

D 型杂交稻恢复系主效恢复基因的剖分与遗传效应分析

王玉平 李仕贵* 曹 罡 马玉清

(四川农业大学 水稻研究所, 四川 温江 611130; *通讯联系人, E-mail:lishigui_sc@263.net)

Dissection and Genetic Analysis of the Major Restorer Gene of D-type Hybrid Rice Restorer Line

WANG Yurping, LI Shir-gui*, CAO Gang, MA Yurqing

(Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China; * Corresponding author, E-mail:lishigui_sc@263.net)

Abstract: To dissect the major restorer gene of D-type hybrid rice restorer line, a set of near-isogenic lines (NILs) carrying gene of fertility restoration from Minghui 63 with a genetic background of D297A were used. Through careful trait investigation and marker-assisted selection of the offsprings of both the back-crossed and self-crossed plants, an individual, NIL 818, which contained a major restorer gene and had genetic background very similar to that of D297A (only 1.5 % of the SSR sites revealed the genotype of Minghui 63) was chosen. Moreover, the fertility segregation ratio of F₂ populations of D297A/818, D62A/818 and Zhenshan 97A/818 were fitted to 3 : 1 confidently, it was proved that the NIL 818 contained a major restorer gene. Investigation on the pollen fertility and seed setting rate of F₁ population of these combinations and the seed setting rate of the hybrids with NIL 818 crossed by several types of CMS lines in different ecological areas indicated that the difference of fertility restoration ability between the single major restorer gene and the whole restorer genes of Minghui 63 was very small, and the expression of the major restorer gene was stable in different genetic backgrounds.

Key words: rice; restorer gene; genetic analysis; QTL dissection; marker assisted selection

摘 要: 利用明恢 63 与 D297A 构建的近等基因系对 D 型杂交水稻恢复系主效恢复基因进行了剖分,连续回交 7 代后,经自交和测交筛选并结合农艺性状比较和 SSR 分子标记辅助选择,将明恢 63 的主效恢复基因剖分到具有 D297A 遗传背景的近等基因系 818 中,该近等基因系遗传背景与 297A 相似,SSR 标记差异为 1.5 %。对近等基因系 818 恢复基因的遗传分析证明,该近等基因系具有一对主效恢复基因。近等基因系 818 与不同类型的不育系杂交后在不同生态地区的试验表明,近等基因系 818 所含单个主效恢复基因的恢复力与明恢 63 所含有的 2 对以上恢复基因的恢复力表现没有差异,并且在不同遗传背景和生态环境中的表现相似;单个主效恢复基因的恢复力在不同生态环境的表现稳定。

关键词: 水稻; 恢复基因; 遗传分析; QTL 剖分; 分子标记辅助选择; 遗传分析

中图分类号: Q943; S334.5; S511.035.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2005)05-0406-05

D 型不育系是采用地理远缘籼亚种内品种间杂交的方法培育而成的不育系,其胞质来源不同于野栽交法获得的野败型不育系,恢保关系与野败型不育系相似^[1],但是尚未对其恢复基因进行深入研究。多数研究报道认为野败型细胞质雄性不育性的恢复受 2 对显性基因控制^[2,3],Yao 等、何光华等分别利用 RFLP 和 SSR 等分子标记把明恢 63 的两个恢复基因定位于第 1 和第 10 染色体上,且证实第 10 染色体长臂上的基因座位的效应值大于第 1 染色体的恢复基因座位;Yao 等进一步认为第 10 染色体上的主效基因有足够效能使野败型的雄性不育性得以全部恢复^[4,5]。这些研究也从分子水平证明了明恢 63 具有 2 对恢复基因。

综合利用恢复基因,扩大恢复系的遗传背景,必须深入研究每个主效恢复基因在不同遗传背景、不同生态环境下的恢复力和稳定情况,以及对不同胞质的恢复力和基因间互作情况。消除遗传背景的影响是研究基因的遗传特性以及基因定位、克隆及表

