普通野生稻中 S_5^n 基因的鉴定及其胚囊育性研究

魏常敏*, 王兰*, 杨有新, 陈志雄, Muhammad Qasim Shahid, 李金泉, 刘向东†, 卢永根†

华南农业大学广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642

* 同等贡献者

† 联系人, E-mail: xdlu@scau.edu.cn; yglu@scau.edu.cn

2009-08-10 收稿, 2009-11-26 接受

国家自然科学基金-广东省人民政府联合基金重点资助项目(批准号: U0631003)

摘要 普通野生稻具有丰富的遗传多样性, 蕴藏许多有利基因. 利用 S_5^n 功能性标记对来自中国 14 个不同居群的 441 份普通野生稻进行检测, 发现其中 18 份可能携带有 S_5^n 基因, 全部为杂合型, 分别来自 5 个居群, 包括广东遂溪 13 份, 广西玉林 2 份, 海南临高、广东高州和江西东乡各 1 份. 进一步对这些材料 S_5 座位可能存在的缺失及其两端 DNA 进行测序, 发现全部材料缺失的 DNA 片段都与已知携带有 S_5^n 的品种 02428 一致, 说明这 18 份材料确实存在 S_5^n 基因. 对其中的 15 份材料自交一代进行基因型检测, 检测到 3 种不同的基因型植株, 其分离比($S_5^i S_5^j / S_5^j S_5^j : S_5^n S_5^n : S_5^i S_5^n$)严重偏离 1:2:1, 其中 S_5^n 的杂合型和纯合型植株比例明显偏少, 说明部分 S_5^n 配子可能无法正常受精. 对 4 份代表性材料的 S_5 座位进行全序列测定并与栽培稻比较, 显示普通野生稻 S_5^n 序列出现少数碱基的差异. 初步推测 S_5^n 基因在普通野生稻中已形成, 属于古老的基因. 对携带有 S_5^n 材料的胚囊育性进行研究, 发现育性总体偏低, 表明这些材料还可能存在除 S_5 座位外决定胚囊育性其他座位的互作.

关键词

水稻(*Oryza sativa* L.)

S_5^n

普通野生稻(*O. rufipogon* Griff.)

序列分析

胚囊育性

亚洲栽培稻包括籼稻与粳稻两个亚种, 它们在许多性状上具有互补性. 利用籼稻和粳稻杂交组配的杂种 F_1 具有强大的生物学优势. 然而, 由于其杂种 F_1 结实率普遍偏低, 产量优势难以得到发挥, 限制了其优势的有效利用. 已有的研究表明, 籼粳杂种 F_1 不育性主要表现为雌性不育和雄性不育^[1], 两种不育类型均受多个基因座位互作控制^[2]. 其中决定雌性不育的最重要基因之一是位于水稻第 6 染色体上的 S_5 , 籼稻在该座位的基因型一般为 $S_5^i S_5^j$, 粳稻为 $S_5^j S_5^j$, “广亲和”品种为 $S_5^n S_5^n$. 一般认为, 当“广亲和”品种与籼稻或粳稻杂交时, 杂种 F_1 雌性可育, 而籼稻和粳稻杂交 F_1 雌性则表现部分败育. 这就是著名的“广亲和基因理论”, 其中 S_5^n 被命名为“广亲和基因”^[3]. 自从该理论被提出之后, 国内外学者对 S_5^n 进

行了大量研究^[4,5], 特别是 Chen 等人^[6]成功克隆了 S_5^n 基因, 使该项研究大大推进一步. Chen 等人发现 S_5^n 在其编码蛋白的 N 末端缺失了 136 bp 的大片段, 造成蛋白亚细胞定位的改变, 导致功能丧失, 从而可以克服籼稻与粳稻杂交的雌性不育. 杨有新等人^[7]利用 S_5^n 基因的特殊 DNA 序列缺失, 设计了 S_5^n 基因功能性标记, 利用该功能性标记和进一步的序列测定成功地在中国水稻微核心种质中发掘出 8 份携带有 S_5^n 基因的水稻新种质. 该研究为进一步利用分子技术快速并准确地发掘携带有 S_5^n 基因新种质奠定基础.

普通野生稻作为栽培稻的祖先种, 在长期的进化过程中形成了丰富的遗传多样性, 拥有栽培品种遗传改良所需的许多优良基因^[8]. 有关普通野生稻中是否存在 S_5^n 基因的问题, 目前仅见少数的报道^[9,10],

英文版见: Wei C M, Wang L, Yang Y X, et al. Identification of an S_5^n allele in *Oryza rufipogon* Griff. and its effect on embryo sac fertility. Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-0154-y

这可能是由于普通野生稻的遗传背景较为复杂,利用传统的测交法鉴定难度较大所致.目前 S_5 基因已被克隆,利用分子技术鉴定 S_5^n 基因的方法也已建立^[7],所以也可以进行大量并快速鉴定普通野生稻中的 S_5^n 基因.本研究利用我们以前建立的“基于功能性标记和测序发掘携带有 S_5^n 基因的水稻新种质”的方法,对分布在中国广东、广西、湖南、海南和江西等地的普通野生稻进行鉴定,一方面用以发掘普通野生稻中的 S_5^n 基因新种质,另一方面对可能携带有 S_5^n 基因的材料的胚囊育性等进行研究.

