

# 水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf6* 功能标记开发及微核心种质中 *Rf6* 基因的筛选

徐 雪<sup>1</sup>,王 英<sup>2</sup>,邹礼平<sup>1</sup>,魏 朗<sup>1</sup>,彭 方<sup>1</sup>,黄文超<sup>3</sup>,段俊枝<sup>4</sup>,姚国新<sup>1,3\*</sup>

(1. 湖北工程学院 生命科学技术学院,湖北 孝感 432000; 2. 湖北神农架林区农林局,湖北 神农架林区 442499;  
3. 杂交水稻国家重点实验室/武汉大学 生命科学学院,湖北 武汉 430072;  
4. 河南省农业科学院 农业经济与信息研究所,河南 郑州 450002)

**摘要:** 核恢复基因 *Rf6* 是红莲型杂交水稻特有的新恢复基因,为了寻找更多具有 *Rf6* 恢复基因的种质,以扩展红莲型杂交水稻的恢复系来源,组配更多优良杂交品系,利用 *Rf6* 及其等位基因的序列差异,开发 *Rf6* 基因的功能标记,并利用该标记对中国水稻微核心种质进行 PCR 扩增,筛选具有 *Rf6* 恢复基因的种质。结果表明,在 324 bp 插入片段 (*Rf6* 较其等位基因插入 324 bp) 两侧设计引物 (正向引物: 5' - ATGACAAGAGGACCAGCGATGCAATGG - 3', 反向引物: 5' - ATTCTTG-CAGAGATAGACCATGAGCGTG - 3'), 利用该引物可扩增出条带清晰且无杂带的差异片段,可用于 *Rf6* 基因的鉴定。利用该标记在 197 份中国水稻微核心种质中筛选出 22 份具有 *Rf6* 恢复基因的种质,可为拓宽红莲型杂交水稻的恢复系来源提供材料。

**关键词:** 红莲型水稻; 恢复基因 *Rf6*; 微核心种质

中图分类号: S435.72 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2017)02-0012-04

## Functional Markers Development of Restore Gene *Rf6* in Rice and Screening of *Rf6* in Micro-core Collections

XU Xue<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, ZOU Liping<sup>1</sup>, WEI Lang<sup>1</sup>,  
PENG Fang<sup>1</sup>, HUANG Wenchao<sup>3</sup>, DUAN Junzhi<sup>4</sup>, YAO Guoxin<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Life and Science Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, China; 2. Agricultural and Forestry Bureau of Shengnongjia Forest Region, Shengnongjia Forest Region 442499, China; 3. College of Life Sciences, Wuhan University/Sate Key Laboratory of Hybrid Rice, Wuhan 430072, China; 4. Institute of Agricultural Economy and Information, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** *Rf6* is a new rice restoring gene of HL type, in order to select more restoring lines with *Rf6* for increasing restoring lines to hybrid more combinations, the functional marker of *Rf6* was developed according to the difference of sequence of *Rf6* and its allele, and this marker was used to screen lines with *Rf6* among Chinese rice micro-core collections. The results indicated that the marker designed in both sides of the inserted 324 bp fragment (there was a 324 bp inserting fragment between *Rf6* and its allele) could generate clear and non-background production, and this marker (forward sequence 5'-ATGACAAGAGGACCAGCGATGCAATGG-3', reverse sequence 5'-ATTCTTG-CAGAGATAGACCATGAGCGTG-3') could identify *Rf6* germplasm. Twenty-two lines including *Rf6* restoring gene were selected in 197 Chinese rice micro-core collections using the above marker, and these materials would broaden restoring lines of HL hybrid rice.

