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

杨有新, 吴锦文, 陈志雄, 王兰, 郭海滨, 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

* 联系人, E-mail: xdliu@scau.edu.cn; yglu@scau.edu.cn

2009-02-10 收稿, 2009-4-10 接受

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

摘要 水稻籼粳亚种间杂种具有强大的生物学优势, 但杂种 F_1 普遍高度不育, 难以直接利用。 S_5^n 基因可以克服由 S_5 基因座位互作引起的杂种不育性。目前 S_5^n 基因已被成功克隆, 该基因功能区存在大片段的缺失 DNA, 为快速并准确发掘携带有 S_5^n 的水稻新种质提供基础。本文将 S_5^n 基因序列与日本晴相对应序列进行比对, 在 S_5^n 基因缺失 DNA 的两端设计引物, 对已知携带有 S_5^n 和不携带有 S_5^n 基因(但携带有 S_5^i 或 S_5^j) 的水稻材料进行 PCR 扩增检测, 建立 S_5^n 基因的功能性标记。利用该标记对我国水稻微核心种质进行检测, 其中有 10 个品种的 S_5 座位中存在 DNA 片段缺失, 这些品种可能携带有 S_5^n 基因。这些品种包括毫补卡、小红谷、老造谷、三磅七十箩、木邦谷、魔王谷内杂、饭毫皮、飞蛾糯 2、包协-7B 和特青选恢等, 其中除三磅七十箩和老造谷外, 其余的 8 个品种均未见报道携带有 S_5^n 基因。对存在缺失 DNA 的 10 个品种的扩增片段进行测序, 发现全部品种 S_5 座位的缺失 DNA 片段都与 02428 和零轮(已知携带有 S_5^n) 的一致, 说明这 10 个品种 S_5 座位的基因也是没有功能的, 证明确实存在 S_5^n 基因。

关键词

水稻 S_5^n 基因
广亲和品种
微核心种质
功能性标记

亚洲栽培稻(*Oryza sativa* L.) 具有 2 个亚种, 即籼稻和粳稻。利用籼稻和粳稻杂交组配杂种 F_1 具有强大的生物学优势和较大的增产潜力。然而由于绝大多数的 F_1 育性偏低, 难以在生产上直接利用^[1]。籼粳杂交 F_1 不育性的机理十分复杂^[2], 有关克服其不育性的研究已有许多报道, 其中最具有影响的是 Ikehashi 和 Araki^[3] 于 1986 年提出的观点。他们认为, 籼粳杂种 F_1 的不育性主要表现为胚囊不育, 其不育性主要由于存在于水稻第 6 号染色体上的 S_5 基因座位的基因型决定, 其中籼稻在该座位的基因型一般为 $S_5^i S_5^i$, 粳稻一般为 $S_5^j S_5^j$ 。当籼稻与粳稻杂交组配籼粳杂种 F_1 (基因型 $S_5^i S_5^j$) 时, 由于 S_5^i 和 S_5^j 互作而使杂种 F_1 表现高度不育, 如果杂交亲本之一携带有 S_5^n (即所谓的“广亲和基因”), 那么不管是组配的杂种 F_1 基因型是 $S_5^n S_5^i$, 还是 $S_5^n S_5^j$, 育性均能得到提高乃至正常, 所以认为利用 S_5^n 基因可以克服籼粳杂种 F_1 胚囊的不育性^[3,4]。

此后, 水稻工作者对 S_5^n 基因的精细定位、携带有 S_5^n 基因水稻新种质的发掘及其利用等方面开展了大量的研究工作, 并取得显著进展^[2,5-12]。Chen 等人^[13] 成功克隆了 S_5 基因。他们的研究发现, 该基因的功能是编码天冬氨酸蛋白酶, 在籼粳稻中的等位基因 S_5^i 和 S_5^j 之间仅有两个碱基的差别, 引起相应蛋白质中两个氨基酸的替换, 造成其籼粳杂种 F_1 的不育。 S_5^n 基因由于在其编码蛋白的 N 末端缺失了 136 bp 的大片段, 造成蛋白亚细胞定位的改变, 从而导致其功能丧失, 所以无论与籼稻还是粳稻杂交, 都不影响杂种的育性, 从而使籼粳杂种 F_1 可育。这一研究成果为直接利用分子技术快速并准确地发掘携带有 S_5^n 基因的水稻新种质和分子育种等提供了重要的基础。本文利用这一研究成果, 首先在 S_5^n 基因缺失 DNA 的两端序列设计特异引物, 建立 S_5^n 基因功能性标记; 然后, 通过该功能性标记对我国水稻微核心种质进行检测, 找

