

DOI: 10.1360/yc-007-0455

# 水稻 CMS 相关基因在稻属 AA 基因组中的分布及其单核苷酸多态性

段世华<sup>1,2</sup>, 李绍清<sup>1</sup>, 李阳生<sup>1</sup>, 熊云<sup>3</sup>, 朱英国<sup>1</sup>

1. 武汉大学生命科学院植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072;
2. 井冈山大学生命科学学院, 吉安 343009;
3. 湖北省监狱管理局, 武汉 430006

**摘要:** 水稻线粒体基因组嵌合基因 *orf79* 和 *orfH79* 分别被认为与 BT-型和 HL-型水稻 CMS 有关, 两者具有 98% 的同源性, 并且其 DNA 序列只存在 4 核苷酸的差异。对于这两个嵌合基因, 前者来源于栽培稻 (*Oryza sativa* L.), 而后者则来源于普通野生稻 (*O. rufipogon* Griff.)。这意味着 *orf79/orfH79* 可能在广泛分布于稻属 AA 基因组中。为了调查 *orf79/orfH79* 在稻属物种中的分布和变异, 190 份栽培稻品系 [包括 156 份亚洲栽培稻 (*O. sativa* var. *landrace*) 和 34 份非洲栽培稻 (*O. glaberrima*)] 以及 104 份稻属 AA 基因组野生稻品系 (包括 *O. rufipogon*, *O. nivara*, *O. glumaepatula*, *O. barthii*, *O. longistaminata* 和 *O. meridionalis* 6 个种), 被用于 PCR 扩增检测。31 份具有控制粤泰 A 和籼锦 A 的特异片段的稻属 AA 基因组水稻品系被检测出。所有特异片段均被回收并测序, 基于 DNA 序列的聚类结果显示 31 份水稻材料被分成了两组, 分别代表为 BT-型和 HL-型水稻不育细胞质组群。结果也进一步表明: HL-型水稻 CMS 胞质主要分布于一年生的 *O. nivara* 中; BT-型水稻 CMS 胞质可能来源于栽培稻变种或多年生野生稻 *O. rufipogon*。

**关键词:** 细胞质雄性不育; *orf79* 和 *orfH79*; 稻属; AA 基因组; 单核苷酸多态性

## Distribution and SNPs of the rice CMS-related gene in AA-genome of *Oryza* species

DUAN Shi-Hua<sup>1,2</sup>, LI Shao-Qing<sup>1</sup>, LI Yang-Sheng<sup>1</sup>, XIONG Yun<sup>3</sup>, ZHU Ying-Guo<sup>1</sup>

1. Ministry of Education Key Laboratory for Plant Developmental Biology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China;
2. College of Life Science, Jinggangshan University, Ji'an 343009, China;
3. Management Bureau of Prison, Hubei Province, Wuhan 430006, China

**Abstract:** The moiety of a chimeric gene in mitochondrial genome, *orf79* and *orfH79*, probably related to BT-type and HL-type CMS of rice respectively, has 98% homology and only 4 nucleotide variation in DNA sequence. Of which, the former comes from *Oryza sativa* L., and the latter originates from *Oryza rufipogon* Griff. That means the *orf79/orfH79* may widely exist in *Oryza* species with AA genome. In order to investigate the distribution and difference of *orf79/orfH79* in the *Oryza* species, 190 cultivated rice accessions (including *O. sativa* and *O. glaberrima*) and 104 accessions of AA-genome

收稿日期: 2006-08-04; 修回日期: 2006-09-25

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2006CB101700)和自然科学基金项目(编号: 30571144)资助[Supported by Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program) (No. 2006CB101700) and the National Nature Science Foundation of China (No. 30571144)]

作者简介: 段世华(1968—), 男, 博士生, 研究方向: 植物发育遗传学。E-mail: shihua\_duan@yahoo.com

通讯作者: 朱英国(1939—), 男, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 研究方向: 植物发育遗传学。E-mail: zhuyg@public.wh.hb.cn

*Oryza* wild species (including *O. nivara*, *O. rufipogon*, *O. barthii*, *O. longistaminata*, *O. glumaepatula*, and *O. meridionalis*) were detected with PCR amplification. Of which, 31 accessions mainly from AA-genome *Oryza* species were found to share the special amplified fragment with the control of Yuetai A and Shijin A. The special amplified fragments were all recovered and sequenced. Phylogenetic analysis based on DNA sequences showed that the 31 accessions were fallen into two groups, correspondingly representing HL-type and BT-type cytoplasm group. Further, the results revealed that the HL-type cytoplasm distributed mainly in annual *O. nivara*, and the BT-type cytoplasm centered in cultivated varieties or perennial *O. rufipogon*.