**Key words:** HL type rice; restoring gene *Rf6*; micro-core collections

收稿日期:2016-11-04

基金项目:杂交水稻国家重点实验室(武汉大学)开放课题基金项目;湖北省自然科学基金项目(2016CFB510)

作者简介:徐 雪(1992-),女,湖北襄阳人,在读硕士研究生,研究方向:作物遗传育种。

\* 通讯作者:姚国新(1977-),男,湖北当阳人,副教授,博士,主要从事水稻杂种优势研究。E-mail:guoxiny2004@hbeu.edu.cn

细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是植物界一种普遍现象,是指植物不能产生花粉或产生的花粉无活力,导致雄蕊不能正常授粉而雌蕊功能正常的一种母性遗传现象。核恢复基因 (restorer of fertility, Rf) 是能够恢复 CMS 花粉育性的基因,利用 CMS/Rf 系统可大量生产杂交种。目前,水稻 CMS 主要有 3 种类型:野败型 (WA)、红莲型 (HL) 和包台型 (BT)。研究表明,orf79 和 orfH79 分别是 WA 和 HL 型 CMS 的不育基因<sup>[1]</sup>,Rf1 恢复 BT 型 CMS 的育性<sup>[2]</sup>,Rf3 和 Rf4 恢复 WA 型 CMS 的育性<sup>[3-4]</sup>,Rf5 和 Rf6 恢复 HL 型 CMS 的育性<sup>[5-6]</sup>。Rf1 和 Rf5 是等位基因,Rf6 是新发现的 HL 型 CMS 的特有恢复基因,对其他类型 CMS 不具有恢复功能。恢复基因的来源直接限制 HL 型杂交水稻的组配,对杂种优势的利用起着决定性的作用。目前,Rf6 基因已经被定位克隆,与其等位基因 rf6 相比,Rf6 基因存在 3 个重复插入序列,比 rf6 基因长 324 bp,rf6 由于缺失插入序列而失去育性恢复功能<sup>[7]</sup>。传统寻找恢复系的方法是与不育系进行杂交,考察下一代 F<sub>1</sub> 的花粉育性,能够恢复花粉育性的材料可作为恢复系利用,这种方法比较盲目,缺乏针对性,而且耗时长。开发恢复系恢复基因功能分子标记,筛选具有恢复基因的材料,进行组合配制,可减少工作量,节省时间。目前,尚未见 Rf6 基因功能标记开发的报道,本研究在 Rf6 基因插入的 324 bp 序列两侧设计基因内功能分子标记,对中国栽培水稻微核心种质进行筛选,以期从中获得含有 Rf6 恢复基因的种质,用于 HL 型杂交水稻恢复系选育。

表 1 YRf6 标记的序列及扩增长度

引物名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	Rf6/rf6 长度/bp
YRf6	ATGACAAGAGGACCAGCGATGCAATGG	ATTCTTGAGAGATAGACCATGAGCGTG	763/439

记可扩增出 763/439 bp 的片段。为了鉴定该标记的扩增效果,用该标记对 9311、YTA、YTB、Nip 和 NJ3 的 DNA 进行扩增,扩增结果如图 1 所示,条带清晰且无杂带,可用于 Rf6 基因的鉴定。

## 2.2 中国栽培水稻微核心种质中 Rf6 基因的筛选

对 197 份中国栽培稻微核心种质进行 DNA 提取,然后利用设计的 YRf6 标记进行 PCR 扩增,部分扩增电泳结果见图 2。扩增结果清晰,区分效果良好。所有扩增结果整理汇总于表 2 中,共筛选到含

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

197 份中国栽培稻微核心种质由中国农业大学李自超教授实验室提供,9311(阳性对照)、日本晴 (Nip,阴性对照)、粤太 A(YTA)、粤太(YTB)和宁梗 3 号(NJ3)等材料由杂交水稻国家重点实验室种植保存。2016 年 5 月,所有材料种植于湖北孝感,常规方法种植管理。

### 1.2 引物设计

Rf6 及其等位基因序列由 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载,采用 Primer Premier 5 和 Gene Runner 设计功能标记引物 YRf6。

### 1.3 DNA 提取、PCR 扩增及电泳

取 3 叶期幼苗叶片,采用 CTAB 法提取各材料 DNA,稀释至 20 ng/μL,于 -20 °C 保存备用。PCR 反应体系为 10 μL,包含 Taq 酶 0.10 μL (2.5 U/μL)、引物 1.5 μL (10 mmol/L)、dNTP 0.1 μL (10 mmol/L)、DNA 1 μL (20 ng/μL)、10 × buffer 1.0 μL、灭菌蒸馏水 6.3 μL。扩增程序为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 30 s、55 °C 40 s、72 °C 50 s,共 35 个循环。采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳 30 min,EB 染色后,采用 Gellogic 200 成像系统读带分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Rf6 基因功能标记的设计与扩增效果

