水稻籼粳杂种不育与广亲和

欧阳亦聃

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

E-mail: diana1983941@mail.hzau.edu.cn

2016-09-12 收稿, 2016-09-13 修回, 2016-09-13 接受, 2016-10-17 网络版发表

国家自然科学基金(31371599)资助

摘要 水稻是世界主要粮食作物, 水稻杂种优势的利用为提高作物产量做出了巨大贡献. 亚洲栽培稻分为籼稻和粳稻两个亚种, 亚种间的杂种优势更强, 培育籼粳杂交水稻可以进一步提高水稻产量潜力. 但是亚种间普遍存在生殖隔离, 导致籼粳杂种育性较低, 限制了对其杂种优势的利用. 广亲和品种与籼稻和粳稻的杂交后代正常可育, 为利用亚种间杂种优势提供重要种质资源. 本文回顾了籼粳杂交育种的历史, 总结了水稻杂种不育的遗传基础和分子调控机理的研究进展, 介绍了广亲和基因形成机制的最新理解, 在此基础上概述了近年来对广亲和基因发掘和利用的成果, 并展望了未来创建广亲和水稻种质资源的途径.

关键词 水稻, 籼粳亚种, 杂种不育, 广亲和, 生殖隔离

水稻是我国主要粮食作物. 1966年, 袁隆平在“水稻的雄性不孕性”一文中指出, 水稻具有杂种优势现象, 尤以籼粳杂种更为突出; 并提出利用水稻杂种优势, 需选育雄性不育系、保持系及恢复系, 用于杂交稻的培育^[1]. 50年后的今天, 杂交水稻生产为提高我国水稻产量做出了巨大贡献, 由1970年的每公顷约3.4 t增至2014年的6.7 t (<http://faostat3.fao.org/>).

经过50年的发展, 充分利用水稻杂种优势已成为提高我国水稻产量的重要策略; 与品种间杂种相比, 籼粳亚种间杂种生长旺盛、株型高大、穗型较大, 表现出较强的杂种优势, 其生产应用是水稻育种家们多年来积极探索的目标之一. 袁隆平先生1987年提出, 水稻杂种优势的利用可以从三系法利用品种间杂种优势出发, 进而向两系法利用亚种间杂种优势和通过无融合生殖利用远缘杂种优势逐步推进^[2]. 然而籼粳杂种结实率偏低限制了对亚种间杂种优势的有效利用. 在水稻杂交研究中, 发现有些品种(广亲和品种)无论与籼稻还是粳稻杂交, 杂种都能正常

结实或结实率较高. 广亲和品种和广亲和基因的发现有可能成为克服亚种间杂种不育的有效途径.

1 水稻籼粳亚种及其遗传变异

水稻属禾本科(Gramineae)稻属(*Oryza*), 包括亚洲栽培稻(*Oryza sativa* L.)和非洲栽培稻(*O. glaberrima* Steud.)两个栽培稻, 以及20多个野生稻种^[3]. 亚洲栽培稻起源于低纬度的热带和亚热带地区, 其适应性和农艺性状优良, 是一个广泛种植的栽培种^[4]. 亚洲栽培稻在长期的自然选择和人工驯化下, 演化为籼稻(ssp. *indica*)和粳稻(ssp. *japonica*)两个亚种. 我国早在东汉《说文解字》中就认识到籼稻和粳稻的区别^[5]. 两个亚种的地理分布存在纬度、海拔上的明显差异, 在形态特征、生理特性和遗传基础上表现出明显的差异^[4].

早期研究使用一系列分子标记, 包括同工酶标记(isozyme variation)^[6]、RFLP (restriction fragment length polymorphism)^[7-9]、SSRs (simple sequence repeats)^[10,11]、

引用格式: 欧阳亦聃. 水稻籼粳杂种不育与广亲和. 科学通报, 2016, 61: 3833-3841

Ouyang Y D. Progress of *indica-japonica* hybrid sterility and wide-compatibility in rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 3833-3841, doi: 10.1360/N972016-01012

RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)^[12]、rRNA多态性(polymorphic ribosomal DNA)^[13]等方法,检测到籼粳群体之间存在显著的遗传差异.对典型的粳稻品种日本晴和籼稻品种广陆矮4号第4染色体的序列分析发现,籼粳之间在编码区和基因间区存在片段插入/缺失和单碱基突变等序列变异^[14,15].通过重测序技术对广泛分布的栽培稻品种进行全基因组测序和分析,鉴定出籼稻和粳稻群体之间存在的大量自然变异^[16~18].这些序列变异导致籼稻和粳稻在基因组、转录组和代谢组等多个层面出现广泛差异,进而影响两个亚种的形态与生理特征和对环境的适应性.通过GWAS研究结合代谢组学分析,对529份栽培稻品种代谢组自然变异的遗传机制进行了研究,发现水稻籼稻和粳稻在代谢性状及其遗传基础上存在差异,揭示出逆境应答代谢组在亚种分化中的可能作用^[19].杂交水稻亲本珍汕97和明恢63来自籼稻的两个亚群^[20],对这两个籼稻品种参考基因组序列进行分析,发现存在大量倒位、易位,大片段插入/缺失等结构变异;其基因组层面的差异导致不同组织的杂种转录组比亲本多表达一千到两千个基因^[21].这些在全基因组各个层面的自然变异使籼稻和粳稻对环境表现出不同的适应性,在品种材料上呈现出丰富的遗传多样性,为杂交水稻育种提供了丰富的种质资源.

