

SSR 方法标记谷子光敏雄性不育基因

郝晓芬¹, 王志民², 王根全¹, 王贵荣², 王晓宇¹, 王潞英¹, 王节之¹

(1. 山西省农业科学院 谷子研究所, 山西 长治 046011; 2. 上海交通大学, 上海 200240)

摘要: 为加快谷子杂种优势利用的研究进展、寻找谷子光敏雄性不育基因, 利用 SSR 方法对谷子光敏雄性不育基因进行了分子标记。首先用 166 对引物在谷子光敏不育系 GM 与恢复系恢东 1 号两亲本间进行了筛选, 其中有 61 对引物在亲本间存在差异; 经 F₂ 群体 153 株单株验证后, 仅有一对引物 b159 和目标基因连锁; 通过 Kosambi 函数计算, 其连锁距离为 13.5 cM, 位于第 6 条染色体。

关键词: 谷子; 光敏雄性不育基因; SSR; 分子标记

中图分类号: S515.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0112-05

SSR Analysis of Photo-sensitive Male Sterile Gene of Millet

HAO Xiao-fen¹, WANG Zhi-min², WANG Gen-quan¹, WANG Gui-rong²,
WANG Xiao-yu¹, WANG Lu-ying¹, WANG Jie-zhi¹

(1. Institute of Millet, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Changzhi 046011, China;

2. Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: To accelerate the research progress of heterosis utilization in millet and to look for photo-sensitive male sterility genes, millet photo-sensitive male sterile gene was studied using SSR technique. 166 pairs of SSR primers were selected between photo-sensitive male sterile material GM and restorer material HuiDong 1. 61 pairs primers were different between their parents. Checking by F₂ population 153 strains only b159 was the linked marker of target gene. The chain distance is 13.5 cM through Kosambi function. This mark is located at the sixth chromosome.

Key words: Millet; Photo-sensitive male sterile gene; SSR; Molecular marker

谷子是中国的传统作物,也是世界上由我国首次种植成功的农作物之一。据考证,其已有 7 000 多年的种植历史,历史上最大的种植面积在 1 500 万 hm² 左右,解放初期全国谷子种植面积也有 1 000 万 hm²,然而,目前全国谷子种植面积仅 200 万 hm² 左右^[1,2],其减少的主要原因就是产量低。而杂种优势可有效提高作物产量,其中杂交玉米、杂交水稻已在全世界范围应用^[3-5],杂交谷子的研究相对缓慢。近年来,我国谷子杂种优势的利用研究已取得了多项突破性进展,先后发现与利用了高度雄性不育^[6,7]、显性雄性不育^[8,9]和谷子光(温)敏核不育材料^[10,11]等,并且利用光敏不育材料培育出的杂交种张杂谷系列已在生产实践中显示出很好的应用

价值^[12]。

谷子的适应性范围较窄,按常规的育种手段可以把不育基因转移到具有不同遗传背景的优良育种材料中,选育出不同生态区域的不育系,但在回交转育过程中后代的基因型变得较为复杂,用传统的育种手段难以对后代个体的基因型进行快速有效地筛选。分子标记不受外界干扰,通过标记可以准确选育目标性状,加快育种进程。

我们已用 AFLP 方法找到了谷子光敏雄性不育基因的两个连锁标记^[13]。鉴于 SSR 标记相对于 AFLP 标记成本低,易操作^[14,15]。本试验利用 SSR 标记对谷子光敏雄性不育基因进行研究,旨在借助分子标记辅助选育不同的不育系类型,促进谷子杂

收稿日期: 2011-06-25

基金项目: 山西省自然科学基金项目(2008011059-3)

作者简介: 郝晓芬(1977-),女,山西襄垣人,助理研究员,学士,主要从事谷子生物技术及常规育种研究。

通讯作者: 王节之(1956-),女,山西运城人,研究员,学士,主要从事谷子生物技术及常规育种研究。

交种优势的选育,推动谷子杂种优势利用研究的迅速发展。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 供试谷子包括光敏雄性不育材料 GM 和恢复性好的恢东 1 号及其杂交获得的 F₂ 单株。其中,母本 GM,幼苗叶鞘、叶色均为绿色,株高 116 cm,穗长 20 cm,纺锤穗型,刚毛长;在长治生育期为

