水稻 S_5^n 基因的分子进化及功能比较

全静飞*, 李艳红*, 杨有新, 陈志雄, 王兰, 李金泉, MUHAMMAD Qasim Shahid,
刘向东†, 卢永根†

华南农业大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州 510642

* 同等贡献者

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

2011-01-05 收稿, 2011-04-25 接受

国家自然科学基金(30971756)和国家自然科学基金委员会-广东省人民政府联合基金重点项目(U0631003)资助

摘要 S_5^n 基因是克服水稻亚种间杂种胚囊不育性最主要因子之一, 了解其序列特征对于揭示其起源或进化以及在分子育种上的应用具有重要意义. 本文以 48 份携带有 S_5^n 的栽培稻品种和野生稻为材料, 通过对其 S_5^n 的全序列进行测定, 并选择在编码区序列差异较大的品种(系)与籼粳测验种进行测交组配 F_1 , 研究不同序列 S_5^n 在克服水稻亚种间杂种胚囊不育性效应的差异. 结果表明, 48 份材料的 DNA 全序列与对照 02428 完全一致的有 15 份, 其他 33 份存在不同程度的变异. 变异位点, 包括颠换、转换和缺失等, 共有 24 个. 编码区的变异主要发生在外显子 2, 其中变异最大的 8 份材料在 1710~1719 bp 处缺失了 10 个碱基, 包括尼瓦拉野稻 IRW501 和栽培稻品种粤泰 B 等. S_5^n 序列变异没有偏向性, 说明 S_5^n 是中性进化基因. 通过构建 S_5^n 全序列及其编码区编码氨基酸系统 NJ 树, 将 48 份材料归为 4 类, 其中大部分的栽培稻聚成一类, 普通野生稻聚成一类, 8 份缺失 10 个碱基的材料聚为一类, 其他的材料聚成一类. 利用 WE-CLSM (whole-mount eosin B-staining confocal laser scanning microscopy) 对测交 F_1 的胚囊育性观察表明, 不同 S_5^n 序列材料组配测交 F_1 的胚囊育性均比对照明显增加, 彼此间没有显著差异, 显示它们都能克服亚种间的胚囊不育性, 也间接证明 S_5^n 是功能缺失基因.

关键词

水稻(*Oryza sativa* L.)

杂种不育性

S_5^n

广亲和基因

普通野生稻(*O. rufipogon*)

尼瓦拉野生稻(*O. nivara*)

籼稻和粳稻是亚洲栽培稻的 2 个亚种, 它们在长期进化中产生明显分化和生殖隔离. 两者杂交产生的 F_1 具有明显的生物学优势, 但却存在部分或高度不育, 影响了其产量优势的发挥. 所以如何有效克服其杂种 F_1 的不育性成为利用籼粳杂种优势的关键^[1].

大量研究已表明, 籼粳杂种 F_1 不育主要表现为胚囊不育和花粉不育, 两者贡献几乎一样^[2,3]. 其中胚囊不育主要是由位于第 6 染色体上 S_5 座位基因互作引起, 该座位存在 3 种等位基因型, 包括 $S_5^i S_5^i$ (籼稻)、 $S_5^j S_5^j$ (粳稻) 和 $S_5^n S_5^n$ (“广亲和品种”)^[4]. 利用具有 $S_5^n S_5^n$ 的广亲和品种与籼稻或粳稻杂交可以克服胚囊不育. 水稻遗传

学家经过近 20 年的研究^[5~8], 于 2008 年成功克隆了 S_5 座位的基因, 该基因编码 1 个天冬氨酰蛋白酶, 通过控制雌配子(胚囊)的育性而影响水稻结实率. S_5^i 和 S_5^j 存在 2 个碱基的差异, 引起相应蛋白质中 2 个氨基酸的替换, 互作时导致杂种不育. 而 S_5^n 在翻译起始点上游缺失 69 bp, 下游缺失 67 bp, 共缺失 136 bp, 表达产物缺乏引导肽, 造成蛋白亚细胞定位的改变, 其蛋白产物无法正常运输到胞外, 不能与 S_5^i 或 S_5^j 产生蛋白互作, 所以杂种就可育. 这一研究为直接利用分子技术鉴定 S_5^n 和水稻分子育种奠定了基础^[9].