**Keywords:** cytoplasmic male sterility; *orf79* and *orfH79*; *Oryza*; AA-genome; single nucleotide polymorphisms

细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)是高等植物中普遍存在的一种生物学现象。它是受细胞核和细胞质双重控制的一种母性遗传性状,是农作物杂交优势利用的基础。自从1969年Shinijyo<sup>[1]</sup>成功将籼稻“Chinsurah Boro II”的细胞质转入粳稻栽培种“台中65”中,并获得第一个水稻细胞质雄性不育系以来,许多新的水稻CMS系通过种间或者亚种间杂交而获得<sup>[2]</sup>。其中,野败型(Wild-abortive WA)、包台型(BT)和红莲型(Honglian HL)由于其败育特征和恢保关系的不同,被认为是3种不同类型的水稻CMS系统<sup>[3]</sup>。在我国,WA-型水稻CMS系是公认的目前对杂交水稻生产发展贡献最大的不育系<sup>[4,5]</sup>,其他类型的水稻CMS系,例如HL-型和BT-型等,由于它们高产、优质、抗病虫、或者对高纬度、高海拔、低气温环境的适应等优良特性也得到了相当规模的推广和应用<sup>[6]</sup>。在杂交水稻的育种过程中,选择优异的雄性不育系是培育优质高产组合的必要条件。通常新型水稻CMS系的获得是利用具有优异不育细胞质的品系,通过原生质融合或者与其他相应的保持系回交而获得<sup>[7]</sup>。因此,发掘培育不同类型和来源的水稻雄性不育细胞质,不仅对丰富雄性不育细胞质的遗传多样性,而且对避免由于细胞质的单一性引起的遗传脆弱而导致生产风险具有非常重要的意义。

稻属AA基因组野生近缘种由于与栽培稻品种同属于AA基因组,生产上很容易通过有性杂交方式从这些品种中转移优异基因。因此具有AA基因组的野生稻以及农家栽培品种是水稻雄性不育细胞质的有利种质来源。目前,生产上广泛应用的WA-型、HL-型和马协型等水稻雄性不育细胞质均是来源相应的野生稻物种或性状原始的农家品种<sup>[8]</sup>。在野生稻以及农家品种中发掘新的水稻不育细胞质不仅对丰富水稻CMS的多样性和促进杂交水稻的可持续生产,而且为我们更好地了解水稻CMS的起源与进化提供了更多的信息。过去通过大量的普通杂交来进

行选育的方式既费时又费力,因此,在育种实践中利用植物的某种特有性状标记,采用现代生物技术的手段<sup>[9]</sup>,例如分子标记辅助选择,可以大大地提高了筛选的效率和准确性。BT-型和HL-型水稻CMS线粒体相关嵌合基因*orf79*和*orfH79*的发现与证实<sup>[10~13]</sup>,为我们提供了通过简单的实验程序,在相关物种中发掘新的具有HL-型或BT-型水稻雄性不育细胞质的CMS系的可能性。本研究利用分子生物学手段,分析了BT-型和HL-型水稻CMS系线粒体相关嵌合基因*orf79*和*orfH79*在稻属AA基因组中的分布及其单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs),为新的水稻CMS细胞质的发掘和培育提供一定的理论依据和实践指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

从190份分别来自不同稻作国家的栽培稻农家品种和非洲栽培稻(*Oryza glaberrima*)品系以及104份来自广泛地理分布的稻属AA基因组野生稻(包括*O. rufipogon*、*O. nivara*、*O. glumaepatula*、*O. barthii*、*O. longistaminata*和*O. meridionalis*6个野生稻种)品系中,用HL-型和BT-型水稻CMS系线粒体基因组特有的可读阅读框*orf79*和*orfH79*作为标记进行筛选。共筛选出31份具有标记片段的水稻品系(表1)。包括HL-型水稻CMS系粤泰A及其保持系粤泰B、BT-型水稻CMS系筲锦A及其保持系筲锦B以及利用标记筛选出的31个水稻品系在内的共35份水稻材料用于本实验进一步分析。除4个不育系和保持系材料由本实验提供外,其他实验材料均由菲律宾国际水稻所种质资源中心提供。所有水稻材料均种植在武汉大学校园内的试验田中。

