



研究论文

Research Article

开发 S5 功能标记应用于水稻广亲和品种筛选

吴爽<sup>1\*</sup>, 台德卫<sup>1\*</sup>, 宛煜嵩<sup>2</sup>, 王德正<sup>1</sup>, 张效忠<sup>1</sup>, 王守海<sup>1</sup>

1.安徽省农业科学院水稻研究所,合肥,230031

2.中国农业科学院生物技术研究所,北京,100081

\*同等贡献作者

✉ 通讯作者: wshouhai@sina.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2014 年, 第 12 卷, 第 3 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0003

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

吴爽等, 2014, 开发 S5 功能标记应用于水稻广亲和品种筛选, 分子植物育种(online), 12(3): 1016-1023 (doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0003)

引用格式(英文):

Wu et al., 2014, Developing Functional Marker for S5 Gene and Screening Wide Compatibility Variety, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 12(3): 1016-1023 (doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0003)

**摘要** 广亲和基因 S5 能有效地提高水稻亚种间杂交种的结实率, 被广泛地应用于育种实践, 如本单位以广亲和品种 Cpslo17 为 S5 基因供体育成的双优 4183, 已通过品种审定并应用于生产。本研究利用公开的 S5 分子信息, 开发出基于 PCR 的功能性标记, 对安徽省水稻地方品种等材料进行筛选, 并对 5 份材料进行测序。研究结果表明: 一份来源于东南亚材料含有 S5 基因, 但 332 份安徽省水稻地方品种没有检测到 S5 基因, 说明生殖隔离阻碍了基因交流, 使得地方品种保留了遗传稳定性和多样性, 同时也说明了全面收集和保存地方品种的重要性。

**关键词** 广亲和品种; S5; 功能性标记; 筛选

Developing Functional Marker for S5 Gene and Screening Wide Compatibility Variety

Wu Shuang<sup>1\*</sup>, Tai Dewei<sup>1\*</sup>, Wan Yusong<sup>2</sup>, Wang Dezheng<sup>1</sup>, Zhang Xiaozhong<sup>1</sup>, Wang Shouhai<sup>1</sup>

1. Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, 230031, P.R. China

2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, P.R. China

\*These workers contributed to this work

✉ Corresponding author, wshouhai@sina.com; ✉ Authors

**Abstract** S5 is a wide compatibility gene, which can improve the seed setting rate of inter-subspecific hybrid rice effectively and has been widely used in rice breeding programs. For example, Shuangyou 4183, which was bred using Cpslo17 as the S5 gene donor, has been registered and released by our group. A functional marker to detect S5 gene was developed using public available molecular information and it was used for screening germplasm with wide compatibility among rice landraces in Anhui et al, and 5 rice varieties were sequenced. Results indicated that one variety from Southeast Asia was identified with S5 gene, but none of 332 rice landraces in Anhui province was found with S5 gene, which means that reproductive isolation prevents gene flow and retains genetic stability and diversity in those rice landraces. On the other hand, extensively collecting and protecting these rice landraces is very important for rice breeding and academic study.

**Keywords** Wide compatibility variety; S5; Functional marker; Screening

收稿日期: 2014 年 01 月 23 日

接受日期: 2014 年 01 月 24 日

发表日期: 2014 年 03 月 23 日

基金项目: 本研究由安徽省农业科学院院长青年创新基金(11B10105)和国家高技术研究发展计划(2011AA10A100)共同资助

研究背景

自 20 世纪 60 年代开始, 随着全球人口的快速增长及农业用地被大量占用, 粮食短缺问题引起了全球的广泛关注。为了满足对粮食的需求, 到 2025 年粮食产量要在现有基础上(1995 年全球谷物总产