本室以 S_5^n 序列为基础, 设计了 S_5^n 功能性标记,

英文版见: Tong J F, Li Y H, Yang Y X, et al. Molecular evolution of rice S_5^n and functional comparison among different sequences. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4534-8

利用该标记并结合 S_5^n 缺失碱基两端序列的测定分析, 成功地在栽培稻和野生稻中发掘出 48 份携带有 S_5^n 的水稻新种质, 其中 28 份已报道^[10,11], 为进一步研究 S_5^n 分化提供物质基础. 本研究利用这些新种质, 通过 S_5^n 全序列测定, 对其全序列进行比对, 分析碱基变异, 并在此基础上预测表达产物的差异, 以构建分子系统进化树. 此外, 还选用不同序列 S_5^n 材料与典型的籼稻和粳稻测验种杂交, 组配杂种 F_1 , 研究不同序列 S_5^n 对克服胚囊不育性的作用是否一致等问题. 目的在于弄清 S_5^n 在栽培稻和野生稻中的分化情况, 比较不同序列变异在克服杂种胚囊不育性的功能上是否存在差异, 以及探讨其起源等重要问题.

1 材料与方法

(i) 材料. 选用本室已鉴定出携带有 S_5^n 的水稻材料共 48 份(表 1), 包括 22 份野生稻和 26 份栽培稻, 其中部分野生稻因为杂合影响测序, 所以利用其自交后代 S_5 座位纯合的单株进行测序, 这些材料包括 SXW008, SXW010, SXW013, SXW014, SXW016, SXW017, SXW018, SXW021, SXW022, SXW032, YLW004, YLW006, DXW051, DXW062 和 CHW001. 选择 8 份 S_5^n 序列差异明显的栽培稻品种与籼粳测验种广陆矮 4 号(籼稻)、南特号(籼稻)和台中 65(粳稻)杂交组配测交 F_1 . 以典型籼粳杂交组合(广陆矮 4 号 $\times$ 台中 65)和(南特号 $\times$ 台中 65) F_1 作为对照. 所有的材

表 1 48 份携带有 S_5^n 的野生稻和栽培稻名称及来源地

材料类型	代号 ^{a)}	名称	材料属性	来源
野生稻	SXW006, SXW008, SXW009, SXW010, SXW013, SXW014, SXW016, SXW017, SXW018, SXW021, SXW022, SXW024, SXW032	遂溪普通野生稻 (<i>O. rufipogon</i>)		广东遂溪市
	YLW004, YLW006	玉林普通野生稻		广西玉林市
	GZW032	高州普通野生稻		广东高州市
	DXW051, DXW062	东乡普通野生稻		江西东乡市
	CHW001	从化普通野生稻		广东从化市
	IRW496, IRW501, IRW644	尼瓦拉野生稻(<i>O. nivara</i>)		IRRI
栽培稻	N74	毫补卡	粳稻	云南
	N75	三磅七十箩	粳稻	云南
	N77	木邦谷	粳稻	云南
	N81	小红谷	粳稻	云南
	N84	老造谷	籼稻	云南
	N94	魔王谷内杂	粳稻	云南
	N101	饭毫皮	籼稻	云南
	N103	秕五升	籼稻	云南
	N115	飞蛾糯 2	籼稻	贵州
	N150	包协-7B	籼稻	湖南
	N161	特青选恢	籼稻	湖南
	INL3	L202	粳稻	美国
	INL5	Jackson	粳稻	美国
	INL49	M18	粳稻	广东
	INL43	Cypress PB-6	粳稻	美国
	INL44	Gulfmont	粳稻	美国
	INL46	APIV	籼稻	广东
	INL56	M12	粳稻	广东
	INL69	LKJ001	籼稻	福建
	CC31	灰背子	粳稻	云南
	CC42	中齐家青	籼稻	长江流域
	ZB23	Madhukar	籼稻	印度
	ZB31	CW 科珍 2A	籼稻	广东
	ZB54	Cisanggarung	籼稻	不详
	ZB71	Doddi	籼稻	台湾
	ZB89	粤泰 B	籼稻	广东

a) SXW008, SXW017 和 SXW021 共 3 份材料每份各测其自交后代的 3 个单株, SXW013, SXW014 和 SXW018 共 3 份材料每份各测其自交后代的 2 个单株

