - 214.
- [21] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of wild rice *Oryza gramulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2001, 102: 440 - 449.
- [22] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Nakamura A, Fujimura T. A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, *Rf1*, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, 1996, 39: 1 205 - 1 209.