

葡萄雄性不育基因的初步定位

季晨飞, 张明月, 王继源, 余晓娟, 贾 玥, 陶建敏*

(南京农业大学 园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 为了对葡萄雄性不育基因进行定位研究, 以可育葡萄‘魏可’(*Vitis vinifera* L.) 为亲本构建的自交群体 88 株为试验材料, 运用分离群体分组混合分析法(bulked segregant analysis, BSA), 构建了可育株和不育株基因池, 结合 SSR 技术对葡萄雄性不育基因进行定位研究和生物信息学分析。该研究筛选到 2 个与葡萄雄性不育基因连锁的 SSR 标记 VVMD34 和 VVIB23, 且位于该基因两侧, 遗传距离分别为 3.5 cM 和 1.9 cM。2 个标记间物理距离为 1 134 kb, 在该区域总共预测到了 111 个候选基因。该研究对葡萄雄性不育基因的精细定位及分子标记辅助育种奠定了良好的基础。

关键词: 葡萄; 雄性不育; 基因定位; SSR 标记

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Genetic Mapping of the Male-sterile Gene in Grape

Ji Chenfei, ZHANG Mingyue, WANG Jiyuan, YU Xiaojuan, JIA Yue, TAO Jianmin*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: To map the male-sterile gene in grape, we used a ‘WS’ population including 88 individuals derived from the selfing of ‘Wink’(*Vitis vinifera* L.) as materials. The bulked segregate analysis(BSA) technology was conducted to screen the polymorphism between the fertile and sterile pools by SSR technologies in order to locate the gene and carry out bioinformatics analysis. Two SSR markers of VVMD34 and VVIB23 were linked with *VvMs1*. They located on either sides with genetic distances of 3.5 cM and 1.9 cM, respectively. The physical distance between VVMD34 and VVIB23 is 1 134 kb based on the whole genome sequence of grape, and there are 111 candidate genes in this region. These results will benefit fine-mapping of male-sterile gene and marker-assisted selection(MAS) in grape breeding program.

Key words: grape; male sterility; gene mapping; SSR marker

雄性不育在开花植物中广泛存在, 它是一种有性繁殖过程中雄性器官异常, 从而不能产生花粉或者花粉败育的遗传现象。人们已在 43 个科、162 个属、617 种植物中发现了植物的雄性不育现象, 且数量在持续增长^[1]。利用雄性不育种质可免去繁琐的人工去雄工作, 利于生产无籽果实, 同时, 可降低树体养分消耗, 提高果实品质, 增强果实商业价值。

雄性不育在粮食作物、油料作物、蔬菜、果树等上均有研究, 其中以粮食作物上研究最为深入。目前, 水稻上已登记了 130 余份雄性不育材料^[2], 实现基因定位的有 35 个, 分布在除 4 号和 11 号外的所有染色体上, 包含温敏核雄性不育、质雄性不育等多种不育类型。其他农作物如小麦、大豆、谷子上雄性不育的研究也较多^[3-6], 应用广泛。雄性不育在油料

收稿日期: 2014-06-06; 修改稿收到日期: 2014-09-11

基金项目: 国家 948 重点项目(2011-G28); 江苏省科技厅项目(BE2012453)

作者简介: 季晨飞(1987—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事葡萄育种及生物技术研究。E-mail: jcf-1221@163.com

* 通信作者: 陶建敏, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事葡萄栽培育种及生物技术研究。E-mail: taojianmin@njau.edu.cn