料按照常规方法种植于华南农业大学教学实验农场。在秧苗移栽 25 d 左右剪取叶片供 DNA 提取和进一步测序用。

(ii) 引物设计. 根据 Chen 等人^[8]公布的 S_5'' 序列, 设计 5 对引物(表 2). 利用这 5 对引物分别进行扩增、拼接获得供试材料 S_5'' 的全序列. 引物由上海生物工程技术有限公司合成。

(iii) PCR 扩增和序列测定. DNA 提取方法参照 Yang 等人^[10]的方法. 20 μ L PCR 反应体系为: 0.15 μ mol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTP, 2 μ L 1 $\times$ PCR 缓冲液, 20~30 ng DNA 模板, 1 U *Taq* 酶, 补充 ddH₂O 至 20 μ L. PCR 扩增步骤为: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 57 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 延伸 5 min. PCR 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测. PCR 产物由北京华大基因科技股份有限公司测序。

(iv) 数据分析. 利用 ContigExpress 软件对测定的序列进行拼接, 构建 S_5'' 的全序列. 用 Clustal X 1.83^[12]软件对不同材料的 S_5'' 全序列进行序列比对, 用 MEGA 4.0^[13]软件进行全序列碱基含量、多态位点及颠换和转换分析. 系统分析采用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)、最大简约法(Maximum-Parsimony, MP)和最小进化法(Minimum-Evolution, ME)构建分子系统树. 所有的系统树都以 MEGA 4.0 软件基于 Kimura-2-Parameter (K2P)进行构建. 其中 NJ 和 ME 树分别采用 1000 次内部分支检验来评估各自分支置信度. 用 Dnasp 5.0^[14]软件计算核苷酸多样性。

(v) 测交 F₁ 成熟胚囊结构观察及育性统计. 采用 WE-CLSM (whole-mount eosin B-staining confocal laser scanning microscopy) 观察测交 F₁ 成熟胚囊结构^[15]. 取杂种 F₁ 当天开花的小穗, 每份材料取 300 个左右的小穗, 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, 然后放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用. 解剖分离出的子房分

别以 50%和 30%乙醇梯度复水, 2%硫酸铝钾溶液(硫酸铝钾与水的质量比 2:100)媒染 20 min, 10 mg/L 曙红 B (4%蔗糖溶液配制)染色 10~12 h, 2%硫酸铝钾溶液染色 30 min, 梯度乙醇脱水. 水杨酸甲酯透明后在 Leica SPE 激光扫描共聚焦显微镜下用波长 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 Shi 等人^[16]的方法。

2 结果

2.1 PCR 结果和 S_5'' 序列特征

以对照 02428 DNA 为模板, 用 5 对引物进行 PCR 扩增, 分别得到 5 条分子量不同的 DNA 片段, 这些片段经过测序后拼接, 获得 S_5'' 全序列, 与 Chen 等人^[8]公布的序列结构特征一致, 说明本文所设计的引物可以用于扩增 S_5'' 全序列。

利用以上引物, 分别对所获得 48 份不同类型材料进行 PCR 扩增, 进一步对扩增产物分别进行序列测定和拼接. S_5'' 序列包括 3 个外显子和 2 个内含子, DNA 序列基本特征与 02428 的一致。

2.2 S_5'' 序列变异

对 S_5'' DNA 序列的变异情况进行分析发现, 所有供试 48 份材料的全序列与 02428 完全一致的有 15 份(图 1, Group 1). 其余 33 份材料的全序列与 02428 存在不同程度的变异, 变异位置共有 24 处, 包括 8 处转换、2 处颠换和 14 处缺失, 转换与颠换之比为 4:1, 说明水稻 S_5'' 序列变异中存在转换偏倚现象. ORF 变异主要发生在外显子 2, 有 7 个变异位点, 另外有 8 份材料在外显子 2 连续缺失了 10 个碱基, 包括 7 份栽培稻和 1 份野生稻, 分别是尼瓦拉野稻 IRW501, 栽培稻粤泰 B, Madhukar, Doddi, 小红谷, 老造谷, 魔王谷内杂和饭毫皮(图 1, groups 13~16), 其中有 4 份材料来源于中国云南. 2 个内含子共有 4 个位点发生突变. 33 份材料中 ORF 序列与 02428 完全一致的有 4 份, 包括 IRW496, 毫补卡, 特青选恢和 CW 科珍 2A; 内含子序列与 02428 完全一致的有 2 份(特青选恢和 CW 科珍 2A)(图 1)。

