

用 EST 和 SSR 标记定位水稻温敏不育基因 *tms5*姜大刚^{①*} 卢森^{①*} 周海^① 武小金^② 庄楚雄^{①†} 刘耀光^① 梅曼彤^①(① 华南农业大学生命科学学院, 广东省植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广州 510642; ② 国家杂交水稻工程技术研究中心, 长沙 410125. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: zhuangcx@scau.edu.cn)

摘要 利用 cDNA 抑制差减杂交技术建立了水稻减数分裂时期穗部特异表达的 SSH 文库, 从中筛选 121 个 cDNA 片段作为 EST (expressed sequence tags) 标记, 用 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 方法分析了温敏不育系安农 S-1 和正常品种安农 N 之间的多态性, 其中一个 EST 标记 HN57 可以检测到亲本间的多态性. 共分离分析结果表明, HN57 与安农 S-1 的温敏不育性完全共分离, 进而将安农 S-1 的温敏不育基因 *tms5* 定位于 RGP (rice genome research program) 遗传图的第二染色体的 31.2 cM 处. 为了进行精细定位, 在该区域设计了 80 对 SSR (simple sequence repeat) 引物对, 用 12 对多态性引物将 *tms5* 定位于 181 kb 区间

关键词 水稻 安农 S-1 温敏不育基因 *tms5* 精细定位

水稻温敏不育系是发展二系杂交稻的重要资源. 温敏不育系的花粉育性主要受环境温度控制. 当环境温度高于某一温度时, 水稻花粉表现为不育, 而当环境温度低于某一温度时, 表现为可育. 许多温敏不育材料已被发现, 并被应用于二系杂交稻育种. 多个温敏不育基因 *tms1*^[1], *tms2*^[2], *tms3*^[3], *tms4*^[4], *tms5*^[5], *tms6*^[6] 和 *msh*^[7] 已被定位.

安农 S-1 是我国特有的一个温敏不育材料, 已广泛应用于水稻二系杂育种, 其育性转换温度的起始点为 25°C, 即环境温度高于 25°C 时, 其花粉表现为不育, 而环境温度低于 25°C 时, 表现为可育, 并且其温敏不育性受一对隐性基因控制^[8]. Wang 等人^[5] 将安农 S-1 温敏不育基因定位于第二染色体的标记 C365 和 G227 之间, 并将该基因命名为 *tms5*. 本研究利用穗部特异表达的 cDNA 片段作为 EST 标记, 用 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 方法对安农 S-1 的温敏不育基因 *tms5* 进行定位分析, 获得了与 *tms5* 完全共分离的 EST 标记. 进一步采用 SSR (simple sequence repeat) 标记, 将 *tms5* 定位在第二染色体的一个 181 kb 区间.

1 材料与方法

(i) 植物材料. 提取 RNA 的材料为减数分裂时期的安农 N 的穗和剑叶. 定位群体为 3 个 F₂ 群体, 分别为安农 S-1 × 安农 N, 安农 S-1 × IR36 和安农 S-1 转育的香 125S × BAR-68, 其中安农 S-1 为安农 N 的自然突变体, 香 125S 是由安农 S-1 转育的不育系. 这些 F₂ 群体在广州的早季种植, 分别获得了 271 株、287 株和

229 株全不育株.

(ii) RNA 的提取和 mRNA 的分离. 以安农 N 的减数分裂时期穗和剑叶作为材料. 总 RNA 用一步法 (TRIzol 试剂, GIBCO/BRL 公司) 提取. 采用磁珠法 (Promega) 分离 mRNA, 纯化的 mRNA 用酒精沉淀后, 溶于 DEPC 水中, 终浓度为 0.5 μg/μL.

(iii) 抑制差减文库的构建和筛选. cDNA 抑制差减杂交 (suppress subtraction hybridization, SSH) 采用 PCR-Select cDNA 差减试剂盒 (Clontech), 按 Diatchenko 等人^[9] 的方法进行. 减数分裂时期的安农 N 幼穗 cDNA 作为 tester, 同时期的叶的 cDNA 作为 driver. 文库的建立和筛选按庄楚雄等人^[10] 的方法进行.