1 材料与方法

(i) 材料. 选用分布在中国广东、广西、湖南、海南和江西境内 14 个不同居群的普通野生稻共 441 份,其中广东高州 141 份、广东增城 29 份、广东惠来 60 份、广东遂溪 22 份、广东佛冈 25 份、广东博罗 28 份、江西东乡 84 份、海南琼海 28 份、海南临高 2 份、广西玉林 6 份、广西贵港 8 份、广西上林 5 份、湖南茶陵 2 份和湖南江永 1 份. 这些材料均保存于“华南农业大学稻属种质资源保存基地”中.

(ii) PCR 引物设计. 引物 1(S_5^n 基因功能性标记之一): 参照杨有新等人^[7]的设计. 上游引物为 S5-t1f (5'-CGTCTTGCTTCTTCATTCCC-3'); 下游引物为 S5-t1r (5'-GTAGGTAACACAGGCAGAG-3'). 引物 2 (S_5^n 基因功能性标记之二): 上游引物为 S5-t2f, 其 DNA 序列同 S5-t1f; 下游引物为 S5-t2r (5'-AGAGTTCACAGCGTGATCTG-3'). 其他引物 (S_5^n 基因缺失区下游序列测序): 根据 NCBI 数据库提供的日本晴序列,将 S_5 基因缺失区下游的 DNA 片段分成两部分,分别进行 PCR 扩增后再拼接,两次扩增引物序列分别为引物 3 (S5-q1f, 5'-AGTTGGAGTGTCCCTCCTCC-3'; S5-q1r, 5'-ATTGTCACTGAGTAGGTTGG-3') 和引物 4 (S5-q2f, 5'-CATTAAGCTACTGCTTGCCC-3'; S5-q2r, 5'-TCTTGGCTTGAGGTCAGGAG-3'). 以上引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成.

(iii) PCR 扩增和序列分析. 剪取普通野生稻种茎上的幼嫩叶片,按 Zheng 等人^[11]的 SDS 简易抽提法(稍加修改)抽提基因组 DNA 作为 PCR 的模板. PCR 扩增反应体系(20 μ L)包括 20~30 ng 模板 DNA, 0.15 μ mol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 $\times$ PCR buffer 和 1 U *Taq* 聚合酶. PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;

94 $^{\circ}$ C, 40 s, 58 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 32 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. PCR 反应在 Mycycler (Bio-Rad 公司)热循环仪上进行.

用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化目的片段. 纯化后的 PCR 产物直接送上海英骏生物技术有限公司测序. 利用 DNA-star 软件中的 Seqman 和 MegAlign 进行序列拼接和相似性分析.

(iv) 携带有 S_5^n 普通野生稻自交后代单株 S_5 座位的基因型鉴定. 对所鉴定出的携带有 S_5^n 的普通野生稻进行套袋自交,收获自交种子种成自交一代,对每份材料的自交一代群体按照单株对 S_5 座位的基因型进行鉴定,方法同上.

(v) 携带有 S_5^n 基因普通野生稻成熟胚囊育性鉴定. 参照 Zeng 等人^[12]的 WE-CLSM 方法. 取当天开花的小穗,每份材料取 150~250 个小穗,用 FAA 溶液(50%乙醇:冰乙酸:甲醛=89:6:5)固定 24 h, 50%乙醇冲洗后保存于 70%乙醇中,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用. 在解剖镜下于 70%乙醇溶液中解剖分离出子房,分别以 50%, 30%, 10% 的乙醇和蒸馏水进行梯度复水,每级间隔 20 min, 2% 钾矾溶液(钾矾与水的质量比 2:100)媒染 20 min, 10 mg/L 曙红(4%蔗糖溶液配制)染色 10~12 h, 1% 钾矾溶液分色 20~30 min, 蒸馏水冲洗后梯度乙醇脱水. 水杨酸甲酯透明. 透明后的子房放在凹面玻片上,盖片后在 Leica SPE 激光扫描共聚焦显微镜下用波长为 543 nm 的激光对子房进行整体分层扫描并进行图像重构,根据胚囊的结构特点判断育性并进行统计.

成熟花粉育性鉴定和结实率统计参照史磊刚等人^[13]的方法.

