

文章编号:1000-8551(2013)6-0750-08

水稻 CMS-WA 和 CMS-Y 育性恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 的等位性分化

蔡健^{1,2} 兰伟¹ 廖秋平² 马同富¹(¹ 阜阳师范学院生命科学学院,安徽 阜阳 236041; ² 华南农业大学植物分子育种重点实验室,广东 广州 510642)

摘要:为了检测水稻第1染色体上恢复基因 *Rf3* 和第10染色体上恢复基因 *Rf4* 的等位性分化,利用8个携带 *Rf3* 基因座位,16个携带 *Rf4* 基因座位的染色体单片段代换系(chromosome single segment substitution line, SSSL)和华粳粘74(HJX74)为父本,野败型(WA)细胞质雄性不育系珍汕97A(ZsA)和Y型(Y)细胞质雄性不育系Y华农A(HnA)为母本杂交,采用分子标记辅助选择的方法,鉴定携带基因型 *Rf3rf3/Rf4rf4* 的 F_1 杂种株并对其花粉和小穗育性进行考察。结果表明:(1)24个 SSSLs 和 HJX74 对于2个不育系的恢复力存在着显著的不同,携带 *Rf3* 基因座位的 SSSLs 恢复力均低于携带 *Rf4* 基因座位的 SSSLs,并且低于对照品种 HJX74; SSSL S6 对于 WA-CMS 的花粉小穗育性分别为 7.2% 和 15.5%, 对于 Y-CMS 的花粉小穗育性分别为 1.3% 和 12.4%, 表现出最弱的恢复力; SSSLs S14-S18 和 SSSL S20 对这2种不育系的平均花粉和小穗育性分别高于 70% 和 85%, 表现出较强的恢复力。(2)在恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 基因座分别鉴定出3个和4个等位基因,由弱到强依次命名为 *Rf3*-1、*Rf3*-2、*Rf3*-3 和 *Rf4*-1、*Rf4*-2、*Rf4*-3、*Rf4*-4, 受体亲本 HJX74 的基因型为 *Rf3Rf3/Rf4Rf4*, 其 *Rf3* 的恢复性强于 *Rf4* 恢复性。(3)在 HJX74 的遗传背景下,WA 型不育细胞质的可恢复性好于 Y 型不育细胞质。

关键词:水稻;单片段代换系;质核互作雄性不育系;恢复力

水稻不育系(Cytoplasmic male sterility, CMS)是由于线粒体 DNA 重排而引起非正常的读码框(ORF)所致,其育性恢复要靠细胞核基因组中恢复基因(*Rf*)的作用来实现^[1-2]。水稻胞质不育恢复基因的分析,有利于杂交水稻恢复系的选育。国内外学者针对野败型的主效恢复基因进行了大量的分子标记定位研究,多数以恢复系 IR24 和明恢 63 为材料。Zhang 等^[3]利用第7和第10染色体上的 RFLP 标记分析几个带有不同恢复基因的珍汕97A 的近等基因系,将 *Rf3* 定位于分子标记 RG532 与 RG140、RG458 之间。张群宇等^[4]为了用分子标记准确定位野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf4*, 将日本水稻基因组项目构建的水稻遗传连锁图谱第10染色体分子遗传图上的分子标记 R1877 和 G2155 之间对应区域 YAC 物理图上的6个 YAC 克隆进行了亚克隆,并把 *Rf4* 座位定位于第10染

色体的特定位置:亚克隆 Y328 距离 *Rf4* 0.9cM, 亚克隆 Y1210 距离 *Rf4* 3.2 cM。Tan 等^[5]和景润春等^[6]也都在第10染色体长臂定位到了 IR24 中的野败型主效恢复基因,其位置和效应都类似 *Rf4*, 同时 Tan 等^[5]还在第10染色体的另一个位置探测到一个效应较弱的育性恢复 QTL, 该基因与 RFLP 标记 R2309 和 RG257 连锁。Yao 等^[7]和何光华等^[8]分别用珍汕97A × 明恢63 的 F_2 极端育性群体,采用集团分离分析法对明恢63 的野败型恢复基因进行定位,结果都定位到两对主效恢复基因,其中位于第10染色体长臂中部的基因表现主效恢复作用,而位于第1染色体的基因恢复效应较弱。Sheeba 等^[9]利用 IR58025A 和恢复系 KMR3RF₂ 群体将恢复基因 *Rf4* 定位于第10染色体上,与 SSR 标记 RM6100 的遗传距离为 1.2cM。Ngangkham 等^[10]利用野败型不育系 Pusa6A 和

收稿日期:2012-12-04 接受日期:2013-05-03

基金项目:国家“863”计划(2006AA100101-2)

作者简介:蔡健(1968-),男,安徽阜阳人,博士,副教授,主要从事水稻遗传育种和优质高产栽培技术研究。E-mail: fycjiajian@163.com

通讯作者:马同富(1965-),男,安徽阜阳人,研究员,主要从事水稻遗传育种和优质高产栽培技术研究。Tel: 0558-2595619; E-mail: matongfu6328

@126.com

BasmatiPRR78 的 F_2 群体,将恢复基因 *Rf4* 定位于第 10 染色体上,与 SSR 标记 RM6373 和 RM6100 的遗传距离分别为 0.3cM 和 0.5cM,这两个标记的物理距离为 163.6Kb。

