

水稻 F_1 花粉不育基因 $S-e$ 的初步鉴定

朱文银, 李文涛, 丁效华, 张泽民, 曾瑞珍, 朱海涛, 张桂权

(广东省植物分子育种重点实验室, 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要: 选用分布于水稻 12 条染色体上 74 个多态性 SSR 标记, 对 E47-1/广陆矮 4 号的 F_2 分离群体进行偏态分离分析. 结果表明, 9 个 SSR 标记的分离显著或极显著地偏离了预期的孟德尔比例 (1:2:1). 其中, 7 个 SSR 标记基因型偏向于籼型, 2 个标记偏向杂合型, 没有发现偏向粳型的标记. 通过对第 6 和第 12 染色体上 4 个 SSR 标记基因型与 F_2 植株花粉育性的初步分析, 表明位于第 12 染色体上 SSR 标记 RM19 ~ RM453 区域附近存在 1 个 F_1 花粉不育基因, 定名为 $S-e$. 这一结果为分子定位该基因奠定了基础.

关键词: 水稻; SSR 标记; 偏态分离; F_1 花粉不育性

中图分类号: S511; Q75

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)01-0001-05

Preliminary Identification of F_1 Pollen Sterility Gene $S-e$ in *Oryza sativa*

ZHU Wen-yin, LI Wen-tao, DING Xiao-hua, ZHANG Ze-min,

ZENG Rui-zhen, ZHU Hai-tao, ZHANG Gui-quan

(Guangdong Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture,

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Seventy four SSR polymorphism markers distributed on twelve chromosome in rice between a *japonica* line E47-1 and an *indica* variety Guangluai4 had been selected to detect the distorted segregation in the E47-1/GLA F_2 separate population. The results showed that nine SSR markers displayed significant deviation from the expected Mendelian ratio (1:2:1) at 5% or 1% level. Of these, seven SSR markers tended to *indica* genotypes and two markers inclined to the heterozygote. The distorted segregation at the loci RM19 and RM453 on chromosome 12 was found to be correlation with the F_1 pollen sterility in the F_2 population. Hereby, It suggested that there was a gene for F_1 pollen sterility on the region of RM19-RM453 on chromosome 12. The locus for F_1 pollen sterility is named $S-e$. The result will be significant foundation for gene ovientation.

Key words: *Oryza sativa*; SSR markers; distorted segregation; F_1 pollen sterility

栽培稻 *Oryza sativa* L. 分籼稻和粳稻 2 个亚种, 籼粳亚种间具有强大的杂种优势, 但 F_1 的低育性限制了籼粳间的遗传交流和杂种优势的利用. 雌配子不育和雄配子不育是引起 F_1 低育性的主要原因. Ikehishi 等^[1] 认为 F_1 低育性主要受 $S-5$ 座位的复等位基因 $S-5^n$ 、 $S-5^i$ 和 $S-5^j$ 控制. 当 S_5^n 与 S_5^i 或 S_5^n 和 S_5^j

结合, 或等位基因纯合时均表现可育, 当 S_5^i 和 S_5^j 结合时, 则带有 S_5^j 的雌配子发生部分败育, 该座位已经被定位到 40 kb 的范围内^[2]. 随着研究的深入, 更多的雌性不育座 $S-7$ 、 $S-8$ 、 $S-9$ 、 $S-15$ 、 $S-16$ 、 $S-17$ 等被发现和分子定位^[3-5]. 张桂权等^[6-10] 系统地研究了水稻杂种不育性, 提出了特异亲和性学术观点. 认为杂

收稿日期: 2007-03-05

作者简介: 朱文银 (1975—), 男, 博士, 现在江苏省农业科学院博士后流动站工作; 通讯作者: 张桂权 (1957—), 男, 教授, 博士, E-mail: gqzhang@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30600390)

