

与白菜雄性不育基因 M_s 连锁的SCAR标记

刘志勇, 冯 辉*, 李承戡, 魏 鹏, 王丽丽

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866)

摘 要: 用基因型为 M_sM_s 的大白菜雄性不育两用系‘AB01’的不育植株, 与基因型为 $msms$ 的双单倍体可育品系‘FH-1’杂交, 构建 BC_1 群体。采用BSA法, 在不育池和可育池之间筛选 512 对AFLP引物组合, 获得了与不育基因连锁的 3 个AFLP 标记, 并将其转化成SCAR标记syau_scr02、syau_scr03 和 syau_scr05。3 个SCAR标记位于不育基因 M_s 的同一侧, 与 M_s 的遗传距离分别为 1.60、1.60 和 2.50 cM。多态性检验表明, 3 个SCAR标记在‘AB01’和 12 个 $msms$ 基因型的自交系之间具有良好的多态性。

关键词: 大白菜; 核基因雄性不育; AFLP; SCAR

中图分类号: S 634.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 05-0757-06

SCAR Markers Linked to M_s , a Genetic Male Sterile Gene in Chinese Cabbage

LIU Zhi-yong, FENG Hui*, LI Cheng-yu, WEI Peng, and WANG Li-li

(Department of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: To identify molecular markers tightly linked to the male sterility gene M_s in Chinese cabbage, a BC_1 population was developed from the cross between male sterile plants (M_sM_s) and fertile double haploid line ‘FH-1’ ($msms$). AFLP primers were screened for polymorphisms between the parents and two bulks representing fertile and sterile plants. Out of 512 primer combinations, 3 combinations gave polymorphic amplification patterns. These polymorphic amplicons were cloned and successfully converted to dominant SCAR markers, designated syau_scr02, syau_scr03 and syau_scr05. All the SCAR markers are located on one side of the M_s locus with a map distance ranging from 1.60 to 2.50 cM. These SCAR markers show high polymorphism between ‘AB01’ and 12 fertile inbred lines.

Key words: *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson; genetic male sterility; AFLP; SCAR

大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson) 具有显著的杂种优势, 雄性不育系的利用是配制其杂交种的理想途径。由单基因控制的隐性或显性不育性, 采用测交法只能获得不育株率稳定在 50%左右的“两用系”。用“两用系”配制杂交种, 必须在开花前拔除可育株, 从而增加了制种成本, 大面积制种杂种纯度也难以保证。Feng 等 (1995, 1996) 发现的大白菜核不育复等位基因雄性不育材料, 具有雄蕊退化彻底、不育性遗传稳定等突出优点, 且可以配成具有 100%

收稿日期: 2010 - 03 - 31; 修回日期: 2010 - 05 - 04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671414); 国家‘863’项目 (2006AA10Z170); 国家博士后科学基金项目 (200902551, 20080441101)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fenghuiaaa@263.net)

不育株率的雄性不育系,成为近年来大白菜雄性不育研究的热点。目前已有多家育种单位用其转育成不育系应用于杂交种子生产(岳艳玲和冯辉,2005;冯辉等,2007;李承戡,2009;辛彬等,2009)。在该类不育系转育过程中,每个世代都要测交鉴定中间转育材料的基因型,不但工作量大,也影响了转育进程。利用分子标记进行辅助选择,可以说是解决这一问题的有效途径。

大白菜雄性不育分子标记已见报道。沈向群和杨文骏(2004)筛选到1个与恢复基因 M_s 连锁的RAPD标记。张淑江等(2008)筛选到1个与显性核不育基因连锁的RAPD标记,并转化成SCAR标记,连锁距离为2.60 cM。冯辉等(2009)筛选到2个位于不育基因 M_s 同一侧的SSR标记,遗传距离分别为4.95和7.92 cM。袁鹤等(2009)利用初级三体将1个大白菜雄性不育基因定位于4号染色体的近着丝粒区域,并获得了1个与不育基因遗传距离为1.2 cM的AFLP标记。本研究旨在筛选与 M_s 基因紧密连锁的SCAR标记,用于不育系转育中的辅助选择,并为图位克隆 M_s 基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 群体的构建及其DNA提取

