

# 水稻光温敏雄性核不育系广占 63S 不育基因 *PTGMS2-1* 的遗传分析与分子定位

王宝和<sup>2</sup> 徐建军<sup>1</sup> 吴银慧<sup>1</sup> 朱金燕<sup>1</sup> 李生强<sup>1</sup> 周 勇<sup>1</sup> 程小涛<sup>1</sup> 梁国华<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>扬州大学 江苏省作物遗传生理国家重点实验室培育点/植物功能基因组学教育部重点实验室, 江苏 扬州 225009; <sup>2</sup>江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007; \* 通讯联系人, E-mail: ricegb@yzu.edu.cn)

## Genetic Analysis and Molecular Mapping of a Photoperiod-Thermo-Sensitive Genic Male Sterile Gene (*PTGMS2-1*) in Rice Line Guangzhan 63S

WANG Bao-he<sup>2</sup>, XU Jian-jun<sup>1</sup>, WU Yin-hui<sup>1</sup>, ZHU Jin-yan<sup>1</sup>, LI Sheng-qiang<sup>1</sup>, ZHOU Yong<sup>1</sup>, CHENG Xiao-tao<sup>1</sup>, LIANG Guo-hua<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology/Key Laboratory of Plant Function Genomics, Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; <sup>2</sup>Lixiahe Region Agricultural Research Institute of Jiangsu, Yangzhou 225007, China; \* Corresponding author, E-mail: ricegb@yzu.edu.cn)

WANG Baohe, XU Jianjun, WU Yin-hui, et al. Genetic analysis and molecular mapping of a photoperiod-thermo-sensitive genic male sterile gene (*PTGMS2-1*) in rice line Guangzhan 63S. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(4): 429-432.

**Abstract:** Guangzhan 63S, a photoperiod-thermo-sensitive genic male sterile (*PTGMS*) line, was one of the most widely used *PTGMS* lines in two-line indica hybrid rice breeding system in China. Genetic analysis indicated that the sterility of Guangzhan 63S was controlled by a single recessive gene using the F<sub>2</sub> population derived from a cross between the Guangzhan 63S and Han 1587. Molecular mapping was performed on the F<sub>2</sub> mapping population using SSR and InDel markers and bulked-segregant analysis(BSA). The *PTGMS2-1* was restricted to a 390-kb region on chromosome 2 between the markers S2-4 and S2-27, at genetic distances of 0.5 cM and 1.1 cM, respectively, and co-segregated with S2-24.

**Key words:** photoperiod-thermo-sensitive genic male sterility; genetic analysis; molecular mapping

王宝和, 徐建军, 吴银慧, 等. 水稻光温敏雄性核不育系广占 63S 不育基因 *PTGMS2-1* 的遗传分析与分子定位. *中国水稻科学*, 2010, 24(4): 429-432.

**摘 要:** 水稻光温敏雄性核不育系广占 63S 的不育基因来源于光敏核不育系农垦 58S, 其育性转换表现为温敏型, 是迄今两系杂交水稻中应用最广泛的籼型光温敏核不育系之一。对广占 63S/早 1587 组合的 F<sub>2</sub> 分离群体进行不育基因的遗传分析, 结果表明广占 63S 的不育性受 1 对隐性不育基因控制。利用 SSR 和 InDel 分子标记技术, 结合 BSA 法, 以广占 63S 与早 1587 组合的 F<sub>2</sub> 分离群体为材料, 将不育基因(暂命名为 *PTGMS2-1*) 定位于第 2 染色体标记 S2-4 与 S2-27 之间物理距离 390 kb 的区间内, 与两标记间的遗传距离分别为 0.5 和 1.1 cM, 与标记 S2-24 共分离。

