

# 爪哇稻 Wanilava 细胞质雄性不育系的创建及 AFLP 指纹图谱分析

陈永军<sup>1</sup> 谢崇华<sup>1</sup> 张景荣<sup>2</sup> 郑文静<sup>2</sup> 胡尚连<sup>1</sup> 魏 炘<sup>2</sup> 王琦琳<sup>2</sup> 杞从婷<sup>2</sup> 刘永胜<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621002; <sup>2</sup>四川大学 生命科学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610064; \* 通讯联系人, E-mail: liuyongsheng1122@yahoo.com.cn)

## Breeding of Cytoplasmic Male Sterile Line Derived from *Oryza sativa* subsp. *javanica* cv. Wanilava and Its AFLP Fingerprints

CHEN Yong jun<sup>1</sup>, XIE Chong hua<sup>1</sup>, ZHANG Jing rong<sup>2</sup>, ZHENG Wen jing<sup>2</sup>, HU Shang lian<sup>1</sup>, WEI Xin<sup>2</sup>, WANG Qi lin<sup>2</sup>, QI Cong ting<sup>2</sup>, LIU Yong sheng<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science & Engineering, Southwest University of Science & Technology, Mianyang 621002, China; <sup>2</sup>Key Laboratory for Bioresource and Ecoenvironment, Ministry of Education; College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

\* Corresponding author, E-mail: liuyongsheng1122@yahoo.com.cn)

**Abstract:** The characteristics of a novel cytoplasmic male sterile (CMS) line derived from *Oryza sativa* subsp. *javanica* cv. Wanilava (denominated as JW type) were analyzed. Two sets of isonucleus alloplasmic lines (273D, 273JW and 273B; 803WA, 803JW and 803B, respectively) were bred by advanced backcrosses using the maintainer lines (273B and 803B, respectively) as recurrent parents, each containing individual cognate nucleus with different cytoplasm. Considerable genetic diversities between CMS JW (CMS from *javanica* cv. Wanilava) and CMS WA (CMS of wild abortive from *O. rufipogon*) or CMS D (CMS from African indica cv. Dissi) were revealed by AFLP. The differential fragments from the cytoplasm were isolated.

**Key words:** cytoplasmic male sterility; isonucleus alloplasmic lines; amplified fragment length polymorphism; fingerprint; javanica rice

**摘 要:** 初步鉴定了爪哇稻 Wanilava 细胞质雄性不育系的特征特性,并以 2 套水稻 (*Oryza sativa*) 同核异质材料 273JW (爪哇型胞质不育系)、273D (D 型胞质不育系) 及其对应的保持系 273B, 803JW (爪哇型胞质不育系)、803WA (野败型胞质不育系) 及其对应的保持系 803B 为研究对象,利用 AFLP 分子标记技术构建了 JW 型不育胞质的指纹图谱,分离了 JW 型胞质与野败型胞质及保持系的差异片段。

**关键词:** 细胞质雄性不育; 同核异质材料; 扩增片段长度多态性; 指纹图谱; 爪哇稻

中图分类号: Q943; S511.035.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2008)01-0028-05

核质互作型细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是植物杂种优势利用最重要的工具之一。三系杂交水稻的成功培育是人类 20 世纪技术进步的重要标志。几十年来我国培育的不同细胞质源的水稻雄性不育类型达 60 种以上,在生产上应用的主要有野败型 (WA)、D 型、冈型 (G)、红莲型 (HL)、滇型 (DT)、K 型、包台型 (BT)、印尼水田谷型 (ID)、矮败型 (DA) 以及马协型 (MA) 等。其中,杂交籼稻以野败型为主,杂交粳稻以包台型为主<sup>[1-5]</sup>。目前我国杂交水稻生产仍然面临细胞质比较单一、杂种组合类型少的危机,长此下去势必引起杂交水稻优势衰退,抗病虫能力和适应性减弱,并给我国粮食安全带来潜在威胁。因此,进一步发掘和利用新的细胞质雄性不育种质资源对克服我国杂交

