调控水稻异倍性杂交种子败育的相关基因分析

吴丽梅^①, 朱晓炜^{①②}, 崔晓云^①, 刘志坚^①, 刘禹彤^①, 徐培洲^①, 陈晓琼^①, 吴先军^{①*}, 张红宇^{①*}

① 四川农业大学水稻研究所, 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 长江流域杂交水稻协同创新中心, 成都 611130;

② 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

* 联系人, E-mail: wuxj@sicau.edu.cn; zhanghysd@163.com

2015-01-29 收稿, 2015-03-12 接受, 2015-04-08 网络版发表

国家自然科学基金(31301049)、农业部公益性行业科研专项(201403002-3)和四川省国际科技合作项目(2013HH0023)及四川省教育厅项目(12ZA123)资助

摘要 *MADS29* 是控制水稻(*Oryza sativa* L.)种子饱满程度的基因, 它通过调控母体组织细胞退化和维持体内激素平衡来影响种子发育. 水稻异倍性杂交往往产生败育种子, 为了探讨 *MADS29* 等种子发育相关基因是否参与其调控, 本研究以 4 份水稻材料(2 个二倍体; 2 个四倍体)构建 4 个自交组合(对照)和 8 个杂交组合(正反交), 对花粉粒育性、花粉管萌发及伸长、种子发育及 *MADS29* 等相关基因表达进行分析. 结果表明: (1) 异倍性杂交均可正常受精, 但杂交种子败育; (2) 石蜡切片结果显示, 授粉后 3 d(3 day after pollination, 3 DAP), 与对照相比, $4n \times 2n$ 胚乳已进入细胞化时期, 但细胞数量较少; 而 $2n \times 4n$ 胚乳处于合胞体时期, 游离核周围未形成细胞壁, 胚乳细胞化时期滞后; (3) 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)表明, 6 DAP 和 8 DAP, *MADS29*、生长素基因和母体组织细胞程序化死亡(PCD)相关基因的相对表达量在杂交种子中均明显高于对照; 淀粉合成基因在杂交种子中的相对表达量显著低于对照. 本实验结果表明, 在水稻异倍性杂交中, *MADS29* 高表达, 生长素基因和母体组织 PCD 相关基因表达上调, 淀粉合成相关基因表达下调, 导致胚乳发育异常、种子败育, 说明 *MADS29* 的高表达导致异倍性杂交种子败育, 是一种有别于二倍体水稻种子发育的新型调控方式.

关键词

MADS29

水稻

异倍性杂交
种子败育

在一些植物中, 二倍体($2n$)与四倍体($4n$)杂交能产生正常种子, 然而大多数异倍性杂交均导致种子败育^[1]. Scott 等人^[2]研究发现, 拟南芥异倍性杂交种子的胚乳发育不正常, 其结果导致幼胚的发育终止. 黄群策和孙敬三^[3]研究异倍性水稻(*Oryza sativa* L.)杂交时, 也发现胚乳发育异常导致种子夭折的现象. Vinkenoog^[4]证明了胚乳发育异常是其自身造成, 而与种子的其他组织关系不大. Scott 等人^[2]对拟南芥 $2n$, $4n$, $6n$ 自交以及 $2n$ 分别与 $4n$ 和 $6n$ 杂交种子发育进行了观察, 发现 $2n$ 与 $4n$ 杂交都能够产生正常的种子, 而 $2n$ 与 $6n$ 杂交种子都败育. $2n$ 与 $4n$ 杂交能产生正常成熟种子, 说明胚乳中亲源倍性比例不是种子正常发育的决

定条件, 还存在其他的调控因素控制胚乳的发育.

目前水稻中共报道有 75 个 *MADS-box* 基因, *MADS29* 属于 II 型 *MADS-box* 基因中的 MIKC^C 型^[5]. 大多数 *MADS-box* 蛋白都可与 CArG-box 特异性结合, 而 CArG-box 常出现在 *MADS-box* 蛋白靶标基因的启动子区域^[6]. *MADS-box* 转录因子是同源异型基因, 已经被证明在花器官的发育中起着重要的调节作用, 参与 ABC 调控模式^[7,8]. 先前研究表明, *MADS29* 在种子中转录积累^[9,5]. 最近研究发现, *MADS29* 主要在水稻种子的珠心、珠心突起处以及胚珠维管束表达^[10]. 它通过维持体内激素平衡和调节母体组织细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)来影响胚乳发育

引用格式: 吴丽梅, 朱晓炜, 崔晓云, 等. 调控水稻异倍性杂交种子败育的相关基因分析. 科学通报, 2015, 60: 1592–1601

Wu L M, Zhu X W, Cui X Y, et al. Analysis of genes regulating seed abortion in heteroploid crosses of rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 1592–1601, doi: 10.1360/N972015-00110