为  $1.68 \times 10^{12}$  kg)增加 50%以上(Khush, 2001)。水稻是最重要的粮食作物之一, 要提高水稻总产量以保证粮食安全, 只有依靠科技进步来提高单位面积产量。据统计, 全球自 20 世纪 60 年代以来的 40 多年中, 单产对水稻总产增长的贡献率达 73% (朱德峰等, 2010)。水稻杂种优势利用对提高单产意义重大, 可提高 20%以上。基于形态性状、同工酶以及对一些化合物的不同反应, 亚洲栽培稻(*Oryza Sativa* L.)分为籼(*indica*)、粳(*japonica*)2 个亚种(Oka, 1974), 籼亚种主要适应于热带和亚热带等低纬度地区, 而粳亚种主要分布在高纬度和高海拔地区, 从而形成天然的生殖隔离基因库。不同品种资源间杂种优势存在差异, 籼粳间杂种优势明显高于品种间的杂种优势, 主要表现在生物产量显著增加, 根系发达, 穗粒数增多。袁隆平认为在水稻单产突破中, 利用亚种间杂种优势可能是在较短时期内取得成效的途径(袁隆平, 1987, 杂交水稻, (1): 1-3)。Zhang 等(1997)利用 9 个籼稻和 11 个粳稻采用完全双列杂交设计, 研究表明绝大多数亚种间  $F_1$  的结实率低于 50%, 结实率的降低导致每穗实粒数减少从而影响最终产量的形成。广亲和种质的发现为解决亚种间杂交不亲和性提供可能, Ikehashi 和 Araki(1984)从 74 个品种中筛选出 Cpslo17 等 6 个品种与籼、粳稻杂交  $F_1$  都有较高的结实率, 认为均具有广亲和特性且含有广亲和基因(wide compatibility gene, WCG)。卢诚和潘熙淦(1992)认为 02428 等的广亲和特性受 1 对主效基因控制, 且与色素原基因 *C* 连锁。顾铭洪等(1993)通过广亲和品种之间的双列杂交分析得出 Cpslo17、02428、轮回 422 等 5 个品种互为等位关系, 受广亲和基因  $S5^m$  控制, 而 Dular 和 Aus373 则受另一对非等位基因控制, 陈忠明等(1996)将来自 Aus373 的广亲和基因 *Sa(t)n* 初步定位于第 7 染色体上, 其广亲和性比  $S5^m$  弱。袁隆平等(1997)将水稻亚种间亲和性分为 4 大类, 以热带粳稻(爪哇稻)如 Cpslo17 为第一类: 广谱广亲和性, 在育种上的实用性最好。Yangihara 等(1995)和 Liu 等(1997)利用不同群体分别找到与  $S5$  紧密连锁的位于第 6 染色体上的 RFLP 标记, 之后该基因分别定位在 40 kb、50 kb 内, 这 2 个定位结果存在着 24.8 kb 的重叠(Qiu et al., 2005; Ji et al., 2005)。Chen 等(2008)成功地克隆了编码天冬酰胺蛋白酶的  $S5$  基因, 它通过调控雌配子的育性来影响水稻结实率, 亚种间杂种不育是由于籼粳等位基因间存在着两个碱基的差异导

致了相应氨基酸的替换, 而在广亲和品种,  $S5$  基因则有 136 bp 缺失导致功能丧失, 所以与籼稻或粳稻杂交的  $F_1$  结实率都表现正常。经过深入研究, 发现在籼粳杂种的雌配子形成过程中, *ORF4* 和 *ORF5* 基因共同作用杀死配子, 籼型配子由于 *ORF3* 的保护而正常存活, 而粳型配子因无保护而死亡, 最终导致半不育, 广亲和品种因无杀死配子的能力, 故表现出广亲和特性(Yang et al., 2012)。本文就公开的分子信息开发出检测  $S5$  基因的功能性分子标记, 希冀在安徽省水稻地方品种等材料中筛选到广亲和品种, 为进一步配制亚种间组合或创制新的育种材料提供支撑。

## 1 结果与分析

### 1.1 功能性引物的实用性

为确定新设计引物的实用性, 以含有广亲和  $S5$  基因的 02428 和 Cpslo17 与不含有  $S5$  的 Nipponbare 和 9311 进行 PCR 扩增(图 1A)。由于广亲和品种 02428 和 Cpslo17 均有大片段的缺失, 与 Nipponbare 和 9311 的带型存在明显差异, 能较好地地区分这两种类型的材料。

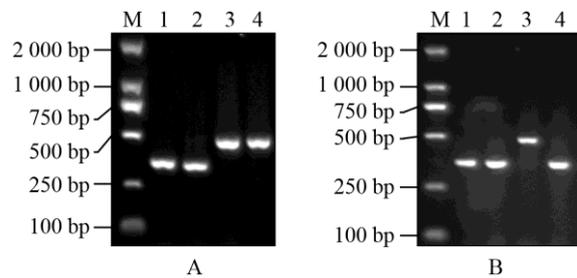


图 1  $S5$  功能性标记的电泳图

注: M: DL2000 marker; A: 1: 02428; 2: Cpslo17; 3: Nipponbare; 4: 9311; B: 1: Cpslo17; 2: 4183; 3: Balilla; 4: 培矮 64S

Figure 1 The PCR results of some rice varieties using  $S5$  functional marker

Note: M: DL2000 marker; A: 1: 02428; 2: Cpslo17; 3: Nipponbare; 4: 9311; B: 1: Cpslo17; 2: 4183; 3: Balilla; 4: Peiai 64S

4183 系本单位以 Cpslo17 为  $S5$  基因供体选育的粳型广亲和系(王守海, 2004, 作物研究, (4): 241), 在  $S5$  这个位点上, 与 Cpslo17、培矮 64S 等广亲和材料的基因型完全相同(图 1B), 而且基因组序列也一致(图 3)。1999 年经扬州大学“863”项

