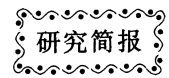


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01151



## 一个水稻雄性不育突变体的遗传分析和基因定位

初明光 李双成\*\* 王世全 邓其明 张 婧 丁 磊 文 勇 郑爱萍  
周星宇 李 平\*

四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130

**摘 要:** *ms-np* 是一个源于自然突变的水稻雄性不育突变体, 明显较正常植株矮小, 叶色浓绿。小花解剖观察发现, 突变体小花花丝细长, 花药干瘪, 呈白色透明状, 但雄性器官的数量和雌性器官正常。碘染证实, 突变体的花药壁内没有花粉粒着色, 是一个典型的无花粉型雄性不育材料。5 个  $F_2$  和 2 个  $BC_1F_1$  群体的遗传分析显示, 该突变性状受 1 对隐性基因控制。对组合 *ms-np*/M63 衍生  $F_2$  不育单株的连锁分析表明, *ms-np(t)* 基因位于水稻第 6 染色体微卫星标记 RM541 和 RM343 之间, 遗传距离分别为 15.2 cM 和 7.9 cM。

**关键词:** 水稻; 雄性不育; 遗传分析; 基因定位

## Genetic Analysis and Molecular Mapping of a Male Sterile Mutant in Rice

CHU Ming-Guang, LI Shuang-Cheng\*\*, WANG Shi-Quan, DENG Qi-Ming, ZHANG Jing, DING Lei, WEN Yong, ZHENG Ai-Ping, ZHOU Xing-Yu, and LI Ping\*

Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

**Abstract:** Male sterility is an important inheritance phenomenon in plants and widely used in hybrid seed production. The male sterile plant can't produce normal male gametophyte for reproduction, while the female counterpart is normal. So far, more than 100 of male sterile mutants or genes have been reported in rice. *Ms-np* is a male-sterile mutant derived from a spontaneous mutation. The filaments of the mutant are long and thin, and the withered anthers are white and transparent. *Ms-np* was confirmed to be a none-pollen type mutant of male sterility, for no pollen grains were stained with  $I_2$ -KI solution and the anther locules were always hollow. Genetic analysis of five  $F_2$  populations and two  $BC_1F_1$  populations revealed that the mutation was controlled by a single recessive gene. To uncover the molecular basis of *ms-np*, the  $F_2$  population derived from the cross of *ms-np*/M63 was used for genetic mapping. Screening of 227  $F_2$  mutant individuals with simple sequence repeat (SSR) markers indicated that *ms-np(t)* was located between the molecular markers RM541 and RM343, on chromosome 6, with the distances of 15.2 and 7.9 cM, respectively. The results provide a basis for further gene cloning and understanding of the molecular mechanism underlying rice male fertility.

**Keywords:** Rice; Male sterility; Genetic analysis; Mapping

植物雄性不育是其在有性繁殖过程中不能产生正常可育雄配子体的遗传现象, 它广泛存在于开花植物中。小孢子母细胞在花粉囊中进行减数分裂产生小孢子, 进一步发育成花粉粒。当花粉囊裂开时, 成熟的花粉粒被释放出来。任何参与雄蕊发育、孢原细胞分化、减数分裂、小孢子的有丝分裂、花粉分化等过程基因的突变, 均能引起花药发育异常, 最终导致雄性不育<sup>[1-2]</sup>。目前在水稻上报道的雄性不育突变体或基因已经有 70 多个<sup>[3]</sup>, 雄性不育胞质达 30 多种<sup>[4]</sup>, 其中超过 30 个核基因实现了染色体定位。