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N972015-00110>

和籽粒灌浆^[10~12]. Yin和Xue^[10]研究发现,在抑制 *MADS29*表达时,产生不饱满种子,种子皱缩,籽粒灌浆率低,淀粉合成受到抑制以及淀粉颗粒异常.进一步研究发现, *MADS29*直接与编码半胱氨酸(Cys)蛋白酶和核苷酸结合位点-富含亮氨酸重复序列(nucleotide-binding site-leucine rich repeat, NBS-LRR)蛋白基因的启动子结合,从而影响母体组织细胞程序性死亡. Nayar等人^[13]研究发现, *MADS29*的生物学功能可能不仅如早期报道的那样只调控转录和翻译水平,它还通过 *MADS29*单体之间和 *MADS29*与其他 *MADS-box*蛋白相互作用在翻译后水平上起作用.

AGPase是淀粉合成代谢的第一个限速酶^[14]. 水稻中AGPase包括AGPL1, AGPL2, AGPL3, AGPL4, AGPS1, AGPS2a及AGPS2b等7种同工酶,协同催化淀粉合成的第1步反应^[15,16]. 袁定阳等人^[17]研究发现, AGPS2b, AGPL2和AGPL3这3个同工酶基因可能是水稻胚乳中AGPase的主要表达基因. 在哺乳动物中, NBS-LRR蛋白的直系同源物在发育和病原体诱导的母体组织细胞程序性死亡(PCD)中都发挥着作用^[18]. 而在动植物中, Cys蛋白酶均能够引起PCD^[19~21]. 另外,激素调节在种子发育中也起着至关重要的作用,其参与了胚和胚乳的调节^[22]. 研究表明,生长素主要在种子发育后期(9~20 DAP)积累^[23].

前人已经通过光学显微镜对水稻异倍性杂交种子胚乳发育情况进行了初步研究^[3]. 本研究采用石蜡切片对水稻2n与4n自交及杂交种子胚乳发育进行了观察,并通过qRT-PCR技术分析了 *MADS29*等相关基因在2n与4n自交和杂交种子中的表达模式,旨在探明水稻异倍性杂交种子败育与 *MADS29*等相关基因的关系,为水稻近缘野生种的合理利用提供依据.

1 材料与方法

(i) 供试材料. 供试水稻材料有粳稻日本晴_(2n) (Nip_(2n))和籼稻9311_(2n), D9311_(4n)及D海天_(4n)(DH_(4n)),

其中D9311由湖北大学蔡得田教授提供,海天和D海天是由中国科学院成都生物所涂升斌研究员提供的一个籼稻品种的二倍体及其加倍的四倍体,因该品其中D9311由湖北大学蔡得田教授提供,海天和D海天株型高大,茎秆粗壮,大穗、大粒、大叶而得名,属育种材料. 采用正反交将这4份材料构建4个自交对照及8个杂交组合(表1).

(ii) 田间杂交. 清晨6:30~7:30,选择健壮无病害且当日开花的稻穗,采用剪颖去雄法配制杂交组合,套袋隔离,开花时间人工授粉. 授粉时保留2个去雄稻穗不进行人工授粉以作为检验去雄效果对照.

(iii) 花粉粒育性鉴定. 采用I₂-KI染色法鉴定花粉育性. 在显微镜下根据花粉粒形态和染色状况,统计可育和败育的花粉,计算花粉粒育性(花粉粒育性=可育花粉粒/观察花粉总数).

(iv) 花粉管萌发及伸长观察. 采用苯胺蓝染色法观察水稻的花粉管萌发及伸长情况,分别取授粉后10, 50 min的小花,用卡诺固定液固定24 h, 70%乙醇4℃保存,以后处理参照Guo等人^[24]和Li等人^[25]的研究方法.

(v) 胚乳发育观察. 按照常规方法制作石蜡切片^[26,27],观察杂交及自交组合子房发育情况.

(vi) 基因表达分析. 使用Trizol(全式金公司,中国)法提取以上所有杂交组合3, 6, 8 DAP的种子以及9311和D9311的根、茎、叶的总RNA. 接着各取1 μg RNA按照TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix反转录试剂盒(全式金公司,中国)的说明进行cDNA第一链的合成. 参照Yin和Xue^[10]的研究结果,选取水稻 *Actin*作为内参基因,按照qRT-PCR引物设计原则,应用Primer5.0软件设计 *MADS29*等相关基因的特异性引物(表2).