亲本为沈阳农业大学选育的大白菜复等位基因型雄性不育两用系‘AB01’,以及通过游离小孢子培养获得的双单倍体可育品系‘FH-1’。2008年春季,用‘AB01’的不育株与‘FH-1’杂交,获得 F_1 ($M_s M_s \times msms \rightarrow Msms$)。同年秋季,再用‘FH-1’与 F_1 回交,构建分离群体($Msms \times msms \rightarrow Msms, msms$)。所有试材均定植于沈阳农业大学蔬菜育种基地。

引物由美国Invitrogen公司合成;dNTP、*Taq*酶、DNA分子量标准、凝胶回收试剂盒购自天根公司产品;限制性内切酶购自NEB公司;T载体、*T4*连接酶购自Promega公司;大肠杆菌TOP10为辽宁省十字花科蔬菜遗传育种重点实验室保存。

利用改良CTAB法提取亲本和分离群体单株叶片总DNA,调整浓度到 $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Williamson et al., 1994)。根据育性调查结果,随机选取 BC_1 群体中20个可育单株和20个不育单株,分别吸取等量DNA构建不育池和可育池(Michelmore et al., 1991)。

1.2 AFLP分析

AFLP操作参照Vos等(1995)方法。限制性内切酶为*EcoR* I和*Mse* I,预扩增引物不加选择性碱基,分别为E00(5'-GACTGCGTACCAATTCA-3')和M00(5'-GATGAGTCCT2GAGTAA-3');选择性扩增引物分别为E00+MN和M00+NNN(M代表碱基A/C,N为任意碱基)。选择性扩增产物经5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染法显示条带(Sanguinetti et al., 1994)。对于在2个亲本和2个样品池之间均有多态性的AFLP片段,利用建池群体检验标记的多态性。

1.3 SCAR标记的转化和连锁分析

切取多态性条带,放入1.5 mL离心管中,加入100 μL 超纯水,室温下放置24 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,10 000 $\times g$ 离心5 min;取5 μL 上清液做模板,采用选择性扩增体系和程序扩增目的条带。PCR产物经凝胶回收后,连接T载体,转化Top10感受态细胞,蓝白斑筛选后送交北京华大公司测序。根据测序结果,利用Primer Premier 5.0设计SCAR引物,以 BC_1 分离群体DNA为模板,进行PCR扩增。扩增程序为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s,30次循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。利用2.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物多态性。利用Mapmaker/EXP3.0软件分析SCAR标记与 M_s 基因的连锁关系,采用Kosambi函数将重组率转化为遗传图距(cM)(Kosambi, 1944; Lander et al., 1987)。

1.4 SCAR标记多态性分析

将‘AB01’的可育株 $MsMs^f$ 自交, 从后代中鉴定出纯合恢复基因型植株(Ms^fMs^f)。检测转化的SCAR标记在 Ms^fMs^f 、 $MsMs$ 和 12 个 $msms$ 基因型可育品系之间的多态性。PCR程序同于SCAR标记扩增, 用 2.0 %琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物多态性。

2 结果与分析

2.1 双单倍体可育品系‘FH-1’基因型的鉴定

根据“大白菜核基因雄性不育复等位基因遗传假说”(Feng et al., 1996), 可育品系在不育基因位点上的基因型有 3 种: Ms^fMs^f , $msms$ 和 Ms^fms 。这 3 种基因型可以通过它们与两用品不育株 $MsMs$ 杂交后代的育性分离比率加以鉴别。

以‘AB01’不育株($MsMs$)为母本, 与可育品系‘FH-1’杂交, 获得的 98 株 F_1 全部为雄性不育, 证明‘FH-1’的基因型为 $msms$ 。在(‘AB01-1’ \times ‘FH-1’) \times ‘FH-1’回交群体中, 128 株可育, 120 株不育, 卡平方检测($\chi^2 = 0.258$, $\chi^2_{0.05,1} = 3.841$)符合 1:1 比例。