水稻胞质单一、丰富水稻胞质遗传多样性具有重要意义。

经过 10 余年的研究,我们成功创建了来源于爪哇稻 Wanilava (*Oryza sativa* subsp. *javanica*) 细胞质雄性不育系,并育成了系列杂交水稻新组合在生产上大面积推广应用。该不育胞质定名为爪哇型 (JW 型),经初步试验,其恢保关系与野败型 (WA) 完全相同。本文报道 JW 型雄性不育胞质的选育、配组及杂交组合的优势表现并利用 AFLP 技术建

收稿日期: 2007-06-18; 修改稿收到日期: 2007-09-19。

基金项目: 四川省“十一五”水稻育种攻关资助项目 (2006 YZGG 1)。

第一作者简介: 陈永军 (1964 -), 男, 副研究员。E-mail: chen Yongjun@swust.edu.cn

立了 JW 型不育胞质的指纹图谱。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

经多代连续回交或自交培育了 2 套水稻 (*Oryza sativa*) 同核异质不育系,一套为 273JW (JW 型胞质)、273D (D 型胞质) 及其对应保持系 273B,另一套为 803JW (JW 型胞质)、803WA (野败型胞质) 及其对应保持系 803B。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

每份材料分别取 10 g 种子在人工气候箱中发芽,温度为 28 ℃,光照条件为 14 h/d。2 叶期时剪取幼苗,用双蒸水洗净,采用 CTAB 法<sup>[6]</sup>提取 DNA,0.7% 琼脂糖凝胶检测质量。

### 1.3 AFLP 分析

AFLP 方法见前文<sup>[7]</sup>报道,稍作改进。采用 *EcoR* / *Mse* (New England Biolab) 于 37 ℃ 下对上述 6 份材料的 DNA 进行双酶切,对应预扩增引物为 EA(5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') 和 MC (5'-GATGAGTCCTGAGTAAG-3')。预扩增后进行选择性扩增的引物筛选,筛选过程选用 7 条含 3 个选择性碱基的 *Mse* 引物分别与 8 条含 3 个选择性碱基的 *EcoR* 引物配对组成 56 个引物组合。选择性扩增后的产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。银染依据 Sanguinetti 等<sup>[8]</sup>的方法略有改动。

### 1.4 AFLP 特征片段的回收

依据侯磊等<sup>[9]</sup>的方法,用刀片将特征片段所在凝胶切下放入 1.5 mL 离心管中,加入 1.0 mL TE 溶液漂洗凝胶 15 min,倾出 TE,再加入含 100 mmol/L NaCl 的 TE 溶液 100 μL,放入沸水浴中 10 min,自然冷却后备用。

### 1.5 回收片段的克隆及序列分析

依据李传友等<sup>[10]</sup>方法,首先利用与选择性扩增时相同的引物扩增 40 个循环(94 ℃ 下 30 s;56 ℃ 下 30 s;72 ℃ 下 60 s),然后用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,采用凝胶回收纯化试剂盒 (QIAquick Gel Extraction kit) 将目标片段回收并克隆到 pMD18-T (TaKaRa) 载体上转化大肠杆菌 DH5,经抗生素筛选阳性克隆,菌落 PCR 鉴定后送上海 Invitrogen 公司测序。测序结果通过 NCBI 网站在线进行 BLASTn 及 BLASTx 分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 JW 型细胞质雄性不育系的培育

#### 2.1.1 JW 型不育胞质的发现

1991 年冬在海南陵水用爪哇稻 Wanilava 与培矮 64 进行单交,1992 年在四川绵阳种植 F<sub>1</sub>,同时用该 F<sub>1</sub> 与 G46B 杂交,同年冬在海南陵水种植 Wanilava/培矮 64//G46B 复交 F<sub>1</sub>,复交 F<sub>1</sub> 分离部分不育株,选取其中全典败的不育株作为母本选育细胞质雄性不育系,其胞质来源于爪哇稻 Wanilava,定名为 JW 型。

