分类号： 密级：

U D C： 编号：



博士学位论文

**水稻 *Rf-1* PCR 片段序列变异及海拔和细胞质导致的遗传偏分离**

**Sequence variation of *Rf-1* PCR segments and segregation distortion in rice caused by altitude and cytoplasm**

**博 士 研 究 生：何婷婷**

**指** 导 教 **师：谭学林 教授申 请 学 位 类 别：农学博士**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **专** |  |  | **业：作物遗传育种** |
| **研** | **究** | **方** | **向：作物种质创新与杂种优势利用** |
| **培** | **养** | **学** | **院：农学与生物技术学院** |

二 0 一三年 五 月

TCLC: Secrecy:

UDC : No. :

**Yunnan Agricultural University Ph.D. Dissertation**

**Sequence variation of *Rf-1* PCR segments and segregation distortion in rice caused by altitude and cytoplasm**

**Ph.D. Candidate：He Tingting Advisor：Professor Tan Xuelin Major：Crop Genetics and Breeding**

**Specialty：Crop Germplasm Innovation and Heterosis Utilization**

**Yunnan Agricultural University May,** **2013**

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得云南农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解云南农业大学有关保存、使用学位论文的管理办法及规定，即：云南农业大学有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意云南农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

论文作者签名： 时间： 年 月 日

导师签名： 时间： 年 月 日

摘 **要**

水稻是重要的粮食作物，也是分子生物学上的模式植物。育性恢复基因（restorer fertility gene，

*Rf*）是细胞质雄性不育利用于杂交水稻所必需的关键基因。*Rf-1*是水稻上研究最系统的、也是第一个被克隆的恢复基因。恢复基因仅存在于热带、亚热带的野生稻和籼稻种质中，而不存在于温凉气候的粳稻种质中。研究*Rf-1*恢复基因在水稻种质中的变异以及海拔和细胞质因素对*Rf-1*位点基因型遗传分离比例的影响，不仅有助于对水稻恢复基因演化的认识，也有助于阐明恢复基因与适于不同海拔条件的籼粳亚种的分化的关系。

本研究利用*Rf-1*位点上的特异性标记68923-8对来源不同的野生稻、籼稻和粳稻品种的PCR序列进行研究，以分析该恢复基因位点在水稻中的序列差异，从而进一步研究恢复基因的演化。另外，对不同细胞质背景的改良品种南34和C418分别与云南地方高寒品种的杂交组合在不同海拔的小穗育性及在*Rf-1*位点上的基因型频率进行研究，以分析高低海拔（2200 m, 1890m, 1250m, 400m）和细胞质对不同杂交组合*Rf-1*位点的遗传分化的影响。结果如下：

（1）根据*Rf-1*位点的PCR片段序列间的遗传距离构建系统发育树，供试材料可分成两大类，第一类包括野生稻、籼稻种质及粳稻恢复系，第二类包括7个粳稻常规品种。在第一类中，又主

要分成野生稻和籼稻两部分，但有一个籼稻常规品种滇黎401与野生稻的亲缘关系较近。

（2）中高海拔下（1890m和2200m），具粳稻细胞质背景的亲本产生的杂交组合的小穗育性平均值大于具籼稻细胞质背景亲本产生的杂交组合的小穗育性，而在中低海拔（400m和1250m），小穗育性平均值在籼粳不同细胞质间出现差异。

（3）在*Rf-1*位点上，以具籼稻细胞质背景的恢复系为母本时，各海拔点产生的分离群体均极显著的偏向具籼稻细胞质的亲本南34，且在中高海拔地区产生的分离群体的偏离程度更大；而具粳稻细胞质背景的亲本产生的杂交后代分离群体中，中高海拔较易发生偏分离，低海拔地区发生偏分离的群体较少，且所有海拔发生偏分离的群体绝大部分偏向地方品种。

（4）粳稻细胞质背景下，在低海拔产生与在中高海拔产生的分离群体间的分化较为明显，而具籼稻细胞质背景的亲本产生的群体间的遗传分化在不同世代间存在差异。聚类分析也表明，籼、粳不同细胞质产生的分离群体间存在明显的遗传分化，而且籼稻细胞质下的分化受到海拔的影响更加显著。

（5）本研究首次揭示了野生稻与籼、粳稻在*Rf-1*位点上的序列变异及其亲缘关系，该结果可以为籼粳进化等研究提供参考。另外，本研究首次揭示了籼稻细胞质与粳稻细胞核间的遗传互作不协调，以及海拔因素可使群体的*Rf-1*位点基因型遗传结构发生改变，最终导致群体出现遗传分化。

**关键词**：海拔；细胞质； *Rf-1* 位点；遗传偏分离；遗传分化

**Abstract**

Rice is one of the most important crops, and it is a model plant in molecular biology. Restorer fertility gene (*Rf*) is the key gene for cytoplasmic male sterility used in hybrid rice production. *Rf-1* is the first one of *Rf* genes studied systemically and cloned. *Rf* genes exist only in wild rice and *indica* rice that grow in tropical and subtropical region, but don‟t exist in *japonica* rice germplasm fitting template regions. Studies on sequence variation at *Rf-1* locus in rice germplasm and on genotype segregation distortion at *Rf-1* locus caused by altitude and cytoplasmic factors would helpful for understanding evolution of *Rf* genes in rice, also helpful for clarifying relationship between *Rf* genes and *indica-japonica* differentiation of different altitude condition.

Based on 68923-8 primer located on *Rf-1* locus, PCR fragment sequences in wild rice, *indica* and *japonica* rice were analyzed and to indicated sequence variation in rice, further study evolution of *Rf* gene sequentially. Segregated populations generated from crosses between Nan34 and C418 possessed *Rf-1* gene and Xiaohuagu and Xiaomagu possessed non- *Rf-1* gene, which are two *japonica* rice landraces from a high altitude in Yunnan. Geneotype segregation at *Rf-1* locus of the populations

Generated at four altitudes (400m、1250m、1890m and 2200m) were analyzed by PCR with 68923-8

Primer, also spikelet fertility of the populations were analyzed, to know the effect to genetic differentiation of altitude and cytoplasm The main results were as follows:

（1）According to phylogeny tree based on DNA fragment sequence at *Rf-1* locus, all of the germplasm were divided into two groups, one was consisted of wild rice, *indica* rice and *japonica* restorer lines, and the another one constituted mainly by *japonica* conventional varieties. The first group was consisted mainly by wild and *indica* lines, and only one indica conventional variety named Dianli401 had near relationship with wild rice.

(2) Sikelet fertility average value under *japonica* cytoplasm was larger than *indica* cytoplasm at

Middle、high altitudes(1890m and 2200m), but at low、middle altitudes(1250m and 1890m), spikelet fertility average value between reciprocal populations distorted to different cytoplasm.

(3) On *Rf-1* locus, as Nan34 which has *indica* cytoplasm was female parent, populations were all distorted toward Nan34 at all altitudes, and the distorted was more serious at middle、high altitude.

Under *japonica* cytoplasm background, only several populations occurred distortion, and those populations was most distorted toward landrice.

(4) Under *japonica* cytoplasm background, differentiation between low altitude and middle-high altitude was significated, and populations of different generations had difference under *indica* cytoplasm. Cluster analysis indicated that there were obvious differentiation between *indica* and *japonica* cytoplasm, and *indica* cytoplasm effects on differentiation were modified by altitude variation.

(5) Our study first indicate sequence variation on *Rf-1* locus of different type of rice, and these

Results could be reference for study *indica-japonica* differentiation. In addition, it is the first time to show that genetic structure of populations would be changed by effects from interaction between *indica-*cytoplasm and *japonica-*nuclei, and then caused genetic differentiation between populations.

**Key word:** Altitude; Cytoplasm; *Rf-1* locus; Distortion of genetic segregation; Genetic differentiation

目 录

[摘](#_Toc686759519)[要](#_Toc686759519) 3

**[Abstract](#_Toc686759520)** 3

[第一章 文献综述](#_Toc686759521) 8

**[1.1](#_Toc686759522)** [遗传多样性与遗传分化](#_Toc686759522) 8

[1.1.1 遗传多样性及其度量参数](#_Toc686759523) 8

**[1.1.2](#_Toc686759524)** [海拔对遗传多样性的影响](#_Toc686759524) 8

**[1.1.3](#_Toc686759525)** [遗传分化](#_Toc686759525) 8

**[1.1.4](#_Toc686759526)** [稻种资源的遗传多样性](#_Toc686759526) 8

**[1.2](#_Toc686759527)** [水稻细胞质雄性不育及育性恢复基因的研究](#_Toc686759527) 9

**[1.2.1](#_Toc686759528)** [水稻细胞质雄性不育](#_Toc686759528) 9

**[1.2.2](#_Toc686759529)** [雄性不育系的育性恢复基因](#_Toc686759529) 9

**[1.3](#_Toc686759530)** [海拔对水稻性状遗传的影响](#_Toc686759530) 10

**[1.3.1](#_Toc686759531)** [海拔对农艺性状的影响](#_Toc686759531) 10

**[1.3.2](#_Toc686759532)** [高海拔低温对育性的影响](#_Toc686759532) 10

**[1.3.3](#_Toc686759533)** [低海拔高温对育性的影响](#_Toc686759533) 10

**[1.3.4](#_Toc686759534)** [海拔对配子体的影响](#_Toc686759534) 10

**[1.4](#_Toc686759535)** [遗传分离与遗传分化研究](#_Toc686759535) 10

**[1.4.1](#_Toc686759536)** [影响遗传分离的因素](#_Toc686759536) 10

**[1.4.2](#_Toc686759537)** [遗传偏分离与遗传分化的关系](#_Toc686759537) 11

**[1.5](#_Toc686759538)** [籼粳分化及其与海拔的关系](#_Toc686759538) 11

**[1.5.1](#_Toc686759539)** [亚洲栽培稻的起源](#_Toc686759539) 11

**[1.5.2](#_Toc686759540)** [籼粳分化是亚洲栽培稻分化的主流](#_Toc686759540) 11

**[1.5.3](#_Toc686759541)** [籼粳亚种对海拔的适应性](#_Toc686759541) 11

[1.6 本研究目的、意义](#_Toc686759542) 11

[第二章 不同类型水稻](#_Toc686759543)***[Rf-1](#_Toc686759543)***[位点](#_Toc686759543)**[PCR](#_Toc686759543)**[片段的序列分析](#_Toc686759543) 12

**[2.1](#_Toc686759544)** [材料与方法](#_Toc686759544) 12

**[2.1.1](#_Toc686759545)** [供试材料](#_Toc686759545) 12

**[2.1.2](#_Toc686759546)** [方法](#_Toc686759546) 12

**[2.2](#_Toc686759547)** [结果与分析](#_Toc686759547) 18

**[2.2.1](#_Toc686759548)** [野](#_Toc686759548)**[Th](#_Toc686759548)**[稻、籼稻及粳稻的](#_Toc686759548)**[PCR](#_Toc686759548)**[标记](#_Toc686759548)**[68923-8](#_Toc686759548)**[的基因型](#_Toc686759548) 18

**[2.2.2](#_Toc686759549)** [不同类型水稻种质](#_Toc686759549)***[Rf-1](#_Toc686759549)***[位点](#_Toc686759549)**[68923-8](#_Toc686759549)**[片段的序列](#_Toc686759549) 18

**[2.2.3](#_Toc686759550)** [不同类型水稻种质间](#_Toc686759550)***[Rf-1](#_Toc686759550)***[位点](#_Toc686759550)**[68923-8](#_Toc686759550)**[片段的序列差异](#_Toc686759550) 19

[2.2.4 野Th稻与籼粳稻的系统发育树的构建](#_Toc686759551) 32

[2.3 讨论](#_Toc686759552) 32

[第三章 海拔和细胞质对水稻小穗育性遗传分离的效应](#_Toc686759553) 33

**[3.1](#_Toc686759554)** [材料与方法](#_Toc686759554) 33

**[3.1.1](#_Toc686759555)** [材料组合](#_Toc686759555) 33

**[3.1.2](#_Toc686759556)** [材料种植](#_Toc686759556) 33

**[3.1.3](#_Toc686759557)** [小穗育性的调查及统计分析](#_Toc686759557) 35

**[3.2](#_Toc686759558)** [结果与分析](#_Toc686759558) 35

**[3.2.1](#_Toc686759559)** [海拔对分离群体小穗育性的影响](#_Toc686759559) 35

**[3.2.2](#_Toc686759560)** [细胞质对分离群体小穗育性的影响](#_Toc686759560) 35

**[3.2.3](#_Toc686759561)** [海拔与细胞质互作对分离群体小穗育性性状的影响](#_Toc686759561) 39

**[3.3](#_Toc686759562)** [讨论](#_Toc686759562) 43

[第四章 海拔和细胞质对水稻](#_Toc686759563)***[Rf-1](#_Toc686759563)***[位点遗传分离比例及遗传分化的影响](#_Toc686759563) 43

**[4.1](#_Toc686759564)** [材料与方法](#_Toc686759564) 43

**[4.1.1](#_Toc686759565)** [实验材料](#_Toc686759565) 43

**[4.1.2](#_Toc686759566)** [材料种植](#_Toc686759566) 43

**[4.1.3](#_Toc686759567)** [总](#_Toc686759567)**[DNA](#_Toc686759567)**[的提取](#_Toc686759567) 43

**[4.1.4](#_Toc686759568)****[PCR](#_Toc686759568)**[标记及反应体系、参数](#_Toc686759568) 44

**[4.1.5](#_Toc686759569)** [数据统计分析](#_Toc686759569) 44

**[4.2](#_Toc686759570)** [结果与分析](#_Toc686759570) 44

**[4.2.1](#_Toc686759571)** [分离群体](#_Toc686759571)**[68923-8 PCR](#_Toc686759571)**[标记的基因型](#_Toc686759571) 44

**[4.2.2](#_Toc686759572)*****[Rf-1](#_Toc686759572)***[位点基因型遗传分离比例的影响](#_Toc686759572) 44

**[4.2.3](#_Toc686759573)*****[Rf-1](#_Toc686759573)***[位点基因型遗传多样性及遗传分化的影响](#_Toc686759573) 58

[4.3 讨论](#_Toc686759574) 76

[第五章 结论与展望](#_Toc686759575) 76

**[5.1](#_Toc686759576)** [结论](#_Toc686759576) 76

**[5.2](#_Toc686759577)** [展望](#_Toc686759577) 76

[参考文献](#_Toc686759578) 76

[附](#_Toc686759579)[录](#_Toc686759579) 81

[附表](#_Toc686759580) 81

[Appendix Tab.1 Materials of reciprocal populations at different crosses](#_Toc686759581) 81

[Appendix Tab.2 Materials of test cross F2 populations of different crosses](#_Toc686759582) 85

[Appendix Tab.3 The population size of segregation populations generated from different hybrid crosses](#_Toc686759583) 87

[Appendix Tab.4 The plants of test cross F2 populations generated from different hybrid crosses](#_Toc686759584) 91

[Appendix Tab.5 Genetic diversity index of populations in generations](#_Toc686759585) 92

[附](#_Toc686759586)[录](#_Toc686759586) 97

[附图](#_Toc686759587) 97

[Appendix Fig.1 Sequences blast of 68923-8 segment among materials](#_Toc686759588) 97

[附图2 不同杂交组合在各海拔产生分离群体的小穗育性单株比例](#_Toc686759589) 98

[Appendix Fig.2 Plant ratio of spikelet fertility of segregation populations in different crosses generated from different altitudes](#_Toc686759590) 98

[附](#_Toc686759591)[录](#_Toc686759591) 98

[试剂配方及配制](#_Toc686759592) 98

[作者简历](#_Toc686759593) 100

[版权申明](#_Toc686759594) 100

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CMS | Cytoplasmic Male Sterility | 细胞质雄性不育 |
| GMS | Genic Male Sterility | 细胞核雄性不育 |
| CTAB | Cetrimonium Bromide | 十六烷基三甲基溴化胺 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| mtDNA | Mitochondrial deoxyribonucleic acid | 线粒体脱氧核糖核酸 |
| cpDNA | Chloroplast deoxyribonucleic acid | 叶绿体脱氧核糖核酸 |
| SSR | Simple Sequence Repeat | 简单序列重复 |
| RAPD | Random Amplified Polymorphic DNA | 随机扩增多态性 DNA |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism | 限制片段长度多态性 |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism | 扩增片段长度多态性 |
| *orf* | Open reading frame | 开放阅读框 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | 聚合酶链式反应 |
| *Rf* | Restorer fertility gene | 育性恢复基因 |
| *ga* | Gametic gene | 配子体基因 |
| *S* | Sterile gene | 不育基因 |
| QTL | Quantitative trait Loci | 数量性状位点 |
| PPR | Pentatricopeptide Repeat | 三角状五肽重复 |
| UPGMA | Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean | 非加权组对算术平均法 |

# 第一章 文献综述

植物的生活周期是由配子体世代和孢子体世代组成，两个世代交替作用，形成一个完整的周期。植物的生活周期受到环境条件的影响，其中，由于配子体具有完整的遗传信息，利用外界环境，可对不同的基因型配子体进行选择，保留适应环境的配子体，使之具有竞争性，从而影响子代的孢子体表型（Mulcahy, 1979）和群体的基因型频率，使群体的遗传结构发生变化，最终导致群体遗传分化的发生。

近年来，随着分子生物学技术的完善，对遗传分化的研究日益增多。研究表明，遗传分化是生物适应环境的产物，而海拔差异引起的温度变化是生物产生遗传分化的因素之一（Bayer,1992; Nevo, 2001;姜志磊等，2005；王石华等，2009；寇姝燕等，2009）。研究表明，云南地方品种的遗传多样性较丰富，且低海拔地区的籼稻品种多样性高于高海拔的粳稻品种。籼稻中含有育性恢复基因（restorer fertility gene, *Rf* ），而粳稻中则没有育性恢复基因（Shinjyo, 1975;李铮友等, 1980;李泽炳等, 1982; Govinda *et al.,*1988; 袁隆平, 2002）。因此推测温度的变化可以引起籼粳亚种间恢复基因的变化，但缺乏直接的分子证据。

## **1.1** 遗传多样性与遗传分化

### 1.1.1 遗传多样性及其度量参数

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分，它可以进一步分析物种的进化潜力。一个物种遗传多样性越高，变异越丰富，对环境的适应能力也就越强，所以遗传多样性的大小是物种生存和发展的前提。遗传多样性是通过大量基因的组合和重组来体现的，这些基因存在于某个生物物种的个体中，在不同个体之间表现出不同的特性，比如生长方式、抗病虫害的能力，忍耐逆境的能力及生产力等方面。而对于育种家而言，可通过遗传多样性来分离出所期望的特性品种。

植物的遗传多样性主要是通过遗传标记的多态性来反映。遗传标记具有稳定性及遗传性等特点。基因型和环境相互作用越小，则遗传性越高。目前用于遗传多样性研究的参数主要有：多态性位点百分数（P）、等位基因平均数（A）、平均期望杂合率（H）。此外，这些参数还可用来描述分子多态性。

通常利用遗传距离来估算群体间的遗传多样性。Nei的遗传距离可以用来研究数量性状、基因频率及DNA测序数据的分析(Nei, 1978)。

（1）多态性位点百分数（P）：多态性位点占总位点的百分数。它可以反映群体的遗传多样性。

P=k/n×100%（k为多态性位点数，n为总位点数）。

（2）等位基因平均数（A）：等位基因总数占所分析的位点数。多用于群体间或种间的多样性研究。A=∑x/n （∑x为等位基因的总数，n为所分析的位点总数）。

（3）平均期望杂合率（H）：也称总基因的多样性，适用于多位点的群体间基因多样性的比较和基因迁移的估算。H=1-∑i∑j→m*P*2*ij* /m（Pij表示第j位点第i等位基因的频率，m表示位点总

数）。

### **1.1.2** 海拔对遗传多样性的影响

不同作物的遗传多样性会由于气候条件的不同而有所不同（Tanto and Demissie, 2000），光照、温度及纬度等均会对植物的遗传结构及遗传多样性造成不同程度的影响（Bayer, 1992; Antonovics, 1971; Loveless and Hamrick, 1984; Casler et al.,2004; 高丽和杨波, 2006）。长白ft地区红松的遗传多样性会随着海拔的升高而降低（冯富娟等，2004）。姜志磊通过对梭罗草的研究表明，其遗传多样性与海拔呈正相关，由于其生长的高海拔地区环境恶劣，致使高海拔地区的居群具有较高的遗传多样性（姜志磊等，2005）。在2007年，赵春芳对海拔差为1600m的范围内对沙棘RAPD进行研究，发现其遗传多样性呈现低-高-低的趋势，且海拔差异可导致种群间的遗传分化。紫茎泽兰的遗传距离与地理距离成正相关，其中海拔是影响其遗传多样性的重要因素，该多样性与海拔呈正相关但与经纬度呈负相关（黄文坤等，2007）。综合分析表明，海拔差异与种群间的遗传多样性呈现显著的相关性。

植物的遗传分化是植物遗传多样性的另一面，基因流、突变和自然环境的选择作用等均可产生遗传分化（苏晓华等, 1997; Taylor *et al.,* 1990），其中环境条件引起的隔离是导致遗传分化的主要因素。通过对柳叶菜科(Onagraceae)植物的研究发现，群体分化与海拔和纬度有关（Jonas and Geber, 1999）。利用RAPD标记对分布在不同海拔的黄花茅进行遗传分化的研究，发现海拔与遗传分化呈正相关（赵桂仿等，2000）。浙江车前的种群遗传分化也受到地理分布上的差异和海拔高度上的影响（郭水良等，2002）。陈倩（2006）发现温度可以造成蚜虫的种群发生遗传分化。曾亚文曾对水稻的研究表明，水稻籼粳分化与海拔差异具有明显的关系，是导致籼粳分化的因素之一

（曾亚文等，2001；邰丽梅等，2006）。

### **1.1.3** 遗传分化

Nei认为，一个物种的所有种群的总基因多样性指数（HT）包含各种群内的基因多样性(HS)和种群间的基因多样性(DST)，对于任何一个物种而言，HT= HS+ DST（Nei, 1977,1987）。而存在于各种群间的基因多样性的比率为：GST=1-HS/HT. GST又称为基因分化系数，是1977年由Nei定义，该分化系数在0~1之间，当为0时，HS与HT相同，所以种群间没有分化；而随着亚群体间的分化程度的加大，GST越来越接近1，说明总的基因多样性几乎存在于各群体之间。对于位点较多的种群，平均基因多样性可以通过对所有位点的HT、HS、DST的算术平均值来获得。

### **1.1.4** 稻种资源的遗传多样性

我国是世界主要的作物起源中心之一，研究表明，目前在我国栽培的作物中，有50%左右的作物起源于我国，所以我国的作物遗传资源非常丰富。目前我国已保存的遗传资源占到世界第二，仅次于美国。而已编入作物遗传资源目录的资源数量达到37万份以上，其中的33万份为栽培品种，而栽培品种中的农家品种约占85%（中国农业部，1993）。我国是亚洲栽培稻的起源中心之一

（丁颖，1957），种植水稻可追溯到7000年前（游修龄，1979）；我国也是世界上最早将野生稻驯化

成栽培稻的国家，长期的种植及驯化使得我国拥有丰富的遗传资源，从而对遗传多样性的研究也较多。另外随着分子生物学的日趋成熟，利用分子手段对稻种资源的研究也随之增多，分子标记的研究结果表明，利用遗传多样性的研究可以很好的判断品种间的亲缘关系、地理分布以及亲本间遗传差异（程保ft等，2007；刘炜等，2005；杨旭和谭学林，2009）。利用12条染色体上的24个SSR标记分析我国63个主栽常规稻品种及杂交稻组合亲本间的遗传变异，结果发现，恢复系间的遗传差异较大，常规粳稻的遗传多样性要低于常规籼稻品种（应杰政等，2007）。而华蕾（2007）通过对不同年份的水稻品种进行SSR的遗传多样性分析，发现近10年来的常规稻主栽品种丢失了一部分的等位基因。

云南由于其独特的地理气候，稻种资源丰富，成为亚洲栽培稻的遗传分化中心和多样性中心之一，在过去的50多年中，资源工作者一直致力于收集云南的稻种资源，从而方便不同学者利用

这些丰富的资源进行遗传多样性的研究。徐福荣在对分布于云南省内的1630份稻种资源的表现型

进行分析，结果表明，有724份资源属于多型性资源，主要集中分布在思茅、临沧、版纳以及德

宏等4个地州，以墨江、景洪、龙隆、永德、普洱、孟连和云县等7个县（市）为中心地带，表明云南多型性稻种资源主要分布在南部边缘及滇西南地区的野生稻分布区、稻种资源富集区和陆稻的主要种植区（徐福荣等，2005）。曾亚文在2001年对5285份云南地方稻种资源进行多样性的研究，结果表明，云南是中国稻种最大的遗传和生态多样性中心，不仅性状上存在较大的差异，在地州之间的差异也较大。据此，将云南划分为多样性中心区（位于滇西南及滇东南）、多样性扩散区（该区的保ft、玉溪、怒江、昭通、红河、大理州、楚雄和曲靖位于多样性中心区的周围）以及多样性贫乏区（主要包括昆明、丽江、东川和迪庆）。通过对云南的稻种资源进行研究，可以构建理想的种质库，明确核心的系统发育关系，并以此来建立优异的核心种质动态基因库。在分子水平上对云南地方品种的遗传多样性研究表明，使用的品种及标记不同会产生不同的结果，刘克德等（1995）的研究表明，云南地方粳稻中的等位基因数目及和遗传多样性水平均高于籼稻；而寇姝燕等（2009）对云南地方品种的*Rf-1*位点的研究结果显示，籼稻的遗传多样性要高于粳稻。

## **1.2** 水稻细胞质雄性不育及育性恢复基因的研究

### **1.2.1** 水稻细胞质雄性不育

雄性不育是指在雄蕊原基分化形成之后到有功能的花粉粒形成之前的这一阶段，期间，雄蕊原基经历了生理生化及形态方面的变化，并受到阻碍，使得雄蕊不能正常发育，不能形成有活力的花粉。引起这种状况的因素可能有以下几种：一是遗传因素，可分为细胞核雄性不育系（GMS）、细胞质雄性不育系（CMS）、细胞质与细胞核互作的雄性不育系，后来将细胞质雄性不育系及细胞质与细胞核互作的雄性不育系合并成细胞质核互作不育系。因此，以遗传因素为主要因素的不育系分成细胞核雄性不育系及细胞质核互作雄性不育系两大类。二是由于生理因素导致雄蕊不能形成有活力的花粉，因此只要不利因素消失，那么雄蕊就会恢复可育，形成有活力的花粉。化学杀雄导致不育就属于此类型。三是特定基因型在特定条件下才能表现出雄性不育的性状，而在另一条件下又表现出可育现象，此种类型称之为遗传生态型雄性不育系。这种类型的不育系在不同条件下表现出不同育性，但其不育性是可遗传的，所以它受到环境与遗传的双重调控。水稻光敏

及温敏不育系就属于此种类型（刘忠松等，2000）。目前应用较多的不育系有：野败型细胞质雄性不育系（WA-CMS）、红莲型细胞质雄性不育系（HL-CMS）、包台型细胞质雄性不育系（BT-CMS）以及滇Ⅰ型细胞质雄性不育系（D1-CMS）。

WA-CMS：以花粉败育的野生稻为母本，以早籼品种珍汕97、V20、V41、二九南1号等为父本进行核置换回交育成的不育系。属孢子体不育类型，花粉以单核期败育为主，用I2–KI染色镜检，以典败为主（袁隆平，2002）。

HL-CMS：细胞质来源于海南的红芒野生稻，以莲塘早为父本配组杂交，从F2代起用莲塘早连续回交，于1974年选育而成。属配子体不育类型，花粉以二核期败育为主，用I2–KI染色镜检，以圆败为主。红莲型不育系的败育特性介于野败型和包台型之间，败育特性比包台型稳定，但不如野败型稳定（李泽炳等，1982）。

BT-CMS：以籼稻品种Chinsurah Boro II为母本，粳稻品种台中65作回交亲本，育成了第一个包台型细胞质雄性不育系-台中65不育系。该不育系属配子体不育类型，花粉以二核期败育为主，用I2–KI染色镜检，花粉以染败为主。大多数的粳稻品种对其有保持能力，恢复源分布于热带、亚热带籼稻栽培地（Shinjyo, 1975）。

DⅠ-CMS：在云南高海拔籼稻与低海拔粳稻台北8号天然杂交的后代中选低育株作母本，用红帽缨作父本连续回交而育成的不育系，其胞质来自于云南高海拔籼稻。属配子体不育类型，花粉以二核末期、三核期败育为主，用I2–KI染色镜检，以染败为主（李铮友等，1980）。