进一步对 S_5'' 核苷酸变异的多态性进行计算表明(表 3), 全部材料 S_5'' 全序列的核苷酸多态性(π 值)为 0.00134, 多态性不是很高. 野生稻和栽培稻分开计

表 2 引物名称及序列

名称	序列(5'→3')
S5-q1	CGTCTTGCTTCTTCATTCCC GTAGGTAAACACAGGCAGAG
S5-q2	CGTCTTGCTTCTTCATTCCC GTAGGTAAACACAGGCAGAG
S5-q3	GCGTGTAGTAGTATCATAAA GTCCCAATCCTCAGCGTGT
S5-q4	TCGCTGCTCGTGGTCAAGT GAGATAGGTTAGCACAAAGC
S5-q5	TGGGGAACAGGGTTACTC GGAAGATGAAAAGGTCGC

图 1 48 份携带有 S_5' 的野生稻和栽培稻 S_5' 碱基变异位置和类型

■, 外显子; —, 内含子; *, 碱基位置(S_5' 5'端的第 1 个转录起始点为+1); 1), 碱基由 T 变成 C, 氨基酸由亮氨酸→脯氨酸; 2), 碱基由 C 变成 A, 氨基酸由苯丙氨酸→亮氨酸; 3), 碱基由 T 变成 C, 氨基酸由甲硫氨酸→苏氨酸; 4), 碱基由 C 变成 T, 氨基酸由脯氨酸→丝氨酸; 5), 碱基由 C 变成 T, 氨基酸由丙氨酸→缬氨酸. Group 1: 三磅七十箩, 砬五升, M12, 飞蛾糯 2, M18, Cisanggarung, Cypress PB-6, 包协-7B, LKJ001, 木邦谷, Gulfmont, L202, 中齐家青, Jackson, 灰背子; Group 2: SXW006, SXW008, SXW009, SXW010, SXW013, SXW014, SXW016, SXW017, SXW018, SXW021, SXW022, SXW024, SXW032 和 DXW051; Group 3: DXW062; Group 4: CHW001; Group 5: YLW004; Group 6: YLW006; Group 7: IRW496; Group 8: IRW644; Group 9: 特青选恢和 CW 科珍 2A; Group 10: 毫补卡; Group 11: APIV; Group 12: GZW032; Group 13: IRW501; Group 14: 粤泰 B, Madhukar 和 Doddi; Group 15: 小红谷, 老造谷和魔王谷内杂; Group 16: 饭毫皮

表 3 48 份携带有 S_5' 的野生稻和栽培稻 DNA 序列多态性分析^{a)}

材料类型	位置	S	π
野生稻和栽培稻	编码区	5	0.00154
	内含子	3	0.00173
	整个区域	10	0.00134
野生稻	编码区	5	0.00111
	内含子	3	0.00123
	整个区域	10	0.00095
栽培稻	编码区	3	0.00119
	内含子	1	0.00076
	整个区域	5	0.00081

a) S 表示多态位点数; π 表示核苷酸多态性

算显示, 6 个不同居群野生稻 S_5' 的 π 值为 0.00095, 栽培稻为 0.00081, 两者差异不显著. 野生稻编码区的 π 值为 0.00111, 栽培稻为 0.00119, 两者差异也不显著.

2.3 S_5' 全序列分子系统树的构建

分别用 NJ 法、ME 法和 MP 法构建 S_5' 全序列系

统发育树, 所得结果基本一致. 因此本文只显示用 NJ 法构建的系统发育树, 该树的置信度以内部分支检验表示(图 2). 从图 2 可以看出, 49 份(含 02428)携带有 S_5' 的材料可以归为 4 类, 其中有 17 份栽培稻与对照 02428 聚为一类; 8 份在 1710~1719 bp 处连续缺失 10 个碱基的材料聚为一类; 绝大多数普通野生稻聚为一类; 其他材料聚成一类.