#### 2.1.2 JW 型不育系的选育

1991 年用早籼优质保持系 L301B 与早籼抗病保持系地谷 B 进行有性杂交,同年冬在海南陵水种植 F<sub>1</sub>,1992 年在四川绵阳种植 F<sub>2</sub>,同年冬在海南陵水种植 F<sub>3</sub>,选择其中两个株系中的优良单株同时与野败胞质的 L301A 和具有 JW 型胞质的全典败不育株成对测交,经连续回交(在以后的世代中均选用同一株系与同一测交后代的不育系回交)选择,至 1996 年 B<sub>5</sub>F<sub>1</sub> 时经千株以上大群体鉴定,野败型和 JW 型不育系的不育度和不育株率均达 100%,农艺性状稳定,分别定名为 803WA 和 803JW。至 2000 年野败型和 JW 型不育系 803WA 和 803JW 均为 B<sub>12</sub>F<sub>1</sub>,保持系 803B 为 F<sub>16</sub>。

#### 2.1.3 JW 型不育系的特征特性

JW 型和野败型不育系 803JW 和 803WA 的特征特性表现一致,观察结果如下。

生育特性:四川绵阳春播(4 月 11~19 日播种,6 月 26 日~7 月 2 日始穗),播始历期 71~82 d,较珍汕 97A 短 5~7 d,主茎叶片数 13.5 叶,较珍汕 97A 少 1 叶。四川绵阳夏播(5 月 19~28 日播种,7 月 19~27 日始穗),播始历期 60~67 d,较珍汕 97A 短 4~7 d。播种至抽穗有效积温 1017.8~1062.5 ℃,较珍汕 97A 少 66.8~197.8 ℃。海南陵水冬繁,播始历期 71~80 d,较珍汕 97A 短 4~6 d。803JW 和 803WA 的温光反应特性与珍汕 97A 相似,属早籼型不育系。株高 80 cm 左右,较珍汕 97A 高约 5 cm。株型适中,剑叶较长,叶鞘、叶耳、叶缘、颖尖紫色,长粒、无芒,每穗平均着粒 160 粒左右,千粒重 22 g 左右。

育性表现和开花习性:803JW 和 803WA 花药白色、瘦小,花粉以典败为主,有极少量圆败花粉。1996-1999 年经连续 4 年超千株群体观察和海南异地鉴定,套袋自交不结实,镜检花粉典败 99.13%,