2 结果与分析

2.1 利用 S_5^n 基因功能性标记检测普通野生稻 S_5^n 基因

利用引物 1 (S5-t1f/S5-t1r)对 441 份普通野生稻进行 PCR 扩增,进一步检测扩增产物,发现其中包括来自广东遂溪的编号为 SXW005, SXW006, SXW008, SXW009, SXW010, SXW013, SXW014, SXW016, SXW017, SXW018, SXW021, SXW022 和 SXW024, 广西玉林的 YLW001, YLW003, 海南临高的 LGW001, 广东高州的 GZW032, 江西东乡 DXW051

共 18 份普通野生稻均扩增出一条与 02428 分子量一致的 DNA 带(其他的编号没有此带),同时还有一条与不携带有 S_5^n 基因品种(包括南京 11 和台中 65)一样的带. 利用引物 2 (S5-t2f/S5-t2r)进一步对以上 18 份材料进行 PCR 扩增检测,结果完全一致(图 1),说明包括 SXW005 等 18 份普通野生稻均可能携带有 S_5^n 基因,而且它们 S_5 座位均为杂合基因型,即 $S_5^nS_5^i$ 或者 $S_5^nS_5^j$.

2.2 携带有 S_5^n 基因普通野生稻功能区序列测定和分析

利用引物 2 (S5-t2f/S5-t2r)对携带有 S_5^n 基因普通野生稻的 DNA 进行 PCR 扩增和检测,每份材料均能扩增出 2 条带,其中一条较短的是从 S_5^n 扩增出来,另一条较长的是从 S_5^i 或 S_5^j 扩增出来的. 分别对 2 个产物进行测序,其中成功测序的材料有 10 份,为 GZW032, SXW005, SXW006, SXW009, SXW014, SXW024, YLW001, YLW003, LGW001 和 DXW051. 对其序列分析表明,10 份材料中较短的 DNA 片段在 S_5 座位相同位置中缺失的区域及其两端序列与 02428 的一致,即在第一个外显子的 TAAT 框两侧-72~-31 和-26~+67 bp 区域共计缺失 136 个碱基,与 Chen 等人^[6]公布的序列相同;另一条较长 DNA 片段在相同位置的序列与巴利拉或南京 11 的相同(图 2),说明这 10 份材料在 S_5 座位均可能含有杂合的 S_5^n 基因,其基因型为 $S_5^nS_5^i$ 或者 $S_5^nS_5^j$. 另有 8 份材料因为双峰的影响,测序未成功,为此,我们利用其自交后代分离出的 S_5^n 基因纯合型进行测序验证.

2.3 携带有 S_5^n 的普通野生稻自交一代的 S_5 基因型检测

为了进一步验证普通野生稻中 S_5^n 的可靠性,本研究对以上检测到材料进行套袋自交收获种子,以

培育自交一代. 其中由于 3 份材料(YLW001, YLW003 和 LGW0013)未收到种子,所以实际收到自交一代种子的材料只有 15 份. 培育自交一代的目的:一方面希望在自交一代中能够获得 S_5^n 基因型纯合的单株($S_5^nS_5^n$),利用该纯合单株进一步测序验证 S_5^n 基因的存在;另一方面是统计自交后代不同基因型的比例. 15 份材料自交一代共成活 322 株,对每个单株均利用引物 S5-t2f 和 S5-t2r 进行 PCR 扩增和检测,发现所有材料自交一代 S_5 座位均出现分离,除 DXW051, SXW005 和 SXW009 外,其他材料均同时出现 3 种基因型的分离(图 3),也就是说,每份的自交一代中有一部分植株的基因型为杂合型($S_5^nS_5^i$ 或 $S_5^nS_5^j$),一部分是籼型($S_5^iS_5^i$)或粳型($S_5^jS_5^j$),还有一部分是本文所期望的 S_5^n 纯合型($S_5^nS_5^n$). 自交一代共检测到 39 个单株 S_5 座位是纯合型的 $S_5^nS_5^n$. 统计结果见表 1. 从表 1 可以看出,15 份材料自交一代的基因型($S_5^iS_5^i/S_5^jS_5^j:S_5^nS_5^n:S_5^iS_5^n:S_5^jS_5^n$)的分离比例均严重偏离理论的分离比 1:2:1,总的趋势是其中基因型为 $S_5^nS_5^n$ 的纯合型植株和 $S_5^nS_5^i$ 的杂合型植株都偏少,特别是 DXW051, SXW005 和 SXW009 3 份材料的自交一代均未检测到携带 S_5^n 的纯合型植株. 对以上 39 株 S_5^n 纯合型的植株进行 S_5^n 功能区序列测定和分析,发现所有植株在 S_5 座位中缺失的区域及其两端 DNA 序列与 02428 的完全一致,说明这 39 株材料在 S_5 座位的基因是失活的,即含有纯合的 S_5^n 基因型($S_5^nS_5^n$);另外,也进一步证明“2.1”部分检测到的 15 份普通野生稻确实含有杂合的 S_5^n 基因($S_5^nS_5^i$).