2.2 与不育基因 Ms 连锁的AFLP标记筛选

利用 512 对 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物组合进行选择扩增, 平均每对引物组合扩增出 30~50 条清晰的条带, 长度在 20~700 bp 之间。其中, 引物组合 E12M93 在母本和不育池中扩增出 1 条长约 260 bp 的谱带, 而此谱带在可育池和可育亲本中不存在。利用建池单株重复扩增, 得到一致结果, 将此差异条带命名为 E12M93-1。引物组合 E12M45 和 E11M44 在不育池和可育池之间分别存在长度约为 230 bp 和 250 bp 的差异条带, 用建池群体验证, 这 2 个 AFLP 差异条带均为阳性, 分别命名为 E12M45-1 和 E11M44-1 (图 1)。

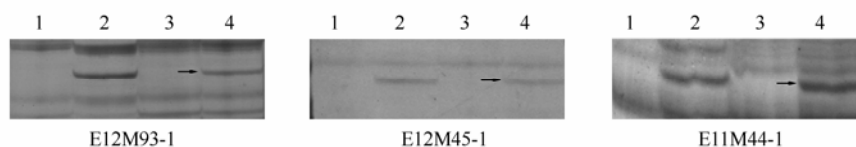


图 1 通过 BSA 法筛选出的与大白菜 *Ms* 基因连锁的 AFLP 标记

1: 父本; 2: 母本; 3: 可育池; 4: 不育池。

Fig. 1 AFLP markers linked to *Ms* gene in Chinese cabbage through BSA strategy

1: Female parent; 2: Male parent; 3: Fertile bulk; 4: Sterile bulk.

2.3 SCAR标记的转化

将以上 3 个AFLP差异条带回收测序, 根据测序结果, 分别在AFLP引物内侧设计SCAR引物(表 1)。电泳分析结果表明, 3 个AFLP标记均被成功地转化成SCAR标记, 扩增片段大小与预期一致, 分别命名为syau_scr02、syau_scr03 和syau_scr05 (图 2)。利用含有 248 个单株的 BC_1 分离群体, 检验 3 个SCAR标记与不育基因 Ms 的连锁关系。在可育群体中, 3 个SCAR标记均无扩增产物。syau_scr02 和syau_scr03 在不育群体中均出现 4 个重组单株, 且重组单株相同, 表明这两个标记来自同一位点; syau_scr05 在不育群体中出现 8 个重组单株, 其中 4 株与syau_scr02 和syau_scr03 相同, 表明这 3 个SCAR标记位于 Ms 基因的同一侧。连锁分析表明, syau_scr02、syau_scr03 和syau_scr05 与 Ms 基因的重组率分别为 1.61%、1.61%和 3.22%, 相应的遗传距离分别为 1.60、1.60 和 2.50 cM。

表1 SCAR引物编号及序列
Table 1 Primers and their sequences of SCAR markers

标记编号 Marker No.	引物序列 (5' to 3') Primer sequences	产物长度/bp Product size
syau_scr02	CATTTGAGAGTAAGAGCTTTCTCTT; GGCCGACTCGTCGGG	218
syau_scr03	TATAGCTTGCGATCCAAGTAA; CAACACAATAATACATCTATTTTATT	188
syau_scr05	ATCTGCAGGTGTAAATTTTTATATC; GGACAAAGACCTGCTCGG	207