### **1.2.2** 雄性不育系的育性恢复基因

#### **1.2.2.1** 育性恢复基因在水稻种质中的分布

水稻雄性不育的育性恢复基因是利用杂种优势的关键基因。研究发现，育性的恢复受到核恢复基因（fertility restorer gene, *Rf*）的控制。而对该恢复基因进行基因组比较，发现该恢复基因属于一类大的基因家族-PPR家族，其中很多基因编码线粒体及叶绿体的目标蛋白，调控细胞器基因的表达（Barkan *et al.,* 2000; Small *et al.,* 2000）。在水稻上，育性恢复基因的分布存在地理特性。对野败和红莲型不育细胞质而言，野生稻种质拥有育性恢复基因的比例分别为41.9％和60％（Li *et al*., 2005）。热带、亚热带气候条件的野生稻和籼稻种质中存在*Rf*基因，适于温带的粳稻不具有恢复基因(Shinjyo，1975；李铮友等，1980；李泽炳等，1982，袁隆平，2002)。在东南亚、我国华南、西南、长江流域的籼稻品种中具有恢复基因的比例分别为35.5％、20％、7.5%和7.5％。这与亚洲栽培稻由普通野生稻到籼稻、再到粳稻的进化关系一致。

目前生产上广泛应用的恢复系有野败型、红莲型、BT型及滇Ⅰ型，它们的恢复基因来源相同。野败型的两个恢复基因来源于IR8和IR27（黎垣庆，1985）；红莲型的主要恢复系密阳23的恢复基因来源于籼稻IR8; BT型和滇Ⅰ型的主要恢复系C418与南34的恢复基因来源相同，均来源于IR8（杨振玉等，1998；洪汝科等，2004）。野败型和红莲型具有不同的恢保关系，一些野败型不育系的保持系可能是红莲型的恢复系，而另一些红莲型的保持系又可能是野败型不育系的恢复系（孙红芹，2004）。而BT型和滇Ⅰ型的恢保关系是完全一致的，他们的恢复系对对方都具有恢复功能，等位性研究也表明，二者的恢复基因位点也是等位的（贺和初, 1988; Tan *et al*., 2004）。

#### **1.2.2.2** 水稻育性恢复基因的定位及克隆

经典遗传学通过花粉育性、结实率等统计学方法对恢复基因的基因对数、基因互作等方面进行研究。但这种方法易受环境和人为主观因素影响，而且育性在分离世代往往表现出组界模糊的

“质量-数量性状”特征，因此，对恢复基因的研究往往因为材料的不同及育性指标性状不同导致结果不尽一致。近年来随着分子标记技术的迅速发展，有效弥补了经典方法的不足。Yao等（1997）利用分子标记RFLP将野败型恢复基因*Rf-3*定位在第1染色体上，并且与RG532连锁，而Tan等（1998）将另一恢复基因*Rf-4*位于在第10染色体长臂中部，主要与RFLP标记C1361连锁。

Zhang等（1997）以珍汕97为受体构建了携带*Rf-3*及*Rf-4*的近等基因系，通过应用珍汕97A 与

ZSR21(一个携带*Rf-3*的近等基因系)杂交的F2，以及珍汕97A与IR24杂交的F2，结合RAPD标记对两个群体进行筛选定位，将*Rf-3*定位于第1染色体，且确认*Rf-3*与3个RAPD标记和3 个

RFLP标记有连锁关系。另外利用SSR标记，将第1染色体上的*Rf-3*定位在SSR标记RM10338和RM10376 之间，两个标记的距离为679.9kb（亓芳丽等，2008）。利用近等基因系，获得两个亚克隆Y1-10及Y3-8，其中Y1-10与*Rf-4*的连锁距离为3.2cM, Y3-8与*Rf-4*的连锁距离为0.9cM，从而将*Rf-4*定位在第10染色体的固定位置（张群宇等，2002）。SSR标记研究也将*Rf-4*定位在第

10染色体长臂中部，与OSR33的遗传距离为3.58cM（景润春等，2000），而与RM6100的遗传距离为0，二者紧密连锁，QTL分析表明，控制野败型育性恢复的两个主效QTL分别位于第1及第10染色体上，其中位于第10染色体上的QTL具有较大效应（李广贤等，2005）。Ahmadikhah等（2006）在第10染色体长臂中部检测到5个与*Rf-4*连锁的SSR标记，其中，*Rf-4*位于RM171和RM6737标记之间，且与两个位点的遗传距离分别为3.2和1.6cM。利用3种不同胞质不育系的F2群体，通过比较作图法将*Rf-3*定位在第1染色体，*Rf-4*定位在第10染色体，*Rf-4*与RM1108的距离为1.6cM(Sattari *et al.,*2008)。RM258与RM117为第10染色体上的SSR标记，二者与*Rf-4*的遗传距离分别为3.1cM和6.3cM（Nematzadeh *et al.,*2010），与RM271、RM171分别相距7.0 cM、

0.25cM。虽然多数学者将两对等位基因定位在第1和第10染色体上，但也有部分学者利用分子标记或QTL等方法在其他染色体上检测到了恢复基因位点。Bazrkar等（2008）采用隐性群体分析法，在第1、7、10和12号染色体上均检测到了与水稻野败型育性恢复基因*Rf-3*、*Rf-4*、*Rf-6*和*Rf-7*紧密连锁的SSR标记。由于对*Rf-3*及*Rf-4*基因未做克隆研究，再加上不同研究者使用的材料、方法均不相同，实验环境也不一致，所以对野败型恢复基因的定位结果也不尽一致。

红莲型作为另一种籼型恢复系，近些年来对其恢复基因的定位研究也较多。红莲型恢复系的育性恢复基因是由一对恢复基因控制，并将这对恢复基因定位于第10染色体长臂中部，与SSR标记RM258相连锁，连锁距离为7.8cM（黄青阳等, 1999; Huang *et al.,*2000）。2003年利用（丛广41A×密阳23）×丛广41B回交群体为材料，采用群分法将*Rf-5*定位在第10染色体上的长臂上，与SSR标记RM5373的距离为0.63cM（Huang *et al.*,2003）。利用密阳23及93-11两个恢复系进行恢复基因的研究，发现在第10染色体上有两个红莲型的恢复基因座位*Rf-5*及*Rf-6*（*t*），其中，*Rf-5*与SSR标记RM5373的连锁距离为1.3cM，而*Rf-6*（*t*）则与RM5373完全共分离，距离为

0.4cM。因此，他们认为这两个红莲型恢复基因虽然距离很近，但不在一个基因座位上，可能是由于不同学者利用的定位材料不同所致（Liu *et al.,*2004），而红莲型恢复基因与野败型的恢复基因同样位于第10染色体的相同区域，在一个基因簇内，但不在同一位点上。对*Rf-5*克隆结果表明，

*Rf-5*同样属于PPR家族，但RF5是通过GRP162与*orf79-atp6*作用（Hu *et al.,*2012）。

对BT型恢复系的恢复基因*Rf-1*的研究开展较早，它是目前水稻中记录最详尽的恢复基因。最初Shinjyo用初级三体确定了*Rf-1*与*fgl*和*pgl*连锁，位于第10染色体上（Shinjyo, 1975）。而后发现*Rf-1*与RFLP标记XNpb291相距7.5cM，与SSR标记OSR33的连锁距离为3.7cM(Fukata *et al.,*1992)。Akagi等（1996）利用近等基因系为材料在76个SSR标记中筛选出OSRRf标记，该标记与*Rf-1*的距离为3.7±1.1cM。此外，*Rf-1*还与RFLP标记G2155 及C9083紧密连锁（Ichikawa *et al.,*1997;谭学林等, 1999），且可能与C9083等位（梁国华等，2001）。Komori等将*Rf-1*定位在了S12564 Ts509l和CI36lMwol之间，两个标记的遗传距离仅为0.3cM，随后利用图位克隆对该基因进行克隆（Komori *et al*., 2003, 2004, 2005）。Akagi等（2004）利用日本晴的基因组设计了112对引物，在PCR的基础上开发了与*Rf-1*紧密连锁的标记。Toshiyuki等（2004）利用图位克隆法成功的在第10染色体上克隆出了*Rf-1*基因，并将其定位在fL601和C1361间。通过对以上不同类型的恢复基因的定位研究发现，BT型恢复基因*Rf-1*与野败型的恢复基因*Rf-4*和红莲型的恢复基因*Rf-5*都被定位于第10染色体长臂中部，但与不同标记的遗传距离有所不同，所以，不同类型的水稻恢复基因位于相同区域的不同位点上，即位于同一基因簇内。

*Rf-1* 是水稻上第一个被克隆的恢复基因（Akagi *et al.,*2004, Komori *et al.,*2004, Wang *et*

*al.,*2006）。传统遗传学的*Rf-1*基因是由*Rf-1A, Rf-1B*等同源片段组成，通过控制线粒体基因的表达来行使不同功能（Akagi *et al.,*2004; Komori *et al.,* 2004; Wang *et al.,*2006; Kato *et al.,*2007），其中，*Rf-1A*和*Rf-1C*可能与水稻的育性恢复功能密切相关，本研究所使用的标记68923-8就位于*Rf-1A*片段上（图1）。Wang等（2006）应用明恢63及相关不育系和恢复系进行研究发现，在BT型细胞质雄性不育系里有一个异常的线粒体开放读码框*orf79*，它与*atp6*基因共转录，编码一个细胞毒素肽。野生稻和籼稻拥有的具有育性恢复功能的*Rf-1*基因与粳稻中不具恢复功能的*rf-1*基因的主要区别是DNA碱基的插入或缺失（Akagi *et al.,*2004; Komori *et al.,*2004; Wang *et al.,*2006）。粳稻中的*rf-1*基因缺失了一段*Rf-1D*序列（谭亚玲，2009），从而导致籼粳亚种间的遗传分化出现差异（寇姝燕等，2009，谭亚玲等，2009）。

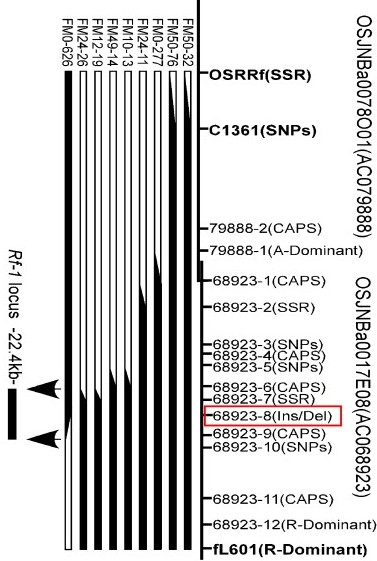
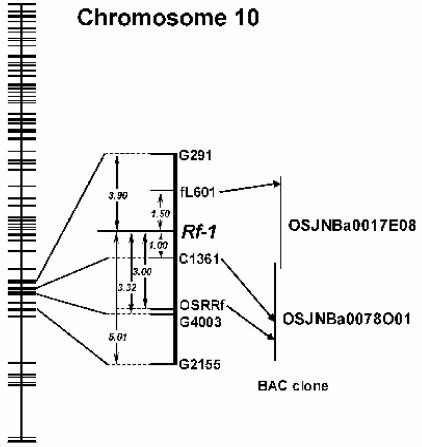


图1-1 特异性标记68923-8在*Rf-1*位点上的位置（Akagi *et al.,*2004）

Fig. 1-1 location of special marker 68923-8 on*Rf-1* locus（Akagi *et al.,*2004）

滇Ⅰ型恢复基因的研究在近些年来也得到突破。赵银河等（2003）利用保持系及恢复系材料对OSR33及RM228等6对引物进行筛选，发现OSR33、RM228及PMRF在保持系和恢复系间存在差异，进一步研究表明，上述3个标记与滇Ⅰ型细胞质雄性不育育性恢复基因连锁，PMRF、

OSR33和RM228引物是设计在第10染色体长臂的中部，所以，滇Ⅰ型细胞质雄性不育育性恢复的一个基因可初步定位于第10染色体长臂的中部。另外，OSR33和RM228鉴定材料的准确率分别为96%和90%；并在OSR33、RM228之间探测到1个与育性恢复有关的主效QTL，与OSR33和RM228的遗传距离分别为3.3cM和7.0cM（谭亚玲等，2004）。Tan等（2004）利用SSR标记，在第10染色体上检测到与育性相关的主效基因，他与OSR33与RM228的连锁距离分别为3.4cM和5.0cM。利用滇Ⅰ型主要恢复系南34与Ansanbyeo设计引物，发现两个恢复系与M43804 和

M43558紧密连锁，并克隆出一个滇Ⅰ型恢复基因*Rf-D1*（*t*），该恢复基因编码16个PPR蛋白。另外该基因与*Rf-1*的相似度为99%, ORF中仅在1149bp处出现一个碱基的变化，该变化改变了氨基酸的种类。另外，该变化正好处在PPR结构域中，故该改变可能影响水稻育性恢复功能（朱建荣等，2009）。以上对滇Ⅰ型恢复系的恢复基因的定位结果表明，该类型水稻的恢复基因与BT型恢复系的恢复基因具有等位性。

## **1.3** 海拔对水稻性状遗传的影响

由于海拔差异主要体现为温度，生长在不同海拔上的水稻所承受的温度也不一样，若遇到极端低温或极端高温，都会对水稻的抽穗开花等生长发育过程造成不同程度的影响。

### **1.3.1** 海拔对农艺性状的影响

云南是世界公认的亚洲栽培稻的起源中心之一，稻种资源丰富（程侃声等，1984；刘克德等，

1995），但由于海拔的不同，所表现出的农艺性状也不尽相同。刘克德在对云南87份地方品种的农艺性状的研究中发现，稃毛长度与低温抗性呈现负相关（刘克德，1995）。另外通过调查种植在昆明（1890m）和团结乡（2200m）的同一材料的农艺性状，发现随着海拔的升高，株高变矮，穗茎长及穗长缩短；生育期也随着海拔的升高而延长；有效穗及穗总粒数降低（谭亚玲，2009）。随着海拔的升高，稻种资源的株高变矮，叶片、谷粒变短，颖壳的颜色变深，且耐冷性提高（Xu and Wang, 1974）。

### **1.3.2** 高海拔低温对育性的影响

影响籼粳杂种小穗育性的因素有两类：一类因为是杂种，所以小穗育性较低，但是广亲和基因的发现和利用已经基本上克服了这一因素（严长杰等，2003）。另一因素是温度对杂种花粉育性的影响。低温可以使花药缩小（叶昌荣等，1996），降低雄配子的育性，导致小穗育性的降低。有研究表明，温度每下降1℃，亚种间杂种的花粉育性就下降约3.42个百分点，小穗育性降低约6.74个百分点（吕川根等，2002）。常规品种、品种间及亚种间杂种的花粉育性与日平均气温、最高气温和最低气温等外界条件都呈显著或极显著正相关。其中亚种间杂种的正相关性最大，这说明，亚种间杂种的花粉育性较易受到温度的影响（杨杰等，2003）。例如，籼粳杂种亚优2号抽穗期时，若日平均气温在28-30℃时，小穗育性达到90%，但日平均气温若低于24℃，小穗育性会显著下降（Lu *et al*., 1999）。在花粉母细胞减数分裂期时，若日平均气温低于22-23℃，花粉育性会显著降低，且不同材料之间的的花粉育性存在明显的差异（杨杰等，2003）。Li 等（1997）除了田间试验之外，还利用RFLP标记分析了温度与育性的关系，指出，等位基因的互作可以导致低温条件下杂种的不育性。低温除了可以影响四分孢子时期小孢子的分化和发育，还可以使绒毡层细胞膨大，导致花药不开裂或开裂程度不良，最终导致受精效果不好，受精率降低（Satake, 1991; Satake and Shibata, 1992; Lu *et al.,* 1999; 吕川根等, 2002;王玉锋等, 2010）。

由于低温降低了小穗育性和花粉育性，最终导致产量的降低。虽然云南地方品种小花谷、小麻谷等的耐冷性极强，但其植株高大，株型披散，产量低等因素，在生产生很难应用（戴陆园等，

1999；曾亚文等，2000）。低温造成稻谷减产的主要因素是其花药器官受到损害，导致不结实（Hayase

*et al.,*1969），但对雌性生殖器官不产生影响（李太贵，1988）。

### **1.3.3** 低海拔高温对育性的影响

1973年，石明松发现了水稻光温敏核不育系，此后温度对水稻的影响得到了广大研究者的重视。1977年，云南建水遇到高温天气，使两种滇Ⅰ型粳稻不育系的育性发生了恢复现象，而后师常俊又对不同海拔地区的滇型细胞质雄性不育系进行育性研究，发现在低海拔地区的不育系可以散粉，并部分出现自交结实现象，但在高海拔地区的不育系不育性稳定。以上事例都说明，高温可能会引起不育系育性的恢复。随后在1988年，蒋义明系统的将滇Ⅰ型和野败型的不育系进行研究，发现染败花粉率、花粉颜色与温度有关，温度越高，深染的花粉就越多。另外，通过对滇Ⅰ

型粳稻的温度和海拔的研究发现，当海拔不断升高时，温度降低，典败花粉率会增加而圆败花粉率降低，而染败却没有明显的变化。同样，典败和圆败败育率都因温度的不同而有所不同（徐津等，2005；王石华等，2009）

近年来，随着全球“温室效应”的不断加剧，地表温度不断升高，许多国家和地区的高温已经成为影响水稻生长发育的因素之一（夏明元和戚华雄，2004），水稻的高温胁迫对开花后1-5天尤为突出，进而对结实率产生较为严重的影响（盛婧等，2007），当温度超过35℃时，极易导致颖花不育，花粉活性降低（Matsui *et al.,*1997; Jagadish *et a1.,* 2007; 陈仁天等, 2012）。研究表明，花粉活性、花药长度、花药基部的开裂程度等都是水稻耐高温胁迫的重要表型指标，而热激蛋白的表达，花药的抗氧化能力，维持结构蛋白和酶的稳定性都是增强柱头及柱头上花粉粒耐高温胁迫的重要生理指标（陈仁天等，2012）。Jagadish等（2010）的研究表明，短期高温（1-2h）并不会导致柱头长度发生变化(Jagadish *et a1.,*2010)，但Rang等（2011）的研究却表示，若开花前一天承受38℃的高温，那次日开花时会导致花药开裂不良，花粉粒数量减少，受精率降低，而且研究指出，高温胁迫对颖花受精率的影响具有积累效应。高过水稻可承受的临界值的温度可导致水稻生育期缩短，其中，夜间温度的增加是导致水稻产量降低的主要原因（(Peng *et a1.,* 2004; Sheehy *et a1.,* 2005)，据估计，到21世纪末，水稻产量将下降41%（Ceccarelli *et a1.,* 2010）。国际水稻研究所（IRRI）以高温胁迫前后小穗育性比值为指标，筛选了一批耐热性强的水稻品种。此外，李太贵（1995）也针对来自不同省份的水稻品种进行耐热性研究，发现只有来自于浙江、江西等易发生高温热害地区的品种可以结实，其余的均在苗期就已经死亡或未发生结实现象。这说明，浙江等高温地区的水稻在长期的进化过程中已经形成了适应高温胁迫的特性。

一般来说，高温导致的颖花不育在不同亚种间存在差异。根据亚洲栽培稻的起源得知，籼稻比粳稻更耐高温。一般而言，温度增加的幅度越大，颖花的不育率越严重（Sheehy *et a1.,* 2005）。高温导致的不育是因为高温降低了花粉粒的膨胀能力，使花粉囊鞘开裂不良。虽然花粉粒从外观上仍然是圆形，但绒毡层功能已经发生了变化，花粉在柱头上的吸附力下降，影响花粉的萌发能力(Endo *et a1.,* 2009)。而花粉在极端高温的情况下，仅需10分钟，就会丧失萌发的能力（Jagadish *et a1.,* 2007）。而利用基因芯片技术的研究指出，高温可以导致花器官内各类激素比例的变化，影响光合产物的生成以向籽粒的传送，使花器官失去吸引碳水化合物的能力，导致淀粉和糖的合成酶活性的下降(Endo *et a1.,* 2009; Shah *et a1.,* 2011)。并且在抽穗期，高温胁迫下，与光合作用的相关蛋白、能量蛋白及代谢类蛋白的表达量均下降（周伟辉等，2011）。

综上所述，无论是高温还是低温，都会对水稻品种的花药、不同生殖时期产生一定的影响。

### **1.3.4** 海拔对配子体的影响

在生物的整个生活史中，双亲产生配子的过程及配子结合之前，环境条件都对其产生一定的作用，只有适应于该条件的配子才能产生合子。配子体通过对不同基因型的选择和淘汰，产生新的孢子体，从而影响新的基因型的频率，进而影响群体的遗传多样性及遗传分化。早在20 世纪

20年代就有了关于配子体选择的报道（Jones, 1920）。目前研究较多的关于配子体选择的方面有：自交配子体不亲和性（Brink and Cooper, 1938）、玉米不正常分离的配子体因子及种间杂交回交后代某亲本基因型的消除等(Nelson,1952, 1962)。

由于雄配子体的数量要比雌配子体多，且易受环境条件影响，因此，越来越多的学者将研究

的重点放在了雄配子上。1982年和1985年的两次国际会议上都提到了雄配子选择（Mulcahy and

Mulcahy,1986）。而雄配子是导致分离群体出现偏分离的主要因素之一，因此，研究雄配子的选择可以为研究遗传分化、演变和生物多样性提供一定的参考价值，被认为是生命进化的动力(Harushima *et al*., 2001). Nevo利用同工酶、RAPD和SSR标记对雄配子选择进行研究，发现遗传分化不是随机的，是适应环境条件的产物，而温度是一个核心因素（Nevo, 2001）。

不同生态环境下的雄配子选择是导致籼粳杂种发生分化的重要原因（王象坤和张居中，1998；曾亚文等，2001），这种选择可以引起籼、粳群体中基因型频率的差异，导致不同基因型在不同生态条件下的繁殖速度及死亡率的差异（杨忠义，2007）。此外，温度还可以影响雄配子参与受精的成功率（Young and Stanton,1990）。

## **1.4** 遗传分离与遗传分化研究

### **1.4.1** 影响遗传分离的因素

遗传分离是生物界普遍存在的现象，遗传分离受到内部遗传因子和外界环境的双重影响。遗传偏分离是指观察到的基因型偏离孟德尔分离定律的一种分离方式，由于它不符合分离定律，所以无法用传统的遗传理论和方法进行分析（Lu *et al.,*2002）。偏分离可以增加群体中杂合等位基因或异型染色体的频率，是生物进化过程中的一种强而有力的动力（宋宪亮等，2006；刘海燕等，

2009）。目前在多种动植物中均发现了遗传偏分离的现象。植物中偏分离的比例、程度、来源、遗传效应等因物种、群体类型、杂交组合、标记类型的不同而产生变化（宋宪亮等，2006）。1926年，Mangelsdorf和Jones在玉米中首次发现偏分离，随后研究发现，植物中的偏分离可能发生在花粉或胚囊或同时发生在两者中（Camero and Moav, 1957; Scoles and Kibirge-Sebuny, 1983; Rick，

1966）。目前，在水稻（(Harushima *et al.,* 1996; Xu *et al.,*1997; Matsushita *et al.*, 2003)、玉米（Lu *et al.,* 2002; Sibov *et al.,* 2003）、大麦(Konishi *et al.,* 1992)等多种植物中报道了植物偏分离。

影响偏分离的因素分内因和外因两种，内在因素主要根据作用时间分成配子选择和合子选择，分别在受精前和受精后进行。受精前通过影响配子的比例间接影响合子的基因型比例，而受精后则直接影响合子的基因型比例(Perfegtti and Pascual,1996)。目前已经在多数作物的不同类型群体中发现偏分离的现象，并且多数报道均表明，偏分离的热点区域与配子体选择有关（Brumme *et al.,*1993; Kesseli *et al.,* 1994; 张帆等, 2006;刘刚等, 2007）。玉米F2群体分子标记偏分离研究发现在9条染色体上有14个偏分离的热点区域（严建兵等，2003）。在水稻中已经定位了11个导致

偏分离的配子体基因（*ga*）和20个杂种不育基因（*S*）（Kinoshi, 1991）。彭勇等（2006）利用日本

晴与培矮64杂交的F1代构建了含有92个微卫星标记的遗传图谱，发现有9个偏分离热点区域，

并发现其中的4个区域中有3个配子体基因和2个杂种不育基因，认为这些区域中标记的偏分离可能是由配子体选择及杂种不育基因所导致。多数研究认为，偏分离的标记多偏向于父本，并认为偏分离是由雄配子选择所引起（Xu *et al.,*1997）。此外，细胞质基因组也可以导致偏分离的发生

（Luning *et al.,*1985）。此后，对细胞质效应与遗传偏分离的研究均显示，细胞质效应可对遗传分离产生一定的影响。细胞质产生的影响与配子体具有密切关系。而雄配子可以遗传偏分离的发生。目前在玉米、水稻及小麦等作物中均发现偏分离现象，很多遗传标记在正反交群体间均存在明显

差异（Manabe *et al.,* 1999; Goloenko *et al.,* 2002; Wang *et al.,*2009; 王昌江等, 2011）。近些年随着分子生物学的发展完善，利用分子标记技术对植物偏分离的研究日益增加。Lorieux等（1995）的研究表明，偏分离位点的选择作用对共显性标记间重组率估计的影响小于显性标记。刘峰等（2000）利用4种不同类型非分子标记对大豆的重组自交系进行偏分离研究，结果表明，RAPD所检出的偏分离频率比AFLP的偏分离频率要高出1倍。

影响偏分离的外在因素主要是环境条件。1968年Mange等人对果蝇进行低温和高温处理，并设置室温对照，结果表明，低温和高温处理过的果蝇在R-206位点的传递比例降低，且低于对照，但SD-72位点的传递比例仅在低温处理后降低，而高温和对照无明显差异（Mange, 1968）。

Zamir等（1982）也同样利用番茄证明，温度的变化可以导致遗传偏分离的发生，并证明番茄花粉对低温的表现差异是配子选择的结果。姚焱（2003）等利用低温影响水稻籼粳杂种构建的DH群体，发现低温明显增强了偏分离的趋势。王石华等（2009）对产生于不同海拔的相同群体进行偏分离的研究，发现在不同海拔的群体间，偏分离存在差异。张云等（2010）对不同水稻F2代和测交群体进行高、低温处理，结果发现，温度对F1代雄配子基因型具有选择偏爱。

### **1.4.2** 遗传偏分离与遗传分化的关系

遗传分离的发生与海拔和细胞质存在密切关系，那么不同细胞质背景产生的群体在不同生态区的表现有所不同，存在不同程度的遗传多样性。徐云碧等（1995）利用54个RFLP标记对籼稻细胞质背景的群体进行多样性的分析，结果表明，在发生偏分离的26个标记中，有57.1%的标记偏向籼稻细胞质背景，而偏向粳稻细胞质背景的只有7%. Xiao等（1996）同样利用141个RFLP标记对籼粳稻不同细胞质背景的F2代群体进行偏分离的研究，发现有76.9%的标记偏向籼稻细胞质背景，23.1%的标记偏向粳稻细胞质。彭勇等（2006）和梁永书等（2007）分别利用SSR标记对培矮64与日本晴的重组自交系和F2代群体的偏分离研究，发现偏向籼稻细胞质背景的标记远远多于偏向粳稻细胞质背景的标记。说明分离群体在不同细胞质背景中的遗传分化与群体的遗传偏分离存在密切关系。Wang等（2009）利用16对SSR标记对不同海拔产生的籼粳交后代群体进行偏分离的研究，结果发现在籼稻细胞质背景下多数标记均偏离孟德尔定律。而且不同海拔产生的相同群体的遗传多样性较丰富（王石华，2009）。

## **1.5** 籼粳分化及其与海拔的关系

### **1.5.1** 亚洲栽培稻的起源

水稻所隶属的稻属包含22个种，其中含有两个栽培种-非洲栽培稻（*O. glaberrima* Steud）和亚洲栽培稻（*O. sativa* L.），其中，亚洲栽培稻的种植范围要大于非洲栽培稻（Chang, 1983）。目前一致观点认为亚洲栽培稻起源于亚洲热带及亚热带地区的野生稻。在不同的环境条件和人类的共同选择下，亚洲栽培稻具备了丰富的遗传多样性并出现了明显的遗传分化，产生了适合于不同生态环境种植的类型。