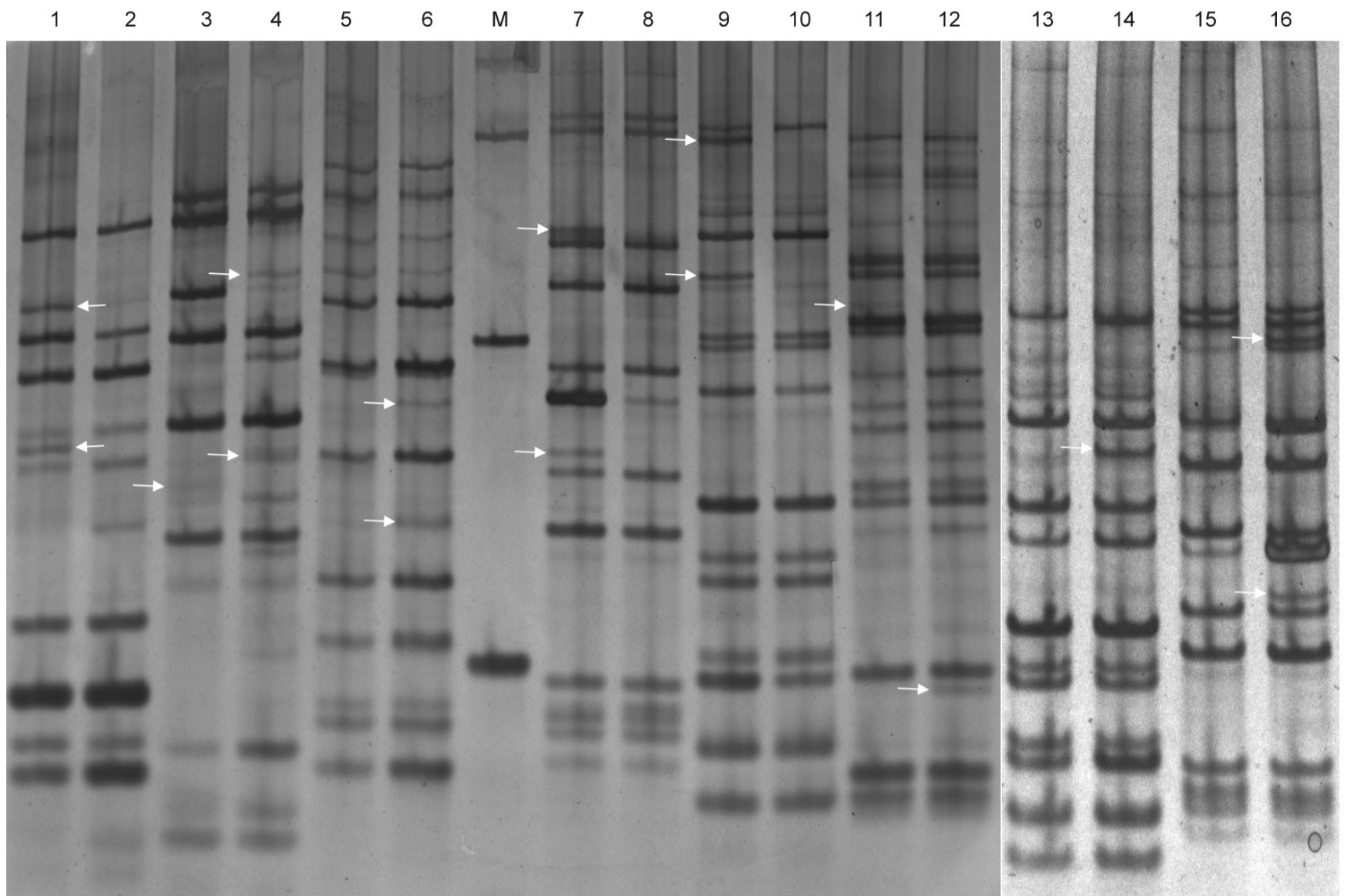


图 1 两组同核异质系的 AFLP 多态性

Fig. 1 . AFLP polymorphism among the two sets of CMS lines .

泳道 1、3、5、7、9 和 11 为 273JW 胞质；泳道 2、4、6、8、10 和 12 为 273D 胞质；泳道 13、15 为 803WA 胞质；泳道 14、16 为 803JW 胞质；M - DL2000 标准分子量。白色箭头指示多态性条带。

Lanes 1 , 3 , 5 , 7 , 9 and 11 represent 273JW ; Lanes 2 , 4 , 6 , 8 , 10 and 12 represent 273D ; Lanes 13 and 15 represent 803WA ; Lanes 14 and 16 represent 803JW . M stands for DL2000 marker . White arrows show the polymorphic bands .

圆败 0.87% ,不育株率和不育度均为 100%。不论春繁、夏制还是海南异地种植 ,803JW 和 803WA 均表现不育性稳定 ,自然状态下包颈长 3.9 ~ 5.5 cm ,包颈度较珍汕 97A 轻 ,对“九二”反应敏感 ,自然状态下柱头外露率 65% 以上 ,花期较集中 ,开花习性好。

#### 2.1.4 JW 型不育系的杂种优势表现

利用 JW 型不育胞质已配制的 5 个杂交水稻新组合(B 优 827、B 优 811、B 优 838、B 优 840、B 优 817)已通过省级或国家级品种审定 ,据不完全统计 ,2001 - 2006 年累计推广面积 106 万  $\text{hm}^2$  ,较对照品种平均增产 7.15%。

### 2.2 AFLP 分析

#### 2.2.1 AFLP 指纹图谱分析

从 56 对引物组合中 ,分别选取对 2 套同核异质材料谱带清晰、齐全、扩增位点数较多的 10 对和 5 对引物组合进行数据分析。结果在 273JW 和 273D 中共扩增出 290 条带 ,其中 13 条带具多态性 ,占 4.48% ;277 条共同带 ,占 95.52%(图 1 ,图 2)。在