2 籼粳杂种不育的发现和籼粳杂交育种的提出

2.1 籼粳杂种不育现象的发现

籼稻和粳稻之间亲缘关系较远,亚种间杂交存在着巨大的育种潜力,其杂种 F_1 在产量、品质和抗逆性等方面具有很强的杂种优势.然而,由于籼粳杂交的半不育特性,籼粳杂种优势在实际应用上遇到很大困难,包括株高偏高、花时差异、结实率低等一系列问题,其中最主要的是籼粳杂种 F_1 代结实率(小穗育性)较低.Kato等人^[22]研究表明栽培稻品种间杂种的平均育性在50%以上,而籼粳杂种 F_1 的育性在0~33%之间.随后的一系列研究表明,不同籼粳杂交组合含有不同的籼粳不育位点;籼粳亚种间杂种 F_1 代育性变化范围很大,从完全不育到完全可育,且亚种间杂种结实率显著低于亚种内杂种的结实率^[4,23,24],这种亚种间杂交后代育性降低的现象是由生殖隔离所导致的.

2.2 水稻广亲和性概念

在亚洲栽培稻杂交亲和性的系统研究中,Morinaga和Kuriyama^[25]发现印度的*Aus*群(秋稻生态型)和印度尼西亚的*Bulu*群(布鲁稻生态型)的一些品种与籼、粳亚种杂交都表现出一定的亲和力,故认为亚洲栽培稻中除籼粳两个亚种外还存在中间类型.随后,日本学者Ikehashi和Araki^[23]对74种不同生态型水稻品种间杂交结果进行研究,发现一些水稻品种与籼粳稻杂交,杂种都表现为可育,他们称这些品种为广亲和品种(Wide Compatibility Variety, WCV),而控制广亲和性的基因称为广亲和基因(Wide Compatibility Gene, WCG).Ikehashi和Araki^[26]在筛选广亲和品种和研究广亲和基因的同时,对利用广亲和基因克服籼粳亚种间杂种的不育性进行了探索.他们认为在籼粳杂种不育位点上存在籼型、粳型和广亲和型等位基因;籼粳位点杂合表现不育,而携带广亲和型等位基因的水稻品种,和籼稻或粳稻的杂交后代都正常可育;因此广亲和品种的发现使得克服杂种不育和利用亚种间杂种优势成为可能.

2.3 籼粳杂交育种的提出

早在1959年,杨守仁和赵纪书^[27]提出籼粳稻杂交可以作为常用的稻作育种新途径,并就籼粳后代的结实率问题、如何扬长避短结合籼稻和粳稻优点,以及其杂种优势的利用问题进行了探索.

1987年,袁隆平从杂种优势的水平,将杂交水稻育种分为品种间、亚种间和远缘杂种优势的利用3个发展阶段,从战略上提出了杂交水稻育种的设想^[2].由于品种间的亲缘关系较近,其杂种优势在产量上存在一定限制.尽管品种间杂交水稻的培育在生育期、米质、抗性和不育系的异交率等方面有进一步改良和提高的空间,但是其在产量上的提高将逐渐变缓.而籼粳 F_1 杂种的产量潜力有望成为杂交水稻产量进一步提高的有效途径.袁隆平先生提出,直接利用强大的籼粳杂种优势的主要限制在于杂种结实率;广亲和品种和广亲和基因为解决籼粳杂种 F_1 育性降低的问题提供了途径.

3 籼粳杂种不育调控机制的研究及发展

3.1 水稻籼粳杂种不育位点及其遗传基础

水稻籼粳亚种间杂种不育的分子机制非常复杂.

杂种不育往往由多种原因造成,包括花粉败育、雌配子败育,以及雌雄配子体不亲和等^[28,29]。以中国、日本科学家为主,利用栽培稻和野生稻、籼粳亚种间、*Aus*稻和籼稻/粳稻等不同的杂交组合,定位到30个调控籼粳杂种不育的位点,以及6个影响亚洲栽培稻和其他水稻杂种育性的位点;此外还发现17个杂种不育QTL,其定位区间尚不明确(图1)^[30~38]。

遗传分析表明,籼粳杂种的不育性除了受主效QTL位点控制,还被QTL位点间、QTL与非QTL位点间的互作调控^[28,35,38~40]。Kubo等人^[38~40]发现了两对上位性互作导致花粉败育的位点*EFS-S24*和*S35-INK*,其中*S24*和*INK*紧密连锁,但是它们通过独立的遗传途径调控籼粳亚种间杂种不育。隐性重复致死基因*DPL1/DPL2*与*S27/S28*在遗传上亦表现为非等位基因的互作模式^[32,34]。