对于亚洲栽培稻的起源问题争议颇多，概括起来主要有三种学说：印度起源说、中国起源说

和喜玛拉雅ft东南麓起源说。目前，多数学者认为野生稻祖先(*O．rufipogon*)起源于喜马拉雅ft东南麓、唐古拉ftft脉和云贵高原，由于自然变异和生态地理的差异，在新石器时代人类稻作文化形成和产生以后，在人工选择参与下逐步演化为现今的亚洲栽培稻（姜国勇等，2002）。

### **1.5.2** 籼粳分化是亚洲栽培稻分化的主流

亚洲栽培稻在漫长的进化过程和人类选择中，已演化成具有丰富种质资源的物种，并分化成两个适应于不同气候条件的亚种-籼稻（*Indica*）和粳稻（*Japonica*）（丁颖, 1949;丁颖, 1957; Chang, 1976; Wang *et al.,*1992; Li and Rutger, 2000;段世华等, 2009）。其中，籼稻适应于热带及亚热带地区，而粳稻则适合于生长在温凉地区。籼粳稻的出现是历史进化上的重大事件。研究表明，关于

籼粳的遗传分化存在两种观点：一源论和二源论。一源论指出籼稻是由野生稻进化而来，而粳稻却是由籼稻进化而来，是人工驯化的结果（Chang, 1976; 1984; Oka, 1988）；二源论却认为，籼粳亚种是分别从野生稻进化而来，二者在进化上是平行的，是自然选择的结果（周拾禄，1948；

Second，1982；庄杰云等，1995；梁耀懋等，1997；孙传清，1997a；1997b）。虽然对一源论和二源论的支持都很多，但无论是哪种起源方式，归根结底，它们都来自共同的祖先。重要的是这两个亚种的分化是自然选择的结果还是人工驯化的结果。

目前对籼粳亚种的研究多集中在二者的鉴别上，1927年Kato利用籼粳稻的形态特征、杂交亲和性与血清反应作为籼粳鉴别的指标进行研究。目前应用较多的有形态指数鉴别法、同工酶鉴别法及分子标记鉴别法。

程侃声建立的程氏形态指数分类法，是以6个性状为分类指标，经数字量化后分为籼、偏籼、

偏粳和粳型4类（程侃声, 1984, 1985, 1993; Cheng, 1985）。该法既符合以综合性状区分的原则，又去除很多不必要的干扰，所以已成为我国广泛采用的籼粳形态分类法。但该法的应用也存在一定的难度，一是形态性状易受环境影响，二是等级的划分主要依靠经验判断，掌握该方法则具有一定难度，所以该法不易推广（张尧忠等，1998）。

自上世纪60年代找到了对籼粳稻具有特异性的过氧化物酶等位基因，就开始利用同工酶来研

究籼粳分化。目前有6个同工酶位点常用于水稻籼粳鉴别（Second, 1982; Morishima, 1987;汤陵华, 1991）。在对籼型和粳型品种的研究中发现某些酯酶同工酶特征带，并已确认10A为粳型标志酶带，11A是籼型标志酶带（张尧忠等，1994; 1996）。

近些年来由于分子生物学技术的发展，利用DNA分子标记技术鉴别籼粳亚种的研究逐渐增多。DNA分子标记技术具有遗传稳定、多态性高、数量多及不易受环境影响等特点。该鉴别法是直接对基因组操作，所以克服了传统分类法的缺点。目前应用较多的鉴别籼粳类型的分子标记有

SSR、RAPD、AFLP、RFLP等。孙传清（1997）用48个探针对籼、粳稻、偏籼、偏粳稻、育成品种及地方品种等进行研究，筛选出15个籼粳特异性探针，这些探针判别籼粳的准确率在83%-97%之间。Yu等（1994）用42个引物对13个水稻和陆稻品种进行了RAPD分析，证明应用

RAPD标记可以有效地鉴别不同水稻品种间的遗传关系。龙雯虹等（2003）以滇型杂交稻不育系、保持系和恢复系为材料，研究了亲本材料的RAPD籼粳分化程度与杂种优势的关系，发现RAPD技术能鉴别亲本籼粳差异。目前应用较多的SSR标记属于共显性标记。Akagi等（1996）利用高度多变的含（AT）n的17个微卫星标记，成功区分了59个亲缘关系极近的粳稻品种。樊叶扬（2000）

等用SSR标记鉴别水稻的籼粳亚种，发现了36个标记可以区分籼粳亚种，并找到了分布于12条染色体21个籼粳特异性微卫星标记。朱作峰在2001年利用20对SSR标记对籼粳品种进行研究，发现标记RM226, RM50、RM234、RM240、RM242可用于栽培稻籼粳分化鉴别，其籼粳分辨率均在90％以上。张建勇等（2005）采用123对多态性SSR标记对93份材料进行分析表明，所有的供试材料可以分为籼稻群和粳稻群，具有非常高的分辨效果。

籼粳分化在分子水平上的差异不仅表现于细胞核DNA上，在mtDNA、cpDNA上也有差异，这些差异也可用于水稻籼粳亚种间的分类。研究发现，在同一细胞质中，若其线粒体为籼型，其叶绿体既可能是籼型，也可能是粳型；若线粒体为粳型，则其叶绿体只能是粳型（孙传清等，1998）。张武汉等（2007）发现非AA型野生稻的叶绿体DNA存在籼粳分化现象，4个位点的籼粳分类标记中，3个位点与粳型标记一致，呈现偏粳趋势，但与典型粳稻存在一定遗传差异。

### **1.5.3** 籼粳亚种对海拔的适应性

近年来，对籼粳亚种的研究热点逐渐转移到利用分子标记评价水稻种质资源的遗传多样性等方面。籼粳亚种的遗传多样性随海拔的升高而降低（Nagamine *et al.,* 1992; Sun *et al.,* 1994; Liu *et al.，*

1995）。所以对于籼粳亚种在不同海拔的表现的相关研究也较多。朱作峰等（2002）用30对SSR引物比较了52份不同生态型的栽培稻和34份不同省区的普通野生稻的遗传多样性，通过聚类分析认为SSR标记既能将栽培稻和野生稻分开，又能较好地进行籼粳稻的分类。中国以及东南亚地区的多个栽培稻品种的同工酶基因位点的多态性及遗传分化程度与地理分布有密切关系（黄燕红等，2003, 2005）。刘炜等（2005）利用SSR标记对不同生态类型的粳稻品种进行遗传多样性的研究，并基本上将不同生态类型的材料分开。

云南地势复杂，垂直海拔差异大，地理气候较为多样。这种多样的地理气候造就了云南稻种资源的丰富多样性（Sun *et al.,* 1996; 曾亚文等, 2001）。云南的籼粳亚种数量各半，但粳稻的平均遗传多样性要大于籼稻（李自超等，2001）。寇姝燕等（2009）对云南地方老品种进行遗传多样性的研究表明，云南地方籼稻的遗传多样性要高于云南地方粳稻及光壳稻，且籼稻与粳稻、光壳稻间的分化要大于粳稻与光壳稻间的分化。综上所述，采用不同的籼、粳稻材料，对研究结果有较大影响。

## 1.6 本研究目的、意义

水稻是我国重要的粮食作物，也是分子生物学研究的重要模式植物，海拔的差异所导致的温度变异是导致籼粳分化的因素之一，由于二者的生长环境不同，导致其表型、生理生化及DNA水平上均出现不同，产生一定的差异。

（1）本研究利用*Rf-1A*位点上的特异标记68923-8，分析恢复基因在野生稻、籼稻和粳稻种质中的序列变异。

（2）利用不同细胞质背景的材料在不同海拔产生群体的小穗育性进行研究，分析海拔和细胞质对小穗育性的影响。

（3）对不同细胞质背景的材料在不同海拔产生群体的*Rf-1*位点进行研究，分析海拔和细胞质对该恢复基因位点的基因型频率及遗传分化的影响。

本研究可以为恢复基因与水稻进化的关系提供参考，为选育适于不同海拔的杂交水稻恢复系的育种提供参考，可以对以温度变化为主的环境因素对水稻的恢复基因频率产生的影响的相关研究提供参考。

# 第二章 不同类型水稻***Rf-1***位点**PCR**片段的序列分析

水稻育性恢复基因（restorer fertility gene*, Rf*）是杂种优势利用的关键基因，且籼稻中具有*Rf*基因，而粳稻中却没有*Rf*基因的存在（shinjyo, 1975;李铮友, 1980）。*Rf-1*是水稻上第一个被克隆的恢复基因（Komori *et al.,* 2004），海拔可以影响群体在该位点上的遗传结构，且在籼稻细胞质背景下影响较大（王石华，2009）。籼、粳稻适合种植的气候条件不同，而籼稻又来源于野生稻，所以，研究野生稻、籼稻及粳稻三者在*Rf-1*位点上的遗传变异可为籼粳分化的研究提供一定的参考价值。本研究利用*Rf-1*位点上的特异性标记对来源不同的野生稻，籼稻、粳稻的恢复系及常规品种进行PCR序列的分析。

## **2.1** 材料与方法

### **2.1.1** 供试材料

供试材料为来源不同的野生稻、籼稻及粳稻，共计23份。其中，野生稻5份（含2份国外野

生稻和3份国内野生稻），籼稻8份（含2份野败型优良恢复系，1份红莲型优良恢复系以及 5

份常规品种），粳稻10份（含滇Ⅰ型和BT型优良恢复系各1份，来自韩国的1份恢复系材以及7份常规品种）（表2-1）。

### **2.1.2** 方法

#### **2.1.2.1** **DNA**提取

采用改良的CTAB法（Murray and Thompson, 1980）提取水稻总DNA，具体方法见下：

（1）取约0.5 g嫩叶放入到1.5 mL离心管中，加入液氮并快速研磨成粉末状，后加入2×CTAB缓冲液700L，放入65℃水浴锅中1h，每隔20min混匀一次。

（2）取出离心管，12000rpm，10min。取上清液至1.5 mL新离心管。

（3）在上清液中加入700L氯仿异戊醇混合液（三氯甲烷：异戊醇=24: 1），颠倒混匀至分层明显。12000 rpm, 10 min，取600l上清液移至1.5 mL新离心管。

（4）重复步骤3。

（5）在上清液中加入等体积预冷的异丙醇。将离心管轻轻颠倒混匀约1 min后，-20℃冰箱中过夜沉降。

（6）取出后12000 rpm, 10 min。弃上清液，用70%乙醇洗涤后再用无水乙醇洗涤。

（7）风干后，加100L已灭菌的双蒸水，现用或-20℃冰箱保存。

#### **2.1.2.2** **PCR**扩增

表2-1 供试材料

Tab. 2-1 Materials used in research

| 编号  No. | 名称  Name | 类型  Type | 来源  Source |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 缅甸野生稻  Burma wild rice | 普通野生稻  O. rufipogon. Griff | 缅甸  Burma |
| 2 | 尼泊尔野生稻  Nepal wild rice | 普通野生稻  O. rufipogon. Griff | 尼泊尔  Nepal |
| 3 | 元江野生稻  Yuanjiang wild rice | 普通野生稻  O. rufipogon. Griff | 中国，云南  Yunnan, China |
| 4 | 景洪野生稻  Jinghong wild rice | 普通野生稻  O. rufipogon. Griff | 中国，云南  Yunnan, China |
| 5 | 东乡野生稻  Dongxiang wild rice | 普通野生稻  O. rufipogon. Griff | 中国，江西  Jiangxi, China |
| 6 | IR24 | 籼稻 野败型恢复系  Indica WA-Restorer Line | 国际水稻所  IRRI |
| 7 | 明恢 63  Minghui63 | 籼稻 野败型恢复系  Indica WA-Restorer Line | 中国，福建  China |
| 8 | 93-11 | 籼稻 红莲型恢复系  Indica HL-Restorer Line | 中国，江苏  Jiangsu, China |
| 9 | IR58025 | 籼稻 常规品种  Indica conventional variety | 国际水稻所  IRRI |
| 10 | 巴-1  Ba-1 | 籼稻 常规品种  Indica conventional variety | 巴基斯坦  Pakistan |
| 11 | 滇黎 401  Dianli401 | 籼稻 常规品种  Indica conventional variety | 中国，云南  Yunnan, China |
| 12 | 月亮谷  Yuelianggu | 籼稻 常规品种  Indica conventional variety | 中国，云南  Yunnan, China |
| 13 | 天杂 57  Tianza57 | 籼稻 常规品种  Indica conventional variety | 中国，云南  Yunnan, China |
| 14 | 南 34  Nan34 | 粳稻 滇Ⅰ型恢复系  Japonica Dian typeⅠ-Restorer Line | 中国，云南  Yunnan, China |
| 15 | C418 | 粳稻 BT 型恢复系  Japonica BT-Restorer Line | 中国，辽宁  Liaoning, China |
| 16 | Ansanbyeo | 粳稻 滇Ⅰ型恢复系  Japonica Dian typeⅠ-Restorer Line | 韩国  Korea |
| 17 | Krepish | 粳稻 常规品种  Japonica conventional variety | 俄罗斯  Russia |
| 18 | 意 4388  Yi4388 | 粳稻 常规品种  Japonica conventional variety | 意大利  Italy |
| 19 | 江苏 408  Jiangsu408 | 粳稻 常规品种  Japonica conventional variety | 中国，江苏  Jiangsu, China |
| 20 | 辽粳 454  Liaojing454 | 粳稻 常规品种  Japonica conventional variety | 中国，辽宁  Liaoning, China |
| 21 | 楚粳 28  Chujing28 | 粳稻 常规品种  Japonica conventional variety | 中国，云南  Yunnan, China |
| 22 | 丽粳 13  Lijing13 | 粳稻 常规品种  Japonica conventional variety | 中国，云南  Yunnan, China |
| 23 | 小花谷  Xiaohuagu | 粳稻 常规品种  Japonica conventional variety | 中国，云南  Yunnan, China |

PCR扩增所使用的引物为*Rf-1*位点上的InDel标记，标记序列及其他参数见表2-2(Akagi *et al.,* 2004)。PCR反应体系为20L（表2-3）。在Apploed Biosystems 2720 Thermal Cycler PCR仪上进行扩增。68923-8的反应程序：94℃预变性5 min；94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸2min，

36个循环；72℃延伸15 min。在1×TAE缓冲液中利用1.5%琼脂糖凝胶电泳，分析PCR扩增产物。

表2-2 分子标记引物序列

Tab. 2-2 Sequences of molecular markers

| 标记  Marker | 染色体  Chromosome | 退火温度  Tm(℃) | 正向引物  Forward primer(5‟- 3‟) | 反向引物  Reversed primer(5‟- 3‟) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 68923-8 | 10 | 55 | tccctcctctaataggactg | ggtgtcgtataccactgtca |

表2-3 PCR反应体系

Tab. 2-3 PCR reaction system

| 反应组分  Component | 反应体积  Volume(L) |
| --- | --- |
| Master mix | 10 |
| Primer F | 1 |
| Primer R | 1 |
| DNA 模板 | 1 |
| ddH2O | 7 |
| 总计 | 20 |

#### **2.1.2.3** **PCR**片段回收

用浓度为1.5％的琼脂糖凝胶检测PCR产物，利用上海生工的琼脂糖凝胶DNA回收胶试剂盒对目的DNA片段进行回收。具体操作步骤如下：

（1）琼脂糖凝胶电泳分离PCR扩增产物，新鲜的1×TAE Buffer 作为电泳缓冲液。

（2）当所需DNA片段完全分离时，转移凝胶至紫外灯下，尽可能快的把所需的DNA片段切下来。注：切胶时尽量把多余的凝胶切去，DNA曝露在紫外灯下不超过30s。

（3）将含有目的DNA片段的琼脂糖凝胶块切下，放入1.5ml离心管中，称重得出凝胶块的重量，凝胶块的体积可以近似等于其重量，近似确定其体积。根据凝胶块的重量和体积，按每100mg琼脂糖（如胶块不足100mg则用水补充至100mg）加300-600l的比例加入Buffer B2, 50℃水浴5-10min，间或混匀，直至胶块完全融化。

（4）当目的片段<500bp时，加入所使用的Buffer B2体积1/3的异丙醇，混匀。当目的片段≥500bp时，此步骤可以省略，直接进行步骤5。由于本研究所有材料的目的片段均大于500bp，故省略此步骤。

（5）将融化好的溶液全部移入吸附柱，8000rpm，离心30s。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一收集管中。

（6）向吸附柱中加入500l Wash Solution，9000rpm，离心30s。倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一收集管中。

（7）重复步骤6一次。

（8）将空吸附柱和收集管放入离心机，9000rpm，离心1min。

（9）在吸附膜中加入15-40l Elution Buffer，室温静置1-2min, 9000 rpm，离心1min. 所得到的

DNA溶液置于-20℃保存或用于后续试验。

#### **2.1.2.4** 克隆、测序

（1）PCR扩增产物经胶回收试剂盒回收纯化后，连接到克隆载体*pEASYTM*–T1 Simple Cloning

Vector上。25℃反应15min。

表2-4 连接反应体系

Tab. 2-4 The system for Ligation

| 混合液名称 | 体积 |
| --- | --- |
| PCR 产物 | 4l |
| PEASYTM –T1 Simple Cloning Vector | 1l |

（2）在感受态细胞刚刚解冻时，每管连接产物中加入50l *Trans*1-T1感受态细胞中，旋转混匀，冰上放置25min。

（3）将冰浴后的混合液放入42℃的水浴锅中90s，不要摇动。而后快速将管转移至冰上放置2min。

（4）每管转化产物中加800l的LB（不含Amp）液体培养液，37℃，200rpm/min振荡培养1小时。

（5）取出培养的转化产物，4000 rpm，离心1min，倒掉上清液直到管中余留约150μL，而后在每管中加入8l的IPTG (4mg·mL -1)和40l的x-gal ( 20mg·mL -1))，混匀后涂板，37℃培养12h-16h。

（6）对过夜培养的菌斑进行蓝白斑的筛选。每个材料挑取10个白色菌斑分别转移至10管500l

的LB（含氨苄）液体培养基中，180rpm，37℃，摇菌过夜。

（7）以菌液为模板，利用M13通用引物进行PCR检测，每个材料选取5个含有目的片段的菌液送测序。

#### **2.1.2.5** 序列分析

在NCBI网站上进行序列的同源性比对。另外利用DNAMAN对每个材料的5个测序序列进行比对，结合NCBI上的比对结果，选取差异最小的序列做为与其他材料比对的序列。而后利用在线软件MultAlin（[http: //multalin. toulouse. inra. fr/multalin/multalin. html](http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html)）分析序列间的碱基变异

（Corpet, 1988）。另外在Clustal X 1.8中进行全部序列的比对，以比对后的. aln格式文件为基础，在MEGA 4.0中计算变异位点和遗传距离，并采用类平均法（UPGMA）法构建系统发育树，置信

度用自举检验法（bootstrap）检验，共进行1000次循环，以评价分支图的可靠性。遗传距离的计算是建立在遗传一致性的基础之上.

遗传一致性为：*I**xi yi* /(*xi* *yi* )，

2 2 1/ 2

其中*x*i是x群体i等级的频率，*y*i是y群体i等级的频率。遗传距离D=-Ln*I*

## **2.2** 结果与分析

### **2.2.1** 野**Th**稻、籼稻及粳稻的**PCR**标记**68923-8**的基因型

恢复基因*Rf-1*位点特异PCR引物68923-8对供试材料基因型分析揭示，野生稻、籼稻材料（恢复系及常规品种）具有大小约为1900bp的片段；粳稻材料出现两种带型：粳稻恢复系的带型与野生稻和籼稻带型一致，而常规品种具有的片段大小约为1300bp（图2-1）。

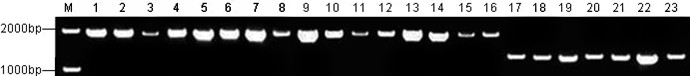


图2-1 供试材料的*Rf-1*位点68923-8片段的基因型

注：泳道M: Marker2000；1-5泳道为野生稻（1: 缅甸野生稻，2：尼泊尔野生稻，3：元江野生稻，

4: 景洪野生稻，5： 东乡野生稻）；6-8泳道为籼稻恢复系（6: IR24, 7: 明恢63, 8: 93-11）；9-13泳道为籼稻常规品种（9: IR58025, 10:巴-1, 11:滇黎401, 12:月亮谷，13：天杂57）；14-16泳道为粳稻恢复系（14:南34, 15: C418, 16: Ansanbyeo）；17-23泳道为粳稻常规品种（17: Krepish, 18:意4388, 19:江苏408, 20:辽粳454, 21:楚粳28, 22:丽粳13, 23:小花谷）

Fig. 2-1 Genotype of 68923-8 fragment of materials on*Rf-1* locus

Note: Lane M: Marker 2000; Lanes 1-5 are wild rice(1: Burma wild rice, 2: Nepal wild rice, 3: Yuanjiang wild rice, 4: Jinghong wild rice, 5: Dongxiang wild rice); Lane 6-8 are indica restorers(6: IR24, 7: Minghui63, 8:93-11); Lane 9-13 are indica conventional variety (9: IR58025, 10: Ba-1, 11: Dianli401, 12: Yuelianggu, 13: Tianza57); Lanes 14-16 are japonica restorers(14: Nan34, 15: C418, 16: Ansanbyeo); Lanes 17-23 are japonica conventional variety ( 17: Krepish, 18: Yi4388, 19: Jiangsu408, 20: Liaojing454, 21: Chujing28, 22: Lijing13, 23: Xiaohuagu)

### **2.2.2** 不同类型水稻种质***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列

#### **2.2.2.1** **野Th**稻种质***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列

序列比对发现，在*Rf-1*位点不同野生稻的68923-8片段存在84bp的碱基替换，其中有57个位点为转换（A/G或C/T）位点，颠换位点有26个，转换/颠换值为2.19。另外在1087bp处，出现A/C/T三种碱基替换，元江野生稻为A，东乡野生稻为T，尼泊尔、景洪和缅甸野生稻均为 C

（附图1）。依据*Rf-1*位点68923-8片段的序列分析，不同来源的野生稻间的遗传距离变化较小。

有意思的是来自国内的云南景洪野生稻与尼泊尔野生稻的距离最近，为0.0018；而同是来源于国内的云南元江野生稻与江西东乡野生稻间的遗传距离最远，达到0.0297（表2-5）。

#### **2.2.2.2** 恢复系种质***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列

在*Rf-1*位点上，三个籼稻恢复系间共存在130bp的碱基替换，其中，转换位点有76bp，颠换位点有54bp，二者比值为1.41。此外，在1112bp处，IR24插入碱基A, 1724bp处IR24缺失碱基T（附图1）。而根据该位点的序列差异分析，不同来源的籼稻恢复系间的遗传距离变化范围较小。其中，野败型恢复系明恢63与红莲型恢复系93-11的遗传距离最近，为0，反而与另一个野败型恢复系IR24的距离最远，达到0.0822（表2-5）。

粳稻恢复系间共存在159bp的碱基替换，其中80bp为转换，78bp为颠换，二者比值为1.03，此外在1517bp处南34为T, C418为G，Ansanbyeo为C。另外，Ansanbyeo在754bp处插入碱基G, 793bp处插入碱基A, 860bp处缺失碱基A, 906bp处缺失碱基G, 1000bp处缺失碱基T，

1013bp处缺失碱基A，1047bp-1048bp处缺失片段TG, 1061bp处缺失碱基T, 1092bp处缺失碱基T, 1154bp处缺失碱基G, 1485bp处缺失碱基G；C418在1148bp处缺失碱基T（附图1）。另外，根据不同来源的三个粳稻恢复系间的序列分析发现，滇Ⅰ型恢复系南34与BT型恢复系C418的遗传距离变化最近，为0.0115，而两个滇Ⅰ型恢复系C418和Ansanbyeo的距离最远，达到0.1083

（表2-5）。

#### **2.2.2.3** 常规品系（种）种质***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列

不同来源的五个籼稻常规品种间共存在95bp的碱基替换，其中，转换位点有50bp，颠换位点有45bp，二者比值为1.11。此外，天杂57和月亮谷在906bp处均缺失碱基G；天杂57在793bp处插入碱基T，在952bp处缺失碱基T；月亮谷在793bp处插入碱基A，在937bp处插入碱基G。

（附图1）。而根据*Rf-1*位点上不同籼稻恢复系间的遗传距离分析发现，国外的两个常规品种巴-1与IR58025间的距离最近，为0，而巴-1与IR58025与滇黎401的距离却最远，为0.0306（表2-5）。

粳稻常规品种间共存在79bp的碱基替换，其中，转换位点有20bp，颠换位点有51bp，二者比值为0.39，其余的8个位点上，均出现两种以上的碱基变化。另外，在100bp处意4388插入碱基T；辽粳454在1727bp处缺失碱基A，1784bp-1786bp处缺失片段CAA, 1800bp-1801bp处缺失片段AT（附图1）。根据不同来源的粳稻常规品种间的序列分析发现，来自俄国的Krepish与国内品种小花谷遗传距离最近，为0，而二者与辽粳454的距离最远，达到0.1022（表2-5）。

### **2.2.3** 不同类型水稻种质间***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列差异

#### **2.2.3.1** **野Th**稻与恢复系间***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列差异

对野生稻和籼稻恢复系间的序列进行比对分析发现，野生稻与籼稻恢复系间存在2bp的碱基替换，965bp处野生稻为G，籼稻恢复系为A, 968bp处野生稻为A，籼稻恢复系为G（图2-2：

A）。以野生稻和籼稻恢复系间的序列分析为依据发现，景洪野生稻与籼稻恢复系明恢63、93-11

的距离为0.0279，缅甸野生稻和元江野生稻与野败型恢复系IR24的遗传距离达到0.0607（表2-5）。

野生稻与粳稻恢复系间仅存在13bp的碱基替换，138bp处野生稻为G，粳稻恢复系为A，

387bp处野生稻为C，粳稻恢复系为T, 388bp处野生稻为C，粳稻恢复系为G, 431bp处野生稻为G，粳稻恢复系为A, 439bp处野生稻为T，粳稻恢复系为A, 443bp处野生稻为G，粳稻恢复系为A, 452bp处野生稻为T，粳稻恢复系G, 758bp处野生稻为T，粳稻恢复系为C, 764bp处野生稻为G，粳稻恢复系为T, 769bp处野生稻为C，粳稻恢复系为A, 786bp处野生稻为C，粳稻恢复系为T, 965bp处野生稻为G，粳稻恢复系为A, 968bp处野生稻为A，粳稻恢复系为G，其中转换位点有8个，颠换位点有5个，二者比值为1.6 (图2-2: B)。而根据野生稻和粳稻恢复系间的序列分析发现，景洪野生稻与粳稻恢复系南34的距离最近，为0.0179，缅甸野生稻与粳稻恢复系Ansanbyeo的遗传距离最远，为0.1009（表2-5）。结果表明，野生稻与籼稻恢复系间的序列差异较小，而与粳稻恢复系间的差异较大。

#### **2.2.3.2** 野Th稻与常规品系（种）间***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列差异

在相同位点上，若不同来源的野生稻碱基一致，籼稻常规品种的碱基也一致时，野生稻与籼稻常规品种之间没有碱基的替换以及片段的插入/缺失（附图1）。根据野生稻和籼稻常规品种的序列分析发现，来自国内的云南景洪野生稻与云南的籼稻常规品种滇黎401 间的距离最近，为

0.0027，而缅甸野生稻与巴-1和IR58025间的距离最远，为0.0362（表2-5）。

野生稻与粳稻常规品种间只有6个位点存在碱基替换，在227bp处野生稻为A，粳稻常规品种为G, 852bp处野生稻为C，粳稻常规品种为T, 859bp处野生稻为A，粳稻常规品种为G, 964bp处野生稻为C，粳稻常规品种为T, 985bp处野生稻为T，粳稻常规品种为A, 1348bp处野生稻为

G，粳稻常规品种为A，其中转换位点有5bp，颠换位点有1bp，比值为5。另外，在181bp处，野生稻插入碱基A（图2-2: C）。根据序列分析发现，云南的景洪野生稻与云南的粳稻常规种丽粳13的距离最近，为0.1004，而东乡野生稻与辽粳454的距离最远，为0.1617（表2-5）。结果表明，野生稻与籼稻常规品种间的序列差异要小于野生稻与粳稻常规品种的序列差异。

#### **2.2.3.3** 恢复系与常规品系（种）间***Rf-1***位点**68923-8**片段的序列差异

在相同位点上，若不同来源的籼稻恢复系碱基一致，粳稻恢复系的碱基也一致时，二者间没有碱基的替换以及片段的插入/缺失（附图1）。而在序列分析基础上发现，籼稻恢复系中的93-11及明恢63与粳稻恢复系C418的遗传距离最近，为0.0053，而籼稻恢复系明恢63、93-11与粳稻恢复系Ansanbyeo的距离最远，为0.1094（表2-5）。

