

水稻光敏核不育基因 *pm s3* 的精细定位*

李香花 王伏林* 陆青 徐才国

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要 为了进一步研究水稻晚粳品种农垦58转变为光敏核不育水稻农垦58S的突变位点, 并精细定位光敏不育基因 *pm s3*, 我们利用农垦58S/1514杂交组合的 F_1 进行花药培养构建了一个DH群体, 验证了在该群体中光敏不育受 *pm s1*、*pm s3* 两对基因的控制, 并根据分子标记分析选择第12染色体是1514基因型、第7染色体农垦58S基因型的DH系DH80与农垦58S杂交构建一个 *pm s3* 光敏不育单基因分离的群体。根据 F_3 家系的育性分离情况推测出 F_2 的基因型, 结合分子标记分析进一步验证了 *pm s3* 在第12染色体上的位置, 并将其定位在RFLP标记M36和RZ261之间, 与两标记的遗传距离分别为1.5 cM和3.05 cM, 为启动 *pm s3* 区域的染色体步查打下了基础。同时还比较分析了RFLP标记在DH群体及 F_2 群体中的分离情况, 发现第12染色体上 *pm s3* 区域在 F_2 群体中正常分离的多个标记在DH群体中发生了严重的偏分离, 另外还发现DH群体第3、7、11染色体上的标记也发生了偏分离。

关键词 光敏核不育水稻; 花药培养; 偏分离; 基因定位; RFLP标记

中图分类号: S511.032 文献标识码: A

Fine Mapping of PSGMS Gene *pm s3* in Rice (*Oryza sativa* L.)

LIXiang-Hua WANG Fu-Lin* LU Qing XU Cai-Guo

(State Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Hubei, Wuhan, 430070)

Abstract In order to determine the precise location of *pm s3* gene which induce Nongken58 (NK58) to PSGMS Nongken58S (NK58S), a DH population was constructed by culturing F_1 anthers of NK58S/1514. A line DH80, which was only with PSGMS gene *pm s1*, was selected to cross with NK58S for constructing a segregation population only in *pm s3* locus. Segregation of RFLP markers was compared between DH and F_2 populations. And the results showed that several markers close to *pm s3* on chromosome 12 normally segregated in F_2 population showed obviously distorted segregation in DH population. Meanwhile, some markers on chromosome 3, 7 and 11 in DH population also segregated distortedly. The genotypes for every F_3 family were determined by analysis of fertility segregation. And then the location of *pm s3* and distances between RFLP markers and *pm s3* were precisely calculated. The gene *pm s3* is located between M36 and RZ261, but much closer to M36.

Key words PSGMS (photo-sensitive genic male sterile) rice; Anther culture; Marker segregated distortion; Gene location; RFLPs

70年代初在湖北发现的光敏核不育水稻具有长日照条件下表现雄性不育, 短日照条件下能够恢复雄性正常可育的特点^[1], 因而不但在水稻杂交育种中可以“一系两用”: 长日条件下作为不育系配制杂交种子、短日条件下作为保持系自交繁殖, 同时也为探讨植物雄性不育的机理提供了宝贵的生物学材

料。大量的研究表明, 以光敏核不育水稻农垦58 (简称NK58S) 为材料与大多数品种杂交, 后代表现两对基因的分离。将农垦58S与正常农垦58 (简称NK58) 杂交, 后代表现一对基因的分离^[2]。近年光敏核不育水稻的基因定位取得了很大的进展, 分别定位了位于第7和第12染色体上的光敏核不育

* 基金项目: 国家863高科技计划(Z16-02-02)和美国洛氏基金资助。

作者简介: 李香花(1967-), 女, 汉族, 河南遂平人, 高级工程师, 硕士学位, 研究方向: 水稻分子生物学。

* 现在工作单位: 浙江省农业科学院。

Received on (收稿日期): 2001-04-16; Accepted on (接受日期): 2001-07-20

基因 *pm s1*、*pm s3*^[3-6], 并确定了位于第12染色体上的 *pm s3* 是引起 NK58 转变为 NK58S 的突变位点^[6]。

由于光敏不育属于生态不育型, 育性受环境条件影响较大, 最好能有永久群体(如 DH 群体、RL 等)供多年、多点考查, 才能获得准确的表现型数据。同时在大多数组合中光敏不育受两对隐性基因的控制, 两对基因的分离及背景的影响使得难以根据表现型准确判定 *pm s3* 位点的基因型, 而在 NK58S/NK58 组合中又因为背景不分离而无法对 *pm s3* 位点进行定位分析, 所以为了验证并精细定位 *pm s3*, 需构建 *pm s3* 单基因分离而该区域分子标记多型性又较高的新群体。

