

张宏根,许作鹏,裴 艳,等. 利用染色体片段代换系定位水稻 HL 型育性恢复基因[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):64-68.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.017

利用染色体片段代换系定位水稻 HL 型育性恢复基因

张宏根,许作鹏,裴 艳,封智嵩,徐辰武,汤述翥,梁国华,顾铭洪

(扬州大学/江苏省作物遗传生理重点实验室/教育部植物功能基因组学重点实验室,江苏扬州 225009)

摘要:以水稻 9311 为背景、日本晴为供体构建的一套染色体片段代换系为试验材料,利用 HL 型籼稻不育系粤泰 A 与代换系测交,根据测交 F_1 群体的花粉育性和小穗育性,结合 Bin-map,采用多元回归的方法,对 HL 型粤泰 A 的育性恢复 QTL 进行分析。以花粉育性为指标检测到 3 个 QTLs,分别位于第 2、6 和 10 染色体上,定位区段大小为 379 262、1 853 725、1 229 303 bp;以自然小穗育性为指标检测到 3 个 QTLs,分别位于第 1、第 3 和第 11 染色体上,定位区段大小为 455 070、525 340、247 226 bp。

关键词:水稻;染色体片段代换系;恢复基因;基因定位

中图分类号: S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0064-04

目前,我国主要有 9 种胞质不育系类型用于生产,以野败(WA)型、红莲(HL)型和包台(BT)型为 3 种代表类型^[1]。WA 型不育系败育彻底、不育性稳定,在杂交籼稻生产利用中占据主导地位。近年来,HL 型不育系在杂交籼稻中应用越来越广泛。杂交粳稻以利用 BT 型不育系为主,推广面积较小。要发展三系杂交稻,HL 型杂交籼稻在生产上进一步的利用是一条重要途径。HL 型不育系的恢复谱较广,但强恢复系很少,恢复系选育是限制 HL 型杂交籼稻进一步发展的重要因素。

质核互作雄性不育系的育性恢复是一复杂的遗传性状,并且环境对目标性状表现的影响较大。已有的研究表明,HL 型不育系花粉表现为圆败,其育性恢复由主效基因与微效基因共同控制,且基因间可能存在互作^[2-4]。目前,在籼稻核背景下,HL 型不育系的主效育性恢复基因已被定位^[5-9],而微效基因的定位及基因效应研究相对较少^[10]。因此,有效地开展 HL 型不育系微效基因的定位是选育 HL 型强恢复系的关键。

如何对微效恢复基因进行定位是育性恢复遗传研究的难点。染色体片段代换系与受体亲本的遗传背景基本一致,其与受体亲本之间以及系与系之间只有单个或少数的染色体片段的差异,因此其表现出的任何差异都可以直接与导入的片段或被替换的片段联系起来,是进行 QTL 分析及精细定位目标 QTL 的理想材料。目前,在水稻中已经有很多的学者利用染色体片段代换系来定位重要性状的 QTL^[11-16]。为定位 HL 型籼稻不育系的微效恢复基因,本试验在已有研究基础上以水稻 9311 为背景、日本晴为供体构建的一套染色体片段代换

系为试验材料(利用高通量测序对每一个系基因组进行了重新测序,每个系中的代换片段长度及位置均准确获知),其中 9311 为 HL 型强恢复系,日本晴为 HL 型不育系的保持系,利用 HL 型籼稻不育系粤泰 A 与代换系测交,根据测交 F_1 群体的花粉育性和小穗育性,结合 Bin-map,采用多元回归的方法,对 HL 型不育系育性恢复的 QTL 进行分析,相关研究结果有助于 HL 型恢复系的选育。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以粳稻测序品种日本晴为供体,籼稻测序品种 9311 为受体构建的 128 个染色体片段代换系(C1-C128),9311 及 HL 型籼稻不育系粤泰 A。

1.2 群体配置

2010 年正季在扬州种植亲本 9311、HL 型粤泰 A 及 128 个 CSSLs,并配制 F_1 :HL 型粤泰 A/128CSSLs。成熟时实际收到 119 个测交 F_1 组合的种子。