种的不育主要表现为花粉的不育,并且至少由 $S-a$ 、 $S-b$ 、 $S-c$ 、 $S-d$ 、 $S-e$ 和 $S-f$ 共 6 个 F_1 花粉不育基因座位控制;在单个座位上,等位基因分化为 S^i 基因和 S^j 基因; F_1 花粉不育基因的遗传方式符合单座位孢子体-配子体互作模式,当这些座位的基因型纯合时,花粉表现正常可育,当杂合时,带 S^j 基因的雄配子败育. 至今为止, $S-a^{[11]}$ 、 $S-b^{[12]}$ 、 $S-c^{[13]}$ 和 $S-d^{[14]}$ 已完成了分子定位, $S-b^{[15]}$ 和 $S-c^{[16]}$ 也已经完成了物理作图. 水稻粳粳 2 个亚种间杂交,杂种后代的一些性状常常偏离孟德尔遗传规律而呈偏态分离^[17-18]. Lytle^[19] 认为配子的选择性受精、雌雄配子的败育和合子的败育等均可导致偏态分离的发生. Cheng^[20] 认为尽管互补基因、重复基因、染色体异常、竞争性受精等都能引起偏态分离现象,但配子体基因的存在才是引起偏态分离的主要原因. 水稻杂种不育性的单座位孢子体-配子体互作模式表明,水稻的杂种不育性导致了偏态分离^[1,7]. 一些学者^[11-14,16] 在研究粳粳杂种 F_1 花粉不育基因时也都发现与 F_1 花粉不育基因座位连锁的分子标记在 F_2 分离群体中表现出严重的偏态分离,并且偏态分离方向都是一致的,均表现出粳型基因型偏多的偏粳分离. 本研究利用 SSR 分子标记对粳粳杂交 F_2 群体进行全基因组检测.

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为水稻粳型品系 E47-1 和粳型品种广陆矮 4 号,其中 E47-1 为台中 65 的近等基因系. 2001 年早季,选用粳型品系 E47-1 为母本,广陆矮 4 号为父本进行稻穗离体室内杂交试验,获得 F_1 种子,晚季种植 F_1 获得 F_2 种子. 2002 年早季种植 F_2 种子构建 F_2 分离群体,用于 SSR 标记的偏态分离分析. 所有田间试验均在华南农业大学农学院教学实验农场进行.

1.2 分子标记的利用

研究中所用到的分子标记均为 SSR 标记,共 116 对^[21].

1.3 DNA 的提取及 PCR 扩增

DNA 的提取按 SDS 提取法进行. PCR 扩增每管 20 μ L 反应体系,包括 0.15 μ mol/L SSR 引物、200 μ mol/L dNTP、1 $\times$ PCR 反应缓冲液、50~100 ng 模板 DNA、1U Taq 酶;反应程序为:94 $^{\circ}$ C DNA 变性 5 min、循环(94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min)35 次、72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.

1.4 电泳、银染和结果记录

扩增出的 PCR 产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳:电压 250 V,室温下电泳约 3 h,取出凝胶银染,记录带型的结果或凝胶成像.

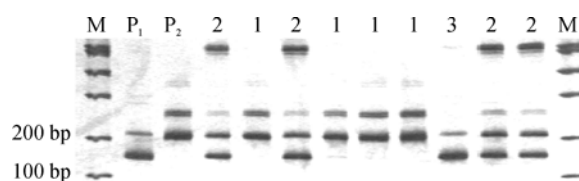
1.5 花粉育性检测

花粉育性的检测采用 I_2 -KI 溶液染色法:抽穗期在单株主穗的中上部枝梗中,于开花前采集当天即将开放的顶花置于 FAA 液 [$V(\varphi = 70\%$ 的乙醇): V (冰乙酸): V (甲醛) = 89:6:5] 中保存. 将同一颖花的全部 6 个花药挤出花粉粒并用 1% I_2 -KI 溶液染色,每朵颖花取 3 个代表性的视野在显微镜下观察,每株观察 3 朵颖花,共观察 9 个视野. 统计不育花粉和可育花粉的数目,算得可育花粉率,即花粉育性. 计算方差时,将百分率转换成反正弦,再进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 SSR 标记在亲本间的多态性

利用分布于水稻 12 条染色体上的 116 个 SSR 标记对 2 个亲本进行多态性筛选,其中 101 个 SSR 标记在亲本基因组间扩出的片段具有多态性(图 1),15 个 SSR 标记在亲本间无多态性. 这 101 个 SSR 标记分布于水稻的 12 条染色体上(图 2).