引用格式: 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

Yang Y X, Wu J W, Chen Z X, et al. Mining rice new germplasm containing S_5^n gene by functional molecular marker and sequencing. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0466-y

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-15-2212>

出可能携带有 S_5^r 基因的品种;最后,通过对这些品种的 S_5 基因座位的缺失区及其两端序列进行测定,进一步确定其可靠性。目的是希望利用分子生物学的研究成果建立快速并准确发掘携带有 S_5^r 基因的新材料,为水稻籼粳杂交育种提供新质源。

1 材料与方法

() 材料。 选用由中国农业科学院国家农作物种质保存中心提供的国家水稻微核心种质共 199 份,因有 2 份没有发芽,所以实际使用 197 份,其中籼型水稻 114 份,粳型水稻 83 份(表 1)。此外,选择已知携带有 S_5^r 基因的水稻品种 02428(粳稻)和零轮(籼稻),以及已知不携带有 S_5^r 基因的品种,包括籼稻南京 11(基因型 $S_5^iS_5^i$)、IR36($S_5^iS_5^i$)、广陆矮 4 号($S_5^iS_5^i$);粳稻秋光($S_5^jS_5^j$)、沈农 15($S_5^jS_5^j$)和沈农 265($S_5^jS_5^j$)等,作为对照和功能性标记的验证。

() 引物设计。 检测引物(S_5^r 基因功能性标记,简称为“S5-t1”,下同):为了能快速检测水稻品种(材料)是否存在 S_5^r 基因,本文根据Chen等人^[13]公布的 S_5^r 基因序列,针对 02428 S_5^r 基因功能区缺失DNA片段的两端设计检测引物,作为 S_5^r 基因功能性标记。具体做法是:与日本晴相对应的序列进行比对,在 S_5^r 基因序列的上游-143 bp(以 S_5^r 基因 5'端的第一个转录起始点为+1,下同)设计上游引物S5-t1f(5'-CGTCTTGCTTCTTCATTCCC-3');在+355 bp(02428 为 219 bp)处设计下游引物S5-t1r(5'-GTAGGTAAAC-ACAGGCAGAG-3')(图 1)。预测的PCR扩增长度为:携带有 S_5^r 基因的水稻品种为 381 bp,不携带有 S_5^r 基因的水稻品种为 517 bp。

测序引物(简称为“S5-t2”,下同):为了验证经过 S_5^r 基因功能性标记检测出材料的可靠性,特别设计能扩增 S_5^r 基因缺失DNA片段两端较长的片段(理论长度为 695 bp),通过测序以判断被测材料是否具有相同的缺失DNA片段,从而确定检出材料是否真正携带有 S_5^r 基因。上游引物S5-t2f的DNA序列同S5-t1f;下游引物S5-t2r在+688 bp(02428 为 552 bp)处设计为5'-AGAGTTCACAGCGTGATCTG-3'(图 1)。所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

() PCR扩增。 分别选用各品种的幼嫩叶片,利用微量提取法提取DNA。PCR扩增参照Panaud等人^[14]的方法稍加修改。20 μ L反应体系包括 0.15 μ mol/L引物,200 μ mol/L dNTP,1 $\times$ PCR反应缓冲液(50

mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.01%明胶), 10~30 ng DNA模板, 1 U *Taq*酶。反应在PTC-100 型DNA扩增仪中进行。反应程序为:94 预变性 5 min; 94 , 1 min, 58 , 1 min, 72 , 1 min, 循环 33 次;最后 72 延伸 5 min。1.0%琼脂糖电泳检测并录取图像。每个品种分别进行 3 次重复的检测。序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。利用DNA-star软件中的MegAlign程序、ClustalX和GeneDoc对所测定的序列进行比对和相似性分析。