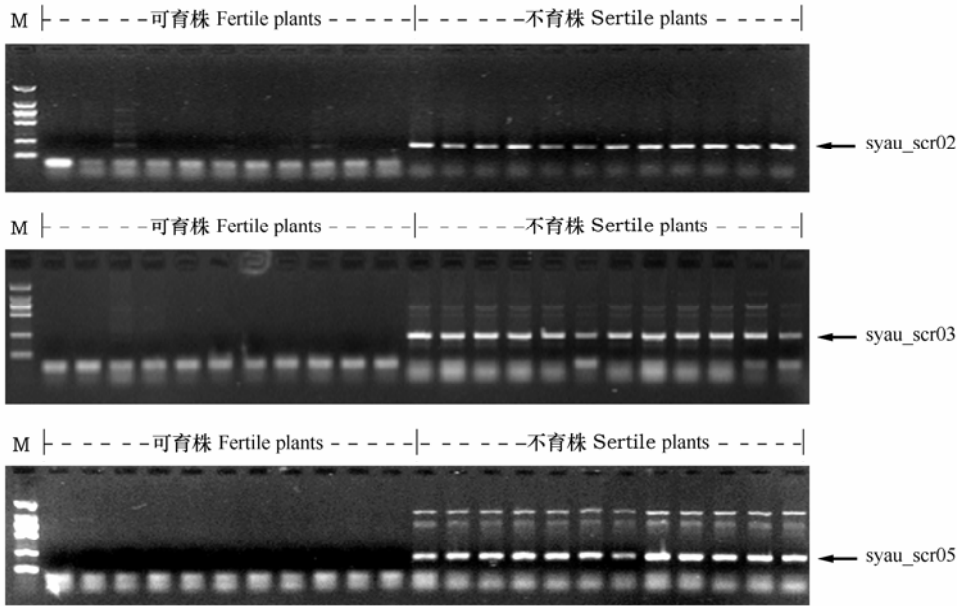


图2 标记 syau_scr02、syau_scr03和syau_scr05在BC₁群体上的单株验证
Fig. 2 Band pattern of individuals with syau_scr02, syau_scr03 and syau_scr05 primers

2.4 SCAR标记的多态性检验

为了检验在分子标记辅助选择上应用的可行性，利用从课题组骨干亲本中筛选出的 12 个 *msms* 基因型大白菜自交系（表 2），分析以上 3 个 SCAR 标记在 ‘AB01’ 和 12 个自交系之间的多态性。

结果表明，3 个SCAR标记在可育株 (*Ms^fMs^f*，‘AB01’ 可育株自交后代) 与不育株 (*MsMs*) 上均扩增出单一条带，说明 ‘AB01’ 的可育株与不育株的遗传背景高度一致，筛选出的与*Ms*基因连锁的标记同样可以用来标记*Ms^f*基因。

脱离原作图群体后，3 个标记均存在不同程度的多态性消失，但是对于任一可育品系，均至少有 1 个标记存在多态性，说明以上标记可以作为核心标记用于雄性不育性的分子标记辅助选择

表 2 12 个大白菜自交系基因型的鉴定
Table 2 Model of genotypic identification of twelve fertile inbred lines in Chinese cabbage

测交品系 Test cross line	可育自交品系 Fertile inbred lines	不育株/可育株 Sterile plants /Fertile plants	基因型 Genotype
<i>MsMs</i>	01	23/0	<i>msms</i>
	02	19/0	<i>msms</i>
	03	27/0	<i>msms</i>
	04	18/0	<i>msms</i>
	05	23/0	<i>msms</i>
	06	17/0	<i>msms</i>
	07	17/0	<i>msms</i>
	08	22/0	<i>msms</i>
	09	20/0	<i>msms</i>
	10	23/0	<i>msms</i>
	11	24/0	<i>msms</i>
	12	23/0	<i>msms</i>

注：斜线前后数值分别为不育株数和可育株数。
Note: Numbers before and behind slashes indicate the number of male sterile plants and female plants.