遗传研究还认为各种类型 CMS 的育性恢复或多或少地受到微效基因的影响,一些学者应用 QTL 分析,也定位到一些野败型微效恢复基因。庄杰云等^[11]先建立珍汕 97B 与密阳 46 配组的 F_6 重组自交系群体,然后与珍汕 97A 测交,经 QTL 分析,在 227 个株系的测交群体中检测到控制野败型育性恢复的主效 QTL (*qRf-10*) 1 个和微效 QTL (*qRf-1*、*qRf-7*、*qRf-11*) 3 个,主效 QTL 位于第 10 染色体,3 个微效 QTL 分别位于第 1、7、11 染色体上。在此基础上,李广贤等^[12]将[珍汕 97A/(珍汕 97B/密阳 46) F_6]的测交定位群体扩大为 704 个株系,将主效 QTL 位于第 10 染色体长臂中部,另外 3 个微效 QTL 分别位于第 1 染色体短臂、第 7 染色体长臂近着丝粒处和第 11 染色体短臂近着丝粒处。

本研究以华南农业大学植物分子育种实验室用不同来源的 24 个水稻品种(14 个籼稻品种和 10 个粳稻品种)为供体,优良籼稻品种华梗粳 74 (HJX74) 为受体,通过多轮回交、自交和分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS),构建了含有 1 123 个单片段代换系(Single segment substitution line, SSSL)的水稻单片段代换系文库^[13-14]。本研究利用 8 个携带有 *Rf3* 基因座位,16 个携带有 *Rf4* 基因座位的染色体 SSSLs 和 HJX74 为父本,野败型(WA)细胞质雄性不育系珍汕 97A(ZsA)和 Y 型(Y)细胞质雄性不育系 Y 华农 A (HnA)为母本杂交,采用 MAS 鉴定 F_1 杂种株并对其花粉和小穗育性进行考察,旨在检测 *Rf3* 和 *Rf4* 座位等位性分化基因的遗传效应和 WA-CMS 和 Y-CMS 的遗传关系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为 24 个 SSSLs,籼稻品种华梗粳 74,野败型不育系 ZsA 和 Y 型不育系 HnA(表 1),所有试验材料及其杂交后代均种植于华南农业大学教学试验场。

1.2 DNA 的抽提

试验材料及其杂交后代的 DNA 抽提参照 Murray 和 Thompson^[19]的 CTAB 方法,并略作修改。

1.3 微卫星标记分析

微卫星标记的检测方法按 Li 等^[20]的方法进行。 F_1 杂种植株的鉴定:利用与恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 两侧紧密连锁(<5cM)的微卫星标记(SSR)鉴定携带基因型 *Rf3rf3/Rf4rf4* 的杂种株(表 2),并对其花粉和小穗育性进行考察。

1.4 花粉和小穗育性观察

花粉育性观察:于每天 7:00~10:00 或 16:00 之后,从目标植株上选取已抽出约 1/3 的主穗或较大分蘖穗,取中上部枝梗上当天或次日要开放的 2~5 朵顶端颖花,置于 FAA 固定液中固定并保存,各组合均取 20 株,1% I_2 -KI 溶液染色,在 10×16 倍显微镜下观察,每朵颖花观察 3 个视野。根据花粉粒的形状、大小和着色反应,将花粉分为可育花粉和败育花粉两种类型;小穗育性观察:在成熟期考查目标单株的小穗育性(小穗育性为实粒数占总粒数的百分率),参照张桂权和卢永根^[22]方法进行。

1.5 数据处理与分析

采用 Excel 及 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计分析。计算方差及多重比较时,先将各组合花粉和小穗育性的百分率作反正弦($\sin^{-1}\sqrt{\%}$)转换。

2 结果与分析

2.1 SSSLs 在 *Rf3* 恢复基因座的等位性分化

8 个携带有 *Rf3* 基因座位和 HJX74 为父本,ZsA 和 HnA 为母本杂交,采用 MAS 鉴定 F_1 杂种株并对其花粉和小穗育性进行考察(表 3)。通过对 F_1 杂种植株花粉和小穗育性的多重比较发现,SSSL S1 和 SSSL S2 表现出 4.3% (14.0%) 和 5.8% (16.1%) 花粉(小穗)育性,平均为 5.1% 和 15.1%,这两个 SSSLs 具有相似的恢复力水平而被划为第一类,在 *Rf3* 基因座携带 *Rf3-1* 等位基因,其恢复基因来源于伊朗的粳稻品种 Khazar。SSSL S3 和 SSSL S4 表现出 10.4% 和 25.9% 平均花粉和小穗育性,被划分为第二类,携带 *Rf3-2* 等位基因,其恢复基因来源于巴基斯坦的籼稻品种 Basmati370。SSSL S5-SSSL S8 拥有 47.5% 和 63.8% 平均花粉和小穗育性,在恢复力水平上而被划分为第三类,携带 *Rf3-3* 等位基因,其恢复基因来源于尼日利亚的粳稻品种 IRAT261。HJX74 具有 57.1% 和 77.8% 花粉和小穗育性,其基因型为 *Rf3Rf3/Rf4Rf4*。