作物和蔬菜上的研究仅次于粮食作物,许多雄性不育基因已被定位。Huang 等^[7]以 1 对双隐性基因 *BnMs3* 和 *BnMs4* 控制的甘蓝型油菜雄性不育系为材料,将雄性不育基因 *BnMs3* 定位在 AFLP 标记 EA01MC12 和 EA09P06 之间,与 2 个标记的距离分别为 0.1 cM 和 0.3 cM。吴国平等^[8]以甜椒细胞质雄性不育系(CMS)T6 和相应保持系 T6B 为材料,利用 SRAP 分子标记技术筛选到了 1 条在两系间有差异性的稳定条带,经比对分析其功能可能与逆转座子有关。在果树上,受材料生长周期较长等因素的限制,雄性不育的研究主要停留在细胞学和生化指标方面。何天明^[9]通过可育梨和不育梨品种中游离氨基酸总量、游离脯氨酸含量和过氧化氢酶活性的变化差异检测,认为脯氨酸的缺失影响小孢子的发育,导致花粉败育。张婧等^[10]在不完全雄性不育板栗的短雄超微结构观察中发现,其雄花序上部组织细胞在衰亡过程中呈现有序的死亡变化,与植物细胞程序性死亡特征相似,可能与板栗雄性不育形成的机制有关。在葡萄上,有研究表明葡萄雄性不育材料雄蕊发育不良,花粉粒异常无活力,小孢子发育过程中绒毡层提前解体,可溶性蛋白和脯氨酸等物质含量均低于可育材料^[11]。其中,葡萄的绒毡层发育相关基因 *Vvms2* 和 *Vvmyb4* 的克隆和表达分析,进一步证明了绒毡层的提前解体与葡萄雄性不育的产生关系紧密^[12]。迄今尚没有葡萄雄性不育基因遗传分析及标记定位方面的相关报道。

本实验在前人研究的基础上^[11-12],以葡萄可育品种‘魏可’及其自交产生的 88 株实生苗群体为材料,通过对自交后代中产生的雄性不育现象进行统计,根据性状分离比确定了葡萄雄性不育类型。通过 BSA 和 SSR 技术的结合,初步定位了葡萄雄性不育基因 *VvMs1*。葡萄雄性不育基因的定位为分子标记辅助葡萄育种和创造更多的葡萄雄性不育新种质提供了重要依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为葡萄品种‘魏可’,欧洲种,完全花,由日本山梨县志村富男于 1987 年用‘Kubel Muscat’与甲斐露杂交获得。‘Kubel Muscat’与甲斐露均雄蕊发育正常,花粉有活力,为可育植株。在‘魏可’的自交实生后代中发现部分不育株,不育株雄蕊花丝短,且反卷,花药干瘪。利用‘魏可’自交获得了‘WS’群体,该群体总株数 88 株。所有材料均种植

于南京农业大学汤山基地。

1.2 田间调查与花粉萌发力检测

‘WS’群体播种于 2007 年春,当年 6 月定植。植株部分于第 2 年始花,大多播种后第 3 年开花结果。于 2011~2012 连续 2 年对‘WS’群体进行花器官形态观察和统计,以田间统计为主,辅之以花粉活力检测。

1.3 SSR 反应及 SSR 标记多态性筛选

基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[13],分别提取亲本材料和‘WS’群体材料的基因组 DNA。

SSR 反应体系为 DNA 模板 50 ng,上下游引物各 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \times$ PCR buffer, MgCl_2 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U,总体积 20 μL 。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 73 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 73 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 反应结束后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳后银染观察。

共有 598 条 SSR 引物用于多态性筛选。SSR 引物主要选自 VMC(Vitis Microsatellite Consortium, Agrogen SA, Moissy Cramayel, France)、VVI 和 UDV^[14-15] 等 3 个系列, EST-SST 引物则来源于近些年发表的文献^[16, 17]。

1.4 连锁标记的筛选和 *VvMs1* 的定位

从‘WS’群体中随机挑选 10 个可育植株和 10 个不育植株,分别构建可育株和不育株的混合 DNA 基因池。使用 SSR 引物进行筛选和群体分析,借鉴 IPPG 参考图谱^[18],利用筛选出具有多态性的 SSR 引物及位点附近引物构建连锁群,将葡萄雄性不育基因 *VvMs1* 定位在连锁群上。

1.5 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和葡萄全基因组数据库 (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-whole-genome.html>), 对初步定位区域的候选基因进行查找与分析。通过基因注释文件,提取目的基因序列。再利用 CDD 数据库 (Conserved Domain Database), 以 $E\text{-value}=1.00\text{E}^{-5}$ 为阈值,对具有保守结构域的基因进行功能预测。