100 d,长光照下不育率 100%,结实率为 0~5%;短光照(12 h)下自交结实率达 30%~50%。父本恢东 1 号,叶鞘紫色,叶色深绿,成熟叶色变红,株高 155 cm,穗长 25 cm,穗桶型,刚毛短,结实率为 100%。

1.1.2 SSR 所用引物 分子标记试验部分在上海交通大学重点实验室完成。所用引物为中国农科院作物科学研究所设计的引物^[16]及中国农科院刁现民老师所赠的引物,共 166 对,引物名称如表 1 所示。

表 1 试验所用的 166 对引物
Tab. 1 166 SSR primers used in present study

SSR 引物名称 SSR primer																									
p2	p3	p4	p5	p6	p8	p9	p10	p11	p12X	p14	p15	p16	p17X	p18X	p20	p21	p22	p23	p24	p25	p29				
p31X	p32	p33	p34	p36	p37	p38	p39	p40X	p41	p42	p44	p45	p46	p47X	p48	p49	p50	p51	p52	p53					
p54	p56	p58	p59	p61	p62	p63X	p67	p68	p71	p74	p75	p78	p80	p81	p83	p85	p87	p88	p90	p91					
p92	p93X	p95X	p96X	p97	p98	p100	b101	b102	b103	b105	b106	b107	b109	b110	b111	b112	b113								
b114	b115	b116	b117	b118	b119	b122	b123	b124	b125	b126	b127	b128	b129	b130	b131	b132	b135								
b138	b142	b144	b145	b147	b151	b152	b153	b155	b156	b157	b158	b159	b161	b163	b165	b166	b169								
b170	b171	b172	b174	b177	b180	b181	b182	b183	b184	b185	b186	b187	b188	b189	b190	b192	b193								
b194	b195	b196	b198	b200	b201	b202	b203	b208	b209	b210	b211	b212	b223	b225	b234	b246	b247								
b258	Si180	Si287	Si288	Si308	Si318	Si323	Si343	Si351	Si358	Si367	Si369														

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验方法 田间种植 GM×恢东 1 号的 F₂ 38 行,父本、母本各 1 行。4~5 叶期随机间苗后,每行单株挂牌编号,10 叶期选株数较多的两行采叶片,用于 DNA 提取及分子标记。成熟期调查 F₂ 群体育性及性状分离情况。

1.2.2 分子标记方法 DNA 提取方法采用 CTAB 法^[17]。谷子 SSR 引物扩增体系为:谷子基因组 DNA 50 ng 作模板,200 μmol/L dNTPs,1 μL 10×PCR Buffer,SSR 正、反向引物各 0.5 μmol/L,Taq 酶 0.75 个单位,灭菌双蒸水补足到 10 μL。扩增循环程序为:94℃ 3 min 预变性;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 min,33 个循环;72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。然后,将扩增产物加 loading buffer 变性染料后,94℃ 条件下变性 7 min,在 6% 聚丙烯酰胺变性胶上电泳,电泳缓冲液为 1×TBE,上样量为 5 μL,1 500 V,电泳 90 min,电泳结束后,用银染法显影。

1.3 对筛选出的引物进行验证

将有差异的引物上大群体进行 PCR 扩增反应,分析连锁交换情况。计算出重组率,再根据作图函数 Kosambi 计算图距^[18]。

2 结果与分析

2.1 田间试验结果

种植的 GM×恢东 1 号的 F₂ 38 行材料中,选择株数较多的 4 行进行调查。经卡方检验,育性符合孟德尔 3:1 遗传规律,说明光敏不育基因对父本恢东 1 号是隐性,受一对隐性基因控制^[19]。