以反转录得到的cDNA为模板进行RT-PCR和qRT-PCR. qRT-PCR采用TransStart Top Green qPCR SuperMix试剂盒(TransStart公司,美国), 10 μL反应体

表1 2n和4n杂交及自交组合
Table 1 Rice crosses between diploid and tetraploid

类型	组合
异源异倍性	籼籼交 9311×9311, 9311×DH, DH×9311, DH×DH
	籼粳交 Nip×Nip, Nip×DH, DH×Nip, DH×DH
	Nip×Nip, Nip×D9311, D9311×Nip, D9311×D9311
同源异倍性	籼籼交 9311×9311, 9311×D9311, D9311×9311, D9311×D9311

表 2 *MADS29* 等相关基因的引物
Table 2 Primers of *MADS29* and other genes

基因名称	正向引物F(5'→3')	反向引物R(5'→3')
<i>MADS29</i>	ACTTGGAGACCATGAAGATGCA	CAGTAGTTCACACACCAACAAATC
<i>AGPS2b</i>	TCTATGACCGGTCTGCTCCA	CAGAAATGCAGGACCGGAGT
<i>AGPL2</i>	ACCAGAGGGTGCTGATTTGG	CCAAAGTCTTGCAGGTGTGC
<i>LOC_Os05g31570</i>	GGAGTTCACGGAGGGTAAGA	TCTGGTGCTGGTGTATTGAAT
<i>LOC_Os06g17970</i>	GTTGCCTAACTGGATTGAGC	TGCACCTGCCTATTTCTATCT
<i>IAA1</i>	GCCGCTCAATGAGGCATT	GCTTCCACTTTCTTTCAATCCAA
<i>IAA19</i>	CGAGGTTGTCTTGTGTCAATCTG	GGAAGCATTAAGCAGCCTGACT
<i>Actin</i>	CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA	CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA

系包括: 5 μ L 2 $\times$ TransStart Top Green qPCR Super-Mix, F和R引物各0.2 μ L, 1 μ L 10 ng/ μ L cDNA模板(反转录后稀释5倍), 3.6 μ L焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水每个样品3个重复, 每一对引物做2个未加模板的重复对照(no template control, NTC). 同时为了确保实验的可信度, 还做了搭桥实验. 实验结果用Bio-Pad CFX 96软件进行分析, 用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[28]进行计算.

2 结果与分析

2.1 $2n$ 与 $4n$ 水稻杂交种子发育异常

通过田间对大量 $2n$ 与 $4n$ 水稻杂交种子发育观察, 发现与大多数植物一样^[1], 水稻异倍性间杂交不能获得正常成熟的种子, 但通过胚拯救, 可以获得三倍体水稻^[29]. 种子发育表型见图1和表3. 从中可知, 杂交种子从6 DAP开始变瘪, 发育后期越来越干瘪, 成熟时期(25 DAP)杂交种子只剩一层薄薄的种皮, 内部几乎无内含物, 说明 $2n$ 与 $4n$ 杂交导致种子败育.

2.2 花粉管萌发及伸长情况

为了研究异倍性杂交种子是否正常受精, 本研

图1 (网络版彩色) $2n$ 和 $4n$ 杂交及自交种子发育表型. N, Nip; DH, D海天
Figure 1 (Color online) Seeds phenotypic traits produced by $2n$ and $4n$ crosses. N, Nipponbare; DH, Double Haitian

表 3 $2n$ 和 $4n$ 杂交及自交种子发育表型
Table 3 Seeds phenotypic traits produced by $2n$ and $4n$ crosses

杂交组合	Nip $\times$ Nip	Nip $\times$ D海天	D海天 $\times$ Nip	D海天 $\times$ D海天
3 DAP	饱满	饱满	饱满	饱满
6 DAP	饱满	开始变瘪, 液泡化	开始变瘪, 液泡化	饱满
8 DAP	饱满	更瘪	更瘪	饱满
25 DAP	饱满	干瘪, 只剩种皮	干瘪, 只剩种皮	饱满

究先对 $2n$ 和 $4n$ 水稻进行了花粉粒育性鉴定,随后分别对其自交和杂交花粉管萌发及伸长情况进行观察.结果显示:(1) $2n$ 和 $4n$ 花粉粒均可育,只是 $2n$ 花粉粒育性高于 $4n$ (图2(a)和(b),表4);(2) 花粉粒均能在柱头上萌发,授粉后10 min,各杂交组合均能观察到花粉管开始伸长(图2(c)~(f)),且花粉管萌发及伸长在不同组合中没有显著差异;授粉后50 min,各组合都能观察到花粉管伸入到胚珠基部(图2(g)~(j)).这说明水稻 $2n$ 和 $4n$ 杂交不存在花粉管伸入障碍,可以正常受精,形成初生胚乳核与受精卵.