2.4 携带有 S_5^n 基因普通野生稻 S_5 基因全序列测定和分析

利用引物 3 (S5-q1f/S5-q1r)和引物 4 (S5-q2f/S5-q2r)对以上已鉴定出携带有 S_5^n 基因的 4 份普通野生稻(代表 3 个不同居群,包括广东高州 GZW032、广

图 1 利用引物 2 (S5-t2f/S5-t2r)检测普通野生稻 S_5 基因型的电泳图

1~18, 携带 S_5^n 的普通野生稻杂合型植株,从小到大依次为 SXW005, SXW006, SXW008, SXW009, SXW010, SXW013, SXW014, SXW016, SXW017, SXW018, SXW021, SXW022, SXW024, YLW001, YLW003, LGW001, GZW032 和 DXW051; NT, 南京 11 (籼稻, $S_5^iS_5^i$); TZ, 台中 65 (粳稻, $S_5^jS_5^j$); GQ, 02428($S_5^nS_5^n$)

1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT 02428
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT ballila
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT Nanjing11
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT DXW051-L
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT GZW032-L
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT SXW024-L
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT SXW005-L
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT DXW051-S
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT GZW032-S
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT SXW024-S
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT SXW005-S
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT YLW001-S
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT YLW003-S
 1 ATCAACCCATTTCCTTCTACGTTTGACTGCTGCTGCCCTGAGCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAGGGATTAAAT LGW001-S

81 TGCT-----TAAT----- 02428
 81 TGCTCGCTCTACGAATCTGCCCTGAGTAACAATGACTGACTTTAATTTGTTGACAGCTAGGGTGGGGATCGAGATG ballila
 81 TGCTCGCTCTACGAATCTGCCCTGAGTAACAATGACTGACTTTAATTTGTTGACAGCTAGGGTGGGGATCGAGATG Nanjing11
 81 TGCTCGCTCTACGAATCTGCCCTGAGTAACAATGACTGACTTTAATTTGTTGACAGCTAGGGTGGGGATCGAGATG DXW051-L
 81 TGCTCGCTCTACGAATCTGCCCTGAGTAACAATGACTGACTTTAATTTGTTGACAGCTAGGGTGGGGATCGAGATG GZW032-L
 81 TGCTCGCTCTACGAATCTGCCCTGAGTAACAATGACTGACTTTAATTTGTTGACAGCTAGGGTGGGGATCGAGATG SXW024-L
 81 TGCTCGCTCTACGAATCTGCCCTGAGTAACAATGACTGACTTTAATTTGTTGACAGCTAGGGTGGGGATCGAGATG SXW005-L
 81 TGCT-----TAAT----- DXW051-S
 81 TGCT-----TAAT----- GZW032-S
 81 TGCT-----TAAT----- SXW024-S
 81 TGCT-----TAAT----- SXW005-S
 81 TGCT-----TAAT----- YLW001-S
 81 TGCT-----TAAT----- YLW003-S
 81 TGCT-----TAAT----- LGW001-S

89-----CCGGCGCCACAGCAGC 02428
 161 GTGATCTTGGAGCAGCCACAGCTGCTCTTCTTCTTCTTCTTGTAGCAGCTGCAGCTGCAACCGGCGCCACAGCAGC ballila
 161 GTGATCTTGGAGCAGCCACAGCTGCTCTTCTTCTTCTTCTTGTAGCAGCTGCAGCTGCAACCGGCGCCACAGCAGC Nanjing11
 161 GTGATCTTGGAGCAGCCACAGCTGCTCTTCTTCTTCTTCTTGTAGCAGCTGCAGCTGCAACCGGCGCCACAGCAGC DXW051-L
 161 GTGATCTTGGAGCAGCCACAGCTGCTCTTCTTCTTCTTCTTGTAGCAGCTGCAGCTGCAACCGGCGCCACAGCAGC GZW032-L
 161 GTGATCTTGGAGCAGCCACAGCTGCTCTTCTTCTTCTTCTTGTAGCAGCTGCAGCTGCAACCGGCGCCACAGCAGC SXW024-L
 161 GTGATCTTGGAGCAGCCACAGCTGCTCTTCTTCTTCTTCTTGTAGCAGCTGCAGCTGCAACCGGCGCCACAGCAGC SXW005-L
 89-----CCGGCGCCACAGCAGC DXW051-S
 89-----CCGGCGCCACAGCAGC GZW032-S
 89-----CCGGCGCCACAGCAGC SXW024-S
 89-----CCGGCGCCACAGCAGC SXW005-S
 89-----CCGGCGCCACAGCAGC YLW001-S
 89-----CCGGCGCCACAGCAGC YLW003-S
 89-----CCGGCGCCACAGCAGC LGW001-S

105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA 02428
 241 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA ballila
 241 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA Nanjing11
 241 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA DXW051-L
 241 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA GZW032-L
 241 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA SXW024-L
 241 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA SXW005-L
 105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA DXW051-S
 105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA GZW032-S
 105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA SXW024-S
 105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA SXW005-S
 105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA YLW001-S
 105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA YLW003-S
 105 CGACGACGAGTTGGAGTGTCCCTCTCCATCTTCGGTAAGTAGCAAAGCACAGTATGACATTCACGAATGCATGTCATGA LGW001-S

图2 携带有 S_5^n 基因普通野生稻(部分)缺失区及两端序列的相似性分析

“-”表示缺失的碱基,材料名称后面的“-L”表示携带 S_5^i 或 S_5^j 的DNA序列,加“-S”表示携带 S_5^n 的DNA序列。图中 S_5^n 的只显示7份代表性材料,其他3份(包括SXW006, SXW009和SXW014)未显示,其结果一致; S_5^i 或 S_5^j 的只显示4份(DXW051, GZW032, SXW024和SXW005)材料,其他的6份未显示,其结果一致