2.2 SSR 引物筛选结果

采集的两行叶片中,一行用于 SSR 分析。总株数 198 株,不育株 57 株,剔除病株及 DNA 质量不好的单株后,共 153 株单株作为分子标记的材料进行分析。将这 153 株重新编号,其中 1~27,55~84 为不育株,28~54,85~153 为可育株。用 166 对引物在 GM 和恢东 1 号间进行筛选,其中有 61 对引物在亲本间有多态性(表 2),多态率约为 36.7%。

2.3 F₂ 单株验证其连锁关系

在 F₂ 群体中选取高度不育、高度可育单株进行验证,61 对引物中,绝大部分引物的多态性与目标性状(育性)相关基因不连锁,只有 b159 与目标基因有连锁。用 b159 对 153 个光敏雄性不育材料进行扩增,在 200 bp 左右扩增出差异带(图 1,2,3),根据贾小平构建的连锁图,该引物位于第 6 条染色

体(图4箭头所示)。这与王润奇等^[20]研究的谷子 1066A 不育基因位于第6染色体相吻合。

表2 在亲本间有差异的 SSR 引物

Tab.2 SSR primers have difference between parents

引物名称 Primers	左序列(5' to 3') Left sequence(5' to 3')	右序列(5' to 3') Right sequence(5' to 3')
p3	GCAGAAAGCATGCCGTAGTC	GCTTGGAGTCCACATGGATAG
p5	CTTCCCTCCCTCCCTGAC	CTGAGCTGAGCTGCCTTTG
p6	AAGGATGGAATTTGCCACTG	TTTCGACGATTTGCTTCAAC
p10	CAATCACATCCGAGCATTTTC	CACCCACCGTGTTGATCTG
p14	TCGTTCAAGGCTCAGGACATC	GAACAAGAAAGAACATCCTGTGG
p16	TTTCTCCCTCTCTCGATTCC	AAATTGGCGTGCTAACAACC
p17X	CGGACACCTGAAAGACGAA	GTCACTTGTGTTGTTGCG
p20	GTGCCCCGCTTAGCTTTAATC	ATGCACGTGGGACCCATAC
p24	TAACGCTCCTGTTCTCGGTC	AAAGCATAGGTGGGTGTGG
p34	GACTCTCTTCCCCGCTCTCG	TTTGCCAAGCCTTCATAACC
p37	CGGGAAGCAAATGTTCAAGC	GCATGAAGCTCGTCTGTAC
p39	GAACACAAAACCTGGGAACG	TTCGCAGTAAACGTGCAAAAC
p40X	ATCTCAGTTGTAAGTCTCCT	TCTGCTTGCTCGTCTAG
p42	GGCACTTTCCCTTCCAATC	TTCTTTTGTGCTTCTCC
p44	TTCCCGGAACAGACAAGAAC	GCGTTGGAAGCCATGGAG
p45	CATGCATCGTGAGGGAATC	AATTGCTCCCATGCTACTGTG
p47X	CAACACCATAAAGAGCCACAAG	TGAAGAGATGCCAGCCTGA
p50	GGGATACACCGAGATAGAGG	CCCCACATACCAGCAGTTG
p51	AACGGACTATAATCATGTGAATGC	AAAATTGTTCAAGGGTGATAAGC
p61	CATCCGCGTCATCTGAATC	ACCTGCTGCTATCCATCACC
p62	CCCACACACATAAGAACAGAGC	TGTGGGTCAGATGTGTGAAAC
p63X	TTTGAAGACCCAGAAGAGC	AGACTCAGAACTAGCCGAT
p68	CATGCGTTGATCGTTTGTG	ACCACGCATTTACATGATCG
p75	ATGCCATGGGAATTTGAACC	GTTTGATGCAGGACGAGAGG
p78	CGCCCCGTGTGTTACCATTC	CGTTGTCGAAAACCATTCAG
p80	GCCGTTGGATTGATTATGG	TGTGCTTACTTTATGTGGCTTG
p81	TTTTCTCGAAAACGCAGGAG	CCTTGTGCTGTTTGTCTCG
p85	GAATTAGGCCGATGCACAAC	ATCCTAACTGCATGGCAAGG
p92	TGGAATTGGAACCCCTTTCG	GCCATGCAACACGTACCATC
p97	TCCACCAATCCACTCC	GTCTCCGTCATACCAC
b102	CCGTGAAACCCACCACTATT	GCACACACAAACCCGTCA
b103	CTACACCTCGCTTCCAGTCC	CTTCCATTTGCAGGATTGCT
b106	TGCTTTGCTCTCTTCTCTCA	ACGGACGATGAGGAATTGT
b107	AGAACGAGGTGCTGTGTGG	GGGTCTCAGCTCTCATCA
b112	CCACCCATTTCAAGTTCTGC	TTGTGGTCAGATTAGGTTGGTC
b113	GTCCTTGAACATCATT	TGAACACACTTACACTG
b115	GGTAGCGACGGATCTACAGC	GCTAGCAAATGCTGTCTATGG
b117	TGCCCTCCAGTCAATGTGC	TCCGTTGCGTTTCTTCTCT
b119	TCGGTGCGGATTCAGGTG	TGTCTTGGTTTGTAGGAGCCT
b122	ACTTCTTCTCTCTTTCGCG	TGTGGGATTAAGGTGCATCG
b124	GCTTGTGCACGGGATGCACC	CAAGGCTTATGCCTGCGTCAAC
b125	GCCATGAAACAGGTACAAAAGG	GCATCCCTTAATTTGTCAATG
b129	CACACTCTTCTCCCTTTTCC	ACGGTAACGGAGGATGGCTA
b142	TGGTAAAACTCCCATATTGAGC	GCCCCATCCTTGATAACAGA
b152	TCCTCGACATATAACCCTCACC	ACACATCACCTACCAAGCCG
b157	ATTCGTTTGTGTTCTGGCAAT	GTGTCTCTTGGCCCTCGTTTC
b158	GATGAGGAAAAGGTAGGTTGGA	CTGCAACGTGCAGAACTACG

