

粳稻 BT 型细胞质雄性不育恢复基因功能标记的开发与应用

陈涛 骆名瑞 张亚东 朱镇 赵凌 赵庆勇 周丽慧 姚姝 于新 王才林*
(江苏省农业科学院 粮食作物研究所/江苏省优质水稻工程技术研究中心/国家水稻改良中心 南京分中心, 江苏 南京 210014; * 通讯联系人, E-mail: clwang@jaas.ac.cn)

Development and Application of a Functional Marker Associated with Fertility-restoring Gene for BT-type Cytoplasmic Male Sterility (CMS) in japonica Rice

CHEN Tao, LUO Ming-rui, ZHANG Ya-dong, ZHU Zhen, ZHAO Ling, ZHAO Qing-yong, ZHOU Li-hui, YAO Shu, YU Xin, WANG Cai-lin*
(*Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu High Quality Rice R&D Center/Nanjing Branch of China National Center for Rice Improvement, Nanjing 210014, China; Corresponding author, E-mail: clwang@jaas.ac.cn*)

CHEN Tao, LUO Ming-rui, ZHANG Yadong, et al. Development and application of a functional marker associated with fertility-restoring gene for BT-type cytoplasmic male sterility (CMS) in japonica rice. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(3): 259-264.

Abstract: To improve the selection efficiency of restoring gene for BT-type cytoplasmic male sterility (CMS) in japonica rice, we designed a functional marker *InDel-Rfla* based on a 574 bp insertion/deletion (*InDel*) in *Rfla* locus between japonica restorer line and CMS line reported by previous studies and used it to identify the genotypes of *Rfla* locus in 72 indica or japonica rice materials. The results showed that there was no 574 bp deletion in indica conventional rice varieties, restorer and maintain lines and they could restore the fertility of BT-type CMS in japonica rice, with genotypes of *RflaRfla*; However, the same deletion was detected in most of japonica conventional rice varieties, except in Aichi 106 and Yijing 12, and they had the ability to maintain sterility of BT-type CMS lines, with genotypes of *RflaRfla*. For further verification of the detection effect with this marker for different genotypes in this locus, we used it to amplify the DNA of different japonica rice restorer lines, CMS lines, hybrid F₁ and the F₂ population derived from a cross between 863A and Ninghui 8, and three genotypes in *Rfla* locus could be distinguished distinctly by gel electrophoresis.

Key words: rice; BT-type cytoplasmic male sterility; fertility-restoring gene; functional marker

陈涛, 骆名瑞, 张亚东, 等. 粳稻 BT 型细胞质雄性不育恢复基因功能标记的开发与应用. 中国水稻科学, 2013, 27(3): 259-264.

摘 要: 为提高粳稻 BT 型细胞质雄性不育恢复基因的选择效率,在前人克隆的基础上,根据其恢复系与不育系在 *Rfla* 位点 574 bp 的碱基插入/缺失,设计出功能标记 *InDel-Rfla*。利用该标记对不同地区来源的 72 份籼、粳稻材料进行检测,结果表明所有的常规籼稻品种、恢复系及保持系在 *Rfla* 位点并不存在缺失,其基因型为 *RflaRfla*。这些材料对粳稻 BT 型细胞质雄性不育系具有恢复育性的作用;而绝大多数常规粳稻品种(爱知 106 和伊粳 12 号除外)在该位点存在缺失,其基因型为 *rflaRfla*,它们对 BT 型细胞质雄性不育系具有保持不育的能力。同时,为进一步验证该标记对不同基因型的检测效果,利用其对粳稻恢复系、不育系、杂交组合以及 863A/宁恢 8 号 F₂ 分离群体的 DNA 进行扩增,根据其电泳带型可准确区分出 *Rfla* 位点的 3 种基因型。

关键词: 水稻; BT 型细胞质雄性不育; 恢复基因; 功能标记

中图分类号: Q785; S511.0351 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7216(2013)03-0259-06

近年来,随着城乡居民生活水平的提高,我国稻米消费呈现出由粳变粳的趋势^[1-2]。粳米市场看好,也为粳稻生产拓展了空间。目前,我国粳稻种植面积在 830 万 hm² 左右,其中以常规粳稻为主,杂交粳稻的种植面积只有 33 万 hm²,所占比例不足 4%^[3]。因此,加强杂交粳稻品种选育,增强其竞争优势,对保障我国粮食安全具有重要意义^[4]。

优良不育系和恢复系是选配三系杂交粳稻优势组合的基础。目前我国粳稻不育系的胞质来源主要是 BT 型(来自印度春粳品种,Chinsurah Boro II)^[5]和滇 I 型(来自云南高海拔粳稻)^[6]。它们均属于配子体雄性不育类型,具有相似的恢保关系,其育性恢