2011 年春季在海南种植亲本 9311、HL 型粤泰 A、128 个 CSSLs 以及 2010 年正季获得的各 F_1 ,并继续配制 HL 型粤泰 A/128CSSLs。成熟时收获各 F_1 种子。

2011 年正季在扬州种植各亲本以及海南收获的各测交 F_1 ,每份材料各种植 10 苗。由于 2011 年海南春季温度偏低,配制的一些杂交组合未能收到杂交种,以及播种后一些杂交种没有成苗或后期因病枯死而缺苗,最终在配制测交群体中实际得到的测交系数目为 116 个。

1.3 抽穗期调查

抽穗后及时记载抽穗期(50%的稻穗抽穗),并折算成播种至抽穗的天数表示。

1.4 花粉育性鉴定与小穗育性鉴定

每天 07:00—09:00,在田间每个测交系中选取 4 株单株,从每个始花植株上选取 1 个已抽出约 1/3 的主穗或较大分蘖穗。镜检时,在每个穗子的中上部枝梗中,选取 3 朵当天要开放的颖花,用 1% I_2 -KI 液染色、压片,在低倍显微镜下观察花粉育性。根据花粉粒的形状和对 I_2 -KI 液的染色反

收稿日期:2014-09-06

基金项目:国家“973”计划(编号:2011CB100101);国家自然科学基金(编号:31071384);江苏省高校自然科学研究项目(编号:13KJ13210008);江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介:张宏根(1981—),男,江苏南通人,博士,讲师,研究方向为作物遗传育种。E-mail:zhg@yzu.edu.cn。

通信作者:汤述翥,教授,研究方向为作物遗传育种。E-mail:sztang@yzu.edu.cn。

应,将花粉划分为典败、圆败、染败和正常 4 种类型。观察时,选择分布均匀、花粉数目超过 100 粒的视野,分别记录 4 类花粉的数目,计算 4 类花粉的百分率。

在抽穗期间,每天 07:00—09:00,选取尚未开花的小穗套袋,自交袋大小为 50 cm×20 cm,每系 2 个袋子,每个袋子 2 个小穗。20 d 后,剔除折断或自交袋破损的穗子,调查群体单株的自交小穗育性。

待种子成熟后,每测交系选取 4 个主茎穗考察自然小穗育性。

1.5 水稻 DNA 提取与分子标记分析

水稻基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[17]。普通 PCR 采用 20 μL 的反应体系:模板 DNA 1.0 μL,10×PCR 缓冲液 2.0 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL,2 mmol/L dNTP 2.0 μL,0.3 μmol/L 引物 2.0 μL,Taq 酶 0.5 U,加 ddH₂O 补足 20 μL。富含 GC 含量模板的 20 μL 反应体系包括:DNA,2×GCI 缓冲液 10 μL,2.5 μmol/L 的 dNTP 3.2 μL,0.3 μmol/L 的引物 2.0 μL,Taq 酶 0.5 U,加 ddH₂O 补足 20 μL。PCR 扩增条件为:95℃预变性 5 min;94℃变性 50 s,55℃退火 50 s(温度因引物不同而异),72℃延伸 50 s(不同长度的预期产物按 1 kb/min 调整延伸时间),扩增 32 个循环;72℃延伸 10 min,18℃保温。PCR 反应产物首先在 3% 琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭染色后在 UVP Bioimaging Systems 凝胶成像仪上成像。

SSR 引物的信息来自于 Gramene 网站上(<http://www.gramene.org/>)提供的 SSR 序列信息。DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、普通 PCR 试剂购自上海生工生物工程技术有限公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司和上海英俊公司合成。

1.6 基于 Bin-map 的 QTL 定位及数据分析

基于 Bin-map 的 QTL 定位,主要是采用多元回归的方法,利用 SAS 软件处理分析。每一个 bin 作为一个变量,利用方差分析精确估计误差,从而提高遗传分析效率,实现 QTL 的精确定位。回归模型如下:

$$y_i = b_0 + \sum_{k=1}^m b_k x_{ik} + \varepsilon_i$$

式中: y_i 为第 i 系的性状平均值,在进行 QTL 定位时, y_i 为表示第 i 染色体片段代换系的性状平均值; b_0 为模型均值; m 是 bin 的总数; b_k 为第 k 个 bin 的偏回归系数; x_{ik} 为第 i 个系第 k 个 bin 基因型的指示变量,依 bin 的基因型来源不同而取值,来自供体的 bin 取 -1,来自受体亲本的 bin 取 1; ε_i 为随机误差。其他数据在 Excel 2003 中处理。