籼稻恢复系与籼稻常规品种间序列比对发现，当籼稻恢复系在同一位点上碱基一致，籼稻常规品种在同一位点上碱基一致时，二者没有碱基的替换或片段的插入/缺失（附图1）。遗传距离的分析也表明，恢复系的明恢63、93-11与常规品种巴-1、IR58025的距离为0；恢复系IR24与常规品种巴-1和IR58025的距离最远，为0.0822（表2-5）。

籼稻恢复系与粳稻常规品种间的序列比对发现，二者间存在7bp的碱基替换，826bp处籼稻恢复系为A，粳稻常规品种为T；852bp处籼稻恢复系为C，粳稻常规品种为T, 859bp处籼稻恢复系为A，粳稻常规品种为G, 964bp处籼稻恢复系为C，粳稻常规品种为T, 965bp处籼稻恢复系为A，粳稻常规品种为G, 968bp处籼稻恢复系为G，粳稻常规品种为A, 985bp处籼稻恢复系

为T。粳稻常规品种为A，转换位点为5bp，颠换位点为2bp，二者比值为2.5。另外，粳稻常规品种在181bp处缺失碱基A（图2-2: D）。而遗传距离在0.1056-0.2089之间，籼稻恢复系93-11，明恢63与粳稻常规品种小花谷、Krepish的距离最小，为0.1056，而籼稻恢复系IR24与粳稻常规品种辽粳454的距离最大，为0.2089（表2-5）。

籼稻常规品种与粳稻常规品种间序列比对发现，二者间存在6bp的碱基替换，202bp处籼稻常规品种为C，粳稻常规品种为G, 826bp处籼稻常规品种为A，粳稻常规品种为T, 852bp处籼稻常规品种为C，粳稻常规品种为T, 859bp处籼稻常规品种为A，粳稻常规品种为G, 964bp处籼稻常规品种为C，粳稻常规品种为T, 985bp处籼稻常规品种为T，粳稻常规品种为A，其中，转换位点3bp，颠换位点3bp，比值为1。另外，在181bp处，粳稻常规品种缺失碱基A（图2-2：

E）。籼、粳常规品种的遗传距离在0.1005-0.153之间，其中，籼稻常规品种天杂57与粳稻常规品种丽粳13的距离最近，为0.1005，而籼稻常规品种IR58025、巴-1与粳稻常规品种辽粳454的距离最远，达到0.153（表2-5）。

粳稻恢复系与粳稻常规品种二者间的序列比对发现，二者存在8bp的碱基替换，202bp处粳稻恢复系为C，粳稻常规品种为G, 826bp处粳稻恢复系为A，粳稻常规品种为T, 852bp处粳稻恢复系为C，粳稻常规品种为T, 859bp处粳稻恢复系为A，粳稻常规品种为G, 964bp处粳稻恢复系为C，粳稻常规品种为T, 965bp处粳稻恢复系为A，粳稻常规品种为G, 968bp处粳稻恢复系为G，粳稻常规品种为A, 984bp处粳稻恢复系为T，粳稻常规品种为A，其中转换位点5bp，颠换位点为3bp。另外，粳稻常规品种在181bp处缺失碱基A（图2-2: F）。遗传距离分析发现，来自国内辽宁的粳稻恢复系C418与云南的粳稻常规品种小花谷的遗传距离最小，为0.1066，而粳稻恢复系Ansanbyeo与粳稻常规品种辽粳454的距离最大，为0.2439（表2-5）。

粳稻恢复系与籼稻常规品种间的序列比对发现，二者不存在碱基的替换或序列的插入/缺失

（附图1）。遗传距离分析中，云南的粳稻恢复系C418与籼稻常规品种IR58025和巴-1的距离最小，为0.0053，韩国的粳稻恢复系Ansanbyeo与籼稻常规品种IR58025和巴-1的距离最远，为0.1094

（表2-5）。结果表明，籼稻恢复系与籼稻常规品种间的序列差异小于与粳稻常规品种间的序列差异，但粳稻恢复系与籼稻常规品种间的序列差异要小于与粳稻常规品种间的序列差异。





图2-2 不同类型水稻种质间68923-8片段的序列比对

Fig. 2-2 Sequence alignment of 68923-8 in different rice germplasm

云南农业大学博士学位论文第二章不同类型水稻*Rf-1*位点PCR片段的序列分析

表2-5 供试材料间的遗传距离

Tab. 2-5 Genetic distance between materials

|  | 缅甸  野生稻 | 元江  野生稻 | 尼泊尔  野生稻 | 景洪  野生稻 | 东乡  野生稻 | 9311 | 明恢  63 | IR24 | 月亮谷 | 天杂  57 | 滇黎  401 | 巴-1 | IR58025 | 南 34 | C418 | Ansan- byeo | Kre- pish | 小花谷 | 楚粳  28 | 丽粳  13 | 江苏  408 | 意  4388 | 辽粳  454 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 缅甸野生稻 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 元江野生稻 | 0.0142 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 尼泊尔野生稻 | 0.0098 | 0.0133 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 景洪野生稻 | 0.008 | 0.0116 | 0.0018 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 东乡野生稻 | 0.027 | 0.0297 | 0.0206 | 0.0188 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9311 | 0.0362 | 0.0306 | 0.0297 | 0.0279 | 0.0352 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 明恢 63 | 0.0362 | 0.0306 | 0.0297 | 0.0279 | 0.0352 | 0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| IR24 | 0.0607 | 0.0607 | 0.0597 | 0.0579 | 0.0531 | 0.0822 | 0.0822 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 月亮谷 | 0.0288 | 0.0288 | 0.0242 | 0.0224 | 0.0361 | 0.0197 | 0.0197 | 0.0801 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 天杂 57 | 0.0306 | 0.0251 | 0.0242 | 0.0224 | 0.0324 | 0.0107 | 0.0107 | 0.0763 | 0.0116 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 滇黎 401 | 0.0107 | 0.0142 | 0.0044 | 0.0027 | 0.0215 | 0.0306 | 0.0306 | 0.0607 | 0.0251 | 0.0251 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 巴-1 | 0.0362 | 0.0306 | 0.0297 | 0.0279 | 0.0352 | 0 | 0 | 0.0822 | 0.0197 | 0.0107 | 0.0306 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| IR58025 | 0.0362 | 0.0306 | 0.0297 | 0.0279 | 0.0352 | 0 | 0 | 0.0822 | 0.0197 | 0.0107 | 0.0306 | 0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 南 34 | 0.0261 | 0.0297 | 0.0197 | 0.0179 | 0.0288 | 0.0116 | 0.0116 | 0.0733 | 0.0206 | 0.017 | 0.0206 | 0.0116 | 0.0116 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C418 | 0.0352 | 0.0306 | 0.0297 | 0.0278 | 0.0352 | 0.0053 | 0.0053 | 0.0811 | 0.0197 | 0.0107 | 0.0306 | 0.0053 | 0.0053 | 0.0115 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ansanbyeo | 0.1009 | 0.0998 | 0.0999 | 0.0979 | 0.0949 | 0.1094 | 0.1094 | 0.0729 | 0.1062 | 0.1021 | 0.1009 | 0.1094 | 0.1094 | 0.1082 | 0.1083 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Krepish | 0.1076 | 0.1015 | 0.1025 | 0.1005 | 0.1138 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1619 | 0.1076 | 0.1006 | 0.1035 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1117 | 0.1066 | 0.2013 |  |  |  |  |  |  |  |
| 小花谷 | 0.1076 | 0.1015 | 0.1025 | 0.1005 | 0.1138 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1619 | 0.1076 | 0.1006 | 0.1035 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1117 | 0.1066 | 0.2013 | 0 |  |  |  |  |  |  |
| 楚粳 28 | 0.1128 | 0.1067 | 0.1076 | 0.1057 | 0.119 | 0.1108 | 0.1108 | 0.1676 | 0.1128 | 0.1057 | 0.1087 | 0.1108 | 0.1108 | 0.1169 | 0.1118 | 0.2062 | 0.0044 | 0.0044 |  |  |  |  |  |
| 丽粳 13 | 0.1076 | 0.1015 | 0.1024 | 0.1004 | 0.1137 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1618 | 0.1075 | 0.1005 | 0.1034 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1116 | 0.1066 | 0.2001 | 0.0098 | 0.0098 | 0.0071 |  |  |  |  |
| 江苏 408 | 0.1076 | 0.1015 | 0.1025 | 0.1005 | 0.1137 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1619 | 0.1076 | 0.1006 | 0.1035 | 0.1056 | 0.1056 | 0.1116 | 0.1066 | 0.2013 | 0.0062 | 0.0062 | 0.0107 | 0.0081 |  |  |  |
| 意 4388 | 0.1068 | 0.1007 | 0.1027 | 0.1007 | 0.115 | 0.1068 | 0.1068 | 0.1611 | 0.1068 | 0.1007 | 0.1037 | 0.1068 | 0.1068 | 0.1119 | 0.1078 | 0.1981 | 0.0486 | 0.0486 | 0.0448 | 0.0391 | 0.0467 |  |  |
| 辽粳 454 | 0.1509 | 0.1443 | 0.1475 | 0.1454 | 0.1617 | 0.153 | 0.153 | 0.2089 | 0.1487 | 0.1465 | 0.1486 | 0.153 | 0.153 | 0.1573 | 0.1541 | 0.2439 | 0.1022 | 0.1022 | 0.0991 | 0.092 | 0.1002 | 0.065 |  |

24

### 2.2.4 野Th稻与籼粳稻的系统发育树的构建

基于遗传距离的系统发育树共分成两大枝。一大枝包括供试的野生稻、粳稻恢复系、籼稻恢复系及籼稻常规品种，其中，籼稻恢复系明恢63、93-11与籼稻常规品种巴-1和IR58025聚为一小枝，而籼稻常规品种滇黎401 与尼泊尔野生稻和景洪野生稻的亲本关系较近，另外粳稻恢复系均在此分枝中，而且

Ansanbyeo与籼稻恢复系IR24的关系较近。另一大分枝中包括7个粳稻常规品种，其中，来自俄国的常规品种krepish与云南地方品种小花谷的亲缘关系较近，而辽粳454与其它粳稻常规品种的关系较远（图2-3）。



图2-3 不同类型水稻种质的系统发育树

注：图中横坐标为遗传距离(cM)

Fig. 2-3 phylogenetic tree of different type materials Note: The abscissa is genetic distance(cM)

## 2.3 讨论

本研究结果表明，在*Rf-1*位点上，粳稻恢复系间的遗传距离平均值较高，碱基替换较多，籼稻恢复系间次之，籼-粳稻恢复系间的遗传距离平均值略小于籼稻恢复系的距离平均值，且籼-粳恢复系间没有碱基替换。粳稻恢复系的恢复基因都是通过籼粳交从籼稻引进的（杨振玉等，1998；洪汝科等，2004），所以籼、粳稻恢复系二者间的序列差异较小。另外，本研究结果还表明，粳稻常规品种与籼、粳稻恢复系间的遗传距离均较大，粳稻常规品种中是不具有功能恢复基因的，所以与具有恢复基因的籼、粳恢复系间的遗传距离均较大。Komori（2004）等研究发现，常规品种在*Rf-1*位点上缺失了一段574bp的片段（Komori *et al.,*2004）。

野生稻与粳稻恢复系间的遗传距离平均值较大，碱基替换的也较多，而与籼稻恢复系间的距离平均值较小，碱基替换较少，说明在*Rf-1*位点上，野生稻与粳稻恢复系间的序列差异较大，而野生稻与籼稻恢复系间的序列差异较小。野生稻与籼、粳稻常规品种间的序列分析结果和野生稻与恢复系的结果一致。这可能是由于野生稻是籼、粳稻的共同祖先的原因（丁颖，1957）。

恢复基因*Rf-1*是由多个基因座位组成，其中*Rf-1A*和*Rf-1C*基因座位可能与水稻的育性恢复功能紧密相关（寇姝燕，2009），而本研究所用的68923-8标记位于*Rf-1A*上，但本研究结果却表明，籼、粳稻恢复系间在该位点上并不存在碱基的变异，所以，推测68923-8片段对育性恢复功能没有显著影响。

前人的研究表明，根据Nei的遗传距离可以初步判断不同群体之间开始分化到现在的相对时间，且指出，若普通野生稻到栽培稻的驯化过程发生在籼粳分化之前，那么野生稻与籼粳稻间的遗传距离应大于籼粳稻间的距离；若驯化过程与籼粳分化几乎同时发生，那么野生稻、籼稻、粳稻的遗传距离基本一致（庄杰云等，1995；梁耀懋等，1997）。但本研究表明，野生稻与粳稻间的遗传距离与籼、粳稻间的距离基本相等，但野生稻与籼稻间的遗传距离却远远小于籼、粳稻间的距离，从该结果可以推测，粳稻亚种是由野生稻直接进化而来，且该进化过程与野生稻到栽培稻的驯化过程几乎同时发生。

本研究中，5个野生稻在同一位点上存在三种碱基的变化，该位点可以作为野生稻间的信息位点，同样在三个粳稻恢复系间以及粳稻常规品种间都存在这样的信息位点。推测，这些信息位点可以做为不同品种（系）间的特异性识别位点，由变异的碱基所翻译的氨基酸同样存在变异，而该变异可能会导致该恢复基因位点的育性功能的变化。所以，研究不同品种（系）间的变异位点甚至是籼粳亚种间的变异位点可能会对籼粳分化的研究提供一定的实验数据。

本研究的聚类将供试材料分成两大类，一大类包括所有的野生稻，籼、粳稻恢复系和籼稻常规品种；另一大类包括粳稻常规品种。粳稻的恢复系与粳稻常规品种分别在不同的类别中，是因为粳稻本身不具有恢复基因。虽然南34与C418分属于滇I型和BT型的恢复系，但在聚类中同为一类，而且聚在籼稻分枝中，这与杂交粳稻的育种实践的结果相一致，虽然C418是BT型恢复系，但对滇I型细胞质不育系仍然具有良好的恢复性，主要是因为它们的恢复基因供体都是IR8

（杨振玉等，1998；洪汝科等，2004）。

滇I型粳稻恢复系Ansanbyeo与籼稻恢复系IR24的聚类较近，说明在*Rf-1*位点上，二者的

同源性较高，亲缘关系较近。Ansanbyeo为韩国地方粳稻与韩国引进的外来品种杂交的后代，其恢复基因来源于外来引进品种。因此推测，该引进品种可能与IR24有较近的亲缘关系。由于杂交粳稻上使用的多数恢复系的恢复基因来源较为单一（王三良和许可，1996；阳峰萍等，2007；谭亚玲等，2009），因此，可利用*Rf-1*位点的分子标记筛选候选恢复基因供体，创造新的恢复系。

对籼粳分化的研究多集中在籼粳亚种的鉴别上（孙传清等，1998；张建勇等，2005；张武汉等，2007；谭亚玲等，2009）。本研究以*Rf-1*位点PCR片段的序列为基础对籼粳亚种的分化作了尝试性研究。结果表明，恢复基因*Rf-1*位点的DNA序列差异与水稻进化关系紧密，同时也表明，研究*Rf-1*位点的DNA序列变异，将会对阐明恢复基因与水稻进化的关系有极大帮助。

# 第三章 海拔和细胞质对水稻小穗育性遗传分离的效应

水稻自孕穗期起，对环境温度的反应更加敏感，温度变化过大将对水稻小穗育性有明显影响。低温可以使雄配子育性降低，从而导致小穗育性的降低，温度与小穗育性呈正相关（吕川根等，2002）。本研究利用云南高海拔的地方品种和籼粳交恢复系为亲本，分析比较了不同海拔产生的后代分离群体的小穗育性，以研究海拔差异引起的温度变化及籼粳细胞质背景对籼粳交后代育性的影响。

## **3.1** 材料与方法

### **3.1.1** 材料组合

本研究所用亲本为：云南省宁蒗县永宁乡海拔2650m高寒稻区种植的不具恢复基因的粳稻地方老品种小花谷及小麻谷；滇Ⅰ型细胞质雄性不育系合系42A；恢复系南34（滇Ⅰ型）和C418（BT型），其中，南34为籼粳杂交选育出的具有籼稻细胞质背景的滇I型细胞质雄性不育杂交粳稻体系的优良恢复系（洪汝科等，2004），C418为粳籼杂交选育出的具有粳稻细胞质背景的BT型（boro type细胞质）杂交粳稻体系的优良恢复系（杨振玉等，1998）。南34与C418的系谱如下：



图2-1 南34和C418的系谱

Fig. 2-1 The pedigree of Nan34 and C418

（1）2009年将南34和C418分别与小花谷和小麻谷杂交得到的正反交F1代共8个组合，分别种植在海拔差异达1800m的四个海拔点（表3-1），2010年单株收种得到正反交F2代，2011年混合播种，并得到正反交F3代，继续单株收种后混合播种，于2012年得到正反交F4代（附表1）。

（2）2010年在三个海拔下(1250m, 1890m, 2200m)，以南34和C418分别与小花谷和小麻谷正反交得到的F1代为父本，与稳定细胞质雄性不育系合系42A测交，在2011年得到

B1F1，单株收种后，于2012年在同一海拔混合播种，得到B1F2 (附表2)。

为便于分析，本研究中将南34或C418作母本的组合称为正交，将小麻谷或小花谷作

母本的组合称为反交。

### **3.1.2** 材料种植

将正反交F2、F3、F4代于2010、2011及2012年分别种植在元江、个旧、昆明及团结乡四个海拔点，测交F1、F2代于2011、2012年分别种植在个旧、昆明及团结乡三个海拔点。

元江点每年1月播种，2月插秧，3月取样，6月收种；其他三个海拔点每年3月播种，

5月插秧、8月取样、9月收种。全部材料均采取单本插，株行距为15×15cm，每行10株，管理条件及病虫害防治与大田管理相同。不同组合的群体大小见附表3，附表4。

不同海拔试验点的环境温度数据来源：个旧试验点与气象站的观察点基本处在同一海拔平面，故采用的是该气象站的数据；元江、昆明、团结乡试验点由本课题组安装温度自动记录仪记录温度（表3-1）。

表3-1 四个试验点的地理因子及环境温度

Tab.3-1 Environment temperature and geographical factors of four experiment sites.

| 参数  Parameter | 年份  Year | 元江  Yuanjiang | 个旧  Gejiu | 昆明  Kunming | 团结乡  Tuanjiexiang |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 2010 | 23.6 | 18.6 | 15.7 | 13.2 |
| 年均温（℃）  AT(℃) | 2011 | 19.2 | 18.7 | 14.5 | 13.2 |
|  | 2012 | 23.8 | 20.5 | 14.8 | 13.5 |
| 海拔 (m) Altitude(m) | - | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
| 纬度  Latitude | - | 23°36 | 23°23 | 25°01 | 25° |
| 经度  Longitude | - | 101°59 | 103°23 | 102°41 | 102° |

注：AT: Annual average temperature

### **3.1.3** 小穗育性的调查及统计分析

收种时每个群体的每个单株取小穗1枚，后统计每个群体的各单株的实粒数、空粒数，随机取穗。通过Excel 2003计算总粒数/穗（实粒数+空粒数）、小穗育性（实粒数/穗总粒数）及性状多样性指数（*MDI*），并利用数据分析进行各性状的单因素方差分析（ANOVA）。利用SPSS 18.0 对不同世代群体进行二因素方差分析。

群体的性状多样性指数（Morphological diversity index, *MDI*）：将各数量性状分成10个等级，统计各等级内不同数量性状出现的频率（马育华，1979）：

*MDI*(*Pi*j

Lg *P*) / *N*

*I j*

*Pij*为第i性状在第j级别内出现的频率（单位为：%），N为计算中所涉及的性状总数。等级的划分方法：实粒数变化范围不仅限在0-100之间，所以划分按照以下方法：先计

算参试材料总体平均数（X）和标准差（σ），然后划分为10级，从第1级[X 1 <(X-2σ)]到第10

级[X 10>(X+2σ)]，每0.5σ为1级（黄勇等，2011）。小穗育性限于0-100之间，所以按10%

为一个等级，递增。共分成10级。

## **3.2** 结果与分析

### **3.2.1** 海拔对分离群体小穗育性的影响

不同组合产生的分离群体的实粒数及小穗育性均受到海拔的影响。南34与小花谷的组合、C418与小麻谷的组合产生的两个世代正反交群体中，实粒数及小穗育性均在中高海拔地区（1890m）较大（表3-2, 表3-5）。另外两个组合产生的分离群体的实粒数及小穗育性在不同海拔间产生明显差异。南34与小麻谷组合产生的两个世代的分离群体中，F3代的正交群体（南34×小麻谷）的实粒数及小穗育性均在2200m海拔最大，而小穗育性却在400m最大；F4代中正反交群体的实粒数及小穗育性均在1890m海拔最大（表3-3）。C418与小花谷组合产生的两个世代的分离群体中，F3代正反交群体的实粒数及小穗育性均在1890m海拔最大；而F4代中，正反交群体的实粒数在1890m最大，小穗育性在正反交群体间出现差异（表3-4）。另外，4个组合产生的分离群体中，小穗育性的分布频率均在中高海拔（1890m和2200m）较高，且分布在等级60-90之间的单株较多（附图2）。另外，将南34与小花谷的杂交组合和C418与小花谷的杂交组合进行对比发现，两个世代下，C418与小花谷的杂交组合在1890m时的实粒数和小穗育性要高于南34与小花谷杂交组合在1890m时的两个性状（表3-2, 表3-4）。而南34与小麻谷的杂交组合和C418与小麻谷的杂交组合对比发现，

C418与小麻谷的杂交组合的实粒数在400m、1250m和1890m均高于南34与小麻谷的杂交组合，而小穗育性在两个世代之间产生差异（表3-3, 表3-5）。结果表明，海拔对不同组合产生的正反交群体的小穗育性均可产生显著影响。

测交F2代结果显示，海拔对不同组合产生的正反交群体的实粒数及小穗育性产生显著影响。南34与小花谷组合、南34与小麻谷组合和C418与小花谷的组合产生的正反交群体做父本时，实粒数和小穗育性均出现在1890m海拔下（表3-6, 表3-7）。C418与小麻谷组合产生的正反交群体做父本时，正交群体（C418×小麻谷）的实粒数和小穗育性均在2200m最大，而反交群体中的实粒数和小穗育性则在1890m的中高海拔最大（表3-6）。另外在1890m时，南34做亲本与地方品种杂交产生的测交组合的实粒数和小穗育性均高于C418做亲本时产生的测交组合的实粒数和小穗育性（表3-6, 表3-7）。结果显示，中高海拔对不同组合产生群体的小穗育性影响较大。

### **3.2.2** 细胞质对分离群体小穗育性的影响

对不同组合正反交群体间的实粒数及小穗育性分析发现，不同组合产生的分离群体中，细胞质对两个性状均可产生显著影响。南34与小花谷组合产生的分离群体中，F3代的正反交群体间的实粒数和小穗育性均在1250m差异最大，且为正交群体（南34×小花谷）大于

反交群体，其它三个海拔均为反交群体（小花谷做细胞质供体）大于正交群体；F4代的实粒数和小穗育性分别在1890m和1250m差异最大，而且在400m和1890m为反交群体大于正交群体，其它两个海拔正好相反（表3-2）。南34与小麻谷组合产生的两个世代的分离群体中，F3代正反交群体间的实粒数在400m差异最大，而且为反交群体大于正交群体，小穗育性在1890m差异最大，而且是正交群体大于反交群体；F4代正反交群体间的实粒数、小穗育性分别在2200m和1890m差异最大，而且均为反交群体大于正交群体（表3-3）。C418做亲本产生的不同组合中，只有C418与小麻谷组合产生的F3代的正反交群体间的小穗育性在2200m差异最大，且反交群体大于正交群体；而该组合F3代的实粒数、F4代的实粒数和小穗育性、C418 与小花谷组合产生的两个世代的正反交群体间的实粒数和小穗育性均在

400m地区的正反交群体间差异较大，而且都是正交群体大于反交群体（表3-4, 表3-5）。

C418与小花谷的杂交组合在低海拔产生的正反交群体中，正交群体的实粒数和小穗育性均大于相同海拔产生的反交群体，但南34与小花谷的杂交组合在该海拔产生的正交群体的实粒数和小穗育性却小于反交群体（表3-2, 表3-4）。C418 与小麻谷的杂交组合在高海拔地区产生的群体中，F3代的实粒数和小穗育性均为反交群体大于正交群体，F4代为正交群体大于反交群体；而南34与小麻谷的组合在该海拔产生的群体在两个世代下有所差异，F3代中的实粒数和小穗育性均为正交群体大于反交群体，而F4代却是反交群体大于正交群体（表3-3, 表3-5）。

表3-2 南34与小花谷杂交组合不同海拔产生的分离群体小穗育性的比较

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 性状  Trait | 海拔  (m) Altitude | 南 34×小花谷  Nan34×Xiaohuagu | 小花谷×南 34  Xiaohuagu×Nan34 | F3-RF3 | 南 34×小花谷  Nan34×Xiaohuagu | 小花谷×南 34  Xiaohuagu×Nan34 | F4-RF4 |
| F3 | RF3 |  | F4 | RF4 |  |
|  | 400 | 76.11±4.26 | 79.12±4.46 | -3.01 | 103.45±2.38 | 111.62±2.48 | -8.17 |
| 实粒数  FG | 1250 | 97.81±4.17 | 54.66±3.44 | 43.15 | 101.54±6.09 | 86.60±11.90 | 14.94 |
| 1890 | 118.00±9.40 | 148.03±10.56 | -30.03 | 134.69±4.58 | 170.97±4.23 | -36.28 |
|  | 2200 | 49.54±3.50 | 73.35±3.57 | -23.81 | 111.69±5.69 | 93.00±6.80 | 18.69 |
|  | 400 | 51.74±2.47 | 54.37±2.44 | -2.63 | 52.73±1.08 | 57.08±0.89 | -4.35 |
| 小穗育性  SF | 1250 | 53.45±1.63 | 34.57±1.9 | 18.89 | 52.59±2.50 | 47.31±5.87 | 5.28 |
| 1890 | 67.54±2.72 | 73.98±2.70 | -6.44 | 75.80±1.42 | 76.24±1.02 | -0.44 |
|  | 2200 | 31.63±1.90 | 48.55±1.82 | -16.92 | 66.67±2.39 | 62.23±3.41 | 4.44 |

Tab. 3-2 Comparison of spikelet fertility between segregation populations generated from nan34 and xiaohuagu at altitudes

注：表中实粒数及小穗育性的数值为性状平均值加减标准误。FG和SF分别代表实粒数和小穗育性。

Note: The data of fill grain and spikelet fertility in the above table are average value and standard error. FG and SF represent fill grain and spikelet fertility.