复受 1 对核基因控制^[7]。在不育系选育方面,常用上述细胞质雄性不育材料作母本,优良常规粳稻品种(品系)作父本,通过连续回交转育而成,其综合性状较好,仅需对一些开花、异交习性进行选择;相比之下,粳稻恢复系的培育不仅周期长、难度大,而且过程相对繁琐。究其原因,主要是恢复系选育时必须保证后代单株具有恢复基因,否则不能使杂种 F_1 自交结实。然而,一般粳稻中并没有相应的恢复源,很难通过它们之间的相互杂交来直接获得恢复系,这就需要通过人工制恢的方法将恢复基因从籼稻导入粳稻,在这个过程中难免会渗入部分籼稻的不利遗传成分^[8]。因此,选育优良恢复系的关键首先在于对恢复基因进行快速、准确的鉴定。

为提高粳稻 BT 型细胞质雄性不育恢复基因的选择效率,已有研究者利用其连锁的分子标记尝试辅助育种^[9-14]。这虽然提高了选择的可靠性,但仍然存在许多缺陷。一方面,这些标记大多是通过遗传群体定位恢复基因获得的,因而在实际育种群体中缺乏可检测的多态性;另一方面,既然是连锁标记就很难保证对基因型的选择达到 100% 准确。

随着现代分子生物学的发展,人们对水稻育性恢复的遗传机制有了更多的认识。Wang 等^[15]利用图位克隆的方法解析了 BT 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf-1* 的育性恢复机理。该基因由两个相关的育性恢复基因 *Rf1a* 和 *Rf1b* 组成,编码定向线粒体的 PPR 蛋白,其中 *Rf1a* 编码的蛋白 RF1A 以内切方式切断 *B-atp6/orf79* mRNA 来阻止 ORF79 蛋白的产生使育性恢复,而 RF1B 则通过降解 *B-atp6/orf79* mRNA 使育性恢复,在 RF1A 和 RF1B 同时存在时,RF1A 具有优先作用。与可以恢复细胞质雄性不育的近等基因系(*Rf-1Rf-1*)相比,不能恢复育性的近等基因系(*rf-1rf-1*)在 *Rf1a* 位点上存在 1 bp 和 574 bp 两处缺失^[15]。

本研究根据 BT 型粳稻不育系和恢复系在 *Rf1a* 位点上存在的碱基差异,设计了 *Rf1a* 的 1 对插入/缺失(insertion-deletion, InDel)功能标记,目的就是要建立一种准确、快捷的基因型选择方法来鉴定粳稻恢复基因,提高恢复系的育种效率。

1 材料与方法

1.1 材料

以具有代表性的 11 个常规籼稻品种、8 个籼稻恢复系、5 个不同不育细胞质来源的籼稻保持系、24

个常规粳稻品种、14 个粳稻恢复系、6 个 BT 型粳稻不育系以及 4 个杂交粳稻组合为材料,对它们的 BT 型细胞质雄性不育恢复基因进行检测,其具体名称、来源及类型见表 S1(在线辅助性信息 <http://www.ricesci.cn>)。粳稻 BT 型细胞质雄性不育恢复基因的分离群体,是由杂交粳稻组合 86 优 8 号(863A/宁恢 8 号)经自交获得的 200 个 F_2 单株。

上述水稻材料于 2011 年 5 月播种于江苏省农业科学院粮食作物研究所试验田,常规栽培管理。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计和合成

根据粳稻 BT 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf-1* 的克隆结果,下载其位于第 10 染色体长臂 PAC(P1-derived artificial chromosome)克隆(OSJN-Ba0017E08, AC068923),并对 *Rf1a* 位点进行序列分析,利用 Primer Premier 5.0(<http://www.premierbiosoft.com>) 在 574 bp 的插入/缺失区域附近,设计 InDel 标记,并将合成的引物分别命名为 InDel-*Rf1a*,其正向引物序列为 5'-CTGATGATCGAGGAGGAGGTA-3',反向引物序列为 5'-TAACGCGTCTTCCATCCTACT-3',退火温度为 55℃(图 1)。

1.2.2 水稻 DNA 提取

分蘖盛期按单株剪取水稻植株的叶片,并根据 Dellaporta 等^[16]提供的方法提取全基因组 DNA。

1.2.3 PCR 扩增和电泳检测

PCR 根据 Chen 等^[17]的方法进行,略有修改。20 μ L PCR 体系包括 DNA (10 mg/L) 2.0 μ L,引物(4 μ mol/L) 2.0 μ L, 10 \times 缓冲液(包括 $MgCl_2$) 2.0 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 0.4 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L 和 ddH₂O 13.1 μ L。反应程序如下: 95℃ 下预变性 5 min; 然后 95℃ 下变性 30 s, 55℃ 下复性 30 s, 72℃ 下延伸 1 min, 循环 35 次后, 72℃ 下延伸 7 min, 10℃ 下冷却 10 min, 然后将扩增产物加指示剂备用。反应产物在 1% 琼脂糖凝胶上 120 V 电泳 30 min, 经溴化乙锭(ethidium bromide, EB) 染色后于凝胶成像系统下进行观察。