续表 2:

引物名称 Primers	左序列(5′ to 3′) Left sequence(5′ to 3′)	右序列(5′ to 3′) Right sequence(5′ to 3′)
b159	GCCAGTCCGAGATGGTTAAG	AGCTCTAGCAGTTGGGGACA
b163	CTCGGAAGCTCAGATTCTCC	CACTTCCTGCAGCTCTCACA
b165	GCTTTGGTTTGGTTTGGTTGG	CCATTAGTCTCTGCCCTTGTT
b172	CAAAAGTCAGCTCTTGTTCCTG	AGCTCTCCTTGGTGAACAGC
b180	AGTCTCTCTTCCTTTCGCC	CCCTCTCACTGTTCTCTCGTC
b182	CCGATCAAATAATGCGAACA	TGCATCTTGCACGGATACAC
b187	TTGGACAAATGACGCTATGC	CTGCATCAAATCAGGACCAC
b188	AGCTGGTGGCCTTGTGTG	GGGAGAAGTTTGGAGCGTA
b192	CACAATTCTACCACGCCT	ACTATTCACTCGCCGTC
b194	CTGGGTTCCTCTACCGTA	CACACCGAAGAGGCAAAAG
b195	GGAATAGCTCGTCATCTGTTC	GCAGTGTCATTGGTTGCTG
b198	AGGGGACATGATCTCAAAG	CTGCCCCAAAGTTGAGCTGTT
b200	CATCGATCTCAACCTGTCCTT	ATGAGCCGTCATGTCACAAA
b247	GATTGCTCTCTACACACAGC	GCCCGATGGCTGCTAGT