此外,杂交分离后代中,杂种不育基因的基因型分离比例往往明显偏离孟德尔遗传规律,某一类型配子比例在群体中明显提高或降低^[31,41,42],这些结果增加了对杂种育性基因研究的困难。

3.2 籼粳杂种不育基因功能及其分子机制

迄今为止,水稻中已有4个杂种不育位点和2对

调控杂种不育的基因(*S5*, *Sa*, *hsa1*, *S7*, *DPL1/DPL2*, *S27/S28*)被图位克隆(表1)^[31~34,37,42,43]。这些水稻杂种不育基因的分离和克隆加深了对植物生殖隔离分子机制的理解;其遗传和分子机理的揭示对克服杂种不育和利用杂种优势提供了新的机遇。

(i) 水稻籼粳杂种雌配子育性位点*S5*。 *S5*位点最初由日本学者定位于第6染色体^[26],随后国内外多个课题组对该位点展开一系列定位和探索工作。在精细定位的基础上^[44,45],通过图位克隆法和遗传分析,发现*S5*位点3个连锁的基因(*ORF3*, *ORF4*, *ORF5*) 在遗传上彼此互作,形成一个“杀手-保护者”互作的生殖隔离体系(killer-protector system),调控水稻籼粳杂种雌配子的育性和偏分离^[31,43]。研究发现*ORF3*, *ORF4*和*ORF5*分别编码热激蛋白Hsp70, 一个未知功能的膜蛋白和天冬氨酸蛋白酶。*ORF5*基因扮演着“杀手”(killer)的角色, *ORF4*辅助*ORF5*, 而*ORF3*则功能相反, 作为“保护者”(protector)存在。这3个基因在籼稻和粳稻中存在不同的等位基因,典型的籼稻携带*ORF3+**ORF4-**ORF5+*组合, 而典型的粳稻携带*ORF3-**ORF4+**ORF5-*组合。在籼粳杂种中, 杀手基因*ORF5+*和它的助手*ORF4+*合作杀死雌配子, 而携带保护基因*ORF3+*的雌配子则免于败育。因此认为

图1 (网络版彩色)水稻杂种不育位点一览

Figure 1 (Color online) Loci for hybrid sterility and wide-compatibility in rice

表 1 水稻已克隆的调控杂种不育和生殖隔离的基因

Table 1 Functional cloned hybrid sterility genes causing postzygotic reproductive isolation in rice

杂交组合	位点/基因	等位基因	编码蛋白	杂种表型	遗传机制	参考文献
籼稻×粳稻	<i>S5 ORF3</i> <i>S5 ORF4</i> <i>S5 ORF5</i>	<i>ORF3+/ORF3-</i> <i>ORF4+/ORF4-</i> <i>ORF5+/ORF5-/ORF5n</i>	热激蛋白Hsp70 膜蛋白 天冬氨酸蛋白酶	携带 <i>ORF3-</i> 的 雌配子败育	<i>ORF5+</i> 和 <i>ORF4+</i> 共同杀死携带 <i>ORF3-</i> 的雌配子	[31, 43]
籼稻×粳稻	<i>Sa SaF</i> <i>Sa SaM</i>	<i>SaF⁺/SaF⁻</i> <i>SaM⁺/SaM⁻</i>	F-box蛋白 泛素修饰因子E3连接酶	携带 <i>SaM⁻</i> 的雄 配子败育	<i>SaM⁺</i> 和 <i>SaF⁺</i> 杀死携带 <i>SaM⁻</i> 的 雄配子	[42]
籼稻×粳稻	<i>DPL1</i> <i>DPL2</i>	<i>DPL1-N⁺/DPL1-K⁻</i> <i>DPL2-K⁺/DPL2-N⁻</i>	均编码植物特异小分子蛋白	花粉萌发异常	携带两个功能缺失突变等位基 因的花粉发育异常	[32]
亚洲栽培稻× 南美野生稻	<i>S27</i> <i>S28</i>	<i>S27-T65⁺/S27-glum^s</i> <i>S28-glum⁺/S28-T65^s</i>	均编码线粒体核糖体 蛋白L27 (mtRPL27)	花粉败育	携带两个功能缺失突变等位基 因的花粉败育	[34]
籼稻×粳稻	<i>hsa1 HSA1a</i> <i>hsa1 HSA1b</i>	<i>HSA1a-i/HSA1a-j</i> <i>HSA1b-i/HSA1b-j</i>	植物特异DUF1618结构域 类核酸结合蛋白	雌配子败育	<i>HSA1a-i-HSA1b-i/HSA1a-j-HSA1b-i</i> 和 <i>HSA1a-i-HSA1b-i/HSA1a-j-HSA1b-j</i> 的基因型分别导致 杂种不育和杂种衰退	[33]
Aus稻× 籼稻/粳稻	<i>S7 ORF3</i>	<i>S7^{ai}/S7^{ap}/S7ⁱ</i>	TPR 结构域(tetratricopeptide repeat domain)	雌配子败育	杂合背景下, 携带籼型等位基 因(<i>S7ⁱ</i>)或粳型等位基因(<i>S7^{ap}</i>) 的雌配子败育	[37]