2 结果与分析

2.1 InDel-*Rf1a* 标记对常规籼稻品种、籼稻恢复系以及保持系 *Rf1a* 位点的基因型检测

利用分子标记 InDel-*Rf1a* 对来自不同地区的 24 份籼稻材料进行 PCR 扩增和电泳检测。结果表明, 11 个常规籼稻品种(南京 11 号、南充一枝蜡、中

```
CTGATGATCG AGGAGGAGGT AGCCACCTG ATGTGGTGTG GTATACCACT
GTCATCAATG GCTTCTTCAA AGAGGGGGAT TCAGACAAAG CTTACAGTAC
ATACCATTAA ATGCTGGACC GGGGGATTTT ACCTGATGTT GTGACCTACA
ACTCTATTAT TCGTGCCTTA TGCAAGGCTC AAGCTATGGA CAAAGCCATG
GGGTACTCTA ACACCATGGT TAAGAATGGT GTCATGCTGT ATTGCATGAC
ATATAATAGT ATTCTGCATG GATATTGGTC TTCAGGGGCG CCGAAAGAGG
CTATTGGATT TCTCAAAAAG ATGCGCAGTG ATGGTGTGCA ACCAGATGTT
GTACTTATA GCTTGCTCAT GGATTATCTT TGCAAGAACG GAAGATGCAT
GGAAGCTAGA AAGATTTTCG ATTCTATGAC CAAGAGGGGC CTAAGCCCTG
AAATTAATCTAG CTATGGTACC CTGCTTCAGG GGTATGCTAC CAAAGGAGCC
CTTGTTGAGA TGCATGGTCT CTTGGAATTTG ATGGTACGAA ACGGTATCCA
CCCTGATCAT TATGTTTTCG GCATTCTAAT ATGTGCATAC GCTAACCAAG
GGAAAGTAGA TCAGGCAATG CTGTGTGTTCA GCAAAATGAG GCAGCAAGGA
TTGAATTCGCA ATGCAGTGAC GTATGGAGCA GTTATAGGCA TACTTTGCAA
GTCAGGCAGA GTAGAAGATG CTATGCTTTA TTTTGAGCAG ATGATCGATG
AAGGACTAAG CCCTGGCAAC ATTGTTTATA ACTCCCTAAT TCATGGTTTG
TGCACCTGTA ACAAATGGGA GAGGGCTGAA GAGTTAATTC TTGAAATGTT
GGATCGAGGC ATCTGTCTGA AACTATTTT CTTTAATTCA ATAATTGACA
GTCATTGCAA AGAAGGGAGG GTTATAGAAT CTGAAAACT CTTTGAGCTG
ATGGTACGTA TTGGTGTGAA GCCCAATGTC ATTAGCTACA ATACTCTTAT
CAATGGATAT TGCTTGGCAG GTAAGATGGA TGAAGCAATG AAGTTACTTT
CTGGCATGGT CTCAGTTGGG TTGAAACCTA ATACTGTTAC TTATAGCACT
TTGATTAATG GCTACTGCAA AATTAGTAGG ATGGAAGACG CGTTA
```

阴影部分表示不含恢复基因 *Rfla* 水稻存在的 1 bp 和 574 bp 两处碱基缺失；黑框部分表示引物所在位置。

The 1 bp and 574 bp deletions without fertility-restoring gene *Rfla* are shaded in gray; the sequences of primers are shown in box.

图 1 检测 BT 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rfla* 的引物设计
Fig. 1. Strategies for PCR primers designed for detecting fertility-restoring gene for BT-type cytoplasm male sterility in japonica rice.

早 39、黄华占、滇瑞 408、贵州麻谷、Tetep、Basmati 370、IR24、密阳 23、Dular），8 个籼稻恢复系（镇恢 084、93-11、蜀恢 527、辐恢 838、广恢 998、航 1 号、华恢 451、中恢 8006）以及 5 个不同不育细胞质来源的籼稻保持系（川香 29B、Ⅱ-32B、武香 2B、冈 46B、中