2.2 SSSLs 在 *Rf4* 恢复基因座的等位性分化

16 个携带 *Rf4* 基因座位的 SSSLs 和 HJX74 分别与 ZsA 和 HnA 杂交,通过对 F_1 杂种植株花粉和小穗育

表 1 供试的单片段代换系和华粳 74
Table 1 SSSLs (single segment substitution lines) and HJX74 of rice in the experiment

单片段代换系 SSSL	编号 Code	染色体 Chromosome	代换片段恢复 基因座 Rf loci on substitution segments	供体 Donor	类型 Ecotype	来源 Origin
W22-04-10-04-03-02	S1	1	<i>Rf3</i>	Khazar	粳稻	伊朗
W22-04-10-04-02-04-01	S2					
W11-15-08-03-01	S3			Basmati370	籼稻	巴基斯坦
W11-15-08-01-08	S4					
W18-18-08-29	S5			IRAT261	粳稻	尼日利亚
W18-18-08-05-07	S6					
W18-18-07-06-18	S7					
W18-18-08-04	S8					
HJX74	W0	1, 10	<i>Rf3, Rf4</i>		籼稻	中国
W14-16-03-13-02	S9	10	<i>Rf4</i>	联鉴 33	籼稻	中国
W14-18-02-04-01	S10					
W02-08-03-01-02	S11			Amol 3 (Sona)	籼稻	伊朗
W02-08-03-01-11-03	S12					
W24-42-46-04-03-10	S13			Star bonnet 99	粳稻	美国
W24-42-46-08-01-06	S14					
W24-42-46-08-08-03-06-04-07	S15					
W11-09-02-03-08-08-01	S16			Basmati370	籼稻	巴基斯坦
W11-09-02-07-02-03-01	S17					
W20-10-01-02-02	S18			成龙水晶米	籼稻	中国
W20-02-04-07	S19					
W20-19-01-10	S20					
W23-07-06-08-02-04	S21			Lemont	粳稻	美国
W23-07-06-08-07	S22					
W23-19-06-06-11	S23					
W23-07-06-01-09	S24					

性的多重比较发现(表 4), SSSL S9 和 SSSL S10 表现出 33.9% 和 50.7% 平均花粉和小穗育性, 在恢复力水平被划分为第一类, 在 *Rf4* 基因座携带 *Rf4-1* 等位基因, 其恢复基因来源于中国的籼稻品种联鉴 33。SSSL S11 和 SSSL S12 表现出与 HJX74 相似的恢复力, 具有 58.6% 和 81.4% 平均花粉和小穗育性被划分为第二类, 携带有 *Rf4-2* 等位基因, 其恢复基因来源于伊朗的籼稻品种 Amol3 (Sona)。SSSL S13, SSSL S14 和 SSSL S15 表现出 64.1% 和 88.1% 平均花粉和小穗育性被划分为第三类恢复力水平, 携带 *Rf4-3* 等位基因, 其恢复基因来源于美国的粳稻品种 Starbonnet99。SSSL S16 - SSSL S24 表现出 71.2% 和 88.0% 平均花粉和小

穗育性而被划分为第四类, 在 *Rf4* 基因座位上携带 *Rf4-4* 等位基因, 其恢复基因来源于巴基斯坦的籼稻品种 Basmati370、中国的籼稻品种成龙水晶米和美国的粳稻品种 Lemont。

可见, 在 HJX74 携带 *Rf4* 等位基因背景下, *Rf3* 基因座分化为 3 个等位基因, 恢复力由弱到强依次为 *Rf3-1*, *Rf3-2* 和 *Rf3-3*; 同样, 在 HJX74 携带 *Rf3* 恢复基因背景下, *Rf4* 基因座分化为 4 个等位基因, 恢复力由弱到强依次为 *Rf4-1*, *Rf4-2*, *Rf4-3* 和 *Rf4-4*。图 1 花粉粒的 1% I_2 -KI 溶液染色也揭示了 *Rf3* 和 *Rf4* 基因座位由弱到强的等位基因分化特征。

表 2 用于恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 检测的 SSR 引物
Table 2 Primer sequences of the SSR markers for the *Rf3* and *Rf4* genes detection

编号 Code	标记 Marker	连锁基因 Linked <i>Rf</i> gene	染色体 Chromosome	位置 Position/cM	引物序列 Primer sequence (5'-3')	参考文献 Reference
1	RM220	<i>Rf3</i>	1	24.7	F: ggaagtaactgtttccaac R: gaaatgcttccacatgtct	McCouch 等 ^[21]
2	PSM348- <i>Rf3</i> [§]			28.9	F: gatgaggttaggttggtgcc R: gtagaatcaactcgagcggc	
3	PSM354			30.5	F: acaagctaaggtagtgtccatg R: cattttacctcaggctctca	
4	PSM25599	<i>Rf4</i>	10	49.5	F: cctgcagtactcgcggaagagg R: ggacgaacaccagtaggatctcagg	
5	RM304- <i>Rf4</i>			53.5	F: gataggagctgaaggagatg R: tcaaacggcacatataagac	McCouch 等 ^[21]
6	RM6100			56.5	F: tecttaccagtaccgcacc R: gctgatcacagatcattgc	McCouch 等 ^[21]

注: [§] PSM 引物由华南农业大学植物分子育种重点实验室设计。

Note: [§] PSM primers were previous designed by the State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University.