目广亲和系鉴定组鉴定，该品系程氏指数为 22，属粳型，与 4 个广亲和性测验种(南特号、IR36、秋光、巴利拉)杂交 F<sub>1</sub> 的结实率分别为 82.2%、86.5%、93.0%、90.7%，平均育性 88.1%，广亲和性等级为优。以 4183 为父本育成的双优 4183 于 2003 年通过安徽省品种审定，表现结实率高、米质优，高产稳产。4183 的育成再次证明了 S5 基因具有广谱广亲和性。

### 1.2 S5 基因的筛查检测及部分品种 S5 位点序列比较

天鹅果是一个来自于东南亚的粳稻，用新设计的功能性引物 S5cpslo 筛查检测发现该材料与 Cpslo17 具有相同的带型(图 2)。天鹅果穗粒数较多、农艺性状较好，其广亲和特性的鉴定为直接或间接利用该品种配制亚种间杂交品种提供了可能。

安徽水稻地方品种是各地农民在长期的生产实践中培育出来的地方良种,主要分布于皖南山区及江淮之间,淮河以北地区少有种植。在这些地方品种中绝大部分为籼稻,占 97.6%,粳稻在江淮之间有少量种植。本研究利用功能性引物 S5cpslo 检测了 332 份安徽水稻地方品种,在所分析的安徽水稻地方品种中没有检测到 S5 基因(图 2)。结果表明在进化过程中籼粳分化造就了丰富多样的稻种资源,但也导致生殖隔离,生殖隔离的存在阻碍了不同品种间的基因交流,使得这些地方品种保留了遗

传稳定性和多样性,这能为发掘和利用蕴含的有利基因和分析水稻驯化过程中的选择事件提供实物。在二十世纪农家品种的整理收集过程中,部分品种可能被丢失,这也可能是没有检测到 S5 基因的一个原因。

在 S5 基因大片段缺失的上下游设计引物,用 PCR 产物直接测序,得图 3。在 S5 这个位点上,Cpslo17、02428、天鹅果及 4183 的序列一致,都比非广亲和品种 Balilla 少了 136 bp,且有 2 个相同的 SNP(T→C, G→A)(其中 T→C 未显示)。表明 S5 基因的突变类型只有一种,即主要为大片段的缺失导致功能丧失,这与 Chen 等(2008)的测序结果一致。

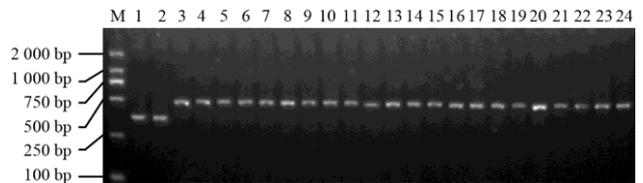


图 2 功能标记 S5 cpslo 的筛查检测结果

注: M: DL2000 marker; 1: Cpslo17; 2: 天鹅果; 3~24: 安徽水稻地方品种

Figure 2 The PCR result of screening rice landraces in Anhui province

Note: M: DL2000 marker; 1: Cpslo17; 2: Tianeguo; 3~24: Rice landraces in Anhui province

Cpslo17	1	GGGAGTGATAGATCATGACATGCATTCGTGAATGTCTACTGTGCTTTGCTACTTACCGAAGATGGAGGAGGGACACT	78
Tianeguo	1	GGGAGTGATAGATCATGACATGCATTCGTGAATGTCTACTGTGCTTTGCTACTTACCGAAGATGGAGGAGGGACACT	78
4183	1	GGGAGTGATAGATCATGACATGCATTCGTGAATGTCTACTGTGCTTTGCTACTTACCGAAGATGGAGGAGGGACACT	78
02428	1	GGGAGTGATAGATCATGACATGCATTCGTGAATGTCTACTGTGCTTTGCTACTTACCGAAGATGGAGGAGGGACACT	78
Balilla	1	GGGAGTGATAGATCATGACATGCATTCGTGAATGTCTACTGTGCTTTGCTACTTACCGAAGATGGAGGAGGGACACT	78
Cpslo17	79	CCAACCTCGTCTCGGCTGCTGTGGCGCGG	108
Tianeguo	79	CCAACCTCGTCTCGGCTGCTGTGGCGCGG	108
4183	79	CCAACCTCGTCTCGGCTGCTGTGGCGCGG	108
02428	79	CCAACCTCGTCTCGGCTGCTGTGGCGCGG	108
Balilla	79	CCAACCTCGTCTCGGCTGCTGTGGCGCGG	156
		TTGCAGCTGCAGCTGCTACAAGAAGAAGAAGAAGGAGCAGCTGTG	
Cpslo17	109	ATTAA	113
Tianeguo	109	ATTAA	113
4183	109	ATTAA	113
02428	109	ATTAA	113
Balilla	157	GCTGCTCCAAGATCACCATCTCGATCCACCCTAGCTGCAAAACAATTAAAGTCACTGATTTGTTACTCAGGGGCG	234
Cpslo17	114	GC AAAATTTAATCCCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTGCTTGCTCAGGGGCAGGCAGGCAGTCAAACGT	176
Tianeguo	114	GC AAAATTTAATCCCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTGCTTGCTCAGGGGCAGGCAGGCAGTCAAACGT	176
4183	114	GC AAAATTTAATCCCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTGCTTGCTCAGGGGCAGGCAGGCAGTCAAACGT	176
02428	114	GC AAAATTTAATCCCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTGCTTGCTCAGGGGCAGGCAGGCAGTCAAACGT	176
Balilla	235	GATTCTGTAGGAGCGG	312
Cpslo17	177	AGGAAAGGAAATGGGTTGATTAAGCAAGAAATTGGAGCAACATTACTACTAGAAAGTAGTGC	254
Tianeguo	177	AGGAAAGGAAATGGGTTGATTAAGCAAGAAATTGGAGCAACATTACTACTAGAAAGTAGTGC	254
4183	177	AGGAAAGGAAATGGGTTGATTAAGCAAGAAATTGGAGCAACATTACTACTAGAAAGTAGTGC	254
02428	177	AGGAAAGGAAATGGGTTGATTAAGCAAGAAATTGGAGCAACATTACTACTAGAAAGTAGTGC	254
Balilla	313	AGGAAAGGAAATGGGTTGATTAAGCAAGAAATTGGAGCAACATTACTACTAGAAAGTAGTGC	390