表3-3 南34与小麻谷杂交组合不同海拔产生的分离群体小穗育性的比较

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 性状  Trait | 海拔  (m) Altitude | 南 34×小麻谷  Nan34×Xiaomagu | 小麻谷×南 34  Xiaomagu×Nan34 | F3-RF3 | 南 34×小麻谷  Nan34×Xiaomagu | 小麻谷×南 34  Xiaomagu×Nan34 | F4-RF4 |
| F3 | RF3 |  | F4 | RF4 |  |
|  | 400 | 70.29±3.60 | 111.85±5.77 | -41.56 | 103.56±1.90 | 92.49±2.52 | 11.07 |
| 实粒数  FG | 1250 | 78.67±9.30 | 69.41±6.14 | 9.26 | 56.54±3.45 | 53.15±2.86 | 3.39 |
| 1890 | 90.83±7.30 | 51.77±6.43 | 39.06 | 117.60±3.53 | 128.51±3.19 | -10.91 |
|  | 2200 | 96.24±8.26 | 88.90±7.62 | 7.34 | 111.54±5.51 | 122.77±6.91 | -11.23 |
|  | 400 | 64.23±1.83 | 71.59±1.5 6 | -7.36 | 65.94±0.84 | 66.40±1.19 | -0.46 |
| 小穗育性  SF | 1250 | 43.19±4.74 | 55.71±3.63 | -12.52 | 39.63±2.19 | 35.04±1.65 | 4.59 |
| 1890 | 64.19±3.07 | 45.30±4.86 | 18.89 | 72.11±1.24 | 87.11±0.69 | -15 |
|  | 2200 | 68.71±3.06 | 66.08±4.30 | 2.63 | 66.68±2.08 | 70.79±2.24 | -4.11 |

Tab. 3-3 Comparison of spikelet fertility between segregation populations generated from nan34 and xiaomagu at altitudes

表3-4 C418与小花谷杂交组合不同海拔产生的分离群体小穗育性的比较

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 性状  Trait | 海拔  (m) Altitude | C418×小花谷  C418×Xiaohuagu | 小 花 谷 ×C418 Xiaohuagu×C418 | F3-RF3 | C418×小花谷  C418×Xiaohuagu | 小 花 谷 ×C418 Xiaohuagu×C418 | F4-RF4 |
| F3 | RF3 |  | F4 | RF4 |  |
|  | 400 | 114.80±4.58 | 101.34±4.57 | 13.46 | 115.24±33.30 | 57.77±2.52 | 57.47 |
| 实粒数  FG | 1250 | 86.40±4.07 | 85.26±3.90 | 1.14 | 78.81±9.71 | 121.84±6.45 | -43.03 |
| 1890 | 163.87±9.42 | 173.7±2.73 | -9.83 | 186.40±10.34 | 193.55±4.54 | -7.15 |
|  | 2200 | 54.95±4.42 | 67.94±4.78 | -12.99 | 129.51±11.24 | 147.4±10.74 | -17.89 |
|  | 400 | 78.29±2.02 | 65.88±2.33 | 12.41 | 68.58±1.28 | 45.60±1.63 | 22.98 |
| 小穗育性  SF | 1250 | 50.76±1.90 | 45.30±1.65 | 5.46 | 34.65±4.59 | 47.98±1.99 | -13.33 |
| 1890 | 85.80±2.30 | 74.14±2.92 | 11.66 | 81.60±2.92 | 79.27±0.98 | 2.33 |
|  | 2200 | 29.51±2.17 | 42.17±2. 68 | -12.66 | 62.31±2.90 | 84.99±1.38 | -22.68 |

Tab. 3-4 Comparison of spikelet fertility between segregation populations generated from C418 and xiaohuagu at altitudes

表3-5 C418与小麻谷杂交组合不同海拔产生的分离群体小穗育性的比较

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 性状  Trait | 海拔  (m) Altitude | C418×小麻谷  C418×Xiaomagu | 小 麻 谷 ×C418 Xiaomagu×C418 | F3-RF3 | C418×小麻谷  C418×Xiaomagu | 小 麻 谷 ×C418 Xiaomagu×C418 | F4-RF4 |
| F3 | RF3 |  | F4 | RF4 |  |
|  | 400 | 123.89±4.52 | 115.42±4.18 | 8.47 | 111.38±3.00 | 93.43±2.49 | 17.95 |
| 实粒数  FG | 1250 | 79.21±3.97 | 79.98±3.60 | -0.77 | 115.73±11.81 | 105.34±5.87 | 10.39 |
| 1890 | 165.53±11.31 | 160.27±12.3 0 | 5.26 | 157.05±4.87 | 163.13±4.34 | -6.08 |
|  | 2200 | 27.30±3.2 | 41.47±3.90 | -14.17 | 138.71±8.65 | 128.03±7.70 | 10.68 |
|  | 400 | 78.62±1.50 | 80.83±1.46 | -2.21 | 70.82±1.19 | 64.24±1.19 | 6.58 |
| 小穗育性  SF | 1250 | 49.66±2.22 | 54.17±1.85 | -4.51 | 57.59±5.19 | 54.92±2.72 | 2.67 |
| 1890 | 81.72±2.11 | 86.92±2.13 | -5.2 | 85.80±1.10 | 85.85±0.96 | -0.05 |
|  | 2200 | 17.14±1.93 | 23.83±1.95 | -6.69 | 79.85±1.91 | 78.71±2.28 | 1.14 |

Tab. 3-5 Comparison of spikelet fertility between segregation populations generated from C418 and xiaomagu at altitudes

测交F2代正反交群体间的性状分析发现，当C418与小麻谷组合产生的正反交群体做父

本时，高海拔地区的实粒数及小穗育性的差异较大，而且均是正交群体大于反交群体。南

34与地方品种的杂交组合、C418与小花谷的杂交组合做父本时，正反交群体间的实粒数和

小穗育性均在中高海拔差异较大，而且均为反交群体大于正交群体。南34与地方品种的杂交组合在中高海拔（1890m）的实粒数和小穗育性均为反交群体大于正交群体，而C418与地方品种的杂交组合正好相反（表3-6, 表3-7）。结果说明，细胞质对不同组合产生群体的实粒数及小穗育性均可产生显著影响。

表3-6 南34与地方品种的杂交组合不同海拔产生的测交F2代群体小穗育性的比较

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 性状  Trait | 海拔  (m) Altitude | 南 34×小花谷  Nan34×Xiaohuagu | 小花谷×南 34  Xiaohuagu×Nan34 | F2-RF2 | 南 34×小麻谷  Nan34×Xiaomagu | 小麻谷×南 34  Xiaomagu×Nan34 | F2-RF2 |
| F2 | RF2 |  | F2 | RF2 |  |
|  | 1250 | 87.16±3.02 | 70.84±2.71 | 8.32 | 47.66±2.70 | - | - |
| 实粒数  FG | 1890 | 107.07±4 | 116.85±4.96 | -9.78 | 116.31±5.04 | 127.02±3.78 | -10.71 |
|  | 2200 | 73.76±3.52 | 86.25±4.30 | -12.49 | 62.32±3.32 | 87.50±4.06 | -25.18 |
|  | 1250 | 50.67±1.48 | 53.96±1.56 | -3.29 | 29.90±1.44 | - | - |
| 小穗育性  SF | 1890 | 54.56±1.60 | 61.27±1.90 | -6.71 | 56.35±1.90 | 62.75±1.56 | -6.4 |
| 2200 | 51.77±1.90 | 55.35±2.03 | -3.58 | 46.73±1.93 | 59.73±1.87 | -13 |

Tab. 3-6 Comparison of spikelet fertility between test cross F2 populations generated from nan34 and landrice at altitudes

注：“-”表示未获得数据。

Note:" -" shows no data.

表3-7 C418与地方品种的杂交组合不同海拔产生的测交F2代群体小穗育性的比较

Tab. 3-7 Comparison of spikelet fertility between test cross F2 populations generated from C418 and landrice at altitudes

| 性状  Trait | 海拔  (M) Altitude | C418×小花谷  C418×Xiaohuagu | 小花谷×C418  Xiaohuagu×C418 | F2-RF2 | C418×小麻谷  C418×Xiaomagu | 小麻谷×C418  Xiaomagu×C418 | F2-RF2 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| F2 | RF2 |  | F2 | RF2 |  |
|  | 1250 | - | 67.55±3.41 | - | 75.57±3.07 | 63.25±2.93 | 12.32 |
| 实粒数  FG | 1890 | 82.22±4.52 | 85.99±4.87 | -3.77 | 114.78±4.74 | 97.95±4.57 | 16.83 |
| 2200 | 53.31±4.47 | 69.18±5.11 | -15.87 | 129.52±10.04 | 60.58±5.68 | 68.94 |
|  | 1250 | - | 42.30±1.85 | - | 44.42±1.38 | 40.73±1.61 | 3.69 |
| 小穗育性  SF | 1890 | 42.90±2.22 | 42.70±2.00 | 0.2 | 56.34±1.41 | 49.89±2.16 | 6.45 |
|  | 2200 | 31.51±2.50 | 39.63±2.57 | -8.12 | 67.82±3.68 | 35.71±3.08 | 32.11 |

### **3.2.3** 海拔与细胞质互作对分离群体小穗育性性状的影响

对F3、F4代群体的实粒数及小穗育性进行二因素方差分析发现，南34做亲本时产生的组合中，海拔、海拔与细胞质互作效应均可对不同组合产生极显著影响。而C418做亲本产生的不同组合中，海拔均可对组合产生影响；而细胞质、海拔与细胞质互作效应对不同组合产生群体的性状产生不同程度的影响（表3-8）。结果表明，海拔对不同世代群体的实粒数

及小穗育性均可产生极显著的影响，而细胞质、海拔与细胞质的互作效应仅对部分群体产生影响，而且影响小于海拔产生的影响。

表3-8 海拔和细胞质对分离群体小穗育性的互作效应分析

Tab 3-8 The interaction effect analysis of spikelet fertility of segregation populations under

Altitude and cytoplasm

| 组合  Cross | 变异来源 Source | 实粒数 F 值  FG F-Value | | 小穗育性 F 值  SF F-Value | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| F3 代 | F4 代 | F3 代 | F4 代 |
|  | 海拔 | 41.71\*\* | 74.83\*\* | 37.54\*\* | 122.2\*\* |
| 南 34-小花谷  Nan34-Xiaohaugu | 细胞质 | 0.71 | 0.37 | 0.95 | 0.64 |
| 海拔\*细胞质 | 32.18\*\* | 11.98\*\* | 24.8\*\* | 2.98\* |
|  | 海拔 | 4.71\*\* | 184.2\*\* | 18.42\*\* | 349.7\*\* |
| 南 34-小麻谷  Nan34-Xiaomagu | 细胞质 | 0.87 | 0.45 | 0.03 | 8.57\*\* |
|  | 海拔\*细胞质 | 16.51\*\* | 5.9\*\* | 8.86\*\* | 20\*\* |
|  | 海拔 | 208.9\*\* | 113.36\*\* | 102.5\*\* | 69.1\*\* |
| C418-小花谷  C418-Xiaohuagu | 细胞质 | 0.01 | 0.28 | 4.23\* | 1.8 |
| 海拔\*细胞质 | 2.61 | 34.9\*\* | 11.78\*\* | 41.96\*\* |
|  | 海拔 | 209.2\*\* | 87.4\*\* | 339.9\*\* | 93.45\*\* |
| C418-小麻谷  C418-Xiaomagu | 细胞质 | 0.001 | 3.16 | 6.36\* | 3.24 |
|  | 海拔\*细胞质 | 2.68\* | 3.71\* | 0.39 | 2.02 |

注：\*和\*\*为产生因素的影响水平，\*代表显著，P≤0.05，\*\*代表极显著，P≤0.01

Note: \* and \*\* are effect level of factor, \* represent significance, P≤0.05, \*\* represent highly significance, P≤0.01

测交F2代的二因素方差分析表明，海拔对不同杂交组合的实粒数及小穗育性均可产生极显著的影响。而细胞质、海拔与细胞质互作效应则对部分杂交组合产生影响，其中，细胞质对南34与小麻谷的杂交组合的实粒数及小穗育性产生影响，但该影响小于海拔产生的影响；海拔与细胞质互作效应对C418与小花谷杂交组合的实粒数和小穗育性产生影响（表3-9）。结果表明，海拔可对所有测交组合的实粒数及小穗育性产生影响。细胞质、海拔与细胞质互作效应则仅对部分测交组合的实粒数及小穗育性产生效应。

表3-9 海拔和细胞质对测交F2代群体小穗育性的互作效应分析

Tab. 3-9 Interaction effect of spikelet fertility under altitude and cytoplasm to test cross F2 populations

| 花粉组合  Pollen Cross | 变异来源  Source | 实粒数 F 值  FG F-Value | 小穗育性 F 值  SF F-Value |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 海拔 | 49.13\*\* | 5.83\*\* |
| 南 34-小花谷  Nan34-Xiaohuagu | 细胞质 | 0.41 | 10.13\*\* |
|  | 海拔\*细胞质 | 9.25\*\* | 0.6 |
|  | 海拔 | 116.49\*\* | 62.07\*\* |
| 南 34-小麻谷  Nan34-Xiaomagu | 细胞质 | 21.78\*\* | 29.71\*\* |
|  | 海拔\*细胞质 | 3.54 | 3.43 |
|  | 海拔 | 42.88\*\* | 19.05\*\* |
| C418-小花谷  C418-Xiaohuagu | 细胞质 | 69.41\*\* | 64.57\*\* |
|  | 海拔\*细胞质 | 17.07\*\* | 21.34\*\* |
|  | 海拔 | 14.89\*\* | 5.45\*\* |
| C418-小麻谷  C418-Xiaomagu | 细胞质 | 4.58\* | 2.74 |
|  | 海拔\*细胞质 | 1.74 | 3.03 |

## **3.3** 讨论

水稻籼粳亚种间的杂交种在F1 代常表现为花粉不育（Hinata and Oka, 1962; Second,

1982），而花粉育性与小穗育性又呈正相关。结合本实验室对F2代的研究和本章研究结果发现，部分杂交组合产生的分离群体的小穗育性随世代的增高而增大（王昌江，2012）。另外，本研究表明，南34与小花谷组合产生的两个世代的正交群体（南34×小花谷）的实粒数在中高海拔均低于反交群体的实粒数，推测是由于南34具有籼稻细胞质，当南34做细胞质供体时，与具有粳稻细胞核的品种杂交会由于质核互作不协调而导致育性降低（朱英国，1979；王石华，2009）。而C418 与小花谷或小麻谷杂交产生的两个世代分离群体中，低海拔的正反交群体间的小穗育性均为正交群体（C418做细胞质供体）大于反交群体，而高海拔地区的正反交群体间的小穗育性多为反交大于正交。说明，小穗育性除了受到海拔的影响外，还会因为亲本细胞质的籼粳差异而产生不同。但对于测交F2代的研究发现，在南34与小麻谷、

C418与小花谷及C418与小麻谷的组合中，小花谷或小麻谷做花粉的细胞质供体时产生的反交群体的实粒数及小穗育性均低于相应杂交组合产生的正交群体，推测这种育性的变化除了受到细胞质因子的影响之外，还受到一些微效基因的修饰（杨竹平等，1993），但目前，这种修饰作用的机理还不清楚。

海拔差异引起的温度变异是影响育性的主要因素之一（王石华，2009）。本研究中，从低海拔到高海拔，温度明显下降，小穗育性也随海拔的升高出现变化，且不同分离群体在中高海拔地区（1890m）的小穗育性均较高。说明高海拔对分离群体的小穗育性影响较小。低温可以使雄配子体发生变化，使花药壁的绒毡层细胞膨大，影响花药壁向花药提供营养，使得花药内的花粉不充实，导致开花时花药不开裂或部分裂开，降低受精率（Satake, 1991；

Satake and Shibata, 1992; Lu *et al.,* 1999； 吕川根等，2002；王玉锋等，2010）。高温亦可以影响水稻的雄配子体，随着温度的升高，不育系雄配子体的育性可得到恢复，但超过临界温度时，会使雄配子体的育性显著降低（李成德, 2003；郑志广等, 2003；夏明元和戚华雄, 2004；张桂莲等，2008）。总而言之，水稻雄配子体对温度变异比较敏感，而雌配子体对环境温度的变异反应较为迟钝，所以水稻育性的降低主要是由于雄配子体育性的降低导致，而与雌配子体关系较小。

本研究利用南34和C418两个优良恢复系分别与云南地方品种杂交产生杂交组合，分析不同杂交组合的小穗育性。发现南34 与小花谷的杂交组合在1890m的小穗育性要小于

C418与小花谷的杂交组合，且在该海拔下，两个杂交组合产生的群体的小穗育性在正反交群体间存在差异，南34与地方品种的杂交组合中为反交群体（南34做父本）的小穗育性大于正交群体。说明，南34与C418可对群体的小穗育性产生差异。南34和C418虽然都是恢复系，但南34的胞质为不育胞质（洪汝科等，2004），而C418的却为正常可育胞质（杨振玉等，1998），故而在以二者为细胞质供体与地方品种杂交产生的正交组合的小穗育性要低于相同海拔产生的反交组合。

# 第四章 海拔和细胞质对水稻***Rf-1***位点遗传分离比例及遗传分化的影响

遗传分离是生物界普遍存在的现象，遗传分离受到内部遗传因子和外界环境的双重影响，可能会偏离孟德尔分离定律，该偏离可以增加种群内等位基因或异型染色体的频率。因此，作为一种重要的进化动力而被广泛关注。遗传偏分离除受到细胞核基因组上的生殖隔离因子（配子体因素及不育基因等）的影响外（Harushima *et al.,* 1996; Bradshaw *et al.,* 1998; Fukuta *et al.,* 2000; He *et al.,* 2001; Harushima *et al.,* 2002; Zhao *et al.,* 2006），环境因素（如海拔等）也会造成偏分离的发生（Zamir *et al.,* 1982; Hiraizumi, 1993, 王石华，2009；张云等，

2009；王昌江等，2011）。遗传分化是生物适应环境的基础。分化越大，适应环境的能力就越强。而遗传分离是生物发生遗传分化的基础。本章对恢复系与地方品种的杂交后代分离群体的*Rf-1*位点的遗传分离比例进行研究，以期明确海拔和细胞质对群体遗传分离的影响。并以此分离为基础，来探讨海拔和细胞质对水稻遗传多样性及遗传分化的影响。

## **4.1** 材料与方法

### **4.1.1** 实验材料

本研究所用组合为第三章所有杂交组合，组合构建参见第三章3.1.1

### **4.1.2** 材料种植

材料种植参见第三章3.1.2

### **4.1.3** 总**DNA**的提取

DNA提取方法参照第二章2.1.2.1。

### **4.1.4** **PCR**标记及反应体系、参数

PCR引物序列、反应体系及扩增参数见第二章2.1.2.2。

### **4.1.5** 数据统计分析

（1）将各群体每个单株的带型按照亲本带型及杂合体带型进行划分、统计：与亲本南34或C418带型相同的记为“0”，与小花谷或小麻谷相同的带型记为“1”，杂合带型记为“2”。按照孟德尔分离比例，利用Excel 2003及SPSS 18.0对各群体进行χ2检测及二因素方差分析。

（2）利用Popgen 32计算群体间遗传一致性（Genetic identity, *I*）及遗传距离（Genetic distance,

*D*）（Nei‟s, 1978）：

*I**xi yi* /(*xi* *yi* )

2 2 1/ 2

其中*x*i是x群体i等级的频率，*y*i是y群体i等级的频率。

*D = -* Ln *I*

（3）利用Popgen32（Yeh *et al*., 1997）计算群体间期望杂合度（Expected heterozygosity, H）、

Shannon 信息指数(Shannon's Information index, *I*)（Lewontin, 1972）及遗传分化系数

（Genetic differentiation index, GST）。通过期望杂合度及Shannon信息指数评价群体的遗传多样性；综合群体间的遗传距离及遗传分化系数评价群体间的遗传分化程度。基于群体间的遗传距离，采用非加权组对算术平均法（UPGMA）（Sokal and Michener, 1958）构建系统分化树。通过TreeView软件（Page, 1996）读取树形图。

## **4.2** 结果与分析

### **4.2.1** 分离群体**68923-8 PCR**标记的基因型

恢复基因*Rf-1*位点特异PCR引物68923-8对不同世代群体的基因型分析表明，F3代、

F4代及测交F2代群体均得到三种带型：一种带型与亲本南34及C418一致，片段大小约为

1900bp；一种带型与云南地方粳稻小花谷及小麻谷一致，片段大小约为1300bp；第三种带型为杂合带型（图4-1）。



图4-1 不同群体*Rf-1*位点68923-8片段的基因型

注：A: F3代（南34×小花谷）；B: F3代(C418×小花谷)；N:南34；H:小花谷；C: C418；1-20:

群体的不同单株

Fig. 4-1 Genotype of 68923-8 fragment on*Rf-1* locus of populations

Note: A: F3 generation (Nan34×Xiaohuagu); B: F3 generation (C418×Xiao huagu); N: Nan34; H: Xiaohuagu; C: C418; 1-20: single plant of population

### **4.2.2** ***Rf-1***位点基因型遗传分离比例的影响

#### **4.2.2.1** 海拔对***Rf-1***位点基因型遗传分离比例的影响

通过对不同杂交组合产生的不同世代分离群体研究发现，不同杂交组合产生的群体对海拔的响应具有显著差异。例如，南34与小花谷、南34与小麻谷及C418与小花谷的杂交组合中，F3及F4代产生的群体在低海拔（400m）和中海拔（1250m和1890m）较易发生偏分离，其中在南34与小花谷、C418与小花谷的杂交组合中，随着世代的增高，发生偏分离的群体增多（表4-1, 表4-2, 表4-3）。尽管C418与小麻谷的杂交组合中，F3代群体在2200m的高海拔地区发生偏分离，但F4代依然在低海拔和中海拔发生偏离，而且同样随世代的增高，发生偏分离的群体随之增多（表4-4）。

对测交F2代群体的遗传分离分析发现，南34与小花谷、南34与小麻谷、C418与小花谷、C418与小麻谷的杂交组合中，1890m和2200m均发生偏分离，且均偏向南34或C418

（表4-5, 表4-6, 表4-7, 表4-8）。结果表明，海拔可显著或极显著的影响不同杂交组合

*Rf-1*位点的遗传偏分离。

#### **4.2.2.2** 细胞质对***Rf-1***位点基因型遗传分离比例的影响

通过对不同细胞质背景的分离群体的研究发现，在不同的细胞质背景下，群体的偏离偏向有所不同。例如，南34与地方粳稻品种杂交产生的分离群体中，中高海拔产生的正交群体（南34做细胞质供体）的偏离程度大于相同海拔产生的反交群体（表4-1, 表4-2）。C418与小花谷杂交产生的正反交群体中，同样在中海拔地区发生偏分离的群体较多，且反交群体

（小花谷×C418）的偏离程度大于相同海拔产生的正交群体（表4-3）。而C418与小麻谷的杂交组合在1250m海拔时，两个世代正反交群体间的偏离程度均为正交群体大于反交群体，其他海拔产生的正反交群体的偏离程度与海拔没有直接的对应关系（表4-4）。

比较不同组合在不同海拔产生的测交F2代群体的偏离程度，结果发现，不同杂交组合产生的正反交群体间的偏离程度有所不同。例如，南34与地方粳稻杂交后代在2200m的高海拔地区的偏离程度为正交群体大于反交群体（表4-5, 表4-6）。C418 与地方粳稻杂交后代中，2200m海拔产生的反交群体的偏离程度大于相同海拔产生的正交群体（表4-7, 表4-8）。结果表明，细胞质可对不同杂交组合的群体产生不同程度的遗传分离。

#### **4.2.2.3** 海拔和细胞质互作对***Rf-1***位点基因型遗传分离比例的影响

对F3代、F4代在不同海拔产生的群体的二因素方差分析发现，在南34做亲本产生的组合中，海拔、细胞质均产生显著影响，且细胞质的影响较显著。C418为亲本产生的杂交组合中，影响因素有所区别。C418与小花谷产生的杂交组合中，细胞质对F3代分离群体产生影响，而海拔、海拔与细胞质互作效应则对F4代分离群体产生极显著影响，且海拔与细胞质互作效应产生的效应更大。C418与小麻谷的杂交组合中，F3代中只有海拔对群体产生极显著影响，F4代中海拔、细胞质、海拔与细胞质互作效应均可对组合产生极显著影响（表4-9）。测交F2代群体的二因素方差分析发现，在南34与小麻谷的杂交组合中，仅有细胞质对群体产生极显著的影响；而在南34与小花谷、C418与小花谷及C418与小麻谷的杂交组合中，均为海拔和细胞质的互作效应对群体产生显著或极显著影响（表4-10）。

对以上F3代、F4代及测交F2代群体的二因素方差分析发现，海拔、细胞质、海拔与

表4-1 南34与小花谷杂交组合分离群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-1 Chi-square values of molecular markers genotype in segregation populations generated from nan34 and xiaohuagu hybrid cross

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Generation Altitude | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| 400 | 166 | 3：2：3 | 1：0.7：0.3 | 32.40\*\* | 82 | 3：2：3 | 1：0.7：0.7 | 1.72 |
| 1250  F3  1890 | 206  119 | 3：2：3  3：2：3 | 1：0.4：0.1  1：0.3：0.1 | 85.92\*\*  74.99\*\* | 192  99 | 3：2：3  3：2：3 | 1：1.4：1.9  1：0.6：1.5 | 17.92\*\*  5.23 |
| 2200 | 148 | 3：2：3 | 1：0.5：0.04 | 79.06\*\* | 181 | 3：2：3 | 1：1：1.1 | 5.69 |
| 400 | 164 | 7：2：7 | 1：0.3：0.1 | 101.14\*\* | 237 | 7：2：7 | 1：0.5：1.6 | 13.36\*\* |
| 1250  F4  1890 | 39  100 | 7：2：7  7：2：7 | 1：0.2：0.3  1：0.1：0.01 | 11.73\*\*  86.71\*\* | 79  121 | 7：2：7  7：2：7 | 1：0.2：2.1  1：0.02：2.3 | 14.54\*\*  36.84\*\* |
| 2200 | 93 | 7：2：7 | 1：0.2：0.01 | 70.13\*\* | 91 | 7：2：7 | 1：0.3：0.9 | 0.15 |

世代海拔

南34×小花谷Nan34×Xiaohuagu

小花谷×南34 Xiaohuagu×Nan34

注：表中的期望比与实际比均为南34：杂合体：小花谷。\* 代表P≤0.05，\*\*P≤0.01，下同。

Note: Expected ratio and Actual ratio are nan34: heterozygote: xiaohuagu. \* represent P≤0.05, \*\* represent P≤0.01. The following are same.

表4-2 南34与小麻谷杂交组合分离群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-2 Chi-square values of molecular markers genotype in segregation populations generated from nan34 and xiaomagu hybrid cross

世代海拔

南34×小麻谷Nan34×Xiao magu

小麻谷×南34 Xiaomagu×Nan34

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Generation Altitude | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| 400 | 124 | 3：2：3 | 1：0.5：0.1 | 65.3\*\* | 96 | 3：2：3 | 1：1.4：1.44 | 8.4\* |
| 1250 | 66 | 3：2：3 | 1：0.3：0.02 | 48.69\*\* | 177 | 3：2：3 | 1：0.8：1.5 | 5.49 |
| 1890 | 118 | 3：2：3 | 1：0.4：0.03 | 69.66\*\* | 122 | 3：2：3 | 1：0.35：1.7 | 20.47\*\* |
| 2200 | 120 | 3：2：3 | 1：0.3：0.1 | 69.2\*\* | 106 | 3：2：3 | 1：0.5：1 | 2.12 |
| 400 | 116 | 7：2：7 | 1：0.2：0.03 | 81.37\*\* | 124 | 7：2：7 | 1：0.9：1.6 | 21.78\*\* |
| 1250 | 121 | 7：2：7 | 1：0.3：0.03 | 84.96\*\* | 118 | 7：2：7 | 1：0.4：0.7 | 5.21 |
| F4  1890 | 120 | 7：2：7 | 1：0.2：0.02 | 93.65\*\* | 85 | 7：2：7 | 1：0.3：1.1 | 0.5 |
| 2200 | 94 | 7：2：7 | 1：0.2：0.06 | 63.03\*\* | 102 | 7：2：7 | 1：0.2：1.4 | 4.89 |

F3

注：表中的期望比与实际比均为南34：杂合体：小麻谷。

Note: Expected ratio and actual ratio are nan34: heterozygote: xiaomagu**.**

表4-3 C418与小花谷杂交组合分离群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-3 Chi-square values of molecular markers genotype in segregation populations generated from C418 and xiaohuagu hybrid cross

世代海拔

C418×小花谷C418×Xiaohuagu

小花谷×C418 Xiaohuagu×C4118

| Generation Altitude | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 141 | 3: 2: 3 | 1: 0.5: 1.2 | 3.18 | 135 | 3: 2: 3 | 1: 0.9: 1.1 | 1.79 |
| 1250 | 201 | 3: 2: 3 | 1: 0.7: 1.2 | 1.49 | 251 | 3: 2: 3 | 1: 0.8: 2.5 | 48.04\*\* |
| F3  1890 | 134 | 3: 2: 3 | 1: 0.6: 1.4 | 3.75 | 112 | 3: 2: 3 | 1: 1.3: 1.7 | 7.81\* |
| 2200 | 97 | 3: 2: 3 | 1: 0.8: 1.8 | 6.34\* | 164 | 3: 2: 3 | 1: 0.7: 1.6 | 8.13\* |
| 400 | 93 | 7: 2: 7 | 1: 0.7: 1.3 | 9.87\*\* | 148 | 7: 2: 7 | 1: 0.7: 3.1 | 33.01\*\* |
| 1250 | 33 | 7: 2: 7 | 1: 0.6: 2 | 3.78 | 95 | 7: 2: 7 | 1: 1.1: 1.4 | 29.96\*\* |
| F4  1890 | 129 | 7: 2: 7 | 1: 0.4: 2.4 | 21.1\*\* | 126 | 7: 2: 7 | 1: 0.3: 4.4 | 56.58\*\* |
| 2200 | 78 | 7: 2: 7 | 1: 0.6: 1.3 | 4.41 | 182 | 7: 2: 7 | 1: 0.2: 0.8 | 3.93 |

注：表中的期望比与实际比均为C418：杂合体：小花谷。

Note: Expected ratio and actual ratio are C418: heterozygote: xiaohuagu**.**

表4-4 C418与小麻谷杂交组合分离群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-4 Chi-square values of molecular markers genotype in segregation populations generated from C418 and xiaomagu hybrid cross

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Generation Altitude | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| 400 | 198 | 3：2：3 | 1：2：1.8 | 36.23\*\* | 67 | 3：2：3 | 1：0.8：0.9 | 0.48 |
| 1250 | 156 | 3：2：3 | 1：2.7：1.5 | 59.66\*\* | 226 | 3：2：3 | 1：2：1.7 | 46.68\*\* |
| 1890 | 102 | 3：2：3 | 1：0.6：1.8 | 9.12\* | 114 | 3：2：3 | 1：0.9：1.3 | 1.74 |
| 2200 | 153 | 3：2：3 | 1：3：2.6 | 47.07\*\* | 147 | 3：2：3 | 1：4.9：4.6 | 59.02\*\* |
| 400 | 132 | 7：2：7 | 1：0.6：1.9 | 12.1\*\* | 187 | 7：2：7 | 1：0.4：0.4 | 35.75\*\* |
| 1250 | 86 | 7：2：7 | 1：0.8：2 | 12.02\*\* | 71 | 7：2：7 | 1：0.9：1.7 | 11.66\*\* |
| 1890 | 123 | 7：2：7 | 1：0.7：1.5 | 13.06\*\* | 141 | 7：2：7 | 1：1.4：2.5 | 47.45\*\* |
| 2200 | 91 | 7：2：7 | 1：0.8：2.8 | 17.6\*\* | 132 | 7：2：7 | 1：0.4：1.1 | 2.23 |

世代海拔

C418×小麻谷C418×Xiaomagu

小麻谷×C418 Xiaomagu×C418

F3

F4

注：表中的期望比与实际比均为C418：杂合体：小麻谷。

Note: Expected ratio and actual ratio are C418: heterozygote: xiaomagu**.**

表4-5 南34与小花谷杂交组合产生的测交F2代群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-5 Chi-square values of molecular markers genotype in test cross F2 populations generated from nan34 and xiaohuagu hybrid cross

| 海拔  Altitude |  | 合系 42A×（南 34×小花谷）  Hexi42A×(Nan34×Xiaohuagu) | |  |  | 合系 42A×（小花谷×南 34）  Hexi42A×(Xiaohuagu×Nan34) | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| 1250 | 153 | 1: 2: 1 | 1: 1.1: 0.1 | 50.25\*\* | 181 | 1: 2: 1 | 1: 2.1: 0.9 | 0.62 |
| 1890 | 94 | 1: 2: 1 | 1: 1.4: 0.1 | 29.66\*\* | 113 | 1: 2: 1 | 1: 1: 0.2 | 33.44\*\* |
| 2200 | 178 | 1: 2: 1 | 1: 1: 0.02 | 87.21\*\* | 108 | 1: 2: 1 | 1: 2.2: 0.2 | 19.91\*\* |

注：表中的期望比与实际比均为南34：杂合体：小花谷。

Note: Expected ratio and actual ratio are nan34: heterozygote: xiaohuagu.