2.4 氨基酸序列变异及其系统树构建

完整的 S_5' 编码区全长为 1074 bp, 共编码 357 个氨基酸(图 3). 粤泰 B, Madhukar, Doddi, 小红谷, 老造谷, 魔王谷内杂, 饭毫皮和尼瓦拉野生稻 IRW501 等 8 份材料由于在第二外显子连续缺失 10 个碱基, 使得翻译无法正常进行下去, 所以只编码了 314 个氨基酸, 比 02428 少了 43 个氨基酸. 其他氨基酸变异共有 5 处, 详见图 3.

不同材料 S_5' 编码氨基酸的分子系统树如图 4 所示. 从图 4 聚类情况来看, 基本趋势与 S_5' 全序列的一致, 大部分野生稻聚为一类, 栽培稻聚为另一类, 栽培稻与野生稻聚在一起的较少.

图3 氨基酸序列变异情况

L1 包含的材料有 20 份, 即三磅七十箩, 秕五升, M12, 飞蛾糯 2, M18, Cisangarung, Cypress PB-6, 包协-7B, LKJ001, 木邦谷, Gulfont, L202, 中齐家青, Jackson, 灰背子, 特青选恢, CW 科珍 2A, 毫补卡, IWR496 和 GZW032. L2 包含的材料有 16 份, 即 SXW006, SXW008, SXW009, SXW010, SXW013, SXW014, SXW016, SXW017, SXW018, SXW021, SXW022, SXW024, SXW032, DXW051, YLW006 和 CHW001. L3 包含的材料有 3 份, 即 IWR644, APIV 和 DXW062. L4: YLW004. L5 包含的材料有 4 份, 即 IRW501, 粤泰 B, Madhukar 和 Doddi. L6 包含的材料有 4 份, 即魔王谷内杂、饭毫皮、老造谷和小红谷

南的地方品种(其中有相当一部分是来自 02428), 所以, 云南可能是 S_5^n 的起源地之一. 除了云南之外, 爪哇稻的起源地可能也是 S_5^n 的来源地之一, 因为目前发现的许多具有爪哇稻血缘的美国水稻品种都具有 S_5^n . 本文利用 S_5^n 全序列和利用 ORF 编码的氨基酸进行聚类分析结果也证明了以上结论.

3.2 S_5^n 序列的多样性与克服籼粳杂种胚囊不育性

Chen 等人^[8]研究表明, S_5^n 由于缺失了 136 bp, 导致其表达产物在 N 端缺少了一段具有引导作用的肽链, 使其表达产物无法正常转运而沉积在胞内, 从而丧失功能, 不与 S_5^i 表达产物或 S_5^j 表达产物互作, 所以杂种的胚囊可育. 根据这一作用机理, 只要 S_5 在 TAAT 两端缺少 136 bp, 那么其他位置 DNA 序列不管是何种变异, 理论上都不影响其克服杂种胚囊不育性的功能. 本文研究结果证明了这一论点. 本室所鉴定出的 48 份水稻品种携带有 S_5^n 材料, 其 S_5 座位在

TAAT 两端共缺失 136 bp. 在这些材料中, 有 15 份水稻品种 S_5^n 全序列与 02428 的完全一致, 33 份存在不同程度的变异, 其中特别有 8 份材料在外显子 2 连续缺失了 10 个碱基, 使翻译蛋白提前终止, 只编码了 314 个氨基酸, 导致其编码蛋白比对照 S_5^n 编码蛋白缺少了 43 个氨基酸. 我们利用这些不同变异材料分别与典型籼稻和粳稻测验种杂交, 组配测交杂种 F_1 , 研究这些材料在克服亚种间杂种胚囊不育性的作用, 发现所有测验种的胚囊育性均明显比对照杂种(不具 S_5^n 材料组配的杂种)高, 说明这些 S_5^n 的作用是一致的, 也就是说, S_5^n 序列变异不影响其克服亚种间杂种胚囊的不育性, 进一步验证了 S_5^n 是功能缺失的基因^[8]. 值得指出的是, 本文也发现一些测交 F_1 , 如 Doddix 台中 65 的胚囊育性为 68.02%, L202×广陆矮 4 号为 76.60%, 明显比平均值低. 此外, 它们彼此间出现的主要胚囊败育类型也存在差异, 这些组合是否存在非 S_5 座位的互作有待进一步研究.