2 结果与分析

2.1 代换系群体的评价

本研究利用的 128 个染色体片段代换系均为纯系,这些系包含来源于供体亲本日本晴的代换片段 259 个,平均每个系含有代换片段 2.02 个,每个系的代换片段数目在 1~6 个之间。徐建军等根据 128 个染色体片段代换系的测序物理图谱及代换片段的切割信息,绘制染色体单片段代换片系的 Bin-map,总共包括 401 个 Bins,定义为 $x_1 \sim x_{401}$ ^[18-19]。Bin 的物理长度介于 13 213~10 654 035 bp,平均长度为 889 652 bp。该代换系各条染色体的覆盖率分别为 91.5%、95.7%、94.8%、100.0%、99.4%、92.0%、95.3%、96.8%、96.4%、59.4%、95.4% 和 95.0%,平均覆盖率为 93.3%。

2.2 代换系及测交 F₁ 群体的抽穗期

2011 年正季,记录各代换系及相应测交 F₁ 的抽穗期。9311 的抽穗期为 102 d,代换系中除 C12 和 C54 抽穗期比 9311 早 18~20 d,C40、C114 抽穗期比 9311 晚 10~12 d 外,其余代换系的抽穗期与 9311 基本一致;粤泰 A 与 C40 测交 F₁ 抽穗期较粤泰 A 与 9311 测交 F₁ 迟 12 d,粤泰 A 与 C114 测交 F₁ 较 9311 的测交后代抽穗迟 5 d,其余测交 F₁ 的抽穗期也与 9311 的测交后代基本一致(表 1)。

表 1 CSSLs 及 9311 对应测交 F₁ 抽穗期 d

材料	CSSLs 抽穗期	HL 粤泰 A/CSSLs 抽穗期
C12	84	—
C54	82	—
C40	114	117
C114	112	110
其余 CSSLs	99~103	103~107
9311	102	105

2.3 亲本花粉育性及小穗育性鉴定

2011 年正季,调查 HL 型粤泰 A 的花粉育性,HL 型粤泰 A 的花粉以圆败为主,存在少量的浅染花粉,各代换系与对照 9311 花粉均正常。HL 型粤泰 A 自然小穗育性为 0,除抽穗较迟的 C40、C114(这 2 个系在扬州不能正常成熟)外,其他代换系自然小穗育性均在 85% 以上(数据未列出),代换系与对照 9311 之间无显著差异。

2.4 HL 型粤泰 A/CSSLs 测交 F₁ 群体的育性表现

2010 年正季配组得到的 119 份 HL 型粤泰 A/CSSLs 的种子带海南种植,并考察各测交 F₁ 的套袋小穗育性及自然小穗育性。结果表明,119 个 HL 型粤泰 A/CSSLs 测交 F₁ 群体中套袋小穗育性平均为 36.33%,自然小穗育性平均为 60.08%,HL 型粤泰 A/9311 F₁ 自然小穗育性为 60.37%,育性偏低。分析原因,2011 年春季海南气温偏低,致使测交 F₁ 小穗育性整体偏低,因此本研究中,海南考种的数据未作分析。

2011 年正季,调查 HL 型粤泰 A 与 9311 及 128 个 CSSLs 测交得到的 116 个测交 F₁ 的小穗育性及花粉育性,结果见表 2。

表 2 HL 型粤泰 A 与 9311 及 115 个 CSSLs 测交 F₁ 的育性调查

%

育性指标	HL 粤泰 A/9311		HL 粤泰 A/CSSLs	
	平均值±标准差	变化区间	平均值±标准差	变化区间
花粉育性	82.50±2.89	80.00~85.00	84.54±6.49	57.50~95.00
套袋小穗育性	44.59±8.76	36.92~56.43	42.42±10.96	18.51~73.43
自然小穗育性	87.12±3.34	82.82~90.57	85.82±7.36	57.46~97.37