与没有育性恢复功能的 rf6 基因相比,有育性恢复功能的 Rf6 基因存在 324 bp 的插入序列<sup>[7]</sup>。因此,将 YRf6 引物(表 1)设计在 324 bp 插入位点前后,用该标

Rf6 恢复基因的材料 22 份,占微核心种质材料的 11.2%,其中四川(5 份)、云南(4 份)和福建(3 份)省是分布较多的省份,在东北和西北地区的水稻微核心种质中没有检测到 Rf6 基因。



图 1 YRf6 功能标记的扩增效果

图 2 部分微核心种质中 *Rf6* 恢复基因的扩增电泳结果(编号材料名称与表 2 对应)表 2 中国栽培稻微核心种质中 *Rf6* 基因的筛选

编号	名称	来源	有无 <i>Rf6</i>	编号	名称	来源	有无 <i>Rf6</i>	编号	名称	来源	有无 <i>Rf6</i>	编号	名称	来源	有无 <i>Rf6</i>
1	9311	江苏	+	51	麻谷子	陕西	-	103	秋前白	安徽	-	162	墨米	广西	-
2	NIP(日本晴)	日本	-	52	白毛稻	黑龙江	-	104	肥东塘稻	安徽	-	163	梗 87 - 304	湖南	-
3	葡萄黄	天津	-	53	黄丝桂占	广东	-	105	台山糯	江西	-	164	湘晚籼 3 号	湖南	-
4	六十早	安徽	-	54	丹东陆稻	辽宁	-	106	矮禾迟	江西	-	165	镇籼 232	江苏	+
5	清可	云南	-	55	闷加丁 2	海南	-	108	陆财号	福建	+	166	早籼 240	安徽	-
6	老造谷	云南	-	56	齐眉	广东	-	110	饿死牛	广东	-	167	郑稻 5 号	河南	-
7	麻谷糯	贵州	-	57	叶里藏花	河北	-	111	白壳花螺	广东	-	168	万利籼	湖南	-
8	滇瑞 409B	云南	-	58	金优 1 号	福建	-	112	赤壳糯	广东	-	169	矮仔占	广西	-
9	饭毫皮	云南	-	59	齐头白谷	云南	-	115	霸王鞭 1	湖北	-	170	盐水赤	福建	+
10	包二幅	海南	-	60	紫糯	云南	-	116	须谷糯	湖南	-	171	西什 15	广东	-
11	88B	江苏	-	61	泸科 3 号	四川	+	117	红旗 5 号	湖南	-	172	红梗旱谷	广西	-
12	四倍体朝 6	北京	-	62	辽梗 287	辽宁	-	118	细白粘	四川	-	173	拉木加	云南	-
13	香谷	云南	-	63	湘早籼 7 号	湖南	-	119	南天纳酒	四川	-	174	80B	湖南	-
14	旱麻稻	河南	-	64	齐头谷	云南	-	120	中农 4 号	四川	-	175	古 154	湖南	-
15	三粒寸	广东	-	65	台东陆稻	台湾	-	121	三颗寸	四川	+	176	圭 630	湖南	-
16	南京 11 号	江苏	-	66	鱼眼糯	云南	-	122	本邦谷	云南	-	177	IR661 - 1	湖南	-
17	一支香	福建	-	67	红米三担	江西	-	125	毫菜	云南	+	178	培 C122	湖南	-
18	鼠牙占	广东	-	68	湖恢 628	湖南	-	126	金枝糯	云南	-	179	梗 7623	上海	-
19	矮密	江西	-	69	丝苗	广东	-	127	鸡血糯	云南	-	180	宁恢 21	江苏	-
20	洞庭晚籼	湖北	-	70	宣恩长坛	湖北	-	128	乌咀红谷	云南	-	181	76 - 1	辽宁	-
21	公居 73	云南	-	71	魔王谷内	云南	-	129	背子糯	云南	-	182	特青选恢	湖南	-
22	毫虑光粘	贵州	-	72	三十七	云南	-	130	泽谷	贵州	-	183	JWR 221	江苏	-
