

水稻细胞质雄性不育恢复系 ZSP-1 恢复基因的初步定位

杨存义¹, 陈乐天¹, 陈芳远², 刘耀光¹

(1 华南农业大学生命科学院, 广东 广州 510642; 2 广西大学水稻研究所, 广西 南宁 530005)

摘要: 调查了用细胞质雄性不育新恢复系 ZSP-1 配制的杂交组合珍汕 97A/ZSP-1 和星 A/ZSP-1 的 F_1 结实率及 F_2 个体花粉育性, 发现恢复系 ZSP-1 的恢复性是由 2 对独立遗传基因控制. 在此基础上, 选用了与野败型雄性不育恢复基因 *Rf-3* 和 *Rf-4* 紧密连锁的 RFLP 标记对 2 个 F_2 群体进行连锁分析, 发现 ZSP-1 具有的 2 个恢复基因与这些标记紧密连锁, 初步把 ZSP-1 的恢复基因定位于 *Rf-3* 和 *Rf-4* 区域.

关键词: 水稻; 恢复基因; 基因定位; RFLP 分析

中图分类号: Q789

文献标识码: A

杂交水稻对我国粮食增产做出了巨大的贡献, 目前杂交水稻的种植面积已占水稻种植面积的 50% 以上. 在三系和两系杂交水稻强优势组合选育过程中, 优良恢复系的选育起着关键作用^[1]. 但现有的恢复系亲缘关系近, 遗传背景单一, 限制了水稻杂种优势的利用^[2]. 为了充分利用杂种优势, 有必要拓宽杂交水稻的亲本来源, 丰富其遗传背景. 空间诱变因其变异幅度大, 产生的变异类型丰富已被我国科学家应用于多种作物新种质材料的创制中^[3]. 广西大学从水稻空间诱变材料中选育出多个野败型细胞质雄性不育恢复系, 并做了初步遗传学分析^[4], 但这些材料的恢复基因的数目和染色体位置尚不清楚. 本研究是利用分子标记技术研究其中的 1 个恢复系 ZSP-1, 以阐明其恢复基因的数目及与目前报道的主要野败型细胞质雄性不育恢复基因的关系.

1 材料与方法

1.1 水稻材料和性状考察

用 ZSP-1 分别与野败型雄性不育系珍汕 97A、星 A 杂交, 获得的杂交 F_1 , 1999 年下半年在广西大学试验田种植, 套袋调查结实率. 杂交 F_2 代于 2000 年上半年在华南农业大学试验田种植, 抽穗时逐株取颖花, 用 I_2 -KI 染色观察花粉育性.

1.2 RFLP 分析

采收完全不育的植株和 20 株可育株叶片, 按 CATB 法抽取 DNA, 进行 RFLP 分析. RFLP 分析按 Liu 等^[5]的方法进行, Southern 杂交信号检测用 FX 分子磷屏系统检测. 选用的限制性内切酶为 *Bam*HI、*Bgl* II、*Eco*RI、*Eco*RV、*Sca*I、*Hind*III、*Xba*I、*Dra*I、*Xba*I, 选用的探针位于第一染色体的 *Rf-3* 位点和位于第十染色体的 *Rf-4* 位点区域, 探针来源于美国康乃尔大学、日本 RGP 和华南农业大学遗传工程研究室创建的亚克隆片段.

2 结果与分析

2.1 F_1 结实率和 F_2 育性分离

F_1 经田间抽样 15 株调查珍汕 97A/ZSP-1 结实率为 95%, 星 A/ZSP-1 结实率为 84%, 表明突变系 ZSP-1 具有较强的恢复能力.

F_2 植株花粉经 I_2 -KI 染色检查, 发现 2 个群体的完全不育植株花粉表现为典败. 在 1 056 株珍汕 97A/ZSP-1 的 F_2 群体中完全不育株为 71 株, 890 株星 A/ZSP-1 的 F_2 群体中完全不育株为 46 株(表 1). 经 χ^2 检测, 表明 ZSP-1 对野败型细胞质雄性不育性具有 2 对独立遗传的显性恢复基因.

2.2 亲本多态性分析

选用 *Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*RV、*Sca* II、*Hind* III、*Xba*I、*Dra*I 等限制性内切酶消化珍汕 97A、星 A 和

ZSP-1 的 DNA, 电泳后转到 Hybond N⁺ 杂交膜上. 选用已知的 *Rf*-3 和 *Rf*-4 紧密连锁区域的 DNA 探针做 RFLP 分析 (表 2). 结果发现 6 个标记在珍汕 97A/ZSP-1 和星 A/ZSP-1 组合有多态性.