2.3 胚乳发育情况

为了观察异倍性杂交后胚乳发育的差别,采用石蜡切片对胚乳的发育进行了观察,结果见图3和表5.从中可知,杂交种子均能形成球形胚,而胚乳发育差异在3 DAP即已出现, $2n \times 2n$ 和 $4n \times 4n$ 胚乳开始有细胞壁的形成,胚乳处于细胞化早期,二者发育进程

基本一致,只是 $2n \times 2n$ 胚乳细胞体积小于 $4n \times 4n$; $4n \times 2n$ 的胚乳发育较快,相当于4 DAP的对照,处于细胞化晚期,胚乳细胞紧密聚集在一起,但形成的细胞数量较少;然而 $2n \times 4n$ 胚乳发育较慢,还没有进入细胞化时期,相当于2 DAP的对照,仍处合胞体时期,游离核不断分裂,且在胚乳内部出现一些空泡.

上述结果表明,胚乳发育早期(5 DAP之内),与对照相比,杂交种子胚乳发育差别主要体现在胚乳核进入细胞化时期的时间上.

2.4 *MADS29*表达分析

(i) 组织特异性. 前人研究表明,*MADS29*主要在水稻种子珠心和珠心突起处表达,*MADS29*的表达量受精时达到最高,随着发育进程其后期表达量呈下降趋势.它主要通过调控母体组织细胞退化和维持体内激素平衡来影响种子发育^[10-12].本研究采用RT-PCR和qRT-PCR分析了*MADS29*分别在 $2n$ 和 $4n$

图 2 (网络版彩色)水稻花粉粒育性和花粉管萌发及伸长情况. (a)~(b) 花粉粒育性; (c)~(f) 花粉管萌发; (g)~(j) 花粉管伸长. (a), (c), (g) Nip×Nip; (d), (h) Nip×D 海天; (e), (i) D 海天×Nip; (b), (f), (j) D 海天×D 海天. 黑色箭头指示花粉管深入胚珠基部

Figure 2 (Color online) Vitality, germination and elongation of pollens in rice. (a)~(b) Pollen vitality; (c)~(f) germination of pollens; (g)~(j) elongation of pollens; (a), (c), (g) Nip×Nip; (d), (h) Nip×DH; (e), (i) DH×Nip; (b), (f), (j) DH×DH. The black arrow indicates pollen extended to the ovule base depth

表 4 花粉育性鉴定结果
Table 4 The results of pollen vitality

	Nip	D海天
正常花粉(%)	61.54	33.91
花粉总数(粒)	4943	3863

不同组织中的表达情况, 结果表明, *MADS29* 在 $2n$ 和 $4n$ 的根、茎、叶中不表达, 只在种子中表达(图 4(a)和 (b)), 且在种子中的相对表达量为: 3 DAP>6 DAP>8 DAP(图 4(b)), 这与前人研究结果一致. 图 4 显示, *MADS29* 在 $2n$ 和 $4n$ 种子中的相对表达量差异不大, 说明 *MADS29* 的表达量与基因组剂量无关.

(ii) 表达分析. 为探明 *MADS29* 在异倍性杂交种子败育中的作用, 本研究采用 qRT-PCR 分析其在水稻异倍性杂交及自交种子不同发育时期的相对表达量. 结果发现, 在所有组合中, 3 DAP, *MADS29* 在杂交种子 ($2n \times 4n$ 和 $4n \times 2n$ 分别产生的败育种子) 中的相对表达量与对照 ($2n \times 2n$ 和 $4n \times 4n$ 分别产生的正常种子) 相比, 没有明显差异(图 5); 但从 6 DAP 开始, 在所有杂交组合中基本上都有一个规律, 即 *MADS29* 在杂交种子中的相对表达量高于对照种子, 最高可达 9.82 倍(图 5); 8 DAP, 其相对表达量仍然远高于对照种子, 且在杂交种子中的相对表达量为: 8 DAP>6

图 3 (网络版彩色) 3 DAP 水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交后各组合胚乳发育情况. (a) NipxNip; (b) NipxD海天; (c) D海天xNip; (d) D海天xD海天. EM, 胚; EN, 胚乳
Figure 3 (Color online) Sections of developing rice grains in Diploid and Tetraploid crosses showing endosperm development at 3 day after pollination. (a) NipxNip; (b) NipxDH; (c) DHxNip; (d) DHxDH. EM, Embryo; EN, endosperm

表 5 水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交后各组合胚乳发育情况
Table 5 Endosperm development in Diploid and Tetraploid crosses