东遂溪 SXW005 和 SXW024、江西东乡 DXW051)的 S_5^n 基因缺失区 3'以外的区段进行 PCR 扩增和测序,并进一步与“2.2”部分的测序结果一起拼接,连接拼成 S_5^n 基因的全序列。全序列分析表明,4份材料 S_5^n 基因存在5个位点的差异,其中2个处于外显子区域、3个处于内含子区域(表2)。外显子区域+1234 bp处, SXW005 为 C, SXW024, GZW032 和 DXW051 为 A, 南京 11 和 02428 均为 C, 巴利拉为 A; +1827 bp处, DXW051 为 T, GZW032, SXW005 和 SXW024 为 C 和 T 的双峰, 而南京 11 和 02428 为碱基 C, 巴利拉为 T, 其中 GZW032, SXW005 和 SXW024 为 C 和 T 的双峰表明该位点可能存在点突变。内含子区域

+260 bp 处, SXW024 和 DXW051 为 T, SXW005 和 GZW032 为 C, 而 02428, 巴利拉和南京 11 均为 T; +293 bp 处, DXW051 为 A, SXW005, SXW024 和 GZW032 为 G, 而 02428, 巴利拉和南京 11 均为 A; +368 bp 位点, SXW005, SXW024, GZW032 和 DXW051 为 G, 而 02428, 巴利拉和南京 11 均为 A。以上结果说明,4份普通野生稻携带的 S_5^n 基因DNA序列总体上与02428的一致。

2.5 携带有 S_5^n 基因的普通野生稻的胚囊育性

利用 WE-CLSM 对携带有 S_5^n 基因的15份普通野生稻成熟胚囊的结构进行观察,发现不同材料除

表 1 15 份携带有 S_5^n 的普通野生稻自交一代基因型检测结果

野生稻编号	株数 ^{a)}	不同基因型的植株数			分离比 ^{b)}
		$S_5^i S_5^j / S_5^j S_5^j$	$S_5^n S_5^{ij}$	$S_5^n S_5^n$	
SXW005	9	4	5	0	1:1.25:0
SXW006	17	10	6	1	1:0.60:0.10
SXW008	32	14	10	8	1:0.71:0.57
SXW009	8	1	7	0	1:7:0
SXW010	10	5	4	1	1:0.80:0.20
SXW013	20	11	8	1	1:0.73:0.09
SXW014	19	8	9	2	1:1.13:0.25
SXW016	20	10	9	1	1:0.90:0.10
SXW017	37	12	21	4	1:1.75:0.33
SXW018	12	6	3	3	6:0.50:0.50
SXW021	50	21	22	7	1:1.05:0.33
SXW022	20	6	11	3	1:1.83:0.50
SXW024	23	10	12	1	1:1.20:0.10
GZW032	17	6	11	1	1:1.83:0.17
DXW051	19	5	14	0	1:2.80:0

a) 因普通野生稻种子发芽率低而且材料间差异大，所以不同材料自交后代成活的株数差异很大；b) 分离比指基因型 ($S_5^i S_5^j / S_5^j S_5^j : S_5^n S_5^{ij} : S_5^n S_5^n$) 比例

图 3 利用引物 2 (S_5 -t2f / S_5 -t2r)检测携带有 S_5^n 普通野生稻自交一代基因型的部分电泳图

图中只显示 SXW024 中 15 个单株的检测结果，其他的结果类似(未显示)。其中 2~4, 11 和 14 号单株为 S_5^n 杂合体，7 号单株为 S_5^n 纯合体，其他为 S_5^i 或 S_5^j 的纯合体。NT，南京 11(籼稻， $S_5^i S_5^j$)；QG，秋光(粳稻， $S_5^i S_5^j$)；GQ，02428($S_5^n S_5^n$)；SX，广东遂溪普通野生稻 SXW024，携带有杂合型 $S_5^n S_5^{ij}$

表 2 4 份携带有 S_5^n 基因普通野生稻 S_5 基因 DNA 序列的差异位置

位置	02428	巴利拉(<i>japonica</i>)	南京 11(<i>indica</i>)	SXW005	SXW024	GZW032	DXW051	所在区域
+260 bp	T	T	T	C	T	C	T	内含子
+293 bp	A	A	A	G	G	G	A	内含子
+368 bp	A	A	A	G	G	G	G	内含子
+1234 bp	C	A	C	C	A	A	A	外显子
+1827 bp	C	T	C	C/T	C/T	C/T	T	外显子