图 3 5 个品种在 S5 位点的序列比对

Figure 3 Sequence comparison of five varieties at S5 locus



## 2 讨论

### 2.1 功能性标记的开发有助于提高育种效率

在育种过程中,选用合适的标记进行辅助选择,可减少盲目性,提高育种效率。遗传标记主要分为形态标记、生化标记和分子标记。广亲和基因 *S5* 与色素原基因 *C* 紧密连锁,水稻的紫稃尖色可作为筛选广亲和种质的标记,但紫稃尖性状是 3 对显性基因互作的结果,所以利用形态标记存在很大的误判导致实用性不强(Ikehashi and Araki, 1984)。由于所有广亲和品种都具有对醋酸- $\beta$ -萘酯反应呈红色的酶带 10A,余文金等提出用酯酶同工酶作为筛选广亲和种质的生化标记,但同工酶不能区分不等位的广亲和基因位点(余文金等, 1991, 遗传, (4): 5-8)。SSR、STS 和 CAPS 等分子标记是以遗传物质为基础而开发的,具有可控性强、特异性高、鉴定快速准确、步骤简便,成为辅助育种的重要手段之一。邓启云等(2004)利用 SSR 引物进行分子标记辅助选择,将来自马来西亚普通野生稻高产位点 *yld1.1* 和 *yld2.1* 导入恢复系测 64-7,育成新的优良恢复系远恢 611。薛庆中等(1998)将抗白叶枯病的 *Xa21* 基因导入到水稻恢复系,准确率高达 93.5%。张士陆等(2005)将糯性 *Wx* 基因导入到直链淀粉含量为 28.4%的恢复系 057 中,使直链淀粉含量降至 18%以下。方珊珊等(2013)将粒长主效基因 *GS3* 及其他外观品质性状基因导入到保持系 II-32B 中,使得长宽比显著增大,而且垩白米率及垩白度极显著降低。本研究基于已克隆的 *S5* 基因的分子信息,通过选取广亲和品种和非广亲和品种进行测序,根据基因内部差异设计出分子标记,可有效地鉴定出广亲和品种,具有共显性、易检测、准确性高、实用性好等特点。

### 2.2 广亲和基因 *S5* 在安徽省水稻地方品种中的分布

中国是亚洲栽培稻(*Oryza sativa* L.)原生起源地之一(郑殿升等, 2012),长江中下游是中国栽培稻的四个遗传多样性中心之一及可能的起源中心(黄燕红等, 2005),位于此区域的安徽省,水稻地方品种资源非常丰富,如耐肥、耐涝的大叶稻,耐瘠、耐旱的三粒寸,耐寒、耐旱、抗倒的顺水拖,还有塘稻(即深水稻)、宿县夹沟香稻等特异种质。在 332 份安徽省水稻地方品种中没有检测到 *S5* 基因,这表明在古老的地方品种间由于地理、生态、遗传基础等差异导致的生殖隔离,造就了遗传的多样性和丰富的稻种资源,同时也保留了地方品种在驯化过

程中所形成的特有种性,这为利用和开发这些种质资源提供了有利条件;另一方面在 20 世纪七八十年代收集地方品种的过程中,可能遗失了一部分资源,使得本研究中所用的材料有所欠缺,这也警示我们全面收集古老地方品种的重要性。安徽水稻地方品种保留了米质优良、抗逆性强等一些性状,在育种上要利用这些优良性状配制亚种间组合,就可以通过多代回交结合分子标记辅助选择方法,将 *S5* 基因转育到亲本当中来解决亚种间结实率问题,*S5cpslo* 标记的开发可使得育种目标能顺利实现。