	NipxNip	NipxD海天	D海天xNip	D海天xD海天
1~2 DAP	胚乳游离核	胚乳游离核	胚乳游离核	胚乳游离核
3 DAP	开始形成胚乳细胞壁, 细胞化早期	细胞化滞后, 处合胞体时期, 游离核不断分裂, 空泡	细胞化晚期, 细胞数量较少, 紧密聚集	开始形成胚乳细胞壁, 细胞化早期
4~5 DAP	胚乳细胞布满整个胚囊	胚乳细胞壁还没形成, 胚乳游离核持续增多	胚乳细胞聚集更加紧密	胚乳细胞布满整个胚囊

图 4 *MADS29* 在不同组织中的表达. (a) RT-PCR; (b) qRT-PCR
Figure 4 Quantitative RT-PCR of *MADS29* in different tissues. (a) RT-PCR; (b) qRT-PCR

图5 *MADS29* 在水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交及自交种子中的相对表达量. 9, 9311; N, Nip; D9, D9311; DH, D 海天
Figure 5 Quantitative RT-PCR of *MADS29* in interploidy crosses. 9, 9311; N, Nipponbare; D9, D9311; DH, Double Haitian

DAP(图5). 6 DAP和8 DAP时, *MADS29*在 $4n \times 2n$ 中的相对表达量均明显高于 $2n \times 4n$ (图5).

上述结果表明, *MADS29*参与了水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交后种子败育的调控.

2.5 淀粉合成基因的表达分析

胚乳主要由淀粉构成, 其发育的好坏决定了稻米的饱满程度. 为了研究异倍性杂交种子败育的原因, 本文挑选了淀粉合成的2个主要基因*AGPL2*和*AGPS2b*, 采用qRT-PCR分析. 结果表明, 在所有组合中, 这2个淀粉合成基因与*MADS29*一样, 3 DAP杂交种子的相对表达量与对照相比, 没有明显的差异. 但在6 DAP和8 DAP时, 其表达量基本上均低于对照种子, 且在正常饱满种子中的相对表达量为: 8 DAP>6 DAP, 而在杂交瘪种子中的相对表达量则为: 6 DAP>8 DAP(图6). 这与田间对异倍性杂交种子发育表型的观察结果相一致, 即杂交种子6 DAP开始就慢慢变瘪, 8 DAP更瘪, 并一直延续到成熟(图1). 上述表明在水稻异倍性杂交中淀粉合成基因表达下调可能是与种子败育相关的一个关键因素. 另外, 在所有组合中, $4n \times 2n$ 的相对表达量基本上均高于 $2n \times 4n$ (图6).

2.6 生长素基因及母体组织细胞程序化死亡(PCD)相关基因的表达分析

Yin和Xue^[10]研究表明, *MADS29*的表达受生长素

诱导, 且通过直接与母体组织PCD相关基因(*LOC_Os06g17970*和*LOC_Os05g31570*)的启动子相结合, 从而调节母体组织的降解, 在抑制*MADS29*表达时, 生长素基因和母体组织PCD相关基因表达均下调. 为了进一步研究*MADS29*是如何参与异倍性杂交种子败育的调控, 本研究分析了生长素基因(*IAA1*和*IAA19*)和母体组织PCD相关基因(*LOC_Os06g17970*和*LOC_Os05g31570*)的表达. 结果表明, 在所有组合中, 这2类基因在6 DAP的杂交种子中的相对表达量基本上也均高于对照种子(图7).

此外, 还检测了3 DAP和8 DAP的种子中生长素基因及母体组织PCD相关基因的表达变化, 发现这些基因在早期(3 DAP)杂交种子和对照中的相对表达量差异不大, 但后期(8 DAP), 在绝大多数杂交种子中的相对表达量仍高于对照.

上述结果表明, 生长素基因及母体组织PCD相关基因也参与了水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交后种子败育的调控.

3 讨论

3.1 *MADS29*在 $2n$ 水稻中的调控途径

Yin和Xue^[10]研究显示, 水稻授粉后, IAA的表达量增高, 从而激活*MADS29*的表达, *MADS29*与NBS-LRR蛋白基因的启动子结合, 促进珠心和珠心组织的降解, 从而产生正常饱满的种子(图8). Yang

图6 *AGPL2* 和 *AGPLS2b* 在水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交及自交种子中的相对表达量。(a) *AGPL2*; (b) *AGPL2*; 9, 9311; N, Nip; D9, D9311; DH, D 海天
Figure 6 Quantitative RT-PCR of *AGPL2* and *AGPLS2b* in interploidy crosses. (a) *AGPL2*; (b) *AGPL2*; 9, 9311; N, Nip; D9, Double 9311; DH, Double Haitian

