

水稻光温敏核不育基因与同工酶基因的遗传关系及连锁测定

胡学应 万邦惠

(农学系)

摘要 本试验以光温敏核不育系农垦58S, 双8-2S, N_{98S} 为材料, 以花粉育性为指标, 研究了不同自然条件, 不同光照长度及不同温度处理下同工酶变化与育性变化的相关性, 并测定了同工酶基因与光温敏核不育基因的连锁关系。试验结果表明: Adh-1和 Est-3与育性有密切关系, 不育时, 这两位点都表现有效等位基因; 可育时, 这两位点都表现无效等位基因。控制光温敏核不育的两对基因中, 一对与 Adh-1紧密连锁(重组率为0); 另一对与 Cat-1连锁(重组率为29%)。

关键词 水稻光温敏核不育基因; 同工酶基因; 遗传关系; 连锁测定

水稻光温敏核不育性的发现, 为杂交水稻的发展展现了广阔的前景, 是实现“两系”法的希望所在。因此近年来已引起了水稻遗传育种工作者的广泛兴趣和研究。关于这一性状的遗传性质, 据初步研究认为是由两对独立的隐性基因控制^[5,6]。

要对水稻光温敏核不育基因的性质, 调节和表达机理等有较透彻的了解, 首先要确定这些基因在染色体上的位置。但是不育性易受多方面因素影响, 利用常规的三体分析或以形态标记的连锁测定都会遇到遗传测验种本身不育性与光温敏不育性相互干扰的麻烦, 而应用内部标记可以避免这方面的影响。在栽培稻中, 已鉴定并进行了染色体定位的同工酶位点共有19个, 分布于8对染色体上^[12]。由于同工酶基因的分离本身对育性表现没有不良影响, 它是测定光温敏不育基因的较理想的标记。本文报告了这方面的研究结果。

1 材料与方法

实验材料: 所用光温敏核不育系包括农垦58S、双8-2S和 N_{98S} 。前面两个都来自湖北, 属梗稻型。后者为本校选育的具有光温敏不育特性的偏粳型不育系。用于基因连锁测定的组合为农垦58S/02428 F_2 群体。02428来自江苏, 为一梗型品种。

同工酶分析方法: 采用水平式淀粉凝胶电泳方法进行。将植株幼嫩的非绿色组织加少许蒸馏水研磨, 用小块滤纸吸取粗提液, 插入已准备好的淀粉凝胶板中, 在4℃下电泳5h。缓冲液系统1(凝胶缓冲液 Tris 0.009 mol/L—组氨酸0.005 mol/L, pH8.6, 淀粉含量为14%; 电极缓冲液为 Tris 0.40 mol/L—柠檬酸0.105 mol/L, pH8.0)用于分离九个酶: 莽草酸脱氢酶(SDH); 异柠檬酸脱氢酶(ICD); 乙醇脱氢酶(ADH); 亮氨酸、丙氨酸和精氨酸氨肽酶(AMP); 酯酶(EST); 过氧化氢酶(CAT); 磷酸葡萄糖异构

1990年9月10日收稿

酶 (PGI)。缓冲液系统Ⅱ (凝胶缓冲液 Tris 0.076 mol/L—柠檬酸 0.006 mol/L, pH8.8, 淀粉含量13%; 电极缓冲液 纳—硼酸 0.3 mol/L, pH8.7) 用于分离谷氨酸—草酰乙酸转氨酶 (GOT); 磷酸葡萄糖脱氢酶 (PGD) 和酸性磷酸酶 (ACP)。染色程序和配方参照 Second^[10], Tanksley 和 Rick^[11], Ott 和 Scandalios^[9], Glaszman^[8]等方法进行。

本文用作遗传标记的同工酶基因以及它们在染色体上的位置列于表1。

连锁分析方法: 在分蘖初期, 对农垦58S/02428 F₂群体单株嫩茎进行同工酶测定。在农垦58S 不育期, 对该群体作育性分离调查, 然后割株, 取再生分蘖幼穗分化期 (Ⅲ—Ⅴ期) 的剑叶鞘 (指内层非绿色部分, 下同) 再次作同工酶测定。幼穗发育期划分按丁颖^[1]的标准进行。重组率计算依 Allard^[7]最大似然性公式和表格进行。本试验中凡以幼穗分化期各器官为材料的单株, 于此后30 d左右观察育性。

