

姚国新,黄明军,李长春,等. 水稻籼粳交新亲和位点的筛选与遗传定位[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):46-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.012

水稻籼粳交新亲和位点的筛选与遗传定位

姚国新,黄明军,李长春,李春生

(特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室/湖北工程学院生命科学技术学院,湖北孝感 432000)

摘要:亲和基因能够突破水稻籼粳亚种间杂交结实率低的障碍,新的籼粳交雌不育基因鉴定与定位将有助于进一步解决亚种间杂交不育问题。将 324 份籼稻育种材料与典型粳稻日本晴杂交,从中筛选出 1 份材料 9311K,与日本晴的杂交种 F₁ 的结实率为 71.23%。经测序 9311k 的 S5 位点为粳型 S5ⁱ。随后构建 9311k/9311//日本晴三交群体对亲和基因进行定位,将该基因定位于第 7 染色体 RM18-RM1335 区间内,为一个新的雌不育位点,命名为 S36(t)。

关键词:籼粳交;亲和基因;筛选;遗传定位

中图分类号: S511.2⁺10.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0046-03

籼(*indica*)粳(*japonica*)是水稻在漫长的进化中形成的 2 个亚种^[1],彼此之间存在生殖隔离,其杂交种 F₁ 的结实率不育或半不育。尽管籼粳交杂交种有强大的杂种优势,但结实率是杂优利用的瓶颈。在自然界中存在一类特殊的基因,它们与籼亚种或粳亚种杂交,其杂种的结实率均正常,称为广亲和品种(wide compatibility varieties,简称 WCV)。S5ⁿ 是目前发现的效应最大的广亲和基因,被定位于第 6 号染色体上^[2],籼稻 S5ⁱ、粳稻 S5^j 和广亲和 S5ⁿ 这 3 个等位基因决定杂交种结实率高低,S5ⁱS5^j 基因型不育,S5ⁱS5ⁱ、S5^jS5^j、S5ⁱS5ⁿ 和 S5^jS5ⁿ 基因型结实正常^[3]。除 S5ⁿ 以外,不同的材料中发现了许多籼粳交不育位点,例如: S7、S8、S9、S31、S32、S35 等^[4-8],更多亚种间亲和基因的发掘有利于突破亚种间结实

率低的问题。本试验在 324 份籼稻育种材料中筛选到 1 份 S5 位点为 S5ⁱ,但具有籼粳杂交亲和表型的材料 9311K,对该粳亲和基因遗传定位显示该位点为一个新位点。

1 材料与方法

1.1 材料种植、杂交与 DNA 提取

324 份育种材料来源于杂交水稻国家重点实验室(武汉)收集与创制,2012 年种植于湖北武汉,杂交采用温烫去雄方法,籼稻 42℃,粳稻 45℃,温烫 5 min,剪颖去雄后授粉套袋。F₁ 2012 年冬种植于海南陵水,9311K/9311//日本晴三交群体分别在 2013 年夏季湖北武汉和冬季海南陵水构建。主茎穗成熟后统计结实率。3 叶期取幼嫩叶片 CTAB 法^[8]提取 DNA,稀释至 20 ng/μL 备用。

1.2 S5 功能位点标记引物及测序引物设计

S5ⁿ 的功能标记参照杨杰等设计的序列^[9],PCR 扩增后含 S5ⁿ 比非 S5ⁿ 的产物短 136 bp。根据 Chen 等公布的籼粳稻 S5 位点序列^[10],在 2 个有差异的 SNP 位点分别设计引物(表 1)进行 PCR 扩增,产物交由测序公司测序。

收稿日期:2014-06-30
基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2012FFB00504);国家级大学生创新创业训练计划(编号:201310528008)。
作者简介:姚国新(1977—),男,湖北孝感人,博士,副教授,主要从事水稻籼粳杂交杂种优势机制研究。E-mail: guoxiny2004@hbeu.edu.cn。