达研究的重要环节,建立近等基因系则是消除遗传背景的首选方法。本研究利用 D297A,采用回交、测交和分子标记辅助选择等方法,剖分和构建了明恢 63 的主效恢复基因的近等基因系,并对该主效恢复基因的遗传效应进行了分析,为进一步研究和利用该恢复基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 近等基因系的构建

自 1996 年起,用不育系 D297A 与恢复系明恢 63 所得 F₂ 的可育株作父本,与 D297A 回交,然后在回交后代中选择性状接近轮回亲本 D297A 且育性好的单株与 D297A 回交,连续回交 7 代;选择回交中育性分离比例为 1 : 1,自交育性分离比为 3 : 1

收稿日期: 2004-10-26; 修改稿收到日期: 2004-12-20。

第一作者简介: 王玉平(1970 -),男,助理研究员,在职博士研究生。

的性状接近轮回亲本 D297A 的正常可育株系,再自交 2 代,选择没有育性分离的正常可育株系,建成 13 个近等基因系。

1.2 分子标记辅助选择和遗传背景分析

取亲本和近等基因系植株的叶片,分别提取总 DNA,方法参照 Murray 等的 CTAB 法^[6]。

据 Yao 等^[5]对野败型不育系恢复基因定位情况,选择与明恢 63 的主效恢复基因连锁的微卫星引物 RM1、RM258、RM304,对各近等基因系进行筛选,进行分子标记辅助选择;根据 Cornell 大学 SSR 图谱,选择 336 对 SSR 引物(每条染色体 28 对,覆盖水稻染色体 1691.7 cM),以 D297B 为对照,对所构建的近等基因系进行背景分析。微卫星扩增及检测参照郑康乐等的方法^[7],PCR 扩增产物在含有 EB 的 3 % 的琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统成像,记录和分析检测结果。

1.3 材料种植与农艺性状调查

2002 年夏,D297B 和入选近等基因系 814、815、818、819、823、824、827、841、844,按随机区组 3 次重复,每小区 3 行,每行 12 株,种植于四川农业大学水稻研究所温江实验场。土壤肥力均匀,田间管理相同于大田。成熟后每小区取中间行的中间 5 株进行性状调查和室内考种,考察性状有播抽期(d)、千粒重(g)、每穗颖花数(朵)、每穗粒数(粒)、结实率(%)和产量(t/hm²)。

2003 年用明恢 63、近等基因系 818 与不育系 D62A、珍汕 A、D297A 杂交,F₁ 分别种植于海南陵水和四川温江等地,3 次重复,每个组合选取 5 株调查 F₁ 的花粉育性及自交结实率;再用明恢 63、近等基因系 818 与不育系珍汕 97A、D297A、D59A、D702A、G46A、G450A、-32A、协青早 A 等杂交,F₁ 分别种植于四川的温江、乐山和南充等地,3 次重复,随机区组设计,考察自交结实率。

所得数据在 DPS 上进行方差分析,达显著水平者再进行 LSD 比较。

2 结果与分析

2.1 近等基因系的构建与主效恢复基因的剖分

2.1.1 分子标记辅助选择与遗传背景筛选

用 RM258 筛选得到具有供体亲本明恢 63 带型的近等基因系,如图 1。图中的双带株系左起依次为近等基因系 814、815、818、819、823、824、827、841、844,表明这些株系均具有明恢 63 的第 10 染色体上的主效恢复基因。没有检测到第 1 染色体上具

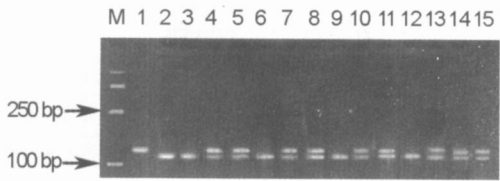


图 1 利用 RM258 对近等基因系进行筛选
Fig. 1. Selecting the near isogenic lines (NILs) by RM258.
1 - 明恢 63; 2 - D297A; 3 ~ 15 - 近等基因系, 其中 4,5,7,8, 10,11,13,14,15 为入选株系。
Lane 1, Minghui 63; Lane 2, D297A; Lanes 3 - 15, NILs 4,5, 7,8,10,11,13,14,15, they were the plants selected.