表1 用于测定光温敏核不育性的同工酶基因及其染色体位置^[12]

酶	基因位点	染色体位置
乙醇脱氢酶	Adh-1	11
莽草酸脱氢酶	Sdh-1	6
异柠檬酸脱氢酶	Icd-1	1
酯 酶	Est-1	7
	Est-2	3
	Est-3	未知
	Est-5	1
	Est-8	7
谷氨酸—草酰乙酸转氨酶	Got-1	1
	Got-3	2
酸性磷酸酶	Acp-1	6
	Acp-4	未知
过氧化氢酶	Cat-1	3
亮氨酸氨肽酶	Amp-1	2
	Amp-3	3
丙氨酸氨肽酶	Amp-2	8
精氨酸氨肽酶	Amp-4	8
磷酸葡萄糖脱氢酶	Pgd-1	11

2 结果与分析

2.1 光温敏不育系和其它亲本同工酶基因型

表2列出了以胚芽鞘为材料, 3个光温敏核不育系以及梗稻品种02428在17个同工酶位点的等位基因组成。从表中可以看出农垦58S, 双8-2s 在 Est-2, Cat-1, Sdh-1 和 Acp-4 位点上都携带有梗稻所特有的等位基因^[8]。而 N_{98S} 在 Est-2 上携带有籼稻所特有的等位基因, 但在其它3个位点上都携带有籼梗杂合等位基因, 说明 N_{98S} 是一个籼梗中间偏籼型光温敏核不育系。N_{98S} 是以梗型光温敏核不育系农垦58S 与籼稻品种 IR8608 一次杂交选育而成的。

表2 水稻光温敏核不育系和其它亲本品种同工酶位点上的等位基因组成

品种(系)	农垦58S	双8-2S	N _{98S}	02428
位点				
Est-1	1	0	1	1
Est-2	0	0	1	2
Est-3	0	0	1	0
Est-5	1	1	1	1
Est-8	1	2	2	1
Amp-1	1	1	1	1
Amp-2	2	2	2	2
Amp-3	2	2	2	1
Amp-4	1	1	1	2
Sdh-1	1	1	12	1
Icd-1	1	1	1	1
Adh-1	1	1	1	1
Cat-1	1	1	12	2
Pgd-1	3	3	—	—
Acp-1	1	1	1	1
Acp-4	2	2	12	1
Got-1	2	2	2	

注: 阿拉伯数字代表等位基因

02428在 Est-2和 Amp-3位点上具有广亲和品种的等位基因^[4],而在 Cat-1, Sdh-1和 Acp-4位点上携带有梗稻所特有的等位基因,证明其是一个具有广亲和性的梗稻品种。

2.2 不同光照条件下不育系同工酶的表现

1988年在不同光照长度时期,以幼穗分化期的剑叶鞘为材料,定株对3个不育系的13个位点控制的同工酶测定,结果表明:除了 Adh-1和 Est-3外,其它11个均表现稳定。在5月6日(未转不育时)测定到农垦58S的 Adh-1和 Est-3位点均表达无效等位基因(图版1),但到6月27日(转不育时)再次测定,这2个位点均表达有效等位基因,酶谱同其它品种一样清晰(图版2)。在8月17日我们又对再生禾苗进行了测定,发现农垦58S在 Adh-1位点表现无效等位基因,Est-3位点的基因也处于静止状态,但此时农垦58S与籼稻品种杂交 F₂群体中不育株仍有 Est-3编码的酶带出现,且此时观察到的由 Est-3编码的酶谱与往常的也有差异。正常情况下仅有一条酶带,但此时出现2条酶带,并伴随有次级酶带的表现(图版3)。花粉镜检表明8月17日农垦58S,双8-2S, N_{98S} 3个不育系均表现可育,而上述 F₂群体中不育株还未发生育性转化,呈不可育状态。

1990年,同样以上述3个不育系重复测定。各材料分别测定幼穗分化期(Ⅲ—V期)的茎、幼穗和剑叶鞘。结果3个不育系茎、幼穗在各光照长度时期,13个同工酶位点都保持稳定,而剑叶鞘在 Adh-1和 Est-3位点与1988年测定结果一样,出现差异。4月20日(未转不育)3个不育系 Adh-1和 Est-3均表达无效等位基因,但到6月17日(转不育时)3个不育系这2个位点又都表达有效等位基因(图版4、图版5)。