(iv) RFLP 分析. 用 SSH 方法筛选得到的 121 个减数分裂时期穗部特异表达的 cDNA 片段作为 EST 标记, 亲本 DNA 分别用 *Alu* I, *Apa* I, *Asp* I, *Asp* 718, *Bam* H I, *Bcl* I, *Bbr* P I, *Bgl* II, *Bfr* I, *Bgl* I, *Cfo* I, *Cla* I, *Kpn* I, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sau* 3A I, *Sal* I, *Spe* I, *Sty* I, *Spe* I, *Xho* I, *Xba* I, *Sca* I, *Msp* I, *Hpa* II, *Hinf* I, *Hind* III, *Eco* R V, *Eco* R I 和 *Dra* I 等酶切. 基因组 DNA 的抽提、酶切、电泳、转膜和分子杂交按 McCouch 等人^[11] 的方法进行.

(v) SSR 分析. SSR 引物设计时, 利用 gramene 网站 (<http://www.gramene.org>) 的软件 SSRIT (simple sequence repeat identification tool) 寻找 SSR 位点, 设计的 SSR 引物扩增产物的长度为 60~80 bp. PCR 扩增程序参照 Akaji 等人^[12] 的方法进行, 通过 6% 的 PAGE

胶电泳, 银染方法检测^[13].

(vi) 连锁分析. 选用F₂群体中不育个体作为定位群体, 采用Zhang等人^[14]的方法进行分析, 重组值按公式 $C = (2N1 + N2)/2N$ 计算, 其中C为分子标记与温敏不育性之间的重组值, N为总的不育个体数, N1为分子标记带型与可育亲本一致的个体数, N2为分子标记带型和杂合体一致的个体数.

(vii) 花粉育性观察. 于开花前采集当天开花的颖花, 置于FAA中固定并保存. 每个单株至少观察3个小穗, 花药用1%的I-KI染色. 根据花粉的形态及染色反应, 判断花粉的育性. 花粉可染率低于2%为不育株, 其余的为可育株.

2 结果

2.1 安农 S-1 温敏不育性遗传分析

为了分析安农S-1温敏不育性的遗传特点, 采用了3个不同的F₂群体, 分别为安农S-1×安农N, 安农S-1×IR36和香125S×BAR-68. 在3个F₂群体中可育株与不育株的比例符合3:1(表1), 这些结果表明安农S-1的温敏不育性是受一隐性基因控制.

表 1 安农-1 温敏不育基因的遗传

组合(世代)	不育株/株	可育株/株	χ^2 (3:1)
安农S-1×安农N (F ₂)	271	914	2.89
安农S-1×IR36 (F ₂)	287	873	0.041
香 125S×BAR-68 (F ₂)	229	771	2.352

2.2 EST 标记亲本多态性分析

以安农 N 减数分裂时期的小穗的 cDNA 作为 tester, 以安农 N 减数分裂时期的剑叶的 cDNA 作为 driver, 采用 SSH 方法构建了差减文库. 通过差异筛选, 共选择了 121 个在小穗中特异或优势表达的 DNA 片段, 用这 121 个 cDNA 片段作为 EST 标记, 组合 31 种限制性内切酶酶切, 分析了安农 N 和安农 S-1 之间的多态性. 分析表明, 只有其中的一个 EST 标记

HN57 可以检测亲本间多态性(图 1).

2.3 HN57 与温敏不育性的共分离

测序分析表明HN57的全长为约600bp. 用Blast分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)发现HN57是位于第二染色体上的BAC克隆OJ1006_A02(序列号: AP003977)的单拷贝序列. OJ1006_A02位于Wang等人^[5]报道的tms5连锁标记C365的附近.

用HN57作为探针对安农S-1×安农N的F₂群体中271株不育单株进行RFLP分析, 结果表明, 所有不育株的杂交带型都和不育亲本安农S-1一致(图1), 表明HN57与安农S-1的温敏不育基因完全共分离. 由于克隆OJ1006_A02被第二染色体的RFLP标记R2164锚定([hppt://rgp.dna.affrc.go.jp](http://rgp.dna.affrc.go.jp)), R2164位于第二染色体的31.2cM处, 而HN57定位于BAC克隆OJ1006_A02上, 说明安农S-1的温敏不育基因位于水稻第二染色体的31.2cM位置附近.

2.4 温敏不育基因的存在区间的确定

虽然HN57与不育基因共分离, 但据此不能确定不育基因的存在区间. 为了确定此区间, 我们构建了另外2个杂交组合的F₂群体, 并在HN57所在的区域5cM范围内筛选了80对SSR标记, 其中67对SSR标记为本研究新发展的. 用这些SSR标记以及HN57分析了安农S-1与安农N, 安农S-1与IR36以及香125S与BAR-68之间的多态性. 所有的SSR标记在安农S-1与安农N之间没有多态性. 而在安农S-1与IR36之间和香125S与BAR-68之间的多态性标记分别有11和6个(表2). 这些多态性标记和F₂群体用于安农S-1的温敏不育基因的精细定位. 综合2个F₂群体的定位结果(图2), 安农S-1的温敏不育基因定位于标记RMAN7和RMAN54之间, 与目标基因分别有2个重组. 由于RMAN7, HN57和RMAN54定位于第二染色体(序列号: AP008202)的6006136, 6118614和6187468bp处, 因此最终将安农S-1的温敏不育基因定位于181kb的区域.