有与 RM1 连锁的主效恢复基因的近等基因系。
利用 336 对微卫星引物对入选的 9 个测交比符合 1 : 1,自交比符合 3 : 1 且 RM258 带型与明恢 63 一致的近等基因系进行背景筛选,微卫星标记背景差异为 1.5 % ~ 5.7 %,见表 1。近等基因系 818、841 与轮回亲本 D297A 的差异最小。

2.1.2 主效恢复基因的剖分

D297A 与筛选获得的 9 个近等基因系杂交后的自交和测交后代的分离情况见表 1,经卡方检验,所得可育株与不育株的比例,自交后代分离比均符合 3 : 1;除了 823 株系,其他 8 个株系的测交分离比均符合 1 : 1,说明各近等基因系都只具有一个主效恢复基因。

2.1.3 农艺性状的比较与筛选

近等基因系与对照 D297B 的主要农艺性状比较见表 2,经方差分析和 LSD 法比较,在 9 个入选的近等基因系中,只有 818 株系与对照在表中所列的 7 个农艺性状都相似,没有显著差异,从农艺性状考察,818 株系是最佳株系。

综上所述,利用分子标记辅助选择,并且通过对育性的测交、自交分离比,以及农艺性状比较和遗传背景筛选,确定最佳近等基因系为 818 株系,其恢复基因是位于第 10 染色体上的 1 个主效恢复基因。

2.2 主效恢复基因的遗传效应分析

2.2.1 恢复基因剖分结果的验证

用不育系 D62A、珍汕 A、D297A 与近等基因系 818 杂交,其 F₁ 结实正常,F₂ 育性分离比符合 3 : 1 (表 3),表现为单个主效基因的遗传,表明恢复基因剖分结果良好。

2.2.2 单个主效恢复基因的恢复力表现

近等基因系 818 与不育系 D62A、珍汕 97A、

表 1 近等基因系用 D297A 回交及自交后代的表现及背景选择结果

Table 1. Result of background selection and performance of NILs in the back-crossing and self-crossing.

近等基因系编号 Code of NIL	自交 Self-crossing			回交 Back-crossing			背景差异 (SSR 差异)
	可育株	不育株	² (3 1)	可育株	不育株	² (1 1)	Difference of genetic backgrounds / %
	Fertile	Sterile		Fertile	Sterile		
814	43	17	0.556	32	26	0.431	1.5
815	45	13	0.092	37	23	2.817	2.0
818	44	15	0.051	28	31	0.271	1.2
819	46	14	0.022	31	29	0.017	1.8
823	40	19	2.040	37	21	3.879	5.7
824	48	12	0.556	35	25	1.350	1.5
827	48	11	0.955	33	25	0.845	2.3
841	48	11	0.955	32	27	0.271	1.2
844	50	11	1.230	37	23	2.817	4.3

表 2 近等基因系与对照的田间农艺性状表现

Table 2. Performance of agronomic traits of NILs and controls.