表 1 珍汕 97A/ ZSP-1 和星 A/ ZSP-1 的 F₂ 群体育性分离状况

Tab. 1 The segregation of pollen fertility in F ₂ populations derived from crosses Zhenshan 97A/ ZSP-1 and Xing A/ ZSP-1					
组合 cross	总株数 No. of plant	可育株数 No. of fertile (F)	不育株数 No. of sterile (S)	χ^2 15F:1S	$\chi^2_{0.95(1)}$
珍汕 97A/ ZSP-1 Zhenshan 97A/ ZSP-1	1 056	985	71	0.422 1	3.841 5
星 A/ ZSP-1 Xing A/ ZSP-1	890	844	46	1.776	3.841 5

表 2 *Rf*-3 和 *Rf*-4 区域的探针在珍汕 97A/ ZSP-1 和星 A/ ZSP-1 组合的 RFLP 探测

Tab. 2 RFLPs detected between parents of crosses Zhenshan97A/ ZSP-1 and XingA/ ZSP-1 using DNA markers closely linked to <i>Rf</i> -3 and <i>Rf</i> -4							
探针 ¹⁾ probe	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RV	<i>Sca</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I
Y1-09	+	—	+	—	—	—	—
Y2-20	—	—	—	—	—	—	—
Y2-17	—	—	—	—	—	—	—
Y2-22	—	—	—	—	—	—	—
Y2-24	—	—	—	—	—	—	—
Y2-33	—	+	+	—	—	+	—
RG532	—	—	—	—	—	+	—
RG140	—	—	—	—	—	—	+
R3192	—	—	—	—	—	—	—
Y3-8	+	—	—	—	+	—	—
RZ500	—	—	—	—	—	—	—
E1	—	+	+	—	—	+	—

1) Y1-09~ R3192 是 *Rf*-3 连锁探针, Y3-8~ E1 是 *Rf*-4 连锁探针; + 表示有多态, — 表示无多态

2.3 F₂ RFLP 分析

为了了解 ZSP-1 与现有恢复系如 IR24 的恢复基因 *Rf*-3 和 *Rf*-4 的关系, 将从 2 个群体获得的完全不育株及 20 株可育株的 DNA 用相应的限制性内切酶酶切, 用华南农业大学遗传工程研究室已确认的 *Rf*-3 和 *Rf*-4 区域的一些多态性单拷贝探针做 RFLP 分析.

RFLP 分析结果发现, *Rf*-3 紧密连锁的分子标记 Y2-33 在星 A/ZSP-1 和珍汕 97A/ZSP-1 杂交组合的 F₂ 中均表现和育性紧密连锁. 124 株完全不育株中, 分子标记带型表现杂合或与恢复系带型一致的个体有 4 株, 20 株高可育株的杂交带型中仅有 2 株和不育系的带型一致. RG 532 和 RG 140 则在调查的 50 株完全不育株中发生重组的个体分别为 2 和 3 株 (图 1). 这表明和 *Rf*-3 紧密连锁的分子标记 Y2-33、RG532 和 RG140 是和突变系中 1 个恢复基因紧密连

锁. 计算各标记和育性之间及各标记之间的连锁值发现该恢复基因位于 RG532 和 Y2-33 之间.

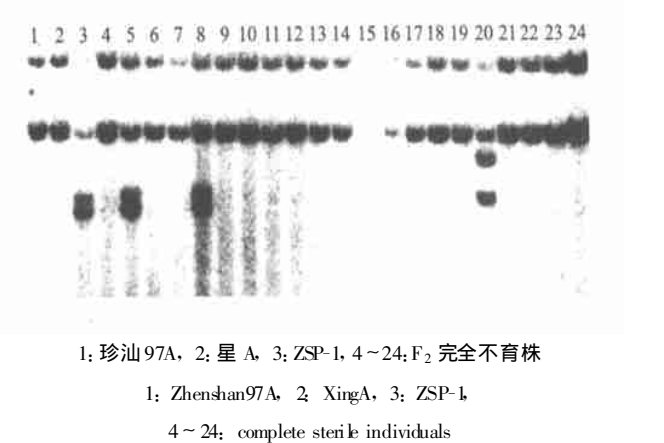


图 1 分子标记 RG532 在星 A/ZSP-1 的 F₂ 代完全不育株中的分离状况

Fig. 1 Segregation of RFLP maker RG532 in F₂ of XingA/ ZSP-1

和 *Rf*-4 紧密连锁的分子标记 Y3-8 和 E1 则在 2 个群体的完全不育株中杂交带型表现为杂合或与恢复系一致的个体分别有 7 和 3 株, Y3-8 在 20 株 F_2 高可育株中和不育系带型一致的仅有 2 株(图 2). 计算的连锁值表明 ZSP-1 的另 1 个恢复基因位于分子标记 Y3-8 和 E1 之间. 这表明 ZSP-1 携带的 2 对恢复基因分别处于第一染色体 RG532 和 Y2-33 之间和第十染色体 Y3-8 和 E1 之间, 和目前已定位的 *Rf*-3、*Rf*-4 处于同一区域. 本文把这 2 个基因暂定为 *Rf*-3(*t*)和 *Rf*-4(*t*)(图 3).