*ORF5+*蛋白能将信号传递给膜蛋白*ORF4+*, 从而导致子房细胞的内质网胁迫. 在没有携带保护基因*ORF3+*的雌配子中, 内质网胁迫将进一步引起细胞程序性死亡的提前发生, 最终导致胚囊败育; 而*ORF3+*的存在可以挽救雌配子. 克隆*S5*位点, 揭示其遗传变异, 是植物生殖隔离机制研究的重要进展, 也为广亲和品种的培育提供了分子标记, 有助于籼粳亚种间杂种优势的利用.

(ii) 水稻籼粳杂种雄配子育性位点*Sa*. *Sa*位点位于第1染色体, 包含两个紧密连锁的基因*SaM*和*SaF*, 分别编码泛素修饰因子E3连接酶和F-box蛋白. 遗传分析表明该位点通过两基因/三因子互作的模式(two-gene/three-component interaction model)调控籼粳杂种雄配子的发育^[42]. 大多数籼稻品种携带*SaM⁺SaF⁺*单倍型, 而粳稻品种携带*SaM⁻SaF⁻*单倍型; 在籼粳杂种的背景下, *SaF⁺*和*SaM⁻*互作导致携带*SaM⁻*的雄配子败育, 这一过程同样需要*SaM⁺*的参与. 研究还发现基因型*SaM⁺SaF⁻*的籼稻与携带*SaM⁺SaF⁺*的籼稻和携带*SaM⁻SaF⁻*的粳稻杂交后代都正常可育, 说明该类型水稻在*Sa*位点表现出广亲和性, 可以应用于水稻杂交育种中.

(iii) 隐性重复致死基因*DPL1/DPL2*与*S27/S28*调控水稻杂种雄配子育性. 在水稻研究中发现两对隐性重复致死基因参与调控水稻杂种雄配子育性^[32,34].

其中*DPL1*和*DPL2*调控籼粳杂种的花粉萌发过程, 这两个基因均编码植物特异小分子蛋白, 分别位于第1和第6染色体. *S27*和*S28*分别位于第8染色体和第4染色体, 其编码蛋白为线粒体核糖体蛋白L27 (mtRPL27), 参与调控亚洲栽培稻和南美野生稻杂种的花粉发育. 这两对重复基因调控杂种育性的遗传机制比较类似: 它们均编码花粉发育过程中所必需的基因. 在两个分化的水稻群体中, 分别携带了不同的重复基因的功能等位基因, 而另一个重复基因发生缺失突变. 在杂种中, 携带两个功能缺失突变等位基因的花粉发育异常.

(iv) *hsa1*位点调控籼粳杂种不育和杂种衰退. Kubo等人^[33]研究发现, 第12染色体上的位点*hsa1*也包含两个紧密连锁的基因*HSA1a*和*HSA1b*, 通过不同等位基因间的互作调控杂种的雌配子育性. *HSA1a*和*HSA1b*分别编码植物特异DUF1618蛋白结构域和类核酸结合蛋白. 在*HSA1b*基因型为籼型纯合的遗传背景下, *HSA1a*杂合导致籼粳杂种的胚囊败育(杂种基因型为*HSA1a-i-HSA1b-i/HSA1a-j-HSA1b-i*); 而将*HSA1a-i-HSA1b-i*等位基因导入粳稻(*HSA1a-j-HSA1b-j*)后, *F₂*群体的雌配子育性将出现分离并导致杂种衰退.

(v) *S7*位点调控Aus稻和籼稻/粳稻之间的杂种雌配子育性. 通过图位克隆法, 在第7染色体定位到一个影响雌配子杂种育性和偏分离的位点*S7*^[37]. 在

*Aus*稻和籼稻/粳稻杂合的遗传背景下,携带粳型等位基因(*S7ⁱ*)或粳型等位基因(*S7^p*)的雌配子发生败育。研究表明,*S7-ORF3*在雌蕊中高水平表达,其编码蛋白含TPR结构域(tetratricopeptide repeat domain)。在杂合背景下下调*S7-ORF3*的表达,可以恢复杂种的育性,且偏分离现象不再发生;而将*Aus*型等位基因(*S7^{ai}*)转入*Cps1017*将导致杂种不育。研究还对*S7*广亲和位点进行了分析,研究结果将为广亲和育种提供分子标记。

3.3 粳籼杂种不育位点的分子演化模型及其广亲和机制

早在20世纪,Dobzhansky-Muller模型提出两个群体在演化的过程中独立的发生并不断积累基因突变;这些突变的等位基因在杂交时位于同一遗传背景,可能发生不利的互作,导致杂种不亲和^[46,47]。基于对水稻杂种不育基因遗传和分子机制的最新理解,提出了3个分子演化模型来解释杂种不育和生殖隔离的形成机制,即平行演化模型(parallel divergence model)、次第演化模型(sequential divergence model)和平行-次第演化模型(parallel-sequential divergence model)^[48]。