803JW、803WA 和 803B 中共扩增出 179 条带 ,其中 4 条带具多态性 ,占 2.23% ;175 条共同带 ,占 98.32%(图 2)。两组同核异质系是经多代连续回交选育而成的 ,因此 ,AFLP 多态性条带上的差异主要来自于细胞质的差异。

#### 2.2.2 差异条带的分离和序列分析

将 E ATG/M CAG 引物组合扩增出来的在 803WA、803B 胞质中均存在而在 803JW 胞质中缺失的 106 bp 的差异条带回收测序(图 2)。序列和 BLASTn 分析表明 ,该序列在水稻线粒体上有 2 个拷贝(图 3) ,在水稻第 1 染色体上有 1 个拷贝。此外 ,GenBank 中有 1 条 cDNA 序列(GenBank 登录号 AK242620.1)与该多态性条带序列完全一致 ,但在 BLASTx 分析中没有任何已知蛋白序列命中。

## 3 讨论

### 3.1 JW 胞质与 D 胞质、野败胞质 DNA 的遗传分化

本文报道了爪哇稻细胞质雄性不育系(JW型)

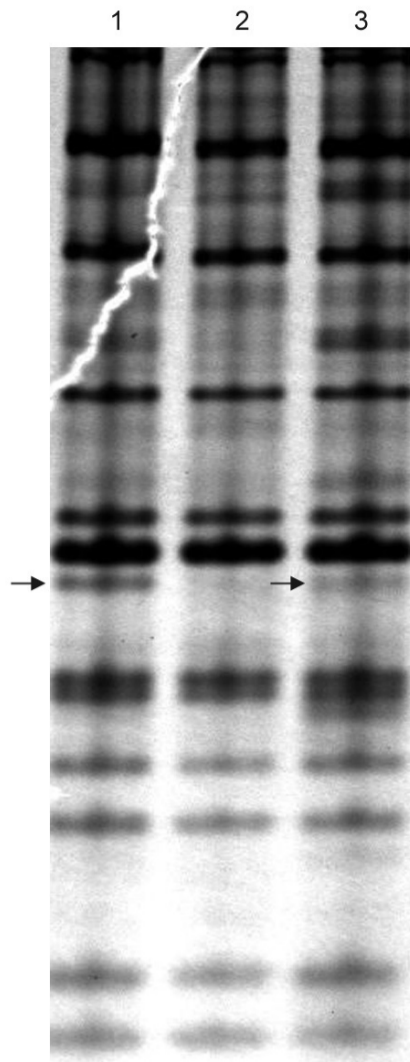


图2 03WA、803JW 和 803B 胞质的 AFLP 多态性及回收多态片段

Fig. 2 AFLP polymorphism among 803WA, 803JW and 803B, and the recovery of AFLP polymorphic fragments.

1 - 803WA ; 2 - 803JW ; 3 - 803B。黑色箭头示回收片段。

Lane 1, 803WA ; Lane 2, 803JW ; Lane 3, 803B. Black arrows indicate the recovered fragments.

的选育经过及其 AFLP 指纹图谱。用该不育系配制的 5 个 JW 型杂交水稻新组合已在生产上大面积推广应用,丰富了现有杂交水稻的胞质类型。AFLP 分子标记技术明确显示 JW 胞质与野败胞质和 D 胞质均有不同程度的分化。虽然本实验采用的是总 DNA,即同时包含了核基因组及胞质基因组,但经过多次回交选育,不育系与保持系已具有了相同的核基因组,它们在遗传背景上的差异应主要来源于不同的细胞质基因组的差异<sup>[11]</sup>。李金泉等<sup>[12]</sup>利用 SSR 标记检测了 4 套同核异质材料不育系与保持系核基因组的遗传多样性,发现在回交 5 至 6 代的不同胞质来源的不育系之间平均多样性为 13.49%,不同胞质来源的不育系与保持系之间平均多样性为 22.22%,遗传多样性中可能有相当一部分是因为回交代次少及回交亲本不单一引起的。本实验采用的同核异质系均为回交 12 代以上,通过 AFLP 技术对两套同核异质材料分析得到的 4.69% 和 1.68% 的 DNA 多态性基本可以代表 JW