图 4 以 NJ 法构建的 S_5' 编码的氨基酸序列系统树

表 4 测交 F_1 花粉育性、胚囊育性和结实率 ^{a)}

亲本和杂种名称	花粉育性(%)	胚囊育性(%)	结实率(%)
广陆矮 4 号×台中 65 (CK)	37.00	26.17	20.16
南特号×台中 65 (CK)	14.42	54.81	29.80
Madhukar	84.65	97.92	91.30
Madhukar×广陆矮 4 号	54.60	92.08	87.60
Madhukar×南特号	76.50	92.14	86.90
Madhukar×台中 65	55.80	78.13	70.30
Doddi	82.80	91.60	88.10
Doddi×广陆矮 4 号	90.96	98.21	92.25
Doddi×南特号	70.48	95.72	92.22
Doddi×台中 65	80.98	68.02	59.99
粤泰 B	92.90	75.51	66.40
粤泰 B×广陆矮 4 号	80.25	98.76	52.90
粤泰 B×南特号	81.20	96.30	73.60
粤泰 B×台中 65	66.08	85.96	77.20
灰背子	86.10	97.48	82.60
灰背子×广陆矮 4 号	88.60	98.54	74.60
灰背子×南特号	81.80	98.24	76.80
灰背子×台中 65	85.88	90.71	81.40
L202	92.95	—	88.30
L202×广陆矮 4 号	87.50	76.60	66.60
L202×南特号	77.78	82.61	63.90
L202×台中 65	60.85	84.03	64.00
Jackson	95.90	96.60	68.13
Jackson×广陆矮 4 号	87.37	83.45	68.96
Jackson×南特号	80.70	96.27	68.90
Jackson×台中 65	91.92	92.97	80.71
Piwusheng	—	—	75.10
秕五升×广陆矮 4 号	88.70	97.29	85.70
秕五升×南特号	90.57	77.58	74.90
秕五升×台中 65	86.00	97.87	91.23
Cisanggarung	89.11	79.01	72.05
Cisanggarung×广陆矮 4 号	66.50	92.09	59.13
Cisanggarung×南特号	74.40	81.88	62.10
Cisanggarung×台中 65	93.00	92.13	69.70

a) “—”, 数据缺失

表 5 测交 F_1 不同败育类型胚囊的出现频率(%)

杂种名称	胚囊总败育率	退化胚囊	异常小胚囊	极核异常胚囊	缺乏卵细胞胚囊	缺乏雌性生殖单位胚囊	其他异常胚囊
广陆矮 4 号×台中 65 (CK)	73.83	45.80	23.40	4.67	0.00	0.00	0.00
南特号×台中 65 (CK)	45.19	27.90	9.62	7.69	0.00	0.00	0.00
秕五升×南特号	22.42	0.00	0.00	21.80	0.00	0.00	0.60
秕五升×台中 65	2.13	0.00	0.00	1.42	0.00	0.70	0.00