材料 Material	播抽期 Days to heading/ d	株高 Plant height / cm	有效穗 No. of panicles per plant	每穗颖花数 No. of spikelets per panicle	结实率 Seed setting rate / %	千粒重 1000-grain weight/ g	产量 Yield / (t · hm ⁻²)
D297B (CK)	84.2	96.1	9.9	140.5	84.4	25.06	442.5
814	85.3	96.7	10.5	141.7	83.5	25.45 [*]	450.1
815	87.2 [*]	99.4	12.4 [*]	150.8 [*]	80.7 [*]	26.22 [*]	428.9 [*]
818	84.5	95.7	10.1	140.3	83.9	25.24	448.3
819	82.7 [*]	97.3	9.5	135.2 [*]	85.6 [*]	24.57 [*]	440.6
823	87.5	95.8	10.6	146.5	84.5	26.17	460.2 [*]
824	85.1	97.2	12.5 [*]	138.9	83.6	26.02 [*]	449.8
827	83.4 [*]	94.5	11.6 [*]	145.2 [*]	82.5	25.24	431.9 [*]
841	86.9 [*]	101.4 [*]	10.7	150.6 [*]	80.2 [*]	24.89	457.2 [*]
844	85.6	100.5 [*]	11.5 [*]	152.4 [*]	81.3	24.84	455.1 [*]

^{*}表示与对照的差异达 0.05 显著水平。

^{*}Significant at the level of 0.05 compared to CK.

表 3 各组合的育性及其后代分离情况

Table 3. Fertility of each combination and the segregation of their F₂.

组合 Combination	F ₁ 结实率	F ₁ 可育花粉率	F ₂ 分离比(可育株 不育株)		χ ² (3 1)
	Seed setting	Percentage of the	Segregation ratio of F ₂		
	rate of the F ₁ / %	fertile pollen in F ₁ / %	(Fertile plant	Sterile plant)	
D62A/ 818	81.10	90.80	887	301	0.222
珍汕 97A/ 818 Zhenshan 97A/ 818	79.80	90.60	697	211	1.411
D297A/ 818	80.70	91.00	93	26	0.473

D297A 杂交所得 F₁ 分别种植于海南陵水和四川温江,调查 F₁ 自交结实率和花粉育性,其平均值分别列于表 4。方差分析表明,两地的结实率没有差异,在 3 个不同的不育系间的表现也没有显著差异;可育花粉率的表现也相同。说明剖分出的单个主效恢复基因在不同环境和遗传背景下的表现相同。

2.2.3 单个主效恢复基因与多个恢复基因遗传效应的比较

明恢 63、近等基因系 818 与各种不育系杂交所得 F₁,在不同地区种植的平均结实率见表 5。两个

材料杂交种的结实率总平均值分别为 76.2%和 75.8%,方差分析差异不显著;利用 DPS 软件进行 LSD 法多重比较,两者与各种不育系杂交 F₁ 的结实率,分别在各种不育系间存在着显著差异;不同地点间 F₁ 的结实率差异不显著。表明具有单个主效恢复基因的近等基因系 818 和具有 2 个以上恢复基因的明恢 63 之间的恢复力没有显著差异,这是由于两份材料有着共同的主效恢复基因的缘故;但明恢 63 的恢复力略大些,则是因为它还具有其他微效恢复基因。同时,由于具有共同的主效恢复基因,两份材

表 4 近等基因系 818 与 3 个不育系杂交后的育性表现

Table 4. Fertility of three combinations of NIL 818. %								
育性 Fertility	温江 Wenjiang				陵水 Lingshui			
	818	D62A/ 818	珍汕 97A/ 818	D297A/ 818	818	D62A/ 818	珍汕 97A/ 818	D297A/ 818
			Zhenshan 97A/ 818				Zhenshan 97A/ 818	
结实率 Seed setting rate	85.1	80.1	79.6	81.2	84.2	82.1	80.1	80.2
可育花粉率 Percentage of fertile pollen	94.3	91.2	89.7	92.6	93.5	90.3	91.4	89.7