由表 2 可知,从不同育性指标考察的育性标准差来看,在花粉育性、套袋小穗育性、自然小穗育性这 3 个指标中,不论是 9311 还是代换系测交群体,均以套袋小穗育性的标准偏差最大,并且套袋小穗育性较自然小穗育性明显降低,说明袋内小气候对小穗育性影响很大(尽管本研究中采用较大的自交袋来增加袋内空间,改善自交袋内小气候以降低环境对小穗育性的影响),不能代表该测交群体育性的真实情况。

HL 型粤泰 A/9311 F₁ 的自然小穗育性为 87.12%,HL 型粤泰 A/CSSLs F₁ 群体中测交系的自然小穗育性分布于 57.46%~97.37%,其中有 73.21% 的测交系自然小穗育性分布于 80%~95% 范围内,与对照相近(图 1-a)。HL 型粤泰 A/9311 F₁ 的花粉育性为 82.50%,HL 型粤泰 A/CSSLs F₁ 群体中测交系的花粉育性分布于 57.50%~95.00%,其中有 76.23% 的测交系的花粉育性分布在 80%~90% 范围内,与对照接近(图 1-b)。

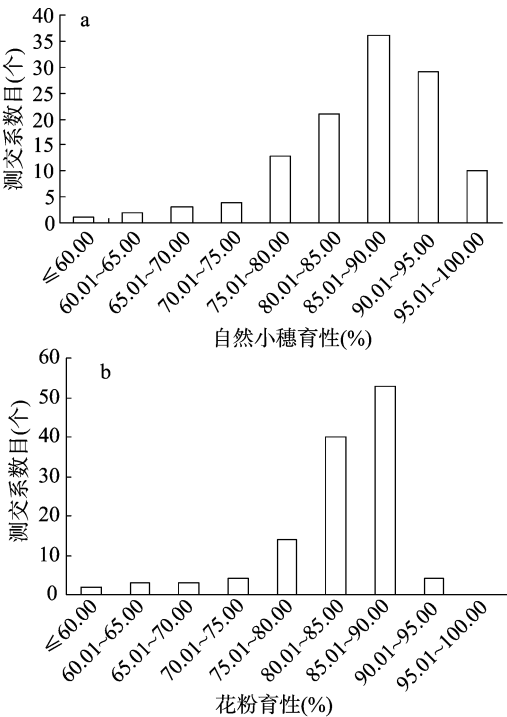


图1 HL型粤泰 A/CSSLs 测交 F₁ 的育性分布

2.5 恢复基因 *Rj5*、*Rj6* 的分子标记检测及效应初步分析

已有研究表明,恢复系 9311 存在 2 对独立的 HL 型粤泰 A 的主效恢复基因 *Rj5* 与 *Rj6*, 分别位于第 10、8 染色体上^[8-9]。本研究利用与 *Rj5* 紧密连锁的标记 RM171、与 *Rj6* 紧密连锁的标记 RM1019(标记在 9311 与日本晴之间具有多态,在 9311 与 HL 型粤泰 A 之间无多态)检测 128 个 CSSLs 及对应的各测交 F₁。结果表明,在 128 个代换系中,C31、C47、C49、C115、C116、C119 等在标记 RM171 处表现为日本晴带型,其测交后代表现为双亲杂合带型,说明这 6 个代换系中带有 *Rj5* 的 9311 片段被日本晴替换,其他各代换系均表现为 9311 带型,说明其他各代换系均带有 *Rj5*;在标记 RM1019 处,各代换系及测交后代均表现为 9311 带型,说明所用各代换系均带有 *Rj6*,相关检测结果与 CSSLs 重测序一致。C31 等 6 个代换系及 9311 测交 F₁ 的花粉育性及小穗育性见表 3。

