

高粱 A₂ 类型 CMS 育性恢复基因的定位研究

赵威军¹, 仪治本², 孙 毅³, 梁小红², 李金梅¹

(1. 山西省农业科学院高粱研究所, 山西 晋中 030600; 2. 中北大学, 山西 太原 030051;

3. 山西省农业生物技术研究中心, 山西 太原 030031)

摘要:以 2 个高粱 A₂ 类型雄性不育系及相应的保持系(A₂V4/B₂V4, A₂TX622/B₂TX622), 2 个恢复系(1383_2, 晋梁 5 号)和 3 个组合(A₂V4×1383_2, A₂V4×晋梁 5 号, A₂TX622×晋梁 5 号)的 F₁, F₂ 群体为材料, 采用 SSR 标记方法, 分析 A₂ 类型雄性不育的育性恢复基因。结果发现, 只有标记 *Xtxp* 65 在 A₂TX622×晋梁 5 号的 F₂ 群体中与育性出现共分离现象, 育性恢复基因与标记间距离为 3.4 cM, 位于连锁群 J 上; 同样只有标记 *Xtxp* 141 在 A₂V4×晋梁 5 号的 F₂ 群体中与育性出现共分离现象, 该标记与育性恢复基因间的距离为 13.4 cM, 位于连锁群 G 上; 在 A₂V4×1383_2 的 F₂ 群体中, 标记与育性未出现共分离现象。这说明, 与这 2 个标记连锁的 A₂ CMS 育性恢复基因是位于同一个恢复系(晋梁 5 号)中的 2 个独立的位点; 在 A₂ 恢复系材料中, 至少有 3 个独立遗传的不同位点与 A₂ 雄性不育性的恢复有关。

关键词:高粱; CMS; A₂; SSR; 育性恢复基因

中图分类号: S514.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)04-0017-05

Study of the Locum of Fertility Restorer Gene of A₂ CMS in *Sorghum bicolor* L Meonch

ZHAO Wei-jun¹, YI Zhi-ben², SUN Yi³, LIANG Xiao-hong², LI Jin-mei¹

(1. Sorghum Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Jinzhong 030600, China;

2. North University of China, Taiyuan 030051, China;

3. Shanxi Agro-biotechnology Research Center, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In this study we investigated the locum of fertility restorer gene of A₂ cytoplasmic male sterility (CMS) in Sorghum with two cytoplasmic male sterile lines and maintainer lines (A₂V4/B₂V4, A₂TX622/B₂TX622), two restorers (1383_2, Jinliang 5) and F₁ and F₂ populations of three cross classifications (A₂V4×1383_2, A₂V4×Jinliang 5 and A₂TX622×Jinliang 5) by simple sequence repeat (SSR) technique. The results demonstrated that only one SSR marker, *Xtxt* 65 was found to link with fertility restorer gene in F₂ population of A₂TX622×Jinliang 5 and located in linkage groups (LG) J, the map distance between them was 3.4 cM; only one SSR marker, *Xtxt* 141 was found to link with fertility restorer gene in F₂ population of A₂V4×Jinliang 5 and located in LG G, the map distance between them was 13.4 cM; no SSR marker was found to link with fertility restorer gene in F₂ population of A₂V4×1383_2. This showed that the fertility restorer genes linked with these two SSR marker were located two independent loci of one restore Jinliang 5, and at least three independent loci in restorers were associated with A₂ CMS restoration.

Key words: *Sorghum bicolor* L. Meonch; CMS; A₂; SSR; Fertility restorer gene

雄性不育性的利用是高粱杂种优势利用的基础。在高粱中已发现有 7 种质核互作雄性不育类型 (A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, 9E)^[1,2]。多数研究认为, 各

种类型细胞质雄性不育育性恢复的遗传一般由 1~2 对基因控制^[1~6]。那么它们在染色体上的位置如何, 与哪些基因或标记连锁? 寻找这些标记来标定

收稿日期: 2005-11-10

基金项目: 山西省科技攻关项目 (021011)