表4-6 南34与小麻谷杂交组合产生的测交F2代群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-6 Chi-square values of molecular markers genotype in test cross F2 populations generated from nan34 and xiaomagu hybrid cross

| 海拔  Altitude |  | 合系 42A×（南 34×小麻谷）  Hexi42A×(Nan34×Xiaomagu) | |  |  | 合系 42A×（小麻谷×南 34）  Hexi42A×(Xiaomagu×Nan34) | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| 1250 | 179 | 1: 2: 1 | 1: 1.4: 0.1 | 55.66\*\* | - | - | - | - |
| 1890 | 81 | 1: 2: 1 | 1: 1.2: 0 | 34.41\*\* | 129 | 1: 2: 1 | 1: 1.5: 0.3 | 15.28\*\* |
| 2200 | 53 | 1: 2: 1 | 1: 0.9: 0.03 | 27.98\*\* | 42 | 1: 2: 1 | 1: 1.2: 0.1 | 15.52\*\* |

注：表中的期望比与实际比均为南34：杂合体：小麻谷。“-”表示未获得数据。下同

Note: Expected ratio and actual ratio are nan34: heterozygote: xiaomagu**.**" -" shows no data. The following are same

表4-7 C418与小花谷杂交组合产生的测交F2代群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-7 Chi-square values of molecular markers genotype in test cross F2 populations generated from C418 and xiaohuagu hybrid cross

| 海拔  Altitude |  | 合系 42A×（C418×小花谷）  Hexi42A×(C418×Xiaohuagu) | |  |  | 合系 42A×（小花谷×C418 ）  Hexi42A×(Xiaohuagu×C418) | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| 1250 | 91 | 1: 2: 1 | 1: 2.4: 0.3 | 15.13\*\* | 55 | 1: 2: 1 | 1: 2.1: 0.6 | 2.2 |
| 1890 | 132 | 1: 2: 1 | 1: 1.3: 0.2 | 29.45\*\* | 80 | 1: 2: 1 | 1: 1.3: 0.4 | 9.08\*\* |
| 2200 | 112 | 1: 2: 1 | 1: 1.9: 0.2 | 21.21\*\* | 93 | 1: 2: 1 | 1: 0.9: 0.1 | 39.24\*\* |

注：表中的期望比与实际比均为C418：杂合体：小花谷

Note: Expected ratio and actual ratio are C418: heterozygote: xiaohuagu

表4-8 C418与小麻谷杂交组合产生的测交F2代群体分子标记基因型的卡方检测

Tab. 4-8 Chi-square values of molecular markers genotype in test cross F2 populations generated from C418 and xiaomagu hybrid cross

| 海拔  Altitude |  | 合系 42A×（C418×小麻谷）  Hexi42A×(C418×Xiaomagu) | |  |  | 合系 42A×（小麻谷×C418 ）  Hexi42A×(Xiaomagu×C418) | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value | 样本  Sample | 期望比  Expected ratio | 实际比  Actual ratio | 卡方值  χ2 value |
| 1250 | - | - | - | -- | 111 | 1: 2: 1 | 1: 2.4: 0.6 | 7.36\* |
| 1890 | 78 | 1: 2: 1 | 1: 0.9: 0 | 45.69\*\* | 61 | 1: 2: 1 | 1: 1.4: 0.04 | 20.21\*\* |
| 2200 | 181 | 1: 2: 1 | 1: 1.1: 0.05 | 27.98\*\* | 160 | 1: 2: 1 | 1: 1: 0.1 | 60.14\*\* |

注：表中的期望比与实际比均为C418：杂合体：小麻谷

Note: Expected ratio and actual ratio are C418: heterozygote: xiaomagu

表4-9 海拔和细胞质对分离群体遗传分离比例的互作效应

Tab. 4-9 The interaction effect of segregation populations under altitude and cytoplasm

| 组合  Cross | 变异来源  Source | F3 F-值  F3 F-Value | F4 F-值  F4 F-Value |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 海拔 | 2.86\* | 3.19\* |
| 南 34-小花谷  Nan34-Xiaohuagu | 细胞质 | 31.11\*\* | 55.04\*\* |
| 海拔\*细胞质 | 4.11\*\* | 0.69 |
|  | 海拔 | 3.64\* | 3.15\* |
| 南 34-小麻谷  Nan34-Xiaomagu | 细胞质 | 44.25\*\* | 58.24\*\* |
| 海拔\*细胞质 | 1.72 | 2.8\* |
|  | 海拔 | 0.57 | 3.94\*\* |
| C418-小花谷  C418-Xiaohuagu | 细胞质 | 4.36\* | 0.05 |
| 海拔\*细胞质 | 1.27 | 4.21\*\* |
|  | 海拔 | 13.96\*\* | 7.48\*\* |
| C418-小麻谷  C418-Xiaomagu | 细胞质 | 0.14 | 10.27\*\* |
| 海拔\*细胞质 | 1.15 | 6.97\*\* |

表4-10 海拔和细胞质对测交F2代群体遗传分离比例的二因素方差分析

Tab. 4-10 The two-way analysis of variance to test cross F2 populations under altitude and cytoplasm

| 花粉组合  Cross of pollen | 变异来源  Source | 自由度  DF | 平方和  SS | 均方  MS | F 值  F-Value |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 海拔 | 2 | 0.116 | 0.058 | 0.07 |
| 南 34-小花谷  Nan34-Xiaohuagu | 细胞质 | 1 | 1.911 | 1.911 | 2.17 |
| 海拔\*细胞质 | 2 | 9.063 | 4.531 | 5.14\*\* |
|  | 海拔 | 2 | 5.335 | 2.667 | 2.83 |
| 南 34-小麻谷  Nan34-Xiaomagu | 细胞质 | 1 | 3.891 | 3.891 | 4.12\* |
| 海拔\*细胞质 | 2 | 0.695 | 0.695 | 0.74 |
|  | 海拔 | 2 | 4.485 | 2.242 | 2.58 |
| C418-小花谷  C418-Xiaohuagu | 细胞质 | 1 | 0.242 | 0.242 | 0.28 |
| 海拔\*细胞质 | 2 | 9.065 | 4.532 | 5.22\*\* |
|  | 海拔 | 2 | 4.572 | 2.286 | 2.48 |
| C418-小麻谷  C418-Xiaomagu | 细胞质 | 1 | 2.911 | 2.911 | 3.15 |
| 海拔\*细胞质 | 2 | 5.447 | 5.447 | 5.89\* |

胞质的互作效应均可对籼粳交后代产生影响，但影响的强弱因产生群体的组合不同而有所差异。

### **4.2.3** ***Rf-1***位点基因型遗传多样性及遗传分化的影响

#### **4.2.3.1** 海拔对分离群体遗传多样性及遗传分化的影响

海拔对不同组合产生的群体的遗传多样性存在显著影响（图4-2, 图4-3）。南34与小花谷或南34与小麻谷的杂交组合中，杂合度和信息指数在不同海拔间出现差异，但比较一致的是，F3代的遗传多样性在低海拔或高海拔较大，而F4代中则在中海拔或高海拔多样性较大。C418与小花谷的杂交组合中，遗传多样性在400m或2200m最大，其中多样性的最大值出现在2200m的组合中的杂合度和信息指数分别为0.4946和0.6877（附表5）。C418与小麻谷的杂交组合中，多样性在中高海拔较大。其中2200m产生的群体的多样性最大的杂合度和信息指数分别为0.4992和0.6923（附表5）。而海拔对不同杂交组合的遗传分化也会产生一定的影响。南34与小花谷的两个世代杂交组合中，400m与其他三个海拔产生的群体的遗传距离较大，而中高海拔群体间的距离较小，遗传分化系数也出现相同结果（表4-11, 表4-12）。聚类分析发现，1250m与中高海拔群体间的距离较小，而与400m的群体间的遗传分化较大（图4-4: A, B, 图4-5: J, K）。南34与小麻谷的遗传距离及遗传分化系数结果显示，群体间的遗传分化对海拔没有固定的指向性（表4-13, 表4-14），聚类分析也表明，不同世代的群体间的遗传分化在不同海拔出现不同的结果（图4-4: C，D，图4-5：

L: M）。C418与小花谷杂交组合和C418与小麻谷的杂交组合中，群体间的遗传分化与海拔没有直接的对应关系，且没有固定规律（表4-15~表4-18, 图4-4: E-H, 图4-5: N-Q）。

#### **4.2.3.2** 细胞质对分离群体遗传多样性及遗传分化的影响

不同组合产生群体的遗传多样性受到细胞质的影响较大（图4-2, 图4-3）。南34与地方粳稻杂交产生的两个世代的正反交群体中，反交群体（南34做父本）在四个海拔的遗传多样性均大于相同海拔产生的正交群体的多样性。而C418与地方粳稻杂交产生的两个世代的正反交群体的多样性出现差异，F3代正反交群体间的多样性随海拔不同而不同，而F4代中，两个组合产生的反交群体的多样性指数在1250m和2200m均高于相同海拔产生的正交群体（附表5）。另外，不同组合产生的正反交群体间的遗传分化同样受到细胞质的影响。南34与小花谷组合产生的两个世代的正反交群体间的遗传分化在1890m较大（表4-11, 表4-12）。而南34与小麻谷组合在F3代的分离群体中，正反交群体间的遗传分化在1890m较大，F4代则在低海拔地区较大（表4-13, 表4-14）。C418与小花谷组合中，F3代的正反交群体间的遗传分化在1250m较大，而F4代同样在低海拔地区分化较大（表4-15, 表4-16）。

C418与小麻谷组合产生的群体中，两个世代正反交群体间的遗传分化均在低海拔较大（表4-17, 表4-18）。F3代的相同海拔下，不同杂交组合产生的分离群体间的遗传分化在正反交群体间以及不同组合间存在差异。400m海拔下，南34做细胞质时产生的群体间的分化较大，而（小花谷×南34）和（小麻谷×C418）两个群体间的遗传分化却较小；而1250m、1890m和2200m海拔下，（南34×小花谷）与（南34×小麻谷）群体间的遗传分化均较小，而且在不同海拔均独立成枝。而C418与地方粳稻产生的杂交组合中，正反交群体间的遗传分化

在不同海拔间产生差异。例如在400m和1890m时，C418做细胞质与地方粳稻杂交产生的正交群体均与南34和粳稻杂交组合的反交群体遗传分化较小，而在2200m时，却是C418与小花谷杂交组合的正反交群体间的分化较小（图4-15）。F4代中，南34做细胞质与地方粳稻杂交产生的两个正交群体（南34×小花谷）与（南34×小麻谷）均在不同海拔独立成枝。另外在400m，（C418×小花谷）与（小麻谷×C418）的分化较小，且与（南34×小花谷）与（南34×小麻谷）间的分化较小。1250m，小麻谷做细胞质分别与南34和C418杂交产生的两个群体间的分化较小，且二者与（南34×小花谷）与（南34×小麻谷）的群体处在一个大的分枝中（图4-16）。



图4-2 南34与地方品种的杂交组合在不同海拔的遗传多样性

Fig. 4-2 Genetic diversity of hybrid cross generated from nan34 and landrice at altitudes



图4-3 C418与地方品种的杂交组合在不同海拔的遗传多样性

Fig. 4-3 Genetic diversity of hybrid cross generated from C418 and landrice at altitudes

表4-11 南34与小花谷杂交组合F3代分离群体的遗传分化系数及遗传距离

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | 南 34×小花谷Nan34×Xiaohuagu | |  |  | 小花谷×南 34 Xiaohuagu×Nan34 | |  |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0.0177 | 0.0436 | 0.0266 | 0.0115 | 0.0712 | 0.0582 | 0.0298 |
| 南 34×小花谷Nan34×Xiaohuagu | 1250 | 0.0202 |  | 0.0061 | 0.0009 | 0.0566 | 0.1535 | 0.1349 | 0.0907 |
| 1890 | 0.0423 | 0.0039 |  | 0.0023 | 0.0967 | 0.2116 | 0.1904 | 0.1386 |
|  | 2200 | 0.0284 | 0.0007 | 0.0013 |  | 0.0713 | 0.1756 | 0.1559 | 0.1086 |
|  | 400 | 0.0201 | 0.0822 | 0.1244 | 0.0987 |  | 0.0262 | 0.0184 | 0.0044 |
| 小花谷×南 34 Xiaohuagu×Nan34 | 1250 | 0.1414 | 0.2849 | 0.37 | 0.3187 | 0.052 |  | 0.0007 | 0.0093 |
| 1890 | 0.1144 | 0.2431 | 0.32 | 0.2737 | 0.0368 | 0.0013 |  | 0.0049 |
|  | 2200 | 0.0559 | 0.1483 | 0.2059 | 0.1711 | 0.0087 | 0.0178 | 0.0096 |  |

Tab. 4-11 Genetic differentiation index and genetic distance of F3 segregation populations generated from nan34 and xiaohuagu hybrid cross

注：上三角与下三角分别为遗传分化系数及遗传距离。下同。

Note: The above diagonal and the below diagonal are genetic differentiation index (GST) and Nei‟s genetic distance (D), respectively. The following are the same.

表4-12 南34与小花谷杂交组合F4代分离群体的遗传分化系数及遗传距离

Tab. 4-12 Genetic differentiation index and genetic distance of F4 segregation populations generated from

nan34 and xiaohuagu hybrid cross

| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | 南 34×小花谷  Nan34×Xiaohuagu | |  |  | 小花谷×南 34  Xiaohuagu×Nan34 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0.0151 | 0.0175 | 0.0045 | 0.2192 | 0.2847 | 0.3122 | 0.1317 |
| 南 34×小花谷Nan34×Xiaohuagu | 1250 | 0.0101 |  | 0.0611 | 0.035 | 0.1296 | 0.1839 | 0.2075 | 0.0622 |
| 1890 | 0.005 | 0.0296 |  | 0.0045 | 0.3216 | 0.3946 | 0.4249 | 0.22 |
|  | 2200 | 0.0016 | 0.0198 | 0.001 |  | 0.2712 | 0.341 | 0.3702 | 0.1756 |
|  | 400 | 0.3733 | 0.2433 | 0.4904 | 0.4363 |  | 0.0055 | 0.0108 | 0.0135 |
| 小花谷×南 34 Xiaohuagu×Nan34 | 1250 | 0.5348 | 0.3647 | 0.6899 | 0.6179 | 0.0089 |  | 0.0009 | 0.036 |
| 1890 | 0.6052 | 0.4173 | 0.7782 | 0.6976 | 0.0166 | 0.0012 |  | 0.0477 |
|  | 2200 | 0.1803 | 0.1005 | 0.254 | 0.2199 | 0.0264 | 0.0671 | 0.0868 |  |

表4-13 南34与小麻谷组合杂交F3代分离群体的遗传分化系数和遗传距离

Tab. 4-13 Genetic differentiation index and genetic distance of F3 segregation populations generated from nan34 and xiaomagu hybrid cross

| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | 南 34×小麻谷Nan34×Xiaomagu | |  |  | 小麻谷×南 34 Xiaomagu×Nan34 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0.0069 | 0.0007 | 0.0004 | 0.1445 | 0.1583 | 0.188 | 0.1067 |
| 南 34×小麻谷Nan34×Xiaomagu | 1250 | 0.0034 |  | 0.0033 | 0.0041 | 0.2037 | 0.2193 | 0.2528 | 0.1598 |
| 1890 | 0.0004 | 0.0015 |  | 0.0001 | 0.1625 | 0.1769 | 0.2079 | 0.1226 |
|  | 2200 | 0.0002 | 0.0019 | 0 |  | 0.1574 | 0.1716 | 0.2023 | 0.1181 |
|  | 400 | 0.2434 | 0.3149 | 0.2665 | 0.2601 |  | 0.0004 | 0.0034 | 0.0033 |
| 小麻谷×南 34 Xiaomagu×Nan34 | 1250 | 0.2741 | 0.3512 | 0.299 | 0.2921 | 0.0007 |  | 0.0015 | 0.0059 |
| 1890 | 0.3425 | 0.432 | 0.3715 | 0.3634 | 0.0062 | 0.0028 |  | 0.0133 |
|  | 2200 | 0.1631 | 0.2195 | 0.1813 | 0.1762 | 0.0065 | 0.0115 | 0.0257 |  |

表4-14 南34与小麻谷杂交组合F4代分离群体的遗传分化系数和遗传距离

Tab. 4-14 Genetic differentiation index and genetic distance of F4 segregation populations generated from nan34 and xiaomagu hybrid cross

| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | 南 34×小麻谷  Nan34×Xiaomagu | |  |  | 小麻谷×南 34  Xiaomagu×Nan34 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0.0023 | 0.0023 | 0 | 0.2408 | 0.128 | 0.1905 | 0.2354 |
| 南 34×小麻谷Nan34×X iaomagu | 1250 | 0.0009 |  | 0.009 | 0.0022 | 0.2046 | 0.1 | 0.1574 | 0.1995 |
| 1890 | 0.0006 | 0.003 |  | 0.0024 | 0.2769 | 0.1574 | 0.224 | 0.2713 |
|  | 2200 | 0 | 0.0008 | 0.0007 |  | 0.2401 | 0.1274 | 0.1898 | 0.2347 |
|  | 400 | 0.3848 | 0.3414 | 0.4242 | 0.3839 |  | 0.022 | 0.0038 | 0 |
| 小麻谷×南 34 Xiaomagu×Nan34 | 1250 | 0.1464 | 0.123 | 0.1679 | 0.1459 | 0.0439 |  | 0.0076 | 0.0202 |
| 1890 | 0.2693 | 0.2353 | 0.3003 | 0.2686 | 0.0073 | 0.0151 |  | 0.003 |
|  | 2200 | 0.3718 | 0.3295 | 0.4103 | 0.371 | 0.0001 | 0.0403 | 0.0059 |  |

表4-15 C418与小花谷杂交组合F3代分离群体的遗传分化系数和遗传距离

Tab. 4-15 Genetic differentiation index and genetic distance of F3 segregation populations generated from C418 and xiaohuagu hybrid cross

| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | C418×小花谷C418×Xiaohuagu | |  |  | 小花谷×C418 Xiaohuagu×C418 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0.0001 | 0.001 | 0.0065 | 0.0001 | 0.0232 | 0.0038 | 0.004 |
| C418×小花谷C418×Xiaohuagu | 1250 | 0.0002 |  | 0.0005 | 0.0051 | 0.0004 | 0.0205 | 0.0027 | 0.003 |
| 1890 | 0.0019 | 0.001 |  | 0.0024 | 0.0017 | 0.0147 | 0.0009 | 0.001 |
|  | 2200 | 0.0123 | 0.0097 | 0.0045 |  | 0.0082 | 0.0052 | 0.0004 | 0.0003 |
|  | 400 | 0.0002 | 0.0007 | 0.0034 | 0.0156 |  | 0.0262 | 0.0051 | 0.0054 |
| 小花谷×C418 Xiaohuagu×C418 | 1250 | 0.0409 | 0.0359 | 0.0248 | 0.0082 | 0.0469 |  | 0.0083 | 0.0079 |
| 1890 | 0.0072 | 0.0052 | 0.0017 | 0.0007 | 0.0098 | 0.0135 |  | 0 |
|  | 2200 | 0.0077 | 0.0057 | 0.0019 | 0.0005 | 0.0104 | 0.0128 | 0 |  |

表4-16 C418与小花谷杂交组合F4代分离群体的遗传分化系数和遗传距离

Tab. 4-16 Genetic differentiation index and genetic distance of F4 segregation populations generated from C418 and xiaohuagu hybrid cross

| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | C418×小花谷C418×Xiaohuagu | |  |  | 小花谷×C418 Xiaohuagu×C418 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0.0364 | 0.0585 | 0.0124 | 0.0768 | 0.0137 | 0.1313 | 0 |
| C418×小花谷C418×Xiaohuagu | 1250 | 0.0714 |  | 0.0028 | 0.0064 | 0.0079 | 0.0056 | 0.032 | 0.0358 |
| 1890 | 0.1114 | 0.0041 |  | 0.0175 | 0.0013 | 0.0161 | 0.0162 | 0.0578 |
|  | 2200 | 0.0248 | 0.0115 | 0.0294 |  | 0.0284 | 0 | 0.0659 | 0.0121 |
|  | 400 | 0.1423 | 0.0109 | 0.0294 | 0.0454 |  | 0.0266 | 0.0083 | 0.076 |
| 小花谷×C418 Xiaohuagu×C418 | 1250 | 0.0273 | 0.0099 | 0.0268 | 0.0001 | 0.0421 |  | 0.0632 | 0.0133 |
| 1890 | 0.2235 | 0.0371 | 0.0164 | 0.0918 | 0.0076 | 0.0871 |  | 0.1302 |
|  | 2200 | 0 | 0.0702 | 0.1099 | 0.0242 | 0.1405 | 0.0266 | 0.2212 |  |

表4-17 C418与小麻谷杂交组合F3代分离群体的遗传分化系数和遗传距离

Tab. 4-17 Genetic differentiation index and genetic distance of F3 segregation populations generated from C418 and xiaomagu hybrid cross

| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | C418×小麻谷C418×Xiao magu | |  |  | 小麻谷×C418 Xiaomagu×C418 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0.0012 | 0.0008 | 0.0013 | 0.0206 | 0.0002 | 0.0018 | 0.0082 |
| C418×小麻谷C418×Xiaomagu | 1250 | 0.0023 |  | 0.0039 | 0.005 | 0.0119 | 0.0004 | 0.0001 | 0.0157 |
| 1890 | 0.0013 | 0.0072 |  | 0.0001 | 0.0291 | 0.0018 | 0.0049 | 0.004 |
|  | 2200 | 0.0023 | 0.0091 | 0.0001 |  | 0.032 | 0.0026 | 0.0061 | 0.003 |
|  | 400 | 0.0412 | 0.0238 | 0.0578 | 0.0633 |  | 0.0165 | 0.0103 | 0.0542 |
| 小麻谷×C418 Xiaomagu×C418 | 1250 | 0.0004 | 0.0007 | 0.0033 | 0.0047 | 0.033 |  | 0.0007 | 0.0112 |
| 1890 | 0.0034 | 0.0001 | 0.009 | 0.0113 | 0.0206 | 0.0014 |  | 0.0176 |
|  | 2200 | 0.0135 | 0.0271 | 0.0063 | 0.0047 | 0.1043 | 0.0188 | 0.0307 |  |

表4-18 C418与小麻谷杂交组合F4代分离群体的遗传分化系数和遗传距离

Tab. 4-18 Genetic differentiation index and genetic distance of F4 segregation populations generated from C418 and xiaomagu hybrid cross

| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔  Altitude |  | C418×小麻谷  C418×Xiao magu | |  |  | 小麻谷×C418  Xiaomagu×C418 | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 400 | 1250 | 1890 | 2200 | 400 | 1250 | 1890 | 2200 |
|  | 400 |  | 0 | 0.0032 | 0.0053 | 0.0806 | 0.0517 | 0.0006 | 0.0224 |
| C418×小麻谷C418×Xiaomagu | 1250 | 0 |  | 0.0031 | 0.0055 | 0.0801 | 0.0513 | 0.0007 | 0.0221 |
| 1890 | 0.0057 | 0.0055 |  | 0.0168 | 0.0525 | 0.0295 | 0.0066 | 0.0087 |
|  | 2200 | 0.0078 | 0.008 | 0.027 |  | 0.1248 | 0.0887 | 0.0023 | 0.049 |
|  | 400 | 0.1613 | 0.1603 | 0.103 | 0.2495 |  | 0.0034 | 0.0946 | 0.0188 |
| 小麻谷×C418 Xiaomagu×C418 | 1250 | 0.1033 | 0.1025 | 0.0589 | 0.173 | 0.0056 |  | 0.0632 | 0.0063 |
| 1890 | 0.001 | 0.001 | 0.0114 | 0.0033 | 0.1898 | 0.125 |  | 0.0303 |
|  | 2200 | 0.0433 | 0.0428 | 0.0173 | 0.0895 | 0.0344 | 0.012 | 0.0575 |  |





图4-4 F3代杂交组合在不同海拔间的遗传分化

Tab. 4-4 Genetic differentiation of F3 hybrid crosses at altitudes

注：A：南34与小花谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；B：南34与小花谷杂交组合在不同

海拔产生的反交群体；C：南34与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；D：南34与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的反交群体；E: C418 与小花谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；

F: C418与小花谷杂交组合在不同海拔产生的反交群体；G: C418与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；H: C418与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的反交群体



图4-5 F4代杂交组合在不同海拔间的遗传分化

Tab. 4-5 Genetic differentiation of F4 hybrid crosses at altitudes

注：J：南34与小花谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；K：南34与小花谷杂交组合在不同

海拔产生的反交群体；L：南34与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；M：南34与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的反交群体；N: C418 与小花谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；

O: C418与小花谷杂交组合在不同海拔产生的反交群体；P: C418与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的正交群体；Q: C418与小麻谷杂交组合在不同海拔产生的反交群体



图4-6 F3代正反交组合在相同海拔的遗传分化

Tab. 4-6 Genetic differentiation of F3 reciprocal populations at same altitude



图4-7 F4代正反交组合在相同海拔的遗传分化

Tab. 4-7 Genetic differentiation of F4 reciprocal populations at same altitude

## 4.3 讨论

育性恢复基因（*Rf*）是杂种优势利用的关键基因，它广泛存在于热带、亚热带地区的野生稻和籼稻种质中，而温凉地区的粳稻中是不具有恢复基因的（Shinjyo, 1975； 李铮友，1980；袁隆平，

2002）。云南地势复杂，海拔差异较大，自76m的河口到2695m的宁蒗县均可种植水稻（谭亚玲等，2009），所以云南可同时种植籼稻和粳稻。一般而言，1400m 以下为籼稻种植区，1600m 以上为粳稻种植区，1400m-1600m 为籼粳交错区（曾亚文等，2001）。本研究将不同杂交组合分别种植在籼、粳稻种植区及籼粳交错区，就是为了利用这种海拔差异产生的温度变异来研究恢复基因位点的遗传分离、遗传多样性及遗传分化。结果表明，海拔可导致不同分离群体在*Rf-1*位点出现不同程度的遗传分离以及遗传分化。