表 3 6 个 *Rj5* 被替换代换系及对照 9311 测交 F₁ 的育性

组合	套袋小穗 小穗育性(%)	自然小穗 小穗育性(%)	花粉育性 (%)
HL 型粤泰 A/C31	23.99**	68.41*	87.50
HL 型粤泰 A/C47	35.21	84.26	80.00
HL 型粤泰 A/C49	34.88	93.07	70.00
HL 型粤泰 A/C115	18.73**	77.56	65.00**
HL 型粤泰 A/C116	27.24**	84.07	60.00**
HL 型粤泰 A/C119	37.45	85.43	57.50**
以上组合的平均值	29.58*	82.13	69.00*
HL 型粤泰 A/9311	44.59	87.12	82.50

注: * 表示与对照相比有显著变化($P<0.05$); ** 表示与对照相比有极显著变化($P<0.01$)。

由表 3 可知,在 HL 型粤泰 A 与 6 个 *Rj5* 被替换代换系测交 F₁ 中,C31 测交 F₁ 的自然小穗育性较对照显著降低,其他 5 个系的自然小穗育性与对照之间无显著差异,6 个测交系平均值与对照之间无显著差异,表明在 *Rj6* 基因存在的前提下,*Rj5* 基因的缺少对自然小穗育性影响较小;C31、C47 及 C49 测交 F₁ 的花粉育性与对照之间无显著差异,C115、C116 及 C119 测交 F₁ 的花粉育性较对照极显著降低。6 个系平均花粉育性较对照显著降低,表明 *Rj5* 基因的缺少使花粉育性显著降低。但 C31 等 6 个代换系测交 F₁ 花粉育性不同,推测 C31、C47 及 C49 等代换系测交 F₁ 中部分正常花粉可能为染败花粉,由于染色较深,无法与正常花粉区分所致。6 个测交系与对照的套袋小穗育性均偏低,与测交系群体育性的实际情况偏差较大。

2.6 不同育性指标调查结果之间的相关性分析

对 HL 型粤泰 A 与 CSSLs 及对照 9311 测交得到的 116 个测交 F₁ 群体 3 个指标的育性进行相关性分析(表 4)。由表 4 可知,花粉育性与自然小穗育性及套袋小穗育性之间相关性不显著,套袋小穗育性与自然小穗育性之间存在显著正相关,但相关系数也不高,仅为 0.230。考虑到套袋结实率受套袋环境影响较大,因此本研究中以花粉育性与自然小穗育性来进行恢复基因的 QTL 分析。

表 4 不同指标育性相关分析

育性指标	相关系数		
	花粉育性	套袋小穗育性	自然小穗育性
花粉育性	1.000		
套袋小穗育性	0.083	1.000	
自然小穗育性	0.047	0.230*	1.000

2.7 育性恢复 QTL 定位

以花粉育性与自然小穗育性为指标,基于多元回归的方法,结合 Bin-map,利用 SAS 软件对 HL 型粤泰 A 与 CSSLs 测交 F₁ 群体的育性恢复相关 QTLs 进行定位,各定位到 3 个育性恢复相关的 QTLs(表 5)。

由表 5 可知,以花粉育性为指标检测到 3 个 QTLs,分别位于第 2、第 6 和第 10 染色体上,定位区段大小为 379 262、1 853 725、1 229 303 bp;以自然小穗育性为指标检测到 3 个 QTLs,分别位于第 1、第 3 和第 11 染色体上,定位区段大小为 455 070、525 340、247 226 bp。其中 qRF6-1 对应测交系父

表 5 育性恢复 QTL 的定位

育性指标	QTLs	染色体 序号	涉及的代换系	区间	区间大小 (bp)	r^2	F
花粉育性	<i>qRF2-1</i>	2	C22	3 061 234 ~ 3 440 496	379 262	0.139 5	24.08
	<i>qRF6-1</i>	6	C40, C114	7814673 ~ 9 668 398	1 853 725	0.107 5	18.63
	<i>qRF10-1</i>	10	C31, C47, C49, C115, C116, C119	18 855 550 ~ 20 084 853	1 229 303	0.245 9	36.86
自然小穗育性	<i>qRF1-1</i>	1	C95, C125	8 349 996 ~ 8 805 066	455 070	0.080 0	11.62
	<i>qRF3-1</i>	3	C15, C16, C33, C34, C53, C88, C115, C116, C131	34 978 995 ~ 35 504 335	525 340	0.117 3	14.88
	<i>qRF11-1</i>	11	C27, C28, C29, C30	23 764 348 ~ 24 011 574	247 226	0.122 4	15.34