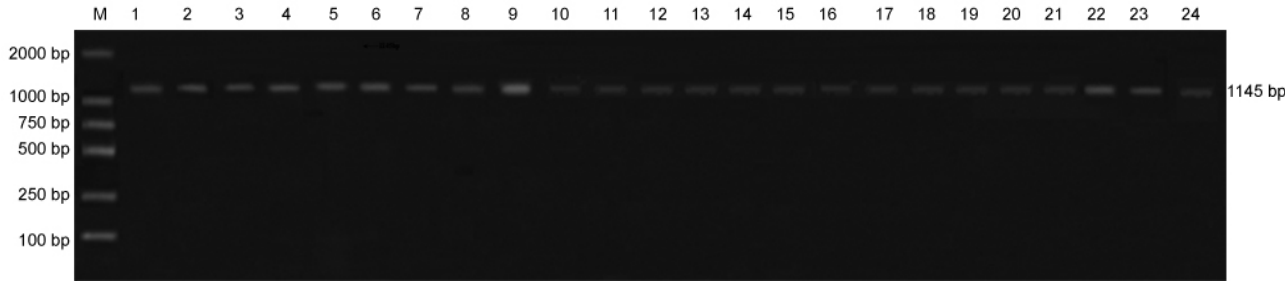
莲 1B）均能稳定扩增出 1 条长度约 1145 bp 的条带（图 2）。这表明以上材料在 *Rfla* 位点不存在 574 bp 的缺失，其基因型为 *RflaRfla*，它们对粳稻 BT 型细胞质雄性不育系具有恢复能力。

2.2 InDel-*Rfla* 标记对常规粳稻品种 *Rfla* 位点的基因型检测

利用分子标记 InDel-*Rfla* 对来自不同地区的 24 份粳稻品种进行 PCR 扩增和电泳检测。结果显示，22 个常规粳稻品种南粳 44、南粳 46、宝农 34、嘉 33、嘉 48、圣稻 13 号、圣稻 14 号、豫粳 6 号、郑稻 18 号、津稻 263、津川 1 号、盐丰 47、辽粳 9 号、吉粳 88、长白 9 号、龙粳 21 号、松粳 9 号、新稻 32 号、楚粳 32 号、合系 41 号、关东 194 及越光均能稳定扩增出 1 条长度约 571 bp 的条带，这些品种在 *Rfla* 位点存在 574 bp 的缺失，其基因型为 *rflarfla*，它们对 BT 型细胞质雄性不育系具有保持不育性的作用；而爱知 106 和伊粳 12 号，则能扩增出 *RflaRfla* 基因型特有的 1145 bp 的条带，它们对 BT 型细胞质雄性不育系具有恢复育性的作用（图 3）。

2.3 InDel-*Rfla* 标记对粳稻恢复系、不育系以及杂交粳稻组合 *Rfla* 位点的基因型检测

利用分子标记 InDel-*Rfla* 对来自不同地区的 14 份粳稻 BT 型细胞质雄性不育恢复系、6 份不育系以及 4 份杂交粳稻组合进行 PCR 扩增和电泳检测。结果表明（图 4），恢复系宁恢 8 号、CR-25、C-53、R9511、湘晴、R161、申恢 254、R192、皖恢 9 号、

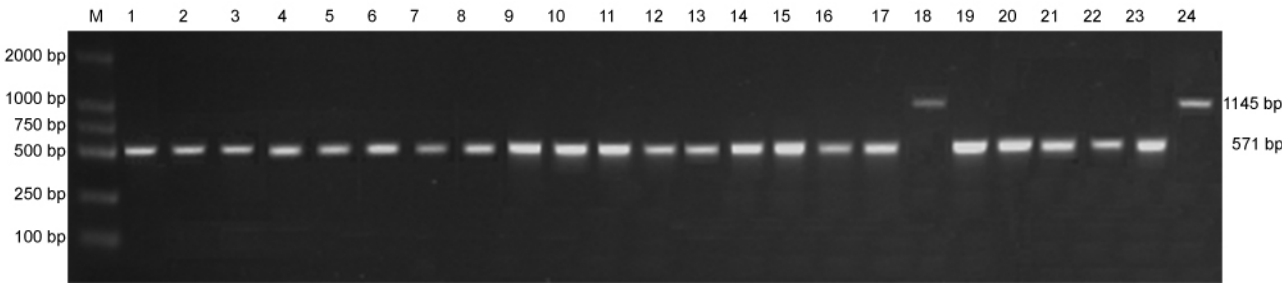


M—DNA 分子量标准，100~2000 bp；1—南京 11；2—南充一枝蜡；3—中早 39；4—黄华占；5—滇瑞 408；6—贵州麻谷；7—Tetep；8—Basmati 370；9—IR24；10—密阳 23；11—Dular；12—镇恢 084；13—93-11；14—蜀恢 527；15—辐恢 838；16—广恢 998；17—航 1 号；18—华恢 451；19—中恢 8006；20—川香 29B；21—Ⅱ-32B；22—武香 2B；23—冈 46B；24—中莲 1B。

M, DNA marker, 100—2000 bp; Lane 1, Nanjing 11; Lane 2, Nanchongyizhila; Lane 3, Zhongzao 39; Lane 4, Huanghuazhan; Lane 5, Dianrui 408; Lane 6, Guizhoumagu; Lane 7, Tetep; Lane 8, Basmati 370; Lane 9, IR24; Lane 10, Milyang 23; Lane 11, Dular; Lane 12, Zhenhui 084; Lane 13, 93-11; Lane 14, Shuhui 527; Lane 15, Fuhui 838; Lane 16, Guanghui 998; Lane 17, Hang 1; Lane 18, Huahui 451; Lane 19, Zhonghui 8006; Lane 20, Chuanxiang 29B; Lane 21, Ⅱ-32B; Lane 22, Wuxiang 2B; Lane 23, Gang 46B; Lane 24, Zhonglian 1B.