本研究中，当南34为细胞质供体时，四个海拔产生的分离群体在*Rf-1*位点均偏向具有籼稻细胞质背景的南34，该结果与F2代结果一致，且在400m海拔下，随世代的增高（自F2代到F4代），偏离程度升高（王昌江，2012）。产生这种偏分离主要是由于南34具有与恢复基因*Rf-1*等位的*Rf-d1*以及不育胞质，所以配子选择利于具有恢复基因的配子体。另外，南34做细胞质与小花谷或小麻谷杂交产生的后代分离群体自F2代开始，连续三个世代均发生偏分离，所以推测，遗传偏分离一旦发生，就会代代遗传。另外，结合本实验室对南34与小麻谷杂交组合的F2代的遗

传多样性及遗传分化的研究结果表明，F2代正交及反交群体的遗传多样性在2200m最丰富，而高世代只有F3代反交群体的遗传多样性在2200m最丰富，遗传分化也如此，F2代正反交群体间的遗传分化在400m与2200m群体间最大，但到高世代时却出现差异。虽然如此，但对三个世代的研究同样可以表明，海拔的确可以对群体的遗传分化造成不同程度的影响。但不同世代间的遗传分化出现差异，可能是由于材料的种植年份和地点不同，使得不同世代群体适应环境的能力有差别所致。利用遗传距离构建的遗传分化树也显示，南34做细胞质时在不同海拔产生的群体基本聚为一枝，其中，中海拔的群体间关系较近，而与高海拔地区的关系较远，即遗传分化较大。推测随着海拔差异增大导致的温度变化增大时，后代群体的基因型频率变化较大，发生偏分离的程度也较大，从而导致群体的遗传分化程度较大。不同作物对海拔的要求有所差异，所以导致作物的遗传多样性对温度的响应有所差异。大麦和小麦在高海拔地区多样性均较大，而高粱的遗传多样性却在中低海拔较大（Tanto and Demissie, 2000）。海拔同样影响水稻的遗传多样性。对云南地方籼、粳稻进行研究发现，籼稻在1400m以下遗传多样性较大，而粳稻在1800m以上的粳稻区才表现出较大的多样性（曾亚文等，2001），并发现低海拔的籼稻的遗传多样性要高于高海拔的粳稻的遗传多样性（寇姝燕等，2009）。

南34与C418均为粳稻恢复系，二者均具有核恢复基因，但南34具有不育胞质（洪汝科等, 2004; Wang *et al.,* 2009），而C418为正常可育胞质（杨振玉等，1998）。所以，C418做细胞质供体与小花谷或与小麻谷杂交产生的两个世代的杂交组合中，由于雄配子发生选择，使发生偏分离的群体大多数偏向地方品种小花谷或小麻谷。自交配子体不亲和、不正常分离的配子体及种间杂交后代的亲本基因型消除等都是由配子体选择引起的（Brink and Cooper,1938; Nelson, 1952,1962）。雄配子体的数量远多于雌配子体，而且较易受到环境因素的影响，温度的变化较大会导致雄配子体发生变化，除了可以影响育性外（第三章），还会对群体的遗传结构产生影响。尽管如此，但在杂交后代中仍然不能排除雌配子的影响。本研究中，当小花谷或小麻谷做细胞质供体与南34或C418杂交产生的杂交后代中，发生偏分离的群体均偏向细胞质供体小花谷或小麻谷，推测是由于雌配子体发生趋异性选择，导致基因型频率发生变化，从而影响群体的遗传结构。另外，C418

与云南地方粳稻杂交产生的正反交F2代群体均符合孟德尔分离定律（王昌江，2012），但自交得到的F3代及F4代，群体中开始有部分群体发生偏分离，推测在F2代时就已经发生了配子体选择，而后自交到F3代时，由于上一代在配子体世代中配子体发生选择，影响了下一代的孢子体世代，从而导致群体的遗传结构发生变化。换言之，在F2代时，虽然分离群体的基因型频率保持着平衡，但配子体已经发生选择效应，所以在下一代中，这种选择效应得以表现，从而影响群体的遗传结构（Sato, 1990）。

本研究对南34与小麻谷的结果表明，在粳稻细胞质背景下，F3及F4代群体的遗传多样性较高，该结果与本实验室对F2代的研究结果一致，但不同细胞质背景下群体的遗传分化在不同海拔间有所差别，F2代和F3代正反交群体间的遗传分化均在中海拔地区较高，但F4代却在400m的低海拔地区最高。细胞质对群体的遗传偏分离的影响大于海拔产生的影响，且随着世代的增高，细胞质的影响增大，海拔的影响却减小，但仍具有显著影响，所以海拔与细胞质的互作效应出现增长趋势，到F4代时出现显著影响（王昌江，2012）。所以推测，在*Rf-1*位点上，海拔和细胞质的互作效应对配子体的选择具有明显的效应，使正反交群体间的最大遗传分化出现在适合恢复基因存在的热带地区，所以F4代的遗传分化在400m最大。

本研究利用籼粳交改良品系南34及C418与云南地方高海拔老品种的正反交F1代做父本与稳定的细胞质雄性不育系合系42A测交，结果三个海拔的测交F2群体均偏向南34或C418，说明在*Rf-1*位点上，受到68923-8标记的影响，不同杂交组合在中高海拔（1890m和2200m）产生的群体均偏向具有恢复基因的亲本。Ichikawa等（1997）的研究表明，*Rf-1*基因位于水稻基因组的籼型基因结构内，说明*Rf-1*仅位于具有籼型结构的野生稻及籼稻中。这与育种实践中水稻育性恢复基因分布在野生稻及籼稻中，而粳稻中没有恢复基因（Shinjyo,1975;李铮友等, 1980）的说法是一致的。但此测交F2代的偏向和C418与小花谷或小麻谷的正反交群体的偏向正好相反，推测是由于正反交群体做花粉供体所导致。另外对测交F1代的研究中使用的*Rf-1*位点上的另一种标记

M45461，其结果表明，所有组合在不同海拔产生的群体均极显著的偏向小花谷或小麻谷（王昌江，

2012），推测虽然两个标记均为*Rf-1* 位点上的标记，但遗传距离有所差异，所以产生的偏离方向有所不同。但该结果还有待进一步研究。

对于质核互作而言，籼稻细胞质与粳稻细胞核的互作不协调，可以导致一系列的生理代谢异常（朱英国，1979），细胞质雄性不育就是其中之一。所以，在籼稻细胞质背景时产生的不育较多，以此为基础构建的籼粳交后代中，育性较低，遗传结构发生变化的可能性较大。

云南地方品种历史悠久，不仅是水稻育种研究的宝贵资源，也是研究籼粳分化的理想材料。且云南境内海拔差异较大，可种植水稻的范围较广，从76m的河口到2670m的永宁乡均可种植

（谭亚玲等，2009），这种独特的立体气候决定了它可能是亚洲栽培稻的起源中心或传播中心之一

（曾亚文等，2001），所以本研究利用这种独特的立体气候优势，加上特殊的实验材料来对*Rf-1*

位点上分离群体的遗传变异进行研究，其结果可以成为籼粳分化研究的有益参考。

# 第五章 结论与展望

## **5.1** 结论

（1）根据*Rf-1*位点PCR片段的序列差异发现，野生稻与籼稻间的亲缘关系较近，而籼粳亚种间的亲缘关系较远。本研究首次利用恢复基因位点上的标记对不同水稻种质的PCR片段进行序列分析，该结果可以为籼粳进化以及和恢复基因间的关系研究奠定基础。

（2）粳稻细胞质背景下，各种基因型的配子体都可以较好的繁殖，而籼稻细胞质的材料更适合种植于中低海拔。这一结论可以为籼粳杂交中不同海拔试验点的父母本选择提供参考。

（3）籼稻细胞质较易受海拔的影响而发生偏分离，且偏向提供细胞质的亲本。

（4）在籼稻细胞质背景下，中低海拔（400m和1250m）的遗传多样性较丰富，而粳稻细胞质背景的遗传多样性在中高海拔（1890m和2200m）较丰富。海拔和细胞质可以对群体的遗传多样性及遗传分化产生显著影响。

## **5.2** 展望

本研究对不同水稻种质*Rf-1*基因片段序列分析，为探讨恢复基因位点序列在野生稻、籼稻和粳稻的遗传变异提供很好的参考，也为探讨环境温度对*Rf-1*基因频率的影响提供了有价值的参考。籼粳不同细胞质适合的环境温度有所区别，在不同海拔下，不同细胞质背景的亲本产生的杂交组合的小穗育性有所区别，籼稻细胞质背景的杂交组合在低海拔地区更加适宜，而粳稻细胞质背景的分离群体则在温凉地区更加适合生长发育，所以本研究结果可以用于指导杂交粳稻恢复系育种的父母本选择及适宜环境温度育种点的选择。

参考文献

[1] 陈倩, 沈佐锐, 王永模. 蚜虫的表型可塑性及其遗传基础[J]. [昆虫学报](http://www.wanfangdata.com.cn/qikan/periodical.Articles/kcxb/index.html), 2006, 49(5): 859-866.

[2] 陈士强, 王忠, 刘满希, 等. 水稻花粉萌发及花粉管生长动态[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(5): 513-517.

[3] 陈仁天, 唐茂艳, 王强, 等. 水稻花期高温胁迫影响颖花育性生理机理研究进展[J]. 南方农业学报, 2012, 43(6): 753-758.

[4] 程侃声, 王象昆, 周季维, 等. 云南稻种资源的综合研究与利用Ⅱ, 亚洲栽培稻的籼粳分类的再认识[J]. 作物学报, 1984, (10): 271-280.

[5] 程保ft, 万志兵, 洪德林. 35个粳稻品种SSR指纹图谱的构建及遗传相似性分析[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(3): 1-8.

[6] 段世华, 李绍清, 李绍波. 野生稻与亚洲栽培稻的遗传多样性[J]. 作物学报, 2009, 3, 467-474.

[7] 戴陆园, 叶昌荣, 徐福荣, 等. 云南稻种昆明小白谷耐冷性指标性状的遗传分析[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(2): 73-75.

[8] 丁颖. 中国栽培稻种的起源及其演变[J]. 农业学报, 1957, 8(3): 243-260.

[9] 段世华, 毛加宁, 朱英国. 用微卫星标记对我国杂交水稻主要恢复系遗传差异的检测分析[J]. 遗传学报, 2002, 29: 250-254.

[10] 冯富娟, 王凤友, 李长松. 长白ft三海拔条件下红松的遗传分化[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(3): 1-3.

[11] 高丽, 杨波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的ISSR分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(3): 250-257.

[12] 郭水良, 张东旭, 曹同. 浙江产车前（*Plantago asiatica*)种群遗传分化的主坐标分析[J]. 应用生态学报, 2002, 13(10): 1283-1286.

[13] 洪汝科, 李铮友, 王樨, 等. 抗病优质滇型粳稻恢复系南34的选育及应用[J]. 西南农业学报, 2004, 17: 85-87.

[14] 黄青阳, 景润春, 何予卿, 等. 水稻红莲型细胞质雄性不育性及其恢复性的遗传. 武汉大学学报[J]. 1999, 4(45): 455-458.

[15] 黄文坤, 郭建英, 万方浩, 等. 紫茎泽兰群体遗传多样性及遗传结构的AFLP分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 992-1000.

[16] 贺和初. 滇一型和BT型杂交稻育性遗传和不育机理研究[J]. 云南农业大学学报, 1988, 3(1): 54-68.

[17] 黄燕红, 孙新立, 王象坤. 亚洲栽培稻分散起源的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(3): 185-190.

[18] 黄燕红, 孙新立, 王象坤. 中国栽培稻遗传多样性中心和起源研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 125-129.

[19] 姜志磊, 杨欣明, 王瑞, 等. 基于SSR的梭罗草遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(3): 315-318.

[20] 景润春, 何予卿, 黄青阳, 等. 水稻野败型细胞质雄性不育恢复基因的ISSR和SSLP标记分析[J]. 中国农业科学, 2000, 33(2): 10-15.

[21] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 宁波: 浙江科学技术出版社, 1999.

[22] 蒋义明. 高温对滇型杂交水稻雄性不育系育性的影响[J]. 云南农业大学学报, 1988, 3(2): 99- 107.

[23] 姜国勇, 祁建民, 杨仁崔. 亚洲栽培稻起源与演化[J]. 福建农林大学学报, 2002, 1(31): 6-10.

[24] 寇姝燕, 云南水稻育性恢复基因*Rf-1*位点结构多态性研究[D]. 云南农业大学, 博士学位论文, 2009.

[25] 刘忠松, 官春云, 陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用[M]. 中国农业出版社, 2000.

[26] 刘刚, 许盛宝, 倪中福, 等. 小麦RIL群体SSR标记偏分离的遗传分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15 (5): 828-83.

[27] 刘炜, 李自超, 史延丽, 等. 利用SSR标记进行粳稻品种的遗传多样性研究[J]. 西南农业学报, 2005, 18(5): 509-513.

[28] 刘海燕, 崔金腾, 高用明. 遗传群体偏分离研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 613-617.

[29] 李泽炳, 肖翊华, 朱英国, 等. 杂交水稻的研究与实践[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 172.

[30] 李铮友, 纳信真, 黄本铣, 等. 滇型杂交水稻[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1980, 16-17.

[31] 李广贤, 屠国庆, 张克勤, 等. 应用微卫星标记定位水稻恢复系密阳46的主效和微效恢复基因[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(6): 506-510.

[32] 黎垣庆. IR24恢复基因遗传的系谱分析[J]. 中国农业科学, 1985, 1: 24-31.

[33] 吕川根, 王才林, 宗寿余, 等. 温度对水稻亚种间杂种育性及结实率的影响[J]. 作物学报, 2002, 28(4): 499-504.

[34] 刘克德, 张启发, 张端品, 等. 云南地方稻种的遗传变异和籼粳分化[J]. 植物学报, 1995, 37(9): 718-724.

[35] 梁耀懋, 陆岗, 黎坤爱, 等. 栽野稻杂交F1的进化遗传[J]. 西南农业学报, 1997, 10（4）: 7-10.

[36] 李太贵. 水稻开花期的低温对结实率的影响[J]. 作物学报, 1988, 14(1): 66-70.

[37] 李成德. 高温导致水稻出现大量空壳分析[J]. 陕西农业科学, 2003, 5: 45-47.

[38] 李自超, 张洪亮, 曾亚文, 等. 云南稻种资源表型遗传多样性的研究[J]. 作物学报, 2001, 27(5): 832-837.

[39] 孟金陵. 花粉选择的研究进展[J]. 遗传, 1990, 12(5): 39-42.

[40] 马育华. 田间试验和统计方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.

[41] 苏晓华, 张倚纹, 郑先武, 等. 利用RAPD分析大青杨天然群体的遗传结构[J]. 林业科学, 1997, 33(6): 504-511.

[42] 孙红芹. 两个恢保性能不同的水稻品种的恢复性遗传分析[D]. 硕士学位论文, 扬州大学, 2004, 1-2.

[43] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 等. 普通野生稻和亚洲栽培稻核基因组的RFLP分析[J]. 中国农业科学, 1997a, 30(4): 37-44.

[44] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 等. 普通野生稻和亚洲栽培稻叶绿体DNA的籼粳分化[J]. 农业生物技术学报, 1997b, 5(4): 319-323.

[45] 孙传清, 袁平荣, 吉村淳, 等. 亚洲栽培稻的核DNA、线粒体DNA和叶绿体DNA籼粳分化的比较研究[J]. 作物学报, 1998a, 24(6): 677-686.

[46] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 等. 普通野生稻和亚洲栽培稻线粒体DNA的RFLP分析[J]. 遗传学报, 1998b, 25(1): 40-45.

[47] 宋宪亮, 孙学振, 张天真. 偏分离及对植物遗传作图的影响[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(2): 286-292.

[48] 盛婧, 陶红娟, 陈留根． 灌浆结实期不同时段温度对水稻结实与稻米品质的影响[J]． 中国水稻科学, 2007, 21(4): 396-402．

[49] 邰丽梅, 杜鹃, 曾亚文, 等. 思茅地区核心稻种籼粳特异性标记的聚类分析[J]. 西南农业学报, 2006, 19: 49-53.

[50] 谭学林, 师常俊. 水稻不同胞质育性恢复基因分子定位及其相互关系[J], 杂交水稻, 1999, 14(3): 37-39.

[51] 谭亚玲, 王石华, 洪汝科, 等. *Rf-1*位点CAPS标记对水稻不同胞质雄性不育育性恢复系的关系分析, 分子植物育种, 2009, 7(3): 461-464.

[52] 谭亚玲, 谭学林. 滇一型杂交粳稻恢复基因的分子鉴定研究. 分子植物育种, 2004, 2(2), 209-214.

[53] 谭亚玲, 王石华, 文建成, 等. 水稻不同胞质雄性不育育性恢复基因相互关系的研究[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 461-464.

[54] 汤陵华. 亚洲主要稻作国家栽培稻在同工酶位点上的差异[J]. 作物学报, 1991, 17(6): 409-416.

[55] 王昌江, 文建成, 雷伟, 等. 一个位于水稻*Rf-1* 基因的InDel 标记遗传分离对海拔和细胞

质的响应[J]. 分子植物育种, 2011, 9(2): 150-155.

[56] 王石华, 在不同海拔产生的水稻正反交F2群体的遗传变异研究[D]. 云南农业大学, 博士学位论文, 2009.

[57] 王石华, 谭亚玲, 谭学林, 等. 籼粳稻细胞质背景下*Rf-1*位点PCR标记的遗传分离研究[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 456-460.

[58] 王昌江. 海拔和细胞质因素对水稻农艺性状及*Rf-1*位点基因型遗传分离的影响[D]. 云南农业大学, 硕士学位论文, 2012

[59] 王玉锋, 黄霁月, 杨金水. 基因工程培育可恢复的植物雄性不育系的研究进展[J].遗传, 2010, 1-11.

[60] 王象坤, 张居中. 中国稻作起源与演化[J]. 科学通报, 1998, 43(22): 2354-2363.

[61] 王三良, 许可. 我国籼型杂交水稻育种现状、问题与对策[J]. 杂交水稻, 1996, 3: 1-4.

[62] 徐福荣, 戴陆园, 叶昌荣, 等. 云南稻种资源表现型分布地和分布民族分析[J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(1): 14-19.

[63] 夏明元, 戚华雄. 高温热害对四个不育系配制的杂交组合结实率的影响[J]. 湖北农业科学, 2004, 2: 21-22.

[64] 游修龄. 从河姆渡遗址出土稻谷试论我国栽培稻的起源、分化与传播[J]. 作物学报, 1979, 5(3): 1-10.

[65] 应杰政, 施勇锋, 庄杰云, 等. 用微卫星标[记评估中国水稻主栽品种的遗传多样性](http://jour.duxiu.com/JourDetail.jsp?dxNumber=100114262249&amp;d=F7A123E53600D9B4E8B70FF1CD2EB931)[J]. 中国农业科学, 2007, 4: 649-655.

[66] 袁隆平主编. 杂交水稻学. 中国农业出版社[M]. 北京, 2002.

[67] 亓芳丽, 姜明松, 袁守江, 等. 水稻野败型细胞质雄性不育恢复基因*Rf3*的定位[J]. 中国农业通报, 2008, 8(24): 114-117.

[68] 杨旭, 谭学林. 滇型杂交粳稻主要亲本的SSR指纹图谱及其遗传差异分析[J]. 杂交水稻, 2009, 24(6): 54 - 58.

[69] 杨振玉, 张宗旭, 魏耀林, 等. 粳型特异亲和恢复系C418的选育及其特性[J]. 杂交水稻, 1998, 13(3): 31-32.

[70] 叶昌荣, 戴陆园, 廖新华, 等. 低温诱导下水稻花药和不育花粉数的变化及其与耐冷性的关系[J]. 西南农业学报, 1996, 9(3): 1-6.

[71] 杨杰, 万建民, 翟虎渠, 等. 温度对亚种间杂种花粉育性的影响[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(2): 145-148.

[72] 杨忠义, 曹永生, 苏艳, 等. 中国栽培稻的籼粳分化机理再论[J]. 西南农业学报, 2007, 20(3): 321-326.

[73] 杨竹平, 韩佩莱, 沈革志, 等. 水稻亚种间杂种的小穗育性遗传[J]. 上海农业学报, 1993, 9(1):

1-5.

[74] 严建兵, 汤华, 黄益勤, 等. 玉米F2群体分子标记偏分离的遗传分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(10): 913-918.

[75] 严长杰, 梁国华, 顾世梁, 等. 水稻籼粳杂种不育性及其类型[J]. 作物学报, 2003, 4（29): 574-580.

[76] 阳峰萍, 胡志萍, 刘海林, 等. 对“九五”以来选育的三系杂交水稻恢复系的分析[J]. 江西农业学报, 2007, l9(2): 21-24.

[77] 朱英国. 水稻不同细胞质类型雄性不育系的研究[J]. 作物学报, 1979, 5(4): 29-38.

[78] 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.

[79] 赵桂仿, Francois F, Philippe K. 应用RAPD技术研究阿尔卑斯ft黄花茅居群内的遗传分化[J]. 植物分类学报, 2000, 38(1): 64-70.

[80] 曾亚文, 李自超, 杨忠义, 等. 云南地方稻种籼粳亚种的生态群分类及其地理分布[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 15-20.

[81] 曾亚文, 申时全, 林兴华, 等. 强耐冷性籼粳亚种间杂种后代孕穗期的耐冷性研究[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(5): 411-416.

[82] 郑志广. 光温条件对水稻结实及干物质生产的影响[J]. 北京农学院学报, 2003, l8(1): 13-16.

[83] 张桂莲, 陈立云, 张顺堂, 等. 高温胁迫对水稻花粉粒性状及花药显微结构的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(3): 1089-1097.

[84] 张建勇, 袁佐清, 李仕贵. 微卫星标记分析籼粳亚种间的遗传多样性[J]. ft东理工大学学报, 2005, 19(2): 22-27.

[85] 张武汉, 邓华凤, 陈良碧, 等. 非AA型野生稻叶绿体DNA籼粳特性研究[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(3): 93-97.

[86] 庄杰云, 钱惠荣, 林鸿宣, 等. 应用RFLP标记研究亚洲栽培稻的起源与分化[J]. 中国水稻科学, 1995, 9(3): 135-140.

[87] 张帆, 万雪琴, 潘光堂. 玉米F2群体分子标记偏分离的遗传分析[J]. 作物学报, 2006, 32(9): 1391 -1396.

[88] 周拾禄. 中国是稻之原产地[J]. 中国稻作, 1948, 7(5): 53-54.

[89] 张尧忠, 徐宁生. 酯酶酶带籼粳分类法及稻种籼粳分类体系的讨论[J]. 西南农业学报, 1998, 11(3): 88-93.

[90] 张尧忠, 徐宁生. 关于亚洲栽培稻演化的探讨[J]. 西南农业学报, 1994, 8(1): 71-74.

[91] 张尧忠, 杨桂芬, 徐宁生, 等. 一条新的酯酶酶带及其应用[J]. 西南农业学报, 1996, 9(3): 125-127.

[92] 张淑媛译(Chang). 水稻的演化亚洲稻（Oryza sativa)和非洲稻(Oryza glaberrima) [J]. 江西农业大学, 1983, 5: 27-33.

[93] 周伟辉, 薛大伟, 张国平. 高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异[J]. 作物学报, 2011, 37(5): 820-83.

[94] Akagi H., Nakamma A., Yokozeki-Misono Y., *et al..* 2004, Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein, Theor. Appl. Genet., 108: 1449-1457.

[95] Antonovics J. The effects of a heterogeneous environment on the genetics of natural populations [J]. American Scientist, 1971, 59(5): 593-599.

[96] Bayer R J. Allozyme variation, genecology, and phytogeography of Antennaria arcuata (*Asteraceace*), a rare species from the great Basin and Red Desert with small disjunct populations [J]. American Journal of Botany, 1992, 79: 872-881.

[97] Barkan A, Goldschmidt-clermont M. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression[J]. Biochimie, 2000, 82: 559-572.

[98] Brink R A, and Cooper D C. Partial self-incompatibility in *medicago sativa* [J]. PNAS, 1938, 24: 497-499.

[99] Brummer E C, Bouton J H, Kochert G． Development of an RFLP map in diploid alfalfa[J]． Theor Appl Genet, 1993, 86: 329-332.

[100] Bradshaw H D, Otto K G, Frewen B E, *et al..* Quantitative trait loci affecting differences in floral morphology between two species of monkeyflower (Mimulus) [J]. Genetics, 1998, 149, 367-382.

[101] Cameron D R, Moav R． Inheri tance in *Nicotiana* tabacum． XX- VII． Pollen killer, an alien genetic locus inducing abortion of microspores not carrying it[J]. Genetics, 1957, 42: 326- 335.

[102] Chang T T. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices[J]. *Euphytica*, 1976, 25: 435-441.

[103] Chang T T. Conservation of rice genetic resources: Luxury or Neccessity [J]. Science, 1984, 224(4646): 251-256.

[104] Casler A, Vogelb KP, and Taliaferroc CM. Latitudinal Adaptation of Switchgrass Populations [J], Crop Sci., 2004, 44: 293-303.

[105] Cheng K S. A statistical evalutuation of the classification of rice cultivars into hsien and keng subspecies [J]. Rice Genetics Newsletter, 1985, 2: 46-48.

[106] Ceccarelli S., Grando S. and Maatougui M. Plant breeding and climate changes[J]. Journal of Agricultural Science, 2012, 148: 627-637．

[107] Endo M., Tsuchiya T. and Hamada K.. High temperatures cause male sterility in rice plants with

Transcriptional alterations during pollen development[J]. P1ant and Cell Physiology, 2009, 50:19l1-1922．

[108] Fukata Y, Yano M, Fukui K. Linkage analysis of the restorer gene (*Rf-1*) in rice using restriction fragment length Polymorphism markers. JPN J Breed, 1992, 42 (suppl 1): 164-165.

[109] Fukuta Y, Sasahara H, Tamura K, *et al..* RFLP linkage map included the information of segregation distortion in a wide-cross population between *indica* and *japonica* rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Breed Science, 2000, 50: 65-72.

[110] Govinda R K, Virmani S S. Genetics of fertility restoration of„WA‟type cytoplasmic male sterility in rice[J]. Crop Science, 1988, 28: 786-792.

[111] Goloenko I M, Davydenko O G, Shimkevich A M. Segregation distortion of marker nuclear genes in alloplasmic and isoplasmic lines of barley [J]. Russian Journal of Genetics, 2002, 38(7): 791-795.

[112] Grower J. A general coefficient of similarity and some of its properties [J]. Biometrices, 1971, 27: 857-871.

[113] Hayase H, Satake T., Nishiyama I., *et al..* Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. II. The most sensitive stage to cooling and the fertilizing ability of pistils [J]. Proc. Crop Science Society of Japan, 1969, 39: 706-711.

[114] Harushima Y, Nakagahra M, Yano M., *et al..* A genome-wide survey of reproductive barriers in an intraspecific hybrid [J]. Genetics, 2001, 159(2): 883-892.

[115] Harushima Y., Kurata N., Yano M., *et al..* Detection of segregation distortions in an *indica- japonica* rice cross using a high-resolution molecular map [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92: 145-150.

[116] Harushima Y, Nakagahra M, Yano M, *et al..* Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses [J]. Genetics, 2002, 160: 313-322.

[117] He P., Li J Z., Zheng X W., *et al..* Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross [J]. Crop Science, 2001, 41: 1240-1246.

[118] Hiraizumi Y. Temperature sensitivity of negative segregation distortion in *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 1993, 135: 831-841.

[119] Hinata K, and Oka H I. A survey of hybrid sterility relationships in the Asian forms of *Oryza perennis* and *O. sativa* [J]. Japanese Journal of Genetics, 1962, 37: 314-328.

[120] Hu J, Wang K, Huang W C*, 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]. The Plant Cell, 2012, 24: 109-122.

[121] Huang Q Y., He Y Q., Jin R C., *et al..* Mapping of the nuclear fertility restorer gene for HL cytoplasmic male sterility in rice using microsatellite markers[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(5): 430-432.

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

[123] Ichikawa N., Kishimoto N., Inagaki A., *et al..* A rapid PCR-aided selection of a rice line containing the *Rf-1* gene which is involved in restoration of the cytoplasmic male sterility [J]. Molecular Breeding, 1997, 3: 195-202.