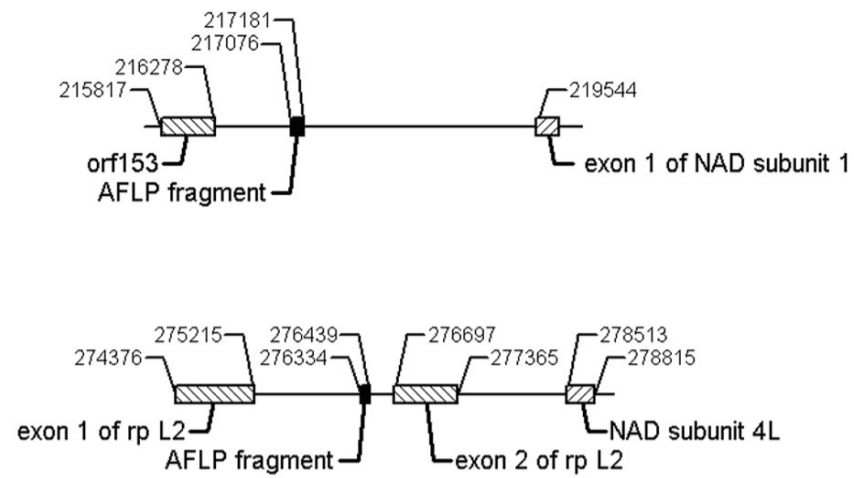


图3 W 型与 WA 型胞质的回收多态片段在水稻线粒体基因组上的两个不同位置

Fig. 3 Two locations of the recovered AFLP fragments of JW and WA type in rice mitochondrial genome.

回收片段第 1 个位置在 orf153 及 NADH 脱氢酶第 1 亚基的第 1 外显子之间;第 2 个位置在水稻线粒体核糖蛋白第 2 大亚基的第 1 和第 2 外显子之间,在水稻 NADH 脱氢酶第 4 大亚基上游。

数字代表在线粒体基因序列上的物理距离(GenBank 登录号: DQ167399.1)。

The first locus of the recovered AFLP fragment is located between orf153 and exon 1 of NAD (NADH dehydrogenase) subunit 1. The second locus is located between the first and second exon of rp (ribosomal protein) subunit L2 and in the upstream of NAD subunit 4L.

The number indicates the physical location in mitochondrial genome (GenBank accession No. DQ167399.1).

胞质与 D 胞质、JW 胞质与野败胞质的遗传分化。

### 3.2 JW 胞质线粒体 DNA 与 CMS 的关系

对以 803B 为轮回亲本的同核异质系的 AFLP 分析中,回收片段只存在于 803WA 及 803B 两个材料中,而 803JW 材料无此扩增条带,表明不同品系间在该片段两侧位置上存在序列差异。虽然该片段在线粒体上存在于两个不同的位置,并且同时在核基因组第 1 染色体上有 1 个拷贝,但实际上只有 3 个位点同时存在序列上的差异才会导致这一条带的多态性。显然,在 803JW 的 3 个位点中只要有 1 个位点的序列与其他 2 个材料一致,803JW 即可以在该 106 bp 片段位置扩增出相应的条带。已有的研究表明,水稻线粒体 DNA 与核基因组 DNA 存在频繁的序列交换<sup>[13]</sup>,本研究利用 AFLP 揭示的差异片段同时存在于线粒体及核基因组,可能也是胞质、胞核遗传物质交换的结果。