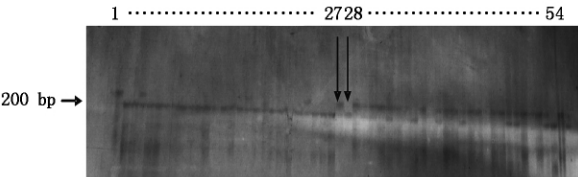


图 1 b159 对 1 ~ 54 个体扩增结果
Fig. 1 Results of b159 in 1 – 54

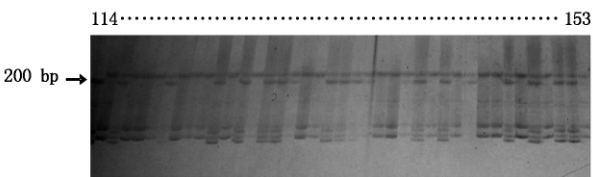


图 3 b159 对 114 ~ 153 个体扩增结果
Fig. 3 Results of b159 in 114 – 153

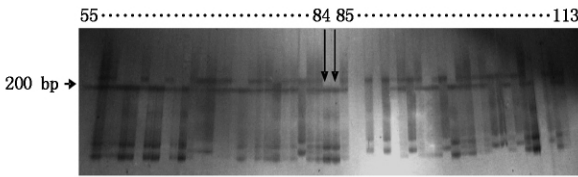


图 2 b159 对 55 ~ 113 个体扩增结果
Fig. 2 Results of b159 in 55 – 113

2.4 计算连锁距离

在 153 个单株中 根据扩增出的条带 结合单株育性 统计出单交换 20 个 双交换 9 个 6 个单株扩增后没条带 ,则标记与目标基因之间的重组率为 13.2% ,根据 Kosambi 函数计算得出遗传距离为 13.5 cM ,即 b159 标记离目标性状的距离为 13.5 cM。

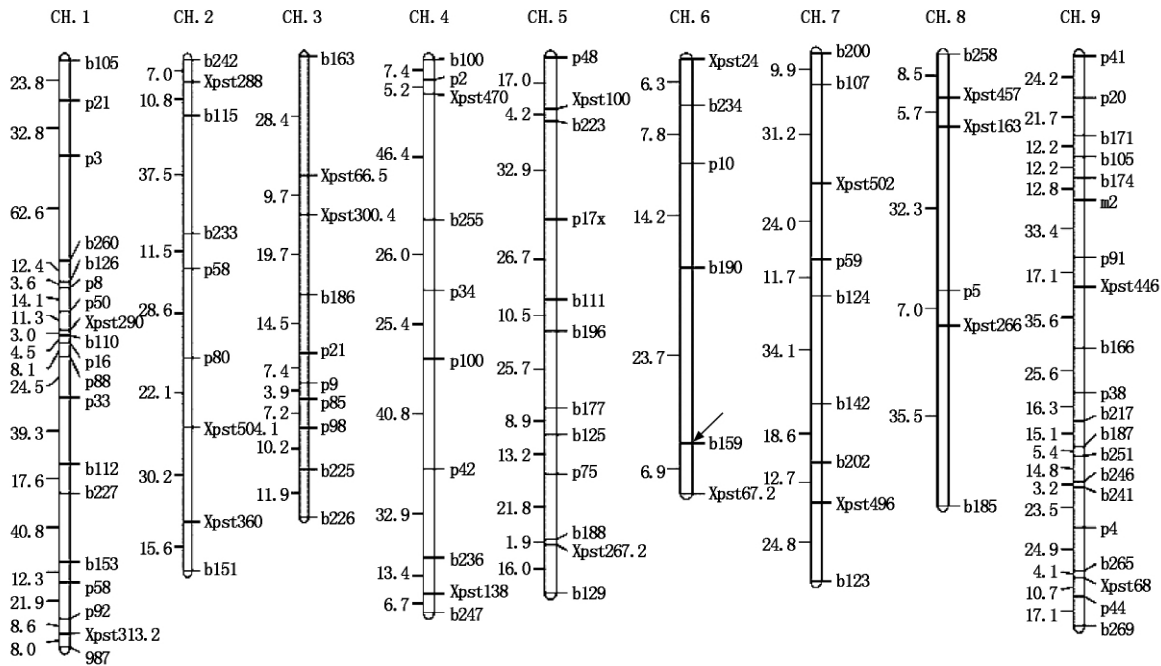


图 4 谷子的 SSR 连锁图谱
Fig. 4 SSR linkage map of foxtail millet

3 讨论

SSR 分子标记不像 AFLP 那样需要预扩增和连接,减少了对人力、物力的需求和依赖,并且多次重复试验结果稳定,克服了 RAPD 重复性、稳定性差的缺点。本试验采用 SSR 的方法对谷子光敏雄性不育基因进行分子标记,找到了位于第六染色体的一个标记 b159,距离目标性状 13.5 cM,这对于谷子光敏雄性不育系及谷子杂种优势的研究有很大的参考价值。