表 5 近等基因系 818 与明恢 63 所配 F₁ 在不同地区的平均结实率

Table 5. Average seed setting rate of the hybrids from NIL 818 and Minghui 63 in different sites. %									
不育系 Sterile line	明恢 63 Minghui 63				近等基因系 818 NIL 818				均值 Mean
	温江	乐山	南充	均值	温江	乐山	南充	均值	
	Wenjiang	Leshan	Nanchong	Mean	Wenjiang	Leshan	Nanchong	Mean	
-32A	72.9	74.1	73.9	73.7 cd	73.2	72.5	74.0	73.2 e	73.5 d
D297A	73.0	74.2	72.6	73.2 d	76.7	77.5	78.3	77.5 ab	75.4 c
D59A	75.4	74.5	74.5	74.8 c	73.9	72.9	76.1	74.3 de	74.6 c
D702A	74.1	74.2	74.4	74.3 cd	74.4	76.0	75.4	75.3 cd	74.8 c
G450A	76.6	76.0	76.6	76.4 b	77.9	78.2	78.0	78.0 a	77.2 b
G46A	77.8	78.0	79.6	78.5 a	76.3	75.7	76.4	76.1 bc	77.3 ab
珍汕 97A Zhenshan 97A	78.5	79.7	80.6	79.6 a	74.2	74.6	74.4	74.4 de	77.0 b
协青早 A Xieqingzao A	77.8	80.2	79.7	79.2 a	76.6	78.3	77.1	77.4 ab	78.3 a
均值 Mean	75.8	76.4	76.5	76.2	75.4	75.7	76.2	75.8	76.0

两份材料在各不育系间结实率 LSD 检验的 LSD 值: $LSD_{0.05} = 1.1593$, $LSD_{0.01} = 1.5973$; 明恢 63 在各不育系间结实率 LSD 检验的 LSD 值: $LSD_{0.05} = 1.2249$, $LSD_{0.01} = 1.8557$; 818 在各不育系间结实率 LSD 检验的 LSD 值: $LSD_{0.05} = 1.4424$, $LSD_{0.01} = 2.1851$ 。

The LSD value of 2 restorer lines for their seed setting rate: $LSD_{0.05} = 1.1593$, $LSD_{0.01} = 1.5973$; The LSD value of Minghui 63 for its seed setting rate: $LSD_{0.05} = 1.2249$, $LSD_{0.01} = 1.8557$; The LSD value of NIL 818 for its seed setting rate: $LSD_{0.05} = 1.4424$, $LSD_{0.01} = 2.1851$.

料在不同生态条件下的恢复力表现相似,没有显著差异。在不同遗传背景下它们的恢复力表现也相似,分别在各种不育系间存在着显著差异。

3 讨论

在对明恢 63 的恢复基因进行剖分时,本研究最初想剖分和建立明恢 63 所有单个恢复基因的整套近等基因系,但在利用分子标记检测时发现绝大多数近等基因 RM258 的带型都与明恢 63 的一样;后来用更近的标记 RM304 对带型与明恢 63 不一致的 4 个近等基因系筛选时,发现它们的带型又与明恢 63 一致,而且近等基因系之间恢复力差异不大,因生育期差异较大而被淘汰。没有检测到与 RM1 存在连锁关系的第 1 染色体上的主效恢复基因,说明在剖分过程中,丢失了另外恢复力较弱的恢复基因。梁国华等^[8]在剖分恢复基因时也遇到类似情况。主要原因可能是:第 10 染色体的恢复基因恢复力强,而其余恢复基因恢复力较弱。在低世代进行田间选择时,弱恢复基因遗传效应被强恢复基因掩盖而未被选择到,再加之弱恢复基因的恢复力弱和

不育系杂交后结实率低,因此在人工选择和自然选择的双重选择下弱恢复基因在剖分时丢失。与剖分其他微效 Q TL 一样,要将单个弱恢复基因剖分出来必须排除环境影响和主效基因的掩盖,同时还要注意基因间的相互作用。所以在剖分弱恢复基因时,首先要将第 10 染色体的主效基因剔除,并利用分子标记对目的基因进行选择。此外在田间选择时还应注意对结实率较低的单株的选择。由于弱恢复基因的恢复力弱,回交时结实率低,所以应有较大的回交群体。