**关键词:** 光温敏雄性不育性; 遗传分析; 分子定位

**中图分类号:** Q943.2; S511.03

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7216(2010)04-0429-04

20 世纪 80 年代中期以后, 三系杂交水稻的单产出现了徘徊局面。光温敏核不育水稻的发现为杂种优势利用开辟了新途径, 为杂交水稻生产由“三系法”向“两系法”转变提供了种质基础<sup>[1]</sup>。我国两系杂交水稻的应用已取得了较大的成功, 据农业部统计资料显示, 2008 年全国两系杂交稻种植面积达到 333 万 hm<sup>2</sup> (5000 万亩) 以上, 占杂交稻种植面积的 1/5, 单产比现有三系杂交水稻高 5%~10%。广占 63S<sup>[2]</sup> 是中籼光温敏雄性不育系, 不育期间败育彻底, 不育性稳定。该不育系及其衍生不育系是目前全国应用最广的两用核不育系之一。广占 63S 与 9311、丰恢 929 等配制的系列组合丰两优 1 号、丰两优 3 号等, 已在全国大面积推广。由广占 63S 衍生的不育系广占 63-4S 与扬稻 6 号配制的扬两优 6 号, 是继两优培九之后推出的又一个中籼超级杂交稻。

光温敏雄性核不育基因是两系不育系的核心, 它与不育系的育性稳定性、育性转换有最直接的联系。目前已发现并定位的光温敏雄性核不育基因有 *pms1*<sup>[3]</sup>、*pms*<sup>[3]</sup>、*pms3*<sup>[4]</sup>、

*tms1*<sup>[5]</sup>、*tms2*<sup>[6]</sup>、*tms3*<sup>[7]</sup>、*tms4*<sup>[8]</sup>、*tms5*<sup>[9]</sup>、*tms6*<sup>[10]</sup>、*rtms1*<sup>[11]</sup> 和 *Ms-h*<sup>[12]</sup>, 分别定位于第 7、3、12、8、7、6、2、2、5、10 和 9 染色体上。Liu 等<sup>[3]</sup> 将 *pms1* 精细定位于第 7 染色体上的 85 kb 区间内; Lu 等<sup>[4]</sup> 将 *pms3* 精细定位于第 12 染色体上的 28.4 kb 区间内; Yang 等<sup>[9]</sup> 将 *tms5* 定位在 BAC 克隆 AP004039 上的 19 kb 区间内。上述部分基因的精细定位, 极大地推动了水稻不育分子机理的研究。

本研究对广占 63S 的光温敏不育基因进行定位, 将有助于揭示水稻光温敏雄性不育性的遗传本质。广占 63S 及其衍生不育系作为目前全国应用最广的两用核不育系之一, 对其不育基因进行定位, 将为新型优质、高产、高抗的光温敏雄性核不育系的选育提供理论依据, 为进一步精细定位并克

**收稿日期:** 2009-07-22; **修改稿收到日期:** 2009-10-03。

**基金项目:** 江苏省六大人才高峰资助项目(06-C-011); 国家 973 计划资助项目(2005CB120807)。

隆该基因奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 分离群体构建与育性鉴定

2007年正季在扬州用光温敏雄性核不育系广占63S与早1587配制F<sub>1</sub>。同年冬季在海南种植F<sub>1</sub>,收获F<sub>2</sub>种子。2008年正季在扬州种植F<sub>2</sub>群体,调查群体的育性表现。5月16日播种,6月6日移栽,宽窄行种植(宽行26.4 cm、窄行16.5 cm),株距为13.2 cm,肥水管理按本地中籼稻常规水平实施。2008年7月1日至8月31日,日平均温度为24.6~32.8℃(扬州市气象局提供)。自出穗后每隔2 d调查1次群体植株育性,田间目测花药大小与室内花粉镜检相结合。

### 1.2 水稻DNA的提取与基因池的构建

在调查分离群体F<sub>2</sub>单株育性后,剪取新鲜叶片,并采用CTAB法<sup>[13]</sup>提取DNA。根据育性的鉴定结果,在分离后代中分别随机选取不育株和可育株各10株,按等量混合组成不育基因池和可育基因池。