遗传座位的等位基因的偏分离是较普遍的现象, 人们利用不同的群体^[7-10]发现水稻12条染色体上都存在有分子标记偏分离的区域, 并且大部分偏分离的区域与已知的配子体基因或不育基因相重叠, 因而认为这些区域的偏分离是这些配子体基因或不育基因引起的。Yamagishi^[10]在一个籼×粳组合中发现1、3、7、10、11、12染色体上的一些区域的 RFLP 标记发生了偏分离, 并进而确定了其中位于第1、10染色体上的两个区域与花培能力有关。

本研究利用 NK58S/1514 的杂种进行花药培养获得一个 DH 群体, 同时根据分子标记分析选择理想的 DH 系与 NK58S 杂交构建 *pm s3* 单基因分离的 F₂ 群体及 F₃ 家系, 考查了各群体的育性表现及分子标记在各群体中的分离, 多方验证光敏不育的遗传规律并利用 F₃ 家系对 *pm s3* 基因进行了精细定位。

1 材料和方法

1.1 花药培养及 DH 群体的构建

1996年夏季从 NK58S/1514 杂种植株上选取小孢子处于单核靠边期为主的新鲜稻穗经低温预处理及消毒后, 按照何予卿等^[11]的培养方法进行花药培养及绿苗分化, 得到的绿苗经壮苗后移栽于海南大田, 自然加倍的株系分单株套袋自交收种子, 1997年在武汉正季种植, 将来自同一愈伤组织的材料种植在一起, 通过考查育性、株高、生育期及其它田间性状以及 RFLP 带型等多项指标判定来自同一愈伤组织的绿苗是否来自同一小孢子, 田间性状及室内分析全部一致的所有株系认为来源相同, 反之, 则认为来自不同的小孢子。

1996年花培共得到288丛绿苗(来自同一愈伤组

织的为一丛), 最后成苗161丛。其中染色体加倍的有86丛, 无加倍单株75丛。结合田间性状考查及室内分子标记分析判定我们共得到一个含79个 DH 系的 DH 群体。

1.2 F₂ 群体及 F₃ 家系的构建

在 DH 群体中, 选取育性正常、第12染色体 *pm s3* 区域是1514基因型、第7染色体 *pm s1* 区域是 NK58S 基因型、其它染色体 NK58S 基因型背景较多的株系 DH80 与 NK58S 杂交构建 F₂ 群体, 1998年正季在武汉考查各单株在长日条件下的育性, 冬季移至海南考查短日条件下的育性并套袋自交收种子, 于1999年夏季在武汉种植 F₃ 家系, 每个家系种植20个单株, 秋季考查各株系的育性分离情况。

1.3 育性考查

DH 群体及 F₂ 群体的每个单株随机收取3个稻穗考查其结实率, 同时对 DH 群体及 F₃ 家系在田间目测其育性及是否有育性分离。

1.4 DNA 的抽提及分子标记分析

DH 群体及 F₂ 群体分单株收取叶片, 提取 DNA, 每个样品取 DNA 2.5 μg 分别用 *Bam*H I、*Dra*I、*Eco*R I、*Eco*R V 及 *Hind*III 等五种限制内切酶消化, DNA 的抽提、消化、电泳、转膜及分子杂交均按本室常规方法进行^[12]。RFLP 标记采用 Mei 等^[6]从306个 RFLP 探针^[13,14]中筛选到的分布于水稻12条染色体上的34个在亲本间有多型性的标记对 DH 群体及 F₂ 群体进行分析。其中第1、2、3、4、5、6、8、9染色体上都只有一个标记, 第10、11染色体各有两个、第7染色体上有4个、第12染色体上有18个标记。

2 结果与分析

2.1 DH 群体及 F₂ 群体的育性分离

根据 Mei 等^[5]的研究, NK58S/1514 组合中光敏不育受两对隐性基因的控制, 即位于第7染色体上的 *pm s1* 和位于第12染色体上的 *pm s3*, 理论上该组合 F₁ 在这两个位点上可产生比例相等的4种类型的小孢子, 其中只有 *pm s1pm s3* 类型的小孢子经过花药培养产生的 DH 系才是光敏不育的, 应占 DH 群体的1/4, 其它株系在长日下均应正常可育。1997、1998连续两年我们对 DH 群体的结实率进行了室内考种, 发现育性呈现明显的双峰分布, 以双峰之间的断点为界限, 将群体划分为可育和不育两部分, 二者之间的分离符合 DH 群体两对基因 3·1