平行演化模型提出生殖隔离可能由隐性重复致死基因所导致,某个重要功能的基因在祖先群体里面发生一次复制,产生两个拷贝;随后两个基因拷贝在两个群体里发生独立的演化,由于复制产生的功能冗余性,在任意一个群体里,只需要有一个基因拷贝保持原来的重要功能以维持个体的正常发育,而另一个拷贝可能产生序列变异,最终导致功能上的改变。如果不同的基因拷贝发生不同的演化事件,将会导致两个功能突变的基因拷贝集中在杂种产生的某一个配子中,最终导致生殖隔离。这一模型和Oka提出的“重复配子致死模型”相吻合^[49,50],*DPL1/DPL2*与*S27/S28*这两对隐性重复致死基因的起源和演化遵循这一机制,参与调控水稻杂种雄配子育性。

生殖隔离还有可能由两个连锁基因的突变所导致。在一个群体中,两个基因都保持祖先的等位基因类型;而在另一个群体,两个基因依次突变,生殖隔离发生在携带祖先等位基因型和携带两次突变等位基因型的群体之间。区别于平行演化模型,次第演化模型中两次突变事件都发生在同一个群体,且突变的先后顺序是固定的。由于本来在自然群体中未曾同时存在的等位基因会在杂种的遗传背景下相遇,

一旦发生不亲和的互作,将会导致杂种不育和生殖隔离。水稻*Sa*位点和*hsa1*符合该模型的遗传作用模式,其遗传基础和Kitamura提出的“单位点孢子体配子体互作模型”保持一致^[51]。

当生殖隔离体系涉及3个连锁的基因,情况会变得更复杂。在这样的体系中,两个基因在两个不同的群体独立的发生突变后,尚不能导致生殖隔离;直到第3个基因在某个基因已突变的遗传背景下,再次发生突变,将会导致不同演化分支上的群体之间出现生殖隔离。这一模型的代表体系为*S5*“杀手-保护者”互作的生殖隔离体系^[52,53]。*S5*位点所包含的三个连锁的基因*ORFs3-5*在稻族分化以后通过*Helitron*转座子复制而来,最初的基因型为*ORF3+ORF4+ORF5+*,即“杀手”和“保护者”形成了一个稳定的平衡;在已经开始分化的不同野生稻群体中,*ORF5+*和*ORF4+*分别突变产生了*ORF5-*和*ORF4-*,对应的水稻在*S5*位点基因型为*ORF3+ORF4+ORF5-*和*ORF3+ORF4-ORF5+*(典型的籼稻类型),不再携带“杀手”基因。在*ORF3+ORF4+ORF5-*的遗传背景下,“保护者”不再是必须的基因,因此*ORF3+*突变产生了*ORF3-*,产生典型的粳稻基因型*ORF3-ORF4+ORF5-*。其中粳型等位基因组合受到自然选择的作用,而粳型等位基因组合频率的变化由驯化过程中的奠基者效应所引起,这两种基因型频率的升高最终导致水稻籼稻和粳稻群体的分化和生殖隔离的产生。

上述3个模型不仅可以解释水稻中已克隆的生殖隔离基因的起源演化机制,还能解释其他植物、动物和微生物中已克隆的生殖隔离基因的发生机制,反映了生殖隔离发生机制的普遍规律。而广亲和现象和粳籼杂种不育彼此对应,广亲和等位基因根据生殖隔离类型的不同,可以分为两种。第一种类型的广亲和品种,携带两个拷贝以上的功能等位基因,因此可以互补由于功能等位基因缺失而导致的杂种不育和生殖隔离;该类型广亲和基因的起源时间在粳籼不亲和等位基因的产生之前,由于其携带的功能拷贝往往位于水稻不同位点或不同染色体,因此给水稻广亲和育种应用带来困难。第二种类型的广亲和基因起源于粳型不亲和等位基因,在演化中进而产生粳型不亲和等位基因;该类型广亲和基因不仅可以作为粳籼的桥梁,而且其携带的功能等位基因由于紧密连锁而利于水稻遗传育种。对生殖隔离和广亲和基因起源发生机制的新认识将进一步利用亚

种间杂种优势提供理论指导^[48].

4 创建广亲和水稻种质资源的途径和展望

利用水稻籼粳亚种间强杂种优势, 进一步提高水稻产量已经成为国内外水稻育种研究领域的一个重点科学问题. 育种家们已通过传统育种手段, 利用自然界存在的广亲和种质资源, 选育出一系列高产的籼粳杂交组合, 可以部分地利用亚种间杂种优势^[54,55].