### 1.3 SSR和InDel分子标记分析

根据Gramene网站(<http://www.gramene.org/>)公布的18 828个SSR标记的信息,在覆盖整个基因组12条染色体上每隔一定距离选择性地选取400对SSR标记,合成引物。把基因初步定位于具体的染色体位置上后,在该染色体区域连锁标记附近设计InDel标记,对目的基因进行进一步定位。根据NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公布的日本晴序列与9311序列的比对结果,用Primer Premier 5.0软件进行标记设计。

PCR扩增反应采用25 μL PCR反应体系:2.5 μL模板DNA(1 ng/μL),正反引物各1.25 μL(0.1 μmol/L),2.5 μL dNTP(0.25 mmol/L),2.5 μL 10× Buffer(不含Mg<sup>2+</sup>),2.5 μL Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L),0.2 μL Taq酶(5 U/μL),12.3 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR反应程序:95℃下预变性5 min;94℃下变性30 s,55℃下退火30 s,72℃下延伸40 s,33个循环后72℃下补充延伸10 min,最后4℃下保温。PCR扩增产物通过3.5%琼脂糖凝胶电泳进行分离。根据PCR扩增产物电泳后显示的指纹条带,采用MapMaker/Exp 3.0软件对不育基因与标记之间的遗传连锁关系进行分析。利用Kosambi函数将重组率转换为遗传图距(centiMorgan, cM)。

## 2 结果与分析

### 2.1 广占63S不育基因的遗传分析

2008年正季种植广占63S/早1587的F<sub>2</sub>群体和广占63S。广占63S于8月5日抽穗,表现为花药细小、无花粉型不育,而F<sub>2</sub>群体于7月20日始穗,8月12日终穗,花药大小分为正常和细小两种类型;正常花药花粉染色率均在90%以上,细小花药均无花粉。F<sub>2</sub>群体表现为不育与可育分离,花药正常植株为正常可育株,花药细小无花粉植株为不育株。F<sub>2</sub>群体共398株,其中可育株数为307株,不育株数为91株,F<sub>2</sub>群体可育株与不育株的比例符合3:1的理论比例( $\chi^2=0.97, \chi^2_{0.05}=3.841$ ),说明广占63S的雄性不育遗传受1对隐性基因控制。

### 2.2 光温敏雄性不育系广占63S的系谱分析

广占63S是由北方杂交粳稻研究中心与合肥丰乐种业

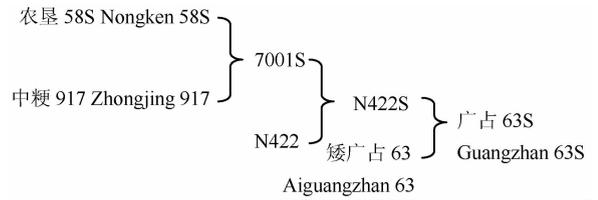


图1 光温敏雄性核不育系广占63S系谱

Fig. 1. Pedigree of Guangzhan 63S, a photoperiod-thermo-sensitive genic male sterile line.

水稻研究所合作,用N422S与矮广占63杂交后自交选育而成的中粳光温敏雄性核不育系。该不育系不育性稳定,在一定高温条件下表现为无花粉型败育。N422S<sup>[14]</sup>是由湖南杂交水稻研究中心从7001S与N422杂交后代中选育出以光因子为主的中粳型光温互作型核不育系。7001S<sup>[15]</sup>是由安徽省农业科学院水稻研究所用农垦58S作为不育基因供体,迟熟中粳917作父本,经一次杂交多代选育而成的粳型光敏核不育系。农垦58S是石明松<sup>[16]</sup>于1973年在晚粳农垦58中发现的自然不育株,其不育性受光周期的控制,同时也受到温度影响,在夏季长日照条件下为不育,秋季短日照条件下又转为可育。