P_1 : E47-1; P_2 : 广陆矮 4 号; 1: 与广陆矮 4 号带型相同的纯合型; 2: 杂合型; 3: 与 E47-1 带型相同的纯合型, M: marker

P_1 : E47-1; P_2 : Guangluai 4; 1: genotype of Guangluai 4; 2: heterozygous; 3: genotype of E47-1, M: marker

图 1 SSR 标记 RM19 在 E47-1/广陆矮 4 号 F_2 群体中的带型
Fig. 1 The band patterns of RM19 in E47-1/Guangluai 4 F_2 population

2.2 SSR 标记在 F_2 群体的偏态分离

从 101 个 SSR 标记中选取 74 个多态性好的 SSR 标记对 F_2 群体随机取到的 40 个植株进行 SSR 标记分离的初步分析(图 2). 表 1 列出了各 SSR 标记在 F_2 群体中的分离. 卡方测验表明,9 个 SSR 标记严重偏离了理论比例,它们分别位于第 3、6、7、10、11 和 12 染色体上. 其中,4 个 SSR 标记达到显著水平,5 个标记达到了极显著水平. 9 个存在偏态分离的标记中,7 个标记均偏向于粳型,2 个标记显著地偏向杂合型,没有偏向粳型的标记. 在第 6、11 和 12 染色体中均有 2 个相邻的标记存在偏态分离. 其中