(图 3)。

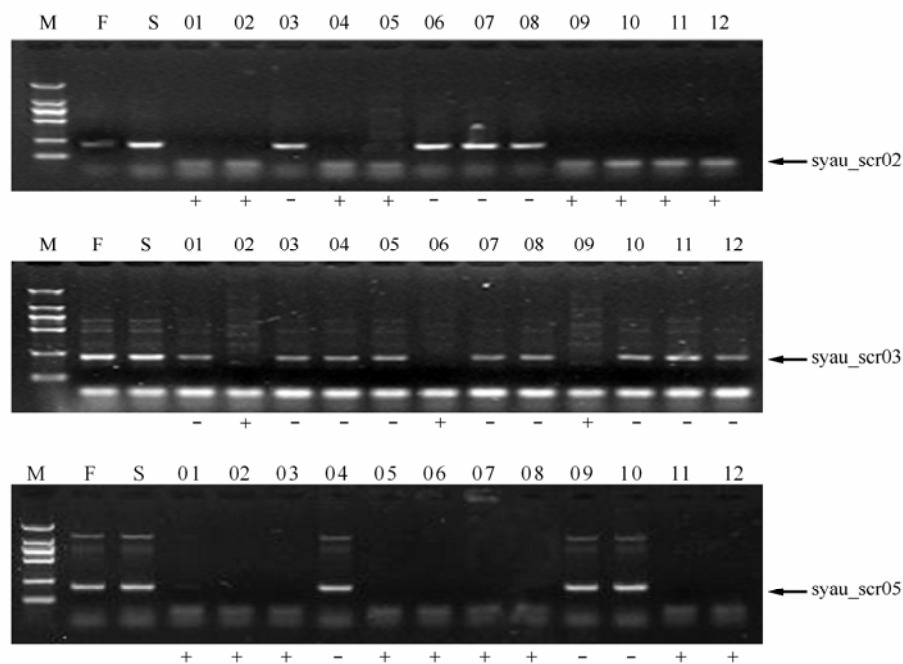


图 3 SCAR 标记在 ‘AB01’ 和 12 个自交系上的多态性检验

+表示标记在 ‘AB01’ 和可育品系之间存在多态性，-表示没有多态性。F. $Ms^f Ms^f$ ；S. $Ms Ms$ 。

Fig. 3 Polymorphism analysis of SCAR markers between AB01 and 12 inbred lines

+ indicated the existence of polymorphism between ‘AB01’ and fertile lines, - indicated no polymorphism.

3 讨论

冯辉等(2009)利用大白菜雄性不育两用系 ‘AB01’，与大白菜基因组测序材料—自交系 ‘Chiifu’ 所构建的BC₁群体，筛选到 2 个与*Ms*基因连锁的SSR标记cnu_m273 和cnu_m295，遗传距离分别为 4.95 和 7.92 cM。为了进一步提高作图准确性，本研究选用 ‘AB01’ 与大白菜双单倍体可育品系 ‘FH-1’ 杂交和回交，构建了新的BC₁群体。‘AB01’ 和 ‘FH-1’ 分别属于大陆气候生态型和海洋气候生态型，遗传距离较远，有利于提高标记的筛选效率。

根据大白菜雄性不育定向转育模式，基因型为*msms*的可育品系宜采用甲型两用系的可育株 ($Ms^f Ms$) 作为不育源进行转育 (李承彧, 2009)。转育包含两部分的连续回交工作，一部分是 $Msms \times msms$ ，回交后代育性表现为1:1分离；另一部分是 $Ms^f ms \times msms$ ，回交后代有 $Ms^f ms$ 和 $msms$ 两种基因型，全部可育，需通过测交鉴别出 $Ms^f ms$ 基因型再回交。如果利用与 Ms^f 紧密连锁的分子标记鉴定出 $Ms^f ms$ ，可省去测交环节，从而减少工作量并加快转育进程。‘AB01’ 为本课题组用于不育系转育的不育源材料，群体可育株和不育株的遗传背景高度一致，筛选出的与*Ms*连锁的分子标记同样可以用来标记 Ms^f 。syau_scr02、syau_scr03和syau_scr05均为显性标记，在 ‘AB01’ 和*msms*基因型可育品系之间存在良好的多态性，可以用来鉴别回交后代中 $Ms^f ms$ 基因型植株。

本试验共筛选了512对AFLP引物组合，最终获得了3个与*Ms*连锁的AFLP标记，并成功将其转化成SCAR标记。下阶段的研究将增加引物的筛选数量，同时跟踪大白菜基因组测序进展，在目标区域进一步开发SSR标记，找到与不育基因连锁更加紧密、多态性更强的分子标记，为图位克隆*Ms*基因奠定基础。