图7 生长素基因和母体组织 PCD 相关基因在水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交及自交种子中的相对表达量。9, 9311; N, Nip; D9, D9311; DH, D 海天
Figure 7 Quantitative RT-PCR of *IAA* and *PCD* in interploidy crosses. 9, 9311; N, Nip; D9, Double 9311; DH, Double Haitian

等人^[11]的研究也表明, *MADS29*是通过调控母体组织的细胞退化对水稻种子的发育起作用。在敲除 *MADS29*时, 导致种子败育, 对异常种子进行切片观察发现, 包括胚珠维管束迹和为子代组织早期提供营养的珠心突起在内的共质体运输连续性受到影响。胚乳的营养主要来源于2条途径, 由母体运至子房背

部微管束的营养先卸载至珠心突起, 然后在珠心突起处细胞分流, 一条途径是通过背部退化珠心层经背部多层的糊粉层细胞直接向胚乳输送; 另一条途径是养分通过珠心表皮和退化的珠心层运向胚乳四周, 再经过各处的糊粉层细胞运向内胚乳^[30]。Nayar 等人^[12]研究表明, *MADS29*还可以通过维持体内激素

图8 *MADS29* 调控途径

Figure 8 Regulation pathway of *MADS29*

平衡来影响胚乳发育和籽粒灌浆。本研究选取了 *MADS29* 等7个基因来研究水稻 $2n$ 和 $4n$ 倍性杂交种子败育的调控机制, 结果表明, *MADS29*、生长素基因和母体组织PCD相关基因的表达量在杂交种子中均呈上调趋势, 淀粉合成相关基因呈下降趋势。

3.2 *MADS29* 等相关基因参与了水稻异倍性杂交种子败育的调控

本研究中, 对异倍性杂交种子中 *MADS29* 等基因的表达分析表明, 在3 DAP杂交种子和对照饱满种子中的相对表达量没有明显差异, 但在6 DAP和8 DAP时, *MADS29*、生长素基因和母体组织PCD相关基因的相对表达量均高于对照饱满种子, 淀粉合成基因的相对表达量在杂交种子中低于对照饱满种子。说明 *MADS29* 等相关基因参与了 $2n$ 和 $4n$ 水稻倍性杂交后种子败育的调控, 且 *MADS29* 可能是通过调控这些基因起作用。田间调查结果显示, 在初期(3 DAP), 杂交种子与对照相比, 表型没有特别明显的差异, 6 DAP开始变瘪, 并一直延续到后期(8 DAP, 25 DAP), 说明基因的表达与种子发育表型一致, 也进一步说明了 *MADS29* 等相关基因参与了水稻 $2n$ 与 $4n$ 倍性杂交种子败育的调控机制。本研究中 *MADS29* 的相对表达量在杂交种子中确实发生了明显的变化(上调), 但也只能说明其参与了水稻异倍性杂交种子败育的调控, 但是否通过阻止母体组织细胞的退化来起作用尚待进一步研究。过去本研究组也曾观察到异倍性杂交珠心细胞中淀粉颗粒的异常积累(未发表), 这与其淀粉合成相关基因的表达下调相吻合。至于本文

中涉及的相关基因表达调控关系, 亦需进一步深入研究。

6 DAP和8 DAP时, *MADS29* 在 $4n \times 2n$ 中的相对表达量均高于 $2n \times 4n$, 这或许与 $4n \times 2n$ 杂交种子胚乳较早进入细胞化状态有关, 因为在3 DAP时, $4n \times 2n$ 的胚乳发育较快, 提前进入细胞化, 而 $2n \times 4n$ 的胚乳发育较慢, 细胞化滞后。

3.3 *MADS29* 的高表达是导致种子败育的一种新型调控方式

MADS29 在 $2n$ 和 $4n$ 中的表达量无明显差异(图4), 证明了其表达量与基因组剂量无关, 而杂交种子与对照最大的不同除了基因组剂量外, 就是胚乳母本和父本比例偏离2:1(表6)。Nishiyama和Inomata^[31]提出当胚乳内母本和父本基因的为2:1时, 才能保证种子正常发育。Johnston等人^[32]于1980年也提出了MBE(endosperm balance number)假说, 认为胚乳正常发育所需的母本和父本比例为2:1。随后, Lin^[33]的研究检验了这一假说。因此, 本研究组认为杂交种子胚乳母本和父本比例偏离2:1导致胚乳发育异常, 从而导致 *MADS29* 表达异常。