具有一定频率的正常胚囊外(图 4(a)和(b))，均存在不同程度的异常胚囊，主要有：(i) 胚囊退化，即没有明显的胚囊腔，只见胚囊痕迹(图 4(c))；(ii) 小胚囊，其胚囊体积明显比正常的小，胚囊内的核或细胞发育不正常(图 4(d)和(f))；(iii) 胚囊发育停滞，有些停留在单核胚囊时期(图 4(g))，有些停在二核胚囊时期(图 4(h))，有些停在四核或以后的时期(图 4(i))。由于这些结构异常的胚囊，都没有正常的卵细胞和极核，所以是无法正常受精发育的，可以认为是不育的。按照这个标准，对以上材料的胚囊育性进行统计(表 3)。从表 3 可以看出，15 份材料平均胚囊育性为 57.06%，

最高为 100%，最低只有 35.23%，显示了不同材料可能存在其他的基因型差异。由于所有材料的花粉育性均在 50%以上，理论上不影响受粉，而结实率平均值只有 33.98%，所以胚囊育性偏低可能是导致结实率低的主要原因之一。

3 讨论

3.1 “基于功能性标记和测序”方法在普通野生稻中发掘携带有 S_5^n 基因新种质的可行性

普通野生稻是否携带有 S_5^n 基因是一个重要的理

图 4 携带有 S_5^n 基因普通野生稻胚囊结构图

(a)和(b)为正常胚囊, (c)~(i)为异常胚囊. (a) 正常胚囊, E 为卵细胞, S 为助细胞, P 指极核, A 指反足细胞团; (b) 正常胚囊受精; (c) 胚囊退化(箭头); (d)~(f) 各种小胚囊, 箭指异常胚囊核; (g) 胚囊发育停留在单核时期(箭头); (h) 胚囊发育停留在二核时期(箭头); (i) 胚囊发育停留在四核时期(箭头)

表 3 携带有 S_5^n 基因普通野生稻胚囊育性、花粉育性和结实率统计^{a)}

材料编号	结实率(%)	胚囊育性(%)	花粉育性(%)
DXW051	26.83	85.00	52.13
SXW005	26.71	60.00	56.51
SXW006	19.47	41.94	58.95
SXW008	50.82	50.00	95.86
SXW009	17.43	42.37	61.60
SXW010	21.57	47.22	68.06
SXW014	39.18	35.23	98.22
SXW016	16.46	39.44	—
SXW019	52.35	57.89	71.54
SXW021	13	39.66	52.61
SXW022	57.3	88.37	76.42
SXW024	27.57	54.72	55.56
GZW032	73.06	100.00	98.40
平均值	33.98	57.06	70.49

a) GZW032 数据引自杨培周(华南农业大学硕士论文, 2005); “—”表示数据缺失

论问题, 然而在 S_5^n 基因被成功克隆之前, 要大量并准确鉴定几乎是不可能的, 这主要是因为通常采用的“测交法”是建立在大量杂交和对杂交后代分析的基础上进行的, 即利用一定数量的典型籼稻和粳稻

作为测验种分别与待测材料进行杂交, 通过观察测交 F_1 小穗育性的正常与否来判定材料是否具有“广亲和基因”(S_5^n), 只有当所有测交 F_1 的小穗育性均在 70% 以上, 被测材料才被鉴定认为是“广亲和品

种”(S₅ⁿ)^[2]。普通野生稻的遗传背景十分复杂,而且几乎都是杂合体,测交一代实际上相当于“三交”一代,将出现类似 F₂ 代的分离,所以是无法通过其测交一代的小穗育性来准确判定被测材料是否具有 S₅ⁿ 基因的。这可能也是至今为何有关普通野生稻是否携带有 S₅ⁿ 基因的报道比较少的原因。本室于 2007 年通过测交法对 87 个不同编号的高州普通野生稻进行 S₅ⁿ 基因鉴定,一共组配了 261 个测交组合,结果发现,所有组合内的单株间小穗育性均出现显著的分离,如其中有一个测交组合,单株间的小穗育性分离幅度在 60%以上(魏常敏,华南农业大学硕士学位论文,2009),无法依据育性判定其是否含有 S₅ⁿ 基因(实际上这也是为何本文未进一步再通过测交验证 S₅ⁿ 基因最重要的原因之一)。所以,有必要寻找其他更有效的方法。值得庆幸的是,2008 年 S₅ⁿ 被成功克隆,这一重要成果为直接利用该基因的信息进行快速并准确鉴定普通野生稻的 S₅ⁿ 基因提供了可能。为了建立利用分子技术鉴定普通野生稻中的 S₅ⁿ 基因,本室首先利用栽培稻进行研究,成功地建立了“基于 S₅ⁿ 功能性标记和测序”的方法鉴定携带有 S₅ⁿ 基因水稻新种质的方法,并成功地在我国的水稻微核心种质中发掘出 8 份携带有 S₅ⁿ 基因新种质^[7]。本文在此基础上,进一步利用 S₅ⁿ 功能性标记和测序方法对普通野生稻进行研究,一方面验证了该方法不但可行,而且准确有效;另一方面,成功地在普通野生稻中发掘出 18 份携带有 S₅ⁿ 基因的新种质,为水稻籼粳育种提供新质源,同时也为研究 S₅ⁿ 基因的起源和进化提供物质基础。