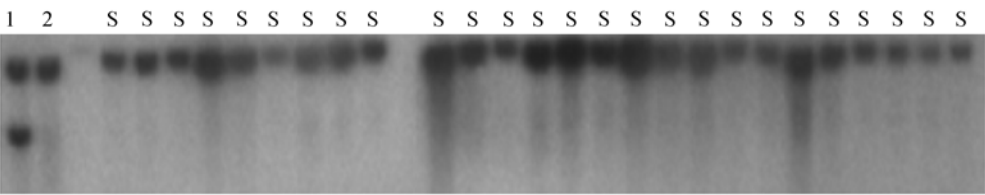


图 1 HN57 为探针检测的安农 N(1)与安农 S-1(2)的 RFLP 多态以及与 F₂ 植株雄性不育性(S)的共分离
用限制性内切酶Hpa II 消化基因组DNA. 图中只显示 26 个F₂植株

表 2 筛选的多态性 SSR 标记

分子标记	上游引物	下游引物	位置/bp (AP008208)
RM5780 ^{a),b)}	5'-GCTGCTGCATCTTCTACTGC-3'	5'-G ACGCACATGCCTAAGCCTA-3'	5453190
RMAN13 ^{a),b)}	5'-CAACAAGGGCATCCTCGTA-3'	5'-ATCTGCATGACTTCTTAGTCA-3'	5866565
RMAN7 ^{b)}	5'-GTACCTCATCATAGCTGGAC-3'	5'-CCGTATCTCTCTAATCTTCTC-3'	6006136
RMAN54 ^{a)}	5'-CGTGGCGAACACCAACCTC-3'	5'-GCTGTTTCTCTGTACGCATG-3'	6187468
RM4702 ^{a)}	5'-CATGTGAAAGAAAATGATATG-3'	5'-CTAATCAAAGTATGAGCAC-3'	6219041
RMAN81 ^{a)}	5'-ACTGAAAGTGGTCTGTAGC-3'	5'-TCTTACCAAAGCCGTGTGTC-3'	6237401
RMAN43 ^{a)}	5'-GCTTGAGCTTCGTATAGGTG-3'	5'-CTCCAGGTGATCAGAGATTC-3'	6320934
RMAN42 ^{a)}	5'-CACTCATGTACCAAGAACTC-3'	5'-TCAAGAGTTAAGGATTCGATC-3'	6398468
RMAN20 ^{a),b)}	5'-CATGACTAATTGCGTATTAGC-3'	5'-AAACAACCGAACGGTGTGTT-3'	6444884
RMAN2 ^{a),b)}	5'-GCAAGGAGACAACCTCTCC-3'	5'-GATTAGATCTATACATGCATCG-3'	6503477
C365 ^{a)}	5'-TCCAAGAGTTTCAGCACAGC-3'	5'-TGATGTTGCTGTAGGCTCTG-3'	6709997
RMAN8 ^{a),b)}	5'-GTGCATGGTGTGTACACTAG-3'	5'-CAACAAATGGTATATTCCAACG-3'	6780044

a) 示可以在安农 S-1 与 IR36 之间检测到多态性; b)表示可以在香 125S 与 BAR-68 之间检测到多态性

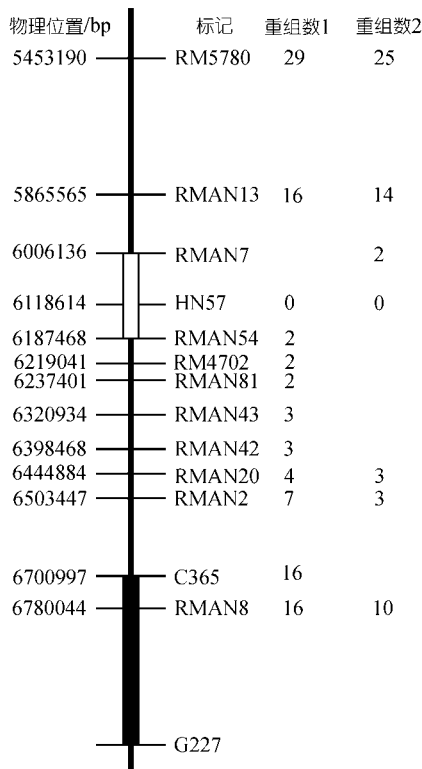


图 2 *tms5* 所在区域的分子标记连锁图

重组数 1 表示安农 S-1×IR36 的 F₂ 群体的数据, 重组数 2 表示香 125S × BAR-68 的 F₂ 群体的数据, 空心的长方形所在区域表示本研究的定位结果, 实心的长方形区域表示 Wang 等人 [5] 定位的 *tms5* 的位置