2 结果与分析

2.1 S_5^r 基因功能性标记可行性的检测

利用引物 S5-t1f 和 S5-t1r 分别对已知携带有 S_5^r 基因的品种 02428 和零轮以及不携带有 S_5^r 基因的品种南京 11, IR36, 广陆矮 4 号, 秋光, 沈农 15 和沈农 265 等进行 PCR 扩增, 进一步通过电泳检测扩增产物(图 2), 发现 02428 和零轮均在 250 和 500 bp 之间(约 380 bp 左右)具有一条明显的 DNA 带, 而南京 11 和 IR36 等品种都没有此带, 但在 500 bp 左右(原预测的 PCR 扩增长度为 517 bp)处有一条 DNA 带, 与预测的结果基本一致。3 次重复检测的结果一致, 稳定性好, 说明 380 bp 左右(原预测的 PCR 扩增长度为 381 bp)的 DNA 带可能是携带有 S_5^r 基因品种所特有的, 可以作为初步鉴定 S_5^r 基因的特征带, 其引物 S5-t1f 和 S5-t1r 可以作为 S_5^r 基因的功能性标记。

2.2 利用 S_5^r 基因功能性标记检测水稻微核心种质的 S_5^r 基因

利用引物 S5-t1f 和 S5-t1r 分别对 197 份国家水稻微核心种质进行 PCR 扩增, 进一步检测扩增产物, 发现其中包括粳型品种毫补卡、三磅七十箩、木邦谷、小红谷、魔王谷内杂, 籼型品种老造谷、饭毫皮、飞蛾糯 2、包协-7B 和特青选恢等均具有与 02428 和零轮分子量一致的 DNA 带(图 2), 而其他的品种则没有此带, 但有一条与不携带有 S_5^r 基因品种一样的带, 说明毫补卡等 10 个品种均可能携带有 S_5^r 基因。

2.3 10 个新检出水稻品种的测序分析

利用引物S5-t2f和S5-t2r分别对上述获得可能携带有 S_5^r 基因的 10 个水稻品种以及 02428 和零轮进行 PCR 扩增, 进一步对产物进行测序, 发现 02428 和零轮在 S_5 基因座位中缺失的DNA片段及其两端DNA序列与Chen等人^[13]公布的相对应的序列完全一致;

表 1 国家水稻微核心种质品种名称

类型	品种名称	来源地
籼稻	六十早, 秋前白, 雷火占, 早籼 240	安徽
	金溪白, 解放籼, 三百粒, 台山糯, 矮禾迟, 矮密, 红米三担白, 珍汕 97B, 猷改 B, 江农早 1 号 B, 南特号	江西
	闽北晚籼, 陆财号, 乌壳占, 一支香, 盐水赤, 红晚 1 号, 金优 1 号	福建
	鼠牙占, 丝苗, 饿死牛, 齐眉, 南雄早油占, 白壳花螺, 黑督 4, 赤壳糯, 青四矮 16B, 广陆矮 4 号, 矮脚南特, 桂朝 2 号, 二钢矮, 包选 21 号, 黄丝桂占	广东
	横县良春叁谷, 矮仔占(选), 红梗早谷, 红矮糯, 七月籼, 柳沙 1 号, 广陆矮 15-1, 早熟香黑米, 墨米	广西
	洞庭晚籼, 柳叶黏, 宣恩长坛青黏	湖北
	矮脚早, 万利籼, 金南特 B, 竹珍 B, 朝阳一号 B, L 301B, 金南特 43B, 包协 123B, 80B, 包协-7B, 古 154, 圭 630, IR 661-1(早), 培 C122, 特青选恢, 湘恢 91269, 湘矮早 10 号, 湘晚籼 1 号, 湘晚籼 3 号, 湘早籼 7 号	湖南
	香稻, 旱麻稻	河南
	88B, 南京 11 号, 扬稻 2 号, 镇籼 232	江苏
	二九南 1 号	浙江
	麻麻谷, 梅花糯, 中农 4 号, 红谷, 三颗寸, 成都矮 3 号, 矮麻抗, 蜀丰 101, 沪科 3 号, 矮沱谷 151, 成农水晶	四川
	文香糯, 大弯糯, 清可, 老造谷, 齐头谷, 紫糯, 毫莱, 毫香, 毫荒腊, 南高谷, 金枝糯, 饭毫皮, 枇五升(选), 细麻线, 乌嘴红谷, 滇瑞 409B	云南
	黏壳糯, 马尾黏, 寸谷糯, 飞蛾糯 2, 阳壳糯, 小白米	贵州
	加巴拉	西藏
	台中在来 1 号/台中 65, 台中籼选 220 号	台湾
	闷加丁 2, 包二幅	海南
粳稻	抚宁紫皮梗子, 隆化毛葫芦, 高阳淀稻大红芒, 水原 300 粒, 叶里藏花	河北
	郑稻 5 号	河南
	中楼一号 1, 晋稻 1 号	山西
	卫国, 丹东陆稻, 黎明 B, 76-1, 辽粳 287	辽宁
	兴国	吉林
	白毛稻, 黑粳 2 号	黑龙江
	木樨球, 老虎种, 有芒早粳, 粳 7623	上海
	黄壳早廿日, 百歌稻, 寸三粒, 宁恢 21, JWR 221, 桂花黄	江苏
	铁秆乌, 秀水 115	浙江
	肥东塘稻, 京虎 B, 当育 5 号	安徽
	金包银	福建
	三粒寸, 西什 15	广东
	光壳香糯	广西
	霸王鞭 1	湖北
	须谷糯, 木瓜糯, 红旗 5 号, 安农晚粳 B, 早熟农虎 6 号 B, 湖恢 628, 郴晚 3 号, 粳 87-304	湖南
	细白黏, 南天纲酒谷, 山酒谷, G 珍汕 97B	四川
	毫马克(K), 毫朴卡, 三磅七十箩, 齐头白谷, 木邦谷, 紫米, 香谷, 小红谷, 五子堆, 毫巴永 1, 公居 73, 冷水谷 2, 冷水糯, 拉木加, 鱼眼糯, 黄皮糯, 魔王谷内杂, 鸡血糯, 半节芒, 八百粒, 背子糯	云南
	泽谷, 麻谷糯, 香糯, 红壳折糯(2), 油黏, 贯推白禾 1, 毫虑光黏	贵州
	麻谷子	陕西
	葡萄黄	天津
其他	台东陆稻 328, 台中 65 号/台中 HR539	台湾
	闷加高 1	海南
	中花 8 号, 四倍体朝 6	北京