栽培稻起源地区(含原生和次生起源地)存在着一定数量比较原始的、籼粳分化不彻底的类型,当中广亲和材料比较多,罗利军等总结了前人研究,认为广亲和基因可能有 3 个来源,而其中最多的是原始型的籼、粳稻(罗利军等, 1991, 作物品种资源, (1): 14-16),如云南省和东南亚山地的光壳陆稻、印度尼西亚的爪哇稻以及印度次大陆的 *Aus* 稻,在本研究中筛选出的广亲和种质天鹄果正是来源于东南亚。海拔跨度大的云南省是我国遗传多样性中心之一且是平均基因多样性最高的地方,长江中下游作为我国稻作的高产区,人工选择压力大且稻作历史悠久,使得遗传多样性受到了削弱(黄燕红等, 2005),本实验结果也从某种程度上验证了这一点。至于安徽水稻地方品种中是否含有其他的广亲和基因有待于进一步研究。

### 2.3 籼粳杂种优势应用的实践

亚种间杂种优势的利用一直是育种家追求的目标之一,培矮 64S 有来自爪哇稻 *Paddy* 血缘,是一个含有 *S5* 基因的籼型广亲和核不育系(罗孝和和袁隆平, 1989),以之为母本育成了培矮 64S/C96211(王长义和方国成, 1999)、培矮 64S/Hb-01(高金福等, 2000, 江西农业科技, (6): 8-10)、培两优 2859(富昊伟等, 2006, 杂交水稻, 21(5): 79-80),其中培两优 2859 通过了浙江省品种审定,表现为分蘖较强、穗粒数多,结实率在 80% 以上。至于种子生产中,籼、粳花时差异在 1 h 以上而影响产量的问题,通过综合施用“调花宝”、“九二〇”可有效地缓解花时不遇的负面影响。

赵志刚等(2010)利用分子标记辅助选择方法育成粳型亲籼不育系 509S,该不育系聚合了 *S5*、*S7*、*S8* 和 *S9* 等 4 个育性相关位点,其中 *S7*、*S8* 和 *S9* 分别位于第 7、第 6、第 4 染色体上,表现为中性

亲和性(Yanagihara et al., 1992; Wan et al., 1993; Wan et al., 1996)。509S 与大部分籼稻杂交结实正常，其中表现突出的有亚种组合 509S/W102。

马荣荣等(2010)以带有部分籼稻成分的粳型不育系甬粳 2A，组配出甬优 4 号、6 号、9 号、11 号、12 号等亚种间组合，其中甬优 6 号、12 号已被认定为超级杂交稻品种。用新设计的 S5cpslo 引物检测甬优 12 号的杂交 F<sub>1</sub> 种子，从图 4 中可以看出，4 份甬优 12 号的杂交种在 S5 这个位点上都显现杂合状态，说明了在这个组合中至少存在一个广亲和基因，从而较好地解决了亚种间杂交种的结实率问题。