续表 5

杂种名称	胚囊总败育率	退化胚囊	异常小胚囊	极核异常胚囊	缺乏卵细胞胚囊	缺乏雌性生殖单位胚囊	其他异常胚囊
Madhukar×广陆矮 4 号	7.92	1.25	2.50	3.75	0.00	0.00	0.40
Madhukar×南特号	8.76	1.38	3.69	3.69	0.00	0.00	0.00
Madhukar×台中 65	21.88	0.00	15.63	6.25	0.00	0.00	0.00
Cisanggarung×广陆矮 4 号	7.91	0.56	0.56	5.09	0.00	0.00	1.70
Cisanggarung×南特号	18.13	5.00	0.63	12.50	0.00	0.00	0.00
Cisanggarung×台中 65	7.87	0.00	3.15	4.72	0.00	0.00	0.00
Doddi×广陆矮 4 号	1.79	0.00	0.60	1.19	0.00	0.00	0.00
Doddi×南特号	4.28	1.07	0.00	3.20	0.00	0.00	0.00
Doddi×台中 65	31.98	0.00	1.16	29.00	0.00	0.00	1.74
粤泰 B×广陆矮 4 号	1.24	0.00	0.00	1.24	0.00	0.00	0.00
粤泰 B×南特号	3.70	0.46	0.00	3.24	0.00	0.00	0.00
粤泰 B×台中 65	14.04	1.69	2.24	9.55	0.56	0.00	0.00
灰背子×广陆矮 4 号	1.46	0.49	0.00	0.98	0.00	0.00	0.00
灰背子×南特号	1.76	0.00	0.00	1.76	0.00	0.00	0.00
灰背子×台中 65	9.29	0.88	3.54	3.98	0.44	0.44	0.00
L202×广陆矮 4 号	23.40	14.90	3.54	4.96	0.00	0.00	0.00
L202×南特号	17.39	4.35	6.09	6.69	0.00	0.00	0.00
L202×台中 65	15.97	0.69	11.10	4.17	0.00	0.00	0.00
Jackson×广陆矮 4 号	16.55	5.04	7.19	4.31	0.00	0.00	0.00
Jackson×南特号	3.73	2.23	1.49	0.00	0.00	0.00	0.00
Jackson×台中 65	7.03	0.00	3.78	2.16	0.00	1.08	0.00

图 5 籼粳杂种 F₁ 异常结构胚囊

(a) 正常胚囊. E, 卵细胞; S, 助细胞; P, 极核; A, 反足细胞. (b) 受精后的正常胚囊. (c) 胚囊退化(箭所示). (d)和(e) 异常小胚囊. (f) 缺乏雌性生殖单位的胚囊. (g)和(i) 极核位置异常的胚囊(箭所示). 标尺: 40 μm

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. 实验过程中得到赵杏娟、傅雪琳、俞淑红、张鹏、周晓伟和黄成达等的协助, 在此一并致谢.

参考文献

- 1 梁国华, 严长杰, 裔传灯, 等. 水稻广亲和性遗传的再研究. 遗传学报, 2001, 28: 447–457
- 2 Liu H Y, Xu C G, Zhang Q F, et al. Male and female gamete abortions, and reduced affinity between the uniting gametes as the causes for sterility in an *indica/japonica* hybrid in rice. Sex Plant Reprod, 2004, 17: 55–62
- 3 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
- 4 Ikehashi H, Araki H. Genetics of F_1 sterility in remote crosses of rice. In: IRRI, ed. Rice Genetics. Manila: IRRI, 1986. 119–130
- 5 Ikehashi H, Wan J. Differentiation of alleles at seven loci for hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Rice Genetics: Proceedings of the International Rice Genetics Symposium, 16–20 October 1995, IRRI, Manila, 1996. 404–408
- 6 Qiu S Q, Liu K D, Jiang J X, et al. Delimitation of the rice wide compatibility gene S_5 to a 40-kb DNA fragment. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1080–1086
- 7 Ji Q, Lu J F, Chao Q, et al. Delimiting a rice wide-compatibility gene S_5 superscript stop to a 50-kb region. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1495–1503
- 8 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
- 9 Ouyang Y, Liu Y, Zhang Q. Hybrid sterility in plant: Stories from rice. Curr Opin in Plant Biol, 2010, 13: 1–7
- 10 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 基因的水稻新种质. 科学通报, 2009, 54: 2212–2218
- 11 魏常敏, 王兰, 杨有新, 等. 普通野生稻中 S_5 基因的鉴定及其胚囊育性研究. 科学通报, 2010, 55: 1007–1014
- 12 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: Flexible strategies formultiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 1997, 24: 4876–4882
- 13 Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform, 2008, 9: 299–306
- 14 Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 2003, 19: 2496–2497
- 15 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 ovaries. Plant Breed, 2007, 126: 574–580
- 16 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
- 17 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
- 18 刘俭飞. 水稻广亲和力基因研究现状. 杂交水稻, 1988, 3: 32–34
- 19 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
- 20 余守武, 万勇, 胡标林, 等. 东乡野生稻细胞质雄性不育育性恢复的遗传研究. 分子植物育种, 2005, 6: 761–767
- 21 邹江石, 聂毓琦, 潘启民, 等. 广亲和选系 02428 在籼粳亚种间杂交的初步利用. 中国农业科学, 1989, 22: 6–14