2.3 不同光照长度处理下不育系同工酶的表现

1988年7月,对自然长光和人工短光12 h下发育的幼穗同工酶的比较观察表明两者之间没有明显差异,3个不育系均表现 Adh-1和 Est-3等位基因。

1990年6月中旬再次对2种光长下的茎、幼穗、剑叶鞘的同工酶进行比较。结果茎、幼穗2种处理之间仍无明显差异,而剑叶鞘却有变化,表现为短光处理(可育) Adh-1和 Est-3均表达无效等位基因;自然长光(不育)下两位点均表达有效等位基因(图版5)。

2.4 不同温度处理下不育系同工酶表现

以 N_{98S}为材料,在人工气候箱内设置3个不同温度处理,即长光高温(13 h30 min/28.5℃),长光中温(13 h30 min/26.5℃),长光低温(13 h30 min/24.5℃),在幼穗分化期(Ⅲ—V期)分别取茎、幼穗、剑叶鞘进行同工酶测定,重复2次。结果茎、幼穗在所测的同工酶位点上3种处理均无明显差异,而剑叶鞘除 Adh-1外,其它位点也都保持稳定。长光中温和长光低温处理,剑叶鞘的 Adh-1表达无效等位基因,但长光高温处理 Adh-1则表达有效等位基因(图版6)。花粉镜检表明:长光中温和长光低温、各单株正常花粉率都在15%以上,而长光高温处理,正常花粉率都为0。

不同自然条件,不同光照长度和不同温度处理所得结果一致,即可育时,剑叶鞘 Adh-1、Est-3为无效等位基因;不育时,这2位点均表达有效等位基因。农垦58S,双8-2S, N_{98S}都是以光为主光温协同诱导育性转换的光温型核不育系。自然光长,人工短光处理都是光长温度同时变化,而不同温度处理却是温度变化而光长恒定,这证明温度—Adh-1—育性3者之间存在密切关系,而光长—Est-3—育性3者之间也有密切关系。

2.5 以同工酶基因为标记, 光温敏核不育基因的染色体定位

2.5.1 杂交亲本的同工酶基因型 经广泛测定, 我们选择了由不育系农垦58S与02428配成的组合农垦58S/02428 F_2 , 作为不育基因定位的材料。这2亲本所测器官及该器官上同工酶基因型列于表3。可见农垦58S与02428育性可育期间茎基 Cat-1位点的基因型和不育期间剑叶鞘 Adh-1位点的基因型都不相同, 从而 F_2 群体将会出现同工酶基因分离, 可用作不育基因定位的标记。

表3 杂交亲本同工酶基因型

测定时期	器官	品种	位	点
			Cat-1	Adh-1
分蘖初期, 农垦58S 可育	嫩 茎	农垦58S	Cat-1 ¹¹	Adh-1 ¹¹
		02428	Cat-1 ²²	Adh-1 ¹¹
幼穗分化期(Ⅲ—Ⅴ期) 农垦58S 不育	剑叶鞘	农垦58S	Cat-1 ¹²	Adh-1 ¹¹
		02428	Cat-1 ¹²	Adh-1 ⁰⁰

2.5.2 光温敏核不育基因与同工酶基因的连锁测定 根据上述亲本同工酶基因型差异, 于农垦58S 可育期间测定了分蘖初期农垦58S/02428 F_2 群体中单株嫩茎的 CAT, 而在不育期间幼穗分化期测定该群体单株剑叶鞘的 ADH。图版7和图版8是这两同工酶位点基因的分离情况。表4列出了同工酶基因 Cat-1¹, Adh-1¹与光温敏核不育基因的重组率。

由表4可见, 一个光温敏不育基因与 Cat-1¹的重组率和另一个光温敏不育基因与 Adh-1¹的重组率都在50%以下, 说明它们两两连锁。由表1可知 Cat-1位于第3染色体上, 而 Adh-1位于第11染色体上, 故此推测两个光温敏不育基因中一个位于第3染色体上, 另一个位于第11染色体上, 即这两个不育基因是独立的, 进一步证实了遗传分析的结果。

表4中, 一个光温敏不育基因与 Adh-1¹紧密连锁, 这与不同自然条件下, 不同光照长度和不同温度处理下同工酶的分析结果是一致的, 进一步表明 Adh-1位点与其中某个不育基因位点密切相关。