3.2 普通野生稻 S₅ⁿ 基因起源初探

亚洲栽培稻起源于普通野生稻^[14]。那么作为能克服亚洲栽培稻 2 个亚种杂种 F₁ S₅ 座位胚囊不育的 S₅ⁿ 基因是否也起源于普通野生稻? 换句话说, S₅ⁿ 基因在普通野生稻中是否已分化形成,并在驯化中“传到”栽培稻中? 要回答这个问题,证据之一是在远离栽培稻的普通野生稻居群中找到一定数量携带有 S₅ⁿ 基因的材料。卢诚等人^[9]、刘俭飞^[10]分别报道在东乡普通野生稻和海南藤野普通野生稻发现“广亲和基因”(S₅ⁿ)。本文通过 S₅ⁿ 功能性标记和进一步测序在普通野生稻中鉴定出 18 份携带有 S₅ⁿ 基因的新材料,分别来自广东遂溪和高州、广西玉林、海南临高和江西东乡等 5 个居群,说明 S₅ⁿ 基因在普通野生稻中已经

存在,而且具有普遍性。问题是普通野生稻中的 S₅ⁿ 基因是来自本身的分化,还是由于和周围的栽培稻串粉获得? 为此,我们仔细分析了所鉴定材料的原生境情况。其中来自广东遂溪县携带有 S₅ⁿ 的普通野生稻份数最多,共有 13 份,占总数的 72%,应该说是有一定代表性的。该居群的原生境是:内塘水库,四面环山,上游是大水库,野生稻生长水库坝底下流的深水塘中,面积大,周围无栽培稻种植,隔离得比较好,可以排除外来栽培稻的基因渗入。由此可以认为普通野生稻中的 S₅ⁿ 基因应该来自本身的分化,而不是来自栽培稻串粉获得。也就是说, S₅ⁿ 基因在普通野生稻中已形成,并非在进化成栽培稻后才出现,说明 S₅ⁿ 基因是一个古老的基因。这可能也是为何目前发现携带有 S₅ⁿ 基因的原始材料基本上是中间型水稻品种的原因之一,中间型水稻品种往往较原始。

对 4 份来自不同居群携带有 S₅ⁿ 基因普通野生稻 S₅ 座位基因进行全测序分析发现, SXW005, SXW024 和 GZW032 在 +1827 bp 位点表现为 C 和 T 的杂合,这些突变很可能是普通野生稻通过点突变向籼稻粳稻分化的中间状态。由此推测 S₅ 基因在进化过程中, S₅ⁿ 和 S₅ⁱ/S₅^j 都起源于原始的普通野生稻,以后在驯化的过程中,少数的栽培稻保留了 S₅ⁿ 基因,多数则保留 S₅ⁱ 或 S₅^j 并进一步进化。

此外,本研究发掘出的 18 份携带有 S₅ⁿ 基因普通野生稻 S₅ 座位均为杂合体,没有发现 S₅ⁿ 纯合型的情况,只有当这些材料自交后才发现纯合型。推测形成这种现象的原因有:一是普通野生稻同源染色体之一 S₅ 座位基因突变成 S₅ⁿ 基因,另一条相对应的基因不变,形成杂合等位基因型 S₅ⁿS₅ⁱⁱⁱ;二是早期具有 S₅ⁿ 基因的野生稻通过传粉将该基因转给其他的单株,形成杂合的后代。这 2 种杂合体均可通过种茎的无性繁殖而长期保持杂合状态。至于自交后代中 S₅ⁿ 纯合型和杂合型比例都比理论预期的明显低,而 S₅ⁱ/S₅^j 的纯合型或杂合型却明显高,这可能是由于 S₅ⁿ 配子的竞争力弱于 S₅ⁱ 或 S₅^j 导致,有关问题值得进一步研究。

3.3 普通野生稻的胚囊不育性可能涉及包括 S₅ 座位在内的多个座位的基因互作

本文通过 WE-CLSM 技术对其中的 15 份携带有 S₅ⁿ 基因普通野生稻的胚囊育性进行研究,结果是胚囊育性总体偏低,平均为 57%,除 3 份材料外,其他材料均在 60% 以下,最低的育性只有 35%。从理论上

讲, 这些普通野生稻均携带有 S_5^n 基因, 也就是说, 它们具有所谓的“广亲和基因”, 其胚囊育性应该是正常或接近正常的, 但实际情况并非如此. 这是否与“广亲和基因”理论存在矛盾? 不是的, 其主要原因是普通野生稻具有复杂的遗传背景和高度的杂合性. 许多研究已表明, 水稻籼粳杂交 F_1 胚囊部分败育除可能由 S_5 座位杂合基因互作(S_5^i/S_5^j)造成外, 还可能由其他座位杂合基因互作导致, 如 $S_7^{[15]}$, S_8 , S_9 , S_{15} , S_{16} 和 S_{17} 等^[16~18], 这些基因座位的遗传模式与 S_5 的基本一致, 每个座位杂合均可以引起杂种的胚囊部分败育, 同样, 这些座位也存在作用类似“广亲和基因”的“中性基因”^[19]. 从理论上讲, 杂种 F_1 每个座位