[124] Jagadish S V K., Craufurd P Q. and Wheeler T R.. High temperature stress and spikelet fertility in rice(*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58: 1627-1635．

[125] Jagadish S V K., Muthurajan R. and Oane R.. Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L． )[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61: 143-156．

[126] Jonas C S., and Geber M A.. Variation among populations of *Clarkia Unguiculata* (Onagraceae) along altitudinal and latitudinal gradients [J]. American Journal of Botany, 1999, 86(3): 333-343.

[127] Jones D F. Selective fertilization in pollen mixtures [J]. The Biological Bulletin, 1920, 38: 251-289.

[128] Kato H., Tezuka K., Feng Y. Y. *et al..* Structural diversity and evolution of the *Rf-1* in the genus*Oryza*, Heredity, 2007, 99: 516-524.

[129] Kesseli R V, Paran I, Michelmore R W． Analysis of a detailed genetic linkage map of Lactuca sativa(Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers[J]. Genetics, 1994, 136: 1435-1446.

[130] Kinoshita T． Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage group[J]. Rice Genet News1, 1991, 8: 2-37.

[131] 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.

[132] Konishi T., Yano Y., Abe K.. Geographic distribution of allelesat the Ga2 locus for segregation distortion in barley[J]. Theor Appl Genet, 1992, 85: 419-422 .

[133] Lewontin R C. The apportionment of human diversity [J]. Evolutionary Biology, 1972, 6: 381-398.

[134] Li Z, and Rutger J N. Geographic distribution and multilocus organization of isozyme variation of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101, 379-387.

[135] Li S Q, Yang G H, Li S B, *et al..* Distribution of fertility-restorer genes for wild-abortive and honglian CMS lines of rice in the AA genome species of genus *Oryza* [J]. Annals of Botany,

2005, 96: 461-466.

[136] 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]. Mol Gen Genomics, 2004, 271: 586-594.

[137] Liu K, Zhang Q, Zhan D. Genetic variation and *indica-japonica* differentiation in Yunnan indigenous rice [J]. Acta Botanica Sinica, 1995, 37(9): 718-724.

[138] Loveless M D, and Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations [J]. Annual Review of Ecological Systems, 1984, 15: 65-95.

[139] Lu C G., Zou J S., Ikehashi H.. Spikelet fertility affected by low temperature in *indica- japonica* hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Japanese Journal of Tropical Agriculture, 1999, 43(4): 254-259.

[140] Lu H, Romero-Severson J, Bernardo R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105: 622-628.

[141] Luning K G, and Lake S. Genetics of inbred *Drosophila melanogaster*. XIII. Interaction genome-cytoplasm on chromosome segregation [J]. Hereditas, 1985, 102: 207-217.

[142] Matsui T., Namuco O S. and Ziska L H.. Effects of high temperature and CO2 concentration on spikelet sterility in *indica* rice[J]. Field Crops Research, 1997, 51: 213-219．

[143] Matsushita S., Iseki T., Fukuta Y., *et al..* Characterization of segregation distortion on chromosome 3 induced in wide hybridization between *indica* and *japonica* type rice varieties [J]. *Euphytica*, 2003, 134: 27-32.

[144] Manabe M., Ino T., Kasaya M., *et al..* Segregation distortion through female gametophytes in interspecific hybrids of tetraploid wheat as revealed by RAPD analysis [J]. Hereditas, 1999, 131(1): 47-53.

[145] Mange E J. Temperature sensitivity of segregation-distortion in *Drosophila Melanogaster* [J]. Genetics, 1968, 58: 399-413.

[146] Morishima H, Gadrinab L U. Are the Asian common wild rices differentiated into the *indica* and *japonica* types[M]. Crop exploration and utilization of genetics resources. Taichung District Agricultural hnprovement Station, 1987: 11-20.

[147] Mulcahy D L. The rise of the angiosperms: A genecological factor [J]. Science, 1979, 206: 20-23.

[148] Mulcahy D L, and Mulcahy G B. Biotechnology and Ecology of Pollen: Proceedings of the International Conference on the biotechnology and ecology of pollen [R]. 9-11 July 1985, U of Mass, 1986.

[149] Murray M G, and Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321-4325.

[150] Nagamine T, Xiong J H, Xiao Q. Genetic variation in several isozymes of indigenous rice varieties in Yunnan province of China [J]. Japan Journal of Breeding, 1992, (42): 507-513.

[151] Nematzadeh G A, Kiani G. Genetic analysis of fertility restoration genes for WA-type cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(38): 6273-6277.

[152] Nevo E. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress [J]. PNAS, 2001, 98(11): 6233-6240.

[153] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided population[J]. PNAS, 1973, 70: 3321-3323.

[154] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.

[155] Nelson O E. Non-reciprocal cross-sterility in maize [J]. Genetics, 1952, 37: 101-124.

[156] Nelson O E. The waxy locus in maize. I. Intralocus recombination frequency estimates by pollen and by conventional analyses [J]. Genetics, 1962, 47: 737-742.

[157] Oka H I. Experiment studies on the origin of cultivated rice. Genetics, 1974, 78: 475-486.

[158] Oka H I. Origin of cultivated rice [M]. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1988.

[159] Page R D M. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. Computer Applications in the Biosciences, 1996, 12, 357-358.

[160] Peng S., Huang J. and Sheehy J E.. Rice yields decline with higher night temperature from global Warming[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101: 9971-9975．

[161] Perfectti F., and Pascual L.. Segregation distortion of isozme loci in cherimoya (*Annona cherimola* Mill) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93(3): 440-446.

[162] Rick C M. Abortion of male and female gametes in the tomato determined by allelic interaction [J]. Genetics, 1966, 53, 85-96.

[163] Sato Y I. Increasing trend of *japonica*-derived genes in hybrid populations grown under upland conditions [J]. Rice Genetics Newsletters, 1990, 7: 94.

[164] Satake T. Male sterility caused by cooling treatments at the young microspore stage in rice plants. XXX. Relation between, fertilization and the number of engorged pollen grains among spikelets cooled at different pollen developmental stages [J]. Japanese Journal of Crop Science, 1991, 60: 523-528.

[165] Satake T, and Shibata M. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XXXI. Four components participating in fertilization [J]. Japanese Journal of Crop Science, 1992, 61: 454-462.

[166] Sattari M., Kathiresan A., Gregorio G B., *et al..* Comparative genetic analysis and molecular

Mapping of fertility restoration genes for WA, Dissi, and Gambiaca cytoplasmic male sterility systems in rice. *Euphytica,* 2008, 160(3): 305-315.

[167] Scoles G J., Kibirge-Sebunya I N. Preferential abortion of gamete in wheat induced by an Agropyron chromosome[J]. Can J Gene Cytol, 1983, 25: 1-6.

[168] Second G. Origin of the genetic diversity of cultivated rice: study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci [J]. The Japanese Journal of Genetics, 1982, 57: 25-57.

[169] Shinjyo C.. Genetic studies of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice[J]. Sci Bull Coll Agr Univ Ryukyus, 1975, 22: 1-57.

[170] Sheehy J E., Elmido A., Centeno G.. Searching for new plants for climate changel[J]. Journal of Agricultural Meteorology, 2005, 60: 463-468．

[171] Shah F., Huang J L., Cui K H.. Impact of high-temperature stress on rice plant and its traits related to tolerance[J]. Journal of Agricultural Science, 2011, 149: 545-556．

[172] Sibov S T., de Souza J C L., Garcia A A F., *et al..* Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation [J]. Hereditas, 2003, 139: 96-106.

[173] Small I D, Peeters N. The PPR motif: A TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. Trends Biochem Science, 2000, 25: 46-47.

[174] Sneath P., Sokal R R.. Numerical taxonomy" The Principles and Practice of Numerical Classiﬁcation". San Francisco. 1973

[175] Sokal R R, Michener C D. A statistical method for evaluating systematic relationships [J]. The University of Kansas Science Bulletin, 1958, 38, 1409-1438.

[176] Sun X L, Cal H W, Wang X K. Is Yunnan a rice diversity center in isozyme variation [J]. Rice Genetics Newsletters, 1994, 11: 65-66.

[177] Sun C Q, Wang X K, Atsushi Y, *et al..* The diversity of common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) in nuclear DNA [C]. In Proceeding of International Symposium on Florististics and Diversity of East Asian Plants. July 24-28, Kunming, 1996.

[178] Taylor D R., Aarssen L W.. Competitive relationships among genotypes of three Perennial grasses: Implications for species coexistence． Amer Nature, 1990, 136: 105-327

[179] Tanto T., and Demissie A.. A comparative genetic diversity study for four major crops managed under Ethiopian condition [J]. American Journal of Botany, 2000, 87: 783-792.

[180] Tan X L, Tan Y L, Zhao Y H, *et al..* Identification of the *Rf* gene conferring fertility restoration of the CMS Dian-type 1 in rice by using simple sequence repeat markers and advanced inbred lines of restorer and maintainer [J]. Plant Breeding, 2004, 123(4): 338-341.

[181] Wang Z Y., Second G., Tanksley S D.. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 83: 565-581.

[182] Wang Z H., Zou Y J., Li X Y., *et al..* Cytoplasmic male sterility of rice with BoroⅡcytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes *via* distinct modes of mRNA silencing [J]. Plant Cell, 2006, 18: 676-687.

[183] Wang S H., Zhang Z L., Tan X L., *et al..* Pollen abortive characters of new cytoplasmic male sterile lines and their potential heterosis in *japonica* rice. The Journal of Yunnan Agricultural University, 2009, 24(3): 330-335.

[184] Xu X, and Wang H. A report on the vertical distribution of the rice varieties in Simao, Yunnan [J]. Acta Botanica Sinica, 1974, 16(3): 208-222.

[185] Xu Y., Zhu L., Xiao J., *et al..* Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1997, 253: 535-545.

[186] Yeh F C., Yang R C., Boyle T B J., *et al..* POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [Z]. Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997.

[187] Young H J, and Stanton M L. Influence of environmental quality on pollen competitive ability in wild radish [J]. Science, 1990, 248(4963): 1631-1633.

[188] Zamir D, Tanksley S D, Jones R A. Haploid selection for low temperature tolerance of tomato pollen [J]. Genetics, 1982, 101: 129-137.

[189] Zhao B, Deng Q M, Zhang Q J, *et al..* Analysis of segregation distortion of molecular markers in F2 population of rice [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(5): 449-457.

附 **录**

# 附表

附表1 不同杂交组合的正反交分离群体

Appendix Tab.1 Materials of reciprocal populations at different crosses

| 编号  No. | 产生群体的海拔(m) Altitude generated | 世代  Generation | 组合  Cross |
| --- | --- | --- | --- |
| YR-1 | 400 | F2、F3、F4 | 南 34/小花谷 |
| YR-2 | 400 | F2、F3、F4 | 小花谷/南 34 |
| YR-3 | 400 | F2、F3、F4 | 南 34/小麻谷 |
| YR-4 | 400 | F2、F3、F4 | 小麻谷/南 34 |
| YR-5 | 400 | F2、F3、F4 | C418/小麻谷 |
| YR-6 | 400 | F2、F3、F4 | 小麻谷/C418 |
| YR-7 | 400 | F2、F3、F4 | 小花谷/C418 |
| YR-8 | 400 | F2、F3、F4 | C418/小花谷 |
| GR-1 | 1250 | F2、F3、F4 | 南 34/小花谷 |
| GR-2 | 1250 | F2、F3、F4 | 小花谷/南 34 |
| GR-3 | 1250 | F2、F3、F4 | 南 34/小麻谷 |
| GR-4 | 1250 | F2、F3、F4 | 小麻谷/南 34 |
| GR-5 | 1250 | F2、F3、F4 | C418/小麻谷 |
| GR-6 | 1250 | F2、F3、F4 | 小麻谷/C418 |
| GR-7 | 1250 | F2、F3、F4 | 小花谷/C418 |
| GR-8 | 1250 | F2、F3、F4 | C418/小花谷 |
| KR-1 | 1890 | F2、F3、F4 | 南 34/小花谷 |
| KR-2 | 1890 | F2、F3、F4 | 小花谷/南 34 |
| KR-3 | 1890 | F2、F3、F4 | 南 34/小麻谷 |
| KR-4 | 1890 | F2、F3、F4 | 小麻谷/南 34 |
| KR-5 | 1890 | F2、F3、F4 | C418/小麻谷 |
| KR-6 | 1890 | F2、F3、F4 | 小麻谷/C418 |
| KR-7 | 1890 | F2、F3、F4 | 小花谷/C418 |
| KR-8 | 1890 | F2、F3、F4 | C418/小花谷 |
| TR-1 | 2200 | F2、F3、F4 | 南 34/小花谷 |
| TR-2 | 2200 | F2、F3、F4 | 小花谷/南 34 |

续附表1不同杂交组合的正反交分离群体

Continued Appendix Tab.1 Materials of reciprocal populations at different crosses

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 编号  No. | 产生群体的海拔(m) Altitude generated | 世代  Generation | 组合  Cross |
| TR-3 | 2200 | F2、F3、F4 | 南 34/小麻谷 |
| TR-4 | 2200 | F2、F3、F4 | 小麻谷/南 34 |
| TR-5 | 2200 | F2、F3、F4 | C418/小麻谷 |
| TR-6 | 2200 | F2、F3、F4 | 小麻谷/C418 |
| TR-7 | 2200 | F2、F3、F4 | 小花谷/C418 |
| TR-8 | 2200 | F2、F3、F4 | C418/小花谷 |

附表2 不同杂交组合的测交F2代分离群体材料表

Appendix Tab.2 Materials of test cross F2 populations of different crosses

| 编号  No. | 产生群体的海拔(m) Altitude generated | 世代  Generation | 花粉组合  Pollen Cross |
| --- | --- | --- | --- |
| GR-1 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | 南 34/小花谷 |
| GR-2 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | 小花谷/南 34 |
| GR-3 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | 南 34/小麻谷 |
| GR-4 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | 小麻谷/南 34 |
| GR-5 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | C418/小麻谷 |
| GR-6 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | 小麻谷/C418 |
| GR-7 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | 小花谷/C418 |
| GR-8 | 1250 | 测交 F1、测交 F2 | C418/小花谷 |
| KR-1 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | 南 34/小花谷 |
| KR-2 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | 小花谷/南 34 |
| KR-3 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | 南 34/小麻谷 |
| KR-4 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | 小麻谷/南 34 |
| KR-5 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | C418/小麻谷 |
| KR-6 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | 小麻谷/C418 |
| KR-7 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | 小花谷/C418 |
| KR-8 | 1890 | 测交 F1、测交 F2 | C418/小花谷 |
| TR-1 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | 南 34/小花谷 |
| TR-2 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | 小花谷/南 34 |
| TR-3 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | 南 34/小麻谷 |
| TR-4 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | 小麻谷/南 34 |
| TR-5 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | C418/小麻谷 |
| TR-6 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | 小麻谷/C418 |
| TR-7 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | 小花谷/C418 |
| TR-8 | 2200 | 测交 F1、测交 F2 | C418/小花谷 |

附表3 不同杂交组合分离群体的群体大小

Appendix Tab.3 The population size of segregation populations generated from different hybrid crosses

| 分离群体  Segregation population | 海拔  Altitude | 群体大小  Population sizes | |
| --- | --- | --- | --- |
| F3 | F4 |
|  | 400 | 166 | 164 |
| 南 34×小花谷  Nan34×Xiaohuagu | 1250 | 206 | 39 |
| 1890 | 119 | 100 |
|  | 2200 | 148 | 93 |
|  | 400 | 82 | 237 |
| 小花谷×南 34  Xiaohuagu×Nan34 | 1250 | 192 | 79 |
| 1890 | 99 | 121 |
|  | 2200 | 181 | 91 |
|  | 400 | 124 | 116 |
| 南 34×小麻谷  Nan34×Xiaomagu | 1250 | 66 | 121 |
| 1890 | 118 | 120 |
|  | 2200 | 120 | 94 |
|  | 400 | 96 | 124 |
| 小麻谷×南 34  Xiaomagu×Nan34 | 1250 | 177 | 118 |
| 1890 | 122 | 85 |
|  | 2200 | 106 | 102 |
|  | 400 | 141 | 93 |
| C418×小花谷  C418×Xiaohuagu | 1250 | 201 | 33 |
| 1890 | 134 | 129 |
|  | 2200 | 97 | 78 |
|  | 400 | 135 | 148 |
| 小花谷×C418  Xiaohuagu×C418 | 1250 | 251 | 95 |
| 1890 | 112 | 126 |
|  | 2200 | 164 | 182 |
|  | 400 | 198 | 132 |
| C418×小麻谷  C418×Xiaomagu | 1250 | 156 | 86 |
| 1890 | 102 | 123 |
|  | 2200 | 153 | 91 |
|  | 400 | 67 | 187 |
| 小麻谷×C418  Xiaomagu×C418 | 1250 | 226 | 71 |
| 1890 | 114 | 141 |
|  | 2200 | 147 | 125 |

附表4 不同杂交组合测交F2代群体的单株数

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分离群体  Segregation population | 海拔  Altitude | 群体大小  Population sizes |
| 合系 42A/(南 34×小花谷) Hexi42A/(Nan34×Xiaohuagu) | 1250 | 153 |
| 1890 | 94 |
| 2200 | 178 |
| 合系 42A/(小花谷×南 34) Hexi42A/(Xiaohuagu×Nan34) | 1250 | 181 |
| 1890 | 113 |
| 2200 | 108 |
| 合系 42A/(南 34×小麻谷) Hexi42A/(Nan34×Xiaomagu) | 1250 | 179 |
| 1890 | 81 |
| 2200 | 53 |
| 合系 42A/(小麻谷×南 34) Hexi42A/(Xiaomagu×Nan34) | 1250 | - |
| 1890 | 129 |
| 2200 | 42 |
| 合系 42A/(C418×小花谷) Hexi42A/(C418×Xiaohuagu) | 1250 | 91 |
| 1890 | 132 |
| 2200 | 112 |
| 合系 42A/(小花谷×C418) Hexi42A/(Xiaohuagu×C418) | 1250 | 55 |
| 1890 | 80 |
| 2200 | 93 |
| 合系 42A/(C418×小麻谷) Hexi42A/(C418×Xiaomagu) | 1250 | - |
| 1890 | 78 |
| 2200 | 181 |
| 合系 42A/(小麻谷×C418) Hexi42A/(Xiaomagu×C418) | 1250 | 111 |
| 1890 | 61 |
| 2200 | 160 |

Appendix Tab.4 The plants of test cross F2 populations generated from different hybrid crosses

注：“-”表示未获得数据。

Note:" -" shows no data.

附表5 不同世代群体的遗传多样性指数

Appendix Tab.5 Genetic diversity index of populations in generations

|  |  | F3 |  | F4 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 正反交群体  Reciprocal population | 海拔(m)  Altitude | 期望杂合度(H)  Expected heterozygosity | 信息指数(I) Information index | 期望杂合度(H)  Expected heterozygosity | 信息指数(I)  Information index |
|  | 400 | 0.449 | 0.6413 | 0.2499 | 0.4163 |
| 南 34×小花谷Nan34×Xiaohuagu | 1250 | 0.3442 | 0.528 | 0.3685 | 0.5552 |
| 1890 | 0.2681 | 0.4388 | 0.1215 | 0.2405 |
|  | 2200 | 0.3151 | 0.4947 | 0.1834 | 0.3298 |
|  | 400 | 0.494 | 0.6871 | 0.4803 | 0.6734 |
| 小花谷×南 34  Xiaohuagu×Nan34 | 1250 | 0.4772 | 0.6702 | 0.4416 | 0.6335 |
| 1890 | 0.4869 | 0.68 | 0.4213 | 0.6123 |
|  | 2200 | 0.4998 | 0.6929 | 0.4995 | 0.6926 |
|  | 400 | 0.3072 | 0.4855 | 0.2057 | 0.3596 |
| 南 34×小麻谷Nan34×Xiaomagu | 1250 | 0.2244 | 0.3841 | 0.2533 | 0.4206 |
| 1890 | 0.2815 | 0.4551 | 0.1597 | 0.2967 |
|  | 2200 | 0.2888 | 0.4637 | 0.2067 | 0.3609 |
|  | 400 | 0.4934 | 0.6866 | 0.4857 | 0.6787 |
| 小麻谷×南 34  Xiaomagu×Nan34 | 1250 | 0.4884 | 0.6815 | 0.4919 | 0.685 |
| 1890 | 0.4737 | 0.6666 | 0.4989 | 0.692 |
|  | 2200 | 0.5 | 0.6931 | 0.4877 | 0.6808 |
|  | 400 | 0.4984 | 0.6915 | 0.4942 | 0.6874 |
| C418×小花谷C418×Xiaohuagu | 1250 | 0.4972 | 0.6904 | 0.4628 | 0.6555 |
| 1890 | 0.4929 | 0.686 | 0.4308 | 0.6222 |
|  | 2200 | 0.4766 | 0.6695 | 0.4933 | 0.6865 |
|  | 400 | 0.4993 | 0.6925 | 0.4036 | 0.5933 |
| 小花谷×C418 Xiaohuagu×C418 | 1250 | 0.4371 | 0.6289 | 0.492 | 0.6851 |
| 1890 | 0.4841 | 0.6771 | 0.3228 | 0.5037 |
|  | 2200 | 0.4833 | 0.6763 | 0.4946 | 0.6877 |
|  | 400 | 0.4853 | 0.6783 | 0.4668 | 0.6596 |
| C418×小麻谷C418×Xiaomagu | 1250 | 0.4947 | 0.6879 | 0.4673 | 0.6601 |
| 1890 | 0.4746 | 0.6675 | 0.4893 | 0.6824 |
|  | 2200 | 0.4708 | 0.6636 | 0.4217 | 0.6127 |
|  | 400 | 0.4933 | 0.6865 | 0.4519 | 0.6442 |
| 小麻谷×C418 Xiaomagu×C418 | 1250 | 0.49 | 0.6831 | 0.4806 | 0.6736 |
| 1890 | 0.4962 | 0.6893 | 0.4535 | 0.6459 |
|  | 2200 | 0.4398 | 0.6317 | 0.4992 | 0.6923 |

附 **录**

# 附图















附图 1 供试材料 68923-8片段的序列比对

Appendix Fig.1 Sequences blast of 68923-8 segment among materials







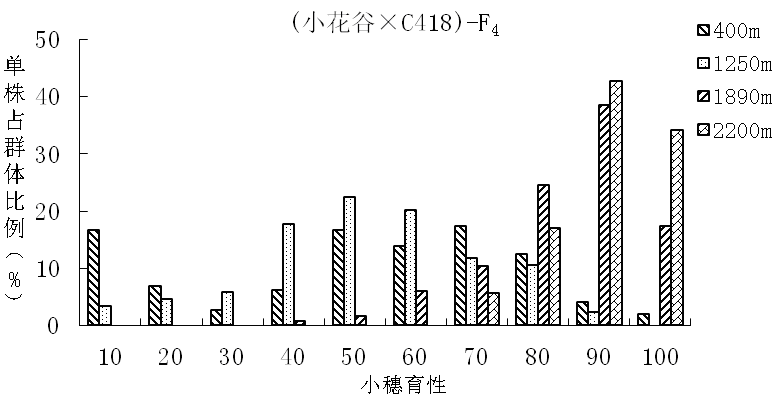




















# 附图2 不同杂交组合在各海拔产生分离群体的小穗育性单株比例

Appendix Fig.2 Plant ratio of spikelet fertility of segregation populations in different crosses generated from different altitudes

附 **录**

# 试剂配方及配制

**1）2×CTAB的配方：**CTAB(w/v) 20g NaCl 81.9g

100MM Tris-HCl(pH8.0) 100mL

20MM EDTA(pH8.0) 40mL

加蒸馏水至1L

**2）TAE电泳缓冲液：**

50×贮存液，pH约8.5: 242g Tris

57.1 mL冰乙酸

32.7g Na2EDTA·2H2O

加蒸馏水至1L

**3) 0.5mol/L EDTA（乙二胺四乙酸）：**

在700mL H2O中溶解186.1g Na2EDTA·2H2O，用10mol/L NaOH调校至pH8.0.

**4) 10mg/mL溴化乙锭：**

在20mL H2O中溶解0.2g 溴化乙锭，混匀后于4℃避光保存。

5) **Ampicillin（氨苄青霉素） 总体积 50 mL 的（100 mg/mL) 配制**：

1. 称量5g Ampicillin置于50 mL 离心管中；

2. 加入40 mL 灭菌水，充分混合溶解后，定容至50 mL；

3. 用0.22m过滤膜过滤除菌；

4. 小份分装（1 ml/份）后，-20℃保存。

**6）IPTG（异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷）总体积50 mL的(24 mg/mL)的配制**

1. 称量1.2gIPTG 置于50 mL 离心管中；

2. 加入40 mL 灭菌水，充分混合溶解后，定容至50 mL；

3. 用0.22m过滤膜过滤除菌；

4. 小份分装（1 mL/份）后，-20℃保存。

**7）X-Gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)总体积50 mL的(20 mg/mL)的配制**

1. 称量1 g X-Gal 置于50 mL离心管中；

2. 加入40 mLDMF(二甲基甲酰胺)，充分混合溶解后，定容至50 mL；

3. 小份分装（1 mL/份）后，-20℃避光保存。

致 **谢**

时光飞逝，转眼即将毕业，在校的5年，我成长了很多，学会了凡事多思考，不要盲目的去做，多听听，多想想。

自读博以来，得到了导师谭学林教授的引导和关心。论文从选题到完成，凝聚了谭老师的辛勤汗水。他的敏锐的洞察力、治学严谨及思考周全的态度都让我获益良多，在这里，衷心感谢您的关怀、指导和培养，祝愿您身体健康，万事顺利。

实验过程中得到了稻作所各位老师的关心及帮助，使我可以顺利完成毕业论文。感谢谭亚玲、文建成、张忠林、金寿林、黄大军、洪汝科、李伟华和顾晓明老师在材料构建和田间试验上的大力帮助，以及陈丽娟教授、师佳、李东宣、李向东等全体老师的指导和帮助，在此对各位老师表示衷心感谢！

感谢研究生处张乃明教授、谢金荣老师、文斌老师以及各科室老师的帮助；感谢农学与生物技术学院郭华春教授、刘雅婷教授、林良斌教授等各位领导和老师的关心与帮助，谢谢您们！

在学习及实验中，得到了本实验赵颖师姐、王石华师兄，同窗甘树仙、董陈文华、王先俱、蔡永占、樊传章，师妹朱高倩、徐莹洁、孙朝华、龙云星、字秋艳、郑玉珍、张江丽，师弟吴志刚、王昌江、周游、李振及合朴农业科技有限公司的普世皇的帮助，在此一并感谢。祝各位心想事成，更上一层楼！

谢谢一直鼓励我、支持我的好朋友李雪、陈瑜欣、罗建蓉、李婷婷、韩毅、徐小刚、李世强和杨文毅。谢谢你们的支持。祝各位心想事成！

在此，特别感谢我的爸爸妈妈，感谢他们多年来对我的支持和鼓励，感谢他们为我的付出，感谢他们在我任性时的宽容。祝愿他们健康长寿！我爱你们！另外，还要感谢我的老公，谢谢他在我迷茫的时候的指引，感谢他对我的包容与谅解！

最后，衷心感谢国家自然科学基因（31060058）对本研究的资助。

何婷婷

2013年5月于云南农业大学

# 作者简历

**个人简介：**

姓名：何婷婷性别：女

政治面貌：中共党员出生年月：1983年9月籍贯：黑龙江牡丹江民族：汉族

**主要经历：**

2002.09-2006.07 牡丹江师范学院理学学士学位

2008.09-2010.07 云南农业大学，硕士生

2010.09-2013.07云南农业大学，博士生

**攻读博士学位期间参加的学术会议：**

(1) 2012年3月，参加“杂草稻的保护与利用”，广西，南宁

(2) 2012年8月，参加“作物杂种优势利用国际学术大会”，陕西，西安

**攻读博士学位期间发表和待发表的论文：**

何婷婷，文建成，金寿林，朱高倩，徐莹洁，普世皇，谭学林，2013，籼粳稻及恢复系*Rf-1*位点PCR片段的序列分析。分子植物育种（已接收）

# 版权申明

本人郑重申明：研究论文《水稻*Rf-1* PCR片段序列变异及海拔和细胞质导致的遗传偏分离》的研究材料、课题来源、研究经费、实验条件等经由 导师课题组提供。论文试验方案设计及撰写经是在导师指导下完成。本研究 的知识产权归云南农业大学稻作研究所谭学林课题组所有，未经版权所有人 及著作人书面共同同意，任何人不得以个人或组织名义传播。

申明人：

日期：年月