3 讨论

Wang 等人 [5] 用安农 S-1 × 南京 11 杂交产生的重组自交系 F₂ 代群体中的 96 株不育株, 对安农 S-1 的不育基因进行了定位分析, 将其温敏不育基因定位于第二染色体, 位于标记 C365 和 G227 之间, 并将该

基因命名为 *tms5*。本研究发现了与安农 S-1 温敏不育基因完全共分离的 EST 标记 HN57, 该标记位于第二染色体的 31.2 cM 处, 并用 SSR 标记和 516 株 F₂ 不育株将安农 S-1 的温敏不育基因定位在 RMAN7 和 RMAN54 之间的 181 kb 区域。本区域与 Wang 等人 [5] 定位的 C365~G227 区域的边际遗传距离为 2.5 cM, 物理距离约为 590 kb。由于所用的不育材料相同, 本研究仍将定位的温敏不育基因称名为 *tms5*, 而定位结果的差异反映的可能是不同实验的误差。本研究利用了 3 个定位群体进行定位, 实验结果相互验证, 可靠性应该较好。

安农 S-1 的温敏不育基因已广泛应用于水稻两系法育种中, 已培育出多个杂交组合, 其花粉育性主要受温度的控制, 在不育温度条件下, 随温度的升高, 不育系的花粉由不可染转变为无花粉型。另外, 安农 S-1 温敏不育系随种植世代的增加, 不育的起点温度将逐渐升高, 导致温敏不育系不稳定, 具体原因不清楚。因此, 温敏不育的机理是目前迫切需要了解的问题。而了解温敏不育机理的途径是克隆温敏不育基因。

致谢 感谢肖国英博士提供了香 125S × BAR-68 的 F₂ 群体。本工作受国家重点基础研究发展规划 (批准号: G1999011603, 2005CB120802)、国家高新技术研究发展计划 (批准号: 2002AA224121)、国家自然科学基金 (批准号: 30080019)、广东省自然科学基金团队项目和广州市科技项目资助。

参 考 文 献

1 Wang B, Xu W W, Wang J Z, et al. Tagging and mapping the

- thermo-sensitive genic male-sterile gene in rice with molecular markers. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 1111~1114
- 2 Yamagushi Y, Ikeda R, Hirasawa H, et al. Linkage analysis of the thermo-sensitive genic male sterility gene *tms2* in rice (*Oryza sativa* L). *Breed Sci*, 1997, 47: 371~377
- 3 Subudhi P K, Borkakati R K, Virmani S S, et al. Molecular mapping of a thermo-sensitive genetic male sterility gene in rice using bulked segregant analysis. *Genome*, 1997, 40: 188~194
- 4 Dong N V, Subudhi P K, Luong P N, et al. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermo-sensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 727~734[DOI]
- 5 Wang Y G, Xing Q H, Deng Q Y, et al. Fine mapping of the rice thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms5*. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(5): 917~921[DOI]
- 6 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(7): 1271~1277[DOI]
- 7 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[DOI]
- 8 邓华凤, 舒福北, 袁定阳. 安农 S-1 的研究及其利用概况. *杂交水稻*, 1999, 14(3): 1~3
- 9 Diatochenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression Subtractive Hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6025~6030[DOI]
- 10 庄楚雄, 徐是雄, 卢永根, 等. 运用 cDNA 缩减杂交法克隆水稻花粉发育有关的 cDNA. *科学通报*, 1999, 44(17): 1842~1846
- 11 McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 815~829[DOI]
- 12 Akaji H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. Micron, a microsatellite-targeting transposable element in the rice genome. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266(3): 471~480[DOI]
- 13 Xu S B, Tao Y F, Yang Z Q, et al. A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation. *Hereditas*, 2002, 24: 335~336
- 14 Zhang Q F, Shen B Z, Dai X K, et al. Using bulked extremes and recessive classes to map genes for photoperiod-sensitive genic sterility in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 8675~8679

(2005-09-13 收稿, 2005-12-12 接受)