表 6 不同生长激素对红果罗芙木不定根诱导的影响

培养基	激素与浓度配比		
	0.5 mg/L NAA	0.5 mg/L IBA	0.5 mg/L NAA + 0.2 mg/L IBA
MS	根少,为 2~3 条,但比较粗大,出根时间为 15~20 d	根数为 1~2 条,细长状,长度 2~3 cm,平均出根时间为 20 d 左右	根数约为 3 条,1~2 条较粗,平均长度为 2 cm,出根时间为 15 d
1/2MS	根数为 3~5 条,较粗大,平均出根时间为 12~15 d	根数目平均为 3~4 条,细长,长度 2~3 cm,平均出根时间为 15 d 左右	根数约为 4~6 条,平均长度 2~3 cm,出根时间 10 d 左右

胞分裂素,生长素配比可诱导芽增殖并获得健壮组培苗,根诱导效果良好、再生时间短,可在较短时间内获得大量种苗进行工厂化育苗。

参考文献:

[1] 赵守训,黄泰康,丁志遵,等. 中药辞海:第 3 卷[M]. 北京:中国医药科技出版社,1997.
[2] 宋立人. 现代中药学大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,

2001:1850.
[3] 于德泉,林 茂. 红果罗芙木弱碱部分的化学研究[J]. 药学学报,1982(4):309-311.
[4] 龙峰雪,曹福祥,曹基武,等. 云南罗芙木叶愈伤组织诱导与植株再生[J]. 中南林业科技大学学报,2008,28(3):49-54.
[5] 高 燕,李守岭,白燕冰,等. 印度罗芙木组织培养技术研究[J]. 热带农业科技,2009,32(2):29-31,34.

表 1 测序引物序列及扩增产物长度

引物名称	引物序列 F(5'→3')	扩增产物长度(bp)
S5-1	F: TGATATGACCAGCATCTTCGATCG; R: TGACGGCCATTAATCCGATCG	1 165
S5-2	F: AGGTTGACGAACCATGCAGATGATC; R: TCAGCGGAGGTACACAATCGATTG	1 085

1.3 SSR 引物、BAS 池构建、PCR 扩增及电泳

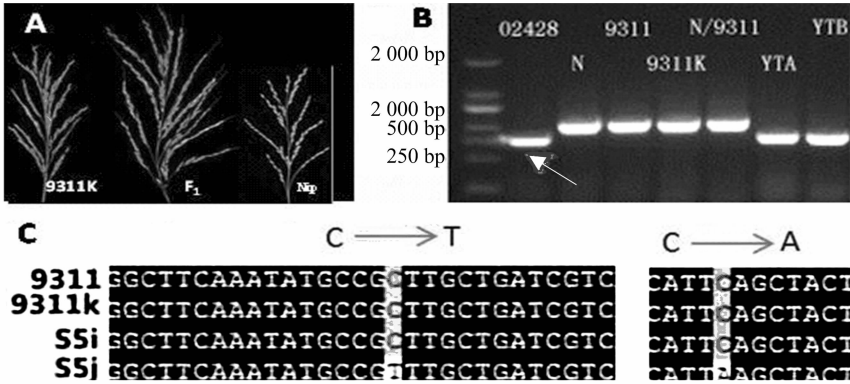
参照文献[11-14]序列,共合成均匀分布染色体的 SSR 引物 746 条。选择高结实率和低结实率的单株各 15 份,等量混合 DNA 构建 BSA 高低池。PCR 扩增程序为:预变性 95 ℃ 5 min;扩增 35 个循环,94 ℃ 30 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s。扩增体系为 10 μL,分别为: *Taq* 酶 0.2 μL (2.5 U/ml), dNTP 0.15 μL (10 mM), DNA 1 μL (20 ng/μL), 引物 0.4 μL (10 mmol/L)。采用 5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,电泳时间 90 min。

1.4 QTL 定位与分析

BSA 池中筛选的多态性引物在三交群体中进行 PCR 扩增、电泳和读带。标记带型与 9311K/日本晴 F_1 一致的记为 A,与 9311/日本晴 F_1 一致的记为 B,按要求录入三交群体的标记带型数据,利用 Mapmaker3.0^[15] 进行标记连锁作图, Group 命令分组, Kosambi 方法计算遗传距离。采用 QTLMapperV2.0^[16] 扫描 QTL,以 LOD 值 2.5 作为 QTL 存在阈值。连锁遗传图采用刘仁虎等绘图方法^[17] 在 Microsoft Excel 2010 中完成。