### 3 材料与方 法

#### 3.1 试验材料

广亲和品种 Cpslo17、02428、培矮 64S 和非广亲和品种 Balilla、Nipponbare、9311 等系从外单位

引进，4183 系本单位选育。供试材料 332 份安徽水稻地方品种(表 1)由本单位收集与保存，天鵝果从外单位引进。

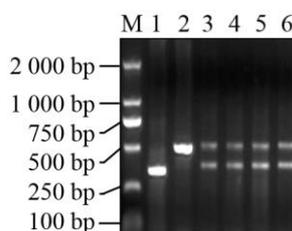


图 4 甬优 12 的 S5 基因检测结果

注: M: Marker DL2000; 1: Cpslo17; 2: Balilla; 3~6: 甬优 12 杂交种

Figure 4 The PCR result of screening Yongyou 12

Note: M: Marker DL2000; 1: Cpslo17; 2: Balilla; 3~6: F<sub>1</sub> of Yongyou 12

表 1 安徽水稻地方品种的来源地及数量

Table 1 The origin and number of rice landraces in Anhui province

品种来源 Origin	部分品种 Part of varieties	籼型 Indica	粳型 Japonica	总计 Total
合肥市 Hefei	一炉香, 黄谷稀, 白脚鹅, 蛮稻 Yiluxiang, Huangguxi, Baijiaoe, Mando	24	2	26
安庆市 Anqing	红嘴儿, 杨柳粳, 竹杈粳, 吊死鸡 Hongzuier, Yangliuxian, Zhuchaxian, Diaosiji	44	1	45
六安市 Luan	深水红, 垫仓底, 水白条 Shenshuihong, Diancangdi, Shuibaitiao	9	0	9
滁州市 Chuzhou	虎皮糯, 瘦六斗, 全椒塘稻 Hupinuo, Bieliudou, Quanjiaotangdao	4	4	8
芜湖市 Wuhu	一线红, 白藏丸, 老鼠牙, 木球锤 Yixianhong, Baicangwan, Laoshuya, Muqiuchui	38	0	38
宣城市 Xuancheng	锅底黑, 乌节糯, 西津野稻, 三粒寸 Guodihei, Wujienuo, Xijinyedao, Sanlicun	87	1	88
黄山市 Huangshan	毛粒藏, 四百粒, 铁杆青, 金包银 Maolicang, Sibaili, Tieganqing, Jinbaoyin	47	0	47
马鞍山市 Maanshan	小乌嘴, 垫仓白, 靠山黄 Xiaowuzui, Diancangbai, Kaoshanhuang	17	0	17
池州市 Chizhou	金刚早, 六月曝, 土地翁, 泥石粘 Jingangzao, Liuyuepu, Tudiweng, Nishinian	38	0	38
铜陵市 Tongling	傍秋糯, 团粒糯, 天生稻 Bangqiunuo, Tuanlinuo, Tianshengdao	3	0	3
其它 others	梅节, 花谷红米, 泥不沾, 大麻壳 Meijie, Huaguhongmi, Nibuzhan, Damake	13	0	13
合计 Total		324	8	332



### 3.2 广亲和基因 S5 功能标记设计及序列测定

根据已克隆的广亲和基因 S5 的分子信息, 基于广亲和基因存在的 136 bp 的缺失, 运用 Primer 3 在线设计引物(<http://frodo.wi.mit.edu/>), 得到检测广亲和基因 S5 的特异性引物, S5cpslo-F: 5'-CTGCA CGTCTTGCT TCTTCA-3', S5cpslo-R: 5'-AGCG AAGACAAAGGGAGTGA-3', 在非广亲和品种中产物大小为 492 bp, 广亲和品种为 356 bp。测序引物: S5Seq-F: 5'-ATGATCTTGC GGAAAACGAC-3', S5Seq-R: 5'-GCTCGA TCGGATTAACAAGC-3', 在非广亲和品种中产物大小为 945 bp。获得的 PCR 产物直接测序, 引物合成及测序均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 3.3 DNA 的提取及 PCR 反应程序

利用 CTAB 法提取水稻叶片的总 DNA (Murray and Thompson, 1980), PCR 反应总体系为 20  $\mu$ L, 其中 10 $\times$ Buffer (MgCl<sub>2</sub>) 2.0  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.0  $\mu$ L, 上下游引物各 1.0  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L), 模板 DNA 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 次循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物加入指示剂在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳 30 min 或直接用于测序。

### 3.4 数据分析

5 个品种的序列用 DNAssit 2.2 软件进行序列比对分析, “-”表示缺失, 红色部分表示序列相同, 本文中只显示部分序列。

### 作者贡献

吴爽和台德卫是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 吴爽完成数据分析, 论文的写作; 宛煜嵩、王德正参与实验研究并对论文进行修改; 张效忠提供有关实验材料并参与实验设计, 王守海全面指导实验设计, 数据分析, 论文的修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由安徽省农业科学院院长青年创新基金 (11B10105) 和国家高技术研究发展计划 (2011AA10A100) 共同资助。

### 参考文献

- Chen J.J., Ding J.H., Ouyang Y.D., Du H.Y., Yang J.Y., Cheng K., Zhao J., Qiu S.Q., Zhang X.L., Yao J.L., Liu K.D., Wang L., Xu C.G., Li X.H., Xue Y.B., Xia M., Ji Q., Lu J.F., Xu M.L., and Zhang Q.F., 2008, 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, 105(32):11436-11441  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0804761105>  
PMid:18678896 PMCID:PMC2516230
- Chen Z.M., Zou J.S., Zhu L.H., Li H.B., Gu F.L., and Gu M.H., 1996, Identification of RFLP markers linked with wide compatibility gene in variety Aus373 of ecotype Aus of rice by using bulked segregant analysis, Jiangsu Nongye Xuebao (Jiansu Journal of Agricultural Sciences), 12(4): 1-6 (陈忠明, 邹江石, 朱立煌, 李和标, 谷福林, 顾铭洪, 1996, 用分群分析法 (BSA) 鉴别与秋稻品种 Aus373 广亲和基因连锁的 RFLP 标记, 江苏农业学报, 12(4): 1-6)
- Deng Q.Y., Yuan L.P., Liang F.S., Li J.M., Li X.Q., Wang L.G., and Wang B., 2004, Studies on yield-enhancing genes from wild rice and their marker-assisted selection in hybrid rice, Zaijiao Shuidao (Hybrid Rice), 19(1): 6-10 (邓启云, 袁隆平, 梁凤山, 李继明, 李新奇, 王乐光, 王斌, 2004, 野生稻高产基因及其分子标记辅助育种研究, 杂交水稻, 19(1): 6-10)
- Fang S.R., Wu C.Z., Liu Y.Q., Zheng P.L., Xiong X.J., Shen W.F., Zhuang L.P., and Zhao M.F., 2013, Molecular Marker-assisted Selection for Improving Appearance Quality of II-32B, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 11(6):673-679 (方珊茹, 吴春珠, 刘玉芹, 郑苹立, 熊雪娇, 沈伟锋, 庄丽萍, 赵明富, 2013, 分子标记辅助选择改良 II-32B 的外观品质, 分子植物育种, 11(6): 673-679)
- Gu M.H., You A.Q., and Pan X.B., 1993, Genetic analysis on allelic relationship of wide compatibility genes among several WCV (*Oryza sativa* L.), Zhong guo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 26(1): 13-21 (顾铭洪, 游艾青, 潘学彪, 1993, 水稻品种广亲和基因等位关系的遗传分析, 中国农业科学, 26(1): 13-21)
- Huang Y.H., Sun X.L., and Wang X.K., 2005, Study on the center of genetic diversity and its origin of cultivated rice in China, Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources), 6(2): 125-129 (黄燕红, 孙新立, 王

