

玉米 CMS-C 型雄性不育系 C543 恢复基因的初定位

刘伟华^a, 罗红兵^{a,b*}, 邱博^a

(湖南农业大学 a.农学院; b.南方粮油作物协同创新中心, 湖南 长沙 410128)

摘要:以玉米恢复系 614、B137 分别与 CMS-C 型雄性不育系 C543 组配的 F₂ 代(614 群体和 B317 群体)为试材, 进行花粉育性鉴定和遗传分析。花粉育性镜检发现, C543 花药内没有花粉, 属于无花粉型雄性不育; 遗传分析表明, C543 的不育性状由 1 对隐性核基因控制, 恢复系 614 和 B137 各有 1 对核恢复基因; SSR 标记连锁分析结果将恢复基因定位在玉米 8 号染色体短臂上, 位于标记 umc1483 附近, 两者距离约 16.9 cM。

关键词: 玉米; 雄性不育系; 质核互作; 连锁分析; 基因定位

中图分类号: S513; Q78 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2016)01-0016-04

Primary mapping of restoring gene for CMS-C cytoplasmic male sterility line C543 in maize

Liu Weihua^a, Luo Hongbing^{a,b*}, Qiu Bo^a

(a. College of Agronomy; b. Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Two F₂ generations, which from the hybridizations of C543×614 and C543×B137, were used as experiment materials to analyze the pollen fertility and inheritance. The results showed that C543 was pollen-free male sterility, which was controlled by a pair of recessive nuclear genes, and there was a restoring gene in restorer 614 and B137, respectively. With the analyzing of SSR, the restoring gene of B137 was mapped on short arm of chromosome 8 and 16.9 cM from the marker umc1483.

Keywords: maize; male sterility line; cytoplasm-nuclear interaction; linkage analysis; gene mapping

雄性不育是玉米杂种优势利用的重要途径, 尤其是细胞质雄性不育对实现玉米“三系”配套杂种的生产具有重要意义。根据育性恢复专效理论, 玉米细胞质雄性不育可分为 C 型、T 型和 S 型^[1]。随着分子标记技术的发展, 对玉米细胞质雄性不育的遗传基础和恢复基因定位进行了大量研究。Khey-pour 等^[2]认为玉米 CMS-C 型细胞质雄性不育是由 1 对显性恢复基因控制; 陈伟程等^[3]研究认为 CMS-C 型细胞质雄性不育由 2 对重叠基因控制, 而陈绍江等^[4]认为玉米 CMS-C 型细胞质雄性不育的恢复基因由 3 对甚至更多的显性互补基因控制。

Wise 等^[5]运用 RFLP 分子标记将 *Rf1* 定位在玉米 3 号染色体的标记 umc97 与 umc92 之间, 将 *Rf2* 定位在 9 号染色体的标记 umc153 与 sus1 之间。王泽立等^[6]运用分子标记将玉米 CMS-S 型恢复基因 *Rf3* 定位在 2 号染色体上, 与标记 RR6 距离约为 2.0 cM。李鹏等^[7]利用 BC₁F₁ 群体进行连锁分析, 将 *Rf3* 精细定位在 2 号染色体长臂的标记 A81 和 A134 之间, 两者相距 *Rf3* 分别为 1.3 和 1.1 cM。恢复基因 *Rf4* 和 *Rf5* 分别被定位在 8 号染色体的短臂上和 5 号染色体的长臂上, 且两者具有叠加效应^[8]。汤继华等^[9]利用不育系 Cms237 和恢复系 A619 构建定位群体,

收稿日期: 2015-09-08

修回日期: 2015-12-18

基金项目: “十二·五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD35B01); 湖南省科技计划项目(2013TP4096); 长沙市科技计划项目(K1406002-61)

作者简介: 刘伟华(1990—), 男, 福建南平人, 硕士研究生, lwillhall@163.com; *通信作者, 罗红兵, 教授, 主要从事玉米种质创新的新技术及应用研究, hb1uo48@sohu.com