通过系谱可以看出(图1),广占63S的不育基因通过农垦58S传递给7001S,再由7001S传递给N422S,最后由N422S传递给广占63S。

### 2.3 光温敏不育基因PTGMS2-1的分子定位

利用400对SSR标记对广占63S与早1587进行多态性筛选,93对标记表现出多态性,多态性频率为23.3%。利用这些多态性标记对F<sub>2</sub>群体的可育基因池和不育基因池进行分析,有4对SSR标记(RM12345、RM12521、RM12823和RM13034)在两个基因池间呈现出多态性,这4对标记均位于第2染色体短臂上。随后利用上述4对可能与目的基因连锁的标记对F<sub>2</sub>群体的91株不育单株进行标记与目的基因之间的重组分析(表1),检测到重组单株49、29、19和46株,

表1 91株不育株的基因型分布

Table 1. Genotype distribution of 91 male sterile plants.

标记 Marker	各基因型不育株株数		
	No. of PTGMS plants with different genotypes		
	早1587基因型 Han 1587 genotype	杂合基因型 Heterozygous genotype	广占63S基因型 Guangzhan 63S genotype
RM12345	9	40	42
RM12521	2	27	62
S2-2	2	16	73
S2-3	0	13	78
S2-4	0	1	90
S2-24	0	0	91
S2-27	0	2	89
S2-31	0	5	86
RM12823	0	19	72
RM13034	7	39	45

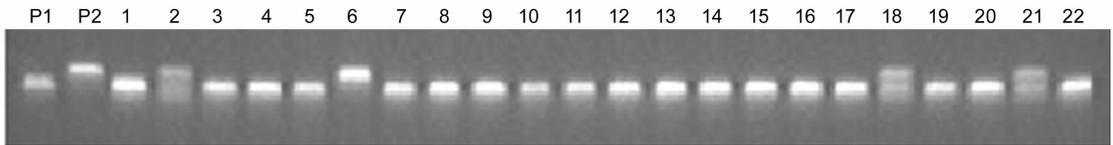


图 2 用 InDel 标记 S2-2 检测 F<sub>2</sub> 群体不育单株的结果

Fig. 2. Detection of individual male sterile plant from F<sub>2</sub> population with the InDel marker S2-2.

P1—广占 63S; P2—早 1587; 1~22—不育单株。

P1, Guangzhan 63S; P2, Han 1587; Lanes 1 to 22, Individual male sterile plants.

分别出现纯合可育亲本早 1587 带型的单株数目为 9、2、0 和 7 株,标记与目的基因之间的重组率分别为 31.9%、17%、10.4%和 29.1%。利用 MapMaker/Exp 3.0 软件进行遗传连锁分析,结果表明这 4 对标记与目的基因连锁。

为了进一步定位目的基因,首先,根据 SSR 标记的信息,查找到标记 RM12345、RM12521、RM12823 和 RM13034 在第 2 染色体上的大概物理位置(0.93、3.65、8.1 和 11.6 Mb 处);然后,结合标记与目的基因之间的重组率,通过分析,将目的基因定位在标记 RM12521 和 RM12823 之间。

在标记 RM12521 和 RM12823 之间共设计了 33 对 In-Del 标记。首先,利用 InDel 标记对广占 63S 与早 1587 进行多态性筛选,有 6 对标记表现出多态性,分别为 S2-2、S2-3、S2-4、S2-24、S2-27 和 S2-31(表 2),多态性频率为 18.2%。利用 F<sub>2</sub> 群体的 91 株不育单株对目的基因进行定位分析(表 1,图 2)。上述 6 对多态性标记在群体中分别出现 18、13、1、0、2 和 5 个重组个体,分别出现纯合可育亲本早 1587 带型的单株数目为 2、0、0、0、0 和 0 株,标记与目的基因之间的重组率分别为 11%、7.1%、0.5%、0%、1.1%和 2.7%。

利用 MapMaker/Exp 3.0 软件进行遗传连锁分析。将目的基因(暂命名为 *PTGMS2-1*)定位于标记 S2-4 和 S2-27 之间,与两标记之间的遗传距离分别为 0.5 和 1.1 cM,与 S2-24 共分离。通过查找标记在染色体上的具体物理位置,标记 S2-4、S2-24 和 S2-27 分别位于 BAC 克隆 AP004085、AP004039 和 AP004996 上,最后将基因限定在标记 S2-4 和 S2-27 之间物理距离大约为 390 kb 的区间内(图 3)。