本研究材料中, 早期(3 DAP) *MADS29* 的相对表达量在杂交种子和对照没有明显的差别, 但后期(6 DAP和8 DAP)在杂交种子中 *MADS29* 的相对表达量均高于对照, 且8 DAP>6 DAP(图5)。而Yin和Xue^[10]研究显示, 在 $2n$ 瘪种子(正常二倍体水稻通过沉默 *MADS29* 后产生的瘪种子)材料中, 其表达量是下降的。说明 *MADS29* 在异倍性杂交种子中表达过高或在正常 $2n$ 种子中沉默都会导致种子败育。Nayar等人^[12]研究表明, *MADS29* 在正常 $2n$ 中过表达, 却不产生种子, 而本实验异倍性杂交种子能够产生种子, 只是后期随着 *MADS29* 的表达量不断升高, 种子败育加剧。说明 *MADS29* 在异倍性杂交种子败育中的调控机制与Nayar等人研究的也不同。综上说明, *MADS29* 的高表达是导致异倍性杂交种子败育的一种新型调控方式。

表6 不同倍性杂交组合
Table 6 Interploidy crosses in rice

胚乳	$2n \times 2n$	$2n \times 4n$	$4n \times 2n$	$4n \times 4n$
母本剂量: 父本剂量	2:1	1:1	4:1	2:1
倍性	$3n$	$4n$	$5n$	$6n$
<i>MADS29</i> 在6~8 DAP的表达变化	正常	上升	上升	正常

参考文献

- Haig D, Westoby M. Genomic imprinting in endosperm: Its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 1991, 333: 1–13
- Scott R J, Spielman M, Bailey J, et al. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 1998, 125: 3329–3341
- Huang Q C, Sun J S. Autotriploid plants obtained from heteroploid rice crosses (in Chinese). *Acta Bot Sin*, 1999, 41: 741–746 [黄群策, 孙敬三. 通过异倍性水稻间杂交获得同源三倍体植株. *植物学报*, 1999, 41: 741–746]
- Vinkenoog R, Bushell C, Spielman M, et al. Genomic imprinting and endosperm development in flowering plants. *Mol Biotechnol*, 2003, 25: 149–184
- Arora R, Agarwal P, Ray S, et al. MADS-box gene family in rice: Genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics*, 2007, 8: 242
- Riechmann J L, Krizek B A, Meyerowitz E M. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 4793–4798
- Lohmann J U, Weigel D. Building beauty: The genetic control of floral patterning. *Dev Cell*, 2002, 2: 135–142
- Yamaguchi T, Hirano H Y. Function and diversification of MADS-box genes in rice. *Sci World J*, 2006, 6: 1923–1932
- Lee S, Kim J, Son J S, et al. Systematic reverse genetic screening of T-DNA tagged genes in rice for functional genomic analyses: *MADS-box* genes as a test case. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 1403–1411
- Yin L L, Xue H W. The MADS29 transcription factor regulates the degradation of the nucellus and the nucellar projection during rice seed development. *Plant Cell*, 2012, 24: 1049–1065
- Yang X, Wu F, Lin X, et al. Live and let die-the Bsister *MADS-box* gene *OsMADS29* controls the degeneration of cells in maternal tissues during seed development of rice (*Oryza sativa*). *PLoS One*, 2012, 7: e51435
- Nayar S, Sharma R, Tyagi A K, et al. Functional delineation of rice *MADS29* reveals its role in embryo and endosperm development by affecting hormone homeostasis. *J Exp Bot*, 2013, 64: 4239–4253
- Nayar S, Kapoor M, Kapoor S. Post-translational regulation of rice *MADS29* function: Homodimerization or binary interactions with other seed-expressed MADS proteins modulate its translocation into the nucleus. *J Exp Bot*, 2014, 65: 5339–5350
- Green T W, Hannah L C. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, a rate-limiting step in starch biosynthesis. *Physiol Plantarum*, 1998, 103: 574–580
- Smith-White B J, Preiss J. Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J Mol Evol*, 1992, 34: 449–464
- Lee S K, Hwang S K, Han M, et al. Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 531–546
- Yuan D Y, Sun Z Z, Tan Y N, et al. A preliminary analysis of gene expression of seven isoforms of ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) in rice endosperm under different temperature conditions (in Chinese). *Hybrid Rice*, 2011, 26: 61–64 [袁定阳, 孙志忠, 谭炎宁, 等. 不同温度下水稻胚乳 AGPase 各同工酶基因表达特征初步分析. *杂交水稻*, 2011, 26: 61–64]
- Underhill D M, Ozinsky A, Smith K D, et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14459–14463
- Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science*, 1998, 281: 1312–1316
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, et al. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 2004, 305: 855–858
- Coll N S, Vercammen D, Smidler A, et al. *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science*, 2010, 330: 1393–1397
- Sun X, Shantharaj D, Kang X, et al. Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 611–620
- Lur H S, Setter T L. Role of auxin in maize endosperm development (timing of nuclear DNA endoreduplication, zein expression, and cytokinin). *Plant Physiol*, 1993, 103: 273–280
- Guo H, Liu X, Lu Y, et al. Structure of mature embryo sac and its abnormal phenomena in autotetraploid rice. *Chin J Rice Sci*, 2005, 20: 283–289
- Li S, Li W, Huang B, et al. Natural variation in *PTBI* regulates rice seed setting rate by controlling pollen tube growth. *Nat Commun*, 2013, 4: 2793
- Yang J P. Improvement of traditional paraffin section preparation methods (in Chinese). *J Biol*, 2006, 23: 45–46 [杨捷频. 常规石蜡切片方法的改良. *生物学杂志*, 2006, 23: 45–46]