近年来, 已经有很多关于细胞核雄性不育的基因被克隆。*Ms2* 基因是用转座子标签法在拟南芥中克隆的第一

个细胞核雄性不育基因<sup>[5]</sup>。此外, 人们还从拟南芥中克隆了雄性不育基因 *Ms1* 和 *Bcp1*<sup>[6-7]</sup>。*Ms45* 基因是从玉米中克隆的细胞核雄性不育基因<sup>[8]</sup>, *Ms5* 则是由 T-DNA 标签法克隆得到的另一核雄性不育基因<sup>[9]</sup>。目前从水稻中克隆的基因大致包括与绒毡层发育及降解有关的基因 *Udt1* 及 *TDR*<sup>[10-11]</sup>; 与小孢子母细胞减数分裂有关的基因 *PAIR1*、*PAIR2*; 与孢原细胞的分化有关的 *MSP1*<sup>[12]</sup>; 雄性育性的调控基因 *Ugp1*、*Ugp2*、*AID1* 和 *OsGAMYB*<sup>[13-14]</sup>。因此, 雄配子体发育的部分过程和调控机制已经逐渐明朗。更多雄性不育基因的克隆将有助于更全面地了解雄配子体发育的分子机制。

本研究由国家自然科学基金项目(30800084)和国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10A103)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 李平, E-mail: liping6575@163.com \*\* 共同第一作者

Received(收稿日期): 2009-01-12; Accepted(接受日期): 2009-03-23.

本研究对一个衍生自粳/籼稻杂交组合的雄性核不育材料进行了初步的表型鉴定、遗传分析和分子标记定位,以期为该基因的精细定位、分离克隆及其在水稻生殖生长中的功能等相关研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水稻雄性不育突变体材料 *ms-np* 来源于一个粳/籼稻杂交组合后代的自然突变体。其他野生型水稻材料 M63、527R、881R、885R 和 D62B,均由四川农业大学水稻研究所提供。

### 1.2 突变体外观形态观察及花粉育性鉴定

取突变体成熟颖花在解剖镜下进行形态观察;同时挑出花药捣碎,用 1%  $I_2$ -KI 染色,在显微镜下根据花粉粒形态和染色状况,分析可育和败育的花粉及败育类型。

### 1.3 突变体育性稳定性调查

2005 年分别在四川成都与海南陵水对突变体的育性稳定性进行调查。于水稻开花期随机选取水稻小穗 20 个,再于每个小穗的不同部位选择 8~12 朵成熟小花,按 1.2 中的方法对小花进行育性鉴定。同时去除其余小穗,一定时期后对再生小穗进行育性调查;再次去除其余小穗,重复调查再生小穗育性。总计调查小花育性 3 次,以评价突变体在不同光、温环境下的育性稳定性。

### 1.4 突变性状的遗传

群体构建:2005 年在温江以该突变体为母本,分别与 M63、527R、881R、885R 和 D62B 等杂交,在海南陵水种植  $F_1$  并套袋自交,2006 年在温江种植  $F_2$ 。同时利用其与 527R 和 D62B 杂交的  $F_1$  作为父本与突变体测交,在温江种植回交一代植株。成熟时以群体为单位分单株统计突变性状的分离情况,进行遗传分析。

### 1.5 基因定位

1.5.1 作图群体 以组合 *ms-np*/M63 的  $F_2$  群体作为该基因的定位群体,其中含有突变型单株 227 株。

1.5.2 水稻叶片总 DNA 的提取 取新鲜叶片少许放入 1.5 mL 离心管,置液氮中,用镊子研磨成粉末;加 65 预热的 DNA 提取液(100 mmol  $L^{-1}$  Tris-Cl; 50 mmol  $L^{-1}$  EDTA; 500 mmol  $L^{-1}$  NaCl; 1.5% SDS; pH 8.0) 700  $\mu$ L,摇匀,水浴 65 保温 20~30 min,并不时摇动以免结团;再加 180  $\mu$ L 5 mol  $L^{-1}$  醋酸钾溶液,混匀后 0 冰浴 20~30 min;每管加入 24 1 的氯仿/异戊醇 400  $\mu$ L,充分混匀,室温下放置 10~20 min,12 000 $\times$ g 离心 6 min;吸取上清液至另一干净离心管,加入-20 预冷的 0.6~1.0 倍体积的异丙醇或 2 倍体积的无水乙醇,缓慢混匀,沉淀 DNA;小心倒出液体,以 70%的乙醇洗涤 2~3 次,然后用无水乙醇脱水,吹干;加 500~1 000  $\mu$ L 超纯水溶解备用。