本为 C40 和 C114,这 2 个测交系的抽穗期较迟,花粉育性易受环境影响,该 QTL 真实性需进一步验证。

3 讨论

水稻细胞质雄性不育系恢复基因的研究过程中,育性划分需采取一个适当的育性指标来进行。研究者一般采用花粉育性和小穗育性为育性指标进行育性划分,其中小穗育性包括自然小穗育性和套袋小穗育性,不同学者对采用何种指标所持观点不尽相同。HL 型不育系粤泰 A 的花粉败育以圆败为主,但梁国华等以粤泰 A 与不同品种杂交,调查了 F₁ 的花粉育性和小穗育性,发现部分组合出现典败或染败花粉,与此类似的是本课题组转育的多个 HL 型梗稻不育系花粉以染败(染色较深)为主,说明不同核背景的 HL 型不育系花粉败育特征之间存在差异,因此在 HL 型粤泰 A 与 CSSLs 测交系群体中可能出现染败花粉^[20]。镜检花粉育性时,测交系中圆败花粉比较容易鉴定,染败花粉与正常花粉则较难区分,这是花粉育性与小穗育性之间相关性不显著的重要原因之一,因此在本研究中不宜采用花粉育性这单一指标来分析。水稻是自花授粉作物,异花串粉对不育株和部分可育株的影响大于对可育株的影响,而套袋对可育株的影响较大^[21]。本研究中测交系均为可育,套袋对植株的结实率影响较大,因此套袋小穗育性不宜作为育性鉴定指标。为求尽可能准确地反映群体中育性分离情况,本研究中采用花粉育性和自然小穗育性 2 类指标来定位育性恢复相关的 QTLs。

关于 HL 型育性恢复基因遗传研究,朱英国等以 HL 型杂交水稻青优早为材料研究认为 HL 型不育系育性恢复除了受 1 对主效基因控制外,还受微效基因的影响^[3]。梁国华等^[22]、黄青阳等^[23]研究认为 HL 型不育系丛广 41A 属于配子体不育类型,其育性恢复受显性单基因控制。关于恢复基因的定位,黄青阳等、Liu 等和 Huang 等将 HL 型雄性不育的恢复基因 *Rf5* 定位在第 10 染色体上,定位区段比较一致^[5-7]。Liu 等在 9311 中定位到第 10 染色体上另一个恢复基因位点,命名为 *Rf6(t)*^[6]。李绍清在第 10 染色体分子标记 RM184 与 RM6704-1 之间定位到 1 个恢复基因,暂命名为 *Rf7*^[24]。Huang 等定位到分别位于第 10 染色体上的主基因 *Rf5* 及第 8 染色体短臂上标记 RM3710 与 RM22242 之间的主基因 *Rf6*^[8]。Hu 等将 *Rf5* 定位于第 10 染色体上标记 RM6469 与 RM25661 之间^[9]。关于微效基因的定位,刘航等定位到第 10 染色体上 1 个主效 QTL *qRF-10-1*,并在第 1、第 2、第 10 染色体上定位到 3 个微效 QTL^[10]。

本研究中,在 HL 粤泰 A/CSSLs 的测交群体中,对照 HL 粤泰 A/9311 可育花粉达 80% ~ 85%,与 Huang 等的鉴定结

果^[8]一致。本研究中共定位到与 HL 粤泰 A 育性恢复相关的 6 个 QTLs,其中以花粉育性为指标定位到的 3 个 QTLs,分别位于第 2、第 6 和第 10 染色体上;以自然小穗育性为指标检测到 3 个 QTLs,分别位于第 1、第 3 和第 11 染色体上,不同的育性指标定位结果并不一致,这与花粉育性与自然小穗育性相关性分析结果是吻合的。其中以花粉育性为指标定位到的 *qRF10-1*,结合标记检测结果可知,它就是 *Rf5*,基因的效应与作用模式与 Huang 等的研究结果^[8]一致;*qRF2-1* 与刘航等报道的位于第 2 染色体上 1 个微效基因^[9]的区间重叠,但基因作用方式有所不同。Huang 等在第 8 染色体短臂上定位到 1 个主效基因 *Rf6*,但是本研究中未能定位该基因,通过分析代换系测序信息及标记检测结果可知,在本研究所使用的 CSSLs 中 *Rf6* 所在的定位区段不存在相应代换系。相关研究结果为 HL 型不育细胞质新育性恢复基因的精细定位奠定了基础,有助于分子标记辅助选育 HL 型强恢复系。

参考文献:

[1] 曾千春,周开达,朱 祯,等. 中国水稻杂种优势利用现状[J]. 中国水稻科学,2000,14(4):52-55.