将 *Rf4* 定位在 8 号染色体短臂上, 位于标记 bnlg2307 附近。利用分子标记定位育性恢复基因, 对深入研究细胞质雄性不育的育性恢复机理具有重要意义。笔者对不育系 C543 的不育特征和遗传特征进行分析, 并利用分子标记对育性恢复基因进行初步定位研究, 以期为将来的基因克隆、功能机理研究和雄性不育的利用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2013 年春季, 以 CMS-C 型雄性不育系 C543 为母本、自交系 614 为父本进行杂交, 得到 F_1 。夏季种植 F_1 , 套袋自交得到 F_2 (614 群体)。2013 年夏季种植亲本 C543 和 B137, 于开花散粉期进行杂交, 得到 F_1 ; 2014 年春季种植 F_1 , 并套袋自交得到 F_2 (B137 群体)。本研究所用材料为 614 群体和 B137 群体。

1.2 方 法

1.2.1 花粉育性鉴定

在玉米 F_2 群体开花散粉期, 取群体单株未开放的小穗于冰盒中, 带回实验室。采用花粉碘染法, 于显微镜下观察花粉育性情况。

1.2.2 遗传分析

在 F_2 群体开花散粉期, 对其进行育性考察并统计, 进行 χ^2 检验, 并取 B137 群体的不育单株的叶片提取 DNA 用于连锁分析。

1.3 叶片 DNA 的提取

采用改进的 SDS 法提取叶片 DNA: 取适当新鲜幼嫩玉米叶片于 2 mL 离心管中, 加液氮, 迅速用电钻磨碎, 再加入 750 μ L Buffer A, 颠倒混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 45 min, 其间轻摇几次, 取出离心管, 放置几分钟, 依次加入氯仿和异戊醇各 350 μ L, 上下颠倒, 轻摇 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液转入 2 mL 灭菌离心管中, 加入等体积的异丙醇, 颠倒摇匀, 得 DNA 白色絮状沉淀, 用玻璃棒挑出 DNA 于 1.5 mL 灭菌离心管中, 用 70%乙醇洗 3 次,

无水乙醇冲洗 1 次, 于超净工作台上风干, 加适量 TE 溶解, 并置于 -20 $^{\circ}$ C 下保存, 备用。

1.4 PCR 反应体系及程序

PCR 扩增采用 10 μ L 反应体系, 包括 1 μ L 模板 DNA, 0.6 μ L 引物(F/R), 3.4 μ L Mix(内含 dNTP、*Taq* 酶、Buffer 等, 北京康为世纪公司提供), 5 μ L ddH₂O。

扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。之后于 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。PCR 扩增产物用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行银染, 显影观察统计并拍照。

1.5 多态性标记的筛选

首先利用 271 对 Indel 标记(由中国农业大学金危危老师提供), 筛选出 52 对在亲本间具有多态性的标记。但该类型的多态性标记分布不均, 未完全覆盖所有染色体两条臂, 因此, 利用已有的 SSR 标记进行适当补充, 共筛选出 43 对在亲本间具有多态性的 SSR 标记。

1.6 电泳条带统计与重组率计算

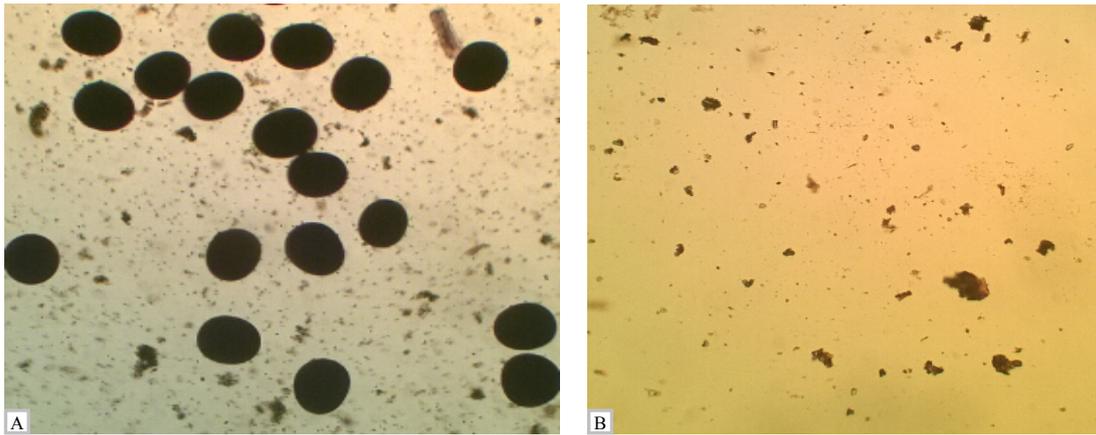
根据显影观察结果, 将不育突变体基因型标记为 1, 恢复系基因型标记为 2, 杂合基因型标记为 3。