表4 农垦58S, 02428F₂中 Cat-1, Adh-1与光温敏核不育基因的分离情况

同工酶基因型	不育株数	可育株数	重组率(%)
Cat-1 ¹¹	4	38	29±4.0
Cat-1 ¹²	5	65	
Cat-1 ²²	0	29	
Adh-1 ¹¹ } Adh-1 ¹⁰ }	9	102	0±16.4
Adh-1 ⁰⁰	0	38	

3 讨 论

水稻光温敏雄性不育由细胞核基因控制,与细胞质无关,由光长和温度协同诱导产生,因此这类材料是研究基因表达、调控的重要材料。

本试验发现乙醇脱氢酶活性与育性有密切关系,故此推测长光高温通过影响剑叶鞘中乙醇脱氢酶活性,导致乙醇累积,从而抑制 ATP 酶活性^[2,3],使非绿色剑叶鞘中高分子物质合成受阻,进而导致代谢紊乱。当然导致雄性不育的生化过程是复杂的,要彻底弄清长光高温诱导雄性败育的真实面目,还有待于包括生理生化、遗传及分子生物学在内的多学科的综合研究。

致谢 吴坤生老师参加前期部份试验工作。

参 考 文 献

- 1 丁颖主编. 中国水稻栽培学. 北京: 农业出版社, 1961. 167~171
- 2 李生广等. 乙醇对 F₁-ATP 酶和 H⁺-ATP 酶的抑制与其核苷酸结合位点状态的关系. 生物化学杂志, 1990, 6 (1): 71
- 3 林治煊等. 猪心线粒体 F₁-ATP 酶的水解活性与色氨酸残基相关的构象的关系. 生物化学与生物物理进展, 1984, 2: 41~44
- 4 傅春霞. 水稻广谱亲和性种质的酯酶同工酶谱特征. 江苏农业学报 (增刊), 1988, 6~13
- 5 靳德明等. 水稻光周期敏感雄性不育性的遗传研究. 作物学报, 1989, 15 (1): 8~10
- 6 雷建勋等. 湖北光敏核不育水稻与中梗杂交后代育性分析. 杂交水稻, 1989 (2): 39~43
- 7 Allard, R. W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. Hilgardia, 1956, 24 (10): 235~278
- 8 Glaszmann, J. C. Varietal classification of Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) based on isozyme polymorphism. Rice Genetic. The International Rice Research Institute. 1985. 83~90
- 9 Ott, L. and Scandalios, J. G. Genetic control and linkage relationships among aminopeptidases in maize. Genetics, 1978, 89: 137~146
- 10 Second, G. Origin of the gene divisivity of the cultivate rice (*Oryza* spp.) Study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. Japan. J. Genetics, 1982, 57: 25~27
- 11 Tanksley, S. D. and Rick, C. M. Isozymic linkage map of the tomato: applications in genetics and

breeding. Theor. Appl. Genet. 1980. 157: 161~170

- 12 Wu Kun—Sheng et al Chromosomal location of ten isozyme loci in rice (*Oryza sativa* L.) through trisomic analysis. Biochemical Genetics 1988, 26 (3~4): 303~321