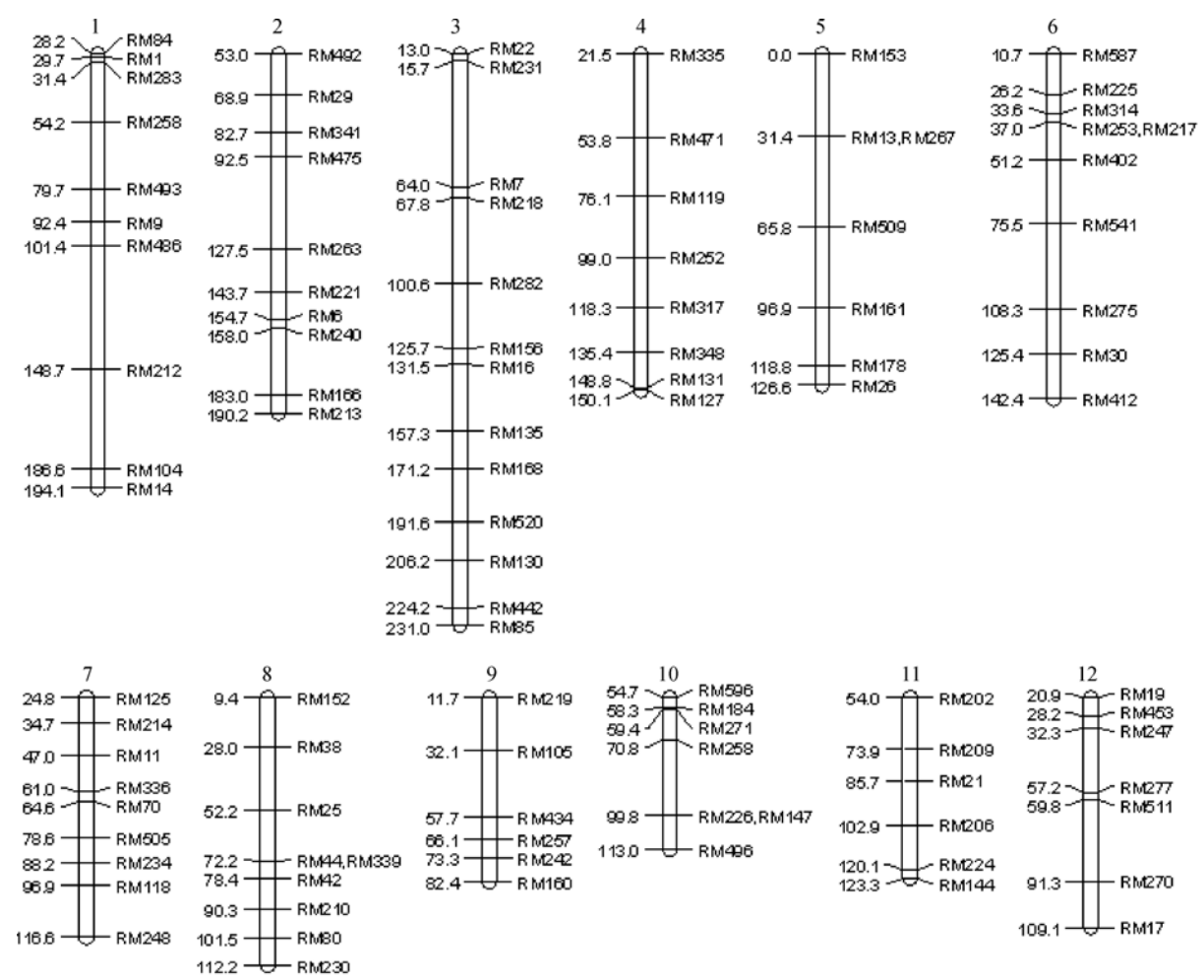


图 2 101 个亲本间多态性的 SSR 标记在水稻 12 条染色体上的分布

Fig.2 Distribution of 101 polymorphic SSR markers on rice chromosomes

表 1 9 个 SSR 标记在 E47-1/广陆矮 4 号 F₂ 群体中的偏态分离¹⁾

Tab.1 Distorted segregation of 9 SSR markers in E47-1/Guangluai 4 F₂ population

染色体 chromosome	SSR 标记 SSR marker	样本数 sample	基因型 genotype			$\chi^2(1:2:1)$
			II	IJ	JJ	
3	RM168	49	22	11	7	19.35 **
6	RM253	40	17	18	5	7.60 *
	RM314	40	16	19	5	6.15 *
7	RM125	38	8	28	7	9.37 **
10	MR596	40	1	35	4	22.95 **
11	RM224	39	17	16	6	7.46 *
	RM144	40	17	17	6	6.95 *
12	RM19	40	17	22	1	13.20 **
	RM453	39	18	17	4	10.70 **

1) II 为广陆矮 4 号基因型;IJ 为杂合型;JJ 为 E47-1 基因型;* 和 ** 分别表示在 5% 和 1% 水平上差异显著

RM253 和 RM314 相距 3.4 cM;RM224 和 RM144 相距 3.1 cM;RM19 和 RM453 相距 7.3 cM.

2.3 水稻 F₁ 花粉不育基因的初步鉴定

根据单株在 SSR 标记基因座上基因型的不同,将 F₂ 群体中 167 个单株分为标记基因型纯合体和标

记基因型杂合体 2 种类型,分析了第 6、12 染色体偏态分离区段 4 个 SSR 标记的基因型与 F₂ 群体花粉育性之间的关系,结果见表 2. 从表 2 可以看出,对于第 6 染色体上的 2 个标记,F₂ 群体中 RM253 的纯合体有 87 株,平均花粉育性为 58.41%,杂合体有 80

株,平均花粉育性为 60.99%,标记 RM314 的纯合体与杂合体的平均花粉育性相差也只有 3.02%。U 测验表明,第 6 染色体上标记 RM253 和 RM314 的纯合体与杂合体之间的花粉育性差异均不显著。对于第 12 染色体上的 2 个标记, F_2 群体中 RM19 的纯合体有 83 株,平均花粉育性为 70.23%,杂合体有 84 株,平均花粉育性为 49.86%,二者的花粉育性相差达 20.37%;标记 RM453 的纯合体比杂合体的平均花粉