23	金溪白	江西	-	73	老红稻	陕西	-	131	香糯	贵州	-	184	横县良春	广西	-
24	台中籼选 2	台湾	-	74	小红谷	云南	-	132	马尾粘	贵州	+	185	山酒谷	四川	-
25	有芒早梗	上海	-	75	寸三粒	江苏	-	134	阳壳糯	贵州	-	186	冷水糯	云南	+
26	台中在来 1	台湾	-	76	广陆矮 4 号	广东	+	136	加巴拉	西藏	-	187	毫香	云南	+
27	丹东陆稻	辽宁	-	77	湘晚籼 1 号	湖南	-	137	包选 21 号	广东	-	188	金南特 B	湖南	-
28	当育 5 号	安徽	-	78	五子堆	云南	-	138	文香糯	云南	+	189	竹珍 B	湖南	-
29	高阳淀稻	河北	-	79	闽北晚籼	福建	-	139	毫补卡	云南	-	190	朝阳 1 号 B	湖南	+
30	毫荒腊	云南	-	80	闷加高 1	海南	-	140	大弯糯	云南	-	191	L301B	湖南	-
31	隆化毛葫	河北	-	81	桂朝 2 号	广东	-	141	毫巴永 1	云南	-	192	安农晚梗 B	湖南	-
32	秕五升	云南	-	82	南特号	江西	-	142	冷水谷 2	云南	-	193	金南特 43B	湖南	+
33	矮沱谷 151	四川	-	83	柳叶粘	湖北	+	143	黄皮糯	云南	-	194	早熟农虎 6	湖南	-
34	成农水晶	四川	-	84	京虎 B	安徽	-	144	半节芒	云南	-	195	青四矮 16B	广东	-
35	白壳旱禾	湖南	-	85	黑督 4	广东	-	145	八百粒	云南	-	196	珍汕 97B	江西	-
36	油粘	贵州	-	86	湘恢 91269	湖南	-	147	飞蛾糯 2	贵州	-	197	献改 B	江西	-
37	金包银	福建	-	87	二钢矮	广东	-	148	紫芒飞蛾	贵州	-	198	江农早 1 号	江西	-
38	毫马克 (K)	云南	-	88	三百粒	江西	-	149	洞庭晚籼	湖北	-	199	黎明 B	辽宁	-
39	台中 65 号	台湾	-	89	红壳折糯	贵州	-	150	柳沙 1 号	广西	-	200	包协 - 7B	湖南	-
40	小白米	贵州	-	90	香稻	河南	-	151	桂花黄	江苏	-	201	G 珍汕 97B	四川	+
41	紫米	云南	-	91	红谷	四川	-	152	苏梗 2 号	江苏	-	204	中楼一号	山西	-
42	七月籼	广西	-	92	南雄早油	广东	-	153	成都矮 3 号	四川	-	205	兴国	吉林	-
43	矮麻抗	四川	-	93	梅花糯	四川	+	154	立新梗	四川	-	206	雷火占	安徽	+
44	红矮糯	广西	-	94	水原 300 粒	河北	-	155	黑梗 2 号	黑龙江	-	207	麻麻谷	四川	+
45	木瓜糯	湖南	-	95	寸谷糯	贵州	-	156	广陆矮 15 - 1	广西	-	210	卫国	辽宁	-
46	解放籼	江西	-	96	木榔球	上海	-	157	红晚 1 号	福建	+	211	百歌稻	江苏	-
47	包协 123B	湖南	-	97	铁秆乌	浙江	-	158	湘矮早 10	湖南	-	213	乌壳占	福建	-
48	光壳香糯	广西	-	98	秀水 115	浙江	-	159	扬稻 2 号	江苏	-	214	南高谷	云南	-
49	郴晚 3 号	湖南	-	99	二九南 1 号	浙江	+	160	晋稻 1 号	山西	+	215	细麻线	云南	-
50	贵推白禾 1	贵州	-	1100	矮脚南特	广东	+	161	早熟香黑	广西	-				