表 3 恢复基因 *Rf3* 的等位性分化
Table 3 Allelic differentiations of the *Rf3* loci

等位基因 Alleles	单片段代换系 SSSLs	F ₁ 杂种株在 2006 年至 2007 年晚季的花粉、小穗育性 Average pollen fertility and seed setting of F ₁ plants in the late season of 2006 and 2007					
		ZsA/SSSLs		HnA/SSSLs		Average	
		花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent	花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent	花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent
<i>Rf3</i> -1	S1	7.2 ± 1.6a	15.5 ± 0.8a	1.3 ± 0.6a	12.4 ± 0.6a	4.3	14.0
	S2	9.9 ± 1.6a	18.8 ± 1.4a	1.7 ± 0.5a	13.3 ± 0.8a	5.8	16.1
	Average	8.6	17.2	1.5	12.9	5.1	15.1
<i>Rf3</i> -2	S3	18.4 ± 2.9b	33.6 ± 1.6b	1.3 ± 0.3a	17.4 ± 0.9b	9.9	25.5
	S4	19.4 ± 2.8b	34.0 ± 2.1b	2.2 ± 0.6a	18.4 ± 1.2b	10.8	26.2
	Average	18.9	33.8	1.8	17.9	10.4	25.9
<i>Rf3</i> -3	S5	56.0 ± 1.1c	72.7 ± 1.0c	38.6 ± 1.2b	54.4 ± 1.2c	47.3	63.6
	S6	56.1 ± 2.8c	73.2 ± 1.9c	38.3 ± 2.0b	55.7 ± 1.3c	47.4	64.5
	S7	56.8 ± 1.4c	73.7 ± 0.9c	38.4 ± 1.7b	53.5 ± 1.7c	47.6	63.6
	S8	57.1 ± 1.7c	72.9 ± 1.0c	38.2 ± 2.2b	54.9 ± 1.4c	47.7	63.9
	Average	56.5	73.0	38.4	54.6	47.5	63.8
	HJX74(CK)	64.3 ± 1.9b	81.0 ± 1.4b	49.8 ± 0.9b	74.5 ± 1.5a	57.1	77.8

注: 表中小写字母表示 0.05 水平差异, 下同。

Note: Small letters in the table show significant difference at 0.05 level. The same as below.

表4 恢复基因 *Rf4* 的等位性分化
Table 4 Allelic differentiations of the *Rf4* loci

/%

		F ₁ 杂种植株在 2006 年至 2007 年晚季的花粉、小穗育性 Average pollen fertility and seed setting of F ₁ plants in the late season of 2006 and 2007					
等位基因 Alleles	单片段代换系 SSSLs	ZsA/SSSLs		HnA/SSSLs		Average	
		花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent	花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent	花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent
<i>Rf4-1</i>	S9	40.1 ± 1.5a	48.5 ± 1.0a	23.5 ± 0.6a	49.3 ± 1.0a	31.8	48.9
	S10	43.8 ± 0.3a	51.1 ± 1.2a	27.8 ± 2.1a	53.7 ± 1.1a	35.8	52.4
	average	42.0	49.8	25.7	51.5	33.9	50.7
<i>Rf4-2</i>	HJX74 (CK)	64.3 ± 1.9b	81.0 ± 1.4b	49.8 ± 0.9b	74.5 ± 1.5a	57.1	77.8
	S11	65.2 ± 0.9b	81.3 ± 0.7b	53.4 ± 1.6b	79.8 ± 0.8b	59.3	80.6
	S12	64.7 ± 1.4b	82.1 ± 0.7b	52.4 ± 1.9b	80.6 ± 0.8b	58.6	81.4
	Average	64.7	81.5	49.9	75	57.3	78.2
<i>Rf4-3</i>	S13	69.3 ± 1.5c	86.9 ± 1.1cd	58.7 ± 1.8c	90.3 ± 0.7cde	64	88.6
	S14	70.2 ± 2.6c	86.5 ± 0.7c	58.3 ± 1.3c	89.9 ± 0.7cde	64.3	88.2
	S15	69.6 ± 1.8c	86.3 ± 0.7c	58.5 ± 1.5c	88.8 ± 0.5cde	64.1	87.6
	Average	69.7	86.6	58.5	89.7	64.1	88.1
<i>Rf4-4</i>	S16	77.8 ± 1.3d	90.9 ± 0.9d	67.5 ± 2.0def	87.6 ± 1.0c	72.7	89.3
	S17	77.6 ± 1.5d	92.0 ± 0.6d	66.1 ± 1.7def	88.1 ± 0.8cd	71.9	90.1
	S18	76.3 ± 2.4d	88.5 ± 0.8cd	68.8 ± 0.8f	93.1 ± 0.4e	72.6	90.8
	S19	76.1 ± 1.6d	88.8 ± 0.7cd	67.4 ± 1.3def	92.2 ± 0.4de	71.8	90.5
	S20	75.4 ± 2.7d	88.7 ± 0.6cd	68.4 ± 1.4ef	91.6 ± 0.7cde	71.9	90.2
	S21	76.8 ± 1.5d	89.0 ± 0.7cd	64.8 ± 1.1def	81.7 ± 1.2b	70.8	85.4
	S22	76.0 ± 2.7d	89.3 ± 1.3cd	63.8 ± 1.6d	81.3 ± 1.2b	69.9	85.3
	S23	76.0 ± 1.6d	90.5 ± 1.0cd	63.6 ± 1.8d	80.0 ± 0.8b	69.8	85.3
	S24	75.6 ± 2.1d	89.8 ± 0.7cd	64.0 ± 1.7de	80.8 ± 0.9b	69.8	85.3
Average	76.4	89.7	66.0	86.3	71.2	88.0	