作者简介: 赵威军 (1973-), 男, 山西阳城人, 助理研究员, 主要从事高粱遗传育种研究工作。

它们在染色体上的位置,就能更好地利用它们,如进行基因克隆、定向选择等。现代分子标记技术为基因的精细定位提供了方便。常用的分子标记定位技术有 RAPD, AFLP, RFLP, STS, SSR 等。目前已报道的对高粱细胞质雄性不育育性恢复基因进行定位研究的有 A₁ 类型的 Rf1 基因^[7]和配子体不育类型育性恢复基因 Rf4^[8]。我国已经先后有一批 A₂ 型杂交种用于生产^[9, 10],但有关 A₂ 类型细胞质雄性不育育性恢复基因的鉴定和定位方面的研究还未见报道。我们以 2 个高粱 A₂ 类型雄性不育系及相应的保持系(A₂V4/ B₂V4, A₂TX622/ B₂TX622), 2 个恢复系(1383_2, 晋梁 5 号)和 3 个组合(A₂V4× 1383_2, A₂V4× 晋梁 5 号, A₂TX622× 晋梁 5 号)的 F₁, F₂ 群体为材料,采用 SSR 标记方法,分析 A₂ 类型雄性不育的育性恢复基因。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2 个 A₂ 雄性不育系 A₂V4, A₂TX622 及相应的保

持系 B₂V4, B₂TX622, 2 个恢复系 1383_2, 晋梁 5 号, 3 个组合 A₂V4× 1383_2, A₂V4× 晋梁 5 号, A₂TX622× 晋梁 5 号的 F₁ 和 F₂ 群体。

A₂V4 是将从 ICRISAT 引进的材料 Chicklett 与从美国引进的 A₂TX428 杂交并连续回交育成的具有 A₂ 细胞质和 Chicklett 核背景的 A₂ 不育系^[9]。A₂TX622 是将从美国引进的 TX622B 的核背景导入到具有 A₂ 细胞质的 A₂TX398 中而育成。1383_2 和 晋梁 5 号为优良的中国 A₁, A₂ 类型 CMS 的恢复系。材料均种植于山西省农科院高粱研究所试验地内。

1.2 试验方法

1.2.1 育性鉴定和分离分析 3 个组合的 F₂ 群体,于抽穗后开花前单株套袋自交,收获前摘袋调查 F₂ 群体单株育性, < 1% 为不育, 1% 以上为可育^[7],统计可育与不育株分离比率。

1.2.2 雄性不育性恢复基因的 SSR 标记分析 根据已定位于 Meiz 等的连锁图^[11]上的 SSR 标记,每个连锁群上随机选取 SSR 标记 3 个,共 30 对 SSR 引物(表 1)。引物由上海生工生物工程公司合成。