1.5.3 SSR 分析 (1) 微卫星引物分析:以均匀分布于水稻染色体上的 512 对微卫星引物(序列由康乃尔大学公布,由上海 invitrogen 生物技术有限公司合成)筛选亲本,

差异标记分别在由 M63、*ms-np*、4 株可育株、6 株不育株构成的小群体中进行连锁分析。对小群体得到的连锁标记进一步在所有的不育单株中进行连锁验证和连锁分析。(2) PCR 扩增:反应体系总体积为 20  $\mu$ L,包含 2  $\mu$ L 模板 DNA, 2 pmol SSR 前、后引物各 1  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer (含镁离子) 2  $\mu$ L, 2.5 mmol  $L^{-1}$  dNTP 2  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L;扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。(3) 电泳:在扩增产物中加入 3  $\mu$ L 6 $\times$ loading buffer,混匀,用 3%~4%的琼脂糖凝胶(加微量 EB)于 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中 120 V 下电泳 2~4 h 左右,在凝胶扫描成像系统记录电泳分离结果。

1.5.4 遗传作图 将具有野生型亲本带型的单株记为“1”,具有突变体亲本带型的单株标记为“2”,具有二者杂合带型的单株记为“3”,利用 mapmaker 3.0 软件对分离群体的不育性状和分子标记的分离数据进行连锁分析,并进行遗传图距(cM)的计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体形态

突变体植株明显较正常植株(姊妹株)矮小,叶色浓绿。突变体最明显的特征就是自然结实率低,仅有 10%左右(图 1-A);套袋自交的突变体的结实率为 0,说明自然状态下的结实实际上是异花授粉的结果。小花的解剖观察发现,正常材料到花期时雄蕊饱满,颜色淡黄(图 1-B);而突变体小花花丝细长,花药干瘪,呈白色透明状,但雄性器官的数量和雌性器官形态正常(图 1-C)。碘染证实,突变体的花药捣碎后没有花粉粒着色(图 1-D, E),据此认为突变体是一个典型的无花粉型雄性不育材料,并命名为 *ms-np* (male sterility with no pollen grains)。

### 2.2 突变体育性稳定性

不同生态区域和生育时期小穗育性观察结果表明,突变体在不同光周期和温度条件下均表现稳定不育,证实该不育特性不受光温调控,隶属普通核不育类型(表 1)。

### 2.3 突变性状的遗传

以突变体 *ms-np* 作为母本,分别与 M63、527R、881R、885R、D62B 杂交衍生  $F_2$  群体,同时利用 *ms-np* $\times$ D62B 和 *ms-np* $\times$ 527R 的  $F_1$  与突变体 *ms-np* 回交衍生 BC<sub>1</sub> $F_1$  代植株,调查突变性状在各种背景下的分离。结果表明,所有群体的  $F_1$  植株均表现正常可育,  $F_2$  和 BC<sub>1</sub> $F_1$  出现育性分离,说明该育性性状受核基因控制而不受胞质基因组的影响,可育相对不育为显性。在所有  $F_2$  群体中,育性均符合 3 1 的分离,而 BC<sub>1</sub> $F_1$  植株则符合 1 1 的分离规律(表 2),表明该不育性状为单个基因控制的隐性突变。

### 2.4 *ms-np(t)* 基因的初步定位

利用均匀分布于水稻 12 条染色体上的 512 对 SSR 引物分析雄性不育突变体和 M63,筛选在两个亲本间具有多态性的引物。对差异标记分别在由亲本、4 株可育株、