### 1.2 基因组总DNA和线粒体DNA的提取

用于标记筛选的水稻材料的基因组总DNA的提取采用Doyle等<sup>[14]</sup>的方法,从3~5颗由种子萌发

表1 本研究中使用的水稻材料

Table 1 Rice materials used in the present study

编号 No.	种名-亚种名 Species name-subspecies name	品系号或变种名 Accession No. or variety name	代码 Code	来源 Origin
01	<i>O. sativa</i> Landrace	47078	SA-CAM-1	Cameroon
02	<i>O. sativa</i> Landrace	56681	SA-CAM-2	Cameroon
03	<i>O. sativa</i> Landrace	64771	SA-BAN-1	Bangladesh
04	<i>O. sativa</i> Landrace	66765	SA-BAN-2	Bangladesh
05	<i>O. sativa</i> Landrace	77263	SA-BAN-3	Bangladesh
06	<i>O. sativa</i> Landrace	77276	SA-BAN-4	Bangladesh
07	<i>O. sativa</i> Landrace	67708	SA-IND-1	India
08	<i>O. sativa</i> Landrace	74748	SA-IND-2	India
09	<i>O. sativa</i> Landrace	74773	SA-IND-3	India
10	<i>O. sativa</i> Landrace	77530	SA-IND-4	India
11	<i>O. sativa</i> Landrace	76341	SA-PAK-1	Pakistan
12	<i>O. sativa</i> Landrace	76418	SA-PAK-2	Pakistan
13	<i>O. nivara</i>	101978	NI-IND	India
14	<i>O. nivara</i>	103415	NI-SLA-1	Sri Lanka
15	<i>O. nivara</i>	103419	NI-SLA-2	Sri Lanka
16	<i>O. nivara</i>	103835	NI-BAN-1	Bangladesh
17	<i>O. nivara</i>	103841	NI-BAN-2	Bangladesh
18	<i>O. nivara</i>	105712	NI-CAB-1	Cambodia
19	<i>O. nivara</i>	105728	NI-CAB-2	Cambodia
20	<i>O. nivara</i>	106153	NI-LAO	Laos
21	<i>O. rufipogon</i>	103305	RU-PHI	Philippines
22	<i>O. rufipogon</i>	104057	RU-CHI	China
23	<i>O. rufipogon</i>	104599	RU-SLA	Sri Lanka
24	<i>O. rufipogon</i>	105349	RU-IND	India
25	<i>O. rufipogon</i>	105491	RU-MAL	Malaysia
26	<i>O. rufipogon</i>	105696	RU-NEP	Nepal
27	<i>O. rufipogon</i>	106321	RU-CAB	Cambodia
28	<i>O. glumaepatula</i>	100968	GL-SUR	Suriname
29	<i>O. glumaepatula</i>	105661	GL-BRA	Brazil
30	<i>O. meridionalis</i>	82041	ME-AUS-1	Australia
31	<i>O. meridionalis</i>	82042	ME-AUS-2	Australia
32	<i>O. sativa</i> ssp. indica	Yuetai A	HL- <i>orfH79</i>	China
33	<i>O. sativa</i> ssp. indica	Yuetai B	-	China
34	<i>O. sativa</i> ssp. japonica	Shijin A	BT- <i>orf79</i>	China
35	<i>O. sativa</i> ssp. japonica	Shijin B	-	China

产生的植株叶片中提取。筛选出的 31 份水稻材料以及 4 份不育系和保持系材料的线粒体提取参照 Michael 等<sup>[15]</sup>的方法并略作修改, 所有操作在 4 ℃ 下进行。