重组率=重组数/(个体总数 \times 2)。将 1%的重组率换算成 1 cM, 计算标记与目的基因的遗传距离。

2 结果与分析

2.1 雄性不育系 C543 的花粉育性鉴定结果

在 F_2 群体开花散粉期, 对 C543 不育株和可育株雄穗中部未开放小穗的花药进行碘-碘化钾染色, 镜检结果见图 1。从图 1 可知, 可育株的花粉碘染后呈现出蓝黑色(图 1-A), 且花粉粒形状规则, 这表明该类型植株的花粉育性正常, 能够正常受精结实, 而不育株的花药内没有观察到花粉粒, 无法进行碘-碘化钾染色(图 1-B), 这说明不育株的花药在发育过程中出现了异常, 无法形成正常可育的花粉粒, 最终导致败育。



A 可育株; B 不育株。

图 1 C543 可育株和不育株的花粉碘染镜检结果

Fig. 1 Result of I₂-KI solution-stained pollen for fertile and sterile individuals

2.2 雄性不育系 C543 的遗传分析

对 614 群体和 B137 群体进行田间育性观察和统计分析结果(表 1)表明, 2 个群体中不育单株数与可育单株数的比例分别为 3.489 : 1 和 3.222 : 1, 经

χ^2 检验, 符合 3 : 1 的理论分离比, 说明 C543 的不育性状是由 1 对隐性核基因控制的, 在恢复系中有对应的显性育性恢复基因。

表 1 F₂ 群体中可育株与不育株的分离比例

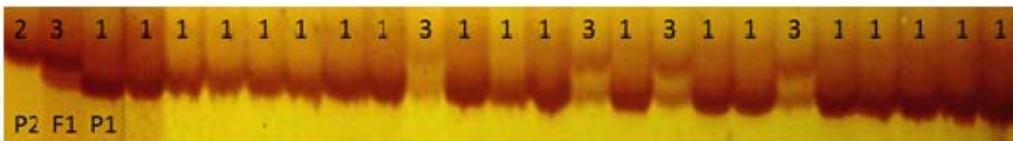
组合	总株数	可育株数	不育株数	可育株与不育株比例	χ^2 值
C543×614	615	478	137	3.489 : 1	2.22
C543×B137	608	464	144	3.222 : 1	0.49

当 $df=1$ 时, 在 0.05 水平上的 χ^2 临界值为 3.84。

2.3 雄性不育系 C543 育性恢复基因的连锁分析

利用筛选出的 43 对 SSR 标记对 C543 的 34 个不育单株进行基因分型, 发现 8 号染色体短臂上的标记 umc1483 扩增产物条带出现偏分离现象, 且有少数交换带型, 而其他 SSR 多态性标记的扩增结果也是不育带型、可育带型和杂合带型随机分离, 因此, 可以初步确定标记 umc1483 与目的基因连锁(图 2)。利用 umc1483 对 B137 群体中的 65 个不育单株

进行基因分型, 经统计, 有 42 条带为不育亲本带型, 有 18 条带为杂合带型, 只有 4 条带为可育亲本带型, 这说明 F₁ 在形成配子时, 同源染色体非姐妹染色单体片段间发生交换, 且单交换多于双交换。65 个单株中得到 22 株重组单株, 重组率为 16.9%, 目的基因与 umc1483 的相对遗传距离约为 16.9 cM。