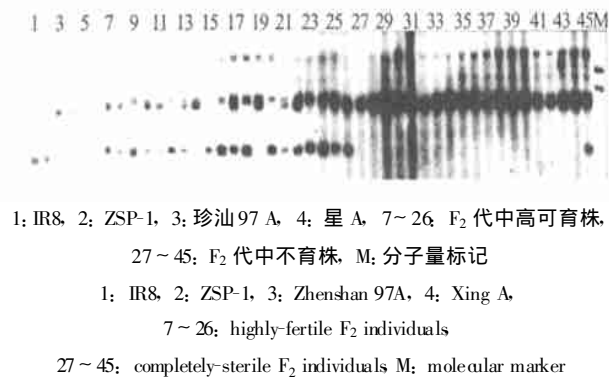


图 2 标记 Y3-8 在星 A/ZSP-1 的 F_2 代中高可育株和完全不育株中的分离状况

Fig. 2 Segregation of RFLP marker Y3-8 in F_2 of XingA/ZSP-1.

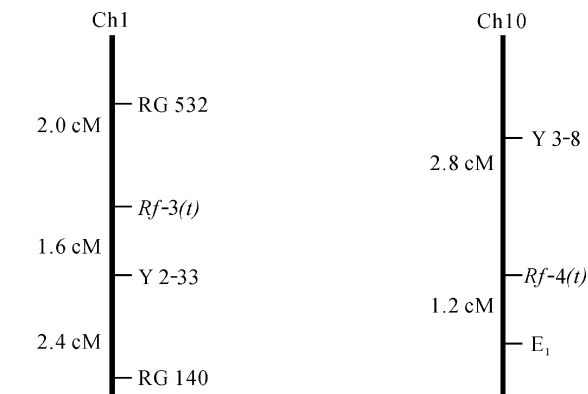


图 3 ZSP-1 的恢复基因初步定位连锁图

Fig. 3 Linkage map of the restorer genes of ZSP-1

3 讨论

3.1 恢复系多种来源对杂种优势利用的重要性

水稻“三系”杂交种的利用使粮食产量大幅度提高, 但由于材料来源有限, 遗传背景狭窄, 导致杂交种遗传基础单一, 杂种优势进一步利用受到限制, 同时现有杂交种生产利用存在一定的风险. 我国生产中推广的籼型不育系的恢复系基本上含有东南亚品种或品系的遗传成分, 其主要恢复源均来源于 IR 系统和测 64-7^[9]. 我国“八五”期间通过杂交选育的 18 个恢复系中近 80% 来自测 64-7 和明恢 63 后代, 20% 来自于 IR 系统, 其中中籼恢复系全部选用明恢 63 作亲本^[7], 因此有必要创造新的恢复系.

陈芳远等^[4]在空间诱变材料后代中选育了一批恢复系, 对野败类型具有较高的恢复能力, 配组的组合表现优秀. 由此可知, 利用诸如空间条件等特殊处理, 可创造一些新的恢复系材料.

3.2 野败型不育系的恢复基因定位

虽然对野败型雄性不育恢复基因的数目认识有 1、2、3 对甚至多基因等多种看法, 但目前大部分研究结果倾向于由 2 对独立基因控制. 在对 2 对恢复基因互作关系的研究中, Bharaj 等^[8]利用初级三体将 IR36 材料中的野败型细胞质雄性不育系的 2 个恢复基因分别定位在第七和第十染色体上, 并且认为第七染色体上的恢复基因的恢复作用强于另一恢复基因的作用. 而李平等^[9]利用 QTL 分析对珍汕 97A 座位恢复性进行研究, 认为有 8 个基因座位与育性恢复有关. 其中 2 个基因座位起主要作用, 分别位于第三、第四染色体上. Zhang 等^[10]以不育系珍汕 97A 为轮回亲本, 以 IR24 为恢复基因供体, 经过多代回交选择, 建立了具有 1 对及 2 对恢复基因的近等位基因系. 并将这 2 对恢复基因重新命名为 *Rf*-3 和 *Rf*-4, 并且通过 RAPD 及 RFLP 分析, 将 *Rf*-3 基因定位于第一染色体上分子标记 RG 532 和 RG140 之间. 张群宇等^[11]利用张桂权教授提供的以 IR24 为恢复基因供体的等基因系材料在第十染色体上找到了 2 个和目的基因 *Rf*-4 连锁的分子标记 A10 和 Y3-8, 并推测 *Rf*-4 基因位于 2 个 YAC 克隆(Y4892 和 Y2111)附近, 其结果表明 *Rf*-4 基因确实是定位在第十染色体上. Tan 等^[12]利用 RD21//GD21/TR24 杂交组合材料研究认为, 控制细胞质雄性不育系的 2 个恢复基因都位于第十染色体上, 但这 2 个恢复基因位点的效应大小不一样. 姚方印等^[13]利用珍汕 97A 和明恢 63 的 F_2 群体将 *Rf*-3 基因定位于第一染色体, 将另一个恢复基因定位于第十染色体.