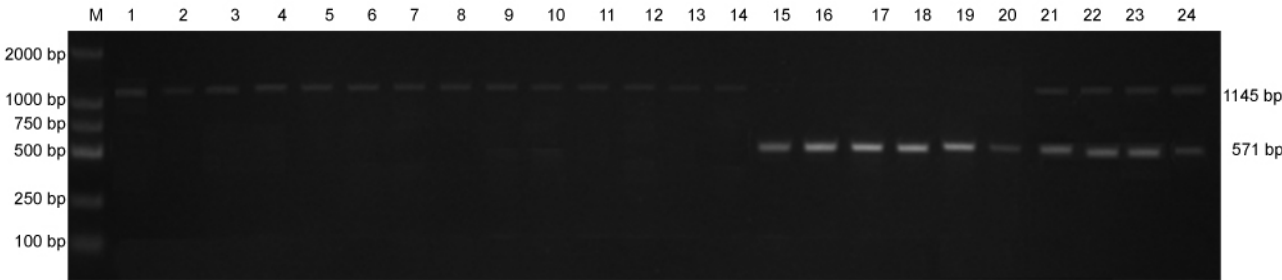
图 2 InDel-*Rfla* 对不同地区来源的常规粳稻品种、恢复系以及保持系的分子检测

Fig. 2. Molecular detections with InDel-*Rfla* in conventional indica rice varieties, restorer and maintain lines from different regions.



M—DNA 分子量标准,100~2000 bp; 1—南梗 44; 2—南梗 46; 3—宝农 34; 4—嘉 33; 5—嘉 48; 6—圣稻 13 号; 7—圣稻 14 号; 8—豫梗 6 号; 9—郑稻 18 号; 10—津稻 263; 11—津川 1 号; 12—盐丰 47; 13—辽梗 9 号; 14—吉梗 88; 15—长白 9 号; 16—龙梗 21 号; 17—松梗 9 号; 18—伊梗 12 号; 19—新稻 32 号; 20—楚梗 32 号; 21—合系 41 号; 22—关东 194; 23—越光; 24—爱知 106。
M, DNA marker, 100—2000 bp; Lane 1, Nanjing 44; Lane 2, Nanjing 46; Lane 3, Baonong 34; Lane 4, Jia 33; Lane 5, Jia 48; Lane 6, Shengdao 13; Lane 7, Shengdao 14; Lane 8, Yujing 6; Lane 9, Zhengdao 18; Lane 10, Jindao 263; Lane 11, Jinchuan 1; Lane 12, Yanfeng 47; Lane 13, Liaojing 9; Lane 14, Jijing 88; Lane 15, Changbai 9; Lane 16, Longjing 21; Lane 17, Songjing 9; Lane 18, Yijing 12; Lane 19, Xindao 32; Lane 20, Chujing 32; Lane 21, Hexi 41; Lane 22, Kantou 194; Lane 23, Koshihikari; Lane 24, Aichi 106.

图 3 InDel-*Rfla* 对不同地区来源的常规梗稻品种的分子检测
Fig. 3. Molecular detections with InDel-*Rfla* in conventional japonica rice varieties derived from different regions.



M—DNA 分子量标准,100~2000 bp; 1—宁恢 8 号; 2—CR-25; 3—C-53; 4—R9511; 5—湘晴; 6—R161; 7—申恢 254; 8—R192; 9—皖恢 9 号; 10—HP121; 11—LR27; 12—C418; 13—轮回 422; 14—R187; 15—95122A; 16—徐稻 3 号 A; 17—武运梗 7 号 A; 18—863A; 19—泰梗 985A; 20—连梗 6 号 A; 21—9 优 418; 22—常优 1 号; 23—86 优 8 号; 24—95 优 161。
M, DNA marker, 100—2000 bp; Lane 1, Ninghui 8; Lane 2, CR-25; Lane 3, C-53; Lane 4, R9511; Lane 5, Xiangqing; Lane 6, R161; Lane 7, Shenhui 254; Lane 8, R192; Lane 9, Wanhui 9; Lane 10, HP121; Lane 11, LR27; Lane 12, C418; Lane 13, Lunhui 422; Lane 14, R187; Lane 15, 95122A; Lane 16, Xudao 3A; Lane 17, Wuyunjing 7A; Lane 18, 863A; Lane 19, Taijing 985A; Lane 20, Lianjing 6A; Lane 21, 9 you 418; Lane 22, Changyou 1; Lane 23, 86 you 8; Lane 24, 95 you 161.