SSR 分子标记也有一定的局限性,需要特定的引物。谷子分子标记研究相对比较落后,开发的 SSR 引物较少,所以试验受到一定的限制,找到的标记与谷子光敏雄性不育基因连锁程度不紧密。在 F_2 通过选择标记基因获得目标基因的正确率随着重组率的增加会迅速下降。若要求选择正确率达到 90% 以上,标记与目标基因间的重组率必须小于等于 0.05;当重组率超过 0.1 时,选择正确率会降到 80% 以下。这就要求必须尽快更多地开发谷子第 6 染色体的 SSR 引物,找到与目标基因紧密连锁的标记。

参考文献:

- [1] 陈卫军,魏益民,张国权,等. 国内外的谷子研究现状[J]. 杂粮作物, 2003(3): 27-29.
- [2] 古世禄. 谷子研究新进展[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 235-241.
- [3] 许明学,荆绍凌,苗万波. 玉米杂交育种的历史回顾与展望[J]. 玉米科学, 2000, 8(1): 28-30.
- [4] 杨守仁. 粳籼稻杂交育种的进展及前景[J]. 中国农业科学, 1986(5): 15-18.
- [5] 袁隆平. 杂交水稻育种的新突破[J]. 世界科技研究与发展, 1999, 21(2): 29-30.
- [6] 王天宇,杜瑞恒. 谷子高度雄性不育基因在常规品种选育中的应用[J]. 华北农学报, 1994, 9(3): 21-25.
- [7] 王玉文,李会霞,田岗,等. 谷子高异交结实雄性不育系的创制及应用[J]. 中国农业科学, 2010, 43(4): 680-689.
- [8] 胡洪凯,马尚耀,石艳华. 谷子显性雄性不育基因的发现[J]. 作物学报, 1986, 12(2): 73-78.
- [9] 袁进成,石云素,胡洪凯,等. 谷子显性雄性不育基因 M_s^{ch} 的 AFLP 标记[J]. 作物学报, 2005, 31(10): 1295-1299.
- [10] 赵治海,崔文生,杜贵,等. 谷子光(温)敏不育系 821 选育及其不育性与光、温关系的研究[J]. 中国农业科学, 1996, 29(5): 23-31.
- [11] 王玉文,王随保,李会霞,等. 谷子光敏雄性不育系选育及应用研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 714-717.
- [12] 王晓明,王峰. 谷子光(温)敏两系杂交种“张杂谷”系列品种简介[J]. 河北农业科技, 2007(4): 20-21.
- [13] 郝晓芬,王节之,王根全,等. 利用 AFLP 方法对谷子光敏雄性不育基因进行分子标记[J]. 山西农业科学, 2009, 37(11): 3-5, 10.
- [14] 张立荣,徐大庆,刘大群. SSR 和 ISSR 分子标记及其在植物遗传育种研究中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(1): 90-94.
- [15] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [16] Jia X P, Zhang Z B, Liu Y H, et al. Development and genetic mapping of SSR markers in foxtail millet (*Setaria italica*(L.) P. Beauv.) [J]. Theor Appl Genet, 2009, 118: 821-829.
- [17] 北京大学. 分子生物学试验技术[M]. 北京: 北京大学出版社, 1988: 232-235.
- [18] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer for constructing primary genetics linkage maps of experimental and natural populations[J]. Genomics, 1987, 1: 174-182.
- [19] 王节之,郝晓芬,王根全,等. 光敏雄性不育系(GM)谷子主要性状遗传规律研究[J]. 山西农业科学, 2010, 38(6): 3-4, 17.
- [20] 王润奇,高俊华,关中波,等. 谷子几种农艺性状基因染色体定位及连锁关系的初步研究[J]. 作物学报, 2007, 33(1): 9-14.