表 1 SSR 引物序列

Tab 1 SSR primer sequences

引物编号 Primer No.	上游序列 Forward sequences	下游序列 Reverse sequences	退火温度 (℃) Annealing temperature	连锁群 Linkage group
Xbp6	ATC GGA TCC GTC AGA TC	TCT AGG GAG GTT GCC AT	55	I
Xbp8	ATA TGG AAG GAA GAA GCC GG	AAC ACA ACA TGC AGC CAT G	60	B
Xbp12	AGA TCT GGC GGC AAC G	AGT CAC CCA TCG ATC ATC	55	D
Xbp13	TCT TTC CCA AGG AGC CTA G	GAA GTT ATG CCA GAC ATG CIG	55	B
Xbp17	GGG ACC AAC GAC CAT TAT C	ACT CGT CTC ACT GCA ATA CIG	55	I
Xbp20	TCT CAA GGT TTG ATG GTT GG	ACC CAT TAT TGA CCG TTG AG	60	G
Xbp21	GAG CTG CCA TAG ATT TGG TGG	ACCTGG TCC CAC CTT TGT TG	60	D
Xbp32	AGA AAT TCA CCA TGC TGC AG	ACCTCA CAG GCC ATG TGG	60	A
Xbp47	CAA TGG CTT GCA CAT GTC CTA	GGT GGG AGC TAG TTA AGT GGG	55	H
Xbp51	TCT CGG ACT CAA GAG CAG AGG	GGA CAG CAG GGG CTT CAG	55	D
Xbp61	GAT GCC CAT GCC TTG C	CCC ACT AAA CTA AAG GGG ACA	55	A
Xbp63	CCA ACC GCG TCG CTG ATG	GTG GACTCT GTC GGG GCA CTG	55	B
Xbp65	CAC GTC GTC ACC AAC CAA	GTT AAA CGA AAG GGA AAT GGC	55	J
Xbp67	CTT GAC GCT GGT GGC TAC C	TCC ACA CAA GAT TCA GGC TCC	55	F
Xbp69	ACA GGC ATG GTT TGA CIG	TTG ATA ATC TGA GGC AAG TG	50	C
Xbp92	ACT TGC AGG TTA ATT TGG TCC	GGC GAG CTT GCG GTA G	50	E
Xbp123	TGG GGG AGC ATC TTA CA	TAC GTA GGC GGT TGG ATT	55	J
Xbp141	TGT ATG GCC TAG CTT ATC T	CAA CAA GCC AAC CTA AA	55	G
Xbp145	GTT GCT CCT GCC ATT ACT	CTT GGG CAC ATC CAC	55	I
Xbp159	ACC CAA AGC CCA AAT CAG	GGG GGA GAA ACG GTG AG	55	E
Xbp188	AAG TTG TAA TGG GGC TAT TG	TTA AGA GGT GGG ATA TTG GT	55	C
Xbp205	CTT GGC GTG TCT TCC	TAT ATG CAT GCC GTA GAT TT	55	C
Xbp228	ACA GGT TGG CGA TGT TTCTCT	TTCTTTTTC GAA TTA ATT GCT TTT	55	C
Xbp250	GCA CAT CCT CTA AAA CTA CTT AGT	GAA CAG GAC GAT GTG ATA GAT	50	H
Xbp273	GTA CCC ATT TAA ATT GTT TCC AGT	CAG AGG AGG AGG AAG AGA AGG	55	H
Xbp296	CAG AAA TAA CAT ATA ATG ATG GGG TGA A	ATG CTG TTA TGA TTT AGA GGC TGT AGA GTT	55	B
Xbp312	CAG GAA AAT ACG ATC GGT GCC AAG T	GTG AACTAT TCG GAA GAA GTT TGG AGG AAA	55	E
Xbp325	GGG GCG ACT CTT TGT AAA ACA TA	ATC GTG TCA CTA TCT ACA TCT AAA	55	A
Xbp339	CCG CAC TCT CCA CTC T	CGG AAC ACA GGG AAG T	55	F
Xbp358	CAA GGA CAA GAT TCA TTT TAA GGG	TCA CAC CTC ACA AAA TAA AAG TGC	55	F

亲本、F₁ 及 F₂ 群体同时于 4 月底播种于山西省农科院高粱研究所试验地, 出苗后 42 d 取样, 每株取上部叶片 3 g 左右, F₂ 群体每群体随机取样 150 株, 叶片用蒸馏水洗净, 放入- 40℃冰箱备用。

总 DNA 制备采用 PEX(乙基磺原酸钾, Potassium ethyl xanthogenate) 法。具体操作步骤如下:

- (1) 样本叶片放入经液态氮预冷的研钵中, 加液氮研磨后, 收集到 2.0 mL 的 Ependoff 管中。
- (2) 加入 800 mL PEX 提取缓冲液(PEX 12.5 mmol/L; Tris·Cl 100 mmol/L, pH 8.0; NaCl 700 mmol/L; EDTA 10 mmol/L, pH 8.0), 充分混匀后, 样品放入 65℃水浴锅中加热 1 h, 每 15 min 混匀一次。避免剧烈搅动。
- (3) 从水浴锅中取出, 13 000 r/min 室温离心 5 min。
- (4) 取上清液于新的 Ependoff 管中, 13 000 r/min 室温离心 5 min。
- (5) 上清液转移到新的 Ependoff 管中, 加入 1/10 体积醋酸钠(pH 5.2) 和 1 倍体积的异丙醇, 轻轻混匀后, 置- 20℃下 1 h, 沉淀 DNA。
- (6) 取出样品, 13 000 r/min 室温离心 15 min, 弃上清液。
- (7) 用 70% 酒精洗沉淀(DNA) 2 次。
- (8) 室温干燥或真空干燥 DNA。
- (9) 加适量 1 倍体积的 TE(10 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解 DNA。可 65℃助溶 15 min。
- (10) 13 000 r/min 离心 8 min, 吸出含有 DNA 的上清液, 底部不溶物为杂质。
- (11) 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, PDS-800 胶成像系统(UVP) 检测 DNA 质量。
- (12) 紫外分光光度计(Ependoff Biophotometer) 测定 DNA 样品的浓度及 260/280 比值, 根据需要把 DNA 稀释到所需浓度, 置 4℃备用。