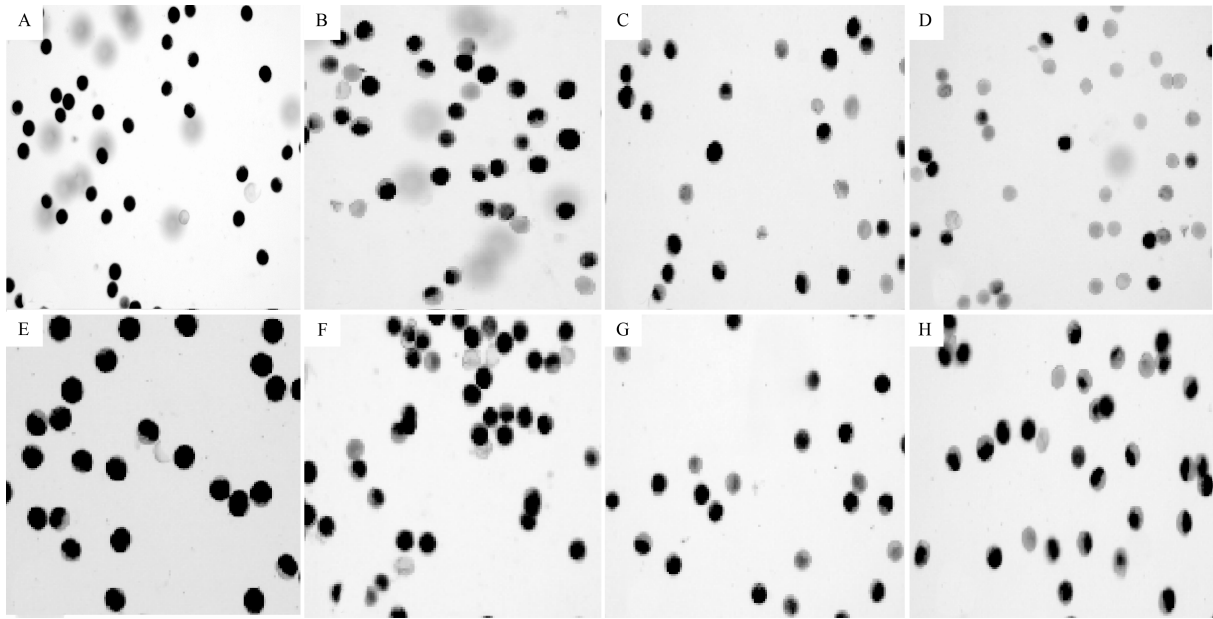
2.3 *Rf3* 和 *Rf4* 等位基因的遗传效应

在单片段代换系中,背景亲本 HJX74 仅在一个位点是外来的,另外一个位点仍为 HJX74 的恢复基因,每个单片段代换系都是两个恢复基因。由表 4 可以看出,HJX74 携带的恢复基因 *Rf3* 单独存在时对花粉育性的恢复效应至少为 34%。因为 SSSL S9 和 SSSL S10 只是处于这个恢复力水平,即携带没有恢复能力或者为隐性的恢复基因,对花粉育性的恢复效应为 0。由于加性效应,HJX74 携带的恢复基因 *Rf4* 单独存在时对花粉育性的恢复效应至少为 5% (表 3)。因此,在 HJX74 恢复基因 *Rf4* 背景下,*Rf3-1*,*Rf3-2* 和 *Rf3-3* 的遗传效应分别为 0,5% 和 42%;在 HJX74 恢复基因 *Rf3* 遗传背景下,*Rf4-1*,*Rf4-2*,*Rf4-3* 和 *Rf4-4* 的遗传效

应分别为 0,23%,30% 和 37%。

2.4 WA-CMS 和 Y-CMS 遗传效应比较

24 个 SSSLs 和 HJX74 与不育系 ZsA 和 HnA 杂交,F₁ 杂种植株的花粉和小穗育性的平均值对于不育系 ZsA 分别为 50.2% 和 64.1% (表 5),而对于不育系 HnA 分别为 36.5% 和 57.8%,表现出 WA-CMS 的可恢复性好于 Y-CMS。携带 *Rf3* 基因座的 SSSLs 和 HJX74 显示出 30.0% 和 45.7% 的花粉和小穗育性,而携带 *Rf4* 基因座的 SSSLs 和 HJX74 显示出 56.6% 和 76.3% 的花粉和小穗育性,表现出携带 *Rf3* 基因座位的 SSSLs 恢复力低于携带 *Rf4* 基因座位的 SSSLs 恢复力。