### 1.3 PCR 扩增

根据已知序列的 HL-型和 BT-型水稻 CMS 系线粒体基因组特有的可读阅读框 *orfH79* 和 *orf79* 两端的保守同源序列设计共用引物对, Y<sub>1</sub>: 5'-TGA-CAAATCTGCTCCGATG-3'; Y<sub>2</sub>: 5'-CTTACTTAGG-AAAGACTAC-3'。PCR 扩增参照 Yi 等<sup>[12]</sup>描述的程序执行, 以所有被筛选材料的基因组总 DNA 或相关材料的线粒体 DNA 为模板, Y<sub>1</sub>和 Y<sub>2</sub>为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 25 μL, 其中 *Taq* 酶 1.0 U, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mol/L, 10× 缓冲液 2.5 μL, dNTPs 200 μmol/L, DMSO 1.0 μL, 模板 DNA 60 ng, 上下游引物均为 0.2 μmol/L, PCR 程序为 94 ℃ 变性 2 min; 94 ℃ 50 s 55 ℃

50 s, 72 ℃ 50 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 8 min。

### 1.4 扩增 DNA 片段的回收、克隆和序列测定

将各实验材料(31 份被筛选出的水稻材料以及 4 份不育系和保持系材料)的线粒体 DNA 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离后, 用 DNA 回收试剂盒(Fermentas K0513, Canada)对各水稻材料的 PCR 扩增产物回收并纯化。然后根据克隆载体试剂盒内提供的操作指南将回收纯化的 DNA 片段分别克隆到 T 载体上(pGEM T-Vector, Promega A3600, U.S.A)。受体菌为 DH5α。在选择性(氨苄青霉素)固体培养基上进行转化菌落的培养。挑选 5~8 个阳性克隆并进行菌落 PCR 验证, 以确证目标片段的插入。为保证测序结果的准确性, 每个水稻材料挑选 3 个以上确证有插入片段的阳性克隆进行测序。序列测定由上海联合基因公司完成。

## 1.5 序列分析和系统进化树的构建

所有序列通过 CLUSTAL-X<sup>[16]</sup> 软件进行排序比对并辅以人工校正。聚类分析应用 PAUP4.0 版<sup>[17]</sup> 软件中的简约法进行运算, 最大简约性(Maximum parsimony, MP)分析通过 MULRARS 的启发式搜寻, TBR 和 1,000 次循环的 random stepwise addition 完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 *orf79* 和 *orfH79* 在稻属 AA 基因组物种中的分布

为了检测 HL-型和 BT-型水稻 CMS 系线粒体基因组特有的可读阅读框 *orf79* 和 *orfH79* 片段在稻属 AA 基因组的其他品系中的存在。利用已知序列信息的 *orf79* 和 *orfH79* 片段设计的引物对 Y<sub>1</sub> 和 Y<sub>2</sub>, 对 294 份稻属 AA 基因组水稻材料进行筛选。结果获得 31 份水稻材料具有 *orf79h* 和 *orfH79* 片段(表 1)。这 31 份水稻材料分别隶属于稻属 AA 基因组的五个种: *O. rufipogon*(7)、*O. nivara*(8)、*O. sativa* Landrace (12)、*O. glumaepatula*(2) 和 *O. meridionalis*(2)。筛选结果表明 HL-型和 BT-型水稻雄性不育细胞质有着广泛的地理分布。分别提取 31 份被筛选出水稻材料以及 4 份不育系和保持系材料的线粒体 DNA, 利用前文所用引物对 Y<sub>1</sub> 和 Y<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增验证, 结果确证 31 份水稻材料线粒体基因组中均有目标片段的在(图 1), 说明了筛选结果的准确性。

### 2.2 单核苷酸多态性(SNPs)分析

对包括 2 个不育系在内(保持系中不具有目标 DNA 片段)的 33 份水稻材料的扩增 DNA 片段进行了序列测定。利用 CLUSTAL-X 软件对 33 份水稻材料的 DNA 序列进行比对分析。结果显示在总 DNA 长度为 240 bp 的序列中共检测到 13 个(5.4%)变异位点, 其中 4 个(1.7%)位点为信息位点(表 2)。在 4 个信息位点中, 第 142(A→T)、146(A→C)和 147(A→