图 4 InDel-*Rfla* 对不同地区来源的粳稻恢复系、不育系以及杂交梗稻品种的分子检测
Fig. 4. Molecular detections with InDel-*Rfla* in japonica restorers, male-sterile lines and japonica hybrid combinations from different regions.

HP121、LR27、C418、轮回 422 和 R187 能扩增 1 条长度约 1145 bp 的条带;不育系 95122A、徐稻 3 号 A、武运梗 7 号 A、863A、泰梗 985A 和连梗 6 号 A 能扩增出 1 条长度约 571 bp 的条带;而杂交梗稻组合 9 优 418、常优 1 号、86 优 8 号及 95 优 161 则能同时扩增出长度约 1145 bp 和 571 bp 的两条谱带。因此,在 *Rfla* 位点,梗稻恢复系的基因型为 *RflaRfla*,不育系的基因型为 *rflarf1a*,而杂交梗稻组合的基因型为 *Rflarf1a*。

2.4 InDel-*Rfla* 标记对 863A/宁恢 8 号 F₂ 分离群体不同单株 *Rfla* 位点的基因型检测

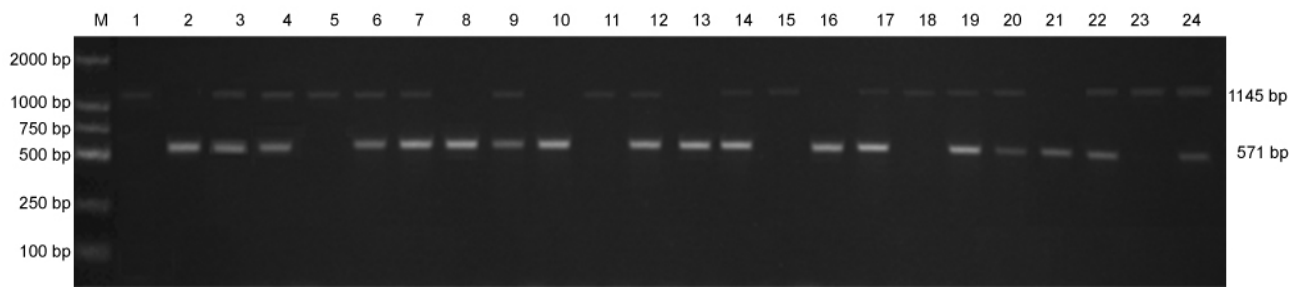
为进一步验证 InDel-*Rfla* 对恢复基因不同基因型的检测效果,在分蘖盛期对 863A/宁恢 8 号 F₂ 群体 200 个单株的 DNA 进行扩增,其电泳产物呈

现出 3 种类型的条带,即恢复系宁恢 8 号 (*RflaRfla*, 1145 bp)、不育系 863A (*rflarf1a*, 571 bp) 以及杂种 F₁ (*Rflarf1a*, 1145 bp 和 571 bp) 的带型(图 5)。经统计,在 F₂ 群体中共检测到 *RflaRfla* 基因型单株 41 个, *Rflarf1a* 基因型单株 111 个, *rflarf1a* 基因型单株 48 个, 3 种基因型符合 1 : 2 : 1 ($\chi^2 = 2.91, 0.25 < P < 0.50$)。因此,通过 InDel-*Rfla* 标记的 PCR 扩增能准确区分 *Rfla* 位点的不同基因型,达到辅助育种的目的。

3 讨论

3.1 *Rfla* 位点基因型在水稻中的分布以及与其他细胞质雄性不育恢复基因的关系

本研究利用 BT 型细胞质雄性不育恢复基因



M—DNA 分子量标准,100~2000 bp; 1—宁恢 8 号; 2—863A; 3—863A/宁恢 8 号 F₁ 杂种个体; 4~24—部分 863A/宁恢 8 号 F₂ 分离单株。
M, DNA marker, 100—2000 bp; Lane 1, Ninghui 8; Lane 2, 863A; Lane 3, F₁(863A / Ninghui 8), Lane 4 to 24, Parts of plants derived from F₂ population of 863A / Ninghui 8.

图 5 InDel- *Rfla* 对 863A/宁恢 8 号 F₂ 群体不同单株的分子检测

Fig. 5. Molecular detections with InDel- *Rfla* in plants derived from F₂ population of 863A / Ninghui 8.