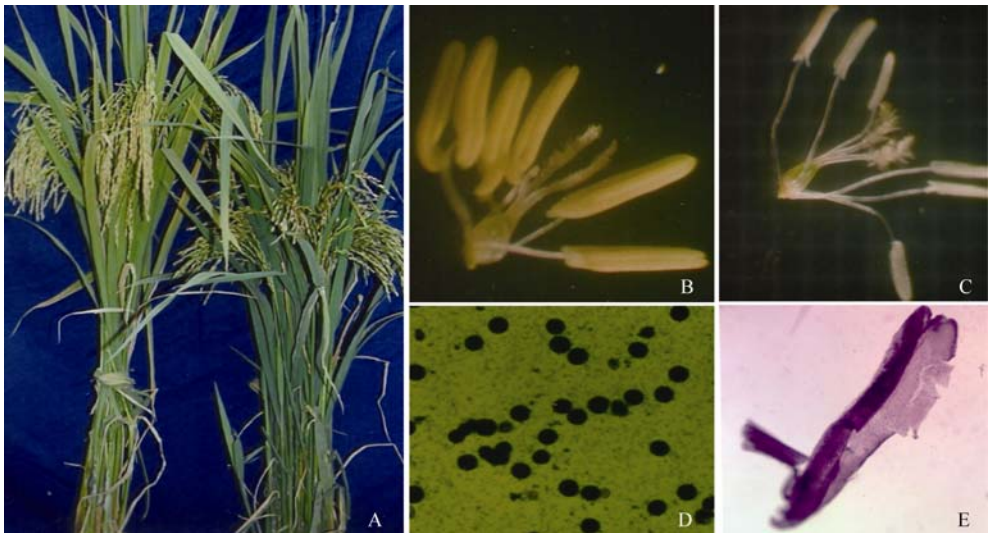


图 1 突变体的形态特征

Fig. 1 Phenotype of the mutants

A：正常材料(左)与突变体(右)的株型对比; B：正常水稻小花; C：突变体小花; D：正常花粉染色; E：突变体的花药染色。

A: comparison of the plant character of the normal plant (left) and the mutant (right); B: a normal floret; C: a mutant floret;  
D: staining of the normal pollen grains; E: staining of the mutant anther locule.

表 1 突变体育性稳定性  
Table 1 Stability of the mutant fertility

区域 Location	时期 Date (month/day)	调查小花数(个) No. of investi- gated florets	可育小花数(个) No. of fertile florets
海南陵水 Lingshui, Hainan	3/20	196	0
	4/10	203	0
	4/30	187	0
四川温江 Wenjiang, Sichuang	8/30	234	0
	9/20	212	0
	10/10	201	0

6 株不育株构成的小群体中进行初步连锁分析。发现位于第 6 染色体上的 SSR 标记 RM3、RM541 和 RM343 与突变性状存在连锁关系。进一步用 F<sub>2</sub> 群体的所有隐性单株

(227 株)对这 3 个标记进行分析,结果显示突变基因与上述标记表现明显的连锁(图 2),遗传距离分别为 15.2、15.2 和 7.9 cM。其中 RM3 和 RM541 表现共分离,与 RM343 分别位于突变基因的两侧。根据各标记在基因组上的位置, *ms-np(t)* 基因被初步定位在水稻第 6 染色体上的微卫星标记 RM541 和 RM343 之间(图 3)。

3 讨论

雄性不育可以分为核不育和细胞质不育(包括核质互作不育)两种类型,其中细胞核雄性不育又包括显性核不育与隐性核不育两类。根据育性是否受光照、温度等外界条件影响,核不育又可以分为光(温)敏核不育和普通核不育两种类型。根据 GRAMENE(<http://www.gramene.org>)网站的数据库记载,目前在该数据库登录的雄性不育基因大致有 120 多个,其中大约有 20 多个属于细胞质雄性不育类

表 2 突变性状在群体中的分离  
Table 2 Segregation of the mutation in different populations

组合 Population	群体大小 Total number of individuals	正常株 No. of wild-type individuals	突变株 No. of mutant individuals	期望比例 Expected value	$\chi^2$
<i>ms-np</i> ×M63	871	644	227	3:1	0.47
<i>ms-np</i> ×527R	339	259	80	3:1	0.28
<i>ms-np</i> ×881R	374	275	99	3:1	0.36
<i>ms-np</i> ×885R	233	181	52	3:1	0.75
<i>ms-np</i> ×D62B	411	315	96	3:1	0.51
<i>ms-np</i> ×( <i>ms-np</i> ×D62B)	311	149	162	1:1	0.46
<i>ms-np</i> ×( <i>ms-np</i> ×527R)	277	147	130	1:1	0.92

$P_{0.05,1}=3.84$ .