的理想分离比(表1), 再次证实了在本组合中光敏不育受两对隐性基因的控制。同时还利用第7染色体及第12染色体上的分子标记对DH 群体的育性进

行了单因子方差分析和双因子方差分析, 进一步证实了分别位于第7和第12染色体上的 *pm s1*、*pm s3* 的存在及它们的效应。

表1 DH 群体及 F₂群体的育性分离
Table 1 Segregation of fertility in DH and F₂ populations

群体 Population	总株数 Total no. of plants	可育株数 No. of fertile plants	不育株数 No. of sterile plants	期望比 Expected ratio	χ^2	P value
DH lines	77	59	18	3:1	0.039	P> 0.75
F ₂	280	206	74	3:1	0.233	P> 0.5

1998年我们还考查了农垦58S/DH80的 F₂群体的育性分布, 同样发现其育性呈现双峰分布, 且育性分离符合一对基因3:1的分离比(表1)。

2.2 利用 F₃家系对 *pm s3*位点的再分析

为了利用更多的信息对 *pm s3*基因进行精细定位, 我们在利用 F₂群体对 *pm s3*分析的同时, 将所有的 F₂稻莩移至海南以考查其育性并收取套袋自交的种子, 于1999年正季在武汉种植其 F₃家系。根据每个家系20个单株的育性表现来判别 F₂单株 *pm s3*位点的基因型: 若20个单株全部可育, 则认为其 *pm s3*位点是纯合可育基因型; 若20个单株中既有可育单株又有不育单株, 则认为其 F₂ *pm s3*位点是杂合的; 若所有单株全部不育, 认为 F₂是纯合不育基因型。据此, 我们发现在226个 F₃家系中共有57个可育家系, 115个分离家系及54个不育家系, 极显著符合1:2:1的一对基因的分离比 ($\chi^2 = 0.1504, P > 0.90$), 不仅与 F₂单株育性十分吻合, 同时还澄清了个别不好判别育性的 F₂单株的育性表现, 通过 F₃家系的分析明确了 F₂的基因型。

根据203个 F₂单株的 RFLP 带型及 F₃家系育性表现推测各 F₂单株 *pm s3*位点的基因型, 比较分析各株系基因型及其两侧分子标记的带型, 利用该群体的所有交换单株(表2)推算出各标记与 *pm s3*的相对位置并计算出各标记与 *pm s3*的遗传距离(图1)。可以看出, *pm s3*位于 RZ261与 M36之间, 其中与 C751有13个交换株系, 与 RZ261有12个交换株系, 而与另一侧的标记 M36之间只有6个交换株系。 *pm s3*与 C751、RZ261及 M36的遗传距离分别为3.31 cM、3.05 cM 和1.50 cM, 从而完成了 *pm s3*的精细定位。同时可以看出由于 F₂极端不育交换株较少, 无法区分其距离基因远近的标记 RZ261和 C751, 在 F₃家系中因发现了一个交换株系而可将二者区别开来, RZ261比 C751更靠近 *pm s3*。

表2 F₃家系中 RFLP 标记与 *pm s3*基因发生交换的所有类型及株系数

Table 2 Types and numbers of F₃ families in which crossover between RFLP markers and *pm s3* gene occurred

F ₂ 育性 Fertility of F ₂ plants	F ₃ 家系育性 Fertility of F ₃ families	株数 No. of plants	分子标记基因型 Genotype of markers		
			C751	RZ261	M36
不育	不育	2	H	H	A
不育	不育	2	A	A	H
可育	可育	4	B	B	H
可育	可育	6	H	H	B
可育	分离	3	B	B	H
可育	分离	1	A	A	H
可育	分离	1	B	H	H

A: 农垦58S 基因型; B: DH80 基因型; H: 杂合基因型 A: Genotype of NK58S; B: Genotype of DH80; H: Heterozygous

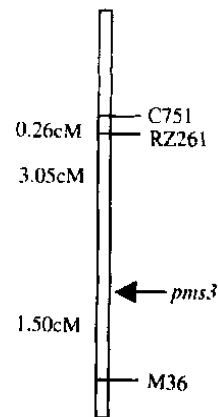


图1 利用NK58S/DH80组合的 F₃家系对 *pm s3*的定位

Fig. 1 The location of *pm s3* determined with F₃ families of NK58S/DH80

2.3 RFLP 标记在DH 群体及 F₂群体中的分离

花培植株来自于 F₁的雄配子, 没有经过雌雄配子的受精作用, 因而在该群体中每个标记均应无杂合带型而是父母本的带型之一, 且应符合1:1的分离比。通过用34个 RFLP 标记对加倍后的花培株系进行分析, 未发现任何株系呈杂合带型, 说明所有