图 1 引物所在 DNA 片段上的位置

图 2 利用检测引物进行 PCR 扩增的电泳图

只显示水稻微核心种质中不携带有 S_5^n 基因的 4 个品种(包括抚宁紫皮粳子(粳)、寸三粒(粳)、六十早(粳)、秋前白(粳), 其他品种未显示); IR36, 广陆矮 4 号, 沈农 15 和沈农 265 电泳图未在图中显示, 它们的带型与其他不携带有 S_5^n 基因的品种完全一致。M, DL2000 分子量标记; NJ, 南京 11; QG, 秋光; LL, 零轮; GQ, 02428; J1, 抚宁紫皮粳子(粳); J2, 寸三粒(粳); L1, 毫补卡; L2, 三磅七十箩; L3, 木邦谷; L4, 小红谷; L5, 老造谷; L6, 魔王谷内杂; L7, 饭毫皮; L8, 飞蛾糯 2; L9, 包协-7B; L10, 特青选恢; I1, 六十早(粳); I2, 秋前白(粳)

新检测的 10 个品种在相同座位中缺失的 DNA 片段及其两端 DNA 序列也与 02428 和零轮的完全一致(图 3); 在未缺失的 DNA 片段中, 毫补卡、三磅七十箩、木邦谷、飞蛾糯 2、包协-7B 和特青选恢的序列与 02428 完全一致, 小红谷、老造谷、魔王谷内杂和饭毫皮在 02428 的 388 bp 处 G 取代 A。

3 讨论

3.1 利用 S_5^n 基因功能性标记和测序可以快速并准确发掘水稻 S_5^n 基因新种质

近年来, 随着一些重要水稻基因的成功克隆^[15], 利用已克隆基因的序列信息发掘新种质日益受到重视。根据已知基因的信息发掘新种质的关键在于目标基因是否具有特殊的序列结构和独特的生物学功能。Chen 等人^[13]报道 S_5^n 基因与典型籼稻的 S_5^i 基因和粳稻的 S_5^j 基因比较, 该基因在其功能区缺失了一大片段, 使其无法翻译成功能蛋白(天冬氨酰蛋白酶), 从而使具有 S_5^n/S_5^i 或 S_5^n/S_5^j 杂合基因的杂种亲和、胚囊育性表现正常。 S_5^n 基因这种特殊的序列缺失和独特的功能失活(没有功能)为直接利用其基因序列信息以快速和准确发掘携带有 S_5^n 基因的新种质成为了可能。本文根据 S_5^n 基因的这两个重要特点, 通过与日本晴相对应序列的比对, 在 S_5^n 基因缺失区的两端设计特异引物, 利用该引物首先对已知携带有 S_5^n (包括 02428 和零轮等)和已知不携带有 S_5^n 基因的水稻品