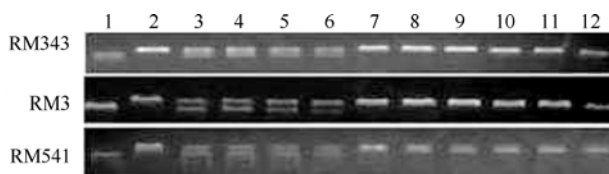


图2 连锁标记在群体中的分离

**Fig.2 Segregation patterns of the linked markers in  $F_2$  populations**  
 1: M63; 2: *ms-np*; 3~6 为  $F_2$  群体中可育株; 7~12 为  $F_2$  群体中不育株。  
 1: M63; 2: *ms-np*; 3~6: fertile plants in  $F_2$  population;  
 7~12: sterile plants in  $F_2$  population.

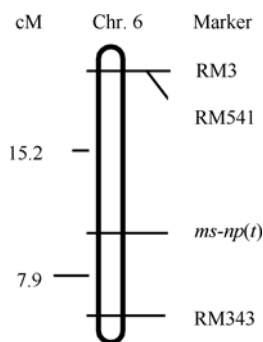


图3 SSR 标记和雄性核不育基因的局部连锁图

**Fig. 3 Linkage map of the *ms-np(t)* gene and SSR makers**

型, 约有 30 多个核不育基因实现了染色体定位。其中光敏核不育基因主要定位在第 3、5、6、7、11、12 染色体上, 温敏核不育基因则主要定位在第 2、6、7、8、9、10 染色体上<sup>[15]</sup>。而核质互作雄性不育(恢复)基因主要被定位在第 10 染色体的长臂上<sup>[16-18]</sup>, 其他染色体上也有定位报道<sup>[19]</sup>。但目前在水稻第 6 染色体上报道的基因仅有 4 个, 即 *ms9*、*ms64*、*ms75(pgms)* 和 *ms82(tms3)*。*ms75(pgms)*、*ms82(tms3)* 分别属于光、温敏型核不育, 与 *ms-np(t)* 不属于同一类型; 而 *ms9* 和 *ms64* 同属于普通核不育类型, 但均由早期的形态学标记定位, 它们之间的等位关系尚需要进一步验证。

利用不育突变体与 M63 杂交衍生的分离群体, 成功地将 *ms-np(t)* 定位在第 6 染色体上的微卫星标记 RM541 和 RM343 之间。但这只是初步界定, 因差异引物十分匮乏, 尚未实现精细定位。我们又尝试在其他群体内进行定位, 结果发现多态性仍然不丰富, 这可能与初期配制群体的亲本材料遗传基础比较狭窄有关(虽然我们曾尝试籼粳交, 但  $F_1$  育性不正常)。要实现该基因的精细定位, 配制亲本间遗传差异足够大、 $F_1$  植株育性正常的分离群体至关重要。目前, 我们已经配制了一些亲缘关系较远的组合, 期望能够实现该基因的精细定位。

隐性核不育材料在育种上的应用目前主要集中在以轮回选择为主要手段的群体改良上。杂交、轮回和周期性的杂交有利于打破不利连锁, 实现有益基因的累加, 从而拓宽育种的质源。目前已经有研究人员利用隐性核不育材料育成高产、优质的不育系、恢复系或杂交组合, 表明隐性核不育材料在水稻育种应用上具有一定的价值。不仅如