2 结果与分析

2.1 田间性状统计与花粉生活力检测

田间调查发现,‘WS’群体中可育株花形态正常,花丝直立,花药饱满,而不育株花丝反卷,花药干

瘪(图 1)。花粉生活力检测结果表明,可育株花粉活力均在 60%以上,而不育株花粉活力均小于 5%。统计分析可得,可育株株数为 65 株,不育株为 23 株,可育株和不育株的比例为 2.84 : 1,根据 χ^2 ($\chi^2=0.06<3.84$),计算显示,符合单基因分离 3 : 1 的比例,表明葡萄雄性不育可能由隐性单基因控制的。

2.2 SSR 引物的多态性筛选

利用 SSR 引物对可育株基因池和不育株基因池进行筛选,得到 2 条在基因池间具有多态性的标记,分别为 VVMD34 和 VVIB23(图 2)。通过和已公布的多条葡萄遗传图谱比较,分析得出 2 条引物均位于葡萄基因组的 2 号染色体上。

2.3 VvMs1 基因的初步定位

用筛选到的 2 条引物及位点附近的引物对 ‘WS’ 群体进行分析(图 3),通过 Joinmap 4.0 构建连锁图。结果表明,VVMD34 和 VVIB23 分布于 VvMs1 基因的两端,距离分别为 3.5 cM 和 1.9 cM(图 4)。VVMD34 和 VVIB23 这 2 个标记,在遗传

群体分析中出现了较为显著的偏分离现象, χ^2 分别为 22.64 和 19.00,而连锁图上其他标记中,离该位点较近的标记比离该位点较远的标记 χ^2 要高(表 1),这可能与 VvMs1 基因对雄配子选择的影响有关^[19]。

2.4 候选基因的生物信息学分析

根据葡萄基因组数据库提供的全基因序列,利用生物信息学方法对目标基因初步定位区域进行了

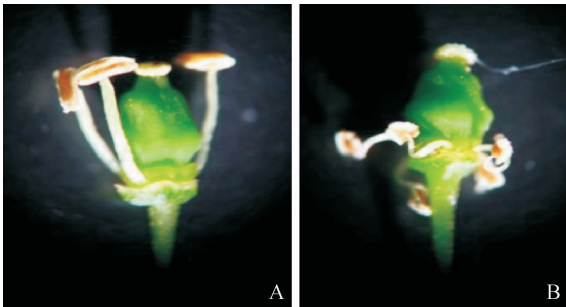


图 1 可育株(A)和不育株(B)的花器官形态
Fig.1 The flower of fertile(A) and sterile(B) individuals