C,T)3 个位点表现为碱基颠换模式, 而第 178(C→T)位点则为碱基转换。剩下的 9 个非信息变异位点分别发生在单个样品材料的 DNA 序列中, 其中第 4(A→G)、23(T→C)、42(G→A)、89(C→T)、102(T→C)、164(A→G)和 202(T→C)7 个位点为碱基转换, 第 13(C→G)和 97(T→G)位点为碱基颠换。氨基酸序列比对分析显示, 13 个碱基变异位点中有 10 个位点导致了氨基酸的改变, 剩下的 3 个碱基变异位点(第 42, 102 和 147)皆为同义替换, 并未引起多肽氨基酸的变化(表 3)。10 个氨基酸变异位点中, 第 48、49 和 60 位点为氨基酸变异信息位点, 在第 48 位氨基酸位点上, 19 份水稻材料的氨基酸与 BT-型水稻 CMS 系籼锦 A 的 ORF79 多肽一样同为蛋氨酸(Met, M), 剩下的 12 个水稻品系与 HL-型水稻 CMS 系粤泰 A 的 ORFH79 多肽一样同为亮氨酸(Leu, L)。第 49 氨基酸位点, 有 12 份水稻材料的氨基酸与 BT-型 ORF79 多肽一样同为谷氨酸(Glu, E), 另外 12 份水稻材料与 HL-型 ORFH79 多肽一样同是天冬氨酸(Asp, D), 剩下的 7 份水稻材料皆为丙氨酸(Ala, A)。第 60 位点的氨基酸变化模式与第 49 位点类似, 同样的 19 份水稻材料与 BT-型 ORF79 多肽一样同为组氨酸(His, H), 其余的 12 份水稻材料与 HL-型 ORFH79 多肽一样同是酪氨酸(Tyr, Y)。其他的 7 个氨基酸位点的变化只发生在单个样品材料中(表 3)。

### 2.3 系统发生分析

利用 PAUP 4.0 软件根据 33 份稻属 AA 基因组水稻品系的 DNA 序列数据进行聚类分析(图 2)。聚类结果显示, 33 份水稻材料被分成了 2 组。有 12 个品系由于与 HL-型 CMS 系粤泰 A *orfH79* 的 DNA 序列变化模式相同而以相当高的支持率(94%)聚在了一起, 剩下的 29 份水稻材料的 DNA 序列变化模式与 BT-型水稻 CMS 系籼锦 A *orf79* 基本类似, 并以较低的支持率(低于 50%)而聚成了第二组。在这个组

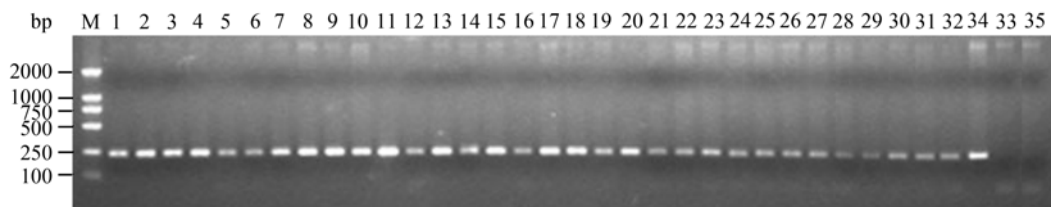


图 1 引物对 Y<sub>1</sub> 和 Y<sub>2</sub> 在 35 份水稻材料的线粒体基因组中的 PCR 扩增产物检测

1~35: 供试材料编号同表 1; M: DNA markers DL2000。

Fig. 1 PCR products of primer pairs Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub> in mitochondrial genome of 35 rice accessions

1~35: Refer to the number of materials tested as Table 1; M: DNA markers DL2000.