- 27 Zhao J, Mun W F, Zhang Z X. Improvement of plant paraffin section technical (in Chinese). *Anhui Agri Sci Bull*, 2009, 15: 69–90 [赵俊, 木万福, 张志星. 植物石蜡切片技术改进. *安徽农学通报*, 2009, 15: 69–90]
- 28 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- 29 Liu L. Study on imprinting and expression of endosperm development genes in hybrid offspring from the cross of $2n$ and $4n$ rice (in Chinese). Master Dissertation. Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2011 [刘磊. $2n$ 与 $4n$ 水稻杂种幼胚后代印记研究及胚乳发育相关基因的表达分析. 硕士学位论文. 四川: 四川农业大学, 2011]
- 30 Gu Y J, Xiong F, Wang Z, et al. A contrast of the endosperm development between rice and wheat (in Chinese). *J Nanjing Normal Univ*, 2001, 24: 65–74 [顾蕴洁, 熊飞, 王忠, 等. 水稻和小麦胚乳发育的比较. *南京师大学报: 自然科学版*, 2001, 24: 65–74]
- 31 Nishiyama I, Inomata N. Embryological studies on cross-incompatibility between $2x$ and $4x$ in *Brassica*. *Jpn J Genet*, 1966, 41: 27–42
- 32 Johnston S A, Den Nijs T P M, Peloquin S J, et al. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet*, 1980, 57: 5–9
- 33 Lin B Y. Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics*, 1984, 107: 103–115

Analysis of genes regulating seed abortion in heteroploid crosses of rice

WU LiMei¹, ZHU XiaoWei^{1,2}, CUI XiaoYun¹, LIU ZhiJian¹, LIU YuTong¹, XU PeiZhou¹,
CHEN XiaoQiong¹, WU XianJun¹ & ZHANG HongYu¹

¹ Yangtze River Valley Hybrid Rice Collaboration Innovation Center, Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resources and Improvement
Ministry of Education, Rice Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

² Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

The *MADS29* gene regulates the plumpness of rice seeds and affects seed development by regulating the degradation of maternal tissues and maintaining the plant's hormone balance. Rice seeds produced by heteroploid crosses exhibit greater rate of sterility than that by seeds of other plants. To determine whether *MADS29* and its related genes regulate seed development, we used four rice cultivars (two diploid and two tetraploid) to produce four self-crossed combinations as the control and eight hybridized combinations as reciprocal crosses. Then, pollen grain fertility, pollen germination, and seed development were observed, and the expressions of *MADS29* and related genes were quantified using RT-PCR. The results showed the following: (1) heteroploid crosses showed 100% successful fertilization, with non-negligible rate of seed abortion. (2) Based on examinations of paraffin sections of seeds at 3 days after pollination (3 DAP) in a $4n \times 2n$ cross, the endosperm had entered the cellularization stage, but the number of cells was lower than that in the control. However, in the endosperm of seeds of $2n \times 4n$ crosses, the cell walls did not form around the nucleus. In addition, some vacuolation was noted in the endosperm, and cellularization was delayed. (3) qRT-PCR results showed that the relative expression levels of *MADS29*, *IAA*, and programmed cell death (PCD) genes associated with maternal tissues in hybrid seeds at 6 DAP and 8 DAP were significantly higher than those of the control. On the contrary, the relative expression of starch synthesis genes in hybrid seeds was significantly lower than that of the control. This suggests that *MADS29* is more highly expressed in the seeds of heteroploid crosses. In addition, it suggested that the expressions of *IAA* and other genes involved in the PCD of maternal tissues was upregulated in the same seeds. However, starch synthesis genes showed downregulated expression levels, leading to the abnormal development of the endosperm, followed by seed abortion. Thus, high expression of *MADS29* leads to hybrid seed abortion, a novel regulatory pattern that is not observed in diploid rice seeds.

***MADS29*, rice, heteroploidy cross, seeds abortion**

doi: 10.1360/N972015-00110