2 结果与分析

2.1 粳亲和材料筛选与检测



A—亲本及杂种 F_1 穗子; B— $S5^n$ 鉴定引物扩增结果(箭头所示 $S5^n$ 扩增产物); C— $S5$ 测序结果(浅底色区域代表粳粳的突变位点)
图1 9311K与Nipponbare 杂交及 F_1 穗部表型及亲和基因S5 检测

2.3 定位群体构建

2013 年夏,将 9311 与 9311K 杂交,2013 年春,将 9311/9311K 的 F_1 与日本晴进行杂交,获得 9311K/9311//日本晴的三交群体共 314 个单株,用于亲和基因的遗传定位。

2.4 BSA 池引物筛选及 QTL 定位

BSA 高低池的 DNA 作为模板,利用 746 对 SSR 标记进行 PCR 扩增,在高低池中筛选到 6 个有差异的标记。将这 6 个差异标记在整个三交群体的 314 个单株中扩增,将带型数据和对应的结实率数据录入 Mapmaker 中进行连锁分析,获得连锁图,随后在 QTLMapper 中扫描 QTL 位点,结果仅发现 1 个 QTL 位点,位于第 7 号染色体 RM18-RM1335 区间内(图 2),LOD 值为 5.4,能解释 23.15% 的表型变异。

324 份粳稻材料与日本晴杂交的 F_1 中,除 1 份材料 9311K 的 F_1 结实率达到 70% 以上外,其余的结实率均在 10%~50%,表现为不育或半不育。将 9311、9311K 分别和日本晴杂交,2 个杂交 F_1 的花粉经碘-碘化钾染色后均为正常。统计主茎穗结实率,结果见表 2、图 1-A,表明 9311K 中含有粳亲和的雌不育位点。

表 2 9311、9311K 自交及与日本晴杂交的结实率

材料	结实率(%)
9311	86.25 ± 4.65
9311/日本晴	28.16 ± 5.86
9311K/日本晴	71.23 ± 8.73
日本晴	90.32 ± 3.24

2.2 9311K 的 S5 位点检测

为了确定 9311K 中的 S5 位点是粳型 $S5^i$ 还是粳型 $S5^j$,利用 S5 的功能标记对 02428(含有广亲和基因 $S5^n$)、日本晴(含 $S5^i$)、9311(含有粳稻 $S5^i$)、9311K、日本晴(N)和 9311 的 F_1 (含 $S5^i$ 和 $S5^j$)、YTA 和 YTB(含广亲和基因 $S5^n$)进行扩增(图 1-B),9311K 与 9311 的带型一致,与含有广亲和基因 02428 等带型不符。为了进一步确认 9311K 中 S5 位点的来源,将 S5 的序列进行测序,9311K 和 9311 的 S5 序列一样,为粳型 $S5^i$ (图 1-C)。

3 结论与讨论

3.1 粳亲和基因位点不断发掘,为克服粳粳杂交不育提供基础

粳粳交有强大的杂种优势,由于生殖障碍,结实率低,在生产上一直没有很好的利用。粳粳交育性位点的发掘和定位,为克服粳粳交结实率低的问题奠定了基础。Chen 等利用已定位的 S5、S7、S8、S9 等位点,将粳稻中的育性位点替换成相应的粳稻位点,成功选育出能够在生产上利用的亲粳粳不育系 509S^[18],大大推进了亚种间杂优利用的进程。越来越多的粳粳亚种间育性控制位点的发掘,对水稻亚种间杂优利用将有较大的促进作用。