[2] 胡锦涛,李泽炳. 四种水稻细胞质雄性不育系不育性遗传的初步研究[J]. 华中农学院学报,1985,4(2):15-22.

[3] 朱英国,徐树华. 水稻细胞质雄性不育系的比较研究[C]//杂交水稻国际学术讨论会论文集. 北京:学术期刊出版社,1988:338-344.

[4] 梁世胡,李传国,伍应运,等. 红莲型雄性不育系粤泰 A 的特性鉴定与评价[J]. 作物品种资源,1998(4):33-34.

[5] 黄青阳,何予卿,景润春,等. 利用微卫星标记定位水稻红莲型细胞质雄性不育恢复基因[J]. 科学通报,1999,44(14):1517-1520.

[6] Liu X Q, Xu X, Tan Y P, et al. Inheritance and molecular mapping of two fertility - restoring loci for Honglian gametophytic cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(5):586-594.

[7] Huang J Y, Hu J, Xu X, et al. Fine mapping of the nuclear fertility restorer gene for HL cytoplasmic male sterility in rice [J]. Bot Bull Acad Sin, 2003, 44:285-289.

[8] Huang W, Hu J, Yu C, et al. Two non - allelic nuclear genes restore fertility in a gametophytic pattern and enhance abiotic stress tolerance in the hybrid rice plant [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124(5):799-807.

[9] Hu J, Wang K, Huang W C, et al. The PPR protein Rf5 functions in HL - CMS fertility restoration via a Restoration of Fertility Complex containing a glycine - rich protein [J]. The Plant Cell, 2012, 24(1):109-122.

苗利娟,张新友,黄冰艳,等. 河南省育成花生品种的幼叶体细胞胚胎诱导[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):68-70.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.018

河南省育成花生品种的幼叶体细胞胚胎诱导

苗利娟,张新友,黄冰艳,石磊,齐飞艳,高伟,董文召,汤丰收

(河南省农业科学院经济作物研究所/黄淮海油料作物重点实验室/河南省油料作物遗传改良重点实验室,河南郑州 450002)

摘要:选用河南省育成的 5 个不同类型的花生品种,在 6 种培养基配方及 2 种光照处理下进行胚小叶外植体诱导体胚效率研究。结果表明,豫花 1 号、豫花 22 号、豫花 9719、豫花 9847 等 4 个品种体细胞胚诱导率均在 2,4-D 浓度为 15 mg/L 时最高,2 种光周期处理的趋势一致,豫花 9719 的体细胞胚诱导率最高。在 4 周全黑暗培养条件下,豫花 12 号体细胞胚诱导率在 2,4-D 浓度为 5 mg/L 时最高,而在暗 2 周转光暗交替(其中光照培养 16 h,黑暗培养 8 h)2 周处理条件下,2,4-D 浓度为 10 mg/L 时体细胞胚诱导率最高,达 45.00%;可见暗培养的平均诱导率低于暗 2 周转光暗交替 2 周处理。因此,以育成品种胚小叶为外植体直接诱导体细胞胚,2,4-D 浓度以 10~15 mg/L 为宜,暗 2 周转光暗交替 2 周处理的体细胞胚诱导率较高。

关键词:花生;幼叶;体细胞胚胎;培养基;光周期

中图分类号: S565.203.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0068-03

花生是我国重要的油料作物,在全国各省(区、市)均有种植。近年来,河南省花生种植面积位居全国首位,常年种植面积稳定在 100 万 hm^2 左右。在气候恶化、灾害性天气频发、环境污染等问题下,为生产提供高产、稳产、优质、抗逆性强的