注: A: HJX74 (*Rf3Rf3/Rf4Rf4*); B: 携带基因型 *Rf3-3Rf3-3/Rf4-2Rf4-2* 植株; C: 携带基因型 *Rf3-2Rf3-2/Rf4-2Rf4-2* 植株; D: 携带基因型 *Rf3-1Rf3-1/Rf4-2Rf4-2* 植株; E: 携带基因型 *Rf3-4Rf3-4/Rf4-4Rf4-4* 植株; F: 携带基因型 *Rf3-4Rf3-4/Rf4-3Rf4-3* 植株; G: 携带基因型 *Rf3-4Rf3-4/Rf4-2Rf4-2* 植株; H: 携带基因型 *Rf3-4Rf3-4/Rf4-1Rf4-1* 植株。

Explanation: A: HJX74 (*Rf3Rf3/Rf4Rf4*); B: A-lines/SSSLs (*Rf3-3Rf3-3/Rf4-2Rf4-2*); C: A-lines/SSSLs (*Rf3-2Rf3-2/Rf4-2Rf4-2*); D: A-lines/SSSLs (*Rf3-1Rf3-1/Rf4-2Rf4-2*); E: A-lines/SSSLs (*Rf3-4Rf3-4/Rf4-4Rf4-4*); F: A-lines/SSSLs (*Rf3-4Rf3-4/Rf4-3Rf4-3*); G: A-lines/SSSLs (*Rf3-4Rf3-4/Rf4-2Rf4-2*); H: A-lines/SSSLs (*Rf3-4Rf3-4/Rf4-1Rf4-1*).

图 1 HJX74 和 F1 杂种植株花粉粒 I2-KI 染色

Fig. 1 I2-KI stainability of pollen grains of HJX74 and the F₁ plants (A-lines/SSSLs) with the different *Rf* genes

表 5 WA-CMS 和 Y-CMS 可恢复性比较

Table 5 Restorability comparison of WA-CMS and Y-CMS

/%

组合 Cross	携带 Rf3 基因座的单片段系 SSSL with Rf3 locus		携带 Rf4 基因座的单片段系 SSSL with Rf4 locus		平均 Average	
	花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent	花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed set percent	花粉育性 Pollen fertility	小穗育性 Seed Set percent
ZA/SSSL, HJX74	37.1	51.3	63.2	76.9	50.2	64.1
HA/SSSL, HJX74	22.9	40.0	50.0	75.6	36.5	57.8
平均 Average	30.0	45.7	56.6	76.3	43.4	61.0

3 讨论

在农作物中,以分子连锁图谱为基础的数量性状基因(QTL)研究已全面展开,并由此促进了 MAS 高产优质育种的实施^[23-24]。由于不同遗传背景的影响和 QTL 之间的相互干扰,不构建遗传背景一致的群体,是

很难进行 QTL 的准确评价的^[25]。单片段代换系只有代换片段与受体亲本不同,其它遗传背景与受体亲本完全一致,对代换区段中的 QTL 进行分析时遗传背景干扰很小,有利于 QTL 的分析。不少学者利用单片段代换系材料对许多 QTL 进行了鉴定和精细定位,并克隆了一些重要性状的 QTL,因此,单片段代换系是进行基因分析,特别是 QTL 分析的理想材料^[15-16,18]。Teng

等^[17]研究表明,在 HJX74 背景下,水稻稻米品质基因 *Wx* 基因存在 5 个等位基因变异,即 *wx*, *Wx-t*, *Wx-g1*, *Wx-g2* 和 *Wx-g3*。王铁固等^[26]研究认为玉米雄穗主轴长和雄穗分支数表现为多基因遗传或以多基因遗传为主。本研究发现,在 HJX74 背景下,恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 基因座分别存在 3 个和 4 个等位基因变异,由弱到强依次命名为 *Rf3-1*、*Rf3-2*、*Rf3-3* 和 *Rf4-1*、*Rf4-2*、*Rf4-3*、*Rf4-4*。HJX74 的基因型为 *Rf3Rf3/Rf4Rf4*, *Rf3* 和 *Rf4* 单独存在时遗传效应分别为 34% 和 5%,而表 3 和表 4 显示 HJX74 具有 57.1% 和 77.8% 花粉和小穗育性,可以推测 HJX74 中,除了恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4*,应该还存在着其它微效恢复基因,而且对育性起着恢复性作用。采用回交转育的方法,可以有效地将这些恢复性不同的基因导入当地推广品种,培育新品种或新材料,用于遗传研究或生产。