此, 隐性核不育的克隆和表达调控可能创造新的杂种优势的利用途径。有研究者认为克隆育性控制基因, 在该基因前面人为添加一个可以受化学物质调控的启动子, 从而控制基因的表达活性, 达到人为操纵植物育性的目的。这样既实现了一系两用, 又摆脱了目前三系育种受恢保关系制约的瓶颈, 因为凡是育性正常的水稻材料都可以作为该材料的恢复系, 可能对水稻杂种优势的利用产生较深远的影响。

## References

- [1] Ma H. Molecular genetic analysis of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 393-434
- [2] Glover J, Grelon M, Craig S, Chaudhury A, Dennis E. Cloning and characterization of *Ms5* from Arabidopsis: A gene critical in male meiosis. *Plant*, 1998, 15: 345-356
- [3] Kinoshita T. Gene symbols and information on male sterility. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 13-22
- [4] Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 175-180
- [5] Aarts M G M, Dirkse W G, Stiekema W J, Pereira A. Transposon tagging of a male sterility gene in Arabidopsis. *Nature*, 1993, 363: 715-717
- [6] Wilson Z A, Morroll S M, Dawson J, Swarup R, Tighe P J. The Arabidopsis MALE STERILITY1(MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant*, 2001, 28: 27-39
- [7] Xu H, Knox R B, Taylor P E, Sinhg M B. *Bcp1*, a gene required for male fertility in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2106-2110
- [8] Cigan A M, Unger E, Xu R J, Kendall T, Fox T W. Phenotypic complementation of *ms45* maize requires tapetal expression of MS45. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14: 135-142
- [9] Ross K J, Fransz P, Armstrong S J, Vizir I, Mulligan B, Franklin F C H, Jones G H. Cytological characterization of four meiotic mutant of Arabidopsis isolated from T-DNA transformed lines. *Chromosome Res*, 1997, 5: 551-559
- [10] Jung K H, Han M J, Lee Y S, Kim Y W, Hwang I, Kim M J, Kim Y K, Nahm B H, An G. Rice undeveloped tapetum1 is a major regulator of early tapetum development. *Plant Cell*, 2005, 17: 2705-2722
- [11] Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 1999, 11: 431-443
- [12] Nonomura K I, Miyoshi K, Eiguchi M, Suzuki T, Miyao A, Hirochika H, Kurata N. The MSP1 gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell*, 2003, 15: 1728-1739

- [13] Zhu Q H, Ramm K, Shivakkumar R, Dennis E S, Upadhyaya N M. The ANTHR INDEHISCENE1 gene encoding a single MYB domain protein is involved in anther development in rice. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1514–1525
- [14] Miyuki K, Yoshiaki I, Miyako U T, Hironori I, Takeshi I, Yuhko K, Tsukaho H, Akio M, Hirohiko H, Motoyuki A, Makoto M. Loss-of-function mutations of the rice GAMYB gene impair  $\alpha$ -amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell*, 2004, 16: 33–44
- [15] Lu X-G(卢兴桂), Gu M-H(顾铭洪). The Principles and Techniques of Two-Line Hybrid Rice (两系杂交水稻理论与技术). Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [16] Tan X L, Vnavichit A, Amornsilpa S, Trangoonrun S. Mapping of rice *Rf* gene by bulked line analysis. *DNA Res*, 1998, 5: 15–18
- [17] Norio I, Noaki K, Akiko I, Atsushi N, Yoko K, Yumi Y, Masaaki O, Shiro S, Hiromori A, Kenichi H, Choyu S, Tatsuhito F, Hiroaki S. 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 Breed*, 1997, 3: 195–202
- [18] Liang G-H(梁国华), Yan C-J(严长杰), Tang S-Z(汤述翥). Molecular location of a fertility restorer gene for BT type CMS rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2001, 15(2): 89–92 (in Chinese with English abstract)
- [19] Bharaj T S, Bains S S, Sidhu G S, Gagneja M R. Genetics of fertility restoration of 'wild abortive' cytoplasmic male sterility in rice. *Euphytica*, 1991, 56: 199–203