随着水稻籼粳杂种不育和广亲和机制认识的加深, 可以根据已鉴定的籼粳杂种不育位点所对应广亲和等位基因的信息, 利用分子标记辅助选择技术加速广亲和品种的培育和应用. 粳型亲籼的光温敏不育系509S的培育过程中通过分子标记辅助选择聚合了广亲和等位基因*S5-n*和粳型等位基因*S7-i*, *S8-i*和*S9-i*; 该材料遗传背景92%表现为粳稻类型, 但是和籼稻品种杂交后代正常可育^[56]. 优良粳型恢复系W107的培育同样也采用了分子标记辅助选择的策略, 聚合了*S5-n*, *S7-n*和*S17-n*三个广亲和基因^[57]. Shahid等人^[58]的研究结果证明了影响花粉育性的位点*Sa-n*和*Sb-n(f5-n)*在籼粳亚种间杂交组合选育中的应用价值. 最新的研究通过分子标记辅助选择和全基因组水稻育种芯片鉴定, 将*S5-n*和*f5-n*导入到优良籼稻恢复系9311中; 育成材料与5个典型的粳稻品种和3个典型的籼稻品种进行测交, 显示其显著提高了籼粳杂种F₁的花药开裂、花粉育性和胚囊育性, 杂种

结实率的提高幅度达33.6%~46.7%. 其建立的广亲和分子育种体系可为水稻遗传改良和亚种间杂交育种提供重要育种材料^[59].

在利用自然界中已有的广亲和种质资源的同时, 未来需要根据广亲和基因的分子机理, 更有针对的人工创建广亲和育种材料, 应用于亚种间杂种优势利用. 近年来定位和克隆的籼粳杂种不育位点给亚种间杂交组合的选育提供了广泛的基因资源. 一方面, 由于杂种不育往往是由多个QTL位点共同调控, 聚合多个位点的广亲和基因可以将不同位点的效应累加起来, 有效地提高籼粳杂种结实率. 可以通过分子标记辅助育种在水稻优良亲本中聚合多个位点对应的广亲和基因, 然后和测验种进行测交, 检测杂种F₁的花粉胚囊和小穗育性, 考察改良后材料对籼稻和粳稻的亲合性; 这一策略的应用需要发掘携带籼粳杂种不育位点对应广亲和基因的水稻种质资源, 并获得和广亲和基因连锁的分子标记的信息. 另一方面, 可以通过CRISPR技术在优良杂交亲本中对多个杂种不育基因进行敲除, 然后和3~5个测验种进行测交, 检测杂种F₁的花粉胚囊和小穗育性, 考察改良后的亲本对籼稻和粳稻的亲合性; 这一策略的实施依赖于杂种不育基因的克隆和对应基因序列信息.

今后对籼粳杂种不育和广亲和的研究成果不仅在理论研究层面可以回答生殖隔离相关的重要科学问题, 更有助于我们在籼粳杂交育种和亚种间杂种优势利用上做到“有的放矢”.

参考文献

- 1 Yuan L P. A preliminary report on male sterility in rice, *Oryza sativa* L. Chin Sci Bull, 1966, 11: 322 [袁隆平. 水稻的雄性不孕性. 科学通报, 1966, 17: 185-188]
- 2 Yuan L P. Strategies of the development of hybrid rice breeding (in Chinese). Hybrid Rice, 1987, 2: 1-3 [袁隆平. 杂交水稻育种的战略设想. 杂交水稻, 1987, 2: 1-3]
- 3 Ge S, Sang T, Lu B R, et al. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 14400-14405
- 4 Oka H. Origin of Cultivated Rice. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1988
- 5 Xu S. Shuo Wen Jie Zi. Annotated by Duan Y C in Qing dynasty (in Chinese). Shanghai: Shanghai Ancient Books Publishing House, 1988 [许慎. 说文解字注(东汉). (清)段玉裁. 注. 上海: 上海古籍出版社, 1988]
- 6 Glaszmann J C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. Theor Appl Genet, 1987, 74: 21-30
- 7 Zhang Q, Saghai Maroof M A, Lu T Y, et al. Genetic diversity and differentiation of *indica* and *japonica* rice detected by RFLP analysis. Theor Appl Genet, 1992, 83: 495-499
- 8 Zhang Q, Liu K D, Yang G P, et al. Molecular marker diversity and hybrid sterility in *indica-japonica* rice crosses. Theor Appl Genet, 1997, 95: 112-118
- 9 Nakano M, Yoshimura A, Iwata N. Phylogenetic study of cultivated rice and its wild relatives by RFLP. Rice Genet NewsLett, 1992, 9: 132-134