本研究对所得近等基因系 818 的恢复力的普通遗传学研究表明,第 10 染色体上的恢复基因是一个主效基因。该主效恢复基因对多种胞质不育系都有很强的恢复力,不受遗传背景和生态环境的影响,其恢复力与具有多个恢复基因的明恢 63 的恢复力无显著差异,这为利用这一主效恢复基因进行分子标记辅助育种,快速选育优良恢复系提供了材料基础和实验依据。利用我们所剖分的主效恢复基因材料,结合分子标记辅助选择,可以快速地将一些优良材料转育成恢复系,缩短恢复系的选育时间,扩大恢

复系的遗传背景,促进水稻杂种优势的利用。

参考文献:

- 1 黎汉云,周开达,李仁端,等. D297A 的选育及其配组鉴定. 杂交水稻,1988,(5):26-28.
- 2 高明尉. 野败型杂交籼稻基因型的初步分析. 遗传学报,1981,8(1):66-74.
- 3 杨仁崔,卢浩然. 水稻恢复系 IR24 恢复基因的初步分析. 作物学报,1984,10:81-86.
- 4 Yao F Y,Xu C G,Yu S B, et al. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 1997,98:183-187.
- 5 何光华,王文明,刘国庆,等. 利用 SSR 标记定位明恢 63 的 2 对恢复基因. 遗传学报,2002,29(9):798-802.
- 6 Murray M G,Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980,8:4321-4325.
- 7 Zheng K L,Huang N,Bennett J, et al. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. IRRI Discussion Paper Series No.12. Manila: IRRI, 1995.1-24.
- 8 梁国华,严长杰,汤述翥,等. BT 型细胞质雄性不育恢复基因的基因定位. 中国水稻科学,2001,15(2):88-92.

欢迎订阅 2006 年《江苏农业学报》

《江苏农业学报》属综合性农业学术期刊,国内外公开发行,以登载未经发表的农业科学研究原始论文为主,并附有研究简报、科技短讯等栏目,选题广泛,编辑规范,现已有 5 家电子版本。刊发的论文已被国内外 24 个文摘期刊收录,在农业科研工作者和农业高校师生中具有较大影响。

《江苏农业学报》为季刊,大 16 开,每期 72 页,每期定价 4 元,全年 16 元,邮发代号 28-113,全国各地邮局均可订阅。

地址:江苏省南京市孝陵卫钟灵街 50 号江苏省农业科学院情报研究所;邮编:210014;电话:025-84390285;E-mail:xuebao@jaas.ac.cn。

欢迎订阅 2006 年《山东农业科学》

《山东农业科学》是山东农学会、山东省农业科学院、山东农业大学、莱阳农学院共同主办的综合性农业科技期刊,创刊于 1963 年 10 月。办刊方针是提高与普及兼顾,学术与实用并举;办刊宗旨是报道农业科技成果,传播农业科学技术,促进农业科技交流,推动农业科技进步。除开辟遗传育种、生物技术、栽培生理、植物保护、土壤肥料、优良品种、畜牧兽医等固定栏目外,还不定期设农业科技发展论坛、国外农业科技、文献综述等栏目,及时报道农业科研的新成果、新进展、新方法以及农业的新技术。主要读者对象为农业科研人员、农业院校师生、农业管理干部、农技推广人员、农村科技示范户等。

《山东农业科学》为山东省十佳期刊、华东地区最佳期刊、全国优秀期刊、中国期刊方阵双百期刊、中国农学会优秀期刊、第二、三届中国期刊奖百种重点科技期刊。

《山东农业科学》为大 16 开本,双月刊,80 页,每期定价 5.00 元,全年定价 30.00 元,国内外公开发行,邮发代号 24-2,各地邮局及编辑部均可订阅。地址:济南市桑园路 28 号;邮编:250100;电话:0531-83179268;E-mail:sdnykx@saas.ac.cn。