PCR 反应在 10 μL 体系中进行, 每个反应体系含

20 ng 模板 DNA, 1×PCR buffer, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.25 μmol/L SSR 引物, 100 μmol/L dNTP, 0.4 个单位 Taq DNA 聚合酶(北京鼎国)。PCR 扩增在 PTC- 100 热循环仪上进行。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5 min, 接着 94℃变性 1 min, 55℃(或 60℃) 退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 34 个循环, 最后 72℃延伸 5 min。

扩增后的样品加 6 μL Loading Buffer (98% 甲酰胺; 10 mmol/L EDTA, pH 8.0; 0.25% 溴酚蓝和 0.25% 二甲苯菁), 于 95℃变性 5 min, 置于冰水中。

样品在 6% 聚丙烯酰胺凝胶(含 7 mol/L 尿素) 中电泳分离(PAGE), 每样品上样 5 μL, 1×TBE, 80 W 恒功率电泳 1 h 左右至第一道指示剂至胶板前沿为止。对电泳胶按田清震的银染、显影方法^[12] 进行处理后, 对带型进行统计分析, 计算重组率, 采用 Kosambi 函数将重组率转换成图距单位(cM)。

2 结果与分析

2.1 3 个组合 F₂ 群体的育性分离及遗传分析

3 个组合(A₂V4×1383_2, A₂V4×晋梁 5 号, A₂TX622×晋梁 5 号) 的 F₂ 群体中, 可育株、不育株分离比经卡方适应性检验, 都符合 3:1 的分离比, 表明 A₂ 雄性不育育性恢复基因在这 3 个组合中都表现为 1 对基因的分离, 符合孟德尔分离规律(表 2)。

2.2 A₂ 类型雄性不育育性恢复基因的 SSR 标记分析

首先用 30 对 SSR 引物对 3 个组合 F₂ 群体进行标记与育性共分离分析, 每个群体可育与不育单株各选 20 单株, 混池, BSA 法初筛与育性共分离的标记。在 A₂TX622×晋梁 5 号 F₂ 群体的 BSA 分析中, 发现标记 *Xtxp* 65 与育性出现共分离现象。然后进行单株的 *Xtxp* 65 引物分析, 发现在 147 个单株中纯合显性株、杂合株和纯合隐性株分别为 36, 72, 39 个(图 1), 符合 1:2:1 的分离比, 为 1 对基因的分离。同时发现有 5 个单株出现交换, 经计算得出标记与恢复基因间遗传距离为 3.4 cM, 位于连锁群 J 上(图 2)。

表 2 A₂ 杂交组合 F₂ 群体育性分离比和卡方测验

Tab 2 Segregation ratio and χ^2 test in F ₂ populations of A ₂ CMS hybrids					
组 合 Cross classification	调 查 株 数 Number of plants investigated		可育株与不育株比率 Ratio of fertile plants to sterile plants		
	可育株 Fertile	不育株 Sterile	实际值 Actual	理论值 Theoretical	χ^2 值 χ^2 value
A ₂ V4×1383_2	154	47	3.28 1	3 1	0.052 5
A ₂ V4×晋梁 5 号	154	59	2.61 1	3 1	0.155 2
A ₂ V4×Jinliang 5 A ₂ Tx662×晋梁 5 号	130	43	3.02 1	3 1	0.000 4
A ₂ Tx622×Jinliang 5					