表 2 DNA 序列变异位点分析

Table 2 Analysis of nucleotide variation sites in DNA sequences

品系代号 Accession code	变异位点 Variation sites												
	4	13	23	42	89	97	102	142	146	147	164	178	202
ME-AUS-1	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
SA-IND-4	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	C
NI-CAM-2	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
SA-BAN-1	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	G	C	T
SA-PAK-2	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
NI-SLA-2	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
RU-PHI	A	C	T	G	C	G	T	A	A	A	A	C	T
SA-BAN-2	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
RU-MAL	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
SA-PAK-1	A	C	T	G	T	T	T	A	A	A	A	C	T
RU-SLA	A	C	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
SA-IND-3	A	C	T	A	C	T	T	A	A	A	A	C	T
BT-orf79	G	G	T	G	C	T	T	A	A	A	A	C	T
RU-CHI	A	C	T	G	C	T	T	A	C	T	A	C	T
RU-IND	A	C	T	G	C	T	T	A	C	T	A	C	T
SA-CAR-1	A	C	T	G	C	T	T	A	C	A	A	C	T
SA-CAR-2	A	C	C	G	C	T	T	A	C	A	A	C	T
SA-IND-1	A	C	T	G	C	T	C	A	C	A	A	C	T
SA-BAN-3	A	C	T	G	C	T	T	A	C	A	A	C	T
SA-BAN-4	A	C	T	G	C	T	T	A	C	A	A	C	T
HL-orfH79	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
GL-SUR	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
GL-BRA	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
NI-IND	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
NI-SLA-1	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
NI-BAN-1	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
NI-BAN-2	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
NI-CAM-1	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
NI-LAO	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
RU-NEP	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
RU-CAM	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
ME-AUS-2	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T
SA-IND-2	A	C	T	G	C	T	T	T	A	C	A	T	T

内由于品系间 DNA 序列的微小变异而被分成了 3 个亚组, 其中的 2 份分别来自中国(RU-CHI)和印度(RU-IND)的 *O. rufipogon* 材料, 其 DNA 序列变化模式相同并以较低的支持率(56%)聚成了一支, 另外 5 份分别来自孟加拉国(2)、喀麦隆(2)和印度(1)的栽培稻农家品系 DNA 序列变化相同并以中等的支持率(64%)形成了一个亚组, 剩下的 12 份水稻材料的 DNA 序列各自与 BT-型水稻 CMS 系籼锦 A *orf79* 存在微小的变异而以较低的支持率聚在了一起。从聚类结果来看, 分别以 *orf79* 和 *orfH79* 为特征标记的 BT-型和 HL-型雄性不育细胞质在稻属 AA 基因组中普遍存在, 并具有广泛的地理分布。结果同时也表明, HL-型水稻雄性不育细胞质主要分布于 *O. nivara* 中, 而 BT-型水稻雄性不育细胞质则主要来源于栽培稻农家品种以及 *O. rufipogon* 品系。

### 3 讨论

植物 CMS 是植物杂交优势应用的基础。大量的

实验证据表明, 植物CMS的决定因子存在于线粒体基因组中<sup>[18,19]</sup>。利用与CMS相关的基因作标记, 检测其野生近缘资源中相应不育细胞质的存在, 是培育新型CMS系最为快捷有效的方法<sup>[20]</sup>。目前, 利用野生稻与栽培稻杂交进行水稻CMS系的选育, 依然是杂交水稻育种实践中的主要方式。毋庸置疑, 利用现代分子生物学手段, 例如分子标记辅助选择, 检测稻属野生近缘种中相关不育因子的存在, 对加快新型水稻CMS系的培育, 提高育种效率, 将有非常重大的意义。本研究利用BT-型和HL-型水稻CMS系线粒体基因组特有的可读阅读框*orf79* 和*orfH79* 片段为标记, 对 294 份稻属AA基因组物种的水稻品系进行筛选, 共检测到 31 个含有目的片段品系。它们分别属于稻属AA基因组的*O. rufipogon*、*O. nivara*、*O. meridionalis*、*O. glumaepatula*和*O. sativa* Landrace 5 个野生或栽培稻品种中。结果表明这两种类型的不育细胞质广泛地存在于稻属 AA 基因组中,