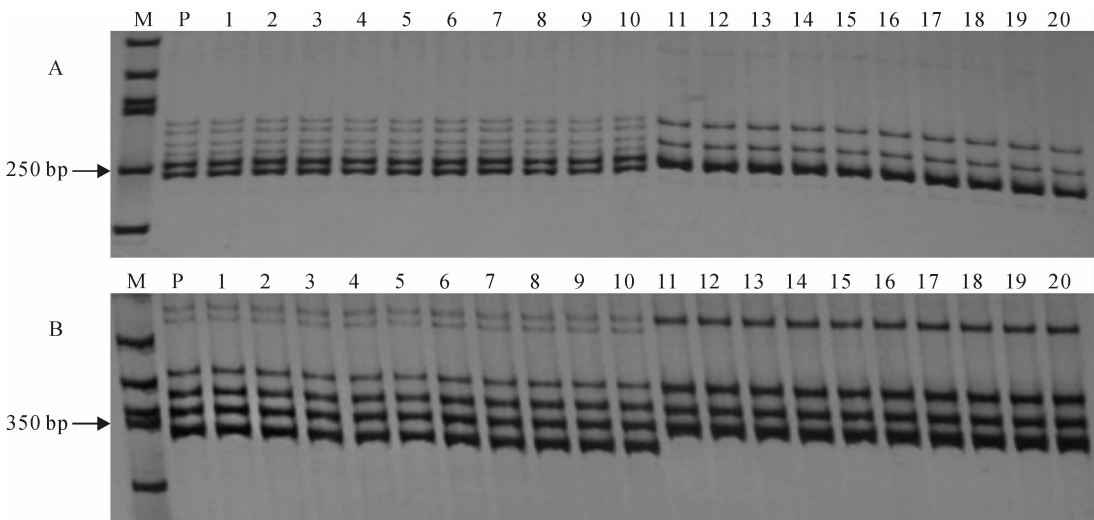


图 2 VVMD34(A)和 VVIB23(B)在 2 个基因池间的扩增结果

M. 50 bp DNA marker;P. 魏可;1~10. ‘WS’群体中可育株;11~20. ‘WS’群体中不育株

Fig.2 The amplification results of VVMD34(A) and VVIB23(B) in fertile and sterile individuals
M. 50 bp DNA marker;P. Wink;1–10. Fertile individuals in ‘WS’ population;11–20. Sterile individuals in ‘WS’ population

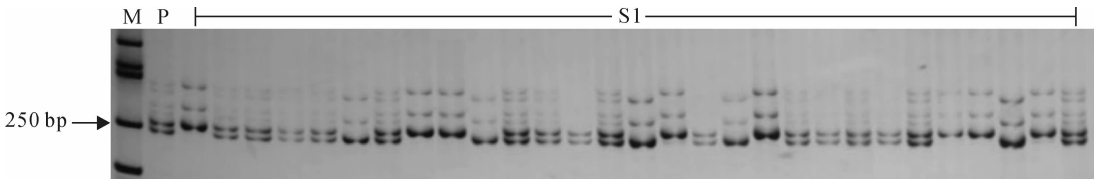


图 3 VVMD34 在 ‘WS’ 群体间的扩增结果

M. Marker;P. 魏可;S1. ‘WS’ 部分个体

Fig.3 The amplification result of VVMD34 in ‘WS’ populations
M. Marker;P. Wink;S1. Individuals in ‘WS’ population

序列分析。结果表明,与 *VvMs1* 紧密连锁的 2 个标记 VVMD34 和 VVIB23 之间的物理距离为 1 134 kb,在该区域中共有 111 个候选基因。这些基因主要涉及锌指结构、水解酶家族、转录因子、细胞色素 P450 和生长激素响应蛋白等。通过分析,YTH、MADS 和 P450 超级家族的基因有可能参与葡萄不育性状(表 2),但其功能还需经过更进一步的研究验证来确定。

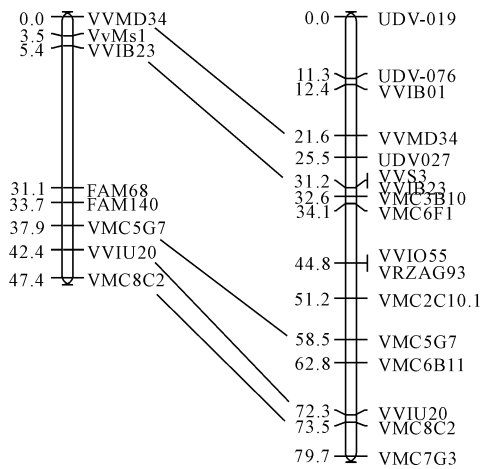


图 4 *VvMs1* 在葡萄第 2 号染色体的定位结果
Fig. 4 The *VvMs1* location on grape chromosome 2

表 1 连锁群上的引物

Table 1 Primers in the linkage group

引物名称 Primer	带型分离比率 Segregation ratio	χ^2	<i>P</i>	引物来源 Primer source
VVMD34	3 : 60 : 25	22.64	1.21×10^{-5}	[14]
VVIB23	6 : 60 : 23	19.00	7.48×10^{-5}	[14]
FAM68	15 : 48 : 25	3.00	0.22	[16]
FAM140	14 : 49 : 25	3.89	0.14	[16]
VMC5G7	17 : 49 : 22	1.70	0.43	[18]
VVIU20	18 : 48 : 22	1.09	0.58	[14]
VMC8C2	16 : 47 : 25	2.25	0.32	[18]