花生优良品种、对保障花生生产可持续发展和食用油安全具有重要意义。众所周知,栽培花生遗传基础狭窄,缺乏抗病、抗虫、耐逆性突出的种质资源,常规育种难以在优质、多抗新品种选育方面取得重大突破;野生种质的优异基因常与一些不良性状基因连锁,且与栽培种之间存在杂交不亲和、杂种不育等障碍,难以直接通过杂交方法加以利用。基因工程为花生利用外源基因提供有效途径,已有多例利用基因工程进行花生代谢途径遗传调控或将外源基因成功转入花生,改良花生品质、抗病、抗虫、耐旱、耐盐等性状的研究报道^[1-9]。然而,基因转化及植株再生效率受基因型影响较大,国内外遗传转化的成功实例基本局限在少数几个诱导率较高的基因型上。本研究旨在探索河南省育成花生品种的组培再生效果,扩大花生基因转化的受体基因型范围,为基因工程技术与常

收稿日期:2014-05-06

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2011CB109304);国家“863”计划(编号:2013AA102602);国家花生产业技术体系建设专项(编号:CARS-14);河南省财政专项(编号:201218305)。

作者简介:苗利娟(1981—),女,河南滑县人,硕士,助理研究员,主要从事花生基因工程研究工作。Tel:(0371)65750825;E-mail:miao8139@163.com。

通信作者:张新友,博士,研究员,主要从事花生遗传育种研究工作。Tel:(0371)65729560;E-mail:haasz@126.com。

[10]刘航,李丹,李绍波. 水稻红莲型 CMS 育性恢复 QTL 分析[J]. 武汉植物学研究,2005,23(2):111-115.

[11]江玲,曹雅君,王春明,等. 利用 RIL 和 CSSL 群体检测水稻种子休眠性 QTL[J]. 遗传学报,2003,30(5):453-458.

[12]Wan J L,Zhai H Q,Wan J M,et al. Mapping QTL for traits associated with resistance to ferrous iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), using japonica chromosome segment substitution lines [J]. Acta Genetica Sinica,2003,30(10):893-898.

[13]何风华,席章营,曾瑞珍,等. 利用单片段代换系鉴定水稻株高及其构成因素的 QTL[J]. 中国水稻科学,2005,19(5):387-392.

[14]何风华,席章营,曾瑞珍,等. 利用单片段代换系定位水稻抽穗期 QTL[J]. 中国农业科学,2005,38(8):1505-1513.

[15]汪岳林. 利用单片段代换系定位水稻粒形及粒重 QTL[D]. 福州:福建农林大学,2008.

[16]朱文银,杨德卫,林静,等. 利用染色体片段置换系定位水稻落粒性主效 QTL[J]. 植物学通报,2008,25(4):443-448.

[17]Rogers S O,Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissue[J]. Plant Mol Biol Manual,1988,A6:1-10.

[18]徐建军,赵强,赵元凤,等. 利用重测序的水稻染色体片段代换系群体定位剑叶形态 QTL[J]. 中国水稻科学,2011,25(5):483-487.

[19]徐建军,赵强,汤在祥,等. 利用重测序的染色体片段代换系群体定位水稻粒型 QTL[J]. 中国水稻科学,2011,25(4):365-369.

[20]梁国华,周培南,杨华,等. 红莲型细胞质雄性不育恢复品种的筛选与分类[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2002,23(3):41-45.

[21]张宏根,朱正斌,李波,等. 粳稻野败型细胞质雄性不育恢复系 SWR78 的恢复基因定位[J]. 中国水稻科学,2009,23(4):377-382.

[22]梁国华,法锦宁,杨华,等. 红莲型细胞质雄性不育恢复系特青和珍汕 97 的恢复性遗传分析[J]. 江苏农业研究,2001,22(1):7-11.

[23]黄青阳,何予卿,凌杏元,等. 3 种水稻细胞质雄性不育育性遗传的比较[J]. 中国农业科学,2000,33(3):8-13.

[24]李绍清. 水稻红莲型细胞质雄性不育与育性恢复的分子机理[D]. 武汉:武汉大学,2004:64-109.