### 3 讨论

本研究的光温敏雄性核不育系广占 63S 核不育基因来自农垦 58S,然而该不育系(温敏型)的育性转换对温光反应明显不同于农垦 58S(光敏型),也不同于 7001S 和 N422S。这是否与其不育基因导入籼稻背景有关,还需要进一步研

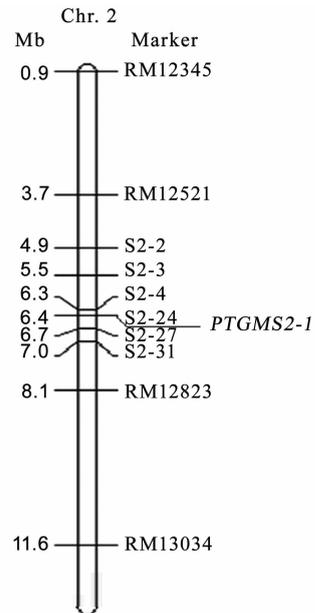


图 3 *PTGMS2-1* 在第 2 染色体短臂上的物理位置

Fig. 3. Location of *PTGMS2-1* on the short arm of chromosome 2.

究。本研究将广占 63S 的不育基因位点定位于第 2 染色体的短臂上;而先前报道的农垦 58S 的原始突变位点 *pms3* 被定位于第 12 染色体上<sup>[17]</sup>;Liu 等<sup>[3]</sup>研究表明农垦 58S 的衍生光敏核不育系 32001S 的不育性受 *pms1* 和 *pms* 的共同作用,这两个不育基因分别被定位于第 7 和第 3 染色体上。说明农垦 58S 衍生的不育系不育基因位点可能存在多样性,为什么不育基因位点出现多样性,还有待于进一步深入研究。

赵明富等<sup>[18]</sup>将光温敏互补型不育系 45S 的不育基因定位于水稻第 2 染色体短臂的 RM6378—RM12847 区间,该

表 2 多态性 InDel 标记在染色体上的位置及序列

Table 2. Locations and sequences of polymorphic InDel markers.

标记 Marker	位置 Location/Mb	前引物 Forward primer (5'-3')	后引物 Backward primer (5'-3')
S2-2	4.91	TACGTCGACGGTGCGGTAGC	CATCAGGTGGTTGTGGGAGTGC
S2-3	5.48	CTGATCATCTCATGCCTCCTACG	TCCATCTCCCAATATGACCAACC
S2-4	6.26	CTTGAGTGGGGACACCAAGT	CAATCCCCTTCCCATCTCTT
S2-24	6.38	ATGGCCTCGTCGAGTTCTAA	CGGTCAGCTGAATTTCTCTGT
S2-27	6.65	AGGGAGCGCAAATTTTATCA	CAATACTCCCTCCGGTTTCA
S2-31	7.01	TATTTTGGCGATATCTCCCG	GCTAGCAGGGTTAACGCAAG

区间物理距离大约 3 Mb, 恰好覆盖本研究的定位区间。Wang 等<sup>[5]</sup>将温敏型核不育系安农-1S 的不育基因定位于第 2 染色体 BAC 克隆 AP004039 上的 19 kb 区间内, 该区间也位于本研究的定位区间内。广占 63S 的不育基因虽来源于光敏型的农垦 58S, 但其育性转换主要表现为温敏型, 与安农-1S 的育性转换敏感性相似, 不育系 45S 的不育基因也来源于光敏型的农垦 58S, 其育性转换表现为较强的温度敏感型。那么这 3 个不育基因位点是否等位, 这 3 个不育系的育性转换是否受同一个基因的控制, 还需要进一步研究证明。