的花培植株都是由小孢子发育而来。χ²测验发现: 第1、2、4、5、6、8、9、10等染色体上的RFLP标记父母本带型出现的比例均符合1:1的理想分离比, 第3、7、11染色体上都检测到一个标记发生了偏分离且全偏向1514基因型, 它们分别是RZ987、C451及RG1094, 而第12染色体上 *pm s3* 区域几乎所有的标记都发生了偏分离, 并且全部偏向NK58S基因型(见表3)。为了分析RFLP标记发生偏分离的原因, 我们又考查了在花培群体中发生严重偏分离的第12染色体上的RFLP标记在NK58S/DH80组合的F₂群体中的分离情况(表3), 结果发现第12染色

体上的所有标记基因型均符合A·H·B=1:2:1的理想分离比, 无一发生偏分离。同时我们查阅了梅明华等(1999, 私人交流)的NK58S/1514组合的F₂群体该区段分子标记的分离情况, 同样发现无一标记发生偏分离, 即在由第12染色体来源相同的亲本配制的两个F₂群体中, *pm s3* 区域的RFLP标记均符合正常的分离比, 只在DH群体中发生了偏分离, 说明该区域的分子标记的偏分离与雌雄配子的选择及合子后选择无关, 而与花培过程对雄配子的选择有关, 即该区域可能存在着与花培有关的基因位点。

表3 RFLP 标记在DH 群体中的偏分离情况

Table 3 Distorted segregation of RFLP markers in DH lines

标记 Markers	染色体 Chromosomes	群体大小 Total no. of plants	株数分布 Plant distribution		期望比 Expected ratio	χ ²	P value
			A	B			
RG341	12	79	57	22	1:1	15.5	P < 0.005
RG457	12	79	60	19	1:1	21.27	P < 0.005
R2708	12	78	55	23	1:1	13.1	P < 0.005
RG543	12	78	50	28	1:1	6.21	p < 0.025
RZ987	3	79	29	50	1:1	5.58	p < 0.025
C451	7	79	29	50	1:1	5.58	p < 0.025
RG1094	11	79	24	55	1:1	12.16	P < 0.005

A: 农垦58S 基因型; B: 1514 基因型; H: 杂合基因型。A: Genotype of NK58S; B: Genotype of 1514; H: Heterozygous

2.4 DH 群体 *pm s1*、*pm s3* 区域分子标记组合的分离情况

由于DH群体中育性表现符合两对隐性基因的理想分离, 而 *pm s3* 区域分子标记却发生了严重的偏分离, 所以我们进一步考查了 *pm s1*、*pm s3* 区域分子标记组合的分离情况。由于 *pm s1*、*pm s3* 分别位于第7和第12染色体上, 二者独立遗传, 因而两区域的分子标记在DH群体中两亲本的带型共有4种组合可能, 且应符合1:1:1:1的分离比。分别以RG477和R2708作为两区域的代表, 我们考查了DH群体中四种组合类型的株数数目(表4), 发现其偏离了理想的分离比例, 但是可育带型组合

(即第7染色体 *pm s1* 区域和第12染色体 *pm s3* 区域至少有一处是亲本1514的带型, 表4中前三项, 13+29+9=51) 与不育带型组合(即 *pm s1* 区域和 *pm s3* 区域均是NK58S的带型, 表4中最后一项)的株数符合3:1的分离比(χ²=1.153, P>0.25), 与DH群体的育性分离结果一致。

3 讨论

光敏不育水稻育性表现不但受光照的调节, 还受到温度等其它环境因素的影响。对于此类性状最好能有多点或多次重复试验相互印证, 才能准确地判定其表现型。F₂群体一般只能考查一季, 虽也可保留稻莩来年重复观察, 但稻莩多次繁殖也会对性状有所影响, 而利用DH群体或F₃家系就可解决这一问题, 可用种子同时多点或多年重复, 保证了数据的可靠性。在本研究中虽然DH群体 *pm s3* 区域分子标记发生了偏分离, 但并未影响到光敏不育基因 *pm s3* 的定位与效应分析, 利用DH群体得到的结果进一步验证了Mei等^[6]利用F₂群体得出的结论。另外光敏不育受两对隐性基因的控制, 在F₂群体中大量的可育单株无法根据其表现型判定其基因