Rfla 位点的碱基差异设计插入/缺失标记,对不同地区来源的常规籼稻品种、恢复系进行检测,结果表明这些材料都含有 BT 型细胞质雄性不育恢复基因,其 *Rfla* 位点基因型为 *RflaRfla*。这其实并不难理解,因为粳稻中的恢复基因均来自于籼稻,大多数籼稻都可能成为它的恢复系^[18]。

对不同细胞质雄性不育来源的籼稻保持系川香 29B(野败型)、Ⅱ-32B(印水型)、武香 2B(马协型)、冈 46B(冈型)和中莲 1B(红莲型)进行扩增,其 *Rfla* 位点基因位点仍为 *RflaRfla*,同样具有恢复粳稻 BT 型细胞质雄性不育性的能力。因此,一般的籼稻保持系都很难转成 BT 型细胞质雄性不育系^[19]。已有研究表明,水稻野败型、印水型以及具有类似恢保关系的马协型、冈型等细胞质雄性不育的主效恢复基因都定位在与 *Rf-1* 相近的第 10 染色体区段,但通过对 *Rfla* 位点基因型的检测,发现它们之间很可能不是同一等位基因的关系^[20-23]。由于在该区段存在大量编码 *Rf-1* 相似结构的 PPR 蛋白基因,因而它们可能属于具有紧密连锁关系的同一基因家族,类似与植物抗病基因的成簇排列^[24]。红莲型细胞质雄性不育保持系在 *Rfla* 位点同样不存在 574 bp 的缺失,它也具有恢复粳稻 BT 型细胞质雄性不育性的能力。尽管红莲型和 BT 型细胞质雄性不育同属配子体不育类型,其线粒体编码的雄性不育毒蛋白基因 *orfH79* 和 *orfH79* 在序列上几乎相同,且红莲型不育主效恢复基因 *Rf5* 与 *Rfla* 是同一基因。但它们在碱基变异位点和恢复机制上完全不同,*Rf5* 基因要恢复红莲型细胞质雄性不育性必须先与一个甘氨酸富集的 GRP162 蛋白结合形成复合物,这样才能进一步与毒蛋白基因 *orfH79* 结合,而 *Rfla* 则直接可以与 *orfH79* 结合,阻止相关毒

蛋白的产生使育性恢复^[25]。

研究同时还对不同地区来源粳稻品种的 *Rfla* 位点进行了检测,除爱知 106 和伊粳 12 号外,都具有 *rflarfla* 基因型,这些品种对粳稻 BT 型细胞质雄性不育系具有保持不育的能力,因此,很容易转成相应的不育系;而爱知 106、伊粳 12 号则与粳稻恢复系一样,其 *Rfla* 位点的基因型为 *RflaRfla*,利用其与 BT 型不育系进行测交,证实它们确实存在较强的恢复性。进一步分析爱知 106、伊粳 12 号的系谱,可以看出它们都具有一定的籼稻血缘,这极有可能是在引入籼稻优异性状的同时,也导入了其恢复基因^[26-27]。由此可见,一些具有恢复性的常规粳稻品种同样可以作为亲本来选育恢复系。

3.2 *Rfla* 分子标记对优良粳稻恢复系选育的作用

优良恢复系选育是提高杂交粳稻优势水平、实现其产量突破的重要途径,而快速、准确地鉴定恢复基因则是提高其育种选择效率的关键。早期粳稻恢复系选育完全依靠测交来鉴定育种后代中是否存在恢复基因,这一方法不仅需要两个生长季节,同时还要对大量单株进行测交。后来为简化育种程序,就借助于不育细胞质来选育同质恢,但由于细胞质遗传背景相同必定导致组合杂种优势的降低^[28]。而利用与恢复基因紧密连锁或共分离的分子标记则可以克服上述缺点,有效减少恢复系选育的时间和强度,大大提高育种工作的效率。本研究根据 BT 型细胞质雄性不育恢复基因克隆的结果,设计了 1 对 InDel 标记,能快速、准确区分不同水稻材料恢复基因 *Rfla* 的基因型,达到粳稻恢复系种质资源鉴定以及标记辅助育种的目的。

当然,仅仅是一个恢复基因的分子标记还难以解决目前粳稻恢复系选育过程中存在的诸多问题。

一方面,恢复系遗传基础还比较狭窄、组合优势不强。闰双勇等对 1985—2006 年间通过国家审定的杂交梗稻父本进行亲缘系数分析,发现绝大多数恢复系仍然是 C57 的衍生系,遗传背景单一,缺乏多样性^[29];另一方面,梗稻恢复系的抗性,如对条纹叶枯病、黑条矮缩病、稻瘟病等的抗性与常规梗稻品种还存在一定的差距^[30-32]。因此,在梗稻恢复系的选育过程中,不仅要充分利用恢复基因的分子标记来实现籼、梗稻血缘间的相互渗透,丰富现有恢复系的遗传背景;同时还要与不同性状分子标记相结合,共同对目标材料进行筛选,从而实现产量、抗性、品质等多个基因在恢复系中的有效聚合。只有这样杂交梗稻的育种水平才有可能上升到一个新的台阶。

在线辅助信息:表 S1 放在《中国水稻科学》网站上,网址为 <http://www.ricesci.cn>。

参考文献:

- [1] 张峭,赵俊晔. 中国稻米供需分析与展望. 农业展望, 2007 (1): 9-14.
- [2] 吴乐,邹文涛. 我国稻谷消费中长期趋势分析. 农业技术经济, 2011, 5: 87-96.
- [3] 邓华凤,何强,舒服,等. 中国杂交梗稻研究现状与对策. 杂交水稻, 2006, 21(1): 1-6.
- [4] 邓华凤. 中国杂交梗稻. 北京: 中国农业出版社, 2008: 11-12.
- [5] 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: 83-84.
- [6] 李铮友. 滇型杂交水稻育种. 昆明: 云南科技出版社, 2000: 1-15.
- [7] 贺和初. 滇一型和 BT 型杂交稻育性遗传和不育机理研究. 云南农业大学学报, 1988, 3(1): 54-68.
- [8] 王才林,汤玉庚. 我国杂交梗稻育种的现状与展望. 中国农业科学, 1989, 22(5): 8-13.
- [9] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, *Rf-1*, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, 1996, 39 (6): 1205-1209.
- [10] Ichikawa N, Kishimoto N, Inagaki A, et al. A rapid PCR-aided selection of a rice line containing the *Rf-1* gene which is involved in restoration of the cytoplasmic male sterility. *Mol Breeding*, 1997, 3(3): 195-202.
- [11] Komori T, Yamamoto T, Takemori N, et al. Fine genetic mapping of the nuclear gene, *Rf-1*, that restores the BT-type cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.) by PCR-based markers. *Euphytica*, 2003, 129(2): 241-247.
- [12] Akagi H, Nakamura A, Yokozeki-Misono Y, et al. Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(8): 1449-1457.
- [13] Tan X L, Tan Y L, Zhao Y H, et al. Identification of the *Rf* gene conferring fertility restoration of the CMS Dian-type 1 in rice by using simple sequence repeat markers and advanced inbred lines of restorer and maintainer. *Plant Breeding*, 2004, 123(4): 338-341.
- [14] 程宝山,洪德林,万志兵,等. 与梗稻 BT 型细胞质育性恢复基因连锁的实用 SSR 标记的筛选. 南京农业大学学报, 2011, 34(1): 1-7.
- [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] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1(1): 19-21.
- [17] Chen X, Temnykh S, Xu Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1997, 95(4): 553-567.
- [18] 汤述翥,张宏根,朱正斌,等. 红莲型不育细胞质应用于梗稻杂种优势的思考与初探. 西南农业学报, 2009, 22(4): 19-20.
- [19] 罗盛财,杨聚宝. BT 型光身不育系一包珍兰 A 选育初报. 杂交水稻, 1989(4): 18-19.
- [20] 张群宇,刘耀光,张桂权,等. 野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf-4* 的分子标记定位. 遗传学报, 2002, 29(4): 1001-1004.
- [21] Fujii S, Toriyama K. Molecular mapping of the fertility restorer gene for ms-CW-type cytoplasmic male sterility of rice. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(4): 696-701.
- [22] 李亮杰,周海鹏,占小登,等. 水稻印尼水田谷型细胞质雄性不育恢复系 R68 的恢复基因初步定位. 中国水稻科学, 2007, 21(5): 547-549.
- [23] Guo J X, Liu Y G. The genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(14): 2404-2409.
- [24] 何小平,刘永柱,郭涛,等. 水稻细胞质雄性不育恢复基因定位及相互关系研究进展. 中国农学通报, 2011, 27(15): 1-5.
- [25] Hu J, Wang K, Huang W C, et al. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *Plant Cell*, 2012, 24(1): 109-122.
- [26] Sugiura N, Tsuji T, Fujii K, et al. Molecular marker-assisted selection in a recurrent backcross breeding for the incorporation of resistance to rice stripe virus and panicle blast in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Res*, 2004, 6(3): 143-148.
- [27] 吐尔干江,陈疆,沙达尔,等. 高产优质水稻新品种—伊梗 12 号. 新疆农垦科技, 2006(1): 40-41.
- [28] 李建红,洪德林. 新选梗稻 BT 型同质恢复系农艺和品质性状的配合力研究. 作物学报, 2005, 31(7): 851-857.
- [29] 闰双勇,马忠友,范俊山,等. 我国杂交梗稻恢复系的遗传多样性. 贵州农业科学, 2011, 39(10): 1-4.
- [30] 李爱宏,戴正元,季红娟,等. 不同基因型水稻种质对黑条矮缩病抗性的初步分析. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 29(3): 18-22.
- [31] 王才林. 江苏省杂交梗稻育种的现状、问题与对策. 西南农业学报, 2009, 22(4): 1165-1169.
- [32] 姚姝,张亚东,朱镇,等. 梗稻恢复系条纹叶病抗性的定向改良. 杂交水稻, 2010(S1): 264-267.