许多研究表明核质互作型水稻雄性不育性与线粒体基因组紧密相关<sup>[14-19]</sup>,而线粒体上的镶嵌基因是导致胞质不育的主要原因<sup>[20]</sup>。Musgrave 等<sup>[21]</sup>研究证明缺少抗氰呼吸途径(alternative respiration)是植物胞质雄性不育的一个显著特点。通过

cDNA AFLP 分析,康俊根等<sup>[22]</sup>获得了 1 条与甘蓝花粉败育相关的 cDNA 序列,该序列与拟南芥线粒体基因 NADH 脱氢酶第 4 亚基(nad 4)高度同源。最近的研究表明水稻孢子体不育类型的不育系(K 型、冈型、D 型、印水型等)都含有与野败型相同的不育基因<sup>[15,19]</sup>。本研究获得的 JW 型与野败型胞质的差异片段在线粒体上第 1 个位置是在 NADH 脱氢酶第 1 亚基(nad 1)基因序列上游的 2363 bp 处,第 2 个位置是 NADH 脱氢酶第 4 大亚基(nad 4L)上游 2047 bp 处,很有可能来源于核基因组第 1 染色体的 DNA 片段插入该位置并参与调控 NADH 脱氢酶的转录表达。后续研究将进一步证明这一序列上的差异与 JW 型水稻胞质不育之间的联系。

#### 参考文献:

- [1] 朱英国. 对我国水稻雄性不育系分类的初步探讨. 作物学报, 1980, 6(1): 17-24.
- [2] 袁隆平, 陈洪新. 杂交水稻育种栽培学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988: 50-53.
- [3] 朱永川, 郑家奎, 王文明, 等. 水稻高配合力、高异交率新质源不育系 K17A 的选育与应用. 西南农业学报, 2004, 11(1): 131-134.
- [4] 汤述翥, 孙叶, 张宏根, 等. 同核异质粳稻不育系特性比较. 中国水稻科学, 2005, 19(6): 521-526.
- [5] 曾千春, 周开达, 朱祯, 等. 中国水稻杂种优势利用研究现状. 中国水稻科学, 2000, 14(4): 243-246.
- [6] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf issue. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [7] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4407-4414.
- [8] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17: 914-921.
- [9] 侯磊, 杨光伟, 何光华, 等. 水稻胞质雄性不育系珍汕 97A 及其保持系的 AFLP 标记及序列分析. 植物学报, 2000, 42(6): 591-594.
- [10] 李传友, 郑洪刚, 翁曼丽, 等. 光敏核不育水稻等位突变系的 AFLP 分析. 生物工程学报, 2000, 16(1): 91-95.
- [11] 刘俊, 朱英国. 水稻细胞质雄性不育的分子机制研究. 武汉大学学报: 自然科学版, 1998, 44(4): 461-464.
- [12] 李金泉, 李伟程, 桂平水, 等. 水稻同核异质不育系及其保持系核基因组的 SSR 分析. 中国水稻科学, 2007, 21(2): 117-122.
- [13] International Rice Genome Sequencing Project. The map based sequence of the rice genome. *Nature*, 2005, 436: 793-799.
- [14] 朱英国. 水稻雄性不育的生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 256-279.
- [15] Wang Z H, Zou Y J, Li X Y, et al. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell*, 2006, 18(3): 676-687.
- [16] 凌杏元, 周培疆, 关和新, 等. 运用 AFLP 技术筛选分离野败型水稻 mtDNA 中与雄性不育性状相关的片段. 遗传, 1999, 21(3): 33-36.
- [17] 凌杏元, 周培疆, 黄青阳, 等. 红莲型水稻与细胞质雄性不育相关 mtDNA 片段的分离及序列测定. 实验生物学报, 2000, 33(2): 151-155.
- [18] 侯思名, 谭学林. 水稻滇一型不育系和保持系线粒体 DNA 差异的 AFLP 检测. 云南农业大学学报, 2003, 18(4): 367-369.
- [19] 舒友菊, 蒲志刚, 蔡平钟, 等. 与水稻 K 型细胞质雄性不育性特异的 mtDNA 片段的鉴定. 分子植物育种, 2007, 5(1): 69-73.
- [20] Hanson M R. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 461-486.
- [21] Musgrave S, Antonovics J, Siedow J N. Is male sterility in plants related to lack of cyanide resistant respiration in tissues? *Plant Sci*, 1986, 44: 7-11.
- [22] 康俊根, 张国裕, 张延国, 等. 四种甘蓝雄性不育类型差异基因表达分析. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 551-554.