表 3 多肽氨基酸序列变异位点分析

Table 3 Analysis of amino acid variation sites in polypeptide

品系代号 Accession No.	变异位点 Variation sites										
	2	5	8	30	33	48	49	55	60	68	
ME-AUS-1	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
SA-IND-4	T	L	L	A	F	M	E	N	H	R	
NI-CAM-2	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
SA-BAN-1	T	L	L	A	F	M	E	S	H	W	
SA-PAK-2	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
NI-SLA-2	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
RU-PHI	T	L	L	A	V	M	E	N	H	W	
SA-BAN-2	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
RU-MAL	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
SA-PAK-1	T	L	L	V	F	M	E	N	H	W	
RU-SLA	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
SA-IND-3	T	L	L	A	F	M	E	N	H	W	
BT-orf79	A	V	L	A	F	M	E	N	H	W	
RU-CHI	T	L	L	A	F	M	A	N	H	W	
RU-IND	T	L	L	A	F	M	A	N	H	W	
SA-CAR-1	T	L	L	A	F	M	A	N	H	W	
SA-CAR-2	T	L	P	A	F	M	A	N	H	W	
SA-IND-1	T	L	L	A	F	M	A	N	H	W	
SA-BAN-3	T	L	L	A	F	M	A	N	H	W	
SA-BAN-4	T	L	L	A	F	M	A	N	H	W	
HL-orfH79	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
GL-SUR	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
GL-BRA	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
NI-IND	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
NI-SLA-1	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
NI-BAN-1	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
NI-BAN-2	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
NI-CAM-1	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
NI-LAO	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
RU-NEP	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
RU-CAM	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
ME-AUS-2	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	
SA-IND-2	T	L	L	A	F	L	D	N	Y	W	

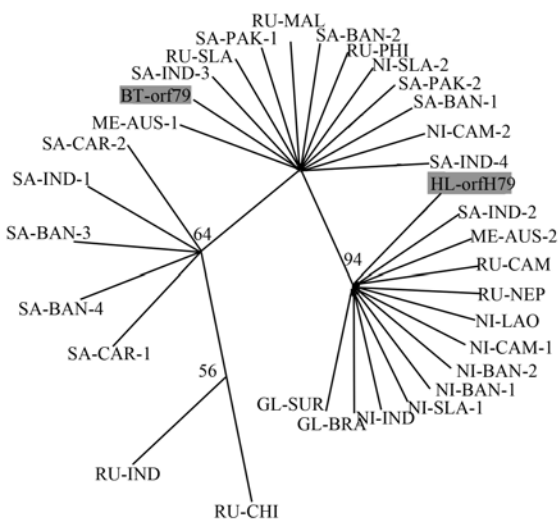


图 2 根据 33 份水稻材料的 *orf79* 和 *orfH79* DNA 序列构建的系统发生树  
 树枝线上的数值为大于 50% 的支持率，树状图上材料的编码同表 1。  
 Fig. 2 Phylogenetic tree based on *orf79* and *orfH79* DNA sequences of 33 rice accessions  
 Number above branches indicate bootstrap values above 50%. The code of studied materials on the tree as Table 1.

并各自具有广泛的地理分布。研究结果也给新型水稻 CMS 系的培育提供了重要的理论依据和实践指导。

细胞遗传学的研究表明，BT-型和HL-型水稻CMS系同属于配子体不育，但由于其败育时期的不同而被认为是两种不同类型的CMS系统<sup>[8]</sup>。Akagi等<sup>[10]</sup>发现包台型水稻CMS系线粒体中不正常*atp6*拷贝(B-*atp6*)基因的下游具有一个编码 79 个氨基酸的ORF，将其命名为*orf79*，并认为其可能与细胞质雄性不育有关。Wang等<sup>[13]</sup>2006 年通过转基因研究证实了*orf79*与包台型水稻CMS的关系。Yi等<sup>[12]</sup>2002 年研究证实，HL-型CMS系线粒体基因组*atp6*基因的下游与BT-型CMS系线粒体基因组*atp6*基因一样也包含一段编码 79 个氨基酸的ORF，被命名为*orfH79*，并与BT-型水稻CMS系 *orf79* 有 98% 的同源性。在本研究中，DNA序列数据分析显示，31 份稻属AA基因水稻材料的*orf79* 和*orfH79* 片段中，共检测出 13 个核苷酸变异位点，其中 4 个为信息变异位点。氨基酸序列比对结果显示，4 个碱基信息变异位点中有 3 个

导致了编码氨基酸的改变。通常发生在编码区的碱基序列的改变将导致编码氨基酸的改变, 从而产生多肽序列的改变, 最终可能影响多肽功能<sup>[21]</sup>。因此, 这种差异可能是导致HL-型水稻CMS系与BT-型水稻CMS系败育时期不同的原因之一, 但结论有待于进一步实验证据的证实。序列分析结果还显示, 31份水稻材料由于DNA序列变化模式的差异而被明显的分成了两组, 大部分来自*O. nivara*品系的DNA序列与HL-型水稻CMS系的*orfH79*高度同源(100%), 说明HL-型水稻CMS胞质广泛分布于一年生的*O. nivara*中。而大多数的来自栽培稻农家品种和*O. rufipogon*品系中的DNA序列与BT-型水稻CMS系的*orf79*高度同源(大于97%), 这表明BT-型水稻雄性不育胞质可能来源于栽培稻变种以及多年生野生稻*O. rufipogon*。