- 象坤, 2005, 中国栽培稻遗传多样性中心和起源研究, 植物遗传资源学报, 6(2): 125-129
- Ikehashi H., and Araki H., 1984, Varietal screening of compatibility type revealed in F1 fertility of distant crosses in rice, Jpn. J. Breed., 34: 304-313  
<http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs1951.34.304>
- Ji Q., Lu J.F., Chao Q., Gu M.H., and Xu M.L., 2005, Delimiting a rice wide-compatibility gene *S5n* to a 50 kb region, Theor. Appl. Genet., 111(8): 1495-1503  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-0078-0>  
 PMid:16133303
- Khush G.S., 2001, Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium, Proc. Nutr. Soc., 60(1): 15-26  
<http://dx.doi.org/10.1079/PNS200075>  
 PMid:11310421
- Liu K.D., Wang J., Li H.B., Xu C.G., Liu A.M., Li X.H., and Zhang Q.F., 1997, A genome-wide analysis of wide compatibility in rice and the precise location of the *S5* locus in the molecular map, Theor. Appl. Genet., 95(5-6): 809-814  
<http://dx.doi.org/10.1007/s001220050629>
- Lu C., and Pan X.G., 1992, Inheritance of wide compatibility in rice cultivars 02428 and 8504, Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science), 6(3): 113-118 (卢诚, 潘熙淦, 1992, 水稻品种 02428 和 8504 的广亲和性遗传, 中国水稻科学, 6(3): 113-118)
- Luo X.H., and Yuan L.P., 1989, Breeding of rice wide compatibility lines, Zajiao Shuidao (Hybrid Rice), (2): 35-38 (罗孝和, 袁隆平, 1989, 水稻广亲和系的选育, 杂交水稻, (2): 35-38)
- Ma R.R., Wang X.Y., Lu Y.F., Zhou H.C., Cai K.F., Li X.H., and Zhang Z.Y., 2010, Breeding and application of late japonica CMS line Yongjing 2A and its late indica-japonica hybrid rice Combinations, Zajiao Shuidao (Hybrid Rice), 25(S): 185-189 (马荣荣, 王晓燕, 陆永法, 周华成, 蔡克锋, 李信华, 章志远, 2010, 晚粳不育系甬粳 2 号 A 及其籼粳杂交晚稻组合的选育及应用, 杂交水稻, 25(S): 185-189)
- Murray M.G., and Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic. Acids. Res., 8(19): 4321-4325  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>  
 PMid:7433111 PMCID:PMC324241
- Oka H.I., 1974, Experimental studies on the origin of cultivated rice, Genetics, 78(1): 475-486  
 PMid:17248664 PMCID:PMC1213206
- Qiu S.Q., Liu K.D., Jiang J.X., Song X., Xu C.G., Li X.H., and Zhang Q.F., 2005, Delimitation of the rice wide compatibility gene *S5<sup>n</sup>* to a 40-kb DNA fragment, Theor. Appl. Genet., 111(6): 1080-1086  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-0033-0>  
 PMid:16177904
- Wan J.M., Yamaguchi Y., Kato H., and Ikehashi H., 1996, Two new loci for hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.), Theor. Appl. Genet., 92(2): 183-190  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00223375>  
 PMid:24166167
- Wan J.M., Yanagihara S., Kato H., and Ikehashi H., 1993, Multiple alleles at a new locus causing hybrid sterility between a Korean *indica* variety and *japonica* variety in rice, Jpn. J. Breed., 43: 507-516  
<http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs1951.43.507>
- Wang C.Y., and Fang G.C., 1999, Development of new inter-subspecies combination Peiai64S/C96211 in two-line hybrid rice, Hubei Nongye Kexue (Hubei Agricultural Sciences), (2): 3-5 (王长义, 方国成, 1999, 两系法亚种间杂交稻新组合培矮 64S/C96211, 湖北农业科学, (2): 3-5)
- Xue Q.Z., Zhang N.Y., Xiong Z.F., Li C., and Zhu L.H., 1998, The development of the rice restorer lines with the resistance of the bacterial blight disease by the marker assisted selection, Zhejiang Nongye Daxue Xuebao (Journal of Zhejiang Agricultural University), 24(6): 581-582 (薛庆中, 张能义, 熊兆飞, 李翀, 朱立煌, 1998, 应用分子标记辅助选择培育抗白叶枯病水稻恢复系, 浙江农业大学学报, 24(6): 581-582)
- Yanagihara S., Kato H., and Ikehashi H., 1992, A new locus for multiple alleles causing hybrid sterility between an Aus variety and javanica varieties in rice (*Oryza sativa* L.), Jpn. J. Breed., 42(4): 793-801  
<http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs1951.42.793>
- Yang J.Y., Zhao X.B., Cheng K., Du H.Y., Ouyang Y.D., Chen J.J., Qiu S.Q., Huang J.Y., Jiang Y.H., Jiang L.W., Ding J.H., Wang J., Xu C.G., Li X.H., and Zhang Q.F., 2012, A killer-protector system regulates both hybrid sterility and segregation distortion in rice, Science, 337(6100):