种(包括南京 11 和 IR36 等)进行 PCR 扩增检测, 成功地建立了初步判断待测材料是否携带有 S_5^n 基因的功能性标记。然后, 利用该标记对待测材料进行测定。本文根据以上的策略首先对国家水稻微核心种质共 197 个品种进行了检测, 结果发现其中 10 个品种可能携带有 S_5^n 基因, 这些品种包括毫补卡、小红谷、木邦谷、三磅七十箩、老造谷、魔王谷内杂、饭毫皮、飞蛾糯 2、包协-7B 和特青选恢。然后, 进一步对检出品种 S_5^n 基因可能存在的缺失区及其两端的 DNA 进行测序, 发现 10 个品种的缺失区及其两端的 DNA 序列都与 02428 和零轮一致, 说明这 10 个品种 S_5 基因座位的基因也是没有功能的, 确实存在 S_5^n 基因。值得一提的是, 10 个品种中的三磅七十箩和老造谷 2 个品种已被前人鉴定携带有 S_5^n 基因^[12,16]。由此认为, 利用 S_5^n 基因特殊序列建立的功能性标记和进一步的序列测定可以快速并准确地发掘携带有 S_5^n 基因的水稻新种质。

3.2 云南可能是我国携带有 S_5^n 基因水稻品种的主要来源地

国内外通过大量测交和杂交方法已筛选或选育出许多携带有 S_5^n 基因的水稻品种(系)(表 2), 我国发现的携带有 S_5^n 基因的水稻材料主要来自云南的地方品种。本文通过 S_5^n 功能性标记和进一步测序, 从国家水稻微核心种质中发掘出 10 份携带有 S_5^n 基因的品

Nanjing11	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
02428	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
Linglun	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L1	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L2	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L3	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L4	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L5	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L6	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L7	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L8	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L9	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
L10	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
Nipponbare	ATCAACCCAT	TTCCTTTCT	ACGTTTGACT	GCCTGCCTGC	CCCTGAGCAA	GCAAGAAAGA	AAGAAAGAAG
Nanjing11	GGATTAAATT	TGCTCGCTCC	TACGAATCCT	GCCCCTGAGT	AACAATGACT	GACTTTTAAAT	TTGTTTGACG
02428	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
Linglun	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L1	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L2	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L3	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L4	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L5	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L6	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L7	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L8	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L9	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
L10	GGATTAAATT	TGCT.....				TAAT	
Nipponbare	GGATTAAATT	TGCTCGCTCC	TACGAATCCT	GCCCCTGAGT	AACAATGACT	GACTTTTAAAT	TTGTTTGACG
Nanjing11	CTAGGGTGGG	GATCGAGATG	GTGATCTTGG	AGCAGCCACA	GCTGCTCCTT	CTTCTTCTTC	TTCTGTAGC
02428							
Linglun							
L1							
L2							
L3							
L4							
L5							
L6							
L7							
L8							
L9							
L10							
Nipponbare	CTAGGGTGGG	GATCGAGATG	GTGATCTTGG	AGCAGCCACA	GCTGCTCCTT	CTTCTTCTTC	TTCTGTAGC
Nanjing11	AGCTGCAGCT	GCAACCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
02428		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
Linglun		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L1		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L2		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L3		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L4		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L5		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L6		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L7		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L8		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L9		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
L10		CCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG
Nipponbare	AGCTGCAGCT	GCAACCGGCG	CCACAGCAGC	CGACGACGAG	TTGGAGTGTC	CCTCCTCCAT	CTTCGGTAAG