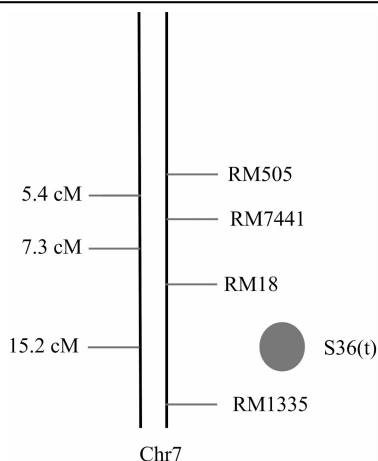


图2 粳亲和雌不育基因QTL定位

3.2 粳亲交雌不育控制位点复杂,定位位点还需进一步构建精细定位群体

粳亲的分化和生殖隔离是在漫长的进化历程中逐步形成的,涉及的基因位点和机制很复杂,分为雌配子不育、雄配子不育、花粉不散、花粉不萌发等原因。目前已报道的粳亲交中导致雌、雄配子不育的位点各有 20 多个,几乎分布于水稻各条染色体^[19]。雌配子中 S5 位点被克隆,其他基因由于种种原因至今还没有精细定位。本研究定位的 QTL 在第 7 染色体长臂上,与已报道的水稻粳亲交雌不育位点不同,是一个新的控制位点。为消除环境和遗传背景的干扰,需要进一步构建近等基因系用于精细定位。此外,琼脂糖凝胶的电泳分辨率有限,进一步定位工作需要利用分辨率更高的聚丙烯酰胺凝胶。

从 324 份粳稻育种材料中筛选到 1 份亲粳的 9311K,构建三交定位群体,获得 1 个新的亲粳粳亲交雌不育位点 S36(t),定位在水稻第 7 号染色体 RM18 – RM1335 区间,能够解释 23.15% 的遗传变异。

参考文献:

- [1] Komori T, Ohta S, Murai N, et al. Map – based cloning of a fertility restorer gene, *Rf – 1*, in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Journal, 2004, 37(3): 315 – 325.
- [2] Ikehashi H, Ariki H. Varietal screening of compatibility types revealed in F_1 fertility of distant crosses in rice [J]. Japan J Breeding, 1984, 34: 304 – 312.
- [3] Chen J M, Zhao Z G, Jiang L, et al. A new gene controlling hybrid sterility in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 2011, 184: 15 – 22.
- [4] Wan J M, Ikehashi H. Identification of a new locus S – 16 causing hybrid sterility in native rice varieties (*Oryza sativa* L.) from Tai – hu Lake region and Yunnan Province, China [J]. Breeding Science, 1995, 45: 161 – 170.
- [5] Yanagihara S, Kato H, Ikehashi H. A new locus for multiple alleles causing hybrid sterility between an aus variety and japonica varieties in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Jpn J Breed, 1992, 42: 793 – 801.
- [6] Li D T, Chen L M, Jiang L, et al. Fine mapping of S32(t), a new gene causing hybrid embryo sac sterility in a Chinese landrace rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(3): 515 – 524.
- [7] Kubo T, Yoshimura A. Linkage analysis of an F_1 sterility gene in *japonica/indica* cross of rice [J]. Rice Genet Newslett, 2001, 18: 52 – 53.
- [8] Chen M J, Zhao Z G, Jiang L, et al. A new gene controlling hybrid sterility in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 2012, 184(1): 15 – 22.
- [9] 杨杰, 王军, 曹卿, 等. 水稻广亲和基因 S5 – n 的功能标记开发及其应用 [J]. 作物学报, 2009, 35(11): 2000 – 2007.
- [10] Chen J J, Ding J H, Ouyang Y D, et al. A triallelic system of S5 is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of *indica – japonica* hybrids in rice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(32): 11436 – 11441.
- [11] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1988, 76(6): 815 – 829.
- [12] Temnykh S, Park W D, Ayres N, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100(5): 697 – 712.
- [13] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Research, 2002, 9(6): 199 – 207.
- [14] Chen X, Temnykh S, Xu Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genome – wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95(4): 553 – 567.
- [15] Gao Y M, Zhu J. Mapping QTLs with digenic epistasis under multiple environments and predicting heterosis based on QTL effects [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(3): 325 – 333.
- [16] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. Genomics, 1987, 1(2): 174 – 181.
- [17] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏 [J]. 遗传, 2003, 25(3): 317 – 321.
- [18] Chen L M, Zhao Z G, Liu X, et al. Marker – assisted breeding of a photoperiod – sensitive male sterile *japonica* rice with high cross – compatibility with *indica* rice [J]. Molecular Breeding, 2011, 27(2): 247 – 258.
- [19] 李万昌, 王永飞, 马三梅, 等. 水稻粳亲亚种间杂种广亲和基因与不育基因 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 930 – 932.