本研究选用了 *Rf*-3 和 *Rf*-4 区域的部分 RFLP 探针对恢复系 ZSP-1 进行了初步鉴定, 发现 ZSP-1 也有 2 个主要显性恢复基因, 且位于和 *Rf*-3、*Rf*-4 相同区域. 但由于所用的 F_2 群体较小和探针数目的限制, 未能作出精细定位, 它们与 *Rf*-3 和 *Rf*-4 的等位关系需进一步研究.

参考文献:

[1] 吴京华, 廖伏明, 罗闰良. 中国水稻杂种优势利用的现状和进展 J. 世界农业, 1999 (8): 20—22.

[2] 张瑞祥, 廖家槐, 张红林, 等. 中国水稻杂种优势利用现状及对策 J. 江西农业大学学报, 1998 20(2): 223—226.

[3] 陈芳远, 蒋兴村, 卢升安, 等. 空间条件对水稻遗传性的影响[J]. 中国水稻科学, 1994, 8(1): 1—8.

[4] 陈芳远, 卢升安, 易小平, 等. 空间条件诱发粳稻品种对胞质雄性不育恢复突变和亲粳突变研究[J]. 空间科学学报, 1996 (增刊): 83—88.

[5] LIU Y G, MORI N, TSUNEWAKI K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. I: Genomic library construction and RFLP analysis in common wheat[J]. Jpn J Genet, 1990, 65: 367—380.

[6] 陆贤军, 任光俊, 李勤修, 等. 粳型杂交水稻恢复系选育研究进展[J]. 西南农业学报, 1998, 11: 58—62.

[7] 王三良, 许 可. 我国粳型杂交水稻育种现状、问题与对策[J]. 杂交水稻, 1996 (3): 1—4.

[8] BHARAJ T S, VIRMANI S S, KHUSH G S. Chromosome location of fertility—restoring genes for wild abortive cytoplasmic male sterility using primary isomies in rice[J]. Euphytica, 1995, 83: 169—173.

[9] 李 平, 周开达, 陈 英, 等. 利用分子标记定位水稻野败型核质互作雄性不育恢复基因[J]. 遗传学报, 1996, 23(5): 357—362.

[10] ZHANG G, BHARAJ T S, LU Y, et al. Mapping of *Rf*-3 nuclear fertility-restoring gene for WA-cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 27—33.

[11] 张群宇, 刘耀光, 张桂权, 等. 野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf*-4 的分子标记定位[J]. 遗传学报, 2002, 29(11): 1001—1004.

[12] TAN X L, VANAICHIT A, AMORNSILPA S, et al. Genetic analysis of rice CMS-WA fertility restoration based on QTL mapping[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 994—999.

[13] YAO F Y, XU C G, YU S B, et al. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 1997, 98: 183—187.

Mapping of Rice Fertility Restorer Genes for Cytoplasmic Male Sterility

Detected in a Restorer Line ZSP-1

YANG Cun-yi¹, CHEN Le-tian¹, CHEN Fang-yuan², LIU Yao-guang¹

(1 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Rice, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The pollen fertility of F₂ individuals of crosses Zhenshan 97A/ZSP-1 and Xing A/ZSP-1 was investigated. The segregation ratio of fertile to sterile plants was fit to 15 :1. The results show that fertility restoration of the cytoplasmic male sterility in these crosses was controlled by two independent restorer genes. The RFLP markers, that are linked closely to the known restorer genes *Rf*-3 and *Rf*-4 for WA-CMS, were used to map the restorer genes found in the restorer line ZSP-1. The results of linkage analysis indicated that the restorer genes in ZSP-1 were located in the same regions of *Rf*-3 and *Rf*-4.

Key words: rice; restorer gene; mapping; RFLP analysis

【责任编辑 柴 焰】