表 2 可能参与葡萄雄性不育性状的候选基因

Table 2 The candidate genes associated with male sterility in grape

基因 Gene	结构域位置 The location of domains		E 值 E value	结构域所属家族 The family of domains
	起始 Start	终止 End		
GSVIVT01019901012	71	206	7.08E^{-57}	YTH 超级家族 YTH super family
GSVIVT01019901034	4	371	3.34E^{-83}	P450 超级家族 P450 super family
GSVIVT01019901062	19	116	2.80E^{-22}	P450 超级家族 P450 super family
GSVIVT01019901076	1	63	1.09E^{-36}	MADS 超级家族 MADS super family
GSVIVT01019901128	155	568	3.11E^{-107}	P450 超级家族 P450 super family
GSVIVT01019901133	2	129	2.70E^{-21}	P450 超级家族 P450 super family

3 讨论

尽管果树雄性不育的研究有了一定进展,但主要集中在细胞学分析和生化生理分析层面上。由于果树遗传背景复杂,童期较长,通过传统育种方法构建遗传群体相对不易,所以在不育遗传机理上远远落后于玉米,水稻等大田作物^[20]。葡萄雄性不育基因的定位研究,有助于找到与雄性不育基因紧密连锁的 DNA 标记。一方面可以运用于育种工作中,通过分子标记辅助选择(marker assistant selection, MAS)技术在苗期鉴定葡萄雄性不育株,提高育种效率,加速育种进程;另一方面可以对雄性不育基因进行精确定位和图位克隆,从而找出控制葡萄雄性不育的基因。

本研究中与雄性不育基因 *VvMs1* 相邻的 2 个标记出现了极度的偏分离现象,这可能是因为 *VvMs1* 基因的存在影响雄配子体的分离,从而通过影响雄配子的比例间接影响合子的基因型比例^[21-22]。前人研究表明,偏分离与雄配子体的育性有关,且偏分离标记成簇出现在连锁群上^[23-26]。本研究中的‘WS’群体出现可育和不育的分离现象,雄性不育基因的定位结果也支持了前人的研究结果,但是其形成机理还有待进一步的研究考证。

Scott 等^[27]认为桃的雄性不育性状由 1 个隐性单基因(*ps*)控制,后面研究也陆续支持了这一结果。本研究中‘WS’群体中可育株和不育株比例约为 3 : 1,初步认为葡萄上的雄性不育性状也是由 1 个隐性单基因控制。根据前人发表的遗传图谱^[18],选用 SSR 分子标记,结合分离群体分组混合分析法(BSA),首次定位了葡萄雄性不育基因,研究表明,该基因位于葡萄 2 号染色体上 2 个 SSR 标记 VVMD34 和 VVIB23 之间。本研究使用的是葡萄自交群体,遗传背景较为明晰,易于分析,有利于深

入研究葡萄雄性不育基因遗传机理,但是自交群体出现的遗传交换位点少于杂交群体,筛选到的多态性标记也就较少,为葡萄的进一步定位带来了困难。

所以后续还需利用多种途径,开发新的多态性标记,进行更加精细的定位。

参考文献:

- [1] KAUL M L H. Male sterility in higher plants[M]. New York: Sperlinger-Veriag, 1988: 3—6.
- [2] SUN X Q(孙小秋), FU L(付磊), WANG B(王兵), *et al.* Genetic analysis and molecular mapping of the rice male sterile mutant 802A[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2011, **44**(13): 2 633—2 640(in Chinese).
- [3] 钱焕焕. 小麦 K 型温敏雄性不育系 KTP116A 的温敏特性研究及隐性恢复基因定位[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2013.
- [4] CAO SH H(曹双河), GUO X L(郭小丽), LIU D CH(刘冬成), *et al.* Preliminary gene-mapping of photoperiod-temperature sensitive genic male sterility in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2004, **31**(3): 293—298(in Chinese).
- [5] KATO K K, PALMER R G. Molecular mapping of the male-sterile, female-sterile mutant gene(*st8*) in soybean[J]. *The Journal of Heredity*, 2003, **94**(5): 425—428.
- [6] HAO X F(郝晓芬), WANG ZH M(王志民), WANG G Q(王根全), *et al.* SSR analysis of photo-sensitive male sterile gene of millet[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2011, **26**(5): 112—116(in Chinese).
- [7] HUANG ZH, CHEN Y F, YI B, *et al.* Fine mapping of the recessive genic male sterility gene(*Bnms3*) in *Brassica napus* L. [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, **115**(1): 113—118.
- [8] WU G P(吴国平), YUAN W(袁稳), LIU J B(刘金兵), *et al.* SRAP marker linked to cytoplasmic male sterility in sweet pepper[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* (江苏农业学报), 2012, **28**(5): 1 114—1 118(in Chinese).
- [9] HE T M(何天明). Analysis of free amino acids and catalase activity in floral buds and anthers in male-sterile ‘Xinli No. 7’ pear[J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2012, **29**(3): 338—342(in Chinese).
- [10] ZHANG J(张婧), DONG Q H(董清华), YANG K(杨凯), *et al.* Studies on the ultrastructure of abnormal cell death during mutant short catk in development in chestnut[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2007, **34**(3): 605—608(in Chinese).
- [11] 刘倩. 两个葡萄雄性不育单株的花粉形态学、细胞学及其相关生理特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [12] 郑焕. ‘钟山红’葡萄雄性不育形成机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [13] TONG ZH G(佟兆国), WANG F R(王富荣), ZHANG ZH(章镇), *et al.* A method for DNA extraction from mature leaves of fruit trees[J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2008, **25**(1): 122—125(in Chinese).
- [14] MERDINOGLU D, BUTTERLIN G, BEVILACQUA L, *et al.* Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR[J]. *Molecular Breeding*, 2005, **15**(4): 349—366.
- [15] DI GASPERO G, CIPRIANI G, MARRAZZO M T, *et al.* Isolation of (AC)n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection[J]. *Molecular Breeding*, 2005, **15**(1): 11—20.
- [16] HUANG H, LU J, REN Z, *et al.* Mining and validating grape (*Vitis* L.) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping [J]. *Molecular Breeding*, 2011, **28**(2): 241—254.
- [17] SCOTT K D, EGGLE P, SEATON G G, *et al.* Analysis of SSRs derived from grape ESTs[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **100**(5): 723—726.
- [18] DOLIGEZ A, AUDIOT E, BAUMES R, *et al.* QTLs for muscat flavor and monoterpenic odorant content in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Molecular Breeding*, 2006, **18**(2): 109—125.
- [19] WANG SH H(王石华). Effect of segregation distortion causing by male gametic selection[J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), 2009, **7**(5): 990—995(in Chinese).
- [20] SONG J(宋建), JIN F M(金凤媚), XUE J(薛俊), *et al.* Progress of molecular markers in male sterility in plants[J]. *Tianjin Agricultural Sciences* (天津农业科学), 2013, **19**(10): 19—21(in Chinese).
- [21] LIU H Y(刘海燕), CUI J T(崔金腾), GAO Y M(高用明). Progress of segregation distortion[J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), 2009, **10**(4): 613—617, 622(in Chinese).
- [22] ZHAO B, DENG Q M, ZHANG Q J, *et al.* Analysis of segregation distortion of molecular markers in F₂ population of rice[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, **33**(5): 449—457.
- [23] LU H, ROMERO-SEVERSON J, BERNARDO R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, **105**(4): 622—628.
- [24] MATSUSHITA S, ISEKI T, FUKUTA Y, *et al.* Characterization of segregation distortion on chromosome 3 induced in wide hybridization between indica and japonica type rice varieties[J]. *Euphytica*, 2003, **134**(1): 27—32.
- [25] LIU G(刘刚), XU SH B(许盛宝), NI ZH F(倪中福), *et al.* Genetic analysis of segregation distortion of molecular markers in wheat RIL population[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2007, **15**(5): 828—833(in Chinese).
- [26] ZHANG F(张帆), WAN X Q(万雪琴), PAN G T(潘光堂). Genetic analysis of segregation distortion of molecular markers in maize F₂ population[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2006, **32**(9): 1 391—1 396(in Chinese).
- [27] SCOTT D H, WEINBERGER J H. Inheritance of pollen sterility in some peach varieties[J]. *Proceeding of the American Society Horticultural Science*, 1944, **45**(1): 229—232.