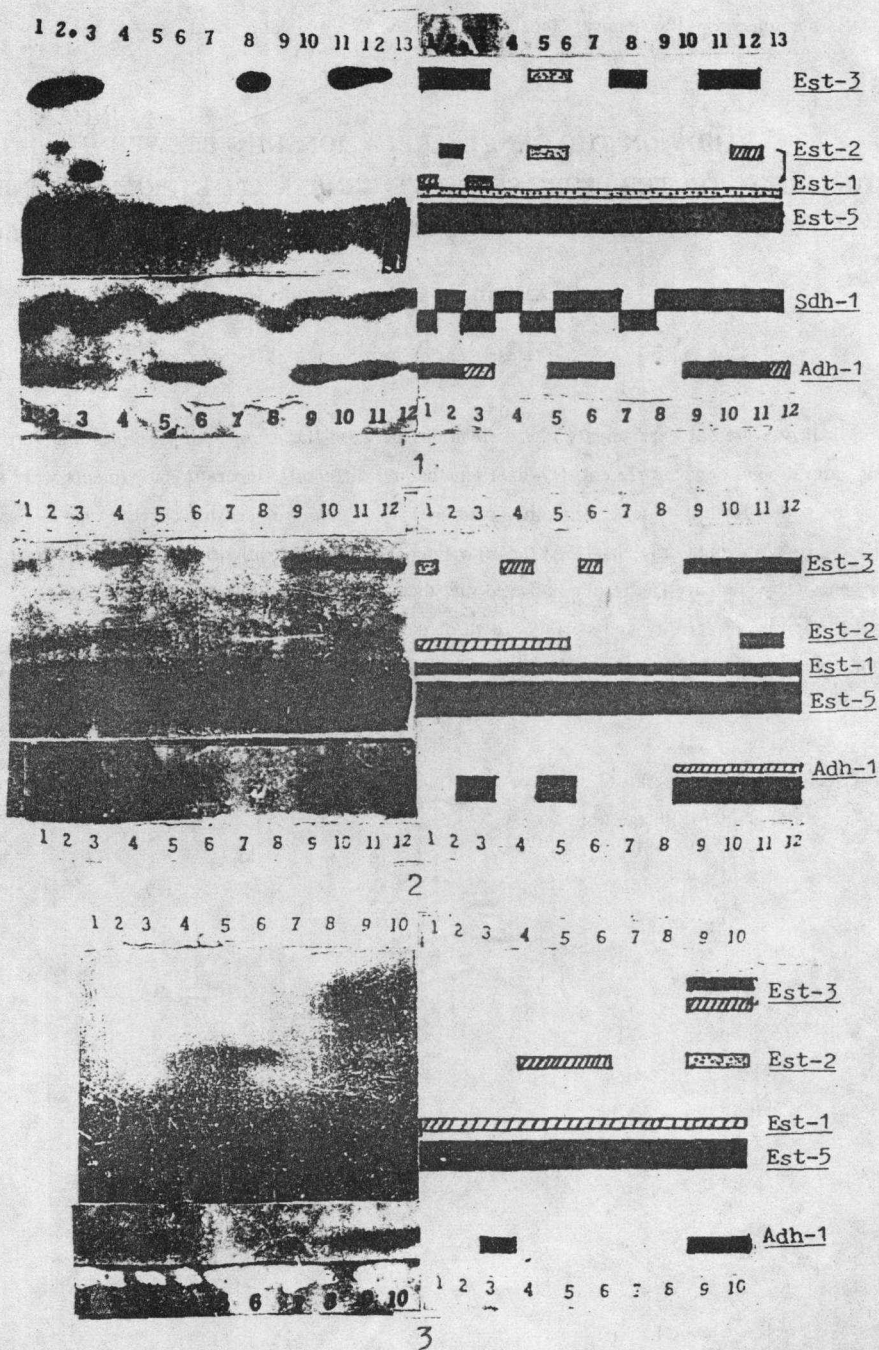
STUDY ON THE GENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN PHOTOPERIOD—TEMPERATURE SENSITIVE GENIC MALE STERILITY GENES AND ISOZYME GENES AND ITS LINKAGE MEASUREMENT IN RICE (*Oryza sativa*)

Hu Xueying Wan Banghui

(Department of Agronomy)

Abstract In the present experiment, the correlations between the changes of isozymes and fertility under different natural conditions, different day-light lengths and different temperature treatments were studied by means of the pollen fertility index, using the photoperiod-temperature sensitive genic male-sterile lines (NongKen58S, Shuang8-2S, N_{88S}). At the same time, the linkage relationships between isozyme genes and sterility genes were tested. The results indicated that there were close relationships between Adh-1, Est-3 and sterility. In the case of fertility and sterility, both of the loci expressed null alleles and active alleles respectively. One of sterility genes linked to Adh-1 with a recombination value of 0, another gene linked to Cat-1 with a recombination value of 29 percent.