图 3 10 个携带有 S_5 基因水稻品种 S_5 基因座位缺失区域及其两端序列(只显示邻近的序列, 其他的序列未在图中显示)与其他对照品种的比对图

Nanjing11, 南京 11; Linglun, 零轮; Nipponbare, 日本晴; L1, 毫补卡; L2, 三磅七十箩; L3, 木邦谷; L4, 小红谷; L5, 老造谷; L6, 魔王谷内杂; L7, 饭毫皮; L8, 飞蛾糯 2; L9, 包协-7B; L10, 特青选恢。南京 11 的序列引自 Chen 等人^[43]公布的序列, 日本晴的序列来自“*Oryza sativa Japonica* Group genomic DNA, chromosome 6, PAC clone: P0701E03”(http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

表 2 部分携带有 S_5^n 基因水稻品种(系)名称

类型	品种名称
籼稻	培迪 ^[2] , 矮子占 ^[2] , 老造谷 ^[21,a] , 台湾陆粳 ^[2] , 培C ^[2] , 培矮 64 ^[5,6] , 测 03 ^[6] , 广 09 ^[6] , 广亲 1 号 ^[6] , 测 64 ^[6] , 红C311 ^[6] , 零轮 ^[6,7] , 中 413 ^[8] , Kuntlan ^[8] , Aus371 ^[8] , 中大菲 ^[8] , 七矮占 ^[8] , 玉 92 秋 14 ^[8] , 苏早占 ^[8] , 海南占 ^[8]
粳稻	02428 ^[2,4,8,16] , Morobereken ^[2] , Tyahak ^[2] , Shinkei 8544 ^[2] , Cpslo17 ^[4,5,16] , Ketan Nanka ^[2,16,17] , 三磅七十箩 ^[16] , 培C311 ^[6] , 轮回 422 ^[5,16,17] , Lemont ^[4,5,10,17] , Bellmont ^[17] , Jw12 ^[2] , Jw28 ^[2] , Jw201 ^[2] , Rtn50-1-1 ^[8] , Rexmont ^[8] , Labelle ^[8] , Copslo ^[8] , Lebonnet ^[8] , Newbonnet ^[8] , Nortai ^[8] , Newrex ^[8] , Kp502-3 ^[8]
恢复系	SWR78 ^[10] , 4183 ^[18] , SWR20 ^[19] , 明恢 86 ^[9] , H921 ^[20]
不育系	培矮 64S ^[2,7] , 苏秋A ^[10]
其他 ^{b)}	PadiBujang Pendex ^[2] , Dular ^[4,5,21] , Aus373 ^[2,5] , 热研 2 号 ^[2] , 真系秋光 ^[5] , 鉴 12 ^[5] , E-146 ^[5] , Pecos ^[5] , Pelde ^[5] , Calotoc ^[5,16] , S26 ^[6] , S18 ^[6] , T984 ^[6] , MZ/6355-EBR ^[6] , AUS1 ^[6] , AUS3 ^[6] , AUS5 ^[6] , Padi-buha-bulu ^[6] , Gundilgendjah ^[6] , Sade AUS ^[6] , 矮嘎 ^[5,22-24] , 毫格劳 ^[16] , 窝爱嘎 ^[23,24] , 花糯 ^[23,24] , 虫蛻 ^[17] , 俄爱嘎 ^[24] , 大百谷 ^[24] , 毛白谷 ^[16,24] , BP176 ^[17] , MCP231-2 ^[17]

a) 云南地方品种; b) 所属类型没有准确资料

种, 其中籼稻 5 份, 粳稻 5 份, 籼粳各占一半, 没有明显的偏向; 10 份材料中有 7 份来自云南的地方品种, 2 份来自湖南, 1 份来自湖北, 说明云南地方品种中具有明显丰富的 S_5^n 基因源^[25], 有必要进一步对云南地方水稻品种进行广泛检测, 以发掘更多携带有 S_5^n 基因的水稻品种, 丰富水稻籼粳杂交育种的种质资源。