注: + 表示能检测出 *Rf6* 基因, - 表示未检测出 *Rf6* 基因。

### 3 结论与讨论

#### 3.1 拓宽 Rf6 恢复基因资源, 加速 HL 型杂交水稻发展

*Rf6* 恢复基因携带材料占微核心种质的 11.2%, 种质资源较少, 若采用杂交方法筛选效率很低, 工作量大, 采用分子功能标记筛选, 效率很高。HL 型核质互作不育系的强恢复系具备 2 对恢复基因 *Rf5* 和 *Rf6*, 可抵抗高温等逆境<sup>[8]</sup>, 更加稳产。其中, *Rf5* 恢复基因的资源丰富, 制约强恢复系选育的一个重要原因可能是 *Rf6* 恢复基因资源较少。目前, 已经选育出一系列高产、优质 HL 型杂交水稻品种, 在生产上其推广面积累计超过 600 万 hm<sup>2</sup><sup>[8]</sup>, 但其恢复系基本局限于 9311 及其改良品系, 来源狭窄。筛选的 22 份含有 *Rf6* 基因的种质资源会拓宽 HL 型杂交水稻恢复系的选育来源。

#### 3.2 充分挖掘微核心种质蕴藏的基因资源, 促进水稻优异基因聚合育种

我国是水稻重要的起源地之一, 在南方许多省份都蕴含着丰富的遗传育种资源。我国保存的水稻种质已经超过 7 万份, 最少的样本保存最大的基因资源是构建微核心种质库的目的, 同时利用微核心种质寻找优异基因也是重要目标。针对微核心种质的基因资源筛选方面已有不少报道, 在抗病、抗旱、耐冷等方面获得了非常好的进展<sup>[9-12]</sup>。在育性恢复基因、广亲和基因等方面的资源筛选是进一步挖掘微核心种质基因库优异基因的重要内容, 更多优异基因和优异种质是培育高产、优质、抗病和广适水稻新品种的基础。

#### 参考文献:

- [1] Yi P, Wang L, Sun Q P, et al. Discovery of mitochondrial chimeric gene associated with cytoplasmic male sterility of HL rice [J]. Chin Sci Bull, 2002, 47(9): 744-747.
- [2] Komori T, Ohta S, Murai N, et al. Map-based cloning of a

fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. The Plant Journal, 2004, 37(3): 315-325.

- [3] Zhang G, Bharaj T S, Lu Y, et al. Mapping of the *Rf-3* nuclear fertility restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94(1): 27-33.
- [4] 张群宇, 刘耀光, 张桂权, 等. 野败型水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf-4* 的分子标记定位 [J]. 遗传学报, 2002, 29(11): 1001-1004.
- [5] Hu J, Wang K, Huang W H, et al. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162 [J]. Plant Cell, 2012, 24(1): 109-122.
- [6] Huang W C, Hu J, Huang Q, et al. Two non-allelic nuclear genes restore fertility in gametophytic pattern and enhance abiotic stress tolerance in the hybrid rice plant [J]. Theor Appl Genet, 2012, 124(5): 799-807.
- [7] Huang W C, Yu C C, Hu J, et al. Pentatricopeptide-repeat family protein Rf6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility [J]. PNAS, 2015, 112(48): 14984-14989.
- [8] 黄文超, 胡骏, 朱仁山, 等. 红莲型杂交水稻的研究与发展 [J]. 中国科学(生命科学版), 2012, 42(90): 689-698.
- [9] 金铭路, 杨春刚, 余藤琼, 等. 中国水稻微核心种质不同生育时期耐冷性鉴定及其相关分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 540-546.
- [10] 吴方喜, 朱永生, 谢鸿光, 等. 中国水稻微核心种质的耐储藏特性初步研究 [J]. 中国粮油学报, 2010, 25(10): 124-128.
- [11] 夏小东, 袁筱萍, 余汉勇, 等. 中国稻种微核心种质资源对稻瘟病和百叶枯病的抗性评价 [J]. 浙江农业学报, 2010, 22(2): 211-214.
- [12] 黎毛毛, 万建林, 黄永兰, 等. 水稻微核心种质氮素利用率相关性状的鉴定评价及其相关分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 352-361.