在植物的进化过程中,细胞质雄性不育和核恢复基因(*Rf*)是协同进化的,对恢复基因(*Rf*)遗传特性的研究是选育恢复系的前提。Luo 等^[27]成功克隆了野败型细胞质雄性不育基因 WA352,揭示了 WA352 在野生稻线粒体基因组的起源、雄性不育发生的分子机理和不同恢复基因对 WA352 的作用方式。王文明等^[28]认为,决定某个不育系能否应用于生产的首要因素就是该细胞质雄性不育的可恢性,而不同细胞质来源的细胞质雄性不育系的可恢性是存在差异的。富昊伟等^[29]认为,矮败型细胞质的可恢性好于野败型细胞质。蔡健等^[30]认为,矮败型细胞质的可恢性好于野败型细胞质,而野败型细胞质的可恢性又好于鸡公型(Y)细胞质。本研究结果表明,在 HJX74 遗传背景下,WA 型不育细胞质的可恢复性好于 Y 型不育细胞质。关于育性恢复基因恢复力大小问题,有的研究者认为 *Rf4* 的效应大于 *Rf3*^[7,11,25],也有研究者认为 *Rf3* 的效应大于 *Rf4*^[31-32]。本研究发现,24 个 SSSLs 和 HJX74 对于 WA-CMS 和 Y-CMS 的恢复力存在着显著的不同,携带有 *Rf3* 基因座位的 SSSLs 恢复力均低于携带有 *Rf4* 基因座位的 SSSLs,并且低于对照品种 HJX74。

本研究鉴定了对于 WA-CMS 和 Y-CMS 具有不同恢复力的 SSSLs,为选育 WA-CMS 和 Y-CMS 的保持系和恢复系提供了理论依据和育种材料,也为水稻单片段代换系拓宽了应用研究领域。

致谢 华南农业大学张桂权教授对于本试验给予了悉心指导,特此感谢!

参考文献:

[1] Bentolila S, Alfonso A A, Hanson M R. A pentatricopeptide repeat-

containing gene restores fertility to cytoplasmic malesterile plants [J]. PNAS, 2002, 99: 10887 - 10892

[2] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophytic development [J]. Plant Cell, 2004, 16: 154 - 169

[3] Zhang G Q, Bharaj T S, Virmani S S, Huang N. Mapping of the *Rf-3* nuclear fertility-restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94:27 - 33

[4] 张群宇,刘耀光,张桂权,梅曼彤. 野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf4* 的分子标记定位 [J]. 遗传学报,2002, 29 (11): 1001 - 1004

[5] Tan X L, Vanavichit A, Amornsilpa S, Tragoonrun S. Genetic analysis of rice CMS-WA fertility restoration based on QTL mapping [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 994 - 999

[6] 景润春,何予卿,黄青阳,朱英国. 水稻野败型细胞质雄性不育恢复基因的 ISSR 和 SSLP 的标记分析 [J]. 中国农业科学, 2000, 3 (2): 10 - 15

[7] Yao F Y, Xu C G, Yu S B, Li J X, Gao Y J, Li X H, Gao Y J, Li X H, Zhang Q. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in wild-abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 1997, 98:183 - 187

[8] 何光华,王文明,刘国庆,侯磊,肖月华,唐梅,杨正林,裴炎. 利用 SSR 标记定位明恢 63 的 2 对恢复基因 [J]. 遗传学报, 2002, 29 (9): 798 - 802

[9] Sheeba N K, Viraktamath B C, Sivaramakrishnan S, Gangashetti M G, Khera P, Sundaram R M. Validation of molecular markers linked to fertility restorer gene (s) for WA-CMS lines of rice [J]. Euphytica, 2009, 167: 217 - 227

[10] Ngangkham U, Parida S K, De S, Kumar A R, Singh A K, Singh N K, Mohapatra T. Genic markers for wild abortive (WA) cytoplasm based male sterility and its fertility restoration in rice [J]. Molecular Breeding, 2010, 26: 275 - 292

[11] 庄杰云,樊叶杨,吴建利,饶志明,夏英武,郑康乐. 水稻 CMS-WA 育性恢复基因的定位 [J]. 遗传学报,2001,28(2):129 - 134

[12] 李广贤,屠国庆,张克勤,姚方印,庄杰云. 水稻恢复系密阳 46 的主效和微效恢复基因的定位和效应分析 [J]. 中国水稻科学, 2005, 19 (6): 506 - 510

[13] Zhang G Q, Zeng R Z, Zhang Z M, Ding X H, Li W T, Liu G M, He F H, Tulukdar A, Huang C F, Xi Z Y, Qin L J, Shi J Q, Zhao F M, Feng M J, Shan Z L, Chen L, Guo X Q, Zhu H T, Lu Y G. The construction of a library of single segment substitution lines in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Rice Genetics Newsletter, 2004, 21: 85 - 87

[14] Xi Z Y, He F H, Zeng R Z, Zhang Z M, Ding X H, Li W T, Zhang G Q. Development of a wide population of chromosome single-segment substitution lines in the genetic background of an elite cultivar of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Genome, 2006, 49: 476 - 484

[15] Liu G F, Zhu H T, Liu S, Zeng R Z, Zhang Z M, Li W T, Ding X H, Zhao F M, Zhang G Q. Unconditional and conditional QTL mapping for the developmental behavior of tiller number in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Genet, 2010, 138: 885 - 893

[16] Zhang Y X, Yang J Y, Shan Z L, Chen S, Qiao W H, Zhu X Y, Xie Q J, Zhu H T, Zhang Z M, Zeng R Z, Ding X H, Zhang G Q. Substitution mapping of QTLs for blast resistance With SSSLs in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 2012, 184:141 - 150