3.3 对于 S_5^n 基因被命名为“广亲和基因”的商榷

自从 Ikehashi 和 Araki^[3]将 S_5^n 基因命名为“广亲和基因”以来, 研究者一直沿用至今。应该说, 除 S_5 基因座位外, 如果没有其他座位基因参与控制籼粳杂交 F_1 不育性, 那么, 就可以认为 S_5^n 基因就是真正意义的“广亲和基因”。但大量研究已表明, 水稻籼粳杂交 F_1 不育性不仅具有 S_5 座位控制的胚囊不育, 还可能具有其他多个非 S_5 座位控制的胚囊不育(如 S_7 和 S_8 等至少 6 个其他的座位), 这些座位内和座位间互作同样也会引起杂种胚囊的部分不育^[2], 也就是说, S_5^n 基因是无法克服其他座位互作引起的不育。此外, 籼粳杂交 F_1 不育还可能存在花粉不育、受精和胚胎胚乳发育异常等类型, 其中花粉不育和胚囊不育一样十分重要^[26], 有些杂种花粉不育的作用甚至还超过胚囊不育。杂种花粉不育和胚囊不育受控于 2 个不同的基因系统, 其中花粉不育被认为至少受 6 个基因座位控制, 不同基因座位内互作, 以及不同数目基因座位间互作引起的花粉不育程度不同^[27]; 杂种胚囊不育同样也受多个基因座位互作控制^[2]。这些研究都说明, 水稻籼粳杂交 F_1 不育性十分复杂, 难以想象光靠 1 个所谓的“广亲和基因”就可以完全克服籼粳杂交 F_1 的不育性, 也就是说, 要真正并完全克服其不育性需要多个基因参与。所以, 我们认为, 把 S_5^n 基因直接等同于“广亲和基因”是值得商榷的(这也是本文为何没

有把 S_5^n 基因直接再称为“广亲和基因”的原因)。此外, 利用测交法测定 S_5^n 基因也值得讨论。测交法测定 S_5^n 基因是基于“广亲和基因”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品种进行杂交, 通过观察测交 F_1 的小穗育性的正常与否来判定材料是否具有“广亲和基因”, 如果所有测交 F_1 的小穗育性均在 70% 以上, 则被测品种被认为具有“广亲和基因”, 反之则被认为未携有该基因^[2]。由此可以推断, 要使所有测交 F_1 的小穗育性均在 70% 以上, 则要求待测材料不但在决定胚囊育性的主要基因座位都是亲和的(即除必须具有 S_5^n 基因外, 还需要其他的“中性基因”), 而且还要求决定花粉育性的基因座位也是亲和的, 否则测交 F_1 的小穗育性就难以达到 70%。可以推想, 如果只是检测待测材料是否携带有 S_5^n 基因, 那么, 采用测交法就可能出现两种情况的漏判: 一是当待测材料与测验种存在除 S_5 基因座位外的其他胚囊育性基因座位(如 S_7 和 S_8 等)的互作时, 待测材料即使存在 S_5^n 基因, 但测交 F_1 的胚囊育性由于其他胚囊育性基因座位的互作而出现部分胚囊不育, 导致小穗育性偏低, 从而可能被认为不含 S_5^n 基因; 二是当待测材料与测验种存在花粉不育基因互作时, 待测材料即使存在 S_5^n 基因, 但由于测交 F_1 的花粉高度不育, 可能导致小穗育性偏低, 从而也可能被认为不含 S_5^n 基因。此外, 测交法的结果还可能会受到环境因素的影响。以上的几种情况可能也是导致不同研究者利用测交法测定同一份材料结果不尽一致的重要原因之一^[2,24,28]。当然, 在这里, 我们并未否定测交法的可靠性, 只是认为根据测交法的结果无法判定一些特殊情况的基因型, 导致可能会漏掉一些携带有 S_5^n 基因的材料。我们认为, 在 S_5^n 基

因被克隆之前,测交法仍是最好的方法.目前 S_5^a 基因已被克隆,我们就可以建立更快速和更准确的方法.本文正是利用该成果成功地建立了一套发掘携带有 S_5^a 基因新种质的方法,即首先利用 S_5^a 基因的功能性标记进行初步筛选,然后对其DNA缺失区进行测序的方法,结果证明是可行的.

致谢 本文得到华中农业大学张启发院士及其实验室的博士生陈炯炯的大力支持.中国农业科学院国家农作物种质保存中心韩龙植研究员提供国家水稻微核心种质.同时也感谢卢宝荣教授、冯九焕博士和黄炳权博士的悉心修改,实验得到穆罕穆德·卡森先生、魏常敏同学和俞淑红女士等的协助.在此一并致谢.