表4 DH 群体 *pm s1*、*pm s3* 区域分子标记组合的分离

Table 4 The segregation of RFLP markers combination on chromosome 7 and 12 in DH population

	RG477	R2708	株数 No. of plants	期望比 Expected ratio	χ ²	P value
基因型	1	B	13	1	13.57 < 0.005	
Genotypes	2	B	29	1		
	3	A	9	1		
	4	A	23	1		

A: 农垦58S 基因型; B: 1514 基因型; A: Genotype of NK58S; B: Genotype of 1514

型,因而只能利用极端不育株中标记与育性有交换的单株计算每个标记与育性的遗传距离,而利用 F_3 家系,所有的家系都可根据其育性分离情况推测其基因型,进而可找出包括全部可育、育性分离及极端不育株系中所有的标记与基因之间发生交换的株系,利用更多的信息定位 $pm\ s3$ 基因,得到更加准确的数据。

花培群体中分子标记的偏分离现象已有多人报道^[7~10],同时与花培能力有关的一些染色体区域也逐渐被确定^[9,10],这些研究大都是利用花培能力差异较大的籼粳组合。本研究利用一粳型组合的不同的分离群体发现在花培群体中发生严重偏分离的第12染色体上的分子标记在 F_2 随机群体中符合正常的分离比。说明DH群体第12染色体上该区域的分子标记的偏分离可能与花培过程对雄配子的选择有关,而与雌雄配子的选择及合子后选择无关,即该区域可能存在着与花培有关的基因位点。与何平等^[9]利用一个籼粳组合的 F_1 经过花培产生DH群体,对DH株系再次花培定位的位于第12染色体上与愈伤诱导有关的一个QTL一致。同时在DH群体中也检测到第3、7、11染色体上的分子标记发生了偏分离。

致谢 本文是在张启发教授的指导下完成的,RFLP探针由美国康奈尔大学及日本水稻基因组计划(RGP)提供,在此表示感谢!

References

- [1] Shi M S (石明松). The discovery and preliminary studies of the photoperiod-sensitive recessive male sterile rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1985, (2): 44~48
- [2] Jin D M (靳德明). Genetics basis of photoperiod-sensitive genic male sterility. In: Li Z B (李泽炳), Jin Z H (金忠恒), Lu X G (卢兴桂), et al eds *Studies on the Photoperiod-sensitive Genic Male Sterility in Rice and Its Utilization in Breeding*. Wuhan: Hubei Science and Technology Press (湖北科学出版社), 1995, 181~252
- [3] Zhang D P (张端品), Deng X A (邓训安), Yu G X (余功勋), et al Chromosome location of photoperiod-sensitive genic male sterile gene. *J Huazhong Agric Univ.* (华中农业大学学报), 1990, 9: 407~419
- [4] Zhang Q F, Shen B Z, Dai X K, et al Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1994, 91: 9675~9679
- [5] Mei M H, Chen L, Zhang Z H, et al $Pms3$ is the locus causing the original photoperiod-sensitive male sterility mutation of Nongken 58s. *Science in China (Ser C)*, 42: 316~322
- [6] Mei M H, Dai X K, Xu C G, et al Mapping and genetic analysis of the genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice using the original mutant Nongken 58s. *Crop Sci*, 1999, 39: 1711~1715
- [7] 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 population in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1997, 253: 535~545
- [8] Guiderdoni E. Genetic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1991, 81: 406~412
- [9] He P (何平), Shen L S (沈立爽), Lu C F (陆朝福), et al Genetic analysis and mapping the anther culture response genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1998, 25 (4): 337~344
- [10] Yamagishi M, Otani M, Higashi M, et al Chromosomal regions controlling anther culturability in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 1998, 103: 227~234
- [11] He Y Q (何予卿), Chen L (陈亮), Xu C G (徐才国). Variability of anther culture and the technology strategies for developing practical photoperiod sensitive male sterile rice. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2000, 26 (6): 879~884
- [12] Liu K D, Wang J, Li H B, et al A genome-wide analysis of wide compatibility in rice and the precise location of the S5 locus in the molecular map. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 809~814
- [13] Causse M A, Fulton T M, Cho Y G, et al Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics*, 1994, 138: 1251~1247
- [14] Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, et al A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet*, 1994, 8: 365~372