#### 参考文献(References):

- [1] Shinjyo C. Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice, *Oryza sativa* L. . The inheritance of male sterility. *Japan Journal of Genetics*, 1969, 44: 149–156.
- [2] Virmani SS, Shinjyo C. Current status of analysis and symbols of male-sterile cytoplasm and fertility-restoring genes. *Rice Genetics Newsletters*, 1988, 5: 9–15.
- [3] ZHU Ying-Guo, MEI Qi-Ming, YU Jin-Hong. Study on the relationship between restoring and maintaining of different types of male sterile lines in rice. *Hereditas* (Beijing), 1984, 6, (5): 14–16.  
朱英国, 梅启明, 余金洪. 不同类型水稻雄性不育恢保关系. *遗传*, 1984, 6(5): 14–16.
- [4] Dalmaciao R, Brar DS, Ishii T, Sitch LA, Virmani SS, Khush GS. Identification and transfer of a new cytoplasmic male sterility source from *Oryza perennis* into indica rice (*O. sativa* L.). *Euphytica*, 1995, 82: 221–225.
- [5] Francoise B, Georges P. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Life Science*, 2001, 324: 43–550.
- [6] MAO Jia-Ning, DUAN Shi-Hua, LI Shao-Qing, ZHU Ying-Guo. Genetic analysis and identification of three groups three-line hybrid rice and their parents by RAPD markers. *Hereditas* (Beijing), 2002, 24(3): 283–287.  
毛加宁, 段世华, 李绍清, 朱英国. 利用 RAPD 分子标记对我国三组三系杂交水稻及亲本的遗传分析和鉴定. *遗传*, 2002, 24(3): 283–287.
- [7] Bijoya B, Aniruddha PS, Hari SG. Transfer of wild abortive cytoplasmic male sterility through protoplast fusion in rice. *Molecular Breeding*, 1999, 5: 319–327.
- [8] ZHU Ying-Guo. *Biology of Male Sterility in Rice*. Wuhan: Wuhan University Press, 2000.
- [9] Toenniessen GH, Tooley JCO, DeVriesz J. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Current Opinion Plant Biology*, 2003, 16: 191–198.
- [10] Akagi H, Sakamoto M, Shinjyo C, Shimada H, Fujimura T. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Current Genetics*, 1994, 25: 52–58.
- [11] Iwabuchi M, Koizuka N, Fujimoto H, Sakai T, Imamura J. Identification and expression of Kosena radish (*Raphanus sativus*. L. cv. Kosena) homologue of the ogura radish CMS associated gene, ORF138. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39: 183–188.
- [12] Yi P, Wang L, Sun QP, Zhu YG. Discovery of mitochondria chimeric gene associated with male sterility of Honglian-rice. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47: 744–747.
- [13] Wang ZH, Zou YJ, Li XY, Zhang QY, Chen LT, Wu H, Su DH, Chen YL, Guo JX, Luo D, Long YM, Zhong Y, Liu YG. Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *The Plant Cell*, 2006, 18: 676–687.
- [14] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 11–15.
- [15] Michael MR, Elise D, Chaz A, Virginia W. Isolation of RNA and DNA from rice seedling mitochondria. *Rice Genetics Newsletters*, 1988, 5: 151–154.
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876–4882.
- [17] Swofford DL. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1998.
- [18] Schnable PS, Wise RP. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Science*, 1998, 3: 175–180.
- [19] Budar F, Touzet P, Paeppe R D. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetics*, 2003, 117: 3–16.
- [20] Lössl A, Götz M, Braun A, Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica*, 2000, 116: 221–230.
- [21] ZOU Yu-Ping, GE Song. A novel molecular marker—SNPs and its application. *Biodiversity Science*, 2003, 11(5): 370–382.  
邹喻萍, 葛颂. 新一代分子标记—SNPs 及其应用. *生物多样性*, 2003, 11(5): 370–382.