- 1336-1340  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1223702>  
PMid:22984070
- Yuan L.P., Wu X.J., Yan Y.C., and Luo X.H., 1997, A strategy for developing wide spectrum compatibility rice line, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 30(4): 1-8 (袁隆平, 武小金, 颜应成, 罗孝和, 1997, 水稻广谱广亲和系的选育策略, *中国农业科学*, 30(4): 1-8)
- Zhang Q.F., Liu K.D., Yang G.P., Saghai Maroof M.A., Xu C.G., and Zhou Z.Q., 1997, Molecular marker diversity and hybrid sterility in indica-japonica rice crosses, *Theor. Appl. Genet.*, 95(1-2): 112-1181  
<http://dx.doi.org/10.1007/s001220050538>
- Zhang S.L., Ni D.H., Yi C.X., Li L., Wang X.F., Wang Z.Y., and Yang J.B., 2005, Reducing amylose content of indica rice variety 057 by molecular marker-assisted selection, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 19(5): 467-470 (张士陆, 倪大虎, 易成新, 李莉, 汪秀峰, 王宗阳, 杨剑波, 2005, 分子标记辅助选择降低籼稻 057 的直链淀粉含量, *中国水稻科学*, 19(5): 467-470)
- Zhao Z.G., Chen L.M., Jiang L., and Wan J.M., 2010, Breeding of an indica-compatible japonica photoperiod-sensitive genic male sterile line in rice and its heterosis, *Zajiao Shuidao (Hybrid Rice)*, 25(S): 256-263 (赵志刚, 陈亮明, 江玲, 万建民, 2010, 水稻粳型亲籼光温敏不育系 509S 的选育及杂种优势, *杂交水稻*, 25(S): 256-263)
- Zheng D.S., Liu X., and Li Y., 2012, Cultivated plants originated in China, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 13(1): 1-10 (郑殿升, 刘旭, 黎裕, 2012, 起源于中国的栽培植物, *植物遗传资源学报*, 13(1): 1-10)
- Zhu D.F., Cheng S.H., Zhang Y.P., Lin X.Q., and Chen H.Z., 2010, Analysis of Status and Constraints of Rice Production in the World, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 43(3): 474-479 (朱德峰, 程式华, 张玉屏, 林贤青, 陈惠哲, 2010, 全球水稻生产现状与制约因素分析, *中国农业科学*, 43(3): 474-479)

### 论文荐读

#### 研究报告/Research Report

凤丹 SRAP-PCR 反应体系的优化/ 1001-1007

Optimization of SRAP-PCR Reaction System of *Paeonia ostii*

李健(Li J.), 胡永红(Hu Y.H.), 秦俊(Qin J.), 韩继刚(Han J.G.), 刘焯(Liu Z.), 蒲立栋(Pu L.D.), 奉树成(Feng S.C.)

#### 研究论文/Research Article

利用双向电泳方法初步分析大豆根、茎、叶蛋白质特点/ 1008-1015

Characters of Root, Stem and Leaf Proteins in Soybean Analyzed Using a 2-DE Approach

董玉梅(Dong Y.M.), 苏源(Su Y.), 余萍(Yu P.), 梅馨月(Mei X.Y.), 杨敏(Yang M.), 何霞红(He X.H.), 李成云(Li C.Y.)



请扫描二维码, 下载当篇文章