- 10 Yang G P, Saghai Maroof M A, Xu C G, et al. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol Gen Genet*, 1994, 245: 187–194
- 11 Garriss A J, Tai T H, Coburn J, et al. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 2005, 169: 1631–1638
- 12 Mackill D J. Classifying *japonica* cultivars with RAPD markers. *Crop Sci*, 1995, 35: 889–894
- 13 Liu K D, Yang G P, Zhu S H, et al. Extraordinary polymorphic ribosomal DNA in wild and cultivated rice. *Genome*, 1996, 39: 1109–1116
- 14 Han B, Xue Y. Genome-wide intraspecific DNA-sequence variations in rice. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 134–138
- 15 Feng Q, Zhang Y, Hao P, et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature*, 2002, 420: 316–320
- 16 Project R G. The 3000 rice genomes project. *GigaScience*, 2014, 3: 7
- 17 Huang X, Wei X, Sang T, et al. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat Genet*, 2010, 42: 961–967
- 18 Huang X, Zhao Y, Wei X, et al. Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. *Nat Genet*, 2012, 44: 32–39
- 19 Chen W, Gao Y, Xie W, et al. Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism. *Nat Genet*, 2014, 46: 714–721
- 20 Xie W, Wang G, Yuan M, et al. Breeding signatures of rice improvement revealed by a genomic variation map from a large germplasm collection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 5411–5419
- 21 Zhang J, Chen L L, Xing F, et al. Extensive sequence divergence between the reference genomes of two elite indica rice varieties Zhenshan 97 and Minghui 63. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, doi: 10.1073/pnas.1611012113
- 22 Kato S, Kosaka H, Hara S. On the affinity of rice varieties as shown by fertility of hybrid plants. *Bull Sci Fac Agric Kyushu Univ*, 1928, 3: 132–147
- 23 Ikehashi H, Araki H. Varietal screening of compatibility types revealed in F_1 fertility of distant crosses in rice. *Jpn J Breed*, 1984, 34: 304–313
- 24 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
- 25 Morinaga T, Kuriyama H. Intermediate type of rice in the subcontinent of India and Java. *Jpn J Breed*, 1958, 7: 253–259
- 26 Ikehashi H, Araki H. Genetics of F_1 sterility in remote crosses of rice. *Rice Genetics: Proceedings of the International Rice Genetics Symposium*, 1986, 119–130
- 27 Yang S R, Zhao J S. Analysis in hybridization between *indica* and *japonica* rice (in Chinese). *Acta Agric*, 1959, 10: 256–267 [杨守仁, 赵纪书. 籼粳稻杂交问题之研究. *农业学报*, 1959, 10: 256–267]
- 28 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
- 29 Liu H Y, Xu C G, Zhang Q. Male and female gamete abortions, and reduced affinity between the uniting gametes as the causes for sterility in an *indica/japonica* hybrid in rice. *Sexual Plant Reprod*, 2004, 17: 55–62
- 30 Ouyang Y, Chen J, Ding J, et al. Advances in the understanding of inter-subspecific hybrid sterility and wide-compatibility in rice. *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 2332–2341
- 31 Yang J, Zhao X, Cheng K, et al. A killer-protector system regulates both hybrid sterility and segregation distortion in rice. *Science*, 2012, 337: 1336–1340
- 32 Mizuta Y, Harushima Y, Kurata N. Rice pollen hybrid incompatibility caused by reciprocal gene loss of duplicated genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 20417–20422
- 33 Kubo T, Takashi T, Ashikari M, et al. Two tightly linked genes at the *hst1* locus cause both F_1 and F_2 hybrid sterility in rice. *Mol Plant*, 2016, 9: 221–232
- 34 Yamagata Y, Yamamoto E, Aya K, et al. Mitochondrial gene in the nuclear genome induces reproductive barrier in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 1494–1499
- 35 Kubo T, Yoshimura A. Epistasis underlying female sterility detected in hybrid breakdown in a *Japonica-Indica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 346–355
- 36 Sakata M, Yamagata Y, Doi K, et al. Two linked genes on rice chromosome 2 for F_1 pollen sterility in a hybrid between *Oryza sativa* and *O. glumaepatula*. *Breed Sci*, 2014, 64: 309–320
- 37 Yu Y, Zhao Z, Shi Y, et al. Hybrid sterility in rice (*Oryza sativa* L.) involves the tetratricopeptide repeat domain containing protein. *Genetics*, 2016, 203: 1439–1451
- 38 Kubo T, Yoshimura A, Kurata N. Pollen killer gene *S35* function requires interaction with an activator that maps close to *S24*, another pollen killer gene in rice. *G3 (Bethesda)*, 2016, 6: 1459–1468
- 39 Kubo T, Yoshimura A, Kurata N. Hybrid male sterility in rice is due to epistatic interactions with a pollen killer locus. *Genetics*, 2011,