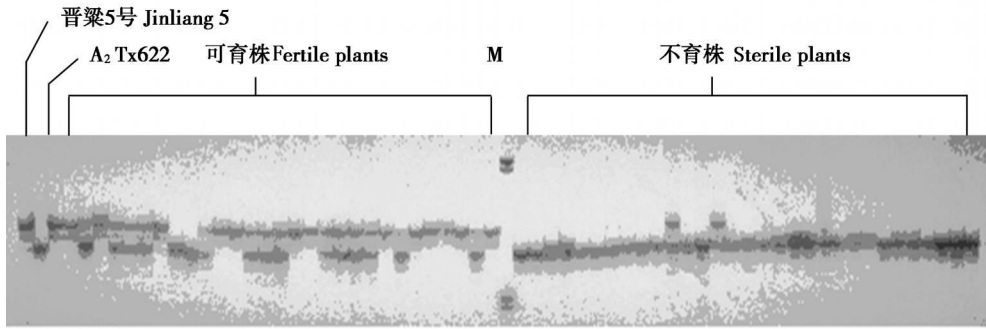
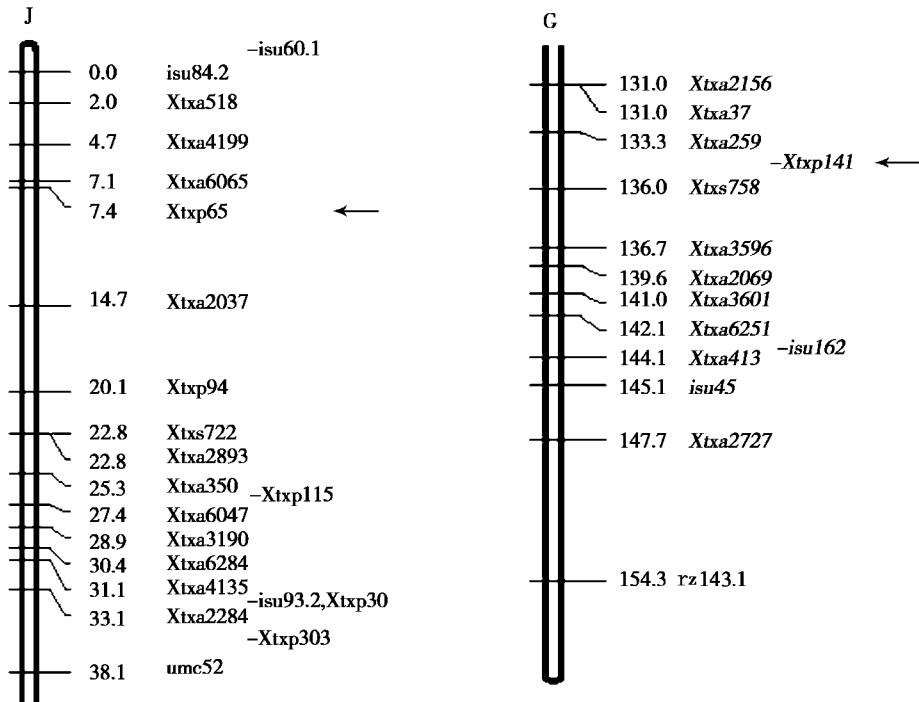


图 1 $A_2Tx622 \times$ 晋梁 5 F_2 群体 SSR 标记 $Xtxp65$ 与育性共分离

Fig 1 Cosegregation of marker $Xtxp65$ with fertility in $A_2Tx622 \times$ Jinliang 5 F_2 population



J, G 分别表示连锁群 J 和 G 的一部分, 箭头分别表示 $A_2Tx622 \times$ 晋梁 5 号和 $A_2V4 \times$ 晋梁 5 号 F_2 群体与育性共分离的标记 $Xtxp65$ 和 $Xtxp141$ 在连锁群上的位置

J, G show part of the LG J and LG G. Arrowheads denote the marker locations, $Xtxp65$ and $Xtxp141$, which were cosegregated with fertility in two sorghum F_2 populations, $A_2Tx622 \times$ Jinliang 5 and $A_2V4 \times$ Jinliang 5, respectively

图 2 标记 $Xtxp65$, $Xtxp141$ 在连锁群上的位置

Fig 2 Location of markers $Xtxp65$ and $Xtxp141$ in linkage groups (LG)

在 $A_2V4 \times$ 晋梁 5 号 F_2 群体的 BSA 分析中, 发现 $Xtxp141$ 标记与育性共分离, 137 个单株中, 纯合显性株和杂合体与纯合不育株比为 100: 37, 为 3: 1 分离, 呈 1 对基因控制的孟德尔遗传分离, 标记与恢复基因间遗传距离为 13.4 cM, 位于连锁群 G 上(图 2)。

在 $A_2V4 \times 1383_2$ 的 F_2 群体中, 未发现标记与育性共分离现象。

3 讨论

张福耀等研究证明, $A_2V4 \times$ 忻梁 7 号的 F_2 群体

可育与不育株分离比为 3: 1, 而另一个组合 $A_2V4 \times$ HM65 的 F_2 群体可育与不育株分离比为 15: 1, 前者表现为 1 对基因作用的显性遗传, 后者则为 2 对基因作用^[3, 4]。陈悦等用 A_2TX398 , A_2TX616 , A_2TX631 , A_2TX378 和不同的 A_2 恢复系杂交, 配制了 11 个杂交组合, 对 F_2 群体育性分离调查, 可育株与不育株分离比率符合 1 对基因控制的显性遗传^[5]。侯荷亭等对 $A_2TX398 \times$ 忻梁 52, $A_2TX398 \times$ 三尺三的 F_2 群体育性分离分析, 也证明 A_2 胞质雄性不育性的恢复是 1 对显性基因的作用^[6]。在本试验中, 我们对 3