参考文献

- Liu K D, Zhou Z Q, Xu C G, et al. An analysis of hybrid sterility in rice using a diallel cross of 21 parents involving *indica*, *japonica* and wide compatibility varieties. *Euphytica*, 1996, 90: 275—280 [\[DOI\]](#)
- 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
- Ikehashi H, Araki H. Genetics of F_1 sterility in remote crosses of rice. In: IRRI, ed. *Rice Genetics*. Manila: IRRI, 1986. 119—130
- Yanagihara S, McCouch S R, Ishikawa K. Molecular analysis of the inheritance of the S_5 locus, conferring wide compatibility in *indica/japonica* hybrids of rice (*O. sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 182—188
- 汤述耆, 李国生, 程祝宽, 等. 水稻广亲和品种对不同细胞质不育系恢复力的鉴定研究. *作物学报*, 1999, 25: 137—144
- 段中岗, 郑枫, 梁承邨. 不同亲和性水稻材料的同工酶遗传多样性分析. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14: 366—373
- 袁隆平, 武小金, 颜应成, 等. 水稻广谱广亲和系的选育策略. *杂交水稻(培矮64S研究及其应用论文选编)*, 2000, 15: 6—9
- 刘光杰, 寒川一成, 谭红, 等. 水稻广亲和品种抗白背飞虱的研究. *中国水稻科学*, 2003, 17(增刊): 53—55
- 张建新, 郑家团, 谢华安, 等. 水稻新株型明恢86及其系列组合的选育研究. *江西农业大学学报*, 2000, 22: 68—69
- 汤述耆, 张宏根, 孔宪旺, 等. 水稻广亲和广谱型恢系 SWR78 的选育. *作物学报*, 2007, 33: 1567—1574
- Qiu S Q, Liu K D, Jiang J X, et al. Delimitation of the rice wide compatibility gene S_5^a to a 40-kb DNA fragment. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1080—1086 [\[DOI\]](#)
- Ji Q, Lu J F, Chao Q, et al. Delimiting a rice wide-compatibility gene S_5^a superscript stop to a 50 kb region. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1495—1503 [\[DOI\]](#)
- 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 [\[DOI\]](#)
- Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 597—607
- Jin J, Huang W, Gao J P, et al. Genetic control of rice plant architecture under domestication. *Nat Genet*, 2008, 40: 1365—1369 [\[DOI\]](#)
- 刘剑飞. 水稻广亲和力基因研究现状. *杂交水稻*, 1988, (5): 32—34
- 易小平. 水稻亚种间杂种 F_1 亲和性研究进展. *广西农业科学*, 2000, (1): 1—4
- 罗彦长, 王守海, 李成荃, 等. 分子标记辅助选择抗稻白叶枯病基因在选育水稻广亲和恢复系上的应用. *中国水稻科学*, 2005, 19: 36—40
- 彭凌涛, 刘巧泉, 汤述耆, 等. $Xa21$ 基因导入水稻广亲和恢复系 SWR20 的研究. *江苏农业科学*, 2001, 22: 7—12
- 富昊伟, 赵洪. 水稻广亲和恢复系 H921 对三种胞质雄性不育系恢复性的遗传. *湖北农业科学*, 2003, (5): 15—16
- 裔传灯, 严长杰, 梁国华, 等. 秋稻品种‘Dular’广亲和基因效应的 RFLP 分析. *遗传学报*, 2001, 28: 540—549
- 严长杰, 谢裕林, 梁国华, 等. 广亲和品种矮嘎的广亲和性初步分析. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2002, 23: 30—33
- 严长杰, 陆驹飞, 梁国华, 等. 云南稻品种窝爱嘎的广亲和性初步分析. *扬州大学学报(自然科学版)*, 1999, 2: 38—41
- 顾兴友, 顾铭洪. 云南水稻品种的亲和性分析. *作物学报*, 1995, 21: 649—658
- 顾铭洪. 水稻广亲和基因的遗传及其利用. *江苏农学院学报*, 1988, 9: 19—26
- Song X, Qiu S Q, Xu C G, et al. Genetic dissection of embryo sac fertility, pollen fertility, and their contributions to spikelet fertility of intersubspecific hybrids in rice. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 205—211 [\[DOI\]](#)
- Zhang Z S, Lu Y G, Liu X D, et al. Cytological mechanism of pollen abortion resulting from allelic interaction of F_1 pollen sterility locus in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetica*, 2006, 7: 295—302
- 曾亚文, 徐福荣, 陈勇, 等. 云南光壳稻广亲和性与等位性研究. *西南农业大学学报*, 1999, 21: 317—323