育性也高 16.87%。U 测验表明,第 12 染色体上标记 RM19 和 RM453 的纯合体与杂合体之间的花粉育性差异均达极显著水平,说明花粉育性与植株的标记基因型高度相关。由此可见,水稻第 12 染色体上标记 RM19 和 RM453 区域可能存在 1 个 F_1 花粉不育基因座位,使得该区域的标记基因型出现了偏态分离,同时导致了 F_1 花粉不育性的出现。

表 2 F_2 群体中 4 个 SSR 标记的基因型与花粉育性的关系¹⁾

Tab. 2 Correlation between genotype of SSR markers and pollen fertility in the F_2 population

染色体 chromosome	SSR 标记 SSR marker	基因型 genotype	株数 plant number	平均花粉育性 pollen fertility/%	U 测验 U test
6	RM253	homozygous(II, JJ)	87	58.41	0.82
		heterozygous(IJ)	80	60.99	
	RM314	homozygous(II, JJ)	78	57.95	0.93
		heterozygous(IJ)	89	60.97	
12	RM19	homozygous(II, JJ)	83	70.23	7.77 *
		heterozygous(IJ)	84	49.86	
	RM453	homozygous(II, JJ)	78	68.63	5.42 **
		heterozygous(IJ)	89	51.76	

1) II 为广陆矮 4 号基因型; IJ 为杂合型; JJ 为 E47-1 基因型; * 和 ** 分别表示在 5% 和 1% 水平上差异显著

3 讨论

张桂权等^[6-10]系统地研究了水稻杂种不育性,提出了特异亲和性学术观点。认为杂种的不育主要表现为花粉的不育,并且至少由 *S-a*、*S-b*、*S-c*、*S-d*、*S-e* 和 *S-f* 共 6 个 F_1 花粉不育基因座位控制。至今为止, *S-a*^[11]、*S-b*^[12]、*S-c*^[13] 和 *S-d*^[14] 已完成了分子定位, *S-b*^[15] 和 *S-c*^[16] 也已经完成了物理作图。本研究利用 E47-1/广陆矮 4 号 F_2 分离群体,通过水稻全基因组范围内偏态分离标记的检测,在第 12 染色体上发现了 1 个偏态分离区,并认为该偏态分离区存在 1 个 F_1 花粉不育基因。由于该基因所在的染色体与已定位的 *S-a*、*S-b*、*S-c* 和 *S-d* 座位所在的染色体均不相同,因此我们把该基因座定名为 *S-e*。该基因的初步鉴定,为进一步定位该基因奠定了基础。

有关水稻偏态分离的认识,经过了一个从简单、外在的表型性状的观察到内在、本质的分子标记鉴定的过程。分子标记偏态分离与育性基因有着密切的关系,这为通过分子标记偏态分离鉴定和定位育性相关基因提供了依据。Xu 等^[22]通过比较 6 个分子标记连锁图上的标记分离情况,发现 17 个异常分离区段,其中 8 个异常分离的染色体区段上在以往的研究中曾鉴别有配子体基因(*ga*)或不育基因(*S*)存在。另外,徐云碧等^[23]利用 54 个 RFLP 标记,发现

粳籼杂种“叶青 8 号/京系 17” F_2 群体有 25 个标记的分离显著或极显著地偏离了预期的孟德尔比例,并在第 12 染色体发现了 1 个偏态分离的染色体热点。Song 等^[24]利用 02428/Nanjing11//Balilla 的 F_1 群体共 202 个真杂种对粳籼杂种的花粉育性、胚囊育性及小穗育性进行了分析,结果在第 5 染色体和第 12 染色体分别鉴定了 *pf5* 和 *pf12* 这 2 个 QTL,它们都能引起 F_1 杂种花粉的败育。*pf12* 被定位于分子标记 RM19 和 RM247 之间,这一区域和本实验定位的 *S-e* 座位相距很近,但二者是否为等位基因,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] IKEHASHI H, ARAKI H. Genetics of F_1 sterility in remote crosses of rice (*Oryza sativa* L.) [M] // IRRI. Rice Genetics, Manila: IRRI, 1986: 119-130.
- [2] QIU S Q, LIU K D, JIANG J X, et al. Delimitation of the wide compatibility gene *S-5ⁿ* to a 40-kb DNA fragment [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1080-1086.
- [3] WAN J, IKEHASHI H. List of hybrid sterility gene loci in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Rice Genet Newslett, 1996, 13: 110-113.
- [4] WAN J, IKEHASHI H. Two new loci for hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 188-190.