本研究获得了与不育基因 *PTGMS2-1* 紧密连锁的 InDel 标记, 为分子标记辅助选择选育新型光温敏核不育系创造了条件。利用两侧紧密连锁的分子标记, 可以在全生育期内对不育基因 *PTGMS2-1* 进行基因型正向选择, 不必将材料置于基因表达的特定光温条件之下。利用上述方法, 可以提高选择效率、缩短育种年限, 有利于在较短的时间内选育出品质优、配合力好、综合抗性强的新型光温敏核不育系。新型光温敏核不育系选育还存在不育系自身繁殖安全与杂交稻制种安全这一矛盾问题。利用分子标记辅助选择技术, 聚合不同光、温敏不育基因, 获得重组型光敏不育系或者重组型光温敏不育系, 以达到降低不育系不育起点温度、提高短日高温条件下繁殖产量的目的<sup>[19]</sup>, 可能是解决这一矛盾问题的有效途径。

#### 参考文献:

- [1] 袁隆平. 两系法杂交水稻研究的进展. *中国农业科学*, 1990, 23(3): 1-6.
- [2] 杨振玉, 张国良, 张从合, 等. 中籼型优质光温敏核不育系广占 63S 的选育. *杂交水稻*, 2002, 17(4): 4-6.
- [3] Liu N, Shan Y, Wang F P, et al. Identification of an 85-kb DNA fragment containing *pms1*, a locus for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. *Mol Gen Genom*, 2001, 266: 271-275.
- [4] Lu Q, Li X H, Guo D, et al. Localization of *pms3*, a gene for photoperiod-sensitive genic male sterility, to a 28.4-kb DNA fragment. *Mol Gen Genom*, 2005, 273: 507-511.
- [5] Wang B, Xu W W, Wang J Z, et al. Tagging and mapping the thermosensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa*) with molecular markers. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 1111-1114.
- [6] Yamaguchi Y, Ikeda R, Hirasawa H. Linkage analysis of thermosensitive genic male sterility gene *tms2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Sci*, 1997, 47(4): 371-373.
- [7] Subudhi P K, Borkakati R K, Virmani S S, et al. Molecular mapping of a thermosensitive genic male-sterility gene in rice using bulked segregant analysis. *Genome*, 1997, 40: 188-194.
- [8] Dong N V, Subudhi P K, Luong P N, et al. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 727-734.
- [9] Yang Q K, Liang C Y, Zhuang W, et al. Characterization and identification of the candidate gene of rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* by mapping. *Planta*, 2007, 225: 321-330.
- [10] Lee D S, Chen L J, Suh H S. Genetic characterization and fine mapping of a novel thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms6* in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1271-1277.
- [11] Jia J H, Zhang D S, Li C Y, et al. Molecular mapping of the reverse thermo-sensitive genic male-sterile gene (*rtms1*) in rice. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 607-612.
- [12] Koh H J, Son Y H, Heu M H, et al. Molecular mapping of a new genic male-sterility gene causing chalky endosperm in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 1999, 106: 57-62.
- [13] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 597-607.
- [14] 李任华, 王象坤, 罗孝和, 等. 光敏核不育系轮回 422S 的选育. *杂交水稻*, 1995(6): 7-9.
- [15] 李成荃, 王守海, 许克农, 等. 粳型水稻光敏核不育系 7001S 的选育及利用研究. *安徽农业*, 1996(7): 11.
- [16] 石明松. 晚粳自然两用系选育及应用初报. *湖北农业科学*, 1981(7): 1-3.
- [17] Mei M H, Chen L, Zhang Z H. *pms3* is the locus causing the original photoperiods sensitive male sterility mutation of "Nongken 58S". *Sci China: Ser C*, 1999, 42(3): 316-322.
- [18] 赵明富, 蔡春苗, 车容会, 等. 水稻光温敏雌性核不育系 45S 不育基因的分子定位. *分子植物育种*, 2008, 6(6): 1045-1049.
- [19] 李新奇, 袁隆平, 邓华凤, 等. 水稻光敏与温敏核不育基因之间互作效应与利用研究. *科技导报*, 2009, 27(3): 74-79.