- 189: 1083–1092
- 40 Kubo T, Yamagata Y, Eguchi M, et al. A novel epistatic interaction at two loci causing hybrid male sterility in an inter-subspecific cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genet Syst*, 2008, 83: 443–453
- 41 Harushima Y, Nakagahra M, Yano M, et al. Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses. *Genetics*, 2002, 160: 313–322
- 42 Long Y, Zhao L, Niu B, et al. Hybrid male sterility in rice controlled by interaction between divergent alleles of two adjacent genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18871–18876
- 43 Chen J, Ding J, Ouyang Y, et al. A triallelic system of *S5* 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
- 44 Ji Q, Lu J, Chao Q, et al. Delimiting a rice wide-compatibility gene *S5ⁿ* to a 50 kb region. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1495–1503
- 45 Qiu S Q, Liu K, Jiang J X, et al. Delimitation of the rice wide compatibility gene *S5ⁿ* to a 40-kb DNA fragment. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1080–1086
- 46 Dobzhansky T. *Genetics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press, 1937
- 47 Muller H J. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biol Symposium*, 1942, 6: 71–125
- 48 Ouyang Y, Zhang Q. Understanding reproductive isolation based on the rice model. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 111–135
- 49 Oka H I. Genetic analysis for the sterility of hybrids between distantly related varieties of cultivated rice. *J Genet*, 1957, 55: 397–409
- 50 Oka H I. Analysis of genes controlling *F₁* sterility in rice by the use of isogenic lines. *Genetics*, 1974, 77: 521–534
- 51 Kitamura E. Genetics studies on sterility observed in hybrids between distantly related varieties of rice, *Oryza sativa* L. *Bull Chugoku Agricult Exp Stat Ser A*, 1962, 8: 141–205
- 52 Ouyang Y, Li G, Mi J, et al. Origination and establishment of a trigenic reproductive isolation system in rice. *Mol Plant*, 2016, doi: 10.1016/j.molp.2016.1007.1008
- 53 Du H, Ouyang Y, Zhang C, et al. Complex evolution of *S5*, a major reproductive barrier regulator, in the cultivated rice *Oryza sativa* and its wild relatives. *New Phytol*, 2011, 191: 275–287
- 54 Lin J, Song X, Wu M. Biological characteristics and heterosis utilization of four *indica-japonica* intermediate type restorer lines with wide compatibility (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2012, 26: 656–662
- 55 Lu Y, Ma R, Wang X, et al. SSLP-based SSR fingerprinting and *indica/japonica* classification of Yongyou series hybrid rice (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2007, 21: 443–446
- 56 Chen L, Zhao Z, Liu X, et al. Marker-assisted breeding of a photoperiod-sensitive male sterile *japonica* rice with high cross-compatibility with *indica* rice. *Mol Breed*, 2011, 27: 247–258
- 57 Wan J M. Utilization in heterosis of *indica-japonica* crosses (in Chinese). In: *Proceedings of the First Hybrid Rice Congress in China*, 2010. 9: 3–6 [万建民. 水稻籼粳交杂种优势利用研究. 见: 第 1 届中国杂交水稻大会论文集, 2010. 9: 3–6]
- 58 Shahid M Q, Chen F, Li H, et al. Double-neutral genes, *Sa-n* and *Sb-n*, for pollen fertility in rice to overcome *indica × japonica* hybrid sterility. *Crop Sci*, 2013, 53: 164–176
- 59 Mi J, Li G, Huang J, et al. Stacking *S5-n* and *f5-n* to overcome sterility in *indica-japonica* hybrid rice. *Theor Appl Genet*, 2016, 129: 563–575

Progress of *indica-japonica* hybrid sterility and wide-compatibility in rice

OUYANG YiDan

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and National Centre of Plant Gene Research (Wuhan), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

As a main staple food for world population, utilization of heterosis in rice has increased crop productivity tremendously. The Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) consists of two subspecies, *indica* and *japonica*. Genetic differentiation between *indica* and *japonica* subspecies appears to be a major source of genetic diversity in the cultivated rice gene pool. A strategic plan for utilization of inter-subspecific heterosis was proposed half a century ago, indicating that strong heterosis in *indica-japonica* hybrids provides an effective approach to increase the yield potential for rice breeding.

Hybrid sterility that caused by postzygotic reproductive isolation has been a major barrier for utilization of such heterosis between *indica* and *japonica*. Genetic analyses have identified a large number of loci conditioning hybrid sterility in rice, which regulate fertility in heterozygous genetic background by complex allelic and epistasis interactions. Six locus-pairs regulating hybrid embryo-sac or pollen sterility have been cloned recently in rice, providing fresh understandings in mechanism of hybrid sterility. The molecular and evolutionary mechanisms underlying reproductive isolation are summarized with respect to the rice hybrid sterility genes, which reveal three evolutionary genetic models including the parallel divergence model, the sequential divergence model, and the parallel-sequential divergence model. There also exists a special group of rice germplasm, referred to as wide-compatibility varieties that produce fertile hybrids when crossed to both *indica* and *japonica* varieties. The wide-compatibility genes in these varieties enable hybridization and provide valuable genetic resources for utilization of inter-subspecific heterosis, which take diverse forms owing to the divergent mechanisms in reproductive barriers. Therefore, understanding in hybrid sterility and reproductive isolation in rice would greatly facilitate the utilization of heterosis in breeding programs.

This paper summarized the progress in genetic and molecular mechanisms regulating rice hybrid sterility, and discussed the recent understanding in wide-compatibility genes and their utilizations in breeding of wide-compatibility varieties. These advances may greatly facilitate the exploration of inter-subspecific heterosis in breeding programs.

rice (*Oryza sativa*), *indica* and *japonica*, hybrid sterility, wide-compatibility, reproductive isolation

doi: 10.1360/N972016-01012