- [5] WAN J, IKEHASHI H, HORISUE N. Analysis of genetic loci pollen sterility in remote crosses of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Jpn J Breed, 1997, 47:188.
- [6] 张桂权, 卢永根. 栽培稻(*Oryza sativa* L.) 杂种不育性的遗传研究: I. 等基因 F_1 杂种不育性的双列分析[J]. 中国水稻科学, 1989, 3(3): 97-101.
- [7] 张桂权, 卢永根. 栽培稻杂种不育性的遗传研究: II. F_1 花粉不育性的基因模式[J]. 遗传学报, 1993, 20(3): 222-228.
- [8] 张桂权, 卢永根, 刘桂富, 等. 栽培稻杂种不育性的遗传研究: III. 不同类型品种 F_1 花粉不育性的等位基因分化[J]. 遗传学报, 1993, 20(6): 541-555.
- [9] 张桂权, 卢永根, 张华, 等. 栽培稻(*Oryza sativa*) 杂种不育性的遗传研究: IV. F_1 花粉不育的基因型[J]. 遗传学报, 1994, 21(1): 34-41.
- [10] ZHANG G Q, LU Y G. Genetics of F_1 pollen sterility in *Oryza sativa* [M] // IRRI. Rice Genetics, Manila: IRRI, 1996: 418-422.
- [11] 庄楚雄, 张桂权, 梅曼彤. 栽培稻 F_1 花粉不育基因 $S-a$ 的分子定位[J]. 遗传学报, 1999, 26: 213-218.
- [12] LI W T, ZENG R Z, ZHANG Z M, et al. Mapping of $S-b$ locus for F_1 pollen sterility in cultivated rice using PCR based markers[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(4): 463-467.
- [13] 张泽民, 张桂权. 水稻 $S-c$ 座位的 PCR 标记精细定位及分子标记辅助选择[J]. 作物学报, 2001, 27: 704-709.
- [14] 李文涛. 水稻 F_1 花粉不育基因的物理作图及其遗传分化研究[D]. 广州: 华南农业大学农学院, 2003.
- [15] 李文涛, 曾瑞珍, 张泽民, 等. 水稻 F_1 花粉不育基因座 $S-b$ 的精细定位[J]. 科学通报, 2006, 51(4): 404-408.
- [16] 杨存义, 陈忠正, 庄楚雄, 等. 水稻籼粳杂种不育基因座 $S-c$ 的遗传图和物理图精细定位[J]. 科学通报, 2004, 49: 1273-1277.
- [17] NAKAGAHARA M. Genetic mechanism on the distorted segregation of marker genes belonging to the eleventh group in cultivated rice[J]. Jpn J Breed, 1972, 22: 232-238.
- [18] LIN S Y, IKEHASHI H. A gamete abortion locus detected by segregation of isozyme locus *Est-9* in wide crosses of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 1993, 67: 35-40.
- [19] LYTTLE T W. Segregation distorters[J]. Ann Rev Genet, 1991, 25: 511-557.
- [20] CHENG R, SAITO A, UKAI Y. Estimation of the position and effect of a lethal factor locus on a molecular marker linkage map[J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 494-502.
- [21] TEMNYKH S, PARK W, AYRES N, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 397-712.
- [22] XU Y, ZHU L, XIAO J, et al. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F_2 , backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Gen Genet, 1997, 253: 535-545.
- [23] 徐云碧, 申宗坦, 陈英, 等. 水稻籼粳杂种 F_2 群体中 RFLP 标记的异常分离及其染色体分布[J]. 植物学报, 1995, 37: 91-96.
- [24] SONG X, QIU S Q, XU C G, et al. Genetic dissection of embryo sac fertility, pollen fertility and their contributions to spikelet fertility of intersubspecific hybrids in rice[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 205-211.

【责任编辑 周志红】