Keywords Photoperiod-temperature sensitive genic male—sterility genes in Rice; Isozyme genes; Genetic relationships; Linkage test



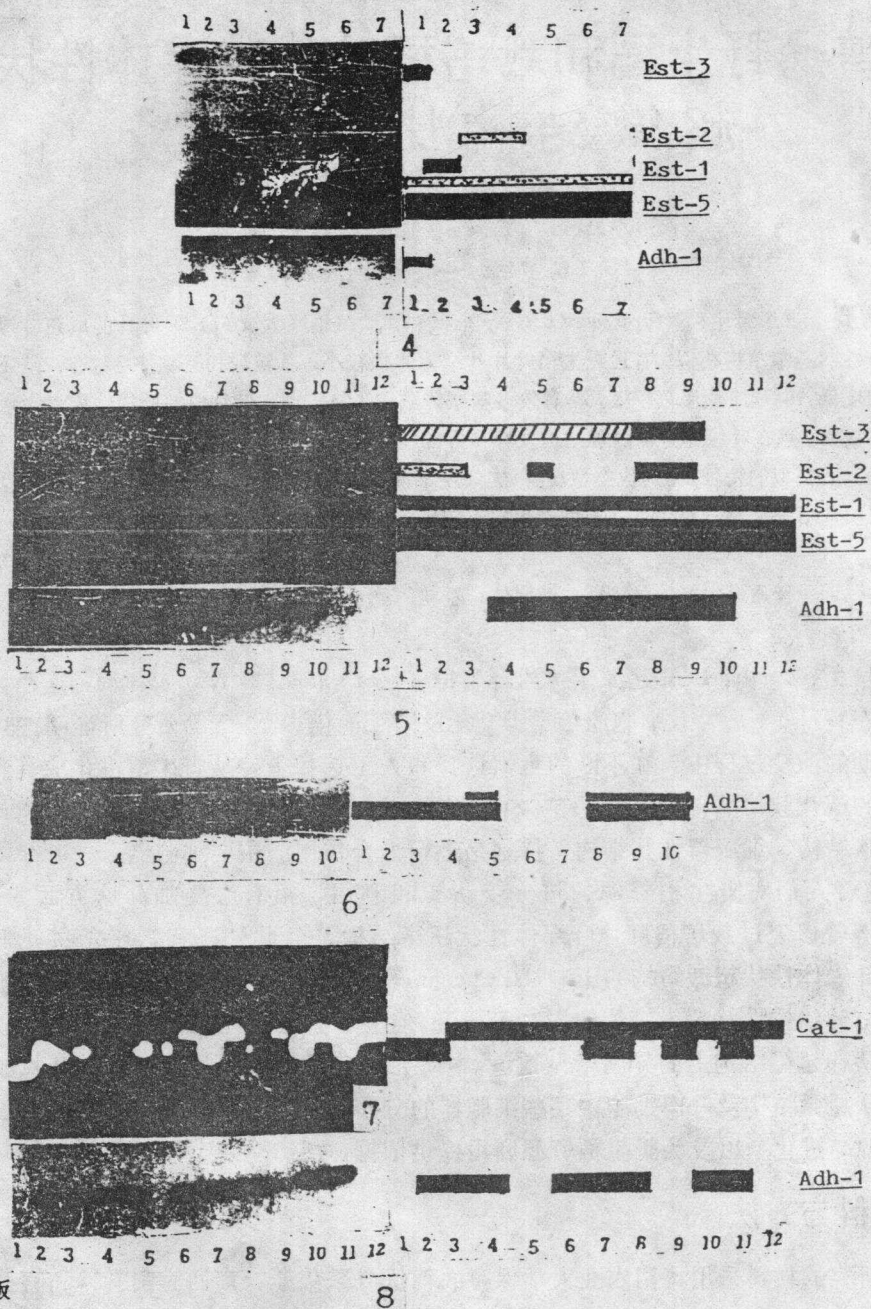


图 版

8

- 1 1988年5月6日所测同工酶谱. 4、7号样为农垦58S
- 2 1988年6月27日所测同工酶谱. 9、10号样为农垦58S; 11号样为 N_{98S} ; 12号样为双8-2S
- 3 1988年8月17日所测同工酶谱. 1、2号样为农垦58S; 4、5、6号样为 N_{98S} ; 9、10号样为 F_2 不育株, 示次级酶带
- 4 1990年4月20日所测同工酶谱. 5、6号样为农垦58S; 3、4号样为 N_{98S} ; 7号样为双8-2S
- 5 1990年6月17日所测同工酶谱. 4、7号样为自然长光农垦58S; 8、9号样为自然长光 N_{98S} ; 11、12号样为短光农垦58S
- 6 不同温度处理同工酶谱. 6号样为长光中温; 7号样为长光低温; 8、9、10号样为长光高温
- 7和8 农垦58S/02428 F_2 群体同工酶分离