- [17] Teng B, Zeng R Z, Wang Y C, Liu Z Q, Zhang Z M, Zhu H T, Ding X H, Li W T, Zhang G Q. Detection of allelic variation at the *Wx* locus with single-segment substitution lines in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Breeding, 2012, 30: 583–595
- [18] Wang S K, Wu K, Yuan Q B, Liu X Y, Liu Z B, Lin X Y, Zeng R Z, Zhu H T, Dong G J, Qian Q, Zhang G Q & Fu X D. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice [J]. Nature Genetics, 2012, 44 (8): 950–954
- [19] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8 (19): 4321–4325
- [20] Li W T, Zeng R Z, Zhang G Q. 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
- [21] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B, Maghiran R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Jellstrom R F, Declercq G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Research, 2002, 9: 199–207
- [22] 张桂权, 卢永根. 栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 杂种不育性的遗传研究 I. 等位基因 F_1 不育系杂种不育性的双列分析 [J]. 中国水稻科学, 1989, 3 (3): 97–101
- [23] Yano M, Sasaki T. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35: 145–153
- [24] Peleman J D, Van der Voort J R. Breeding by design [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8: 330–334
- [25] 徐才国, 唐为江, 邢永忠. 水稻优良恢复系明恢 63 的两个恢复基因恢复力的单独评价 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(4): 497–501
- [26] 王铁固, 马娟, 张怀胜, 陈士林. 玉米雄穗主轴长度和分枝数的主基因-多基因遗传分析 [J]. 核农学报, 2012, 26 (2): 280–286
- [27] Luo D P, Xu H, Liu Z L, Guo J X, Li H Y, Chen L T, Fang C, Zhang Q Y, Bai M, Yao N, Wu H, Wu H, Ji C H, Zheng H Q, Chen Y L, Ye S, Li X Y, Zhao X C, Li R Q & Liu Y G. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice [J]. Nature Genetics, 2013, 45(5): 573–577
- [28] 王文明, 周开达, 文宏灿. 杂交水稻细胞质雄性不育可恢性的配合力分析 [J]. 四川农业大学学报, 1995, 13 (4): 408–412
- [29] 富昊伟, 薛庆中. 三种水稻细胞质雄性不育恢复基因的比较 [J]. 分子植物育种, 2004, 2 (3): 336–341
- [30] 蔡健, 范可章, 马同富. 水稻细胞质雄性不育恢复性的等位基因分化 [J]. 核农学报, 2012, 26 (4): 634–642
- [31] Sattari M, Kathiresan A, Glenn B, Gregorio, Sant S, Virmani. Comparative genetic analysis and molecular mapping of fertility restoration genes for WA, Disi, and Gambiaca cytoplasmic male sterility systems in rice [J]. Euphytica, 2008, 160: 305–315
- [32] 滕利生, 申宗坦. 水稻胞质不育的恢复基因分析 [J]. 作物学报, 1996, 22 (2): 142–146

Allelic Differentiations of the *Rf3* and *Rf4* Genes on Fertility Restoration in Rice with Wild Abortive and Y Type Cytoplasmic Male Sterility

CAI Jian^{1,2}, LAN Wei¹, LIAO Qiu-ping², MA Tong-fu¹

¹School of Life Science, Fu Yang Teachers College, Fuyang, Anhui 236041;

²The State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: To detect the naturally occurring allelic variation at the fertility restorer (*Rf*) loci on chromosomes 1 (*Rf3*) and 10 (*Rf4*), eight SSSLs carrying *Rf3* locus, sixteen SSSLs possessing *Rf4* locus and HJX74 were crossed to two GMS lines (A-lines), such as Zhenshan97A (ZsA, WA) and Y-HuanongA (HnA, Y), respectively, the F_1 plants, carrying the genotype *Rf3rf3/Rf4rf4*, were selected by marker-assisted selection, and their phenotype for pollen and spikelet fertility were evaluated. The results were as follows. (1) There were much differences in restoring abilities among the twenty-four SSSLs and HJX74. The restoration abilities of SSSLs carrying *Rf3* locus were weaker than that of SSSLs with *Rf4* locus and HJX74. SSSL S6 carrying *Rf3* locus exhibited 7.2% (15.5%) and 1.3% (12.4%) pollen (spikelet) fertility of F_1 plants and possessed the weakest restoring ability to WA-CMS and Y-CMS. Out of sixteen SSSLs with *Rf4* locus, high levels of pollen fertility (>70%) and spikelet fertility (>85%) were observed in the crosses of A-lines/SSSLs S14-S18 and SSSL S20, which showed stronger restorer ability to WA-CMS and Y-CMS. (2) Based on the pollen and seed fertility of the F_1 hybrids, the *Rf3* and *Rf4* genes were classified respectively into four alleles, namely *Rf3-1*, *Rf3-2*, *Rf3-3* and *Rf3-4* for *Rf3*, and *Rf4-1*, *Rf4-2*, *Rf4-3* and *Rf4-4* for *Rf4*. HJX74 carried the genotype *Rf3Rf3/Rf4Rf4* and showed that the effect of *Rf3* was larger than that of *Rf4*. (3) In inheritance background of HJX74, WA-CMS was restored more easily than Y-CMS.

Key words: *Oryza sativa* L.; Single segment substitution lines; Cytoplasmic male sterility line; Restoring ability