References

- Feng Hui, Wei Peng, Li Cheng-yu, Choi Su Ryun, Lim Yong Pyo, Piao Zhong-yun. 2009. Identification of SSR markers linked to a genic multiple-allele male sterile gene in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (1): 103 - 108. (in Chinese)
- 冯 辉, 魏 鹏, 李承彧, 崔水莲, 林容杓, 朴钟云. 2009. 大白菜核基因雄性不育复等位基因 *Ms* 的 SSR 标记. *园艺学报*, 36 (1): 103 - 108.
- Feng Hui, Wei Yu-tang, Ji Shu-juan. 1996. Multiple allele model for genic male sterility in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae*, 467: 133 - 142.
- Feng Hui, Wei Yu-tang, Zhang Shu-ning. 1995. Inheritance of and utilization model for genic male sterility in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Acta Horticulturae*, 402: 133 - 140.
- Feng Hui, Xu Wei, Wang Yu-gang. 2007. Directive transfer of the genetic male sterile line of milk Chinese cabbage AI023. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 659 - 664. (in Chinese)
- 冯 辉, 徐 巍, 王玉刚. 2007. ‘奶白菜 AI023’ 品系核基因雄性不育系的定向转育. *园艺学报*, 34 (3): 659 - 664.
- Kosambi D D. 1944. The estimation of the map from recombination values. *Ann Eugen*, 12: 172 - 175.
- Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newberg L A. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174 - 181.
- Li Cheng-yu. 2009. Directional transfer of genetic male sterile genes among three basic ecotypes of Chinese cabbage [Ph.D.Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 李承彧. 2009. 3 种基本生态型大白菜核基因雄性不育系定向转育研究 [博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (21): 9828 - 9832.
- Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17 (5): 914 - 921.
- Shen Xiang-qun, Yang Wen-jun. 2004. RAPD marker linked to the fertile restoring gene for the dominant genic male sterile lines in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (6): 731. (in Chinese)
- 沈向群, 杨文骏. 2004. 大白菜核基因显性雄性不育性育性恢复基因的 RAPD 标记. *园艺学报*, 31 (6): 731.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407 - 4414.
- Williamson V M, Ho J Y, Wu F F, Miller N, Kaloshian I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 757 - 763.
- Xin Bin, Feng Hui, Yang Xiao-fei, Wang Yu-gang. 2009. Studies on breeding for genetic male sterile line in *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* L. *Chinese Vegetables*, (14): 38 - 42. (in Chinese)
- 辛 彬, 冯 辉, 杨晓飞, 王玉刚. 2009. 青梗菜核基因雄性不育系的转育. *中国蔬菜*, (14): 38 - 42.
- Yuan He, Zhang Cheng-he, Liu Hai-he, Xuan Shu-xin, Li Xiao-feng, Shen Shu-xing. 2009. Chromosomal location and AFLP marker screening of genic male sterile gene in Chinese cabbage. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (6): 2061 - 2067. (in Chinese)
- 袁 鹤, 张成合, 刘海河, 轩淑欣, 李晓峰, 申书兴. 2009. 大白菜雄性核不育基因的染色体定位及 AFLP 分子标记筛选. *中国农业科学*, 42 (6): 2061 - 2067.
- Yue Yan-ling, Feng Hui. 2005. Transfer of genetic male sterility among Chinese cabbage in different ecotypes. *China Vegetables*, (7): 22 - 23. (in Chinese)
- 岳艳玲, 冯 辉. 2005. 核基因雄性不育在大白菜不同生态型品种间的转育. *中国蔬菜*, (7): 22 - 23.
- Zhang Shu-jiang, Li Fei, Han He-ping, Zhang Shi-fan, Niu Xin-ge, Sun Ri-fei. 2008. Molecular marker linked to a dominant male sterile gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson). *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (8): 2379 - 2385. (in Chinese)
- 张淑江, 李 菲, 韩和平, 章时蕃, 钮心恪, 孙日飞. 2008. 大白菜细胞核显性雄性不育基因连锁标记的筛选. *中国农业科学*, 41 (8): 2379 - 2385.