个 A₂ 杂交组合 A₂V4 × 1383, A₂V4 × 晋梁 5 号, A₂Tx622 × 晋梁 5 号的 F₂ 群体的育性分离调查结果分析发现, 3 个组合可育与不育株分离比均为 3: 1, 说明 3 个组合中恢复系 1383, 晋梁 5 号对 A₂ 胞质不育的恢复均为 1 对显性基因作用的结果(表 2)。

质核互作雄性不育是由细胞质和细胞核基因共同作用的结果。通过本研究及张福耀、陈悦、侯荷亭等的研究成果推断^[3~6], A₂ 类型 CMS 恢复系的细胞核基因组上, 存在多个独立遗传的育性恢复位点, 在有些恢复系中, 需要 2 个位点的互作, 而在另一些恢复系中, 只要有 1 个显性位点存在, 就能与细胞质基因组互作, 使育性得到恢复。

从本试验结果推断, 与这 2 个标记连锁的 A₂ 胞质育性恢复基因是位于同一个恢复系(晋梁 5 号)中的 2 个独立的位点; 在 A₂ 恢复系材料中, 至少有 3 个独立遗传的不同位点与 A₂ 雄性不育性的恢复有关。

用定位于 10 个高粱连锁群上的 30 对 SSR 引物^[11], 对 3 个 A₂ 杂交种 F₂ 分离群体和亲本进行育性共分离扩增分析, 在 A₂V4 × 1383_2 的 F₂ 群体中, 未发现标记与育性共分离现象; 而在另 2 个 F₂ 群体中, 都只发现 1 个标记与育性出现共分离现象。由于所用的引物有限, 不能确定恢复基因位点与其他标记相对位置, 也不能确定恢复基因在连锁群上的准确位点, 在这方面还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 卢庆善. 高粱学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 卢庆善, 孙 毅, 华泽田. 农作物杂种优势[M]. 北京:

中国农业科技出版社, 2002.

- [3] 张福耀, 闫喜梅, 孟春刚, 等. 高粱 A₁, A₂ 质核互作雄性不育类型核质育性基因的遗传研究[A]. 全国高粱学术研讨会论文选编[C]. 沈阳, 1996: 55– 59.
- [4] 张福耀, 牛天堂, 韦耀明, 等. 高粱非迈罗细胞质 A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, 9E 雄性不育系研究[J]. 山西农业科学, 1996, 24(3): 3– 6.
- [5] 陈 悦, 曹嘉颖, 孙贵荒. 高粱不同雄性不育细胞质育性反应及育性恢复基因遗传规律[J]. 杂粮作物, 1998, 18(4): 9– 12.
- [6] 侯荷亭, 侯丽娟, 仪治本, 等. 高粱新胞质雄性不育及三系配套的研究[J]. 华北农学报, 2001, 16(2): 16– 19.
- [7] Klein R R, Klein P E, Chhabra A K, *et al.* Molecular mapping of the *pf1* gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 1206– 1212.
- [8] Wen L, Tang H V, Chen W, *et al.* Development and mapping of AFLP markers linked to the sorghum fertility restorer gene *pf4* [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 577– 585.
- [9] 李团银, 张福耀, 李三棉, 等. 高粱新型细胞质雄性不育系 A₂V4A 选育及其应用研究[A]. 全国高粱学术研讨会会议论文选编[C]. 沈阳, 1996: 60– 64.
- [10] 刘自华, 贺际春, 张东远. 异质高粱雄性不育国内研究与应用综述[J]. 作物品种资源, 1997, (3): 22– 24.
- [11] Menz M A, Klein R R, Mullet J E, *et al.* A high density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP, and SSR markers[J]. Plant Mol Bio, 2002, 48: 483– 499.
- [12] 田清震. 中国小麦部分核心种质遗传多样性分析及小麦抗白粉病分子标记辅助选择研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2002.