的不育性只能通过其相应的“中性基因”(或“广亲和基因”)加以克服, 换句话说, S_5^n 基因是不能克服除 S_5 座位外的不育^[1,15~18]. 本研究通过对 441 份普通野生稻研究, 发现其中的 18 份具有 S_5^n 基因, 而且都是杂合型, 这些材料类似籼或粳稻与具 S_5^n 基因水稻杂交 F_1 , 虽然它们在 S_5 座位携带有 S_5^n 基因, 但其他的座位可能是杂合的(S_5^i/S_5^j), 没有类似 S_5^n 基因的“中性基因”, 所以同样也引起胚囊的部分败育, 导致胚囊育性偏低. 此外, 普通野生稻胚囊败育的类型与籼粳杂交 F_1 的也不尽一致, 这也说明在普通野生稻中可能存在除 S_5 座位外与胚囊育性有关的其他座位的杂合基因互作. 有关问题值得进一步深入研究.

致谢 本文得到华中农业大学张启发院士及其实验室的陈炯炯博士的大力支持. 实验过程中得到黄成达、赵杏娟、傅雪琳、俞淑红和李艳红等的协助, 在此一并致谢.

参考文献

- 1 吕川根, 邹江石. 水稻亚种间亲和性的研究进展. 江苏农业学报, 2000, 16: 50—56
- 2 Song X, Qiu S Q, Xu C G, et al. Genetic dissection of embryo sac fertility, pollen fertility, and their contributions to spike let fertility of intersubspecific hybrids in rice. Theor Appl Genet, 2005, 110: 205—211
- 3 Ikehashi H, Araki H. Genetics of F_1 sterility in remote crosses of rice. In: IRRI, ed. Rice Genetics. Manila, Philippines: IRRI, 1986. 119—130
- 4 Qiu S Q, Liu K D, Jiang J X, et al. Delimitation of the rice wide compatibility gene S_5^n to a 40-kb DNA fragment. Theor Appl Genet 2005, 111: 1080—1086
- 5 Ji Q, Lu J F, Chao Q, et al. Delimiting a rice wide-compatibility gene S_5^n superscript stop to a 50-kb region. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1495—1503
- 6 Chen J J, Ding J H, Ouyang Y D, et al. A triallelic system of S_5 is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of *indica-japonica* hybrids in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 11436—11441
- 7 杨有新, 吴锦文, 陈志雄, 等. 基于功能性标记和测序发掘携带有 S_5^n 基因的水稻新种质. 科学通报, 2009, 54: 2212—2218
- 8 王美兴, 张洪亮, 张冬玲, 等. 中国普通野生稻(*O. rufipogon* Griff.)的地理多样性与分化. 科学通报, 2008, 53: 2768—2775
- 9 卢诚, 潘熙淦. “东乡野生稻”及“02428”、“8054”、“CPSL017”广亲和性遗传的研究. 江西农业学报, 1991, 3: 93—98
- 10 刘俭飞. 水稻广亲和力基因研究现状. 杂交水稻, 1988, 3: 32—34
- 11 Zheng K L, Huang N, Bennett J, et al. RFLP-based phylogenetic analysis of wide compatibility varieties in *Oryza sativa* L. Theor Appl Genet, 1994, 88: 65—69
- 12 Zeng Y X, Hu C Y, Lu Y G, et al. Diversity of abnormal embryo sacs in *indica/japonica* hybrids in rice demonstrated by confocal microscopy of whole ovary. Plant Breed, 2007, 126: 574—580
- 13 史磊刚, 刘向东, 刘博, 等. 从普通野生稻中鉴定栽培稻 F_1 花粉不育座位 S_b 的中性基因. 科学通报, 2009, 54: 2967—2974
- 14 Jin J, Huang W, Gao J P, et al. Genetic control of rice plant architecture under domestication. Nat Genet, 40: 1365—1369
- 15 Yangihara S, Mccouch S R, Ishikawa K, et al. Molecular analysis of the inheritance of the $S-5$ locus, conferring wide compatibility in *Indica/Japonica* hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet, 1995, 90: 182—188
- 16 Wan J, Yanagihara S, Kato H, et al. Multiple alleles at a new locus causing hybrid sterility between a Korean *indica* variety and a *Javanica* variety in rice (*Oryza sativa* L.). Jpn J Breed, 1993, 43: 507—516
- 17 Wan J, Ikehashi H. Identification of a new locus $S-16$ causing hybrid sterility in native rice varieties (*Oryza sativa* L) from Tai-hu lake region and Yunnan Province, China. Breed Sci, 1995, 45: 461—470
- 18 Wan J, Yamaguchi Y, Kato H, et al. Two new loci for hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet, 1996, 92: 183—190
- 19 Ikehashi H, Wan J. Differentiation of alleles at six loci for hybrid sterility in cultivated rice. In: IRRI, ed. Rice Genetics III. Manila, Philippines: IRRI, 1995. 409—417