1 C543 ; 2 B137 ; 3 F₁。

图 2 标记 umc1483 在亲本间与部分 F₂ 群体不育单株中的扩增结果

Fig. 2 Result of DNA amplified by marker umc1483 between parents and some F₂ individuals

3 结论与讨论

本研究结果表明, 雄性不育系 C543 花药内无花粉存在, 败育彻底; 614 群体和 B137 群体中不育

株和可育株的分离比及卡方检验的结果证实 C543 的不育性是由 1 对隐性基因控制的, 相应的恢复系中有显性恢复基因存在, 使育性得以恢复。

亲本间多态性标记的多少, 标记的分布均匀度

及标记质量的高低都会对后期的连锁分析产生一定影响。本试验利用 Indel 标记在亲本间进行多态性筛选时,一共筛选到 52 对多态性标记,但标记分布不均匀且部分标记多态性不好,在连锁分析中也并未发现有偏分离的标记,可能是由于标记距离目的区域较远。利用 SSR 多态性标记进行连锁分析时,发现 8 号染色体短臂上的标记 umc1483 在群体不育株扩增时出现偏分离现象,初步判断其与目的基因存在连锁。汤继华等^[9]也将一个玉米 C 型胞质不育的恢复基因 *Rf4* 初步定位在 8 号染色体的短臂上,但不知道其连锁标记 bnlg2307 位置是否与 umc1483 接近,两者是否为同一位点。而段柳静^[10]在 8 号染色体 8.00–8.01 Bin 区对恢复基因 *Rf4* 进行定位的位置与本研究中定位的连锁标记 umc1483 比较接近。通过对恢复基因进行 SSR 标记的定位分析,经重组率换算可知目的基因与 umc1483 的遗传距离较大,约为 16.9 cM,这可能是由于群体数量少的原因造成的,也可能是由于连锁标记距离目的基因的实际物理距离还较远。本研究只找到与目的基因连锁的单侧标记,且遗传距离较大,未来的工作要加大群体数量,继续对 umc1483 附近进行标记开发或使用新型标记。

本试验的分子生物学实验部分在中国农业大学金危危老师帮助下完成,对金危危老师的指导与帮助表示真心感谢!

参考文献:

[1] 李小琴,刘纪麟,万邦惠,等.玉米 CMS 育性恢复

专效性分类系统的研究[J].华中农业大学学报,1999(3):1–4.

- [2] Kheyr-Pour A, Gracen V E, Everett H L. Genetics of fertility restoration in the C-group of cytoplasmic male sterility in maize[J]. Genetics, 1981, 98: 379–388.
- [3] 陈伟程,罗福和,季良越.玉米 C 型胞质雄性不育的遗传及其在生产上的应用[J].作物学报,1979,5(4):21–28.
- [4] 陈绍江,陈伟程.玉米 C 型胞质雄性不育恢复基因的定位研究[J].河南农业大学学报,1989,23(3):201–208.
- [5] Wise R P, Schnable P S. Mapping complementary genes in maize: positioning the *rf1* and *rf2* nuclear-fertility restorer loci of Texas (T) cytoplasm relative to RFLP and visible markers [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(6/7): 785–795.
- [6] 王泽立,王鲁昕,戴景瑞,等.运用近等基因系(NIL)、AFLP、RFLP 和 SCAR 标记对玉米 S 组育性恢复基因(*Rf3*)的研究[J].遗传学报,2001,28(5):465–470.
- [7] 李鹏,肖森林,王淑霞,等.玉米 S 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf3* 的精细定位及其候选基因预测[J].山东农业科学,2014,46(8):1–5.
- [8] 丁安明,李凤霞,陈夏晔,等.植物细胞质雄性不育恢复基因的定位和克隆研究进展[J].分子植物育种,2014,12(3):618–628.
- [9] 汤继华,胡彦民,季洪强,等.玉米 C 型 Cms 育性恢复基因 *Rf4* 的 SSR 标记[J].河南农业大学学报,2001,35(1):1–3.
- [10] 段柳静.玉米 C 型胞质雄性不育育性恢复主基因 *Rf4* 的精细定位[D].郑州:河南农业大学,2009.

责任编辑:尹小红

英文编辑:梁和